



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0087514
(43) 공개일자 2009년08월17일

- (51) Int. Cl.
A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2009-7016161(분할)
- (22) 출원일자 2004년08월03일
심사청구일자 2009년07월31일
- (62) 원출원 특허 10-2006-7002436
원출원일자 2006년02월03일
심사청구일자 2009년07월31일
- (85) 번역문제출일자 2009년07월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2004/024840
- (87) 국제공개번호 WO 2005/016266
국제공개일자 2005년02월24일
- (30) 우선권주장
60/492,430 2003년08월04일 미국(US)
- (71) 출원인
브리스톨-마이어스 스킵 컴퍼니
미합중국 뉴저지주 08540 프린스턴 루트 206 앤드
프로빈스 라인 로드
- (72) 발명자
루스네이크, 제임스
미국 18940 펜실베니아주 뉴타운 파인빌 로드 540
- (74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 사용한 심혈관 질환의 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 리간드에 결합하여 내인성 B7 분자를 차단하는 가용성 CTLA4 분자를 대상체에게 투여함으로써 심혈관계 질환을 치료하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1a

인구통계 데이터 -1-

		플라시보 N=32	CTLA.5 N=26	CTLA.2 N=32	CTLA.10 N=32	LEA.5 N=32	LEA.2 N=29	LEA.10 N=31	전체 N=214
성별	남성	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
	여성	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
	인종								
	백인종	30 (94%)	23 (88%)	30 (94%)	30 (94%)	29 (91%)	25 (86%)	27 (87%)	194 (91%)
	흑인종	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3%)	3 (10%)	2 (6%)	9 (4%)
	기타	0 (0%)	3 (12%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	11 (5%)
질환 지속기간	<2년	12 (38%)	5 (19%)	8 (25%)	12 (38%)	10 (31%)	10 (34%)	11 (35%)	68 (32%)
	2-5년	14 (44%)	11 (42%)	18 (56%)	13 (41%)	14 (44%)	14 (48%)	12 (39%)	96 (45%)
	5-7년	6 (19%)	8 (31%)	6 (19%)	6 (19%)	6 (19%)	5 (17%)	7 (23%)	44 (21%)
	>7년	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	6 (3%)
질환 지속 시간 (년)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	평균	3.2	4.2	3.3	3.4	3.7	3.1	3	3.4
	Sd	2	2	1.7	2.1	2	1.8	2.2	2
	최소 최대	0.3 7	0.2 7.5	0.4 6.8	0 7.3	0.7 7.6	0.4 7	0 7.1	0 7.6

특허청구의 범위

청구항 1

활성화된 B 세포 상에 발현된 B7-1 또는 B7-2 항원과 결합하는 CTLA4 분자의 세포의 도메인 또는 그의 일부를 포함하는 유효량의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 포함하는, 심혈관 질환을 치료하기 위한 제약 조성물이며, 여기서 CTLA4 돌연변이체 분자의 세포의 도메인은 위치 +1에서의 메티오닌 또는 위치 -1에서의 알라닌에서 개시하여 위치 124에서 아스파르트산으로 종결하는 도 23에서 나타낸 아미노산을 포함하고, CTLA4 분자의 세포의 도메인에서의 돌연변이체를 포함하며, 심혈관 질환은 죽상동맥경화증인 것인 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 심혈관 질환이 CRP, hsCRP, IL-10, CD40L, sCD40L, IL-6, sICAM-1, TNF- α , 백혈구 수, 피브리노겐 및 혈청 아밀로이드 A로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 염증 마커와 연관된 것인 제약 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 염증 마커가 CRP, hsCRP, IL-6 및 TNF- α 로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자의 유효량이 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 0.5 내지 5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 10 내지 15 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 15 내지 20 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 20 내지 25 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 25 내지 30 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 30 내지 35 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 35 내지 40 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 40 내지 45 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 45 내지 50 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 50 내지 55 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 55 내지 60 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 60 내지 65 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 65 내지 70 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 70 내지 75 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 75 내지 80 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 80 내지 85 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 85 내지 90 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 90 내지 95 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 95 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 4 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 0.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 1.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 1.0 내지 1.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 1.5 내지 2.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2.0 내지 2.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2.5 내지 3.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 3.0 내지 3.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 3.5 내지 4.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4.0 내지 4.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4.5 내지 5.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5.0 내지 5.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5.5 내지 6.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6.0 내지 6.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6.5 내지 7.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 7.0 내지 7.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 7.5 내지 8.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8.0 내지 8.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8.5 내지 9.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 9.0 내지 9.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 9.5 내지 10.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 2 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2 내지 4 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4 내지 6 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6 내지 8 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 10 내지 12 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 12 내지 14 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 14 내지 16 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 16 내지 18 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 18 내지 20 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 2 mg, 대상체의 체중 kg 당 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 20 mg이고, 체중이 60 kg 미만인 대상체의 경우에는 약 500 mg, 체중이 60 내지 100 kg인 대상체의 경우에는 750 mg, 또는 체중이 100 kg 초과인 대상체의 경우에는 1000 mg인 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자가 CTLA4 돌연변이체 융합 분자인 제약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, CTLA4 돌연변이체 융합 분자가, 비-CTLA4 분자에 연결되어 있는, 활성화된 B 세포 상에 발현된 B7-1 또는 B7-2 항원과 결합하는 CTLA4 분자의 세포의 도메인 또는 그의 일부를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 비-CTLA4 분자가 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자의 용해도 또는 친화도를 변경시키는 아미노산 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 용해도 또는 친화도를 변경시키는 아미노산 서열이 면역글로불린 부분을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 면역글로불린 부분이 이펙터 기능을 변경시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 면역글로불린 부분이 힌지(hinge)를 포함하고, 힌지 내의 일부 또는 모든 시스테인 잔기가 세린으로 치환되는 것인 제약 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 면역글로불린 부분이 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부인 제약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부가 이펙터 기능을 변경시키도록 돌연변이된 것인 제약 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 면역글로불린 불변 영역이 면역글로불린 분자의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부가 인간 또는 원숭이의 면역글로불린 불변 영역 또는 그의 일부인 제약 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자가

(a) CTLA4의 세포의 도메인이 도 23에서 나타낸 것과 같이 위치 +1에서의 메티오닌 또는 위치 -1에서의 알라닌에서 개시하여 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결하고;

CTLA4의 세포의 도메인의 위치 +104에서 루이신이 임의의 다른 아미노산으로 치환된 CTLA4의 세포의 도메인을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자가

(a) CTLA4의 세포의 도메인이 도 23에서 나타낸 것과 같이 위치 +1에서의 메티오닌 또는 위치 -1에서의 알라닌에서 개시하여 위치 +124에서의 아스파르트산으로 종결하고;

(b) CTLA4의 세포의 도메인의 위치 +104에서 루이신이 글루탐산으로 치환되고;

(c) CTLA4의 세포의 도메인의 위치 +29에서 알라닌이 티로신으로 치환된 CTLA4의 세포의 도메인을 포함하는 것

인 제약 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자가 도 19에서 나타낸 것과 같이 위치 +1에서의 메티오닌 또는 위치 -1에서의 알라닌에서 개시하여 위치 +357에서의 라이신으로 종결하는, 도 19에서 나타낸 것과 같은 L104EA29YIg인 제약 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 심혈관 질환이 CRP, hsCRP, IL-10, CD40L, sCD40L, IL-6, sICAM-1, TNF- α , 백혈구 수, 피브리노겐 및 혈청 아밀로이드 A로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 염증 마커와 연관된 것인 제약 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 일반적으로 심혈관 질환의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 유효량의 가용성 CTLA4 분자를 대상체에게 단독으로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여함으로써 심혈관 질환을 치료하거나 예방하는 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 대략 6,200만명의 미국인이 관상동맥 심장 질환 (CHD)을 수반하는 하나 이상의 심혈관 질환을 앓고 있으며, 미국에서만 해도 1,700만명 초과와 환자가 줄증으로 고통받고 있다 (자료 [American Heart Association, 2002 Heart and Stroke Statistical Update] 참조, 미국 텍사스주 댈러스; 미국 심장 협회; 2001). 수많은 치료법과 기술적 진보가 있었음에도 불구하고, 이들 질환으로 인한 이환율과 사망률은 지나치게 높다. 사실상, 심혈관 질환은 미국에서 5건의 사망 당 2건과 관련이 있는 제1 사망 원인이다. 따라서, 심혈관 질환의 치료와 예방에 관한 새로운 접근법이 요구된다.

<3> CHD의 제1 원인인 죽상동맥경화증은 동맥 혈관벽에서 지질이 수동적으로 축적되는 과정이며 점차적으로 심혈관 질환의 증상을 발생시킨다는 개념은 더이상 수용되지 않는다 (문헌 [Scientific American 2002 (May):46-55] 참조). 대신, 상기 가설은 심혈관 질환이 만성 염증 과정이라는 증거로 대체되고 있다 (문헌 [Circulation 2002; 105:1135-43] 참조). 근원적이고 전조가 되는 급성 관상동맥 또는 뇌혈관 사건은 "취약한(vulnerable)" (또는 고위험률의) 아테롬성 플라크(들)임이 제안된 바 있다. 염증은 불안정형 협심증 (UA) 및 급성 심근경색증 (AMI)을 초래하는 플라크 불안정성 및 파열의 주된 기여 인자라고 여겨진다. 취약 플라크는 단일 병변 (주(主)(culprit) 병변)에만 국한되는 것이 아니라 해부학적으로 상이한 수많은 위치에 존재하는 경우가 흔한 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Circulation 2003; 107:2072-2075] 참조). 취약 플라크의 다병소성은 부검 관련 문헌 및 혈관조영술, 혈관내 초음파술 (IVUS), 모세혈관현미경술 또는 온도기록술을 이용한 연구에 대한 문헌에 기고된 바 있다. 이러한 가설을 추가로 뒷받침하는 임상 종말점 데이터 (예를 들어 사망, 심근경색증, 줄증)는 역학 데이터, 완결된 임상 시험의 분석을 통한 회고(retrospective) 가설 도출, 및 임상 시험에서의 예측 평가 (하기에서 요약함)로부터 추론된다.

<4> 치료자의 건강상태 연구(Physician's Health Study)로부터 얻은 역학 데이터는 염증 마커 (예를 들어 C-반응성 단백질 [CRP], 피브리노겐, 인터루킨-6, 가용성 세포내 유착 분자-1 [sICAM-1])가 후후의 AMI 발생 위험에 대한 전조라는 명백한 증거를 제공한다 (문헌 [Circulation 1999; 100:1148-1150] 참조). 이후에는, 매우 많은 집단에 대한 역학 연구가 유사한 관찰결과를 보고한 바 있다 (문헌 [Circulation 2002; 105:1135-43] 참조). CRP (및 고감도 CRP [hs-CRP])는 이러한 역학 연구에서 가장 광범위하게 연구되는 염증성 마커였다. CRP는 1차 예방 및 2차 예방 환자 집단 둘다에 있어서 이후의 심혈관 사건 (AMI, 사망)에 대한 독립적인 예측변수라고 여겨진다.

<5> 실험적 증거와 임상적 증거는 염증이 감소되면 임상 사건이 줄어든다는 관념을 뒷받침한다. 아스피린은 치료자의 건강상태 연구에서 CRP 측정을 통해 염증의 감소와 관련이 있는 것으로 나타났고, 관상동맥 사건들의 동시

감소와 관련이 있다 (문헌 [Circulation 1999; 100:1148-1150] 참조). 이러한 발견과 관련하여, 외관상 건강한 인간 집단에서는 아스피린의 소염 효과/CRP 감소 효과와 항혈소판 효과가 대비되는 정도차가 어느 정도인지에 대해 알려져 있지 않다. 히드록시-3-메틸글루타릴 조효소 A (HMG-CoA) 리덕타제 억제제 ("스타틴"; 예를 들어 프라바스타틴, 심바스타틴, 아토르바스타틴, 플루바스타틴 및 로바스타틴)는 소염성을 갖는 현행 요법의 두 번째 예이다. 스타틴은 혈청 지질에 영향을 미칠 뿐만이 아니라 CRP를 감소시키기도 한다 (문헌 [Circulation 2002; 105:1135-43] 참조). 콜레스테롤 및 재발성 사건 (CARE, Cholesterol and Recurrent Event) 연구에서의 프라바스타틴은, 스타틴 요법이 저밀도 지단백질 (LDL) 또는 고밀도 지단백질 (HDL) 콜레스테롤과는 관련이 없는 방식으로 CRP를 저하시킨다는 첫 번째 임상적 증거를 제공하였다. 이러한 고콜레스테롤 집단에서 이후의 심혈관 사건에 대한 상대적 위험률 감소의 크기는, 염증 역시 있는 것으로 입증된 (즉, CRP 상승) 대상체에서 염증의 증거가 없는 대상체에서보다 더 높았다 (문헌 [Circulation 1999; 100:230-235] 참조). 이러한 관찰결과는 프라바스타틴 염증 CRP 평가 (PRINCE, Pravastatin Inflammation CRP Evaluation) 연구에서 예측적으로 뒷받침되었고, 각종 스타틴을 사용한 여러 다른 시험의 분석에서도 보고되었다 (문헌 [Circulation 2002; 105:1135-43] 참조).

- <6> CRP가 상승된 환자에서의 스타틴 요법 효과가 콜레스테롤이 상승된 환자에서의 경우와 다르다는 증거는, AFCAPS/TexCAPS (Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study; 문헌 [New. Engl J Med 2001; 344:1959-1965] 참조)로부터 추론된다. 이 연구는 심혈관 위험이 낮거나 중간 정도인 집단에서 로바스타틴을 사용한 1차 예방 연구였다. 이 연구에서, 로바스타틴에 의한 위험률 감소의 크기는 플라시보를 사용한 경우에 비해 거의 저수준의 LDL/고수준의 CRP인 환자를 고수준의 LDL/저수준의 CRP인 환자와 비교한 경우만큼 높았다.
- <7> 이러한 발견은, 현재로서는 임상적 관행 지침상의 관리 기준이 아닌 염증이 새로운 카테고리의 위험임을 시사하는 것이다. 모든 심장 발작의 대략 절반이 콜레스테롤 수준이 정상적인 집단에서 발생하기 때문에, 새로 발견된 위험 인자의 확인 및 조정이 심혈관의 이환율과 그로 인한 사망률을 감소시키는데 있어서 중요한 전략이 될 것이다. 대략 2,500만명의 미국인이 이러한 저-LDL/고-CRP의 코호트(cohort)에 속하는 집단이라고 추정된다 (문헌 [Circulation 2002; 105:1135-43] 참조). CRP 상승은 심혈관 사건에 수반되는 위험과 일치하는 점진적인 방식으로 발생한다고 여겨진다. 구체적으로, CRP 상승 (> 3 mg/dL)은 건강한 개체의 10%에서 발견되지만, 미국에서 만성 안정형 협심증 환자, 불안정형 협심증 (브라운웰트(Braunwald) 클래스 IIIb) 환자 및 AMI 환자에서는 각각 이들의 < 20%, > 65% 및 > 90%에서 발견된다 (문헌 [Circulation 2002; 105:1135-43] 참조). 따라서, 염증성 마커는 심혈관 사건의 발생 위험이 있는 집단에서의 확인과 약리학적 개입에 대한 기회를 제공한다.
- <8> CRP 측정의 유용성을 대신하거나 증대시킬 수 있는 다른 염증 마커가 발견되고 있다. 최근, 가용성 CD40 리간드 (sCD40L) 농도의 증가 및 혈청 인터루킨-10 (IL-10) 농도의 감소 등을 비롯한 새로운 염증 마커가 심혈관의 이환율과 그로 인한 사망률의 증가와 관련이 있었다. CD40L이 아테롬성 플라크 불안정화에 중요함을 시사하는 증거가 있다. 자극된 림프구로부터 방출된 CD40L은 염증성 사이토킨 및 유착 분자를 상호조절시키는 프로-염증성 분자이다. 또한, CD40L은 대식세포 및 내피 세포에서 조직 인자의 발현을 유도하여 응집을 촉진시킬 뿐만이 아니라 당단백질 IIb/IIIa를 활성화시키기도 한다 (문헌 [Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94:1931-1936], [Nature 1998; 394:200-203], [Circulation 2002; 106:896-899] 참조).
- <9> 여성의 건강상태 연구(Women's Health Study)로부터 얻은 역학적 증거는, 혈청 sCD40L 농도의 상승이 심혈관 위험의 점진적이고 연속적인 증가와 관련이 있음을 입증하였다 (문헌 [Circulation 2001; 104:2266-2268] 참조). 심혈관 위험의 증가는 sCD40L 농도가 가장 높은 여성에서 거의 12배 더 높았다. 불안정형 난치성 협심증에서의 c7E3 Fab 항혈소판 요법 (CAPTURE, c7E3 Fab Antiplatelet Therapy in Unstable Refractory Angina) 연구에서도 유사한 발견이 관찰되었다 (문헌 [NEJM 2003; 348:1104-1111] 참조). 이 연구에서, 기저수준 sCD40L의 오분위수에 기초할 때 플라시보를 처치한 대상체에서는 심혈관 위험의 점진적이고 연속적인 상승 (사망 또는 치명적이지 않은 심근경색증)이 주목되었다. 심혈관 위험에 있어서의 이러한 차이는 초기 (24시간) 및 후기 (6개월째)의 종말점 측정 둘다에서 명백하였다. 소염성 사이토킨 IL-10을 조사한 CAPTURE 시험을 유사하게 분석한 결과, IL-10 수준이 높은 (즉, 소염성 사이토킨의 수준이 높은) 플라시보-처치 환자에서는 사망 위험이 감소하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Circulation 2003; 107:2109-2114] 참조). 소염성 사이토킨 IL-10 혈청 농도의 가장 높은 오분위수에 속하는 환자의 사망률은 혈청 IL-10 수준의 가장 낮은 오분위수에 속하는 환자에 비해 > 50% 감소되었다. 또한, 퇴원 시기의 환자 집단을 IL-10 수준이 높거나 낮은 경우로 분류한다면, 제6개월에는 IL-10 (소염성 사이토킨) 수준이 높은 대상체에서 사망 위험률이 0.38 (즉, 상대적 위험률 62% 감소)로 조정되는 것이 관찰되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 요약하자면, 심혈관 질환이 지질 침착에 의해서만 매개되는 수동적 과정으로 발생한다는 개념은 사라지고 있다. 심혈관 질환이 만성 염증 과정의 징후이며 이러한 염증에서의 개입이 환자의 이환율과 사망률을 줄일 수 있음을 시사하는 실험적 증거 및 임상적 증거가 실질적으로 증가하고 있다. 그러나, 현재로서는 이러한 과정의 세포내 및 분자 매개자가 연구되는 중인 것에 불과하다. 급성 관상동맥 증후군 (ACS)에 대한 적절한 전임상 모델이 없다는 점은, 이러한 과정에 대한 연구에 걸림돌이 되고 있다. 이러한 정확한 메카니즘에 대한 지식이 부족함에도 불구하고, 스타틴의 소염 효과는 염증 마커가 증가된 환자에 대한 약리학적 개입이 심혈관의 이환율과 그로 인한 사망률을 감소시킨다는 개념을 뒷받침한다. 주목할 만한 것은, 이러한 이점이 스타틴의 예측치 못했던 다형질발현성 소염 활성을 통해 제공된다는 점이다. 세포 수준과 분자 수준에서의 상기 과정에 대한 이해가 진보한다면, 특이적이고 더욱 효능있는 소염제의 개발을 이끌어 내어 이들 환자에서 심혈관의 이환율과 그로 인한 사망률을 추가로 줄일 수 있다.
- <11> 일반적으로, T-세포 반응의 크기는 T-세포 표면 분자와 이들의 리간드 사이의 상호작용으로 인해 유발된 공동자극 반응으로 측정된다 [Mueller, et al., 1989 Ann. Rev. Immunol. 7:445-480]. 가장 중요한 공동자극 신호는 T-세포 표면 수용체인 CD28 및 CTLA4와 항원 제시 세포상의 이들의 리간드, 예를 들어 B7-관련 분자인 CD80 (즉, B7-1) 및 CD86 (즉, B7-2) 사이의 상호작용에 의해 제공된다 [Linsley, P. and Ledbetter, J. 1993 Ann. Rev. Immunol. 11:191-212]. 공동자극 부재하에서의 T-세포 활성화는 면역계가 자극에 대해 무반응성이 되는 무감작(anergic) T-세포 반응을 초래한다 [Schwartz, R. H., 1992 Cell 71:1065-1068].
- <12> CD28 및 CTLA4의 가변부 (V)-유사 세포의 도메인을 면역글로불린 (Ig)의 불변 도메인에 융합시켜 CD28Ig 및 CTLA4Ig를 생성함으로써 CD28 및 CTLA4의 가용성 형태를 구축하였다. CTLA4Ig의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 위치 +1의 메티오닌 또는 위치 -1의 알라닌에서 개시하여 위치 +357의 라이신에서 종결하는 단백질에 대한 것으로서 도 24에 나타낸 바와 같다. CTLA4Ig는 CD80-양성 및 CD86-양성 세포 둘다에 CD28Ig보다 더 강하게 결합한다 [Linsley, P., et al., 1994 Immunity 1:793-80]. 많은 T-세포-의존성 면역 반응이 시험관내 및 생체내 둘다에서 CTLA4Ig에 의해 차단되는 것으로 밝혀졌다 ([Linsley, P., et al., 1991b, 상기 문헌], [Linsley, P., et al., 1992a Science 257:792-795], [Linsley, P., et al., 1992b J. Exp. Med. 176:1595-1604], [Lenschow, D. J., et al. 1992 Science 257:789-792], [Tan, P., et al., 1992 J Exp. Med. 177:165-173], [Turka, L. A., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11102-11105]).
- <13> 천연 리간드, 예를 들어 B7에 대한 결합 친화도를 변경시키기 위해서, 가용성 CTLA4Ig 융합 분자를 분자내 CTLA4 일부의 아미노산을 돌연변이시켜 변형시켰다. CTLA4 영역은 돌연변이될 때 B7 리간드에 대한 결합 친화도 또는 결합력을 변경시키며, 이것은 상보성 결정 영역 1 (미국 특허 제6,090,914호, 동 제5,773,253호, 동 제5,844,095호; 공동 계류 중인 미국 특허 출원 제60/214,065호; 및 문헌 [Peach et al, 1994. J. Exp. Med., 180:2049-2058]에 기재된 바와 같은 CDR-1) 및 상보성 결정 영역 3 (CDR-3)-유사 영역 (미국 특허 제6,090,914호, 동 제5,773,253호 및 동 제5,844,095호; 공동 계류 중인 미국 특허 출원 제60/214,065호 및 문헌 [Peach, R. J., et al J Exp Med 1994 180:2049-2058]에 기재된 바와 같이, CDR-3은 CTLA4 세포의 도메인의 보존된 영역임; CDR-3-유사 영역은 CDR-3 영역을 포함하고, CDR-3 모티프의 상류 및/또는 하류에 있는 여러개 아미노산에 의한 연장됨)을 포함한다. CDR-3-유사 영역은 모든 CD28 및 CTLA4족 구성원에서 고도로 보존되어 있는 헥사펩티드 모티프 MYPPPY (서열 20)를 포함한다. CTLA4 중 상기 헥사펩티드 모티프 및 CD28Ig의 선택된 잔기에서의 알라닌 스캐닝 돌연변이유발은 CD80에 대한 결합을 감소시키거나 없앤다 (문헌 [Peach, R. J., et al J Exp Med 1994 180:2049-2058], 미국 특허 제5,434, 131호, 동 제6,090,914호, 동 제5,773,253호).
- <14> 가용성 CTLA4Ig 분자에서 CTLA4 및 CD28의 상동성 영역을 서로 바꾸는 추가의 변형을 가하였다. 이들 키메라 CTLA4/CD28 동족 돌연변이체 분자에서, CTLA4 및 CD28에 공통적인 MYPPPY 헥사펩티드 모티프 뿐만이 아니라 CTLA4의 CDR-1-유사 영역 및 CDR-3-유사 영역에 존재하는 보존되지 않은 특정 아미노산 잔기가 CTLA4와 CD80의 결합력을 증가시키는 영역으로 확인되었다 [Peach, R. J., et al., 1994 J Exp Med 180:2049-2058].
- <15> 상기한 바와 같은 가용성 CTLA4 분자, 예를 들어 CTLA4Ig, CTLA4 돌연변이체 분자 또는 키메라 CTLA4/CD28 동족 돌연변이체는 심혈관 질환 치료를 위한 새로운 군의 치료 약물을 도입한다.

과제 해결수단

- <16> 본 발명은 대상체에게 CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하여 B7-양성 세포상의 내인성 B7 분자가 T-세포상의 CTLA4 및/또는 CD28과 결합하는 것을 억제하는 분자를 투여함으로써 심혈관 질환을 치료하는 방법 및 이를 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법에 사용되는 가용성 CTLA4 분자로는 CTLA4Ig 및 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EA29YIg가 포함된다.
- <17> 본 발명은 대상체에게 B7-양성 세포상의 B7 분자에 결합하여 내인성 B7 분자가 T-세포상의 CTLA4 및/또는 CD28과 결합하는 것을 억제하는 가용성 CTLA4 분자를 투여함으로써 심혈관 질환을 치료하는 방법 및 이를 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법에 사용되는 가용성 CTLA4 분자로는 CTLA4Ig 및 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EA29YIg가 포함된다.
- <18> 또한, 본 발명은 심혈관 질환의 증상을 앓고 있는 대상체에게 가용성 CTLA4 분자, 예를 들어 CTLA4Ig 및/또는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EA29YIg 및/또는 임의의 가용성 CTLA 분자들의 혼합물을 투여함으로써 심혈관 질환을 치료하는 (예를 들어 심혈관 질환의 증상을 완화시킴) 방법을 제공한다. CTLA4Ig 및 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들어 도 19에 나타낸 바와 같이 위치 +1의 메티오닌 또는 위치 -1의 알라닌에서 개시하여 위치 +357의 라이신에서 종결하는 L104EA29YIg가 본 발명의 방법에 사용하기에 바람직하다.
- <19> 또한, 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 생물학상 유효 작용제, 예를 들어 가용성 CTLA4 분자를 단독으로 포함하거나 다른 치료 약물과 함께 포함하는, 심혈관 치료용 제약 조성물을 제공한다.
- <20> 심혈관 질환의 치료용 제약 조성물을 포함하는 키트 역시 본 발명에 포함된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 1종 이상의 제약 조성물을 포함하는 키트를 사용하여 심혈관 질환을 치료한다. 예를 들어, 상기 제약 조성물은 B7-양성 세포상의 B7 분자에 결합하는 유효량의 가용성 CTLA4 분자를 포함하여, B7 분자가 T-세포상의 CTLA4 및/또는 CD28과 결합하는 것을 차단한다. 추가로, 상기 키트는 본 발명의 제약 조성물과 병용되는 1종 이상의 다른 치료제를 함유할 수 있다.

효 과

- <21> 본 발명의 리간드에 결합하여 내인성 B7 분자를 차단하는 가용성 CTLA4 분자를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 여러 질환, 특히 심혈관계 질환을 치료하거나 또는 예방할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <22> 본 명세서 전반에 걸쳐서 각종 간행물이 인용되었다. 이들 간행물의 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 도입되어, 본 발명이 속한 당업계의 현상태를 보다 명확하게 기술한다.

<23> 정의

- <24> 달리 명시하지 않는 한, 본 명세서에서 사용한 모든 학술 용어 및 기술 용어는 당업계에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는다. 본 명세서에 사용한 하기 용어 또는 어구는 명시된 의미를 갖는다.

- <25> 본원에서 사용된 바와 같이, "리간드"는 또다른 분자를 특이적으로 인식하고 결합하는 분자를 지칭하며, 예를 들어 CTLA4에 대한 리간드는 B7 분자이다. 추가의 예에서, B7 분자에 대한 리간드는 CTLA4 및/또는 CD28 분자이다. 분자와 그의 리간드 사이의 상호작용은 본 발명의 조성물에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, CTLA4의 리간드인 B7과의 CTLA4 상호작용은 CTLA4Ig 분자의 투여로 차단될 수 있다. 별법으로, 리간드로서의 중앙 피사 인자 (TNF)는 그의 수용체인 TNF 수용체 (TNFR)와 상호작용하며, 에타네르셉트 또는 다른 TNF/TNFR 차단 분자의 투여로 차단될 수 있다.

- <26> 본원에 사용된 "야생형 CTLA4" 또는 "돌연변이 되지 않은 CTLA4"는 B7을 인식하여 결합하거나 B7을 저해하여 CD28 및/또는 CTLA4 (예를 들어, 내인성 CD28 및/또는 CTLA4)과 결합하는 것을 차단하는, 도 23에 나타낸 바와 같은 천연 발생 전장 CTLA4의 아미노산 서열 (또한 미국 특허 제5,434,131호, 동 제5,844,095호 및 동 제5,851,795호에 기재된 바와 같으며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨) 또는 임의의 그의 일부 또는 그의 유도체의 아미노산 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 도 23에 나타낸 바와 같이 야생형 CTLA4의 세포외 도메인은 위치 +1의 메티오닌에서 개시하여 위치 +124의 아스파르트산에서 종결하거나, 야생형 CTLA4의 세포외 도메인은 위치 -1의 알라닌에서 개시하여 위치 +124의 아스파르트산에서 종결한다. 야생형 CTLA4는 N-말단 세포외 도메인, 막횡단 도메인 및 C-말단 세포질 도메인을 갖는 세포 표면 단백질이다. 세포외 도메인은 B7 분자와 같은 표적 분자에 결합한다. 세포에서, 천연 발생 야생형 CTLA4 단백질은 N-말단에 신호 펩티드를 포함하는 미성숙 폴리펩티드로 번역된다. 미성숙 폴리펩티드는 신호 펩티드의 절단 및 제거 등을 비롯한 번역후 프로세

싱을 거쳐 미성숙 형태의 N-말단부와는 다르게 새로이 생성된 N-말단을 갖는 CTLA4 절단 생성물을 생성한다. 당업자는 CTLA4 절단 생성물의 새로이 생성된 N-말단부로부터 1개 이상의 아미노산을 제거하는 추가의 번역후 프로세싱이 발생할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 별법으로, 신호 펩티드를 완전히 제거하지 않고, 통상의 출발 아미노산인 메티오닌 앞에서 시작하는 분자가 생성될 수 있다. 따라서, 성숙 CTLA4 단백질은 위치 +1의 메티오닌 또는 위치 -1의 알라닌에서 출발할 수 있다. CTLA4 분자의 성숙 형태는 B7과 결합하는 세포의 도메인 또는 그의 임의의 일부를 포함한다.

<27> 본원에서 사용된 바와 같이, "CTLA4 돌연변이체 분자"는 (바람직하게는 야생형 CTLA4의 세포의 도메인에) 하나의 돌연변이 또는 다중 돌연변이를 갖는, 도 23에 나타난 바와 같은 야생형 CTLA4 또는 임의의 그의 일부 또는 그의 유도체를 의미한다. CTLA4 돌연변이체 분자는 야생형 CTLA4 분자의 서열과 유사하되 동일하지는 않으나, 여전히 B7에 결합하는 서열을 갖는다. 돌연변이는 보존적 (예를 들어, 루이신을 이소루이신으로 치환) 또는 비보존적 (예를 들어, 글리신을 트립토판으로 치환)인 구조 또는 화학적 성질을 갖는 아미노산으로 치환된 1개 이상의 아미노산 잔기, 아미노산 결실, 부가, 프레임시프트(frameshift) 또는 말단절단(truncation)을 포함할 수 있다. CTLA4 돌연변이체 분자는 분자 내에 존재하거나 그에 결합된 비-CTLA4 분자를 포함할 수 있다. 돌연변이체 분자는 가용성 (즉, 순환형)이거나 또는 세포 표면에 결합된 것일 수 있다. 추가의 CTLA4 돌연변이체 분자는 미국 특허 출원 제09/865,321호, 제60/214,065호 및 제60/287,576호; 미국 특허 제6,090,914호, 제5,844,095호 및 제5,773,253호; 및 문헌 [R. J., et al., J Exp Med 180:2049-2058 (1994)]에 기재된 돌연변이체 분자를 포함한다. CTLA4 돌연변이체 분자는 합성하여 제조하거나 재조합으로 제조할 수 있다.

<28> "CTLA4Ig"는 면역글로불린 불변 영역 (Ig) 또는 그의 일부에 연결된, B7과 결합하는 야생형 CTLA4의 세포의 도메인 또는 그의 일부를 포함하는 가용성 융합 단백질이다. 특정 실시양태는 위치 +1의 메티오닌에서 개시하여 위치 +124의 아스파르트산에서 종결하거나 위치 -1의 알라닌에서 개시하여 위치 +124의 아스파르트산에서 종결하는 야생형 CTLA4의 세포의 도메인 (도 23에 나타난 바와 같음); 위치 +125의 접합 아미노산 잔기 글루타민; 및 위치 +126의 글루탐산에서 위치 +357의 라이신을 포함한 면역글로불린 일부를 포함한다 (CTLA4Ig를 코딩하는 DNA는 부다페스트 조약의 조항에 의거하여 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 블러버드 10801에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, ATCC)에 1991년 5월 31일자로 기탁되었고, ATCC 기탁 번호 ATCC 68629를 부여받았음; [Linsley, P., et al., 1994 Immunity 1:793-80]). CTLA4Ig를 발현하는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주인 CTLA4Ig-24는 1991년 5월 31일자로 ATCC 관리 번호 CRL-10762로 기탁되었다. 본 발명의 방법 및/또는 키트에 사용되는 가용성 CTLA4Ig 분자는 신호 (리더) 펩티드 서열을 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다. 전형적으로, 본 발명의 방법 및/또는 키트에서, 상기 분자는 신호 펩티드 서열을 포함하지 않는다.

<29> "L104EA29YIg"는 아미노산 변화 A29Y (위치 29의 알라닌을 타이로신 아미노산 잔기로 치환함) 및 L104E (위치 +104의 루이신을 글루탐산 아미노산 잔기로 치환함)를 갖는 야생형 CTLA4의 세포의 도메인 또는 Ig 테일에 연결되어 있으며 B7 분자와 결합하는 그의 일부 (도 19에 포함됨; L104EA29YIg를 코딩하는 DNA는 2000년 6월 20일자로 ATCC 번호 PTA-2104로 기탁되었음, 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 출원 제09/579,927호, 동 제60/287,576호 및 동 제60/214,065호에서 공동 계류 중임)를 포함하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자인 융합 단백질이다. 본 발명의 방법 및/또는 키트에 사용되는 가용성 L104EA29YIg 분자는 신호 (리더) 펩티드 서열을 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다. 전형적으로, 본 발명의 방법 및/또는 키트에서, 상기 분자는 신호 펩티드 서열을 포함하지 않는다.

<30> 본원에서 사용된 바와 같이, "가용성"은 세포에 결합하거나 부착하지 않은, 즉 순환하는 임의의 분자 또는 그의 단편 및 유도체를 지칭한다. 예를 들어, CTLA4, B7 또는 CD28은 면역글로불린 (Ig) 부분을 CTLA4, B7 또는 CD28 각각의 세포의 도메인에 부착시켜 가용성으로 만들 수 있다. 별법으로, CTLA4와 같은 분자는 그의 막횡단 도메인을 제거하여 가용성이 되게 할 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 방법, 조성물 및/또는 키트에 사용되는 가용성 분자는 신호 (또는 리더) 서열을 포함하지 않는다.

<31> 본원에서 사용된 바와 같이, "가용성 CTLA4 분자"는 세포 표면에 결합되지 않은 (즉, 순환형) CTLA4 분자 또는 B7과 결합하는 CTLA4 분자의 임의의 기능적 일부를 의미하고, 이들로는 CTLA4의 세포의 도메인을 면역글로불린 (Ig) 부분, 예를 들어 IgC γ 1 (IgC γ 1), IgC γ 2 (IgC γ 2), IgC γ 3 (IgC γ 3), IgC γ 4 (IgC γ 4), IgC μ (IgC μ), IgC α 1 (IgC α 1), IgC α 2 (IgC α 2), IgC δ (IgC δ) 또는 IgC ϵ (IgC ϵ)에 융합시켜서 해당 융합 분자가 가용성이 되도록 한 CTLA4Ig 융합 단백질 (예를 들어 ATCC 수탁 번호 68629로 기탁된 DNA에 의해 코딩되는 것) 또는 그의 단편 및 유도체; CTLA4의 세포의 도메인을 생물학적으로 활성이거나 화학적으로 활성인 단백질, 예를 들어 파필로마바이러스 E7 유전자 생성물 (CTLA4-E7), 멜라노마-관련 항원 p97 (CTLA4-p97) 또는

HIV env 단백질 (CTLA4-env gp120)에 융합시키거나 그와 연결시킨 단백질 (미국 특허 제5,844,095호에 기재된 바와 같음, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨) 또는 그의 단편 및 유도체; CD28/CTLA4Ig와 같은 하이브리드 (키메라) 융합 단백질 (미국 특허 제5,434, 131호에 기재된 바와 같음, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨) 또는 그의 단편 및 유도체; 막횡단 도메인을 제거하여 해당 단백질을 가용성이 되게 한 CTLA4 분자 ([Oaks, M. K., et al., 2000 Cellular Immunology 201:144-153], 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨) 또는 그의 단편 및 유도체 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. "가용성 CTLA4 분자"는 또한 그의 단편, 일부 또는 유도체 및 CTLA4 결합 활성을 갖는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 포함한다. 본 발명의 방법에 사용되는 가용성 CTLA4 분자는 신호 (리더) 펩티드 서열을 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다. 전형적으로, 본 발명의 방법, 조성물 및/또는 키트에서, 상기 분자는 신호 펩티드 서열을 포함하지 않는다.

<32> 본원에서 사용된 바와 같이, "CTLA4의 세포의 도메인"은 B7 분자와 같은 CTLA4 리간드를 인식하고 그에 결합하는 CTLA4의 일부이다. 예를 들어, CTLA4의 세포의 도메인은 위치 +1의 메티오닌에서 위치 +124의 아스파르트산을 포함한다 (도 23). 별법으로, CTLA4의 세포의 도메인은 위치 -1의 알라닌에서 위치 +124의 아스파르트산을 포함한다 (도 23). 세포의 도메인은 B7 분자와 결합하는 CTLA4의 단편 또는 유도체를 포함한다. 도 23에 나타낸 바와 같이, CTLA4의 세포의 도메인은 또한 B7 분자에 대한 CTLA4 분자의 결합력을 변화시키는 돌연변이를 포함할 수도 있다.

<33> 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "돌연변이"는 야생형 분자의 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열에서의 변화, 예를 들어, 야생형 CTLA4 세포의 도메인의 DNA 및/또는 아미노산 서열에서의 변화를 의미한다. DNA에서의 돌연변이는 코돈을 변화시켜 아미노산 서열을 변화시킬 수 있다. DNA 변화는 치환, 결실, 삽입, 선택적 스플라이싱 또는 말단절단을 포함할 수 있다. 아미노산 변화는 치환, 결실, 삽입, 부가, 말단절단 또는 단백질의 프로세싱 또는 절단 오류를 포함할 수 있다. 별법으로, 뉴클레오티드 서열에서의 돌연변이는 당업계에 공지된 아미노산 서열에서의 무증후(silent) 돌연변이를 초래할 수 있다. 이와 관련하여, 특정 뉴클레오티드 코돈은 동일한 아미노산을 코딩한다. 예로는 아미노산 아르기닌 (R)을 코딩하는 뉴클레오티드 코돈 CGU, CGG, CGC 및 CGA; 또는 아미노산 아스파르트산 (D)을 코딩하는 코돈 GAU 및 GAC 등이 있다. 따라서, 단백질은 구체적인 뉴클레오티드 서열은 다르지만, 여전히 동일 서열의 단백질 분자를 코딩하는 1종 이상의 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있다. 아미노산 코딩 서열은 하기와 같다:

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

<34>
 <35> 돌연변이체 분자는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

<36> 본원에서 사용된 바와 같이, "비-CTLA4 단백질 서열" 또는 "비-CTLA4 분자"는 B7과 결합하지 않고 CTLA4의 표적과 CTLA4와의 결합을 저해하지 않는 임의의 단백질 분자를 의미한다. CTLA4 분자의 세포의 도메인에 부착된 비-CTLA4 분자는 CTLA4 분자의 용해도 또는 친화도를 변경시킬 수 있다. 예로는 면역글로불린 (Ig) 불변 영역 또는 그의 일부 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, Ig 불변 영역은 힌지(hinge), CH2 및 CH3 영역을 포함하는 인간 또는 원숭이 Ig 불변 영역, 예를 들어 인간 C(감마)1이다. Ig 불변 영역을 돌연변이시켜 그의 이펙터(effector) 기능을 감소시킬 수 있다 (미국 특허 제5,637,481호, 제5,844,095호 및 제5,434, 131호).

- <37> 본원에서 사용된 바와 같이, "단편" 또는 "일부"는 예를 들어 CTLA4 또는 CD28과 같은 분자의 임의의 부분 또는 절편, 바람직하게는 B7 분자 등과 같은 CTLA4 또는 CD28의 표적을 인식하고 결합하는 CTLA4 또는 CD28의 세포외 도메인 또는 그의 일부 또는 절편이다.
- <38> 본원에서 사용된 바와 같이, "B7"은 CTLA4 및/또는 CD28을 인식하고 결합할 수 있는 B7-1 (CD80) ([Freeman et al, 1989, J Immunol. 143:2714-2722], 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨), B7-2 (CD86) ([Freeman et al, 1993, Science 262:909-911], 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨; [Azuma et al, 1993, Nature 366:76-79], 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 B7 족 분자를 지칭한다. B7 분자는 활성화된 B 세포상에서 발현될 수 있다.
- <39> 본원에서 사용된 바와 같이, "CD28"은 미국 제5,580,756호 및 동 제5,521,288호 (상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 B7을 인식하고 결합하는 분자를 지칭한다.
- <40> 본원에서 사용된 바와 같이, "B7-양성 세포"는 세포 표면에 발현된 1종 이상 유형의 B7 분자를 갖는 임의의 세포이다.
- <41> 본원에서 사용된 바와 같이, "유도체"는 모(母) 분자와의 서열 유사성 및 활성을 공유하는 분자이다. 예를 들어, CTLA4의 유도체는 B7을 인식하고 결합하는 야생형 CTLA4의 세포외 도메인, 예를 들어 CTLA4Ig 또는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EA29YIg와 70 % 이상 유사한 아미노산 서열을 갖는 가용성 CTLA4 분자를 포함한다. 유도체는 아미노산, 예를 들어 아미노산 유사체에서 아미노산 서열 및/또는 화학적 능력에 대한 임의의 변화를 의미한다.
- <42> 본원에서 사용된 바와 같이, 면역 반응을 "조절하다"는 면역 반응을 활성화, 자극, 상향조절, 억제, 차단, 하향 조절 또는 변형시키는 것이다. 본원에 기재한 심혈관 질환은 면역 반응을 조절하여, 예를 들어 B7-양성 세포와의 기능적 CTLA4- 및/또는 CD28-양성 세포 상호작용을 조절하여 치료될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응을 조절하는 방법은, B7-양성 세포를 본 발명의 가용성 CTLA4 분자와 접촉시켜서 내인성 CTLA4 및/또는 CD28 분자와 상기 B7 분자와의 반응을 저해하는 가용성 CTLA4 분자인 가용성 CTLA4/B7 복합체를 형성하는 단계를 포함한다.
- <43> 본원에서 사용된 바와 같이, 수용체, 신호 또는 분자를 "차단하다" 또는 "억제하다"는 당업계에 알려진 시험법으로 검출할 때 수용체, 신호 또는 분자의 활성화를 저해하는 것을 의미한다. 예를 들어, 세포 매개 면역 반응의 차단은 면역 질환과 관련된 증상의 감소를 결정하여 검출할 수 있다. 이러한 차단 또는 저해는 부분적일 수도 있고 또는 전체적일 수도 있다.
- <44> 본원에서 사용된 바와 같이, "B7 상호작용을 차단하다"는 B7이 그의 리간드, 예를 들어 CD28 및/또는 CTLA4와 결합하는 것을 저해하여, T-세포와 B7-양성 세포의 상호작용을 차단하는 것을 의미한다. CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 분자의 예로는, 임의의 CTLA4, CD28 또는 B7 분자 (예를 들어, B7-1, B7-2)를 인식하고 그와 결합하는 항체 (또는 그의 일부 또는 그의 유도체)와 같은 분자; 가용성 CTLA4와 같은 분자의 가용성 형태 (또는 그의 일부 또는 그의 유도체); CTLA4/CD28/B7-매개의 상호작용을 통해 세포 신호를 저해하도록 고안된 펩티드 단편 또는 다른 소분자(small molecule) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 차단제는 가용성 CTLA4 분자, 예를 들어 CTLA4Ig (ATCC 68629) 또는 L104EA29YIg (ATCC PTA-2104); 가용성 CD28 분자, 예를 들어 CD28Ig (ATCC 68628); 가용성 B7 분자, 예를 들어 B7Ig (ATCC 68627); 항-B7 모노클로날 항체 (예를 들어 ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341, 및 앤더슨(Anderson) 등의 미국 특허 제6,113,898호 또는 문헌 [Yokochi et al., 1982. J. Immun., 128 (2) 823-827]에 기재된 바와 같은 모노클로날 항체); 항-CTLA4 모노클로날 항체 (예를 들어 ATCC HB-304, 및 참고문헌 82 및 83에 기재된 바와 같은 모노클로날 항체); 및/또는 항-CD28 모노클로날 항체 (예를 들어 ATCC HB 11944 및 한센(Hansen)의 문헌 [Hansen et al., 1980. Immunogenetics 10:247-260] 또는 마틴(Martin)의 문헌 [Martin et al., 1984. J. Clin. Immun., 4 (1):18-22]에 기재된 바와 같은 mAb 9.3)이다. 또한, CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 소분자 역시 포함된다. B7 상호작용의 차단은 당업계에 알려진 시험법, 예를 들어 T-세포/B7-세포 상호작용의 감소를 측정하거나 또는 CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용 감소를 측정하여 면역 질환 (예를 들어 심혈관 질환) 또는 염증성 질환과 관련된 증상의 감소를 측정하는 시험법으로 검출될 수 있다. 이러한 차단은 부분적일 수도 있고 또는 전체적일 수도 있다.
- <45> 본원에서 사용된 바와 같이, 분자의 "유효량"은 해당 분자와 그의 리간드 사이의 상호작용을 차단하는 양으로 정의된다. 예를 들어, CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 분자의 유효량은, B7-양성 세포상의 B7 분자와 결합할 때 B7 분자가 내인성 리간드, 예를 들어 CTLA4 및 CD28과 결합하는 것을 억제하는 분자의 양으로

정의될 수 있다. 별법으로, CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 분자의 유효량은, T 세포상의 CTLA4 및/또는 CD28 분자와 결합할 때 B7 분자가 내인성 리간드, 예를 들어 CTLA4 및 CD28과 결합하는 것을 억제하는 분자의 양으로 정의될 수 있다. 이러한 억제 또는 차단은 부분적일 수도 있고 또는 완벽할 수도 있다.

<46> 본원에서 사용된 바와 같이, 질환을 "치료하다"는 의학적 치료 또는 기타 요법에 의해 질환을 치료하는 것을 의미한다. 질환의 치료는 질환의 증상을 호전 또는 경감시키고, 질환의 중증도를 감소시키고, 질환의 진행 과정을 변경 또는 저지하고, 질환의 발생을 저지하고(하거나) 기본적인 질환 문제점을 호전 또는 경감 또는 치유할 수 있다. 심혈관 질환의 증상로는 부정맥, 흉부 동통, 심근 허혈, 협심증, 감소된 운동 부하, 피로, 운동시 호흡곤란, 발작성 야간 호흡곤란, 파행, 일과성 허혈성 발작 및 삶의 질이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 심혈관 질환의 치료는 면역 반응을 조절함으로써, 예를 들어 B7-양성 세포와 기능성 CTLA4- 및/또는 CD28-양성 세포의 상호작용을 조절함으로써 달성될 수 있다. 별법으로, 심혈관 질환의 치료는 본원에 기재된 조성물을 사용하여 상기 질환의 발생 또는 진행을 저지함으로써 달성될 수 있다.

<47> 본원에서 사용된 바와 같이, "심혈관 질환"은 당 분야에서 흔히 사용되는 의미를 가지며, 혈전색전증, 예를 들어 동맥 심혈관 혈전색전증, 정맥 심혈관 혈전색전증, 및 심실에서의 혈전색전증; 죽상동맥경화증; 재협착; 말초 동맥 질환; 관상동맥 우회술; 경동맥 질환; 동맥염; 심근염; 심혈관염; 맥관염; 관상동맥 심장 질환 (CHD); 불안정형 협심증 (UA); 불안정형 난치성 협심증; 안정형 협심증 (SA); 만성 안정형 협심증; 급성 관상동맥 증후군 (ACS); 1차 또는 재발성 심근경색증; 급성 심근경색증 (AMI); 심근경색증; 비-Q 파 심근경색증; 비-STE 심근경색증; 관상동맥 질환; 심허혈; 허혈; 허혈성 급사; 일과성 허혈성 발작; 졸중; 죽상동맥경화증; 말초 폐색성 동맥 질환; 정맥 혈전증; 심부 정맥 혈전증; 혈전정맥염; 동맥 색전증; 관상동맥 혈전증; 뇌동맥 혈전증; 뇌 색전증; 신장 색전증; 폐 색전증; (a) 인공 판막 또는 다른 이식물, (b) 유치 카테터, (c) 스텐트, (d) 심폐 우회로, (e) 혈액투석 또는 (f) 혈전증을 유발하는 인공 표면에 혈액이 노출되는 기타 절차로 인한 혈전증; 죽상동맥경화증, 수술 또는 수술 합병증, 장기간 부동, 동맥 세동, 선천성 호혈전증, 암, 당뇨병, 약물 또는 호르몬의 영향, 및 임신 합병증으로 인한 혈전증; 심부정맥, 예를 들어 심실위 부정맥, 심방 부정맥, 심방 조동, 심방 세동; 문헌 [Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 2 Volume Set, 6th Edition, 2001, Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Peter Libby, Douglas D. Zipes]에 열거된 다른 질환과 같은 질환 또는 증상을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

<48> 바람직한 심혈관 질환은 죽상동맥경화증; 관상동맥 심장 질환 (CHD); 재협착; 말초 동맥 질환; 관상동맥 우회술; 경동맥 질환; 동맥염; 심근염; 심혈관염; 맥관염; 불안정형 협심증 (UA); 불안정형 난치성 협심증; 안정형 협심증 (SA); 만성 안정형 협심증; 급성 관상동맥 증후군 (ACS); 심근경색증; 급성 심근경색증 (AMI), 예를 들어 초회 또는 재발성 심근경색증, 비-Q 파 심근경색증, 비-ST 상승 심근경색증, 및 ST-분절 상승 심근경색증이다.

<49> 더욱 바람직한 심혈관 질환은 죽상동맥경화증; 관상동맥 심장 질환 (CHD); 불안정형 협심증 (UA); 불안정형 난치성 협심증; 안정형 협심증 (SA); 만성 안정형 협심증; 급성 관상동맥 증후군 (ACS); 심근경색증; 급성 심근경색증 (AMI), 예를 들어 초회 또는 재발성 심근경색증, 비-Q 파 심근경색증, 비-ST-분절 상승 심근경색증, 및 ST-분절 상승 심근경색증이다.

<50> 본원에서 사용한 "유전자 치료"는 유전자 조작에 의해 질환을 치료하는 방법이다. 유전자 치료는 핵산 분자를 세포로 도입하고, 상기 세포가 상기 핵산 분자에 의해 코딩된 유전자 생성물을 발현하는 것을 포함한다. 예를 들어, 당업자에게 잘 공지된 바와 같이, 생체의 또는 시험관내에서 다양한 방법, 예를 들어 인산 칼슘 침전, 디에틸아미노에틸 텍스트란, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 전기영동, 직접 주입, 리포펙션(lipofection) 또는 바이러스 감염 (문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)], [Kriegler M. Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (W. H. Freeman and Co, New York, N.Y., 1993)] 및 [Wu, Methods in Enzymology (Academic Press, New York, 1993)], 각각은 본원에 참고 문헌으로 인용함)에 의해 대상 핵산 분자를 함유한 발현 벡터를 세포에 도입함으로써 핵산 분자를 세포에 도입할 수 있다. 별법으로, 대상 핵산 서열을 다양한 벡터 및 다양한 방법을 이용하여, 예를 들어 핵산을 대상체에게 직접 투여하거나 (문헌 [Williams et al, 1991 PNAS 88: 2726 2730]), 핵산 분자를 바이러스 벡터에 삽입하고 재조합 바이러스 또는 바이러스 입자를 생산하여 대상체를 재조합 바이러스로 감염시킴으로써 (문헌 [Battelman et al, 1993 J Neurosci 13:94-95], [Carroll et al, 1993 J Cell Biochem 17E:241], 랩코브스키 (Lebkowski) 등의 미국 특허 제5,354,678호, [Davison and Elliott, Molecular Virology: A Practical Approach (IRL Press, New York, 1993)]) 생체내에서 세포로 도입할 수 있다. 생체내 전달에 사용한 다른 방법은 리포솜내로 핵산을 캡슐화하여 리포솜을 대상체에게 직접 전달하거나, 혈액응고시키는 센다이(Sendai) 바

이러스와 함께 리포솜을 대상체에게 직접 전달하는 것을 포함한다 (본원에 참고문헌으로 인용된 미국 특허 제 5,824,655호). 형질감염된 또는 감염된 세포는 핵산으로 코딩된 단백질 생성물을 발현하여 질환 또는 질환의 증상을 호전시킨다.

<51> 본원에서 사용한 "경감시키다"는 질환의 증상 중 하나 이상, 예를 들어 심혈관 질환의 증상 중 하나 이상 (예를 들어, 부정맥, 흉부 동통, 심근 허혈, 협심증, 감소된 운동 부하, 피로, 운동시 호흡곤란, 발작성 야간 호흡곤란, 파행, 일과성 허혈성 발작 및 삶의 질이 포함되나, 이로 한정되는 것은 아님)을 완화시키거나 덜 심각하게 만드는 것을 나타낸다.

<52> 본원에 개시된 본 발명을 더 충분히 이해할 수 있도록 하기 설명을 기재하였다.

<53> **본 발명의 조성물 및 방법**

<54> 본 발명은 CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 유효량의 분자를 대상체에게 투여함으로써 심혈관 질환을 치료하는 조성물 및 방법을 제공한다. 예를 들어, 이러한 리간드로는 가용성 CTLA4 분자 (예를 들어, CTLA4Ig, CTLA4-E7, CTLA4-p97, CTLA4-env gp120, 및 돌연변이 CTLA4 분자, 예를 들어, CTLA4/CD28Ig, L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg 및/또는 L104EA29WIIg), 가용성 CD28 분자, 가용성 B7-1 분자, 가용성 B7-2 분자, 및 B7, CD28 및/또는 CTLA4를 인식하여 결합하는 모노클로날 항체 (예를 들어, 항-CTLA4 모노클로날 항체, 항-CD28 모노클로날 항체, 항-B7-1 모노클로날 항체 또는 항-B7-2 모노클로날 항체)를 들 수 있다.

<55> CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 분자의 유효량은 B7-양성 세포 상의 B7 분자에 결합할 때 B7 분자가 CTLA4 및 CD28과 같은 내인성 리간드와 결합하는 것을 억제하는 항-B7 모노클로날 항체, 가용성 CTLA4 및/또는 가용성 CD28 분자의 양으로 정의될 수 있다. 부분적으로 또는 완전히 억제할 수 있다.

<56> 또는, CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 분자의 유효량은 T 세포 상의 CTLA4 및/또는 CD28 분자에 결합할 때 B7 분자가 CTLA4 및 CD28과 같은 내인성 리간드와 결합하는 것을 억제하는 항-CTLA4 모노클로날 항체, 항-CD28 모노클로날 항체 또는 가용성 B7 (B7-1 또는 B7-2) 분자의 양으로 정의될 수 있다. 부분적으로 또는 완전히 억제할 수 있다.

<57> CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 분자의 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 100 mg이다. 또다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 0.5 내지 5 mg, 대상체의 체중 kg 당 0.1 내지 5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 10 내지 15 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 15 내지 20 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 20 내지 25 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 25 내지 30 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 30 내지 35 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 35 내지 40 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 40 내지 45 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 45 내지 50 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 50 내지 55 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 55 내지 60 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 60 내지 65 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 65 내지 70 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 70 내지 75 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 75 내지 80 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 80 내지 85 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 85 내지 90 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 90 내지 95 mg 또는 대상체의 체중 kg 당 약 95 내지 100 mg이다.

<58> 한 실시양태에서, CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 분자의 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 2 내지 약 10 mg이다. 바람직한 양은 대상체의 체중 kg 당 10 mg이다. 또다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 4 mg이다. 또다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 0.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 1.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 1.0 내지 1.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 1.5 내지 2.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2.0 내지 2.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2.5 내지 3.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 3.0 내지 3.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 3.5 내지 4.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4.0 내지 4.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4.5 내지 5.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5.0 내지 5.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5.5 내지 6.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6.0 내지 6.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6.5 내지 7.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 7.0 내지 7.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 7.5 내지 8.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8.0 내지 8.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8.5 내지 9.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 9.0 내지 9.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 9.5 내지 10.0 mg이다.

<59> 또다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 20 mg이다. 또다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 2 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2 내지 4 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4 내지 6 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6 내지 8 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 10 내지 12 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 12 내지 14 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 14 내지 16 mg, 대

상체의 체중 kg 당 약 16 내지 18 mg 또는 대상체의 체중 kg 당 약 18 내지 20 mg이다.

- <60> 또다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 2 mg이다. 또다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 10 mg이다.
- <61> 구체적인 실시양태에서, CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 분자는 가용성 CTLA4 분자이고, 가용성 CTLA4 분자의 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 2 mg이다. 또다른 구체적인 실시양태에서, 가용성 CTLA4 분자의 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 10 mg이다. 또다른 구체적인 실시양태에서, 가용성 CTLA4의 유효량은 체중이 60 kg 미만인 대상체의 경우에는 500 mg, 체중이 60 내지 100 kg인 대상체의 경우에는 750 mg, 체중이 100 kg 초과인 대상체의 경우에는 1000 mg이다.
- <62> CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 유효량의 분자는 필요에 따라 매일, 매주, 매달 및/또는 매년 1 시간/일/주/달/년 당 1회 또는 수회 투여될 수 있는 가용성 CTLA4이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 상기 분자를 1 개월 동안 2 주에 한번 투여하는 것으로 시작하여, 그 후 매달 한 번씩 투여할 수 있다.
- <63> 바람직한 실시양태에서, 심혈관 질환은 죽상동맥경화증, 관상동맥 심장 질환 (CHD), 불안정형 협심증 (UA), 불안정형 난치성 협심증, 안정형 협심증 (SA), 만성 안정형 협심증, 급성 관상동맥 증후군 (ACS), 초회 또는 재발성 심근경색증, 급성 심근경색증 (AMI), 심근경색증, 비-Q 파 심근경색증, 또는 비-STE 심근경색증이다.
- <64> 본원에서는 심혈관 질환을 치료 또는 예방하는데 있어서 CD28-B7 상호작용을 차단하는 분자의 용도를 뒷받침하는 임상 데이터가 제시된다 (실시에 3 내지 7). RA에 대한 임상 연구에서, CTLA4Ig는 CRP, IL-6 및 TNF- α 를 저하시키며, 이들 모두는 심혈관 질환과도 상관이 있는 염증 마커이다. 상기 발견은 새로운 작용 메카니즘 (CD28-B7 경로의 차단)이 심혈관 질환의 치료에 유용할 수 있다는 것을 제안한다. 추가의 연구는 실시에 8 및 9에서 논의된다. 본 출원인은 CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 유효량의 분자를 대상체에게 투여함으로써 심혈관 질환을 치료하는 본 발명의 방법을 제시한다.
- <65> 심혈관 질환의 새로운 치료 방법에 대해 본원에서 논의된 일부 입증 데이터는 공개된 의학 문헌으로부터 유도된 것이지만, 본 발명을 제한하지는 않는다. 면역학/염증이 심혈관 질환에 중요한 역할을 할 수 있다는 견해는 비교적 최신의 불완전한 인식의 전환이다. 심장학, 면역학 및 감염성 질환을 아우르는 연구 범위가 실질적 가치가 있기 때문에, 한 분야에서의 연구는 이러한 다양한 분야에서 통합되지 못한다. 반대로, 하나의 새로운 발견이 어떠한 암시를 치료법으로 만들어 내면, 완전한 작용 메카니즘이 연구자/과학자에게 즉시 이해될 수는 없다. 추가로, USA 환자에서 우세한 T-세포 집단이 CD4⁺CD28^{null} 세포였다는 한 연구가 보고되었다 (문헌 [Circulation 2000; 102:2883-2888] 참조). 이 발견은 CD28-B7 매개된 신호전달의 방해가 UA 환자에게는 효과적이지 않을 것이라는 것을 제안한다.
- <66> 심혈관 이환율 및 사망률을 감소시키거나 심혈관 기능 및 삶의 질을 개선시키기 위해 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg에 의해 CD28-B7 상호작용을 억제하는 것은 새로운 것이다. 심혈관 질환의 범위에 걸친 상기 작용제의 용도는 (1) 류마티스성 관절염 (RA) 및 죽상동맥경화증/불안정형 협심증을 앓는 환자들 사이에서의 세포적 및 생화학적 유사성; (2) 심혈관 질환에 개입하기에 적절한 것으로 여겨지는 CTLA4Ig 및 L104EA29YIg의 작용 메카니즘; (3) 본원에 제시된 동물 모델 및 임상 연구에서 CTLA4Ig 및/또는 L104EA29YIg의 소염 효과; (4) 죽상동맥경화증에서 B7-CD28 상호작용의 중요성에 대해 최근 보고된 발견에 의해 뒷받침된다. 이들 데이터의 대부분이 본질적으로 다른 임상전 연구 (세포 모델 및 동물 모델) 뿐만 아니라, 본원에 제시된 임상 연구에서 존재하며, 하기에 요약하였다.
- <67> (1) 류마티스성 관절염 및 죽상동맥경화증/불안정형 협심증을 앓는 환자들 사이에서 세포적 및 생화학적 유사성
- <68> 이들 두가지 병리학적 과정에는 생화학적 및 세포적 유사성이 있다 (표 1). 또한, 최근 RA 환자의 조기 사망은 급성 관상동맥 증후군과 연관이 있었다 (문헌 [J Rheumatology 1999; 26:2562-2571] 및 [Rheumatology 1999; 38:668-674] 참조).

표 1

<69>

류마티스성 관절염 및 죽상동맥경화증/불안정형 협심증 사이의 생화학적 및 세포적 유사성		
	죽상동맥경화증/협심증	류마티스성 관절염
생화학적 유사성		
중양 괴사 인자- α (TNF- α)	↑	↑

메탈로프로테이나제 발현	↑	↑
인터루킨-6 (IL-6)	↑	↑
C-반응성 단백질 (CRP)	↑	↑↑
유착 분자 (VCAM-1, ICAM-1, E-셀렉틴, P-셀렉틴)	↑	↑
엔도텔린	↑	↑
세포적 유사성		
비만 세포 활성화	↑	↑
T-세포 활성화	↑	↑
B-세포 활성화	0 또는 ↑	0 또는 ↑
가능한 항원		
열 충격 단백질 (HSP)	보고됨	보고됨
감염 작용제	보고됨	보고됨
산화된-LDL	보고됨	
콜라겐 II		보고됨
연골 항원		보고됨

주의: 파세리(Paceri) 및 테(Teh)이 문헌 [Circulation 1999; 100:2124-2126]으로부터 개작. 기호 0은 대조군 집단으로부터의 파라미터에 뚜렷한 증가 또는 감소가 없음을 나타내고, ↑는 대조군 집단으로부터의 파라미터가 증가되었음을 나타낸다. "보고됨"은 의학 문헌에서 입수할 수 있는 증거 자료가 존재한다는 것을 나타낸다.

<70> 이러한 유사성은 이들 각각의 질환의 근본적인 병태 생리학적 과정에 공통성이 있을 수 있다는 것을 제안한다.

<71> (2) CTLA4Ig 및 L104EA29YIg의 작용 메커니즘은 심혈관 질환에 개입하기에 적절한 것으로 여겨진다.

<72> T-세포는 초기 아테롬 뿐만 아니라 취약한/파열된 플라크에 존재한다.

<73> T-세포 활성화가 죽상동맥경화증에서부터 급성 플라크 파열에까지 이르는 심혈관 질환의 범위에 걸쳐 중요하다는 견해를 뒷받침하는 증거가 있다. T-세포는 인간 죽상동맥경화증 병변에 존재하는 가장 흔한 세포 중 하나이며 (문헌 [New Engl J Med 1999; 340:115-126] 참조), 초기 병변 및 취약한 또는 파열된 플라크 모두에 존재한다. 취약한 또는 파열된 플라크의 병리학적 연구는 T-세포 (대개 CD4⁺)가 아테롬성 병변의 스펀지 영역 (대개 조직 침식 부위)에 존재하고 국부화된다는 것을 밝혀져 있다 (문헌 [Am. J. Cardiol. 1991; 68:36B-50B. Circulation 1994; 89:36-44] 참조).

<74> T-세포에 의해 동화된 사이토킨은 염증 및 플라크 파열을 촉진하게 된다.

<75> T-세포는 인터페론-γ (IFN-γ)을 비롯한 염증성 사이토킨, TNFα, 및 인터루킨-2 (IL-2)를 분비하는 것으로 알려져 있다 (문헌 [Atherosclerosis 1986; 6:131-138. J Clin Invest 1985; 76:125-131] 참조). 아테롬성 플라크에서 T-세포의 작용은 두가지로 생각된다. 첫째로, T-세포는 대식구의 작용을 조절할 수 있으며, 이로써 소화 효소를 방출하고, 커버 매트릭스 및 평활근층을 파괴하고, 플라크 파열을 촉진시키는 것으로 생각된다. 둘째로, T-세포는 맥관 평활근 세포로 IFN-γ를 분비함으로써 아테롬의 섬유성 캡에서 콜라겐 합성을 직접적으로 감소시킬 수 있다. 총체적으로, 이들 T-세포의 활성화는 아테롬성 플라크 불안정화 및 파열을 촉진시키는 조합된 과정을 나타내는 것으로 생각된다.

<76> T-세포는 아테롬 내에서 그 안에서 임상 증상의 중증도에 상응하는 정도로 활성화된다.

<77> T-세포는 아테롬에서 발견될 뿐만 아니라, 이들 병변 내에서 그 안에서 활성화된다는 증거가 있다. 관상동맥 아테롬에서 T-세포 활성화에 대한 연구에서, 반 데르 발(van der Wal) 등은 IL-2 수용체 (IL-2r) 발현 및 IL-2 분비에 의해 입증된 바와 같이 T-세포가 활성화된다는 것을 아테롬절제술 시편으로부터 밝혀내었다 (문헌 [Heart 1998; 80:14-18] 참조). 이 연구에서는, IL-2r에서 T-세포 발현의 증가가 아테롬절제술을 받은 환자의 임상적 징후의 중증도에 비례하였다. 도 87은 아테롬절제술 시편에서 T-세포 활성화의 백분율을 나타낸다.

<78> HSP60 또는 다른 신규 항원은 심혈관염을 직접적으로 촉진시킬 수 있다.

<79> 여러 연구는 감염성 작용제와 심혈관 질환의 발병 사이의 연관 가능성을 제안하였다. 클라미디아 뉴모니아 (Chlamydia pneumoniae (Cp)), 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori), 사이토메갈로바이러스 (CMV), 아데노바이러스, 콕사키바이러스, 여러 헤르페스바이러스를 비롯한 많은 감염성 작용제가 제안되었으며, 수많은

구강 감염은 CHD의 가능성이 있었다. 그러나, 관상 죽상동맥경화증과 관련된 이들 제제들 사이의 인과성을 입증하는 증거는 매우 광범위하다. 인간 호흡기 병인인 씨. 뉴모니에(*C. pneumoniae*)는 CHD와 관련하여 매우 흔하게 발견된다.

<80> CRP의 지속적인 상승의 역할, 및 인간 HSP60 (hu-HSP60)에 대한 항체 또는 씨. 뉴모니에 (Cp)의 존재는 헬싱키 (Helsinki) 심장 연구의 네스티드 환자-대조군 연구에서 조사되었다 (문헌 [Circulation 2003; 107:2566-2570] 참조). 이 연구 (예측성 이중 맹검 플라시보 조절된 주요 예방 실험)에서는 4081명의 대상체를 랜덤으로 선정하여, 8.5년에 걸쳐 추적한 결과, 241명의 관상동맥 사건 (관상동맥 사망 또는 비치명적 MI)이 관찰되었다. 이후의 관상동맥 사건을 예측하는데 있어서 지속적인 혈청 양성 반응 (기저 수준에서 및 관상동맥 사건 징후 이전 3 내지 6개월에서 CRP의 상승, Cp에 대한 혈청 항체의 상승, 또는 hu-HSP60에 대한 혈청 항체의 상승에 의해 확립됨)의 중요성을 조사하였다 (표 2).

표 2

<81>

헬싱키 심장 연구에서 위험 인자의 지속성에 대한 관상동맥 사망 또는 비치명적 MI의 발병에 대한 위험도 (OR)		
	조정되지 않은 OR (95%CI)	조정된 OR (95%CI)
CRP-		
Cp-	1	1
Cp+	1.55 (0.85-2.80)	1.62 (0.87-3.00)
CRP+		
Cp-	2.36 (1.16-4.79)	1.96 (0.92-4.18)
Cp+	5.38 (2.32-12.46)	4.47 (1.84-10.83)
CRP-		
hu-HSP60-	1	1
hu-HSP60+	0.92 (0.46-1.85)	0.87 (0.42-1.80)
CRP+		
hu-HSP60-	2.07 (1.04-4.14)	1.78 (0.85-3.74)
hu-HSP60+	6.06 (2.23-16.47)	4.36 (1.53-12.39)

<82> 이들 데이터는, 관상동맥 심장 질환이 없는 것으로 알려진 중년 남성의 집단에서 CRP 상승이 존재할 때, Cp 또는 hu-HSP60에 대한 혈청 양성 반응이 지속적으로 상승하면, 이후의 관상동맥 사건이 예측된다는 것을 나타낸다 (표 2). 중요한 것은, 지속적으로 CRP+, Cp+ 및 hu-HSP60+이었던 환자는 이후의 관상동맥 사건의 발병에 대해 조정된 OR이 16.87 (2.06-137.9)이었다. 1/138의 대조군 환자만이 세가지 모든 마커에서 지속적인 상승에 대한 상기 기준을 충족시킨 반면에, 17명은 지침 증례인 것으로 확인되었다. 이러한 발견은 심혈관 사건의 발병 위험에 있어서 개개인에 대한 예측성 확인을 위한 새로운 항원 위험 인자의 존재를 제안한다.

<83> 또다른 최근의 연구는 클라미디아 열 충격 단백질 60 (Cp-HSP60)이 ACS와 강력한 연관이 있다는 것을 보고하였다 (문헌 [Biasucci, et. al. Circulation 2003; 107:3015-3017] 참조). 헬싱키 심장 연구에서 자각 증상이 없었던 환자와는 달리, 이 연구에서는 CHD 범위의 다른 부분에서 환자를 조사하였다. 이 연구에서는, 관상동맥 질환 집중 병동 (CCU)에 입원한 초기 UA (브라운발트 클래스 IIb) 또는 AMI에 걸린 환자 219명을 건강한 환자 또는 안정형 협심증 (SA) 환자와 비교하였다. 환자에서 Cp-HSP60에 대한 항체 반응의 존재 (항-Cp-HSP60)를 100명의 대조군 대상체, 40명의 SA 대상체, 179명의 UA 대상체, 및 40명의 AMI 대상체에서 측정하였다 (표 3).

표 3

<84>

비아수씨(Biasucci) 등에 의해 보고된 연구 집단의 혈청학적 특징				
	대조군 대상체 (N=100)	안정형 협심증 환자 (N=40)	불안정형 협심증 환자 (N=179)	AMI 환자 (N=40)
Cp 혈청 양성 반응	30%	60%	68%	65%
HSP60 혈청 양성 반응	0%	20%	98%	99%
CRP > 3 mg/dL	8%	25%	59%	62%
정중 CRP, mg/dL	1.4	2.1	5.05	6.02

주의: 이 연구에서 HSP60 혈청 양성 반응 측정에 사용된 항체는 Cp-HSP60과 hu-HSP60를 구분하지 않는다. 이러한 특이성의 결여로 인해, 이들 데이터는 항-HSP60 반응과 감염 사이의 직접적인 관계를 뒷받침하지 않는다.

- <85> 상기 발견은 특이적 항원 반응이 UA 환자 및 AMI 환자에게 존재한다는 견해를 뒷받침한다. 이들 두 연구는 심혈관 질환의 범위에서 환자 집단의 극단성을 나타낸다. 헬싱키 심장 연구는, 관상동맥 심장 (또는 다른 주요) 질환의 병력이 없는 환자가 CRP 상승 및 Cp 또는 hu-HSP60에 대한 지속적인 항체 반응에 기초하여 관상동맥 사망 또는 비치명적 MI의 위험이 증가되는 것으로 확인될 수 있음을 보여준다. 그러나, 건강한 주요 예방 집단에서는 이들 위험 인자가 우세하지 않았다. 완전 반대로, 비아수씨 등의 연구에서는, HSP60 혈청 양성 반응이 UA 환자 또는 AMI 환자에서 거의 보편적임을 나타낸다. 또한, 안정형 협심증을 앓는 환자에서 HSP60에 대한 20% 혈청 양성 반응의 존재는 HSP-60에 대한 항체의 존재와 심혈관 사건 사이에 등급화된 관계가 존재할 수 있음을 제안한다.
- <86> *HSP60에 대한 항원 반응은 CD28-B7 상호작용을 통해 매개된다.*
- <87> 동물 모델에서, 대식구 (인간 아테롬에서 공통적인 세포 유형)는 마우스 또는 인간 HSP60의 투여시에 T-세포에서 IFN- γ 의 주요 유도인자로서 확인되었다 (문헌 [Int. Immunol. 2002; 14:1247-1253] 참조). 이 과정은 CD28-B7 경로를 포함하는 T-세포 활성화를 위한 전형적인 "2-신호" 모델을 통해 발생하는 것으로 여겨진다. 이 모델에서, 쥐과 또는 인간 HSP60에 의한 T-세포의 활성화는 CTLA4Ig의 투여에 의해 차단된다 (문헌 [Int. Immunol. 2002; 14:1247-1253] 참조). 인간, 쥐과, 클라미디아 및 박테리아의 열 충격 단백질 사이에는 높은 서열 상동성이 있기 때문에, 상기 발견은 중에 걸쳐 보존될 수 있다. 실제로, 분자 모방체를 통해 자가면역을 촉진시키는 역할을 할 수 있는 것은 감염성 작용제의 HSP와 hu-HSP 사이의 상동성이 높다는 것일 수 있다.
- <88> *CD28-B7을 통한 HSP60 신호전달은 인간 질환에 개입하기 위한 기회를 제공할 수 있다.*
- <89> HSP60을 둘러싼 임상전 모델과 상기 언급한 임상 실험 (헬싱키 심장 연구, 비아수씨 등의 연구) 사이에 수많은 유사성이 존재하는 것으로 여겨진다. 먼저, 쥐과 모델은 가장 강력한 자가면역 반응 (즉, T-세포 증식 및 자체 HSP60에 대한 항체 생산)이 쥐과 (자체) HSP60 및 Cp-HSP60 둘다의 동시 투여에 의해서만 달성된다는 것을 밝혀 내었다 (문헌 [Infection and Immunity 1997; 65:1669-1674] 참조). 관련이 없는 동물 모델에서의 이러한 임상전 발견은 헬싱키 심장 연구의 최고 위험군에서 관찰된 발견과 매우 유사하다. 중요한 것은, 인간 아테롬성 플라크 내에서 Cp-HSP60 및 hu-HSP60의 동시 국부화가 보고되었다 (문헌 [Circulation 1998; 98:300-307], [J Infect Dis 1997; 176:292-295] 참조). 이들 플라크에서, HSP60은 후속적으로 TNF- α , 매트릭스 메탈로프로테이나제 발현을 조절하고, 내피 및 평활근 세포를 활성화시킬 수 있다 (문헌 [Circulation 2003; 107:3015-3017] 참조). 또한, 상기 동물 모델에서 쥐과 HSP60 및 Cp-HSP60의 동시 투여에 의해 림프구 IL-10 생산이 6 배 감소하고, IFN- γ /IL-10 생산 비율이 12 배 증가하였다. 낮은 혈청 IL-10 농도가 AMI 이후 사망의 농도의 존성 위험과 관련이 있기 때문에, IL-10 수준의 동시 감소는 임상적으로 중요한 관찰로 해석될 수 있다 (문헌 [Heeschen, et. al. Circulation 2003; 107:2109-2114] 참조). 이들 동물 연구와 임상 시험 데이터가 일치하기 때문에, CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg의 사용을 통한 CD28-B7 신호전달의 억제는 심혈관 질환의 예방 및/또는 치료에 있어서 메카니즘적으로 합당한 특이적인 개입을 나타내 수 있다.
- <90> *심혈관 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg의 사용은 HSP60에만 한정될 수 없다.*
- <91> HSP60은 심혈관 질환의 예방 및/또는 치료에 있어서 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg의 메카니즘적으로 합당한 가설 모델로서 작용한다. 그러나, HSP60은 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg 치료에 의해 방해될 수 있는 유일한 항원 자극을 나타내지 않는다. 예를 들어, 여성 건강상태 연구로부터 입수한 최근의 역학적 증거 (문헌 [Circulation 2001; 104:2266-2268] 참조) 및 CAPTURE 연구로부터 입수한 관찰가능한 데이터 (문헌 [NEJM 2003; 348:1104-1111] 참조)는 혈청 sCD40L 수준에 기초한 심혈관 위험 (사망 또는 비치명적 심근경색증)의 등급화된 연속적인 증가의 존재를 독립적으로 입증하였다. 결과적으로, CD40-CD40L 상호작용은 심혈관 질환에서 염증의 중요한 매개자로서 인식되고 있다. 불안정형 협심증 환자에서 CD28-B7 경로와 CD40-CD40L 경로 사이의 상호작용을 제안하는 증거 또한 있다. 구체적으로, CD40L 발현 (CD40L+) T-세포는 아테롬성 병변에 존재하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94:1931-1936] 참조). 아테롬-관련 세포 상의 CD40의 시험관내 라이게이션을 통해, 염증전 사이토킨, 매트릭스 메탈로프로테이나제, 유착 분자 및 조직 인자의 생산이 증가한다는 것이 밝혀졌다 (문헌 [Nature 1998; 394:200-203] 참조). 다른 모델 시스템에서, 항원 제시 세포 (APC)에 대한 CD40L와 CD40의 상호작용은 B7-1 (CD80) 및 B7-2 (CD86) (CD28-매개된 T-세포 활성화를 위한 자극 분자)의 발현을 증가시킨다 (문헌 [J. Immunol. 2000; 165:3506-3518]). 또한, 불안정형 협심증 환자로부터의 T-세포를

CD3 및 CD28에 대한 자극 항체로 생체의 처리하면 sCD40L의 방출이 자극된다 (문헌 [Circulation 1999; 100:614-620] 참조). 또한, 이러한 관찰들은 CD28-B7 및 CD40-CD40L 신호전달 경로가 죽상동맥경화성 플라크 진행 및 파열의 경향이 있는 증상을 촉진시키기 위해 집합적으로 작용할 수 있다는 것을 제안할 수 있다. 또한, CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg의 사용을 통해 이러한 과정을 방해하는 것이 치료적으로 유익할 수 있다. 최종적으로, 아직 발견되지 않은 다른 CD28-B7-매개된 과정 (아마도 새로운 허혈 관련 항원을 통한 과정, 하기 참조)이 심혈관 질환에서 중요한 역할을 할 수 있고, 이들 과정에서 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg의 사용은 임상적으로 유용할 수 있다.

<92> (3) 동물 모델 및 임상 연구에서 CTLA4Ig 및/또는 L104EA29YIg의 소염 효과

<93> 신장 허혈의 동물 모델에서 CD28-B7 신호전달의 억제는 새로운 자체 항원이 허혈에 중요하다는 것을 제안한다.

<94> 허혈/재관류 손상의 억제에 대한 CTLA4Ig의 효과는 래트 모델에서 평가되었다 (문헌 [J Clin Invest 1997; 100:1199-1203] 참조). 이 모델에서는, 래트의 한쪽 신장을 절제하고, 반대쪽 신장을 45 분 동안 허혈시켰다. CTLA4Ig 및 조절 면역글로불린의 동시 투여에 의해, CD4+ T-세포, 대식구, 및 주요 조직적합성 (MHC) II 세포가 허혈성 신장으로 침윤하는 것이 크게 차단되었다. 염증성 "Th1" 사이토킨 (IL-2, IFN- γ , IL2r), 대식구-관련 사이토킨 (TNF- α , IL-6, 및 유도성 일산화질소 신태타제), 및 화학유인물질/성장 인자 (MCP-1, RANTES, TGF β)의 감소는 상기 발견과 일치하였다. 이러한 발견 외에도, CTLA4Ig는 초기 (즉, 혈장 크레아티닌의 상승) 또는 후기 (즉, 요단백 측정) 신부전을 거의 완전히 퇴치한다. 상기 발견과 관련하여 특히 놀라운 것은 동종항원이 결여된 모델에서 상기 과정을 억제하는 CTLA4Ig의 능력이다. 대안적으로, 신장 허혈의 비-이식 모델에서 CD28-B7 상호작용의 억제는 CTLA4Ig 투여에 의해 이루어지며, CD28-B7 경로를 통해 작용하는 신규한 자체 항원이 허혈성 손상에 중요하다는 것을 제안한다. 상기 동물 모델에서의 효능은 생리학적으로 다소 유사한 관상동맥 허혈의 모델에서 CTLA4Ig의 사용의 역할을 뒷받침한다.

<95> CTLA4Ig 및 L104EA29YIg의 소염 측면은 CV 질환의 예방 및/또는 치료에서 그들의 용도와 일치한다.

<96> RA 환자에서 CTLA4Ig 및 L104EA29YIg의 임상적 발병에 대해 본원에서 제시된 데이터 (실시에 3 내지 7)는 염증성 마커에서 우호적인 변화를 장려한다. RA 환자 및 죽상동맥경화증 또는 UA 환자가 수많은 생화학적, 세포적 및 항원적 유사성을 갖는다는 것이 주목할 만 하다 (상기 표 1 참조). RA의 II기 임상적 발병 프로그램에서, UA 환자에서 공유되는 염증의 여러 마커 (CRP, IL-6, TNF- α)가 측정되었다. RA 환자에서, CTLA4Ig를 2 mg/kg 또는 10 mg/kg 투여한 결과, 플라시보와 비교할 때 제180일에 CRP, IL-6, TNF- α 의 투여량-의존적 감소가 나타났다. 도 52, 55 및 56을 참조한다. 이러한 효과는 지속적인 것으로 보이고, CTLA4Ig의 360일에 걸친 치료에서 지속되는 것으로 밝혀졌다. 도 85, 86A 및 86B를 참조한다.

<97> 추가의 연구는 실시에 8 및 9에서 논의된다.

<98> (4) 죽상동맥경화증에서 B7-CD28 상호작용의 중요성에 대해 최근 보고된 발견

<99> 본 출원이 우선권을 주장하는 특허 출원의 출원일 이래로, 과학 분야에서 아테롬성 병변의 발병, 진행 및 불안정성에 있어서 CD28-B7 상호작용의 역할을 강력히 뒷받침하는 두가지 보고가 있었다. 첫째로, 부오노(Buono) 등의 문헌 [Circulation 2004; 209:2009-2015]은 저밀도 지단백질 수용체 (LDLr)-결핍 (*Ldlr*^{-/-}) 쥐과 모델에서 아테롬성 병변의 발병 및 진행, 및 플라크-항원-특이적 T-세포 반응을 특징으로 한다. *Ldlr*^{-/-} 마우스는 콜레스테롤이 풍부한 식사를 공급할 때 죽상동맥경화증의 발병이 가속된다. 이 연구에서는, *Ldlr*^{-/-} 마우스를 B7-1^{-/-} B7-2^{-/-}와 이종교배하였고, 그 후, 자손을 이종교배하여 CD80 및 CD86이 완전히 결여된 복합 돌연변이 B7-1^{-/-} B7-2^{-/-} *Ldlr*^{-/-} 계통을 생성하였다. 이 독특한 모델은 죽상동맥경화증이 발병할 경향이 있는 동물 모델에서 B7-CD28 상호작용의 역할을 조사하기 위해 허용되었다. 예상된 바와 같이, 이들 동물에게 콜레스테롤이 풍부한 식사를 공급하였을 때, *Ldlr*^{-/-} 마우스 및 B7-1^{-/-} B7-2^{-/-} *Ldlr*^{-/-} 마우스 둘다 대조군 식사를 공급한 *Ldlr*^{-/-} 마우스에 비해 콜레스테롤이 상당히 상승되었다. 그러나, 중요한 것은, 콜레스테롤이 풍부한 식사를 공급한 *Ldlr*^{-/-} 마우스는 콜레스테롤이 풍부한 식사를 제공한 B7-1^{-/-} B7-2^{-/-} *Ldlr*^{-/-} 마우스에 비해 콜레스테롤 수준에 차이가 없었다는 것이다. 컴퓨터 영상 분석을 이용하여 이들 마우스에서 각각의 3 군으로부터 죽상동맥경화증 병변을 대동맥궁 및 하행대동맥으로부터 정량화하였다. 8 주째에, 대조군 식사를 공급한 *Ldlr*^{-/-} 마우스에서는 최소 죽상동맥경화증이 있었다. 그러나, 콜레스테롤이 풍부한 식사를 공급한 *Ldlr*^{-/-} 마우스는 대동맥궁 및 하행대동맥 둘다

에서 죽상동맥경화증 병변의 현저한 증가가 있었다. 반대로, 콜레스테롤이 풍부한 식사를 공급한 B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}Ldlr^{-/-} 마우스는 콜레스테롤이 풍부한 식사를 공급한 Ldlr^{-/-} 마우스에 비해 죽상동맥경화증 병변이 상당히 감소되었다. 20 주째에, 세 처리군 모두에서 죽상동맥경화증의 진행이 있었고, Ldlr^{-/-} 마우스와 B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}Ldlr^{-/-} 마우스 사이에 관찰된 정도의 차이는 다소 감소되었다. 그럼에도 불구하고, Ldlr^{-/-} 마우스와 B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}Ldlr^{-/-} 마우스 사이에서 대동맥궁에서 죽상동맥경화증의 통계적으로 상당한 감소는 20 주째까지 지속되었다.

<100> 이러한 형태학적 관찰 이외에도, Ldlr^{-/-} 마우스 및 B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}Ldlr^{-/-} 마우스로부터의 T-세포 사이에 기능적 차이가 있는 것으로 보인다. 구체적으로, Ldlr^{-/-} 마우스 및 B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}Ldlr^{-/-} 마우스로부터의 CD4+ T-세포의 생체의 분석은, 콜레스테롤이 풍부한 식사를 공급한 Ldlr^{-/-} 마우스만이 mHSP60으로 자극될 때 실질적인 양의 (대략 5 배 높은) IFN- γ 를 생산한다는 것을 입증한다. 이러한 발견은, 고콜레스테롤혈증 및 죽상동맥경화증이 있는 조건하에 Ldlr^{-/-} 마우스로부터의 T-세포가 자체-HSP60에 반응하게 되었다는 것을 제안한다.

<101> 두번째로, 아페크(Afek) 등의 문헌 [Experimental and Molecular Pathology 2004; 76:219-223]은 아폴리오단백질 E 녹아웃 (ApoE^{-/-}) 마우스의 아테롬 내에서 CD80 및 CD86의 발현을 특징으로 하는 면역조직화학적 방법을 이용한다. ApoE^{-/-} 마우스는 성장함에 따라 죽상동맥경화증이 발병한다. 연구자들은 다양한 성장 단계에서 아테롬성 병변 내의 CD80 및 CD86의 존재를 평가하였다. 이 모델에서는, 초기 및 더욱 진행된 아테롬성 병변 둘다에서 CD80 및 CD86 양성 면역염색이 존재하였다. 더욱이, CD80 및 CD86 염색은 T-세포 활성화에 대한 추정 자가항원인 산화된 LDL과 함께 동시에 국부화되는 것으로 발견되었다.

<102> 총체적으로, 상기 두 문헌은 우선권 특허 출원에서 이전에 제시된 내용을 뒷받침하고 확장시킨다. 첫째로, T-세포가 아테롬에 존재하고 아테롬 내에서 활성화된다는 견해는 초기 및 진행된 아테롬 둘다 내에서 CD80 및 CD86의 발견에 의해 굳건해 진다. 둘째로, B7-1^{-/-}B7-2^{-/-}Ldlr^{-/-} 마우스로부터 얻은 데이터는, B7-CD28 신호전달의 방해가 죽상동맥경화증의 널리 허용되는 모델에서 죽상동맥경화증의 발병 및 진행에 영향을 미친다는 것을 입증한다. 마지막으로, mHSP60으로부터의 CD4+ T-세포의 생체의 자극에 의해 실질적인 IFN- γ 가 생산된다는 관찰은, HSP60이 B7-CD28-의존성 과정을 통해 (즉, 매트릭스 메탈로프로테이나제 및 콜라겐 합성에 대한 IFN- γ 의 효과를 통해) 심혈관염 및 플라크 불안정성을 촉진시키는 새로운 항원으로서 작용한다는 이전의 가설을 뒷받침한다.

<103> 조성물

<104> 본 발명은 CTLA4 및/또는 CD28 (예를 들어, 가용성 CTLA4 분자)과의 B7 상호작용을 차단하는 분자를 포함하는, 심혈관 질환을 치료하기 위한 조성물을 제공한다. 가용성 CTLA4의 예로는 CTLA4Ig (도 24), 및 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들어 L104EA29YIg (도 19), L104EA29LIg (도 20), L104EA29Tig (도 21) 및 L104EA29WLIg (도 22)가 있다.

<105> 돌연변이 또는 야생형 서열을 갖는 CTLA4 분자는 CTLA4 막형단 절편을 결실시킴으로써 가용성이 될 수 있다 (문헌 [Oaks, M. K., et al., 2000 Cellular Immunology 201: 144-153]).

<106> 별법으로, 돌연변이 또는 야생형 서열을 갖는 가용성 CTLA4 분자는 CTLA4 분자를 면역글로불린 (Ig) 분자와 같은 비-CTLA4 잔기와 융합시켜 CTLA4 분자를 가용성으로 만드는 융합 단백질일 수 있다. 예를 들어, CTLA4 융합 단백질은 면역글로불린 불변 영역과 융합되어 CTLA4Ig 분자를 생성시키는 CTLA4의 세포외 도메인을 포함한다 (도 24) (문헌 [Linsley, P. S., et al., 1994 Immunity 1: 793-80]). CTLA4와 융합될 수 있는 면역글로불린 도메인의 예로는 IgC γ 1 (IgC감마1), IgC γ 2 (IgC감마2), IgC γ 3 (IgC감마3), IgC γ 4 (IgC감마4), IgC μ (IgC뮤), IgC α 1 (IgC알파1), IgC α 2 (IgC알파2), IgC δ (IgC델타) 또는 IgC ϵ (IgC엡실론)을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

<107> 임상 프로토콜에서, 면역글로불린 부분이 대상체에서 해로운 면역 반응을 유도하지 않는 것이 바람직하다. 바람직한 상기 부분은 인간 또는 원숭이 면역글로불린 불변 영역을 포함하는 면역글로불린 불변 영역이다. 적합한 면역글로불린 영역의 한가지 예로는 Fc 수용체와의 결합, 상보체-의존성 세포독성 (CDC)의 매개 또는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC)의 매개와 같은 이펙터 기능을 매개할 수 있는 힌지, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 인간 C γ 1이 있다. 면역글로불린 부분은 그 안에 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있는데 (예를 들어,

CH2 도메인에서, CDC 또는 ADCC와 같은 이펙터 기능을 감소시킴), 이 때 돌연변이는 Fc 수용체에 대한 면역글로불린의 결합능을 증가시키거나 감소시켜 그의 리간드에 대한 면역글로불린의 결합능을 조절한다. 예를 들어, 면역글로불린 부분의 돌연변이는 힌지 도메인 내의 임의의 또는 모든 그의 시스테인 잔기의 변화를 포함할 수 있으며, 예를 들어 위치 +130, +136 및 +139의 시스테인은 세린으로 치환된다 (도 24). 면역글로불린 일부는 또한 도 24에 나타낸 바와 같이 위치 +148의 프롤린을 세린으로 치환하는 것을 포함할 수 있다. 추가로, 면역글로불린 부분의 돌연변이는 +144 위치의 루이신을 페닐알라닌으로 치환, 위치 +145의 루이신을 글루탐산으로 치환, 또는 위치 +147의 글리신을 알라닌으로 치환하는 것을 포함한다.

<108> 가용성 CTLA4 분자 또는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자에 사용하기 위한 추가의 비-CTLA4 잔기로는 p97 분자, env gp120 분자, E7 분자 및 ova 분자를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다 (문헌 [Dash, B. et al. 1994 J. Gen. Virol. 75 (Pt 6): 1389-97], [Ikeda, T., et al. 1994 Gene 138 (1-2): 193-6], [Falk, K., et al. 1993 Cell. Immunol. 150 (2): 447-52] 및 [Fujisaka, K. et al. 1994 Virology 204 (2): 789-93]). 다른 분자 또한 가능하다 (문헌 [Gerard, C. et al. 1994 Neuroscience 62 (3): 721], [Byrn, R. et al. 1989 63 (10): 4370], [Smith, D. et al. 1987 Science 238: 1704] 및 [Lasky, L. 1996 Science 233: 209]).

<109> 본 발명의 가용성 CTLA4 분자는 분자의 CTLA4 부분의 세포외 도메인의 N-말단과 연결된 신호 펩티드 서열을 포함할 수 있다. 온코스타틴 M (문헌 [Malik, et al., (1989) Molec. Cell. Biol. 9: 2847-2853]) 또는 CD5 (문헌 [Jones, N. H. et al., (1986) Nature 323: 346-349])로부터의 신호 펩티드 또는 임의의 세포외 단백질로부터의 신호 펩티드를 비롯한 신호 펩티드는 상기 분자의 분비를 허용할 임의의 서열일 수 있다. 본 발명의 가용성 CTLA4 분자는 CTLA4의 세포외 도메인의 N-말단에 연결된 온코스타틴 M 신호 펩티드, 및 CTLA4의 세포외 도메인 (야생형 또는 돌연변이)의 C-말단에 연결된 인간 면역글로불린 분자 (예를 들어, 힌지, CH2 및 CH3)를 포함할 수 있다. 상기 분자는 위치 -26의 메티오닌 내지 위치 -1의 알라닌을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 온코스타틴 M 신호 펩티드, 위치 +1의 메티오닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CTLA4 단백질, 위치 +125의 접합 아미노산 잔기 글루타민 및 위치 +126의 글루탐산 내지 위치 +357의 라이신을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 일부를 포함한다.

<110> 구체적으로, 상기 기재된 돌연변이된 CTLA4 서열을 포함하는 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 돌연변이된 CTLA4 단편과 융합된 인간 Ig, 예를 들어 IgC γ 1 (IgC γ 1) 잔기를 포함하는 융합 분자일 수 있다.

<111> 한 실시양태에서, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 세포외 도메인의 단일 부위 돌연변이를 포함하는 CTLA4 단편과 융합된 IgC γ 1 (IgC γ 1)을 포함한다. CTLA4의 세포외 도메인은 위치 +1의 메티오닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함한다 (예를 들어, 도 23). CTLA4의 세포외 부분은 위치 -1의 알라닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함할 수 있다 (예를 들어, 도 23). 단일 부위 돌연변이의 예로는 위치 +104의 루이신을 임의의 다른 아미노산으로 변화시킨 하기 돌연변이가 있다:

단일-부위 돌연변이체	코돈 변화:
L104EIg	글루탐산 GAG
L104SIg	세린 AGT
L104TIg	트레오닌 ACG
L104AIg	알라닌 GCG
L104Wlg	트립토판 TGG
L104Qlg	글루타민 CAG
L104Klg	라이신 AAG
L104RIg	아르기닌 CGG
L104GIg	글리신 GGG

<112> 추가로, 본 발명은 IgC γ 1 (IgC γ 1) 부분과 융합된, 2 개의 돌연변이를 갖는 CTLA4의 세포외 도메인을 갖는 돌연변이체 분자를 제공한다. 예로는 위치 +104의 루이신을 다른 아미노산 (예를 들어, 글루탐산)으로 변화시키고, 위치 +105의 글리신, 위치 +25의 세린, 위치 +30의 트레오닌 또는 위치 +29의 알라닌이 임의의 다른 아미노산으로 변화시킨 하기 돌연변이체 분자가 있다:

이중-부위 돌연변이체	코돈 변화
L104EG105FIg	페닐알라닌 TTC
L104EG105W1g	트립토판 TGG
L104EG105L1g	루이신 CTT
L104ES25RIg	아르기닌 CGG
L104ET30GIg	글리신 GGG
L104ET30NIg	아스파라긴 AAT
L104EA29Y1g	타이로신 TAT
L104EA29L1g	루이신 TTG
L104EA29TIg	트레오닌 ACT
L104EA29W1g	트립토판 TGG

<114>

<115> 추가로, 본 발명은 IgC γ 1 (IgC감마1) 잔기와 융합된, 3 개의 돌연변이를 포함하는 CTLA4의 세포외 도메인을 갖는 돌연변이체 분자를 제공한다. 예로는 위치 +104의 루이신을 다른 아미노산 (예를 들어, 글루탐산)으로 변화시키고, 위치 +29의 알라닌을 다른 아미노산 (예를 들어, 타이로신)으로 변화시키며, 위치 +25의 세린을 다른 아미노산으로 변화시킨 하기 돌연변이체 분자가 있다:

삼중-부위 돌연변이체	코돈 변화:
L104EA29YS25KIg	라이신 AAA
L104EA29YS25KIg	라이신 AAG
L104EA29YS25NIg	아스파라긴 AAC
L104EA29YS25RIg	아르기닌 CGG

<116>

<117> 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 분자의 CTLA4 부분과 Ig 부분 사이에 위치하는 접합 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 접합 아미노산은 글루타민을 비롯한 임의의 아미노산일 수 있다. 접합 아미노산은 당업계 공지된 분자 또는 화학적 합성법으로 도입될 수 있다.

<118>

본 발명의 가용성 CTLA4 단백질 및 그의 단편은 화학적 합성 방법에 의해 생성될 수 있다. 폴리펩티드의 고상 화학적 합성의 원리는 당업계에 널리 공지되어 있고, 이 분야와 관련된 일반적인 문헌에서 확인할 수 있다 (문헌 [Dugas, H. and Penney, C. 1981 Bioorganic Chemistry, pp 54-92, Springer-Verlag, New York]). 가용성 CTLA4 단백질은 어플라이드 바이오시스템스 430A 펩티드 합성기 (어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems), 캘리포니아주 포스터 시티 소재) 및 어플라이드 바이오시스템스에 의해 공급된 합성 주기에 의해 합성될 수 있다. 보호된 아미노산, 예를 들어 t-부톡시카르보닐-보호된 아미노산, 및 다른 시약은 여러 화학 공급 업체로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

<119>

본 발명은 CTLA4 돌연변이체 분자 일부의 세포외 도메인의 N-말단과 연결된 신호 펩티드 서열을 포함하는 CTLA4 돌연변이체 분자를 제공한다. 온코스타틴 M (문헌 [Malik, et al., 1989 Molec. Cell. Biol. 9: 2847-2853]) 또는 CD5 (문헌 [Jones, N. H. et al., 1986 Nature 323: 346-349])로부터의 신호 펩티드, 또는 임의의 세포외 단백질로부터의 신호 펩티드를 비롯한 신호 펩티드는 돌연변이체 분자의 분비를 허용하는 임의의 서열일 수 있다.

<120>

본 발명은 L104E1g (도 18에 포함된 바와 같음) 또는 L104S1g와 같은 CTLA4의 세포외 도메인의 단일 부위 돌연변이를 포함하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 제공하는데, 이 때 L104E1g 및 L104S1g를 그의 CTLA4 서열에서 돌연변이시켜 위치 +104의 루이신을 글루탐산 또는 세린으로 각각 치환시킨다. 단일 부위 돌연변이체 분자는 추가로 위치 +1의 메티오닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 부분, 위치 +125의 접합 아미노산 잔기 글루타민, 및 위치 +126의 글루탐산 내지 위치 +357의 라이신을 포함하는 면역글로불린 일부를 포함한다. 돌연변이체 분자의 면역글로불린 일부를 또한 돌연변이시켜 위치 +130, +136 및 +139의 시스테인을 세린으로 치환하고 위치 +148의 프롤린을 세린으로 치환할 수 있다. 대안적으로, 단일 부위 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 위치 -1의 알라닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 일부를 가질 수 있다.

<121>

본 발명은 CTLA4의 세포외 도메인에 이중 부위 돌연변이를 포함하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들어 위치 +104의 루이신을 글루탐산으로 치환하고 위치 +29의 알라닌을 타이로신, 루이신, 트레오닌 및 트립토판으

로 각각 변화시킨 L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg 또는 L104EA29WIG를 제공한다. 위치 +1의 메티오닌에서 개시하여 위치 +357의 라이신으로 종결하며 신호(리더) 펩티드 서열을 추가한 L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg 및 L104EA29WIG에 대한 서열은 도 19 내지 22에 각각 나타낸 서열에 포함된다. 이중 부위 돌연변이체 분자는 위치 +1의 메티오닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 부분, 위치 +125의 접합 아미노산 잔기 글루타민, 및 위치 +126의 글루탐산 내지 위치 +357의 라이신을 포함하는 면역글로불린 일부를 추가로 포함한다. 돌연변이체 분자의 면역글로불린 일부를 또한 돌연변이시켜 위치 +130, +136 및 +139의 시스테인을 세린으로 치환하고 위치 +148의 프롤린을 세린으로 치환할 수 있다. 대안적으로, 이들 돌연변이체 분자는 위치 -1의 알라닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 일부를 가질 수 있다.

<122> 본 발명은 CTLA4의 세포의 도메인의 이중 부위 돌연변이를 포함하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들어 위치 +104의 루이신을 글루탐산으로 치환하고 위치 +105의 글리신을 페닐알라닌, 트립토판 및 루이신으로 각각 치환한 L104EG105FIg, L104EG105WIG 및 L104EG105LIg를 제공한다. 이중 부위 돌연변이체 분자는 위치 +1의 메티오닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 일부, 위치 +125의 접합 아미노산 잔기 글루타민, 및 위치 +126의 글루탐산 내지 위치 +357의 라이신을 포함하는 면역글로불린 일부를 추가로 포함한다. 면역글로불린 일부를 또한 돌연변이시켜 위치 +130, +136 및 +139의 시스테인을 세린으로 치환하고 위치 +148의 프롤린을 세린으로 치환할 수 있다. 별법으로, 상기 돌연변이체 분자는 위치 -1의 알라닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 일부를 가질 수 있다.

<123> 본 발명은 위치 +1의 메티오닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 부분, 위치 +125의 접합 아미노산 잔기 글루타민, 및 위치 +126의 글루탐산 내지 위치 +357의 라이신을 포함하는 면역글로불린 일부를 포함하는 CTLA4 일부를 포함하는 이중 부위 돌연변이체 분자인 L104ES25RIg를 제공한다. CTLA4의 세포의 도메인을 갖는 부분을 돌연변이시켜, 위치 +25의 세린을 아르기닌으로 치환하고 위치 +104의 루이신을 글루탐산으로 치환한다. 대안적으로, L104ES25RIg는 위치 -1의 알라닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 일부를 가질 수 있다.

<124> 본 발명은 CTLA4의 세포의 도메인에 이중 부위 돌연변이를 포함하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들어 위치 +104의 루이신을 글루탐산으로 치환하고 위치 +30의 트레오닌을 글리신 및 아스파라긴으로 각각 치환한 L104ET30GIg 및 L104ET30NIg를 제공한다. 이중 부위 돌연변이체 분자는 위치 +1의 메티오닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 부분, 위치 +125의 접합 아미노산 잔기 글루타민, 및 위치 +126의 글루탐산 내지 위치 +357의 라이신을 포함하는 면역글로불린 일부를 추가로 포함한다. 돌연변이체 분자의 면역글로불린 일부를 또한 돌연변이시켜, 위치 +130, +136 및 +139의 시스테인을 세린으로 치환하고 위치 +148의 프롤린을 세린으로 치환한다. 대안적으로, 상기 돌연변이체 분자는 위치 -1의 알라닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 일부를 가질 수 있다.

<125> 본 발명은 CTLA4의 세포의 도메인에 삼중 부위 돌연변이를 포함하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들어 위치 +104의 루이신을 글루탐산으로 치환하고, 위치 +29의 알라닌을 타이로신을 변화시키며 위치 +25의 세린을 라이신, 아스파라긴 및 아르기닌으로 각각 변화시킨 L104EA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg, L104EA29YS25RIg를 제공한다. 삼중 부위 돌연변이체 분자는 위치 +1의 메티오닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 부분, 위치 +125의 접합 아미노산 잔기 글루타민, 및 위치 +126의 글루탐산 내지 위치 +357의 라이신을 포함하는 면역글로불린 일부를 추가로 포함한다. 돌연변이체 분자의 면역글로불린 일부를 또한 돌연변이시켜, 위치 +130, +136 및 +139의 시스테인을 세린으로 치환하고 위치 +148의 프롤린을 세린으로 치환할 수 있다. 대안적으로, 상기 돌연변이체 분자는 위치 -1의 알라닌 내지 위치 +124의 아스파르트산을 포함하는 CTLA4 일부를 가질 수 있다.

<126> 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자의 추가의 실시양태는 B7과 결합하는 키메라 CTLA4/CD28 상동 돌연변이체 분자를 포함한다(문헌 [Peach, R. J., et al., 1994 J Exp Med 180: 2049-2058]). 상기 키메라 CTLA4/CD28 돌연변이체 분자의 예로는 HS1, HS2, HS3, HS4, HS5, HS6, HS4A, HS4B, HS7, HS8, HS9, HS10, HS11, HS12, HS13 및 HS14가 있다(미국 특허 제5,773,253호).

<127> 본 발명의 바람직한 실시양태는 가용성 CTLA4 분자, 예를 들어 CTLA4Ig(도 24에 나타낸 바와 같음, 위치 +1의 메티오닌에서 개시하여 위치 +357의 라이신에서 종결) 및 가용성 CTLA4 돌연변이 L104EA29YIg(도 19에 나타낸 바와 같음, 위치 +1의 메티오닌에서 시작하여 위치 +357의 라이신에서 종결)이다.

<128> 추가로, 본 발명은 본 발명의 가용성 CTLA4 분자에 상응하는 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 DNA(예, cDNA) 또는 그의 하이브리드이다. 예

를 들어, CTLA4Ig 분자는 알라닌을 코딩하는 GCT 또는 GCC 코돈을 도 24에 나타낸 뉴클레오티드 위치 +49 내지 +51에서 포함할 수 있다. 다른 예에서, CTLA4Ig 분자는 글리신을 코딩하는 GGT 또는 GGG 코돈을 도 24에 나타낸 뉴클레오티드 위치 +436 내지 +438에서 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, CTLA4Ig 분자는 아르기닌을 코딩하는 CGG 또는 CGT 코돈을 도 24에 나타낸 뉴클레오티드 위치 +631 내지 +633에서 포함할 수 있다. CTLA4Ig를 코딩하는 DNA (도 24)는 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 블러버드 10801에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC)에 1991년 5월 31일 기탁되었고, ATCC 접근 번호 ATCC 제68629호를 부여받았다. L104EA29YIg를 코딩하는 DNA (도 19에 포함된 서열)는 ATCC에 2000년 6월 19일 기탁되었고, ATCC 접근 번호 제 PTA-2104호를 부여받았다. 또는, 핵산 분자는 RNA 또는 그의 하이브리드이다.

<129> 또한, 본 발명의 핵산 분자는 DNA 또는 RNA 분자와 상이한 유도체 핵산 분자, 및 안티센스 분자를 포함한다. 유도체 분자는 펩티드 핵산 (PNA), 및 염기쌍-의존적 방식으로 단일-가닥 DNA 또는 RNA와 결합하는 비-핵산 분자 (포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트 및 메틸포스포네이트 분자 포함)를 포함한다 [Zamecnik, P. C., et al., 1978 Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 280284; Goodchild, P. C., et al., 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 4143-4146]. 펩티드 핵산 분자는 아미노산 잔기, 예를 들어 라이신, 및 아미노기가 부가된 핵산 올리고머를 포함한다. 항-유전자 작용제로 지칭되기도 하는 상기 소분자들은 핵산에서 이들과 상보성인 (주형) 가닥에 결합함으로써 전사체 연장을 중단시킨다 [Nielsen, P. E., et al., 1993, Anticancer Drug Des 8: 53-63]. DNA, RNA, 및 이들의 유사체의 합성 방법에 대한 검토를 위해서는 문헌 [Oligonucleotides and Analogues, eds. F. Eckstein, 1991, IRL Press, New York; Oligonucleotide Synthesis, ed. M. J. Gait, 1984, IRL Press, Oxford, England]을 참조할 수 있다. 추가로, 안티센스 RNA 기술에 대한 방법은 미국 특허 제5,194,428호 및 동 제5,110,802호에 기재되어 있다. 당업자라면 본원에 기재된 가용성 CTLA4 폴리뉴클레오티드 서열을 이용하여 이러한 종류의 핵산 분자들을 쉽게 얻을 수 있을 것이다. 예를 들어, 문헌 [Innovative and Perspectives in Solid Phase Synthesis (1992) Egholm, et al. pp 325-328] 또는 미국 특허 제5,539,082호를 참조한다.

<130> 추가로, 본 발명은 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 벡터라는 용어는 플라스미드, 코스미드 및 파지미드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 벡터는 적절한 숙주 세포 내에서 rDNA의 복제를 지시하는 레플리콘을 포함하는 자가 복제성 벡터일 수 있다. 또는, 벡터는 재조합 벡터가 숙주 세포로 통합되도록 지시할 수 있다. 예를 들어 다수의 잘 알려진 레트로바이러스 및 아데노바이러스 벡터 [Berkner 1988 Biotechniques 6: 616-629]와 같은 다양한 바이러스 벡터가 사용될 수도 있다.

<131> 벡터는 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 가용성 CTLA4 전사체 또는 폴리펩티드 서열의 발현을 허용할 수 있다. 벡터는, 삽입된 가용성 CTLA4 핵산 서열의 전사를 가능하게 하며 적절한 숙주 세포에서 작동가능하게 연결된 가용성 CTLA4 서열의 발현 (예, 전사 및/또는 번역)을 조절하는데 사용될 수 있는 프로모터 서열과 같은 발현 조절 요소를 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 발현 조절 요소는 당업계에 공지되어 있으며, 유도성 프로모터, 구성적 프로모터, 분비 신호, 인핸서, 전사 종결자 및 기타 전사 조절 요소를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 번역에 관여하는 다른 발현 조절 요소는 당업계에 공지되어 있으며, 샤인-달가르노 서열 (예, 원핵 숙주 세포), 및 개시 및 종결 코돈을 포함한다.

<132> 가용성 CTLA4 서열을 효율적으로 번역하기 위해서는 특정 개시 신호가 필요할 수도 있다. 이러한 신호들은 ATG-개시 코돈 및 인접한 서열을 포함한다. 가용성 CTLA4 개시 코돈 및 상류 서열이 적절한 발현 벡터로 삽입되는 경우, 추가의 번역 조절 신호는 필요하지 않을 수 있다. 그러나, 단지 코딩 서열이나 그의 일부만이 삽입되는 경우, ATG-개시 코돈을 포함하는 외인성 전사 조절 신호가 제공될 수 있다. 또한, 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해서는 개시 코돈이 정확한 리딩-프레임내에 존재해야 한다. 외인성 전사 요소 및 개시 코돈은 다양한 기원의 것일 수 있으며, 둘 다 천연의 것이거나 합성된 것일 수 있다. 사용되는 세포계에 적절한 인핸서를 포함시켜 발현 효율을 증대시킬 수 있다 [Scharf, D., et al, 1994 Results Probl. Cell. Differ. 20:125-62; Bittner, et al., 1987 Methods in Enzymol. 153: 516-544].

<133> 진핵 숙주 세포내 가용성 CTLA4 서열의 발현에 대해 바람직한 벡터는 발현 조절 요소, 예를 들어 곤충 세포내 발현을 위한 바콜로바이러스 폴리헤드린 프로모터를 포함한다. 다른 발현 조절 요소는 식물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 또는 인핸서 (예, 열 충격, RUBISCO, 저장 단백질 유전자), 바이러스 프로모터 또는 리더 서열 또는 식물 바이러스 유래의 프로모터 또는 인핸서 또는 포유동물 유전자 또는 포유동물 바이러스 유래의 프로모터 또는 인핸서를 포함한다.

<134> 바람직한 벡터는 약물 내성, 예를 들어 암피실린 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하는 유전자 생성물을

코딩하는 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자를 포함한다. 또한, 벡터는 외인성 DNA 서열의 편리한 삽입을 가능하게 하는 다수개의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하기도 한다. 본 발명의 가용성 CTLA4 단백질을 코딩하는 재조합 발현 벡터를 생성시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 문헌 [Sambrook et al., (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd edition, Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989, Cold Spring Harbor Press) and Ausubel et al. (1989 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York N. Y.)]에서 찾을 수 있다.

- <135> 가용성 CTLA4 전사체 및/또는 코딩된 가용성 CTLA4 폴리펩티드를 생성시키는 바람직한 벡터는 원핵 숙주 세포에 적합한 발현 벡터이다. 원핵 세포 발현 벡터는 당업계에 잘 알려져 있으며, 여러 시판 공급원으로부터 이용가능하다. 예를 들어, pET 벡터 (예, pET-21, Novagen Corp.), BLUESCRIPT 파지미드 (Stratagene, LaJolla, CA), pSPORT (Gibco BRL, Rockville, MD), 또는 ptrp-lac 하이브리드를 사용해서 박테리아 숙주 세포에서 가용성 CTLA4 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다.
- <136> 또는, 가용성 CTLA4 전사체 및/또는 코딩된 가용성 CTLA4 폴리펩티드를 발현시키는 바람직한 발현 벡터는 진핵 숙주 세포에 적합한 발현 벡터이다. 더 바람직한 벡터는 척추동물 세포에 적합한 벡터이다. 진핵 세포 발현 벡터는 당업계에 잘 알려져 있으며, 여러 시판 공급원으로부터 이용가능하다. 전형적으로는, 이러한 벡터는 원하는 DNA 절편의 삽입을 위한 편리한 제한 부위를 함유하도록 제공된다. 이러한 벡터의 전형적인 것으로는 PSVL 및 pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnologies, Inc.), pTDT1 (ATCC, #31255), 및 유사한 진핵 발현 벡터가 있다.
- <137> 발현 벡터의 예는 포유동물 숙주 세포를 위한 벡터 (예, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc 벡터, pCMV 벡터, pSG5 벡터 (Stratagene)), 레트로바이러스 벡터 (예, pFB 벡터 (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) 또는 이들의 변형된 형태, 아데노바이러스 벡터; 아데노게 바이러스 벡터, 바콜로바이러스 벡터, 효모 벡터 (예, pESC 벡터 (Stratagene))를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- <138> 숙주 벡터 시스템이 또한 제공된다. 숙주 벡터 시스템은 적합한 숙주 세포에서 본 발명의 벡터를 포함한다. 적합한 숙주 세포의 예로는 원핵 및 진핵 세포가 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 수행에 있어서, 진핵 세포가 또한 적합한 숙주 세포이다. 진핵 세포의 예로는 일차 또는 무한 증식성인 임의의 동물 세포, 효모 (예를 들어, 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킨조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) 및 피키아 패스토리스(*Pichia pastoris*)) 및 식물 세포가 있다. 동물 세포의 예는 소, 양, 돼지, 쥐, 말, 원숭이 및 유인원으로부터의 세포를 포함한다. 골수종, COS 및 CHO 세포가 숙주로 사용될 수 있는 동물 세포의 예이다. 특정 CHO 세포는 DG44 ([Chasin, et la., 1986 Som. Cell. Molec. Genet. 12: 555-556]; [Kolkekar 1997 Biochemistry 36: 10901-10909]), CHO-K1 (ATCC 번호 제CCL-61호), CHO-K1 Tet-On 세포주 (Clontech), ECACC 85050302로 지칭된 CHO (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO 클론 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO 클론 B (GEIMG, Genova, IT), ECACC 93061607로 지칭된 CHO-K1/SF (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK) 및 ECACC 92052129로 지칭된 RR-CHOK1 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 식물 세포의 예는 담배, 옥수수, 대두 및 버 세포로부터의 식물 전체, 세포 배양물 또는 유합조직을 포함한다. 옥수수, 대두 및 버 종자가 또한 허용된다.
- <139> 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자를 천연 발생 폴리펩티드로서 단리할 수 있거나 또는 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합인지의 여부에 상관없이 임의의 공급원으로부터 단리할 수 있다. 따라서, CTLA4 돌연변이체 폴리펩티드 분자를 임의의 종, 특히 소, 양, 돼지, 쥐, 말 및 바람직하게는 인간을 비롯한 포유동물로부터 천연 발생 단백질로서 단리할 수 있다. 별법으로, CTLA4 돌연변이체 폴리펩티드 분자를 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현된 재조합 폴리펩티드로서 단리할 수 있거나 또는 화학적으로 합성한 폴리펩티드로서 단리할 수 있다.
- <140> 당업자는 표준 단리 방법을 사용하여 단리된 CTLA4 돌연변이체 분자를 용이하게 획득할 수 있다. 단리 성질 및 단리 정도는 단리된 분자의 공급원 및 사용 용도에 의존할 것이다.
- <141> CTLA4 돌연변이체 분자 및 그의 단편 또는 유도체를 재조합 방법으로 제조할 수 있다. 따라서, 야생형 CTLA4 분자를 코딩하는 단리된 뉴클레오티드 서열을 조작하여 돌연변이를 도입하고, CTLA4 돌연변이체 폴리펩티드 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 생성할 수 있다. 예를 들어, CTLA4 돌연변이체 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을, 프라이머 및 PCR 증폭을 사용하여 부위 지시적 돌연변이유발법으로 생성시킬 수 있다. 프라이머는 원하는 돌연변이를 도입하기 위해 고안된 특정 서열을 포함한다. 별법으로, 프라이머는 랜덤화 또는 반-랜덤화된 서열을 포함하도록 고안하여 랜덤 돌연변이를 도입할 수 있다. 표준 재조합 방법 [Molecular Cloning,

A Laboratory Manual, 2nd edition, Sambrook, Fritch, and Maniatis 1989, Cold Spring Harbor Press] 및 PCR 기술 (미국 특허 제4,603,102호)을 이용하여 CTLA4 돌연변이체 폴리펩티드를 코딩하는 CTLA4 돌연변이체 폴리뉴클레오티드를 생성하고 단리할 수 있다.

- <142> 본 발명은 CTLA4 및/또는 CD28와의 B7 상호작용을 차단하는 분자, 예를 들어 가용성 CTLA4 분자, CD28 분자, B7 (B7-1 또는 B7-2) 분자, 항-CTLA4 모노클로날 항체, 항-CD28 모노클로날 항체 또는 항-B7 (B7-1 또는 B7-2) 모노클로날 항체를 제약상 유효량으로 포함하는 제약 조성물을 포함한다. 본 발명의 제약 조성물은 심혈관 질환의 치료에 유용하다. 특정 실시양태에서, 심혈관 질환은 CD28/CTLA4/B7 상호작용에 의해 매개된다. 가용성 CTLA4 분자는 바람직하게는 야생형 서열을 갖는 가용성 CTLA4 분자 및/또는 CTLA4의 세포외 도메인에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 가용성 CTLA4 분자이다. 제약 조성물은 가용성 CTLA4 단백질 분자 및/또는 핵산 분자, 및/또는 이들 분자를 코딩하는 벡터를 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 가용성 CTLA4 분자는 도 24 또는 19 (각각, CTLA4Ig 또는 L104EA29Y)에 나타난 바와 같은 CTLA4의 세포외 도메인의 아미노산 서열을 갖는다. 훨씬 더 바람직하게는, 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 본원에 개시된 바와 같은 L104EA29YIg이다.
- <143> 본 발명의 조성물은 1종 이상의 추가의, 기타 또는 제2의 치료제를 더 포함할 수 있다. "병용 투여되는" 또는 "병용 요법"이란 본 발명의 화합물과 1종 이상의 추가의 치료제 둘다를 치료하고자 하는 포유동물에게 투여하는 것을 의미한다. 병용 투여될 경우, 각 성분은 동시에 투여될 수 있거나 또는 상이한 시점에서 임의의 순서로 연속 투여될 수 있다. 따라서, 각 성분을 개별적으로 투여하되, 충분히 가까운 시간 간격으로 투여하여 원하는 치료 효과를 제공할 수 있다.
- <144> 본 발명의 분자와 병용되어 사용되는 경우, 추가의 치료제의 양은 예를 들어 문헌 [Physicians' Desk Reference (PDR)]에 제시된 바와 같이 사용될 수 있거나 또는 당업계의 숙련자에 의해 결정될 수 있다.
- <145> 추가의, 기타 또는 제2의 치료제는 항-응고제 또는 응고 억제제, 항-혈소판 또는 혈소판 억제제, 트롬빈 억제제, 비타민 K 길항제, 당단백질 IIb/IIIa 수용체 길항제, 혈전용해제 또는 섬유소용해제, 항-부정맥제, 항-고혈압제, 안지오텐신 전환 효소 억제제 (ACE-I), 안지오텐신 수용체 차단제 (ARB), 베타-차단제, 칼슘 채널 차단제 (L-형 및 T-형), 심장 글리코시드, 이노제, 미네랄코르티코이드 수용체 길항제, 포스포디에스테라제 억제제, 콜레스테롤/지질 저하제 및 지질 프로파일 요법, 항-당뇨병제, 항-우울제, 소염제 (스테로이드 및 비-스테로이드), 항-골다공증제, 호르몬 대체 요법, 경구 피임제, 항-비만제, 항-불안제, 항-증식제, 항-종양제, 항-퀘양 및 위식도역류질환제, 성장 호르몬 및/또는 성장 호르몬 분비촉진제, 갑상선모방제 (갑상선 수용체 길항제 포함), 항-감염제, 항-바이러스제, 항-박테리아제, 및 항-진균제를 포함한다.
- <146> 본 발명의 조성물과 병용되어 사용될 수 있는 항응고제 (또는 응고 억제제)는 와파린 및 헤파린 (분획화되지 않은 헤파린 또는 임의의 시판되는 저분자량 헤파린), 합성 펜타사카라이드, 히루딘 및 아르가트로반을 비롯한 직접 작용성 트롬빈 억제제, 및 인자 Xa 억제제를 포함한다.
- <147> 항-혈소판제 (또는 혈소판 억제제)라는 용어는, 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어 혈소판의 응집, 유착 또는 과립 분비를 억제함으로써 혈소판 기능을 억제하는 작용제를 나타낸다. 이러한 작용제로는 다양한 공지된 비-스테로이드 소염제 (NSAIDS), 예를 들어 아스피린, 이부프로펜, 나프록센, 숄린닥, 인도메타신, 메페나메이트, 드록시캄, 디클로페낙, 숄핀피라존, 피록시캄, 및 이들의 제약상 허용되는 염 또는 전구약물이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. NSAIDS 중에서, 아스피린 (아세틸살리실산 또는 ASA) 및 피록시캄이 바람직하다. 다른 적합한 혈소판 억제제는 IIb/IIIa 길항제 (예, 티로피반, 에프티피바티드, 및 아브시시뎀), 트롬복산-A2-수용체 길항제 (예, 이페트로반), 트롬복산-A2-신테타제 억제제, PDE-III 억제제 (예, 디피리다몰), 및 이들의 제약상 허용되는 염 또는 전구약물을 포함한다.
- <148> 항-혈소판제 (또는 혈소판 억제제)라는 용어는 또한, 본원에 사용된 바와 같이, ADP (아데노신 디포스페이트) 수용체 길항제, 바람직하게는 퓨린성 수용체 P₂Y₁ 및 P₂Y₁₂의 길항제를 포함하는 의미이며, P₂Y₁₂가 훨씬 더 바람직하다. 바람직한 P₂Y₁₂ 수용체 길항제는 티클로피딘 및 클로피도그렐, 및 이들의 제약상 허용되는 염 또는 전구약물을 포함한다. 클로피도그렐이 훨씬 더 바람직한 작용제이다. 또한, 티클로피딘 및 클로피도그렐은 위장관에 사용하기에 적합한 것으로 알려져 있기 때문에 바람직한 화합물이다.
- <149> 트롬빈 억제제 (또는 항-트롬빈제)라는 용어는, 본원에 사용된 바와 같이, 세린 프로테아제 트롬빈의 억제제를 나타낸다. 트롬빈을 억제함으로써, 다양한 트롬빈-매개된 프로세스, 예를 들어 트롬빈-매개된 혈소판 활성화 (즉, 예를 들어, 혈소판의 응집 및/또는 플라스미노겐 활성화 억제제-1 및/또는 세로토닌의 과립 분비) 및/또는 피브린 형성이 붕괴된다. 다수의 트롬빈 억제제가 당업계의 숙련자에게 공지되어 있으며, 이러한 억제제는 본

발명의 화합물과 병용되어 사용되는 것으로 고려된다. 이러한 억제제는 보로아르기닌 유도체, 보로펩티드, 헤파린, 히루딘, 아르가트로반, 및 벨라가트란, 및 이들의 제약상 허용되는 염 및 전구약물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 보로아르기닌 유도체 및 보로펩티드는 보론산의 N-아세틸 및 펩티드 유도체, 예를 들어 라이신, 오르니틴, 아르기닌, 호모아르기닌의 C-말단 α-아미노보론산 유도체 및 이들의 상응하는 이소티오우로늄 유사체를 포함한다. 히루딘이라는 용어는, 본원에 사용된 바와 같이, 본원에서 히루로그(hirulog)라고 언급되는 히루딘의 적합한 유도체 또는 유사체, 예를 들어 디술페이토히루딘을 포함한다. 혈전용해성 작용제 또는 섬유소용해성 작용제 (또는 혈전용해제 또는 섬유소용해제)라는 용어는, 본원에 사용된 바와 같이, 혈병 (혈전)을 용해시키는 작용제를 나타낸다. 이러한 작용제는 조직 플라스미노겐 활성화자 (천연 또는 재조합) 및 이들의 변형된 형태, 아니스트레플라제, 유로키나제, 스트렙토키나제, 테네크테플라제 (TNK), 라노테플라제(nPA), 인자 VIIa 억제제, PAI-1 억제제 (즉, 조직 플라스미노겐 활성화자 억제제의 불활성자), 알파2-항플라스민 억제제, 및 아니소일화(anisoylated) 플라스미노겐 스트렙토키나제 활성화자 복합체, 및 이들의 제약상 허용되는 염 또는 전구약물을 포함한다. 아니스트레플라제라는 용어는, 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어 전체 개시내용이 본원에 참고로 포함되는 EP 028,489에 기재된 아니소일화 플라스미노겐 스트렙토키나제 활성화자 복합체를 지칭한다. 유로키나제라는 용어는, 본원에 사용된 바와 같이, 이중 쇄 및 단일 쇄 유로키나제의 둘 다를 나타내는 의미이며, 후자는 또한 본원에서 프로유로키나제라고도 한다.

- <150> 본 발명의 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-부정맥제의 예는 클래스 I 작용제 (예, 프로파페논); 클래스 II 작용제 (예, 카르바디올 및 프로프라놀롤); 클래스 III 작용제 (예, 소탈롤, 도페틸리드, 아미오다론, 아지밀리드 및 이부틸리드); 클래스 IV 작용제 (예, 디티아젯 및 베라파밀); K⁺ 채널 개구제(opener), 예를 들어 I_{Ach} 억제제, 및 I_{Kur} 억제제 (예, W001/40231에 개시된 것과 같은 화합물)를 포함한다.
- <151> 본 발명의 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-고혈압제의 예는 알파 아드레날린성 차단제; 베타 아드레날린성 차단제; 칼슘 채널 차단제 (예, 딜티아젯, 베라파밀, 니페디핀, 아플로디핀 및 미베프라딜); 이뇨제 (예, 클로로티아지드, 히드로클로로티아지드, 플루메티아지드, 히드로플루메티아지드, 벤드로플루메티아지드, 메틸클로로티아지드, 트리클로로메티아지드, 폴리티아지드, 벤즈티아지드, 에타크린산 트리크리나펜, 클로르탈리돈, 푸로세미드, 무솔리민, 부메타니드, 트리아트레넨, 아밀로리드, 스피로놀락톤); 레닌 억제제; ACE 억제제 (예, 캅토프릴, 조페노프릴, 포시노프릴, 에날라프릴, 세라노프릴, 실라조프릴, 텔라프릴, 펜토프릴, 퀴나프릴, 라미프릴, 리시노프릴); AT-1 수용체 길항제 (예, 로사르탄, 이르베사르탄, 발사르탄); ET 수용체 길항제 (예, 시탁스센탄, 아트르센탄, 및 미국 특허 제5,612,359호 및 동 제6,043,265호에 개시된 화합물); 듀얼(Dual) ET/AII 길항제 (예, W000/01389에 개시된 화합물); 중성 엔도펩티다제 (NEP) 억제제; 바소렙시타제 억제제 (듀얼 NEP-ACE 억제제)(예, 오마파트릴레이트, 게모파트릴레이트 및 니트레이트)를 포함한다.
- <152> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 칼슘 채널 차단제 (L-형 또는 T-형)의 예는 딜티아젯, 베라파밀, 니페디핀, 아플로디핀 및 미베프라딜을 포함한다.
- <153> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 심장 글리코시드의 예는 디지탈리스 및 오우아바인을 포함한다.
- <154> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 이뇨제의 예는 클로로티아지드, 히드로클로로티아지드, 플루메티아지드, 히드로플루메티아지드, 벤드로플루메티아지드, 메틸클로로티아지드, 트리클로로메티아지드, 폴리티아지드, 벤즈티아지드, 에타크린산 트리크리나펜, 클로르탈리돈, 푸로세미드, 무솔리민, 부메타니드, 트리아트레넨, 아밀로리드, 및 스피로놀락톤을 포함한다.
- <155> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 미네랄코르티코이드 수용체 길항제의 예는 스프리오놀락톤 및 에플레레논을 포함한다.
- <156> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 포스포디에스테라제 억제제의 예는 PDE III 억제제 (예, 실로스 타졸); 및 PDE V 억제제 (예, 실테나필)를 포함한다.
- <157> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 콜레스테롤/지질 저하제 및 지질 프로파일 요법제의 예는 HMG-CoA 리덕타제 억제제 (예, 프라바스타틴, 로바스타틴, 아토르바스타틴, 심바스타틴, 플루바스타틴, NK-104 (별칭: 이타바스타틴, 또는 니스바스타틴 또는 니스바스타틴) 및 ZD-4522 (별칭: 로수바스타틴, 또는 아타바스타틴 또는 비사스타틴)); 스쿠알렌 설테타제 억제제; 피브레이트; 담즙산 교환수지(sequesterant)(예, 퀘스트란); ACAT 억제제; MTP 억제제; 리포옥시게나제 억제제; 콜레스테롤 흡수 억제제; 및 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 억제제 (예, CP-529414)를 포함한다.

- <158> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-당뇨병제의 예는 비구아니드 (예, 메트포르민); 글루코시다제 억제제 (예, 아카르보스); 인슐린 (인슐린 분비촉진제 또는 인슐린 감작제 포함); 메글리티니드 (예, 레파글리니드); 술폰닐우레아 (예, 글리메피리드, 글리부리드 및 글리피지드); 비구아니드/글리부리드 조합물 (예, 글루코반스), 티오졸리딘디온 (예, 트로글리타존, 로시글리타존 및 피오글리타존), PPAR-알파 아고니스트, PPAR-감마 아고니스트, PPAR 알파/감마 듀얼 아고니스트, SGLT2 억제제, 지방산 결합 단백질 (aP2)의 억제제, 예를 들어 W000/59506에 기재된 억제제, 글루카곤-유사 펩티드-1 (GLP-1), 및 디펩티딜 펩티다제 IV (DP4) 억제제를 포함한다.
- <159> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-우울제의 예는 네파조돈 및 세르트랄린을 포함한다.
- <160> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 소염제의 예는 스테로이드 화합물, 예를 들어 코르티코스테로이드 및 글루코코르티코이드 (프레드니손 및 텍사메타손 포함); 에타네르셉트 (Enbrel; 등록상표); 인플릭시맵 (Remicade; 등록상표); 단백질 타이로신 키나제 (PTK) 억제제; 시클로옥시게나제 억제제 (NSAID, 및 COX-1 및/또는 COX-2 억제제 포함); 아스피린; 인도메타신; 이부프로펜; 피록시캠; 나프록센; 셀레콕시브; 및/또는 로페콕시브를 포함한다.
- <161> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-골다공증제의 예는 알렌드로네이트 및 랄록시펜을 포함한다.
- <162> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 호르몬 대체 요법의 예는 에스트로겐 (예, 공액결합된 (conjugated) 에스트로겐) 및 에스트라디올을 포함한다.
- <163> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-응고제의 예는 헤파린 (예, 분획화되지 않은 저분자량 헤파린, 예를 들어 에녹사파린 및 달테파린)을 포함한다.
- <164> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-비만제의 예는 오르리스트이트 및 aP2 억제제 (예, W000/59506에 개시된 억제제)를 포함한다.
- <165> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-불안제의 예는 디아제팜, 로라제팜, 부스피론, 및 히드록시진 파모에이트를 포함한다.
- <166> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-증식제의 예는 시클로스포린 A, 파클리탁셀, 아드리아마이신; 에피틸론, 시스플라틴, 및 카르보플라틴을 포함한다.
- <167> 본 발명이 화합물과 병용되어 사용되는 적합한 항-궤양 및 위식도역류질환제의 예는 파모티딘, 라니티딘, 및 오메프라졸을 포함한다.
- <168> 또한, 추가의 치료제는 콜라겐, dnaJ, TNF 기능을 차단하는 분자 (예, 페그수네르셉트), 사이토킨 기능을 차단하는 분자 (예, AMG719), LFA-1 기능을 차단하는 분자 (예, 에팔리주맵) 및 줄기 세포 이식물을 포함한다. 이러한 기타 치료제들은 현재 류마티스성 관절염에 대한 이들 치료제의 효과를 결정하기 위해서 임상 시험 (www.clinicaltrials.gov)에서 연구되고 있는 중이다.
- <169> 한가지 이상의 심혈관 질환 증상을 경감시키기 위해 심혈관 질환을 앓는 환자에게 콜라겐, 예를 들어 소 II 콜라겐 형태의 콜라겐을 경구로 투여할 수 있다.
- <170> DnaJ는 심혈관 질환이 있는 다수의 환자들에서 유전자내에 함유된 단백질을 모방하는 작은 펩티드이다. 이 펩티드는 이. 콜라이 박테리아의 열 충격 단백질로부터 유래된다. 한가지 이상의 심혈관 질환 증상을 경감시키기 위해 심혈관 질환으로 고통받는 환자에게 DnaJ를 경구로 투여할 수 있다.
- <171> TNF는 류마티스성 관절염 및 가능하게는 심혈관 질환을 앓는 환자의 염증성 반응에 관여하는 분자이다. 가능하게는, 예를 들어 TNF 수용체 (TNFR)에 대한 TNF 결합을 차단함으로써 TNF 기능을 차단하는 임의의 분자는 심혈관 질환의 진행을 변경시키고 그의 증상의 일부를 완화시키는데 도움을 줄 수 있다. 인플릭시맵 및 에타네르셉트와 같은 여러 TNF 차단제가 심혈관 질환을 치료하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다. 페그수네르셉트와 같은 다른 TNF 차단제가 개발되었으며, 심혈관 질환을 치료하는 그의 효능을 시험하는 중에 있다 (II기 임상 시험).
- <172> 사이토킨, 예를 들어 인터루킨-1 (IL-1)은 세포로부터 분비되며 면역 반응을 매개하는데 관여하는 분자이다. 가능하게는, 예를 들어 IL-1과 그의 수용체의 상호작용을 차단함으로써 사이토킨 기능을 차단하는 임의의 분자가 심혈관 질환의 진행을 변경시키고 그의 증상의 한가지 이상을 경감시키는데 도움을 줄 수 있다. IL-1과 그의 수용체 (IL-1R)의 상호작용을 차단하는 재조합 단백질인 아나킨라(Anakinra)는 심혈관성 관절염을 치료하는데 효능이 있는 것으로 밝혀졌다. IL-1 억제제인 AMG719가 개발되었으며, 류마티스성 관절염을 치료하는 그의

효능을 시험하는 중에 있다 (II기 임상 시험).

- <173> 림프구 기능 관련 분자 1 (LFA-1)은 림프구가 내피와 같은 다양한 세포 유형에 유착되도록 매개하는 기능을 하는 2개의 서브유닛인 CD11a 및 CD18로 구성된 분자이다. 가능하게는, LFA-1 기능의 방해는 심혈관 질환의 진행을 변경하고 그의 한가지 이상의 증상을 경감시키는데 도움을 줄 수 있다. 항-LFA-1 항체인 에팔리주마브이 개발되었으며, 류마티스성 관절염을 치료하는 그의 효능을 시험하는 중에 있다 (II기 임상 시험).
- <174> 잠재적인 치료 분자에 의한 TNF, 사이토킨 또는 LFA-1과 그의 리간드의 상호작용의 차단은 당업계의 숙련자에게 공지된 다수의 검정법에 의해 결정할 수 있다. 예를 들어, 경쟁 검정법을 이용하여 대상 분자에 의한 차단을 시험할 수 있는데, 예를 들어 분자를 TNF/TNFR 결합 쌍에 노출시켜 이 분자가 TNFR에 결합하는데 있어서 TNF와 경쟁하도록 할 수 있다. 또는, 기능 검정법을 수행하여 차단을 시험할 수 있는데, 예를 들어 분자가 사이토킨에 의해 유발된 염증성 캐스케이드 또는 염증성 반응, 예를 들어 부종, 발적 또는 동통의 특정 부분을 억제하는 능력을 시험할 수 있다.
- <175> 또한, 추가의 치료제는 p38 MAP 키나제 억제제, 가용성 gp39 (또한, CD40 리간드 (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP 라고도 알려짐), 가용성 CD29, 가용성 CD40, 가용성 CD80 (예, ATCC68627), 가용성 CD86, 가용성 CD28 (예, ATCC 접근 번호 68628), 가용성 CD56, 가용성 Thy-1, 가용성 CD3, 가용성 TCR, 가용성 VLA-4, 가용성 VCAM-1, 가용성 LECAM-1, 가용성 ELAM-1, 가용성 CD44, gp39와 반응하는 항체 (예, ATCC HB-10916, ATCC HB-12055 및 ATCC HB-12056), CD40과 반응하는 항체 (예, ATCC HB-9110), B7과 반응하는 항체 (예, ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341 등), CD28과 반응하는 항체 (예, ATCC HB-11944 또는 mAb 9.3 (문헌 [Martin et al (J. Clin. Immun. 4(1): 18-22,1980)]에 기재됨), LFA-1과 반응하는 항체 (예, ATCC HB-9579 및 ATCC TIB-213), LFA-2와 반응하는 항체, IL-2와 반응하는 항체, IL-12와 반응하는 항체, IFN-감마와 반응하는 항체, CD2와 반응하는 항체, CD48과 반응하는 항체, 특정 ICAM과 반응하는 항체 (예, ICAM-1 (ATCC CRL-2252), ICAM-2 및 ICAM-3), CTLA4와 반응하는 항체 (예, ATCC HB-304), Thy-1과 반응하는 항체, CD56과 반응하는 항체, CD3과 반응하는 항체, CD29와 반응하는 항체, TCR과 반응하는 항체, VLA-4와 반응하는 항체, VCAM-1과 반응하는 항체, LECAM-1과 반응하는 항체, ELAM-1과 반응하는 항체, CD44와 반응하는 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 모노클로날 항체가 바람직하다. 다른 실시양태에서, 항체 단편이 바람직하다. 당업자라면 쉽게 이해할 수 있는 바와 같이, 조합물은 본 발명의 가용성 CTLA4 분자와 한 가지 다른 작용제; 본 발명의 가용성 CTLA4 분자와 두 가지 다른 작용제들; 본 발명의 가용성 CTLA4 분자와 세 가지 다른 작용제들 등을 포함할 수 있다. 최적의 조합물 및 투여량의 결정은 당업계에 잘 알려진 방법을 이용하여 결정하고 최적화할 수 있다.
- <176> 공동 투여를 위한 몇몇 특성의 조합물은 다음과 같은 것들을 포함한다: CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg와 CD80 모노클로날 항체 (mAb); CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg와 CD86 mAb; CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg, CD80 mAb와, CD86 mAb; CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg와 gp39 mAb; CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg와 CD40 mAb; CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg와 CD28 mAb; CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg, CD80 및 CD86 mAb와, gp39 mAb; CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg, CD80과 CD86 mAb 및 CD40 mAb; 및 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg, 항-LFA1 mAb와 항-gp39 mAb. gp39 mAb의 특정 예는 MR1이다. 당업계의 숙련자라면 다른 조합물들을 쉽게 인식하고 이해할 것이다.
- <177> 또한, 추가의 치료제는 칼시뉴린 억제제, 예를 들어 시클로스포린 A 또는 FK506; 면역억제성 마크롤리드, 예를 들어 라파마이신 또는 그의 유도체 (예, 40-0-(2-히드록시)에틸-라파마이신); 림프구 귀소제(homing agent), 예를 들어 FTY720 또는 그의 유사체; 코르티코스테로이드; 시클로포스파미드; 아자티오프렌; 디히드로폴산 리덕타제 억제제, 예를 들어 메토티렉세이트; 레플루노미드 또는 그의 유사체; 미조리빈; 미코페놀산; 미코페놀레이트 모페틸; 15-데옥시스포스구알린 또는 그의 유사체; 면역억제성 모노클로날 항체, 예를 들어 백혈구 수용체, 예를 들어 MHC, CD2, CD3, CD4, CD11a/CD18, CD7, CD25, CD27, B7, CD40, CD45, CD58, CD137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB 또는 이들의 리간드에 대한 모노클로날 항체; 또는 기타 면역조절성 화합물, 예를 들어 CTLA4/CD28-Ig, 또는 기타 유착 분자 억제제, 예를 들어 mAb 또는 저분자량 억제제 (LFA-1 길항제, 셀렉틴 길항제 및 VLA-4 길항제 포함)를 포함한다. 이러한 화합물은 CD40과 그의 리간드를 방해하는 화합물, 예를 들어 CD40에 대한 항체 및 CD40-L에 대한 항체와 병용하게 되면 특히 유용하다.
- <178> 본 발명의 화합물 (즉, 제1 치료제)을 1종 이상의 추가의 치료제 (즉, 제2 치료제)와 병용하여 투여하는 것은 바람직하게는 이러한 화합물 및 작용제 단독에 비해 효능상의 이점을 제공하며, 바람직하게는 각각 더 적은 투여량으로 사용할 수 있다 (즉, 상승작용성 조합). 더 적게 투여하면 부작용 가능성이 최소화되며, 따라서 안정성 한계를 증가시킨다. 치료제들 중 적어도 하나를 치료 투여량 미만으로 투여하는 것이 바람직하다. 모든 치

료제는 치료 투여량 미만으로 투여하는 것이 훨씬 더 바람직하다. 치료 투여량 미만이란, 단독으로는 치료될 증상 또는 질환에 대하여 원하는 치료 효과를 제공하지 않는 치료제의 양을 의미하기 위한 것이다. 상승작용성 조합이란, 작용제들의 조합에 대해 관찰된 효과가 단독으로 투여되는 각 작용제의 효과의 합보다 더 큰 것을 의미하기 위한 것이다.

- <179> 가용성 CTLA4를 포함하는 제약 조성물은, CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는 방법 또는 심혈관 질환을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 제약 조성물 중 가용성 CTLA4의 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 100 mg의 범위이다. 다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 0.5 내지 5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 10 내지 15 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 15 내지 20 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 20 내지 25 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 25 내지 30 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 30 내지 35 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 35 내지 40 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 40 내지 45 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 45 내지 50 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 50 내지 55 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 55 내지 60 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 60 내지 65 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 65 내지 70 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 70 내지 75 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 75 내지 80 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 80 내지 85 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 85 내지 90 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 90 내지 95 mg, 또는 대상체의 체중 kg 당 약 95 내지 100 mg의 범위이다.
- <180> 한 실시양태에서, 가용성 CTLA4의 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 2 mg 내지 약 10 mg의 양이다. 다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 4 mg의 양이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 0.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 1.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 1.0 내지 1.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 1.5 내지 2.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2.0 내지 2.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2.5 내지 3.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 3.0 내지 3.5 mg, 또는 대상체의 체중 kg 당 약 3.5 내지 4.0 mg의 양이다. 다른 실시양태에서, 상기 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 20 mg의 양이다. 또 다른 실시양태에서, 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 2 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2 내지 4 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4 내지 6 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6 내지 8 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 10 내지 12 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 12 내지 14 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 14 내지 16 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 16 내지 18 mg, 또는 대상체의 체중 kg 당 약 18 내지 20 mg의 양이다. 한 실시양태에서, 유효량은 대상체의 체중 kg 당 2 mg이다. 다른 실시양태에서, 유효량은 대상체의 체중 kg 당 약 10 mg이다.
- <181> 특정 실시양태에서, 가용성 CTLA4의 유효량은 대상체 체중이 60 kg 미만인 경우에는 500 mg이고, 대상체의 체중이 60 내지 100 kg인 경우에는 750 mg이며, 대상체의 체중이 100 kg 초과인 경우에는 1000 mg이다.
- <182> 또한, 본 발명은 본 발명의 분자, 예를 들어 CTLA4Ig, 및 당업계의 숙련자에게 공지된 허용가능한 담체 또는 아췌번트를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 제약 조성물은 본 발명의 분자 (예, 가용성 CTLA4 분자, 예를 들어 CTLA4Ig 또는 L104EA29Y)와 조합되는 경우에 분자의 활성을 보유하며 대상체의 면역계와 비-반응성인 임의의 물질을 포함하는 적합한 담체 및 아췌번트를 포함한다. 이러한 담체 및 아췌번트는 이온 교환체, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민, 완충 물질, 예를 들어 포스페이트, 글리신, 소르브산, 소르브산 칼륨, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 인산염 완충 염 용액, 물, 에멀전 (예, 오일/물 에멀전), 염 또는 전해질, 예를 들어 프로타민 술페이트, 인산 수소 이나트륨, 인산 수소 칼륨, 염화 나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스계 물질 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 다른 담체들로는 무균 용액; 코팅된 정제를 비롯한 정제, 및 캡슐이 포함될 수 있다. 전형적으로, 이러한 담체들은 부형제, 예를 들어 전분, 밀크, 당 (예, 수크로스, 글루코스, 말토스), 특정 유형의 클레이, 젤라틴, 스테아르산 또는 그의 염, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트, 탈크, 식물성 지방 또는 오일, 검, 글리콜, 또는 기타 공지된 부형제를 함유한다. 이들 담체는 또한 향미 및 색상 첨가제 또는 기타 성분들을 포함할 수도 있다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 잘 알려진 통상의 방법에 의해 제제화된다. 이러한 조성물은 예를 들어 리포솜과 같은 다양한 지질 조성물 및 중합체 미소구와 같은 다양한 중합체 조성물 내에서 제제화될 수도 있다.
- <183> 본 발명의 추가의 실시양태에서, 본 발명은 B7과 그의 리간드의 상호작용을 차단하고(하거나) 심혈관 질환을 치료하는데 유용한 본 발명의 분자를 함유하는 키트 (즉, 시약들과 지침의 패키지 조합물)를 제공한다.
- <184> 키트는 하나 이상의 작용제들, 예를 들어 가용성 CTLA4 분자만을 포함하거나 또는 이 분자를 제2 작용제, 및 허용가능한 담체 또는 아췌번트, 예를 들어 제약상 허용되는 완충액, 예를 들어 인산염-완충 염수, 링거액 및 락

스트로스 용액과 함께 포함하는 제약 조성물을 함유한다. 키트는 기타 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 사용 지침을 포함하는 패키지 삽입물을 비롯하여 상업적 측면 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 작용제들을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 작용제는, 용해되는 경우에 적정 농도를 갖는 시약 용액을 제공하는 부형제를 비롯해서 일반적으로 동결건조된 건조 분말로서 제공될 수 있다.

- <185> 제2 작용제는 추가의 작용제로서 상기 기재된 것들, 예를 들어 항-응고제 또는 응고 억제제, 항-혈소판 또는 혈소판 억제제, 트롬빈 억제제, 혈전용해제 또는 섬유소용해제, 항-부정맥제, 항-고혈압제, 칼슘 채널 차단제 (L-형 및 T-형), 심장 글리코시드, 이뇨제, 미네랄코르티코이드 수용체 길항제, 포스포디에스테라제 억제제, 콜레스테롤/지질 저하제 및 지질 프로파일 요법제, 항-당뇨병제, 항-우울제, 소염제 (스테로이드 및 비-스테로이드), 항-골다공증제, 호르몬 대체 요법, 경구 피임제, 항-비만제, 항-불안제, 항-증식제, 항-종양제, 항-궤양 및 위식도역류질환제, 성장 호르몬 및/또는 성장 호르몬 분비촉진제, 갑상선호르몬제 (갑상선 수용체 길항제 포함), 항-감염제, 항-바이러스제, 항-박테리아제, 및 항-진균제를 포함할 수 있다.
- <186> 키트는 라벨 및/또는 지침을 갖는 용기를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알 및 시험관을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료들로부터 형성될 수 있다. 용기는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘과 같은 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 용기는 제약 조성물, 예를 들어 B7과 그의 리간드와의 상호작용을 차단하고(하거나) 심혈관 질환을 치료하는데 효과적인 작용제를 갖는 제약 조성물을 보유할 수 있다.
- <187> 또한, 키트는 본원에 기재된 하나 이상의 제2 작용제 및/또는 제약상 허용되는 완충액, 예를 들어 인산염 완충염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2의 용기를 포함할 수도 있다. 키트는 기타 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 사용 지침을 포함하는 패키지 삽입물을 비롯하여 상업적 측면 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 작용제들을 추가로 포함할 수 있다.
- <188> 또한, 키트는 적합하게는 용기 상에 있거나 용기와 결합된 라벨 및/또는 지침을 포함할 수도 있다. 라벨은 작용제들의 제조를 수행하기 위한 지시사항, 예를 들어 건조 분말을 용해시키고(시키거나) 특정 심혈관 질환을 치료하기 위한 지시사항을 제공할 수 있다. 라벨 및/또는 지침은 본 발명의 조성물 및 제2 작용제가 동시에 투여될 수 있거나 또는 상이한 시점에서 임의의 순서로 연속 투여될 수 있음을 나타낼 수 있다.
- <189> 라벨 및/또는 지침은 본 발명의 제약 조성물의 생체내 또는 시험관내 사용을 위한 지시사항을 나타낼 수 있다. 라벨 및/또는 지침은 조성물이 단독으로 사용되거나 또는 제2 작용제와 병용되어 사용됨을 나타낼 수 있다.
- <190> 라벨은 본 발명의 분자에 대한 적정 투여량을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 라벨은 B7과 그의 리간드의 상호작용을 차단하고(하거나) 심혈관 질환을 치료하는데 효과적인 분자에 대한 투여량이 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 0.5 내지 5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 10 내지 15 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 15 내지 20 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 20 내지 25 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 25 내지 30 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 30 내지 35 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 35 내지 40 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 40 내지 45 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 45 내지 50 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 50 내지 55 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 55 내지 60 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 60 내지 65 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 65 내지 70 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 70 내지 75 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 75 내지 80 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 80 내지 85 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 85 내지 90 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 90 내지 95 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 95 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 4 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 0.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 1.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 1.0 내지 1.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 1.5 내지 2.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2.0 내지 2.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2.5 내지 3.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 3.0 내지 3.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 3.5 내지 4.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4.0 내지 4.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4.5 내지 5.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5.0 내지 5.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 5.5 내지 6.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6.0 내지 6.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6.5 내지 7.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 7.0 내지 7.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 7.5 내지 8.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8.0 내지 8.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8.5 내지 9.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 9.0 내지 9.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 9.5 내지 10.0 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 2 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 2 내지 4 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 4 내지 6 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 6 내지 8 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 8 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 10 내지 12 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 12 내지 14 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 14 내지 16 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 16 내지 18 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 18 내지

20 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 mg, 대상체의 체중 kg 당 2 mg, 대상체의 체중 kg 당 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 mg 내지 100 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.5 내지 10 mg, 대상체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 20 mg이며, 대상체의 체중이 60 kg인 경우에는 약 500 mg, 대상체의 체중이 60 내지 100 kg인 경우에는 750 mg, 대상체의 체중이 100 kg 초과인 경우에는 1,000 mg임을 나타낼 수 있다.

<191> 라벨 및/또는 지침은 선택된 증상, 예를 들어 심혈관 질환을 치료하기 위해 본 발명의 제약 조성물이 단독으로 투여될 수 있거나, 또는 제2 작용제와 조합되어 동시에 투여되거나 상이한 시점에서 임의의 순서로 연속 투여될 수 있음을 나타낼 수도 있다.

<192> 본 발명의 특정 실시양태에서, 키트는 제약상 허용되는 담체 및 유효량의 제1 작용제를 포함하는 제약 조성물을 포함하는데, 제1 작용제는 CTLA4 및/또는 CD28와의 B7 상호작용을 차단하는 분자, 예를 들어 가용성 CTLA4 분자, CD28 분자, B7 (B7-1 또는 B7-2) 분자, 항-CTLA4 모노클로날 항체, 항-CD28 모노클로날 항체 또는 항-B7 (B7-1 또는 B7-2) 모노클로날 항체이다. 바람직한 실시양태에서, 가용성 CTLA4 분자는 도 24 또는 19 (각각, CTLA4Ig 또는 L104EA29Y)에 나타낸 바와 같은 CTLA4의 세포의 도메인의 아미노산 서열을 갖는다.

<193> 방법

<194> 본 발명은 B7-양성 세포와의 기능적 CTLA4- 및 CD28-양성 세포 상호작용을 조절하는 방법을 제공한다. 이 방법은, 예를 들어 내인성 CTLA4 및/또는 CD28 분자와 B7 분자의 반응을 방해함으로써 CTLA4- 및 CD28-양성 세포와 B7-양성 세포의 기능적 상호작용을 조절하기 위해 B7-양성 세포를 본 발명의 가용성 CTLA4 분자와 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 가용성 CTLA4의 양은 상기 문헌에 기재되어 있다.

<195> 추가로, 본 발명은 심혈관 질환의 치료 방법을 제공한다. 이 방법은 본 발명의 치료 조성물, 예를 들어 본 발명의 가용성 CTLA4 분자를 심혈관 질환과 관련된 한가지 이상의 증상을 완화시키는데 효과적인 양으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 가용성 CTLA4의 예는 CTLA4Ig 및 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자, 예를 들어 L104EA29YIg를 포함한다. 심혈관 질환의 증상은 부정맥; 허혈; 협심증; 감소된 운동 부하; 피로; 운동시 호흡 곤란; 및 일과성 허혈성 발작을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 추가로, 본 발명은 T-세포/B7-양성 세포 상호작용을 차단하고, 이에 따라 CD28에 대한 B7 결합과 같은 공동-자극성 신호에 의해 T-세포 활성화/자극을 차단하여, T-세포 무감작 또는 내성을 유도함으로써, 심혈관 질환에 대한 장기간 요법을 제공할 수 있다.

<196> 심혈관 질환은 동맥 심혈관 혈전색전성 장애, 정맥 심혈관 혈전색전성 장애, 및 심방/심실에서의 혈전색전성 장애를 비롯한 혈전색전성 장애; 죽상동맥경화증; 재협착; 말초 동맥 질환; 관상동맥 우회술; 경동맥 질환; 동맥염; 심근염; 심혈관염; 맥관염; 관상동맥 심장 질환 (CHD); 불안정형 협심증 (UA); 불안정형 난치성 협심증; 안정형 협심증 (SA); 만성 안정형 협심증; 급성 관상동맥 증후군 (ACS); 1차 또는 재발성 심근경색증; 급성 심근경색증 (AMI); 심근경색증; 비-Q 파 심근경색증; 비-STE 심근경색증; 관상동맥 질환; 심장 허혈; 허혈; 허혈성 급사; 일과성 허혈성 발작; 졸중; 죽상동맥경화증; 말초 폐색성 동맥 질환; 정맥 혈전증; 심부 정맥 혈전증; 혈전정맥염; 동맥 색전증; 관상동맥 동맥 혈전증; 뇌동맥 혈전증; 뇌 색전증; 신장 색전증; 폐 색전증; (a) 인공 판막 또는 다른 이식물, (b) 유치 카테터, (c) 스텐트, (d) 심폐 우회로, (e) 혈액투석, 또는 (f) 혈전증을 유발하는 인공 표면에 혈액이 노출되는 기타 절차로 인한 혈전증; 죽상동맥경화증, 수술 또는 수술 합병증, 장기간 부동, 동맥 세동, 선천성 호혈전증, 암, 당뇨병, 약물 또는 호르몬의 영향, 및 임신 합병증으로 인한 혈전증; 심실위 부정맥, 심방 부정맥, 심방 조동, 심방 세동을 비롯한 심장 부정맥; 문헌 [Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 2 Volume Set, 6th Edition, 2001, Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Peter Libby, Douglas D. Zipes]에 열거된 다른 질환과 같은 질환 또는 증상을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

<197> 바람직한 심혈관 질환은 죽상동맥경화증; 관상동맥 심장 질환 (CHD); 재협착; 말초 동맥 질환; 관상동맥 우회술; 경동맥 질환; 동맥염; 심근염; 심혈관염; 맥관염; 불안정형 협심증 (UA); 불안정형 난치성 협심증; 안정형 협심증 (SA); 만성 안정형 협심증; 급성 관상동맥 증후군 (ACS); 심근경색증; 1차 또는 재발성 심근경색증, 비-Q 파 심근경색증, 비-ST-분절 상승 심근경색증 및 ST-분절 상승 심근경색증을 비롯한 급성 심근경색증 (AMI)이다.

<198> 더 바람직한 심혈관 질환은 죽상동맥경화증; 관상동맥 심장 질환 (CHD); 불안정형 협심증 (UA); 불안정형 난치성 협심증; 안정형 협심증 (SA); 만성 안정형 협심증; 급성 관상동맥 증후군 (ACS); 심근경색증; 일차 또는 재발성 심근경색증, 비-Q 파 심근경색증, 비-ST-분절 상승 심근경색증 및 ST-분절 상승 심근경색증을 비롯한 급성 심근경색증 (AMI)이다.

- <199> 바람직한 심혈관 질환은 B7-양성 세포와의 T 세포 상호작용에 의해 매개된 심혈관 질환이다.
- <200> 또한, 하나 이상의 염증 마커와 관련된 심혈관 질환이 바람직하다. 염증 마커와 관련된다는 것은, 마커 (존재, 부재 또는 특정 농도)가 통계적으로 질환의 향후 발병 위험 또는 질환의 재발 위험, 또는 질환 활성도의 현재 수준과 상관관계에 있음을 의미한다. 염증 마커는 CRP, hsCRP, IL-10, CD40L, sCD40L, IL-6, sICAM-1, TNF- α , 백혈구 수, 피브리노겐, 및 혈청 아밀로이드 A를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 염증 마커는 CRP, hsCRP, IL-6, 및 TNF- α 이며, 가장 바람직한 것은 hsCRP이다. 높은 CRP, 높은 hsCRP, 낮은 IL-10, 높은 sCD40L, 높은 IL-6, 높은 sICAM-1, 높은 TNF- α , 높은 백혈구 수, 높은 피브리노겐, 및 높은 혈청 아밀로이드 A는 염증 지시자인 것으로 알려져 있다.
- <201> 본 발명의 가용성 CTLA4 분자는 생체내에서 억제 특성을 나타낸다. T 세포와 B7-양성 세포가 접촉된 결과로서 T-세포/B7-양성 세포 상호작용, 예를 들어 T 세포/B 세포 상호작용이 일어나는 조건하에, 도입된 CTLA4 분자가 B7-양성 세포, 예를 들어 B 세포와 결합 반응하는 것은, 면역 반응을 조절하는 T 세포/B7-양성 세포 상호작용을 방해, 즉 억제할 수 있다.
- <202> 본 발명의 바람직한 실시양태는 CTLA4Ig 또는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자L104EA29YIg를 사용하여 CTLA4- 및 CD28-양성 세포와 B7-양성 세포의 기능적 상호작용을 조절함으로써 재발성 심혈관 증상 (예, 심근경색증)을 치료 또는 예방하고(하거나) 면역 반응을 하향조절하는 것을 포함한다. 본 발명의 L104EA29YIg는 적어도 2개의 아미노산 변화, 즉 위치 +104에서 루이신 (L)의 글루탐산 (E)으로의 변화 및 위치 +29에서 알라닌 (A)의 타이로신 (Y)으로의 변화를 포함하는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자이다 (도 19). L104EA29YIg 분자는 상기 특정된 2개 이외에 추가의 돌연변이를 포함할 수 있다.
- <203> CTLA4 및/또는 CD28과의 B7 상호작용을 차단하는데 사용되는 분자의 적정량은 상기 문헌에 기재되어 있다. B7/CTLA4 상호작용을 차단하는데 사용되는 분자는 가용성 CTLA4, 예를 들어 CTLA4Ig, CTLA4Ig/CD28Ig 또는 L104EA29YIg, 가용성 CD28, 예를 들어 CD28Ig, 가용성 B7 (B7-1 또는 B7-2), 예를 들어 B7Ig, 항-CTLA4 모노클로날 항체, 항-CD28 모노클로날 항체 또는 항-B7 모노클로날 항체일 수 있다.
- <204> 본 발명에 의해 제공되는 증상 완화의 정도는 임상 상황에서 증상 완화를 측정 및 문서화하는데 있어서 확립된 임의의 허용되는 기준을 이용하여 측정할 수 있다. 증상 완화를 측정하기 위한 허용가능한 기준은 협심증; 재발성 협심증; 불안정형 협심증; 허혈 시간; 심혈관 원인으로 인한 입원; 급성 심근경색증; 재발성 심근경색증; 긴급한 혈관재형성에 대한 요구; 경피 관상동맥 시술에 대한 요구; 모든 원인별 사망률; 심혈관 사망률; 일과성 허혈성 발작; 및 졸증을 포함할 수 있다.
- <205> 본 발명에 의해 치료되는 대상체는 인간, 원숭이, 유인원, 개, 고양이, 소, 말, 염소, 돼지, 토끼, 마우스 및 래트를 비롯한 포유동물 대상체를 포함한다.
- <206> 본 발명은 본 발명의 치료 조성물, 예를 들어 가용성 CTLA4 분자를 단독으로 또는 이 분자를 추가의 치료제와 함께 국소 또는 전신 투여하는 다양한 방법을 제공한다. 이 방법은 정맥내, 근육내, 복강내, 경구, 흡입 및 피하 방법, 및 이식가능한 펌프, 연속 주입, 볼루스 주입, 유전자 요법, 리포솜, 좌제, 국소 접촉, 비히클, 캡슐, 생분해성 중합체, 약물-용출 스텐트, 히드로겔, 서방성 패치, 및 주사 방법을 포함한다. 담체와 배합된 치료제는 통상적으로 보관을 위해 동결건조되며, 투여 전에 물 또는 중성 pH (pH 약 7 내지 8, 예를 들어 pH 7.5)의 완충 용액으로 다시 용해시킨다.
- <207> 본 발명의 치료 조성물, 예를 들어 가용성 CTLA4 분자는 추가의 치료제로서 동시에 투여될 수 있거나 또는 상이한 시점에서 임의의 순서로 연속 투여될 수 있다.
- <208> 당업계 표준 관행에 따라, 본 발명의 조성물은 임의의 제약상 허용가능한 형태로 대상체에게 투여될 수 있다.
- <209> 본 발명의 실시예에 있어서, 본 방법은 본 발명의 가용성 CTLA4 분자를 대상체에게 투여하여 B7-양성 세포와의 CD28- 및/또는 CTLA4-양성 세포 상호작용을 조절하는 것을 포함한다. B7-양성 세포는 본 발명의 가용성 CTLA4 분자 또는 그의 단편 또는 유도체의 유효량과 접촉하여 가용성 CTLA4/B7 복합체를 형성한다. 가용성 CTLA4의 적합한 양은 상기에 기재되어 있다. 상기 복합체는 B7 집단 분자와 내인성 CTLA4 및 CD28 분자 사이의 상호작용을 방해한다.
- <210> 가용성 CTLA4 분자는 대상체에서 내인성 B7 분자가 그들의 각각의 리간드와 결합하는 것을 차단하기에 충분한 양 및 충분한 시간 (예를 들어, 시간 길이 및/또는 다회)으로 대상체에게 투여될 수 있다. 내인성 B7/리간드 결합을 차단하여 CD28- 및/또는 CTLA4-양성 세포와 B7-양성 세포 사이의 상호작용을 저해한다. 한 실시양태에

서, 가용성 CTLA4는 필요에 따라 매일, 매주, 매월 및/또는 매년 1 일/주/월/년 당 1회 또는 수회로 대상체에게 투여할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 상기 분자를 1 개월 동안 매 2주에 한번씩 투여하는 것으로 시작하여, 그 후 매달 한번씩 투여할 수 있다.

- <211> 치료제의 투여량은 병에 걸린 조직의 유형, 치료하고자 하는 심혈관 질환의 유형, 질환의 중증도, 대상체의 건강상태 및 약물 치료에 대한 반응을 포함하나 이에 제한되지 않는 많은 인자에 의존한다. 따라서, 약물의 투여량은 각각의 대상체 및 투여 방법에 따라 달라질 수 있다. 가용성 CTLA4 분자는 하루에 환자 체중 1 kg 당 0.1 내지 100 mg의 양으로 투여될 수 있다. 가용성 CTLA4의 적합한 양은 상기에 기재되어 있다.
- <212> 본 발명은 또한 다른 치료제 또는 제약상 작용제와 함께 본 발명의 조성물을 사용하여 심혈관 질환을 치료하는 것을 포함한다. 예를 들어, 심혈관 질환은 본 발명의 조성물에 대한 논의에서 상기 열거된 추가의 치료제 (이에 제한되지 않음)와 본 발명의 분자를 병용하여 치료할 수 있다.
- <213> 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 예를 들어 상기에 구체화된 다른 작용제와 함께 투여할 경우, 공동-투여되는 작용제의 투여량은, 물론 사용되는 공동-약물의 유형, 사용되는 구체적인 약물, 치료할 상태 등에 따라 다양할 것이다.
- <214> 상기에 따라, 추가의 측면에서 본 발명은 유리 형태 또는 제약상 허용되는 염 형태의 본 발명의 가용성 CTLA4 분자, 예를 들어 CTLA4Ig 및/또는 L104EA29YIg의 치료 유효량, 및 제2 약물 물질, 예를 들어 상기 지시된 바와 같은 면역억제제, 면역조절제 또는 소염제를, 예를 들어 공동으로 또는 임의의 순서로 연속적으로 (즉, 동시에 또는 상이한 시점에 임의의 순서로 연속적으로) 공동-투여하는 것을 포함하는 상기 정의된 바와 같은 방법을 제공한다.
- <215> 또한, 치료 배합물, 예를 들어 또다른 치료제를 포함하는 1종 이상의 제약 조성물과 함께 또는 임의의 순서로 연속적으로 (즉, 동시에 또는 상이한 시점에 임의의 순서로 연속적으로) 사용되는 유리 형태 또는 제약상 허용되는 염 형태의 가용성 CTLA4 분자를 포함하는 키트가 제공된다.
- <216> 본 발명은 또한 본 발명의 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 제조하는 방법을 제공한다. 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자는 원핵 세포 또는 진핵 세포에서 발현될 수 있다.
- <217> 원핵 생물은 가장 흔히 박테리아의 각종 균주로 대표된다. 박테리아는 그람 양성 또는 그람 음성일 수 있다. 전형적으로, 이. 콜라이와 같은 그람-음성 박테리아가 바람직하다. 다른 미생물 균주도 또한 사용될 수 있다. 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 코딩하는 서열은 이. 콜라이와 같은 원핵 세포에서 외래 서열 발현용으로 고안된 벡터 내로 삽입할 수 있다. 상기 벡터는 전사 개시를 위한 프로모터, 임의로 오퍼레이터 및 리보솜 결합 부위 서열을 포함하는 것으로 본원에 정의된, 통상적으로 사용되는 원핵 조절 서열을 포함할 수 있으며, 상기 통상적으로 사용되는 프로모터는 베타-락타마제 (페니실리나제) 및 락토스 (lac) 프로모터 시스템 [Chang, et al., (1977) *Nature* 198:1056], 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 [Goeddel, et al., (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057] 및 람다 유도된 P_L 프로모터 및 N-유전자 리보솜 결합 부위 [Shimatake, et al., (1981) *Nature* 292:128]와 같은 것들을 들 수 있다.
- <218> 이러한 발현 벡터는 또한 복제 원점 및 항생제에 대한 내성을 부여하는 선별가능한 마커, 예를 들어 베타-락타마제 또는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자를 포함하므로, 상기 벡터는 플라스미드 보유 박테리아에서 복제될 수 있고, 플라스미드 보유 세포를 암피실린 또는 카나마이신과 같은 항생제의 존재하에 성장시킬 경우 선별할 수 있다.
- <219> 발현 플라스미드를 CaCl₂-충격법 ([Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110] 및 [Sambrook et al. (eds.), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)]) 및 전기천공법을 포함하나 이에 제한되지 않는 각종 표준 방법을 통해 원핵 세포로 도입할 수 있다.
- <220> 본 발명의 실시예에 있어서, 진핵 세포가 또한 적합한 숙주 세포일 수 있다. 진핵 세포의 예로는 일차 또는 무한 증식성인 임의의 동물 세포, 효모 (예를 들어, 사카로마이세스 세레비시아에, 스킴조사카로마이세스 폼베 및 피키아 파스토리스) 및 식물 세포가 있다. 골수종 세포, COS 및 CHO 세포는 숙주로 사용될 수 있는 동물 세포의 예이다. 특정 CHO 세포의 예로는 DG44 ([Chasin, et al., 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556]; [Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909]), CHO-K1 (ATCC 제CCL-61호), CHO-K1 Tet-On 세포주 (Clontech), ECACC 85050302라 지칭된 CHO (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO 클론 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO 클론 B (GEIMG, Genova, IT), ECACC 93061607이라 지칭된 CHO-K1/SF (CAMR, Salisbury, Wiltshire,

UK) 및 ECACC 92052129라 지칭된 RR-CHOK1 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 식물 세포의 예로는 담배 (식물 전체, 세포배양 또는 유합조직), 옥수수, 대두 및 버 세포를 들 수 있다. 옥수수, 대두 및 버 종자가 또한 허용된다.

- <221> CTLA4 돌연변이체 분자를 코딩하는 핵산 서열을 또한 진핵 숙주에서 외래 서열 발현용으로 고안된 벡터 내로 삽입할 수 있다. 벡터의 조절 인자는 구체적인 진핵 숙주에 따라 달라질 수 있다.
- <222> 발현 벡터에서 사용하기 위한 통상적으로 사용되는 진핵 조절 서열은 포유동물 세포에 적합한 프로모터 및 조절 서열, 예를 들어 CMV 프로모터 (CDM8 벡터) 및 조류 육아종 바이러스 (ASV) (π LN 벡터)를 포함한다. 다른 통상적으로 사용되는 프로모터의 예로는 원숭이 바이러스(Simian Virus) 40 (SV40) [Fiers, et al., (1973) *Nature* 273:113]의 초기 및 후기 프로모터 또는 폴리오마, 아데노바이러스 2 및 소 유두종 바이러스로부터 유래된 다른 바이러스 프로모터를 들 수 있다. 유도성 프로모터, 예를 들어 hMTII [Karin, et al., (1982) *Nature* 299:797-802]가 또한 사용될 수 있다.
- <223> 진핵 세포에서 CTLA4 돌연변이체 분자 발현용의 벡터는 또한 인핸서 영역이라 불리는 서열을 보유할 수 있다. 이는 유전자 발현을 최적화하는데 중요하며 프로모터 영역의 상류 또는 하류에서 발견된다.
- <224> 진핵 숙주 세포용의 발현 벡터의 예로는 포유동물 숙주 세포용의 벡터 (예를 들어, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc 벡터, pCMV 벡터, pSG5 벡터 (Stratagene)), 레트로바이러스 벡터 (예를 들어, pFB 벡터 (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) 또는 그의 변형된 형태, 아데노바이러스 벡터; 아데노-관련 바이러스 벡터, 바콜로바이러스 벡터, 효모 벡터 (예를 들어, pESC 벡터 (Stratagene))를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- <225> CTLA4 돌연변이체 분자를 코딩하는 핵산 서열은 진핵 숙주 세포의 게놈 내로 통합되어 숙주 게놈이 복제될 때 복제될 수 있다. 별법으로, CTLA4 돌연변이체 분자를 보유하는 벡터는 염색체의 복제를 가능하게 하는 복제 원점을 함유할 수 있다.
- <226> 사카로마이세스 세레비시아에에서 핵산 서열을 발현시키기 위해, 내인성 효모 플라스미드의 복제 원점인 2 μ 고리가 사용될 수 있다 [Broach, (1983) *Meth. Enz.* 101:307]. 별법으로, 자동 복제를 촉진할 수 있는 효모 게놈으로부터의 서열을 사용할 수 있다 (예를 들어, [Stinchcomb et al., (1979) *Nature* 282:39]); [Tschemper et al., (1980) *Gene* 10:157]; 및 [Clarke et al., (1983) *Meth. Enz.* 101:300] 참조).
- <227> 효모 벡터의 전사 조절 서열은 해당 효소 합성용의 프로모터를 포함한다 ([Hess et al., (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149]; [Holland, et al., (1978) *Biochemistry* 17:4900]). 당업계에 공지된 추가의 프로모터의 예로는 CDM8 벡터에서 제공된 CMV 프로모터 [Toyama and Okayama, (1990) *FEBS* 268:217-221]; 3-포스포글리세레이트 키나제용의 프로모터 [Hitzeman et al., (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073] 및 다른 해당 효소용의 프로모터를 들 수 있다.
- <228> 환경 자극 또는 세포 성장 배지에 의해 조절될 수 있기 때문에 다른 프로모터는 유도성이다. 이들 유도성 프로모터의 예로는 열 충격 단백질, 알콜 탈수소효소 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사 관련 효소, 및 말토스 및 갈락토스 이용에 관련된 효소에 대한 유전자로부터의 것들을 들 수 있다.
- <229> 조절 서열은 또한 코딩 서열의 3' 말단에 위치할 수 있다. 상기 서열은 전령 RNA를 안정화시키는 작용을 할 수 있다. 이러한 종결자는 몇몇 효모-유래 유전자 및 포유동물 유전자에서 코딩 서열 뒤의 3' 비번역 영역에서 발견된다.
- <230> 식물 및 식물 세포용의 벡터의 예로는 아그로박테리움(Agrobacterium) T_i 플라스미드, 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 및 토마토 골든 모자이크 바이러스 (TMGMV)가 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- <231> 포유동물 세포 숙주 시스템 형질전환의 일반적인 측면은 액셀(Axe1) (1983년 8월 16일 허여된 미국 특허 제 4,399,216호)에 기재되어 있다. 포유동물 세포는 인산 칼슘의 존재하에서의 형질감염, 미량주입, 전기천공 또는 바이러스 벡터를 사용한 형질도입을 포함하나 이에 제한되지 않는 방법으로 형질전환시킬 수 있다.
- <232> 식물 및 효모 게놈을 비롯한 외래 DNA 서열을 도입하는 방법은 (1) 기계적 방법, 예를 들어 단일 세포 또는 원형질체 내로의 DNA의 미량주입, DNA의 존재하에 유리 비드를 사용한 세포의 볼텍싱 또는 DNA-코딩된 텅스텐 또는 금구를 세포 또는 원형질체 내로 슈팅하는 것; (2) 폴리에틸렌 글리콜 처리 또는 고압 전기 펄스를 가하여 (전기천공), 세포막을 거대분자가 침투할 수 있도록 함으로써 DNA를 도입하는 것; 또는 (3) 세포막에 융합하는

리포솜 (cDNA 함유)의 사용을 포함한다.

<233> 일단 본 발명의 CTLA4 돌연변이체 분자가 발현되면, 이들을 세포 용해 (예를 들어, 초음파 분해, 리소자임 및/또는 세척제) 및 표준 단백질 정제 방법, 예를 들어 친화성 크로마토그래피 또는 이온-교환 크로마토그래피를 사용하여 수행되는 단백질 회수와 같은 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 수거하여, 실질적으로 순수한 생성물을 수득할 수 있다 ([R. Scopes in: "Protein Purification, Principles and Practice", Third Edition, Springer-Verlag (1994)]; [Sambrook et al. (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)]). CTLA4 돌연변이체 분자의 발현은 당업계 공지된 방법에 의해 검출할 수 있다. 예를 들어, 돌연변이체 분자를 쿠마시(Coomassie) 염색 SDS-PAGE 겔, 및 CTLA4와 결합하는 항체를 사용한 면역블롯팅으로 검출할 수 있다.

<234> 하기 실시예는 본 발명을 설명하고, 동일물을 제조하고 사용하는 정규 기술 중 하나를 돕기 위해 제공한다. 실시예는 달리 어떤 식으로도 본 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다.

<235> <실시예>

<236> **실시예 1**

<237> 하기는 본 발명의 CTLA4 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 생성하기 위해 사용한 방법의 설명을 제공한다.

<238> 미국 특허 제5,434,131호, 제5,885,579호 및 제5,851,795호에 기재된 바와 같이, 먼저 CTLA4Ig를 코딩하는 플라스미드를 구축하였고, 이는 CTLA4Ig 분자를 발현하는 것으로 나타났다. 이어서, 단일-부위 돌연변이체 분자 (예를 들어, L104EIg)를 CTLA4Ig를 코딩하는 서열로부터 생성하고, 발현시키고, 각종 B7 분자에 대한 결합 역학성에 대해 시험하였다. L104EIg 뉴클레오티드 서열 (도 18에 나타난 서열에 포함된 바와 같음)을 주형으로 사용하여 이중-부위 CTLA4 돌연변이체 서열 (도 19 내지 22에 나타난 서열에 포함된 바와 같음)을 생성하여 단백질로서 발현시키고, 결합 역학성에 대해 시험하였다. 이중-부위 CTLA4 돌연변이체 서열은 L104EA29YIg, L104EA29LIg, L104EA29TIg 및 L104EA29WIIg를 포함한다. 또한, 삼중-부위 돌연변이를 생성하였다.

<239> **CTLA4Ig 구축**

<240> 그 내용이 본원에 참고로 인용된 미국 특허 제5,434,131호, 제5,844,095호 및 제5,851,795호에 기재된 바와 같이 CTLA4의 세포외 도메인 및 IgC감마1 도메인을 포함하는 CTLA4Ig를 코딩하는 유전자 구조물을 구축하였다. CTLA4 유전자의 세포외 도메인을 공개된 서열 [Dariavach et al., *Eur. Journ. Immunol.* 18:1901-1905 (1988)]에 상응하는 합성 올리고뉴클레오티드를 사용한 PCR에 의해 클로닝하였다.

<241> CTLA4에 대한 신호 펩티드가 CTLA4 유전자에서 확인되지 않았기 때문에, CTLA4의 예상된 서열의 N-말단을 중복된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 2 단계로 온코스타틴 M [Malik et al., *Mol. and Cell. Biol.* 9:2847 (1989)]의 신호 펩티드에 융합시켰다. 제1 단계에서, 올리고뉴클레오티드, CTCAGTCTGGTCCCTGCACTCCTGTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCC (서열 1) (CTLA4의 N 말단의 7개 아미노산에 융합된 온코스타틴 M 신호 펩티드로부터 C 말단의 15개 아미노산을 코딩함)를 전방향 프라이머로 사용하였고, TTTGGGCTCCTGATCAGAATCTGGGCACGGTTG (서열 2) (CTLA4 수용체를 코딩하고 Bcl I 제한 효소 부위를 함유하는 아미노산 서열의 아미노산 잔기 119 내지 125를 코딩함)를 역방향 프라이머로 사용하였다. 이 단계에서의 주형은 H38 세포 (살라후딘(Salahudin) 및 갈로(Gallo) 박사 (NCI, Bethesda, MD)가 제공한 HTLV II 감염된 T-세포 백혈병 세포주)의 전체 RNA 1 µg으로 합성한 cDNA였다. 제1 단계로부터의 PCR 생성물의 일부를, 온코스타틴 M 신호 펩티드의 N 말단 부분을 코딩하고 Hind III 제한 엔도뉴클레아제 부위를 함유하는 중복된 전방향 프라이머인, CTAGCCACTGAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACA-GAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCCTGCACTC (서열 3), 및 동일한 역방향 프라이머를 사용하여 재증폭시켰다. PCR 반응의 생성물을 Hind III 및 Bcl I으로 다이제스션하고, 상기 힌지, 즉 IgC(감마)1의 CH2 및 CH3 영역에 상응하는 아미노산 서열을 코딩하는 Bcl I/Xba I로 절단된 cDNA 단편과 함께, Hind III/Xba I로 절단된 발현 벡터 CDM8 또는 Hind III/Xba I로 절단된 발현 벡터 piLN (πLN으로도 알려짐) 내로 라이게이션하였다.

<242> CTLA4Ig에 상응하는 아미노산 서열을 코딩하는 DNA는 부다페스트 조약에 의거하여 1991년 5월 31일자로 ATCC에 기탁되었고 ATCC 기탁 번호 제68629호를 부여받았다.

<243> **CTLA4Ig 코돈에 기재한 돌연변이유발법**

<244> CD80 및/또는 CD86 분자로부터 더 느린 해리 속도 ("off" 속도), 즉 개선된 결합성을 갖는 돌연변이 CTLA4Ig 분자를 확인하는 돌연변이유발법 및 스크리닝 방법을 개발하였다. 본 실시양태에서, CTLA4의 세포외 도메인의

CDR-1, CDR-2 (C' 가닥으로도 알려짐) 및/또는 CDR-3 영역 내의 잔기 내에서 및/또는 주위에서 돌연변이를 수행하였다 (미국 특허 제6,090,914호, 제5,773,253호 및 제5,844,095호; 공동 계류중인 미국 특허 출원 제60/214,065호; 및 [Peach, R.J., et al *J Exp Med* 1994 180:2049-2058]에 기재된 바와 같음). CDR-유사 영역은 각각의 CDR 영역을 포함하며, 몇몇 아미노산에 의해 CDR 모티프의 상류 및/또는 하류로 확장되었다. 이들 부위는 키메라 CD28/CTLA4 융합 단백질의 연구 [Peach et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 180: 2049-2058] 및 어떤 아미노산 잔기 측쇄가 용매에 노출되는지를 예견하는 모델 및 CD28과 CTLA4 사이의 특정 위치에서 아미노산 잔기 동일성 또는 상동성의 결핍을 기준으로 선택하였다. 또한, 확인된 잔기에 대해 공간적으로 매우 근접한 (5 내지 20 앙스트롬 단위) 임의의 잔기는 본 발명의 일부로 여겨진다.

<245> B7 분자 (예를 들어, CD80, CD86)에 대한 친화성이 변경된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 합성하고 스크리닝하기 위해, 2-단계 방법을 채택하였다. 실험은 먼저 CTLA4 세포외 부분의 특정 코돈에서 돌연변이체의 라이브러리를 생성한 후 BIAcore 분석법에 의해 이들을 스크리닝하여 B7에 대한 반응성이 변경된 돌연변이체를 확인하여 수행하였다. BIAcore 검정 시스템 (Pharmacia, Piscataway, NJ)은 검출기에 위치한 텍스트란-코팅된 센서 칩으로의 CD80Ig 또는 CD86Ig의 공유 결합을 필수적으로 포함하는 표면 플라즈몬 공명 검출기 시스템을 사용한다. 이어서, 시험 분자를 센서 칩을 함유하는 챔버 내로 주입할 수 있고, 결합하는 상보적 단백질의 양은 센서 칩의 텍스트란-코팅된 측면과 물리적으로 관련되어 있는 분자량의 변화를 기준으로 평가할 수 있으며, 상기 분자량의 변화는 검출기 시스템에 의해 측정할 수 있다.

<246> 구체적으로, 단일-부위 돌연변이체 뉴클레오티드 서열은 주형으로서 돌연변이 되지 않은 (예를 들어, 야생형) CTLA4Ig를 코딩하는 DNA (미국 특허 제5,434,131호, 제5,844,095호, 제5,851,795호 및 제5,885,796호; ATCC 기탁번호 제68629호)를 사용하여 생성하였다. 돌연변이유발된 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머를 코돈의 1 및 2 위치에 임의의 염기를 허용하지만, 3 위치에는 구아닌 또는 티아민만을 허용함으로써 (XXG/T; 또는 NNG/T로도 나타냄) 특정 코돈의 랜덤 돌연변이유발용으로 고안하였다. 상기 방법에서, 아미노산을 코딩하는 특정 코돈을 랜덤하게 돌연변이시켜 20개 아미노산 각각을 코딩할 수 있다. 이와 관련하여, XXG/T 돌연변이유발법으로 20개 아미노산 각각을 코딩하는 32개의 잠재적인 코돈을 수득한다. CTLA4Ig의 CDR3-유사 루프 (MYPPPY)에 매우 근접한 돌연변이를 코딩하는 PCR 생성물을 SacI/XbaI로 다이제스션하고, 유사하게 절단된 CTLA4Ig (도 24에 포함된 바와 같음) π LN 발현 벡터로 서브클로닝하였다. 상기 방법을 사용하여 단일-부위 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EIg를 생성하였다 (도 18에 포함된 바와 같음).

<247> CTLA4Ig의 CDR-1-유사 루프에 근접한 돌연변이유발법에서, 먼저 무중후 NheI 제한 부위를 PCR 프라이머-지정 돌연변이유발법으로 상기 루프의 5'에 도입하였다. PCR 생성물을 NheI/XbaI로 다이제스션하고, 유사하게 절단된 CTLA4Ig 또는 L104EIg 발현 벡터로 서브클로닝하였다. 상기 방법을 사용하여 이중-부위 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EA29YIg를 생성하였다 (도 19에 포함된 바와 같음). 특히, 단일-부위 CTLA4 돌연변이체 분자인 L104EIg를 코딩하는 핵산 분자를 주형으로 사용하여 이중-부위 CTLA4 돌연변이체 분자, L104EA29YIg를 생성하였다.

<248> CTLA4 돌연변이체 분자를 코딩하는 이중-부위 돌연변이체 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 L104EA29YIg (미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 블러버드 10801에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC)에 2000년 6월 19일자로 기탁되었고, ATCC 기탁 번호 ATCC 제PTA-2104호를 부여받았음)를, L104EIg를 주형으로 사용한 상기 기재한 돌연변이유발법을 반복함으로써 생성하였다. 상기 방법을 사용하여 CTLA4 분자 L104EA29YIg (도 19에 나타낸 서열에 포함된 바와 같음), L104EA29LIg (도 20에 나타낸 서열에 포함된 바와 같음), L104EA29TIg (도 21에 나타낸 서열에 포함된 바와 같음) 및 L104EA29WIg (도 22에 나타낸 서열에 포함된 바와 같음)를 코딩하는 것들과 같은 다수의 이중-부위 돌연변이체 뉴클레오티드 서열을 생성하였다. L104EA29YS25KIg, L104EA29YS25NIg 및 L104EA29YS25RIg를 코딩하는 것들과 같은 삼중-부위 돌연변이체를 또한 생성하였다.

<249> 가용성 CTLA4 분자를 뉴클레오티드 서열로부터 발현시키고 하기 실시예 3에 기재된 II기 임상 연구에 사용하였다.

<250> 당업자가 인지하는 바와 같이, 특히 PCR 증폭에 의한 핵산 서열의 복제로 DNA 가닥에 염기 변화를 용이하게 도입한다. 그러나, 일부 코돈은 동일한 아미노산을 중복하여 코딩하기 때문에, 뉴클레오티드 변화가 반드시 아미노산 변화로 번역되는 것은 아니다. 본원에 명시적으로 기재되어 있지 않더라도, 원래 서열 또는 야생형 서열, 무중후 (즉, 번역된 아미노산의 변화를 일으키지 않는) 등으로부터의 뉴클레오티드의 임의의 변화는 본 발명의 범위내에 포함된다.

<251> **실시예 2**

- <252> 하기 실시예는 B7 분자에 대한 결합성이 돌연변이되지 않은 CTLA4Ig 분자에 비해 더 높으며 실시예 1에 기재한 구조물로부터 발현된 단일- 및 이중-부위 돌연변이체 CTLA4 폴리펩티드의 확인에 사용된 스크리닝 방법을 설명한다.
- <253> 현행 시험관내 및 생체내 연구는 CTLA4Ig 그 자체가 항원 특이적으로 활성화된 T 세포의 프라이밍을 완전하게 차단할 수 없음을 나타낸다. T 세포 증식의 억제를 측정하기 위해 CD80 또는 CD86에 대해 특이적인 모노클로날 항체 및 CTLA4Ig를 사용한 시험관내 연구는 항-CD80 모노클로날 항체가 CTLA4Ig 억제를 증대시키지 못함을 나타낸다. 그러나, 항-CD86 모노클로날 항체는 CTLA4Ig 억제를 증대시켰으며, 이는 CTLA4Ig가 CD86 상호작용을 차단함에 있어 효과적이지 못함을 의미한다. 이들 데이터는, CD80-매개의 세포성 반응을 억제하는데 CD86-매개의 반응에 비해 대략 100배 더 낮은 CTLA4Ig 농도가 필요함을 보여주는 문헌 [Linsley et al. *Immunity*, (1994), 1:793-801]의 초기 발견을 지지한다. 이들 발견에 기초하여, 야생형 CTLA4보다 CD86에 대한 결합성이 더 높은 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자가 CTLA4Ig에 비해 항원 특이적으로 활성화된 세포의 프라이밍을 더 잘 차단할 수 있는 것으로 짐작되었다.
- <254> 이러한 목적으로, 신규 스크리닝 절차를 이용하여 상기 실시예 1에 기재된 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자를 스크리닝함으로써, CD80 및 CD86에 대한 결합성을 개선시키는 CTLA4 세포의 도메인에서의 몇몇 돌연변이를 확인하였다. 이 스크리닝 전략은 "off" 속도 결정이 농도에 대해 독립적이기 때문에 단백질을 정제하거나 정량할 필요없이 명백하게 "off" 속도가 느린 돌연변이체를 직접 확인하는 효과적인 방법을 제공하였다 (O'Shannessy et al., (1993) *Anal. Biochem.*, 212:457-468).
- <255> COS 세포를 미니프랩 정제된 개별 플라스미드 DNA로 형질감염시키고, 며칠 동안 증식시켰다. 가용성 CD80Ig 또는 CD86Ig로 코팅된 BIAcore 바이오센서 칩(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)에 3일 동안 조건화시킨 배양 배지를 가하였다. 표면 플라즈몬 공명에 의해 돌연변이체 단백질의 특이적 결합 및 해리를 측정하였다 (O'Shannessy, D. J., et al., 1997 *Anal. Biochem.* 212:457-468). 모든 실험은 25°C에서 BIAcore(상표명) 또는 BIAcore(상표명) 2000 바이오센서 상에서 수행하였다. 표준 N-에틸-N'-(디메틸아미노프로파일)카르보디이미드 N-히드록시숙신이미드 커플링을 이용하여, 연구 등급의 NCM5 센서 칩(Pharmacia)에 리간드를 고정시켰다 (Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277; Khilko, S.N., et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:5425-15434).
- <256> **스크리닝 방법**
- <257> 24 웰 조직 배양 플레이트에서 성장시킨 COS 세포를 돌연변이체 CTLA4Ig로 일시적으로 형질감염시켰다. 분비된 가용성 돌연변이체 CTLA4Ig를 함유하는 배양 배지를 3일 후에 수집하였다.
- <258> CD86Ig 또는 CD80Ig로 유도체화된 BIAcore 바이오센서 칩 상에 조건화된 COS 세포 배양 배지를 흐르도록 방치하고 (문헌 [Greene et al., 1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771]에 기재된 바와 같음), 야생형 CTLA4Ig에 대해 관찰된 것보다 더 느린 off-속도를 갖는 돌연변이체 분자를 확인하였다. 선별된 배지 샘플에 상응하는 DNA를 서열분석하고, 더 많은 DNA를 준비하여 더 큰 규모의 COS 세포 일시적 형질감염을 수행하였으며, 이로부터 배양 배지의 단백질 A 정제 후에 CTLA4Ig 돌연변이체 단백질을 제조하였다.
- <259> BIAcore 분석 조건 및 평형 결합 데이터 분석은 문헌 [J. Greene et al. 1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771] 및 미국 특허 출원 번호 제09/579,927호 및 60/214,065호 (본원에 참고문헌으로 인용됨)에 기재된 바와 같이 수행하였다.
- <260> **BIAcore 데이터 분석**
- <261> 분석 전에 센서그램(sensorgram) 기저수준을 0 반응 단위(RU)로 표준화시켰다. 샘플을 모의(mock)-유도체화된 유동 세포에 흐르게 하여 용액들 사이의 벌크 굴절률 차이로 인한 백그라운드 RU 값을 결정하였다. R_{eq} 대 C의 플롯으로부터 평형 해리 상수(K_d)를 계산하였는데, 이 때 R_{eq} 는 정상 상태 반응에서 모의-유도체화된 칩의 반응을 뺀 것이고, C는 분석물질의 몰농도이다. 결합 곡선은 시판되는 비선형 곡선-작도 소프트웨어 (Prism, GraphPAD Software)를 이용하여 분석하였다.
- <262> 우선, 실험 데이터를 단일 수용체와 결합한 단일 리간드에 대한 모델 (1-부위 모델, 즉 단순한 랭뮤어 시스템, $A + B \leftrightarrow AB$)로 작도하였고, 평형 결합 상수 ($K_d = [A] \cdot [B] / [AB]$)를 방정식 $R = R_{max} \cdot C / (K_d + C)$ 로부터 계산하였다. 이어서, 데이터를 리간드 결합의 가장 간단한 2-부위 모델 (즉, 방정식 $R = R_{max1} \cdot C / (K_{d1} + C) +$

$R_{max2} \cdot C / (K_{d2} + C)$ 에 기재된 바와 같이 2 개의 상호작용하지 않는 독립된 결합 부위를 갖는 수용체에 대해)로 작도하였다.

<263> 이러한 2가지 모델의 적합도 (goodness-of-fits)를 실험 데이터와의 비교에 의해 시각적으로 분석하였고, 결합의 F 검정에 의해 통계적으로 분석하였다. 2-부위 모델의 적합도가 유의하게 더 양호하지 않으면 ($p < 0.1$), 더 단순한 1-부위 모델을 최적의 작도법으로 선택하였다.

<264> BIA 평가 2.1 소프트웨어 (Pharmacia)를 이용하여 결합 및 해리 분석을 수행하였다. 결합 속도 상수 k_{on} 을, 균일한 단일-부위 상호작용 및 평행한 2-부위 상호작용 모두를 가정하여 2 가지 방법으로 계산하였다. 단일-부위 상호작용의 경우에는, k_{on} 값을 방정식 $R_t = R_{eq}(1 - \exp^{-k_s(t-t_0)})$ 에 따라 계산하였는데, 이 때 R_t 는 주어진 시간 t 에서의 반응이고; R_{eq} 는 정상 상태의 반응이고; t_0 는 주입 시작시의 시간이며; $k_s = dR/dt = k_{on} \cdot Ck_{off}$ 이고, 이 때 C 는 단량체 결합 부위의 함으로 계산한 분석물질의 농도이다. 2-부위 상호작용의 경우에는, 방정식 $R_t = R_{eq1}(1 - \exp^{-k_{s1}(t-t_0)}) + R_{eq2}(1 - \exp^{-k_{s2}(t-t_0)})$ 에 따라 k_{on} 값을 계산하였다. 각각의 모델에서, k_{on} 값을 k_s 대 C 플롯의 기울기에 대한 계산치 (약 70% 최대 결합으로)로부터 결정하였다.

<265> 해리 데이터를 한 부위 ($AB = A + B$) 또는 두 부위 ($AiBj = Ai + Bj$) 모델에 따라 분석하고, 가장 우수한 작도 곡선으로부터 속도 상수 (k_{off})를 계산하였다. 잔여분이 기기의 백그라운드 (기기에 따라 2 내지 10 RU)보다 큰 경우 (이 경우에는 2-결합 부위 모델을 채용함)를 제외하고는 결합 부위 모델을 이용하였다. 수용체 점유 시간의 절반을 $t_{1/2} = 0.693/k_{off}$ 의 관계식을 이용하여 계산하였다.

<266> **유동 세포계측법**

<267> 무린 mAb L307.4 (항-CD80)를 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson; San Jose, California)사로부터 구입하고, IT2.2 (항-B7-0 [또한 CD86으로 공지됨])를 파밍겐 (Pharming; San Diego, California)사로부터 구입하였다. 면역 염색을 위해, 10 mM EDTA를 함유하는 인산염 완충 염수 (PBS)에서 인큐베이션하여 CD80-양성 및/또는 CD86-양성 CHO 세포를 배양 용기로부터 분리하였다. 우선, CHO 세포 (1 내지 10×10^5)를 10% 소 태아 혈청(FBS)을 함유하는 DMEM 중에서 mAb 또는 면역글로불린 융합 단백질과 함께 인큐베이션한 후, 세척하고 플루오레신 이소시아네이트-접합된 염소 항-마우스 또는 항-인간 면역글로불린 제2단계 시약 (Tago, Burlingame, California)과 함께 인큐베이션하였다. 세포를 최종적으로 세척하고 FACScan (Becton Dickinson)으로 분석하였다.

<268> **SDS-PAGE 및 크기 배제 크로마토그래피**

<269> 트리스/글리신 4 내지 20% 아크릴아미드 겔(Novex, San Diego, CA)에서 SDS-PAGE를 수행하였다. 분석용 겔을 쿠마시 블루(Coomassie Blue)로 염색하고, 디지털 스캐닝에 의해 젖은 겔의 화상을 수득하였다. CTLA4Ig(25 μ g) 및 L104EA29YIg (25 μ g)을, 1.0 ml/분의 유동 속도에서 0.02% NAN_3 를 함유하는 인산염 완충 염수 중에 평형화된 TSK-GEL G300 SW_{XL} 컬럼 (7.8 x 300 mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피로 분석하였다.

<270> **CTLA4X_{C120S} 및 L104EA29YX_{C120S}**

<271> 단일쇄 CTLA4X_{C120S}를 상기 기재한 바와 같이 제조하였다 (Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424). 요컨대, 온코스타틴 M CTLA4(OMCTLA4) 발현 플라스미드를 주형으로 사용하였고, 정방향 프라이머인 GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG (서열 4)를 선택하여 벡터의 서열과 매치시켰으며; 역방향 프라이머인 GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC (서열 5)는 CTLA4의 세포외 도메인 중 마지막 7 개 아미노산 (즉, 아미노산 118 내지 124)에 상응하고 제한 효소 부위 및 종결 코돈 (TGA)을 함유하였다. 역방향 프라이머는 C120S (120 위치에서 시스테인을 세린으로) 돌연변이를 특정하였다. 특히, 상기 나타난 역방향 프라이머의 뉴클레오티드 서열 GCA (뉴클레오티드 34 내지 36)는 하기 뉴클레오티드 서열 중의 하나로 치환된다: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT 또는 GCT. 당업자가 이해하는 바와 같이, 뉴클레오티드 서열 GCA는 시스테인에 대한 코돈 TGC의 역방향 상보 서열이다. 유사하게, 뉴클레오티드 서열 AGA, GGA, TGA, CGA, ACT 또는 GCT는 세린에 대한 코돈의 역방향 상보 서열이다. 중합효소 연쇄 반응 생성물을 HindIII/XbaI으로 분해하고, 발현 벡터 π LN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ)으로 방향성있게 서브클로닝하였다. L104EA29YX_{C120S}를 동일한

방법으로 제조하였다. 각각의 구조물을 DNA 서열분석으로 확인하였다.

<272>

결합성이 높은 돌연변이체의 확인 및 생화학적 특성화

<273>

돌연변이유발을 위해 24 개의 아미노산을 선택하였고, 생성된 약 2300 개 돌연변이체 단백질을 표면 플라즈몬 공명 (SPR; 상기에 기재)에 의해 CD86Ig 결합에 대해 분석하였다. 각각의 부위에서 돌연변이유발의 두드러진 효과를 하기 표 5에 요약하였다. CDR-1 영역 (S25 내지 R33)에서 몇몇 아미노산의 랜덤 돌연변이유발은 리간드 결합을 명백하게 변화시키지 않았다. E31 및 R33 및 잔기 M97 내지 Y102의 돌연변이유발은 리간드 결합을 명백하게 감소시켰다. 잔기 S25, A29 및 T30, K93, L96, Y103, L104 및 G105의 돌연변이유발은 "on" 및/또는 "off" 속도를 느리게 하였다. 이 결과는 CDR-1 (S25 내지 R33) 영역의 잔기 및 M97 내지 Y102 내부 또는 근처의 잔기가 리간드 결합에 영향을 준다는 이전의 발견을 확인시킨다 (Peach et al., (1994) J. Exp. Med., 180:2049-2058).

<274>

S25, T30, K93, L96, Y103 및 G105 부위를 돌연변이유발하여 몇몇 돌연변이체 단백질이 CD86Ig로부터의 "off" 속도가 느려지는 것을 확인하였다. 그러나, 이런 경우에, 느린 "off" 속도는 느린 "on" 속도에 의해 절충되어 CD86Ig에 대한 전체 결합성이 야생형 CTLA4Ig에서 나타나는 것과 명백하게 유사한 돌연변이 단백질이 생성된다. 추가로, K93의 돌연변이유발은 역학적 변화가 관찰되도록 할 수 있는 충분한 응집을 유발시켰다.

<275>

L104의 랜덤 돌연변이유발에 이은 COS 세포 형질감염 및 고정된 CD86Ig 상의 배양 배지 샘플의 SPR에 의한 스크리닝 결과, "off" 속도가 야생형 CTLA4Ig보다 약 2 배 느린 돌연변이체 단백질을 함유하는 6 개의 배지 샘플을 수득하였다. 상기 돌연변이체에 상응하는 cDNA를 서열분석하여, 각각이 루이신에서 글루탐산으로의 돌연변이 (L104E)를 코딩한다는 것이 밝혀졌다. 명백하게, 루이신 104의 아스파르트산로의 치환 (L104D)은 CD86Ig 결합에 영향을 미치지 않았다.

<276>

이어서, 표 5에 열거된 각각의 부위에서 PCR 주형으로 야생형 CTLA4Ig 대신에 L104E를 사용하여 상기 기재한 바와 같이 돌연변이유발을 반복하였다. 다시 고정된 CD86Ig를 사용한 SPR 분석을 통해, 알라닌 29의 돌연변이유발로 인해 "off" 속도가 야생형 CTLA4Ig보다 약 4 배 느린 단백질을 함유하는 6 개의 배양 배지 샘플을 확인하였다. 가장 느린 2 개는 타이로신 치환체(L104EA29Y)였고, 2 개는 루이신(L104EA29L)이었고, 1 개는 트립토판(L104EA29W)이었으며, 1 개는 트레오닌(L104EA29T)이었다. 명백하게, 야생형 CTLA4Ig에서 알라닌 29 단독을 랜덤하게 돌연변이화시키는 경우 느린 "off" 속도 돌연변이체가 확인되지 않았다.

<277>

정제된 L104E 및 L104EA29YIg의 상대적인 분자량 및 응집 상태를 SDS-PAGE 및 크기 배제 크로마토그래피로 평가하였다. L104EA29YIg(약 1 µg; 레인 3) 및 L104EIg(약 1 µg; 레인 2)는 환원 조건하(약 50 kDa; +βME; 2-메르캅토에탄올 추가) 및 비환원 조건하에서(약 100 kDa; -βME) CTLA4Ig(약 1 µg; 레인 1)와 분명히 동일한 전기영동 이동도를 나타냈다 (도 25A). 크기 배제 크로마토그래피는 L104EA29YIg (도 25C)가 이량체 CTLA4Ig (도 25B)와 분명히 동일한 이동도를 나타낸다는 것을 입증하였다. 도 25B에서 더 빨리 용출되는 부차적 피크가 분자량이 큰 응집체를 나타내는 반면 주피크는 단백질 이량체를 나타낸다. CTLA4Ig의 약 5%가 더 큰 분자량 응집체로서 존재하지만 L104EA29YIg 또는 L104EIg의 응집 증거는 없다. 따라서, L104EIg 및 L104EA29YIg를 사용하여 보여진 CD86Ig에 대한 강한 결합은 돌연변이유발에 의해 유도된 응집에 기여할 수 없었다.

<278>

평형 및 역학 결합 분석

<279>

평형 및 역학 결합 분석을 단백질 A 정제된 CTLA4Ig, L104EIg 및 L104EA29YIg에서 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 이용하여 수행하였다. 결과를 하기 표 4에 나타냈다. 소정의 농도 범위 (5.0 내지 200 nM)에 걸쳐 생성된 결합 곡선으로부터 관찰된 평형 해리 상수 (K_d ; 표 4)를 계산하였다. L104EA29YIg는 L104EIg 또는 CTLA4Ig보다 CD86Ig에 더 강하게 결합한다. L104EIg (6.06 nM) 또는 CTLA4Ig (13.9 nM)보다 낮은 L104EA29YIg의 K_d (3.21 nM)는 CD86Ig에 대한 L104EA29YIg의 결합성이 더 높다는 것을 나타낸다. L104EA29YIg의 K_d (3.66 nM)가 L104EIg (4.47 nM) 또는 CTLA4Ig (6.51 nM)보다 더 낮다는 것은 CD80Ig에 대한 L104EA29YIg의 결합성이 더 높다는 것을 나타낸다.

<280>

역학 결합 분석은 CD80에 결합하는 CTLA4Ig, L104EIg 및 L104EA29YIg의 상대적인 "on" 속도가 CD86Ig에 대한 "on" 속도와 유사하다는 것을 밝혀냈다 (표 4). 그러나, 이들 분자에 대한 "off" 속도는 동등하지 않았다 (표 4). CTLA4Ig와 비교하여, L104EA29YIg는 CD80Ig로부터 약 2 배 느린 "off" 속도 및 CD86Ig로부터 약 4 배 낮은 "off" 속도를 나타낸다. L104E의 "off" 속도는 L104EA29YIg와 CTLA4Ig 사이의 중간치였다. 상기 돌연변이의 도입이 "on" 속도에 유의하게 영향을 미치지 않았기 때문에, L104EA29YIg로 관찰한 CD80Ig 및 CD86Ig에 대한

결합성 증가는 주로 "off" 속도의 감소에 기인하는 것으로 여겨졌다.

<281> CD86Ig 및 CD80Ig에 대한 L104EA29YIg의 결합성 증가가 각 단량체가 이량체로 결합하는 방법에 영향을 주는 돌연변이체 때문인지 또는 각 단량체에 도입된 구조적 변화가 결합성을 증가시키는지 결정하기 위해, CTLA4 및 L104EA29Y 세포의 도메인의 단일체 구조물을 상기 기재한 바 및 문헌 [Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424 (84)]과 같이 시스테인 120을 세린으로 돌연변이유발하여 제조하였다. 정제된 단백질 CTLA4X_{C120S} 및 L104EA29YX_{C120S}가 겔 투과 크로마토그래피 (Linsley et al., (1995), 상기 문헌)에 의해 단량체인 것으로 확인된 후, 그의 리간드 결합 특성을 SPR에 의해 분석하였다. CD86Ig에 대한 둘 다의 단량체 단백질의 결합 친화도가 각각의 이량체에서 보여진 것의 약 35 내지 80 배 더 낮다는 결과를 얻었다 (표 4). 이는 CTLA4의 이량체 형성이 강한 리간드 결합성에 필요함을 확인한, 앞서 공개된 데이터를 지지한다 (Greene et al., (1996) J. Biol. Chem., 271:26762-26771).

<282> L104EA29YX_{C120S}는 CD80Ig 및 CD86Ig 둘 다에 대해 CTLA4X_{C120S}보다 약 2 배 더 큰 친화도로 결합하였다. 이러한 친화도 증가는 둘 다의 리간드로부터 해리 속도가 약 3 배 느리기 때문이었다. 따라서, L104EA29Y에 의한 강한 리간드 결합은 이량체화된 분자에서의 구조적 변화 때문이 아니라, 각각의 단량체 세포로 도입되는 구조적 변화가 결합성을 증가시키기 때문일 가능성이 매우 높았다.

<283> **결합성을 증가시키는 돌연변이의 위치 및 구조 분석**

<284> CTLA4의 세포의 IgV-유사 도메인의 용액 구조가 최근에 NMR 분광학에 의해 결정되었다 (Metzler et al., (1997) Nature Struct. Biol., 4:527-531). 이는 3 차원 폴딩에서 루이신 104 및 알라닌 29의 정확한 위치를 제공하였다 (도 26A 좌측 및 우측 도면). 루이신 104는 보존성이 높은 MYPPPY 아미노산 서열 근처에 위치한다. 알라닌 29는 MYPPPY 영역과 공간적으로 인접한 CDR-1 (S25 내지 R33) 영역의 C-말단 근처에 위치한다. 상기 두 영역 염기의 잔기 사이에 유의한 상호작용이 있기는 하지만, L104 및 A29 둘 다가 단백질의 연속적인 소수성 코어의 부분을 포함함에도 불구하고 L104와 A29 사이의 직접적인 상호작용은 분명히 없다. 결합성을 증가시키는 2 개의 돌연변이체의 구조적 결과를 모델링으로 평가하였다. A29Y 돌연변이체는 CDR-1 (S25 내지 R33) 영역과 MYPPPY 영역 사이의 틈에 용이하게 수용될 수 있고, MYPPPY 영역의 구조를 안정화시킬 수 있다. 야생형 CTLA4에서, L104는 MYPPPY 영역 근처에서 L96 및 V94와 광범위한 소수성 상호작용을 형성한다. 글루탐산 돌연변이가 L104의 돌연변이와 유사한 구조를 갖는 것은 2 가지 이유로 매우 불가능해 보인다. 첫째로, CDR-1 (S25 내지 R33) 영역에 충분한 동요없이 구조내에 더 긴 글루탐산 측쇄를 수용하기에는 공간이 충분하지 않다. 둘째로, 글루탐산 측쇄의 음전하를 내부에 위치시키는 에너지 비용이 클 수 있다. 대신에, 모델링 연구는 글루탐산 측쇄가 그의 전하를 용매화에 의해 안정화시킬 수 있는 표면으로 튀어나온다는 것을 예상한다. 상기 구조 변화는 상기 영역의 다른 잔기를 최소로 변형시키면서 G105에 의해 용이하게 수용시킬 수 있다.

<285> **CD80 또는 CD86을 발현하는 CHO 세포에 대한 높은 결합성을 갖는 돌연변이체의 결합**

<286> 안정하게 형질감염된 CD80+ 및 CD86+CHO 세포와 결합하는 CTLA4Ig 및 돌연변이체 분자의 FACS 분석 (도 27)을 본원에 기재한 바와 같이 수행하였다. CD80-양성 및 CD86-양성 CHO 세포를 CTLA4Ig, L104EA29YIg 또는 L104EIG의 농도를 증가시키면서 인큐베이션한 후 세척하였다. 결합된 면역글로불린 융합 단백질을 플루오레신 이소티오시아네이트-접합된 염소 항-인간 면역글로불린을 사용하여 검출하였다.

<287> 도 27에 나타낸 바와 같이, CD80-양성 또는 CD86-양성 CHO 세포 (1.5 x 10⁵)를 지시된 농도의 CTLA4Ig (검은 정사각형), L104EA29YIg (흰) 또는 L104EIG (삼각형)와 함께 2 시간 동안 23°C에서 인큐베이션하고, 세척하고, 플루오레신 이소티오시아네이트-접합된 염소 항-인간 면역글로불린 항체와 함께 인큐베이션하였다. 총 5,000 개의 살아있는 세포 상에서의 결합을 FACScan으로 분석하고 (1 회 측정), 평균 형광 강도 (MFI)를 PC-LYSYS를 사용한 데이터 히스토그램으로부터 결정하였다. 데이터를 2 단계 시약만으로 인큐베이션한 세포에서 측정된 백그라운드 형광에 대해 보정하였다 (MFI = 7). 대조군 L6 mAb (80 µg/ml)는 MFI < 30이었다. 이 결과는 4 개의 독립적인 실험에 대한 대표값이다.

<288> 인간 CD80-형질감염된 CHO 세포에 대한 L104EA29YIg, L104EIG 및 CTLA4Ig의 결합은 거의 동일하다 (도 27A). L104EA29YIg 및 L104EIG는 CTLA4Ig보다 인간 CD86으로 안정하게 형질감염된 CHO 세포와 더 강하게 결합한다 (도 27B).

<289> **기능 분석**

<290> 인간 CD4-양성 T 세포를 면역자기 음성 선택법으로 단리하였다 (Linsley et al., (1992) J. Exp. Med.

176:1595-1604). 단리된 CD4-양성 T 세포를 적정 농도의 억제제 존재하에 CD80-양성 또는 CD86-양성 CHO 세포와 함께 포볼(phorbol) 미리스테이트 아세테이트 (PMA)로 자극하였다. CD4-양성 T 세포 (8 내지 10×10^4 /웰)를 1 nM PMA 존재 및 조사된 CHO 세포 자극제 존재 또는 부재하에 배양하였다. 증식 반응을 72 시간 배양 중 최종 7 시간 동안 [³H]티미딘 1 μ Ci/웰을 첨가하여 측정하였다. CD80-양성 CHO 또는 CD86-양성 CHO, L104EA29YIg 및 CTLA4Ig에 의해 자극된 T 세포와 함께 PMA의 억제를 수행하였다. 상기 결과를 도 28에 나타냈다. L104EA29YIg는 CTLA4Ig보다 CD80-양성 PMA 처리된 CHO 세포의 증식을 더 많이 억제한다 (도 28A). L104EA29YIg는 또한 CD86-양성 PMA 처리된 CHO 세포의 증식을 억제하는데 CTLA4Ig보다 더 효과적이다 (도 28B). 그러므로, L104EA29YIg는 T 세포의 CD80- 및 CD86-매개 공동자극에 더 효능있는 억제제이다.

<291> 도 29는 상기 제조되고 추가로 CD80 및 CD86 (3.0×10^4 /웰의 T 세포 및 8.0×10^3 /웰의 PM)을 발현시킨 PM이라 불리는 인간 B 림프아구양 세포주 (LCL)로 동시자극된 인간 T 세포의 L104EA29YIg 및 CTLA4Ig에 의한 억제를 나타낸다. 일차 동시자극을 6 일 동안 발생시킨 후, 세포를 ³H-티미딘으로 7 시간 동안 처리하고, 방사선 표지의 혼입을 측정하였다.

<292> 이차 동시자극을 하기와 같이 수행하였다. 7 일 동안 일차 동시자극된 T 세포를 림프구 분리 배지(LSM; ICN, Aurora, OH)로 수확하고 24 시간 동안 방치하였다. 이어서, T 세포를 적정량의 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg 존재하에 상기와 같은 비율로 PM을 첨가하여 재자극(이차)하였다. 3 일 동안 자극한 후, 상기와 같이 세포를 방사선 표지로 처리하고 수확하였다. 일차 동시자극된 T 세포에서 L104EA29YIg의 효과를 도 29A에 나타냈다. 이차 동시자극된 T 세포에서 L104EA29YIg의 효과를 도 29B에 나타냈다. L104EA29YIg는 CTLA4Ig보다 더 크게 일차 및 이차 T 세포 증식 반응 둘 다를 억제한다.

<293> 사이토킨 생성을 측정하기 위해 (도 30), 한쌍의 이차 동시자극 플레이트를 장치하였다. 3 일 후, 배양 배지를 제조사가 추천한 조건에서 ELISA 키트 (Biosource, Camarillo, CA)를 사용하여 분석하였다. L104EA29YIg는 이차 동시자극 후 T 세포 IL-2, IL-4 및 γ -IFN(감마-IFN)의 사이토킨 생성을 차단하는데 CTLA4Ig보다 더 효능있는 것으로 밝혀졌다 (도 30A 내지 C).

<294> 원숭이 혼합 림프구 반응 (MLR)에서 L104EA29YIg 및 CTLA4Ig의 효과를 도 31에 나타냈다. 2 마리 원숭이로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC'S; 각각의 원숭이로부터 3.5×10^4 세포/웰)를 림프구 분리 배지 (LSM)로 정제하고 2 μ g/ml의 피토헤마글루티닌(PHA)과 혼합하였다. 세포를 3 일 동안 자극한 후 방사선 표지를 16 시간 동안 처리하고 수확하였다. L104EA29YIg는 CTLA4Ig보다 더 강하게 원숭이 T 세포 증식을 억제하였다.

<295> 평형 및 겉보기 역학 상수를 하기 표에 나타낸다 (값은 3 회의 다른 실험으로부터 평균±표준 편차이다).

표 4

고정된 단백질	분석물질	$k_{on} (x 10^5) M^{-1} S^{-1}$	$k_{off} (x 10^{-3}) S^{-1}$	$K_d nM$
CD80Ig	CTLA4Ig	3.44 ± 0.29	2.21 ± 0.18	6.51 ± 1.08
CD80Ig	L104EIg	3.02 ± 0.05	1.35 ± 0.08	4.47 ± 0.36
CD80Ig	L104EA29YIg	2.96 ± 0.20	1.08 ± 0.05	3.66 ± 0.41
CD80Ig	CTLA4XC _{120S}	12.0 ± 1.0	230 ± 10	195 ± 25
CD80Ig	L104EA29YXC _{120S}	8.3 ± 0.26	71 ± 5	85.0 ± 2.5
CD86Ig	CTLA4Ig	5.95 ± 0.57	8.16 ± 0.52	13.9 ± 2.27
CD86Ig	L104EIg	7.03 ± 0.22	4.26 ± 0.11	6.06 ± 0.05
CD86Ig	L104EA29YIg	6.42 ± 0.40	2.06 ± 0.03	3.21 ± 0.23
CD86Ig	CTLA4XC _{120S}	16.5 ± 0.5	840 ± 55	511 ± 17
CD86Ig	L104EA29YXC _{120S}	11.4 ± 1.6	300 ± 10	267 ± 29

<296>

<297> 얻어진 부위에서 CTLA4Ig의 돌연변이유발에 의한 CD86Ig 결합에서의 효과는 상기 문헌에 기재된 SPR로 결정하였다. 우세한 효과는 "+" 표지로 나타내었다.

표 5

돌연변이 유발 부위	돌연변이 유발의 효과		
	외관상의 효과 없음	느린 "on" 속도/ 느린 "off" 속도	감소된 리간드 결합
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

<298>

<299>

실시에 3

<300>

하기는 가용성 CTLA4 돌연변이체 분자 L104EA29YIg (L104EA29YIG 또는 LEA로도 공지됨) 또는 CTLA4Ig를 투여하여 관절 부종, 관절 압통, 염증, 조조 경직 및 동통을 감소시키는 것을 비롯한 류마티스성 관절염과 관련된 하나 이상의 증상을 경감시키는 인간 환자의 II기 임상 연구에 대한 설명을 제공한다. 본원에 사용한 CTLA4Ig 분자는 도 24에 나타낸 바와 같이 위치 +1의 메티오닌에서 (또는 별법으로 위치 -1의 알라닌에서) 개시하여 위치 +357의 리신으로 종결된다. CTLA4Ig 분자의 실시양태를 코딩하는 DNA를 ATCC 제68629호로 기탁하였다. 본원에 사용한 L104EA29YIg 분자는 도 19에 나타낸 바와 같이 위치 +1의 메티오닌에서 (또는 별법으로 위치 -1의 알라닌에서) 개시하여 위치 +357의 리신으로 종결된다. L104EA29YIg 분자의 실시양태를 코딩하는 DNA를 ATCC 제PTA 2104호로 기탁하였다.

<301>

추가로, 하기는 L104EA29YIg 또는 CTLA4Ig를 투여하여 적혈구 침강 속도 및 C-반응성 단백질 및/또는 IL2 수용체의 혈청 농도를 감소시키는 것을 비롯한 류마티스성 관절염과 관련된 하나 이상의 생물학적 대체 마커를 경감시키는 인간 환자에 대한 설명을 제공한다.

<302>

환자 코호트

<303>

54명의 남성 및 160명의 여성을 포함하는 총 214명의 환자가 본 연구에 참여하였다 (도 1A, 1B). 기저수준의 환자는 평균 질환 지속기간이 3.4 (±2.0)년이고 하나 이상의 질환 변형 항류마티스 약제 (DMARD)에 대해 효과가 없었다. 안정한 비스테로이드성 소염제 (NSAIDs) 또는 스테로이드 (< 10 mg/일)를 투여하고 동시에 DMARDS를 금지하였다. 상기 환자는 처리군 당 25 내지 32명의 환자의 군으로 랜덤화하였다. 32명의 환자에게 플라시보를 투여하였고, 92명에게 L104EA29YIg를 투여하였고, 90명에게 CTLA4Ig를 투여하였다. 프로토콜 지침에 따르면 57일 후에 중지한 환자에게 제1, 15, 29 및 57일에 각각 하나의 주입액, 총 4 개의 정맥내 주입액을 투여하였다. 모든 환자를 제1, 15, 29, 43, 57, 71 및 85일에 평가하였다. 투여된 투여량은 0.5, 2.0 또는 10.0 mg/kg의 L104EA29YIg (도 1A 내지 1E에 각각 LEA.5, LEA2 및 LEA10로 나타냄) 또는 CTLA4Ig (도 1A 내지 1E에 각각 CTLA.5, CTLA2 및 CTLA10으로 나타냄)를 포함한다.

<304>

모든 대상체를 가능한 이상 반응을 열거한 설문지에 답안을 작성하게 하여 주변-주입 이상 반응 및 전반적인 안정성에 대해 모니터링하였다. 환자는 주입 후 24 시간 내에 발생할 수 있는 가능한 이상 반응에 대해 응답하였다. 추가로, 환자들이 경험한 임의의 이상 반응에 대해 자발적인 보고를 하도록 하였다. 치료자는 혈액 화학 및 혈액학에서 비정상적인 환자의 실험 샘플을 정기적으로 모니터링하고, 예를 들어 사이토킨 (TNF, IL-6), 트립타제 및 보충물과 같은 염증성 반응 매개체의 농도를 평가하였다. 일차 종말점은 제85일에 ACR 20 기준에 부

합하는 대상체의 비율이었다.

<305> **시험 물질의 저장**

<306> CTLA4Ig 및 L104EA29YIg를 각각 CTLA4Ig 200 mg/바이알 또는 L104EA29YIg 100 mg/바이알을 함유한 일회용 유리 바이알에 공급하였다. 주입하기 전에, CTLA4Ig 및 L104EA29YIg를 주사용 멸균수 (SWFI)로 최종 농도 25 mg/ml 이 되게 희석하였다.

<307> **투여 프로토콜**

<308> 모든 주입액을 1 시간 동안 정맥내로 투여하였다 (도 1 내지 17). 모든 대상체에게 하나 이상의 연구 의약 주입액을 투여하였다.

<309> 1 군: 32명의 환자, CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg와 매치되는 플라시보.

<310> 2 군: 26명의 환자; 투여량 CTLA4Ig 0.5 mg/kg.

<311> 3 군: 32명의 환자; 투여량 CTLA4Ig 2.0 mg/kg.

<312> 4 군: 32명의 환자; 투여량 CTLA4Ig 10.0 mg/kg.

<313> 5 군: 32명의 환자; 투여량 L104EA29YIg 0.5 mg/kg.

<314> 6 군: 29명의 환자; 투여량 L104EA29YIg 2.0 mg/kg.

<315> 7 군: 31명의 환자; 투여량 L104EA29YIg 10.0 mg/kg.

<316> **임상 모니터링**

<317> 임의의 주입액을 투여하기 전, 질환 활성도의 기저수준 증상에 대해 환자를 평가하였다. 이들 기저수준 평가는 환자 및 치료자에 의해 평가된 관절 부종, 관절 압통, 염증, 조조 경직, 질환 활성도 뿐만 아니라 건강상태 평가 설문지 (HAQ)에 의해 평가된 장애 (도 1C에 신체 기능 스코어로 보고됨) 및 동통 (도 1A 내지 1D)을 포함한다. 추가로, 기저수준 평가는 적혈구 침강 속도 (ESR) 및 C-반응성 단백질 (CRP)의 혈청 농도 및 가용성 IL-2 수용체 (IL-2r)를 포함한다 (도 1 C 및 1 D).

<318> 임상 반응 연구는 미국 류마티스 학회 (ACR)에 의해 확립된 기준을 기초로 하였다. 압통성 및 부종성 관절수에서 20% 개선되고, 환자 및 치료자 전체 질환 변화, 동통, 장애 및 급성상 반응물과 같은 측정된 남은 5 가지 증상 중 3 가지에서 20% 개선된 경우, 대상체는 ACR20 기준을 충족하였다 ([Felson, D. T., et al., 1993 Arthritis and Rheumatism 36: 729-740]; [Felson, D. T., et al., 1995 Arthritis and Rheumatism 38: 1-9]). 유사하게, 압통성 및 부종성 관절수에서 각각 50 또는 70% 개선되고, 환자 및 치료자 전체 질환 변화, 동통, 물리적 장애 및 급성상 반응물, 예를 들어 CRP 또는 ESR과 같은 측정된 남은 5 가지 증상 중 3 가지에서 각각 50 또는 70% 개선된 경우, 대상체는 ACR50 또는 ACR70 기준을 충족하였다.

<319> **생체마커**

<320> 질환 활성도의 가능한 생체마커 (류마티스성 인자, CRP, ESR, 가용성 IL-2R, 가용성 ICAM-1, 가용성 E-셀렉틴 및 MMP-3)를 또한 평가하였다. 확인된 효소 면역 분석 (EIA) 방법을 사용하여 IL-2sR α , sICAM-1, sE-셀렉틴 및 MMP-3의 혈청 농도를 측정하였다. 필요한 경우, TNF α 및 IL-6을 주입 전 및 주입 2 시간 후에 평가하였다.

<321> IL-2sR α , sICAM-1 및 sE-셀렉틴을 알 앤드 디 시스템즈, 인크. (R & D Systems, Inc.) (Minneapolis, MN)사에서 구입한 상업적으로 시판되는 비색분석 EIA 키트를 사용하여 측정하였다. 정량의 하한 및 상한값은 각각 312 내지 20,000 pg/ml, 40 내지 907 ng/ml 및 10 내지 206 ng/ml였다. 분석 간 계수의 편차는 각각 4.48 내지 8.4%, 3.8 내지 5.0% 및 5.5 내지 9.0%의 범위였다. 키트 제조사에 따라, 정상적인 혈청 값은 각각 676 내지 2,132 pg/ml의 범위였다.

<322> MMP-3를 아머샴 파마시아 바이오텍(Amersham Pharmacia Biotech) (Piscataway, NJ)사에서 구입한 상업적으로 시판되는 비색분석 EIA 키트를 사용하여 측정하였다. 정량의 하한 및 상한값은 30 내지 7,680 ng/ml였다. 분석 간 계수의 편차는 6.3 내지 10.6%였다. 키트 제조사에 따라, 정상적인 혈청 값은 28 내지 99 ng/ml의 범위였다.

<323> IL-6 및 TNF α 를 알 앤드 디 시스템즈, 인크. (Minneapolis, MN)사에서 구입한 상업적으로 시판되는 비색분석 EIA 키트를 사용하여 측정하였다. 정량의 하한 및 상한값은 각각 0.3 내지 3,000 pg/ml 및 0.7 내지 7,000

pg/ml였다. 분석 간 계수의 편차는 각각 3.1 내지 5.7% 및 6.4 내지 20.7%였다. 키트 제조사에 따라, 정상적인 혈청 값은 각각 0.3 내지 12 pg/ml 미만 및 0.7 내지 7.5 pg/ml 미만의 범위였다.

<324> **항체 시험**

<325> 혈청 샘플을 제1일의 투여 전 및 대략 제15, 29, 57, 85 및 169일의 약물-특이적 항체의 평가를 위해 수득하였다. 분자의 면역글로불린 (Ig) 부분에 대해 지시된 미리 존재하는 역가가 높기 때문에, Ig 불변 영역이 없는 CTLA4Ig 및 LEA29Y에 대한 특이적 항체 형성을 또한 평가하였다.

<326> 96 웰 이플론 II ELISA 플레이트 (Dynex, Chantilly, Virginia)를 인산염 완충 염수 (PBS) 중 각각 2, 4, 2 또는 1 µg/ml의 농도인 CTLA4Ig, Ig 불변 영역이 없는 CTLA4Ig, LEA29Y 또는 Ig 불변 영역이 없는 LEA29Y로 코팅하고 2 내지 8°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 상기 플레이트를 0.05% 트윈(Tween) 20을 함유한 PBS로 세척하고 1% 소 혈청 알부민 (BSA)을 함유한 PBS로 37°C에서 1 시간 동안 차단하였다. 이어서 플레이트를 세척하고 시험 혈청 또는 품질 관리 (QC) 혈청의 연속 희석액을 적절한 웰에 첨가하여 37°C에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 혈청을 1:10에서 시작하여 0.25% BSA 및 0.05% 트윈 20과 함께 PBS 중에서 3 배 희석하였다. 플레이트를 세척하고 알칼린-포스파타제-접합된 염소 항-인간 카파 및 람다 (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama) 항체 콕테일을 첨가하였다. 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 세척하고 디에탄올아민 완충액 중 파라-니트로페닐 포스페이트 1 mg/ml을 각각의 웰에 첨가하였다. 25°C에서 30 분 후, 반응을 3 N NaOH로 중지시키고 흡수 (이중 파장: 405 nm 및 550 nm)를 기록하였다. 흡광도가 평균 플레이트 백그라운드 흡광도의 5 배 이상인 것으로 기록된 최대 희석률의 역수로 정의되는 종말점 역가 (EPT)로서 결과를 나타냈다. 플레이트 백그라운드를 혈청 부재시 기록된 흡광도 측정으로 결정하였다. 수치가 2 회 이상의 연속 희석액 (9 배)이거나 투여 전 EPT 값에 비해 더 큰 경우, 수치는 혈청전환에 대해 양성이라 간주하였다. CTLA4Ig- 또는 LEA29Y-특이적 항체에 대해 양성인 혈청 QC 샘플을 면역화된 원숭이로부터 생성하였다. 적절한 QC 샘플의 분석을 각각의 분석적 수행 동안 분석하였다. QC 샘플이 분석 수용 기준 내에 있는 경우에만 분석적 수행을 허용하였다.

<327> **결과**

<328> CTLA4Ig 및 L104EA29YIg는 일반적으로 모든 투여량 수준에서 내성이 있었다. 주변-주입 이상 반응은 두통을 제외하고는 모든 투여 군에서 유사했다. 제85일에 환자의 두통 반응은 각각 0.5, 2.0 및 10.0 mg/kg으로 CTLA4Ig-처리된 환자의 23%, 44% 및 53% 및 L104EA29YIg-처리된 환자의 34%, 45% 및 61%로 투여량에 의존하여 증가하였다. 반대로, 플라시보를 투여한 환자의 31%가 두통을 경험하였다.

<329> 관절염 발적 및 다른 이상 반응 때문에 임상 연구를 중단한 환자의 백분율을 도 2에 요약하였다. 플라시보를 투여한 훨씬 더 높은 백분율로 환자가 관절염 발적 때문에 치료를 중단하였다. CTLA4Ig 처리한 환자는 투여량의 증가에 따라 더 적게 치료를 중단하였다. L104EA29YIg로 처리한 환자는 매우 적은 수가 치료를 중단하였다. 이런 결과는 CTLA4Ig에 대해 양호한 역 투여량-의존 반응이 있음을 나타내고, L104EA29YIg 치료에 대해 더 강한 치료 반응이 있음을 나타낸다.

<330> CTLA4Ig, L104EA29YIg 또는 플라시보로 처리한 환자의 제85일의 ACR-20, -50 및 -70 반응을 도 3A에 요약하였다. 유사하게, 도 3B 및 C는 신뢰 한계 95%로 ACR-20 반응을 나타낸다. 반응은 환자 체중의 kg 당 10 mg에서 명백히 유의한 반응을 갖는 투여량 의존성을 보인다.

<331> CTLA4Ig, L104EA29YIg 또는 플라시보로 처리하였을 때 반응이 없는 환자와 비교하여 부종성 및 압통성 관절수가 감소된 환자의 백분율을 도 4A 및 B에 나타냈다. 치료 반응은 투여량 의존성을 보였다. 보다 큰 백분율의 환자가 둘 다의 생성물에 대한 2 및 10 mg/kg 처리군에서 20, 50, 70 및 100% 까지의 개선을 보였다.

<332> CTLA4Ig, L104EA29YIg 또는 플라시보를 사용하여 환자 및 치료자의 평균 스코어 단위에 의해 평가된, 질환 활성도인 동통이 감소된 환자 백분율을 도 5A, B, C 및 D에 나타냈다. 리커트 척도에 의해 모니터링된 치료 반응은 제85일의 플라시보와 비교한 바와 같이 활성 치료군에 대해 투여량 의존성을 보인다. 리커트 척도는 증상을 평가하기 위해 형용사를 사용한 확인된 언어적 평가 척도이다 [The American College of Rheumatology Preliminary Core Set of Disease Activity Measures for Rheumatoid Arthritis Clinical Trials: Arthritis and Rheumatism, June 1993,36 (6): 729-740].

<333> CTLA4Ig, L104EA29YIg 또는 플라시보로 처리하여 얻어진 2 단위 이상의 기저수준으로부터 질환 활성도 변화에 대한 환자 및 치료자 평가를 도 6A 및 B에 나타냈다. 반응은 투여량 의존성을 보이며 더 높은 투여량의 활성

약물에서 더 두드러지게 개선된다.

- <334> CTLA4Ig, L104EA29YIg 또는 플라시보로 처리한 환자에서 C-반응성 단백질 (CRP) 수준의 감소 백분율을 도 7A 및 B에 나타냈다. 반응은 투여량 의존성을 보이며 2 및 10 mg/kg 활성 성분 처리군에서 명확한 감소가 나타났다. 추가로, 도 7B는 플라시보와 비교하여 매우 유의한 차이를 보였다 (95% 신뢰 구간). 도 7C는 제85일의 기저 수준으로부터 혈청 농도 변화에서의 변화를 보여준다.
- <335> 도 8은 CTLA4Ig, L104EA29YIg 또는 플라시보로 처리한 환자에서 혈청 가용성 IL-2 수용체의 양을 나타낸다. 가용성 IL-2 수용체 수준의 감소는 투여량 의존성을 보인다.
- <336> 도 33은 CTLA4Ig, L104EA29YIg 또는 플라시보로 처리한 환자에서 혈청 가용성 ICAM-1 및 가용성 E-셀렉틴의 양을 나타낸다. 가용성 ICAM-1 및 가용성 E-셀렉틴 수준의 감소는 투여량 의존성을 보인다.
- <337> 도 9A 및 B는 CTLA4Ig 또는 플라시보로 처리한 환자에서 시간에 따른 정중 및 평균 압통성 관절수를 나타낸다. 기저수준으로부터의 변화 (예를 들어, 압통성 관절의 감소)는 플라시보 또는 0.5 mg/kg 군에 비해 2 및 10 mg/kg 처리군에서 더 높은 것으로 보인다.
- <338> CTLA4Ig 또는 플라시보로 처리한 환자에서 시간에 따른 정중 및 평균 부종성 관절수를 도 10A 및 B에 나타냈다. 기저수준으로부터의 변화 (예를 들어, 부종성 관절의 감소)는 플라시보 또는 0.5 mg/kg 군에 비해 2 및 10 mg/kg 처리군에서 더 높은 것으로 보인다.
- <339> CTLA4Ig 또는 플라시보로 처리한 환자에서 시간에 따른 평균 동통 평가 스코어를 도 11에 나타냈다. 기저수준으로부터의 변화 (예를 들어, 동통의 감소)는 플라시보 또는 0.5 mg/kg 군에 비해 2 및 10 mg/kg 처리군에서 더 높은 것으로 보인다.
- <340> CTLA4Ig 또는 플라시보로 처리한 환자에서 환자 또는 치료자가 평가한 시간에 따른 평균 질환 활성도 평가 스코어를 도 12A 및 B에 나타냈다. 기저수준으로부터의 변화 (예를 들어, 질환 활성도의 감소)는 플라시보 또는 0.5 mg/kg 군에 비해 2 및 10 mg/kg 처리군에서 더 높은 것으로 보인다.
- <341> L104EA29YIg (도면에 LEA로 나타냄) 또는 플라시보로 처리한 환자에서 시간에 따른 정중 및 평균 압통성 관절수를 도 13A 및 B에 나타냈다. 기저수준으로부터의 변화 (예를 들어, 압통성 관절의 감소)는 투여량 의존성을 보인다.
- <342> L104EA29YIg (도면에 LEA로 나타냄) 또는 플라시보로 처리한 환자에서 시간에 따른 정중 및 평균 부종성 관절수를 도 14A 및 B에 나타냈다. 기저수준으로부터의 변화 (예를 들어, 부종성 관절의 감소)는 플라시보 또는 0.5 mg/kg 군에 비해 2 및 10 mg/kg 처리군에서 더 높은 것으로 보인다.
- <343> L104EA29YIg (도면에 LEA로 나타냄) 또는 플라시보로 처리한 환자에서 시간에 따른 평균 동통 평가 스코어를 도 15에 나타냈다. 기저수준으로부터의 변화 (예를 들어, 동통의 감소)는 투여량 의존성을 보인다.
- <344> L104EA29YIg (도면에 LEA로 나타냄) 또는 플라시보로 처리한 환자에서 시간에 따른 평균 질환 활성도 평가 스코어를 도 16A 및 B에 나타냈다. 기저수준으로부터의 변화 (예를 들어, 질환 활성도의 감소)는 투여량 의존성을 보인다.
- <345> CTLA4Ig, L104EA29YIg 또는 플라시보로 처리한 환자에 대해 제85일의 HAQ에 의해 평가된 신체 장애의 개선률 (%)을 도 17에 나타냈다 [Health Assessment Questionnaire (HAQ); Fries, J. F., et al., 1982 J. of Rheumatology 9: 789-793]. 이러한 파라미터에 있어서 명확한 투여량 의존성 개선이 있다.
- <346> 가용성 IL-2r 및 C-반응성 단백질 수준에 대한 기저수준으로부터의 변화는 처리군 둘 다에서 투여량 의존적이다. 처리 후, 가용성 IL-2r 수준은 플라시보에서 +3%인 것과 비교하여, 각각 0.5, 2.0 및 10.0 mg/kg의 CTLA4Ig에서 -2%, -10% 및 -22%이고 L104EA29YIg에서 -4%, -18% 및 -32%이었다. C-반응성 단백질 농도는 플라시보에서 +20%인 것과 비교하여 각각 0.5, 2.0 및 10.0 mg/kg의 CTLA4Ig에서 +12%, -15% 및 -32%이고 L104EA29YIg에서 +47%, -33% 및 -47%이었다 (도 7A).
- <347> 약물 둘 다의 더 높은 투여량에서 IgA 및 IgG 수준에 약간의 저해가 있는 것을 제외하고는 일반적인 혈액학 시험, 화학 실험 시험에 대해 임상적으로 두드러진 결과, 신체적 결과 또는 활력 징후 평가가 관측되지 않았다. 특히, 의약 투여가 약물-특이적 항체를 유도하지도 않았다.

<348> **실시에 4**

<349> 하기 실시예는 L104EA29YIg를 투여하여, 확인된 방사선 척도를 사용한 골 또는 관절 침식을 포함하는 구조적 손상을 감소 또는 예방하는 인간 환자의 II기 임상 연구를 기재한다. 구조적 손상의 감소 또는 예방의 개선은 임상 파라미터에 의해 측정된 임상 개선과 유사하다.

<350> CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg로 처리하기 전에 일부 인간 환자에서 골 구조 상태를 모니터링하였다. 이들 환자에 0.5 내지 20 mg/kg의 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg를 만성적으로 2 주 내지 12 주마다 (단독으로 또는 다른 약물과 병용하여) 투여하여 시간에 따른 치료 개선을 유지하였다. FDA 지침서에서 제시한 바와 같이 환자의 손 및 발의 방사선 사진을 소정의 시간 간격, 즉, 6 개월 및 그 후 매년마다 촬영하였다. 이들 환자를 6 개월 및 12 개월 후 및 그 이후 매년 장기간에 걸쳐 모니터링하여 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg로의 치료가 골 퇴행의 진행을 감소시켰는지 측정한다. 환자를 당업계 표준 관행에 따라 X-선 및/또는 자기 공명 영상 (MRI)을 포함하는 방사선 방법으로 모니터링하였다 ([Larsen, A. K. and M. Eek 1977 Acta. Radiol. Diag. 18: 481-491]; [Sharp, J. T., et al., 1985 Arthritis and Rheumatism 28: 1326-1335]). 방사선 데이터의 결과를 관절 간극의 협소화 및/또는 신규 침식의 예방과 함께 골침식 및 연골 손상의 진행이 느려지는 것을 포함하는, 구조적 손상의 예방에 대해 평가하였다.

<351> **실시예 5**

<352> **메토틀렉세이트를 투여하는 동안 활성 류마티스성 관절염을 앓는 대상체에게 정맥내로 투여한 2개의 상이한 투여량의 CTLA4Ig의 안정성 및 임상 효능을 평가하기 위한 연구**

<353> 류마티스성 관절염 (RA) 치료는 효능의 보다 큰 증가 및 더욱 높은 성공율을 달성하기 위하여 보다 공격적인 치료법을 사용하려는 의향이 증가되면서 빠르게 변화되고 있다. 궁극적인 목표는 주된 모든 임상 반응의 비율을 치료까지 증가시키고 상기 장점이 허용가능한 안전성을 갖도록 유지함으로써, 대상체 상태를 보다 집중적인 방법으로 개선시키는 것이다.

<354> 메토틀렉세이트는 RA 치료의 기초로 유지된다. 이는 RA 치료를 위해 사용되는 고전적인 DMARD (예를 들어 금, 히드록시클로로퀸, 설과살라진)에 비해 빠른 작용 개시, 우수한 효능 및 내성이 입증된 일차 작용제였다. 임상적 이득은 치료 개시 후 3주 정도로 빨리 나타날 수 있고, 최대 개선은 일반적으로 6개월까지 달성된다. 그러나, 메토틀렉세이트는 많은 한계를 갖는다. 예를 들어, 그의 내성 증가에도 불구하고, 효능과 간 독성 사이의 영역이 꽤 좁다. 메토틀렉세이트로 치료하는 대상체는 주의 깊은 모니터링이 요구되며, 허용불가능한 독성 때문에 종종 치료가 중단된다.

<355> 또한, 메토틀렉세이트는 질환 진행 또는 관절 퇴행을 효율적으로 제어하는 것처럼 보이지 않는다. 몇몇 대상체에서, 치료자는 독성 증가의 위험에도 불구하고 효능이 증가될 것이라는 희망으로 두번째 DMARD 첨가를 강요받는다는 느낌을 받는다. 별법으로, 사이토킨 염증성 캐스케이드의 상류에 존재하는 자가-면역 메카니즘을 표적으로 하는 공동자극자 차단제 (예를 들어 CD80 및 CD86 차단제, 예를 들어 CTLA4Ig)와 메토틀렉세이트의 공동치료도 또한 효능을 증가시킬 수 있다.

<356> 상기 실시예 3에 언급한 바와 같이, CTLA4Ig에 대해 2 및 10 mg/kg의 투여량에서 양호한 내성 프로파일을 가지면서 유의한 임상 반응 및 질환 활성도의 대리 마커에서의 감소가 관찰되었다. 또한, 상기 실시예 3에서 사용된 조성물 CTLA4Ig가 어떠한 이상 반응도 유도하지 않음을 확인하였다. 그 결과, IIB기에서의 류마티스성 관절염에 대한 CTLA4Ig의 임상 개발을 계속하기로 결정하였다.

<357> 하기는 메토틀렉세이트와 가용성 CTLA4 분자를 투여한 인간 환자의 IIB기 임상 연구에 대한 설명 및 6개월 후의 연구 결과를 제공한다.

<358> 본 실시예는 모든 대상체가 6개월의 치료 또는 휴지 요법을 완료한 후 일차 효능을 평가한 12개월 연구를 기재한다. 연구 기간의 전반에 걸쳐 효능, 안전성 및 질환 진행 또한 평가하였다.

<359> 연구는 랜덤 이중 맹검 플라시보-대조군의 평행 투여량 고안을 사용하였다. 연구는 CTLA4Ig의 2가지 투여량 2 또는 10 mg/kg의 안전성, 임상 활성, 면역원성 및 약동학을 평가하도록 고안되었다. 활성 RA를 앓고 메토틀렉세이트를 투여한 총 대략 330명의 대상체를 3가지 투여량 부분 중 하나로 랜덤화하였다: 2 mg/kg의 CTLA4Ig (N = 110), 10 mg/kg의 CTLA4Ig (N = 110) 및 플라시보 대조군 (N = 110)을 12개월 동안 매달 주입 투여. 모든 군은 매주 메토틀렉세이트 처리 (10 내지 30 mg 매주)를 계속하였다 (도 57 내지 62).

<360> CTLA4Ig 또는 플라시보를 또한 제15일에 투여하였다. 연구 의약의 각 투여량을 대략 30분에 걸쳐 정맥내 주입하였다. 일차 효능 종결점은 6개월 후의 ACR 20 반응률이었다.

<361> 첫번째 6개월 동안에는, 대상체의 코르티코스테로이드, 글루코코르티코이드 또는 NSAID의 투여량을 변경시키지 않았다. 메토티렉세이트의 증가도 처음 6개월 동안에는 허용되지 않았다. 메토티렉세이트의 감소는 메토티렉세이트가 독성을 유발한다고 느껴질 때에만 허용되었다. CTLA4Ig 또는 플라시보의 일차 처리 전에 대상체를 적어도 6개월 동안 메토티렉세이트로 28일 동안 안정 투여량으로 처리하였다. 메토티렉세이트 이외의 DMARD는 허용되지 않았다. 저투여량 안정한 코르티코스테로이드 (1일 10 mg 이하) 및/또는 아세틸 살리실산 (ASA)을 비롯한 안정한 비스테로이드성 소염제 (NSAID)의 사용은 허용되었다. ASA 또는 NSAID를 함유하지 않는 진통제는 관절 평가 전 12시간 동안을 제외하고, 기저수준 및 연구 의약에 의해 적절하게 제어되지 않는 동통을 경험하는 대상체에서 허용되었다. 위장 독성과 같은 이상 반응 때문인 경우에만 NSAID 감소가 허용되었다.

<362> **시험 생성물, 투여량 및 투여 방식, 치료의 지속기간**

<363> 2 mg/kg 또는 10 mg/kg의 CTLA4Ig를 초기 1개월 동안에는 매2주마다, 그 후 12개월 동안에는 매월마다 주입하였다.

<364> 모든 대상체에게 6개월 이상 동안 메토티렉세이트의 1주 투여량 (10-30 mg)을 투여한 후, 랜덤화하고, 시험의 초기 6개월 동안 진입 투여량으로 유지하였다. 투여량은 처음 6개월 동안 독성 때문에만 감소시킬 수 있었다.

<365> **평가 기준**

<366> 연구의 제1 단계의 일차 종결점은 제180일 (6개월)에서 미국 류마티스 학회의 기준인 20% 개선 (ACR 20)을 만족시키는 대상체의 비율이었다. 개선에 대한 ACR 20 정의는 압통성 관절수 및 부종성 관절수에서의 기저수준으로부터의 20% 개선 및 하기 5개의 핵심 셋트 측정 중 3개에서 기저수준으로부터의 20% 개선이었다: 동통의 대상체 전체 평가, 질환 활성도의 대상체 전체 평가, 질환 활성도의 치료자 전체 평가, 신체 기능 및 급성상 반응물 값 (C-반응성 단백질 (CRP))의 대상체 평가. 그 후, 50% 개선 (ACR 50) 및 70% 개선 (ACR 70)에 대해 평가하였다. 효능 부재 (즉, RA 악화)로 인해 연구를 중단한 대상체는 그 시점으로부터 ACR 비반응자로 간주하였다. 다른 이유로 탈락된 모든 대상체에 대하여, 중단 시점에서의 그의 ACR 반응을 기록하였다.

<367> **통계 방법**

<368> CTLA4Ig의 두가지 투여량 (2 mg/kg 및 10 mg/kg)을 플라시보 대조군과 비교하였다. 모든 대상체를 메토티렉세이트의 동일한 안정 진입 투여량으로 유지하였다. 일차 분석은 CTLA4Ig 10 mg/kg과 플라시보의 비교였다. 샘플 크기는 유의성의 5% 수준 (양방향(2-tailed))을 기준으로 하였다. 공개된 연구를 기초로, 6개월에서 플라시보와 메토티렉세이트 대조군 ACR 20 반응률은 약 25%이었다. 치료 부문 당 107명의 대상체 (가능한 15% 탈락에 대해 조정됨)의 샘플을 측정하여 94% 검정력으로 5% 유의 수준 (양방향)에서 25%의 차이를 검출하였다. 유사하게, 샘플을 측정하여 95% 및 90%의 검정력으로 ACR 50 및 ACR 70에서 각각 20% 및 14%의 차이를 검출하였다. CTLA4Ig 10 mg/kg과 플라시보의 비교가 ACR 20에 대해 유의하였다면, CTLA4Ig 2 mg/kg과 플라시보의 비교를 수행하였다. 상기 제2 시험은 88%의 세기를 가져야만 한다. 카이-제곱 시험을 기초로 하는 상기 연속적인 거부 절차를 또한 ACR 50 및 ACR 70 반응에서의 차이에 대한 시험에도 사용하였다.

<369> 모든 효능 분석은 연구 의약의 적어도 하나의 투여량을 투여한 모든 대상체로부터 얻은 모든 이용가능한 평가를 함유하는 데이터 세트를 기준으로 하였다.

<370> 기저수준으로부터의 백분율 변화를 또한 ACR의 개별 성분에 대해 보고하였다. 중단된 대상체의 경우에는, 그의 최종 관찰을 기록하였다.

<371> **결과**

<372> **통계 및 기저수준 지표**

표 6

대상체 배치 및 통계

	메토트렉세이트 + CTLA4Ig 10 mg/kg	메토트렉세이트 + CTLA4Ig 2 mg/kg	메토트렉세이트 + 플라시보
등록/랜덤화	115	105	119
완료	99 (86.1%)	82 (78.1%)	78 (65.5%)
중단	16 (13.9%)	23 (21.9%)	41 (34.5%)
- 부작용	2 (1.7%)	7 (6.7%)	7 (5.9%)
- 효능 없음	12 (10.4%)	13 (12.4%)	29 (24.4%)
- 기타	2 (1.7%)	3 (2.9%)	5 (4.2%)
연령(년)-평균(범위)	55.8 (17 - 83)	54.4 (23 - 80)	54.7 (23 - 80)
체중 (kg) - 평균 (범위)	77.8 (40.1 - 144)	78.7 (48.4 - 186.8)	79.9 (44 - 140)
성별	75% 여성	63% 여성	66% 여성
인종	87% 백인	87% 백인	87% 백인
질환 지속 기간(년) 평균 ± SD	9.7 ± 9.8	9.7 ± 8.1	8.9 ± 8.3

<373>

<374>

통계적 및 기저수준의 임상 지표는 처리군 사이에서 유사하였다. 대상체의 63% 내지 75%는 여성이고, 87%는 카프카스인이었다. 진입 시 질환의 평균 지속기간은 10, 2 mg/kg 및 대조군에서 각각 9.7 ± 9.8, 9.7 ± 8.1 및 8.9 ± 8.3년이었다. 평균 체중 (kg)은 40.1 내지 186.8 kg의 변동 범위에서 77.8 내지 79.9로 매우 유사하였다 (표 6).

<375>

6개월 후, 활성 처리군에서보다 대조군에서 더 많은 대상체가 실험을 중단하였다 (35.5%; 10 및 2 mg/kg 처리군의 경우, 각각 13.9% 및 21.9%). 주요 원인은 효능이 없기 때문이었으며, 대조군의 경우 중단율은 24.3% 였던 반면, 2 및 10 mg/kg 처리군의 경우 각각의 중단율은 12.4% 및 10.4%였다. 부작용에 의한 중단율은 10 mg/kg 처리군의 경우 1.7%로 보다 낮은 반면, 2 mg/kg 처리군 및 대조군의 경우 각각 6.7% 및 5.9%였다.

<376>

초기 3 내지 4개월 동안, 이러한 중단은 활성-처리군에 비하여 대조군에서 더 빠른 비율로 나타났다. 제120일 후에, 모든 처리군에 대한 중단은 1차 처리 기간의 지속기간 (6개월) 동안 안정화되었다.

표 7

기저 수준 임상 지표

	메토트렉세이트 + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	메토트렉세이트 + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	메토트렉세이트 + 플라시보 (n = 119)
압통성 관절 (평균 ± SD)	30.8 ± 12.2	28.2 ± 12.0	29.2 ± 13.0
부종성 관절 (평균 ± SD)	21.3 ± 8.4	20.2 ± 8.9	21.8 ± 8.8
동통 (VAS 100 mm) (평균 ± SD)	62.1 ± 21.4	64.5 ± 22.3	65.2 ± 22.1
신체 기능 (MHAQ 스코어 0내지3) (평균 ± SD)	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.6
대상체 전체 평가 (VAS 100 mm) (평균 ± SD)	60.1 ± 20.7	59.4 ± 23.7	62.8 ± 21.6
치료자 전체 평가 (VAS 100 mm) (평균 ± SD)	62.1 ± 14.8	61.0 ± 16.7	63.3 ± 15.5
CRP (mg/dL)	2.9 ± 2.8	3.2 ± 2.6	3.2 ± 3.2
조조 경직(분)	97.9 ± 63.1	104.1 ± 63.9	106.0 ± 64.2

<377>

<378>

기저수준에서 압통성 관절 및 부종성 관절의 평균 갯수는 3개의 처리군 사이에서 비교할 수 있었다. 10 mg 처리군에서 압통성 관절 및 부종성 관절의 평균 갯수는 각각 30.8 ± 12.2 및 21.3 ± 8.4였다. 2 mg 처리군에서 압통성 관절 및 부종성 관절의 평균 갯수는 각각 28.2 ± 12.0, 및 20.2 ± 8.9였다. 대조군에서 압통성 관절 및 부종성 관절의 평균 수는 각각 29.2 ± 13.0, 및 21.8 ± 8.8였다. 이들 평가 및 모든 다른 임상 평가는 모든 처리군 사이에서 유사하였다 (표 7).

<379>

ACR 반응 및 핵심 요인

표 8

제6개월의 ACR 반응

	메토트렉세이트 + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	메토트렉세이트 + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	메토트렉세이트 + 플라시보 (n = 119)
ACR 20	60.0%	41.9%	35.3%
대조군과의 차이	24.7	6.6	-
95% CI	11.9, 37.5	-6.2, 19.4	-
p-값	< 0.001	0.31	-
ACR 50	36.5%	22.9%	11.8%
대조군과의 차이	24.8	11.1	-
95% CI	13.8, 35.7	1.2, 20.9	-
p-값	< 0.001	0.027	-
ACR 70	16.5%	10.5%	1.7%
대조군과의 차이	14.8	8.8	-
95% CI	7.5, 22.2	2.7, 14.9	-
p-값	< 0.001	0.005	-

<380>

<381> 제6개월의 메토트렉세이트 대조군에 비하여 10 mg/kg 처리군에서 ACR 20, 50 및 70 반응률의 개선은 통계적으로 유의하였다 (도 34 내지 38, 40). 2 mg/kg 처리군에서 ACR 50 및 ACR 70의 개선도 또한 통계적으로 유의하였다. 2 mg/kg 처리군과 대조군 간의 ACR 20 반응차는 6.6%였다. 이러한 반응차는 통계적으로 유의하지 않았다 (p = 0.31, 표 8 및 도 49).

<382> 도 34 내지 37은 제1일 내지 제180일의 ACR 반응률을 나타낸다. 또 38 및 40은 다양한 처리군에서 제180일의 ACR 20, 50 및 70 반응률을 나타낸다. ACR 50 및 ACR 70 반응률은 최대 효능이 10 mg/kg에서 달성되지 않을 수 있다는 가능성을 제시한다.

<383> 도 39는 메토트렉세이트 단독으로 또는 CTLA4Ig (대상체의 체중 kg 당 2 또는 10 mg/kg 투여)와 병용하여 치료한 후 연구 제180일에서 새로운 압통성 관절 및 부종성 관절의 비율을 나타낸다.

<384> 도 46은 HAQ에 의해 측정된 바와 같이 기저수준으로부터 신체 기능의 평균 개선 백분율을 나타낸다.

표 9

제180일의 개별 ACR 요인
(평균 개선 백분율)

핵심 요인	메토트렉세이트 + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	메토트렉세이트 + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	메토트렉세이트 + 플라시보 (n = 119)
압통성 관절	59.9%	43.3%	32.1%
부종성 관절	54.9%	45.1%	33.4%
동통	46.4%	22.7%	8.4%
신체 기능 (mHAQ)	41.5%	17.3%	14.1%
대상체 전체 평가	40.8%	9.6%	17.6%
치료자 전체 평가	52.0%	38.6%	25.6%
CRP	31.5%	16.2%	-23.6%

<385>

<386> 2 mg/kg 투여군에서의 대상체 전체 평가만을 제외하고는, 2 및 10 mg/kg 투여군에서 ACR 반응 기준의 모든 임상 요인에서 어느 정도의 효능이 입증되었다 (표 9; 도 41 내지 45, 도 47 내지 48). 압통성 관절 및 부종성 관절의 감소는 투여량-의존적인 것으로 나타났다. 압통성 관절수는 10 mg/kg 처리군, 2 mg/kg 처리군 및 대조군에서 각각 59.9%, 43.3% 및 32.1%로 감소하였다. 유사한 패턴이 부종성 관절수에 대해 10 mg/kg 처리군, 2 mg/kg 처리군 및 대조군에서 각각 54.9%, 45.1% 및 33.4%의 감소로 관찰되었다. 대조군과 비교했을 때 가장 큰 차이는 동통 평가에서 관찰되었으며, 대조군의 경우 8.4% 감소한 것에 비해, 10 mg 및 2 mg/kg CTLA4Ig의 경우에는 기저수준에 비해 각각 46.4% 및 22.7% 감소하였다. 평균 CRP는 대조군에서의 23.6% 증가에 비해 10 및 2 mg/kg 처리군의 경우 기저수준에 비해 각각 31.5% 및 16.2% 감소하였다.

<387> 건강상태와 관련된 삶의 질

<388> 건강상태와 관련된 삶의 질 (HRQOL)에 대한 CTLA4Ig의 효과는 메디칼 아웃컴즈 스티디 쇼트 폼-36(Medical Outcomes Study Short Form-36) (SF-36)에 의해 측정하였다. SF-36을 기저수준의 모든 대상체에게 제90일 및 제180일에 투여하였다. SF-36은 8개 영역 (신체 기능, 신체적 역할, 체통, 일반적인 건강상태, 활력, 사회적

기능, 정서적 역할 및 정신 건강)을 포함하는 36개 항목으로 구성되어 있다. 이들 각 영역을 이용하여 0 내지 100의 범위에서 삶의 질이 더 개선되면 더 높은 스코어로 신체적 및 정신적 요인 요약 스코어가 유도된다. SF-36 스코어에서 5 이상의 절대적 차이는 임상적으로 의미있는 것으로 간주되었다.

<389> 플라시보로 처리된 대상체와 비교하여, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군의 대상체는 또한 SF-36의 8개의 모든 영역에서 통계 유의하게 상당히 개선되었다 (도 50 내지 51). CTLA4Ig 2 mg/kg으로 처리한 대상체의 경우, 플라시보로 처리한 대상체보다 훨씬 더 개선되었으나, 그 차이는 통계적으로 유의하지 않았다 (도 50 내지 51).

<390> 기저수준 SF-36 스코어는 3개의 처리군 사이에서 비교가능하였다. 삶의 질 개선이 처리 6개월 후에 투여량-반응 경향으로 명백하게 나타났다. CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군의 대상체는 SF-36의 8개의 모든 영역에서 기저수준으로부터 임상학상 및 통계학상 유의하게 개선되었음이 입증되었다. 가장 큰 효과는 신체적 역할, 체통 및 정서적 역할 영역에서 나타났다. 이러한 긍정적인 발견은 효능 결과와 일치하였다. CTLA4Ig 2 mg/kg으로 처리한 대상체의 경우, 기저수준으로부터의 개선은 또한 정신 건강을 제외한 모든 영역에 대해 통계적으로 유의하였다.

<391> **약동학**

약동학 파라미터 값

	C _{MAX} (μG/ML)	T _{MAX} (H)	AUC(TAU) (μG.H/ML)	T-HALF (일)	CLT (ML/H/KG)	VSS (L/KG)
2 mg/kg						
값	57.96	0.50*	10176.14	13.50	0.23	0.07
SD	16.93	(0.00,4.00)	3069.84	5.91	0.13	0.04
N	15	15	15	15	15	15
10 mg/kg						
값	292.09	0.50*	50102.56	13.11	0.22	0.07
SD	67.78	(0.00,4.00)	15345.95	5.32	0.09	0.03
N	14	14	14	14	14	14

* 정중 (최소, 최대)

<392>

<393> CTLA4Ig의 약동학은 투여 제60일 내지 제90일의 혈청 농도 대 시간 데이터로부터 유도할 수 있었다. 샘플을 투여전 제60일, 투여 후 0.5 시간 및 4시간, 제67일, 제74일, 제81일 및 투여전 제90일에 수집하였다. 예비 데이터는 C_{max} 및 AUC 값 둘다가 투여량 증분에 상당하는 비율로 증가하였음을 나타냈다. 1:5의 비율로 증가한 통상 투여량의 경우, C_{max} 및 AUC 값 둘다는 각각 1:5.04 및 1:4.92의 비율로 증가하였다. T-HALF, CLT 및 V_{ss} 값은 이에 필적하며 투여량 독립적인 것으로 나타났다.

<394> 평균 V_{ss} 값은 투여 수준 둘다에 대해 0.07 L/kg이며, 혈장량의 약 1.6배였다.

<395> **약력학**

표 10

약역학 생체마커에 대한 평균 기저 수준 값

생체마커	메토프렉세이트 + CTLA4Ig 10 mg/kg (n = 115)	메토프렉세이트 + CTLA4Ig 2 mg/kg (n = 105)	메토프렉세이트 + 플라시보 (n = 119)
CRP (mg/dL)	2.9	3.2	3.2
RF (IU/L)	207	274	179
IL-2r (pg/ml)	1388	1407	1398
IL-6 (pg/ml)	26.7	31.7	21.4
TNFα (pg/ml)	11.8	6.0	11.9

<396>

<397> 약력학 생체마커의 혈청 수준을 연구 동안 각 시간별로 분석하였다. 기저수준값은 표 10에 나타났다. 기저수준과 비교하여 제180일의 값은 도 52 내지 56에 나타났다.

<398> CRP 수준은 대조군에서보다 CTLA4Ig-처리군 둘다에서 기저수준으로부터 감소하였으며, 이 중 10 mg/kg 투여군에서 훨씬 더 크게 감소한 것으로 관찰되었다 (도 47, 48 및 53 참조).

<399> 류마티스 인자 수준은 대조군에서보다 CTLA4Ig-처리군 둘다에서 기저수준으로부터 감소하였으며, 이 중 10 mg/kg 투여군에서 훨씬 더 크게 감소한 것으로 관찰되었다 (도 53 참조).

<400> 가용성 IL-2r 수준은 대조군에서보다 CTLA4Ig-처리군 둘다에서 기저수준으로부터 감소하였으며, 이 중 10 mg/kg

투여군에서 훨씬 더 크게 감소한 것으로 관찰되었다 (도 54 참조).

<401> 혈청 IL-6 수준은 대조군에서보다 CTLA4Ig-처리군 둘다에서 기저수준으로부터 더 많이 감소하였다 (도 55 참조).

<402> 혈청 TNF α 수준에 대한 CTLA4Ig의 효과는 결론이 나지 않았다. 대조군에 비해 2 mg/kg 군은 증가하였으며 10 mg/kg 처리군은 감소하였다 (도 56 참조).

<403> **안전성**

<404> CTLA4Ig는 모든 투여량에서 매우 관용적이었다. CTLA4Ig를 투여한 어떠한 대상체도 사망하거나 악성 종양 또는 기회 감염에 걸리지 않았다. 심각한 부작용 (SAE) 및 심각하지 않은 부작용 (NSAE)은 대조군과 비교하였을 때 그 발생빈도가 유사하거나 활성 처리군에서 더 적었다.

<405> 대조군에 비해 10 mg/kg 처리군에서 더 적은 대상체가 부작용 때문에 중단하였다 (각각 5.9% 대 1.7%). 2 mg/kg에서 부작용에 의한 중단은 대조군과 유사하였다 (각각 6.7% 대 5.9%). SAE는 부작용에 의한 중단과 유사한 형태를 수반하였다.

<406> 10 mg/kg 투여군에서의 어떠한 부작용도 연구 약물과 관련된 것으로 고려되지 않았다.

<407> **면역원성**

<408> 제180일의 CTLA4Ig 투여량 수준 둘다에서 어떠한 항-약물 항체 반응도 검출되지 않았다.

<409> CTLA4Ig는 ACR 반응 기준에 의한 평가시 메토타렉세이트를 투여한 대상체에서 류마티스성 관절염의 징후 및 증상을 유의하게 감소시켰다. CTLA4Ig의 효과는 투여량 수준에 비례하게 증가하는 것으로 나타났다. 모든 ACR 핵심 요인에서 기저수준으로부터의 개선은 2 mg/kg 처리군보다 10 mg/kg 처리군에서 더 높았다. 10 mg/kg 투여량의 CTLA4Ig는 SF-36의 8개의 모든 영역에서 임상학상 및 통계학상 유의하게 개선되었음이 입증되었다. 평가된 모든 약력학 생체마커는 TNF α를 제외하고는 CTLA4Ig 투여량 수준에 비례하여 감소하는 것으로 나타났다. CTLA4Ig는 메토타렉세이트를 투여한 류마티스성 관절염에 걸린 대상체에 있어서 안전하고 매우 관용적이었다. CTLA4Ig 투여량 둘다에 대한 부작용 프로파일은 대조군과 유사하였다.

<410> **실시예 6**

<411> **활성 류마티스성 관절염에 걸린 환자에게 에타네르셉트와 병용하여 월 1회 제공되는 공동-자극 차단제인 CTLA4Ig의 연구**

<412> 하기 실시예는 활성 류마티스성 관절염에 걸린 환자를 치료하기 위해 CTLA4Ig를 에타네르셉트와 병용하여 투여하는 것에 대한 설명을 제공한다.

<413> 인플릭시마브와 함께 에타네르셉트는 종양 괴사 인자 (TNF)를 표적으로 하는 류마티스성 관절염 약물의 신규 세대를 포함한다. 에타네르셉트는 인간 면역글로불린 (IgG1)의 Fc 부분과 연결된 TNF 수용체의 세포의 부분을 갖는 이량체 융합 단백질이다. 이러한 융합 단백질은 TNF와 결합하여 이의 세포 표면 TNF 수용체와의 상호작용을 차단하며, TNF 분자를 생물학적으로 불활성이 되게 한다.

<414> 이번 실시예는 모든 대상체가 6개월 치료를 완료하거나 치료를 중단한 후 효능을 평가하는 12개월의 연구에 대해 기재한다. 이번 연구의 지속기간 동안의 효능, 안전성 및 질환 진행을 또한 평가하였다.

<415> 연구는 랜덤화된 이중 맹검 플라시보-대조군의 평행 투여 고안을 이용하였다. 활성 RA에 걸려 에타네르셉트 (매주 2회 25 mg)를 투여하는 총 약 141명의 대상체를 2 투여군 중 1군으로 랜덤화하였다: 1) CTLA4Ig 2 mg/kg + 에타네르셉트를 투여하는 군 (n = 94) 또는 2) 에타네르셉트만을 투여하는 플라시보 군 (n = 47).

<416> **시험 생성물, 투여량 및 투여 방식, 치료 지속기간**

<417> 모든 대상체에게 치료 전 3개월 이상 동안 에타네르셉트 (매주 2회 25 mg)를 투여하였다.

<418> CTLA4Ig를 제1일, 제15일, 제30일에 주입하고, 매월 1회씩 6개월 동안 주입하였다 (제1 치료 단계). 연구 의약의 매 투여량은 약 30분 동안 정맥 주입하였다.

<419> 연구의 제1 치료 단계는 치료의 처음 6개월 동안 수행하였다. 이 기간 동안, 대상체는 에타네르셉트의 안정한 투여량 (매주 2회 25 mg)을 유지하도록 하였다. 에타네르셉트 이외의 DMARD는 허용되지 않았다. 저투여량의 안정한 코르티코스테로이드 (1일 10 mg 이하) 및/또는 아세틸 살리실산 (ASA)를 비롯한 안정한 비-스테로이드성

소염제 (NSAID)의 사용은 허용되었다. 진통제 (ASA 또는 NSAID를 함유하지 않음)는 관절 평가 전 12시간 동안 을 제외하고는, 기저수준 및 연구 의약에 의해 적절하게 제어되지 않은 동통을 경험하는 대상체에서 허용되었다.

<420> **평가 기준**

<421> 이번 연구의 제1 종점은 6개월 후 변경된 미국 류마티스 학회 기준인 20% 개선 (ACR 20)을 충족하는 대상체의 비율을 평가하는 데이터를 수집하는 것이다. 변경된 ACR 20 기준을 이용하여 이번 연구의 대상체 집단에서 저 CRP 수준을 조정하였다. 변경된 ACR 20 기준은 1) 압통성 관절수 및 부종성 관절수에 있어 20% 초과 개선 및 2) 나머지 4개의 핵심 데이터 세트 측정 (전체 동통, 치료자, 대상체, 기능 평가) 중 2개에서 20% 초과 개선으로 정의하였다. 통상적으로 표준 ACR 핵심 데이터 세트 중 일부인 CRP는 에타네르셉트와 같은 TNF 차단제를 사용하는 대상체에서는 CRP의 수준이 저하되기 때문에 변경된 ACR 기준에 포함되지 않았다. 표준 ACR 기준 및 2가지의 변형된 기준 (SF-36 신체 건강 및 SF-36 정신 건강)을 또한 제2 종점으로 평가하였다.

<422> **통계 방법**

<423> CTLA4Ig 2 mg/kg를 에타네르셉트와 병용하여 치료하는 1군의 환자를 플라시보 + 에타네르셉트로 치료하는 대조군과 비교하였다. 유사한 환자 집단에서 에타네르셉트로 수행한 예비 연구를 기준으로 6개월째의 변경된 ACR 20 반응률 (변경된 평가 기준)은 대조군의 35%인 것으로 가정하였다. 이는 에타네르셉트 요법에 대해 적당히 반응하지 않는 대상체에서의 예상 반응률이다. 2:1 랜덤화를 이용하여, 141명 (10% 중단 가능성에 대해 조정됨)의 대상체 샘플 (47 대조군/94 CTLA4Ig)은 90% 검정력으로 5% 유의 수준에서 30% 차이를 검출하였다 (연속성 수정으로 조절하지 않은 카이 제곱 검정을 기준으로 한 양방향 검정).

<424> 유사하게는, 샘플을 측정하여 91% 및 83%의 검정력으로 ACR 50 및 70에서 각각 30% 및 25%의 차이를 검출하였다. 그러나, 느린 등록으로 인해 단지 122명의 대상체를 랜덤화하고 121명을 치료하고 분석하였다 (1명의 대상체는 랜덤화하였으나 치료를 한번도 받지 않음).

<425> **통계 및 기저수준 지표**

표 11

제180일의 대상체 배치

	CTLA4Ig + 에타네르셉트	플라시보 + 에타네르셉트	전체
랜덤화*	85	36	121
완료	68 (80%)	22 (61%)	90 (74%)
중단	17 (20%)	14 (39%)	31 (26%)
부작용	6 (7.0%)	1 (2.7%)	7 (6%)
효능 없음	6 (7.0%)	12 (33%)	18 (15%)
기타	5 (5.8%)	1 (2.7%)	6 (5%)

* 치료받지 않은 1명의 대상체는 제외함

<426>

<427> 6개월 후, 전체 중단 비율은 CTLA4Ig + 에타네르셉트 군 (20%)에 비해 플라시보 + 에타네르셉트 처리군에서 더 높았다 (39%). 이러한 차이는 플라시보 + 에타네르셉트 군에서 효능이 없음으로 인해 더 높은 중단율이 발생하였다 (표 11).

<428> 통계 지표는 처리군 사이에서 유사하였다. 대부분의 대상체는 여성이며 카프카스인이었다. 질환의 평균 지속 기간은 13년이고, 평균 연령은 52세였다 (표 12).

표 12

평균 기저 수준 통계적 지표 및 임상적 지표

	CTLA4Ig + 에타네르셉트 N = 85	플라시보 + 에타네르셉트 N = 36	전체 N = 121
평균 연령:년(범위)	50 (24 - 74)	55 (28 - 72)	52 (24 - 74)
평균 체중: kg (범위)	81 (45 - 154)	79 (46 - 126)	81(45 - 154)
성별:여성 : n (%)	66 (78%)	26 (72%)	92 (76%)
인종:백인 - n (%)	80 (94%)	36 (100%)	116 (96%)
질환의 평균 지속기간 : 년 ± sd	13.0 ± 10.1	12.8 ± 8.6	13.0 ± 9.7
압통성 관절 (68 중에서) - 평균 ± sd	28.7±14.0	29.5±13.7	28.9± 13.8
부종성 관절 - (66 중에서) - 평균 ± sd	19.6±9.4	20.3±11.0	19.8 ± 9.9

<429>

<430>

기저수준 임상 지표는 29명의 압통성 관절 및 20명의 부종성 관절의 평균을 포함하여 처리군 사이에서 유사하였다. 저하된 CRP 수준을 예외로 하고, 기저수준 지표는 활성 류마티스성 관절염에 걸린 대상체의 전형이며, 임상 연구에 기입하였다 (표 12)

<431>

ACR 반응 및 핵심 요인

<432>

CTLA4Ig + 에타네르셉트 군에서 ACR 20 및 ACR 70 반응의 개선은 CTLA4Ig + 플라시보 군에 비해 통계적으로 유의하였다 (표 13 및 도 63).

표 13

제180일의변경된 ACR 반응 - 대상체 수 (%)*

	ACR 20	ACR 50	ACR 70
CTLA4Ig +에타네르셉트***	48.2%	25.9%	10.6%
플라시보+ 에타네르셉트와의 차이	20.5%	6.4%	10.6%
95% CI	(1.2, 39.7)	(-10.2, 23.1)	(0.4, 20.8)
p-값	0.037**	0.448	0.042**

* 평가 기준 참조

** p<0.05(CTLA4Ig+ 에타네르셉트 대 플라시보+ 에타네르셉트에 있어서 ACR 반응에 대한 확률)

*** CTLA4Ig+ 에타네르셉트:및 플라시보 + 에타네르셉트 각각에 대한 N=85 및 N=36

<433>

<434>

치료 2개월째에 이르러, CTLA4Ig + 에타네르셉트 군에서 ACR 기준의 모든 요인에 대해 수치적으로 더 높은 반응이 관찰되었다. 7개의 ACR 요인 중 3개를 도 64A 내지 64C에 나타냈다.

<435>

제180일 ACR 기준의 개별 요인에서의 평균 개선이 플라시보 + 에타네르셉트 군과 비교하여 CTLA4Ig + 에타네르셉트 처리군에서 일관적으로 보다 우수하였다 (표 14).

표 14

<436>

제180일째 개별 ACR 요인의 평균 (SE) 개선률 (%)		
ACR 요인	CTLA4Ig + 에타네르셉트 N=85	플라시보 + 에타네르셉트 N=36
압통성 관절	42% (5.5)	24% (8.3)
부종성 관절	37% (5.0)	21% (8.1)
동통	34% (4.3)	-1% (10.8)
신체 기능 (MHAQ)	31% (5.2)	-5% (13.8)
대상체 전체 평가	27% (5.4)	3% (9.5)
치료자 전체 평가	43% (4.3)	27% (5.8)

<437>

삶의 질

<438>

기저수준과 비교하여, CTLA4Ig + 에타네르셉트 군의 대상체는 제180일째 플라시보 + 에타네르셉트 군의 대상체에서는 단지 하나 (신체 기능)에서만 개선된 것에 비해 SF-36의 모든 8개의 하위척도에서 통계적으로 유의한 개선을 입증하였다. HRQOL 하위척도에서의 절대적인 변화는 임상적으로 의미있는 것으로 고려되었다.

<439> 플라시보 + 에타네르셉트 군과 비교하여, CTLA4Ig + 에타네르셉트 군의 대상체가 SF-36의 4개의 하위척도 (신체적 역할, 통증, 활력 및 사회적 기능)에서의 통계적으로 유의하게 보다 우수한 개선을 경험하였다 (도 65). 또한, 다른 4개의 하위척도에서의 개선은 통계적으로 유의하지 않지만, 플라시보 + 에타네르셉트 군보다는 우수하였다.

<440> **안전성**

<441> 이 연구의 최초 6개월 동안 사망 또는 기회 감염이 전혀 발생하지 않았다. 가장 빈번하게 보고되는 부작용 중 두통, 상부 호흡기 감염, 근육통/골격통, 오심/구토, 고혈압 및 설사가 플라시보 + 에타네르셉트 군에 비해 CTLA4Ig + 에타네르셉트 군에서 보다 빈번하게 발생하였다. 골 이상증 및 발진도 또한 CTLA4Ig + 에타네르셉트 군에서 다소 높았다.

<442> CTLA4Ig + 에타네르셉트 군에서 보다 많은 대상체 (7.1%)가 에타네르셉트 + 플라시보 군 (2.8%)보다 중증 부작용 (SAE)을 경험하였다. 그러나, 어떠한 SAE도 연구 약물과 관련된 것으로 고려되지 않았다.

<443> CTLA4Ig와 에타네르셉트를 투여한 2명의 대상체에서 피부과 암이 발생하였다. 한명의 대상체는 기저 세포 암종을 가지고 있었으며, 이를 제150일째 방문 이후에 절단하였다. 다른 한명은 이미 존재하던 병변인 편평 세포 암종을 가지고 있었으며, 이 대상체는 이를 제120일의 방문 이후에 제거하기로 결정하였다. 또다른 대상체는 조사자에 의해 아지트로마이신에 대한 약물 반응인 것으로 여겨지는 혈관부종을 경험하였다.

<444> 중단을 야기하는 모든 부작용 (AE)은 경증 또는 중등증 강도였다. 떨림으로 인한 CTLA4Ig + 에타네르셉트 군에서의 한 중단은 중증의 부작용으로 고려되었다.

<445> **면역원성**

<446> CTLA4Ig를 투여한 어떠한 대상체도 CTLA4Ig 또는 CTLA4-T 특이적 항체에 대해 혈청변환되지 않았다. CTLA4Ig 또는 CTLA4-T 특이적 항체에 대한 GMT에서의 어떠한 유의한 변화도 관찰되지 않았다.

<447> **CTLA4Ig/에타네르셉트 및 CTLA4Ig/메토틀렉세이트 ACR 반응 사이의 비교**

표 15

<448>

CTLA4Ig + 에타네르셉트 대 CTLA4Ig + 메토틀렉세이트 ACR 반응 (개선%)					
	CTLA4Ig + 에타네르셉트 ^a (IM101-101)		CTLA4Ig + 메토틀렉세이트 ^b (IM101-100)		
	2 mg/kg N = 85	0 mg/kg ^c N = 36	10 mg/kg N = 115	2 mg/kg N = 105	0 mg/kg ^c N = 119
ACR 20	4.2% ^d	27.8%	60.0% ^d	41.9%	35.3%
ACR 50	29.3%	19.4%	36.5% ^d	22.9% ^d	11.8%
ACR 70	10.6% ^d	0%	16.5% ^d	10.5% ^d	1.7%

^a 변형된 ACR. 평가를 위한 기준 참조.
^b 표준 ACR 기준
^c 플라시보 + 백그라운드 요법 (에타네르셉트 또는 메토틀렉세이트)
^d ACR 반응 대 플라시보 + 백그라운드 요법 차이에 대해 p < 0.05

<449> 2 mg/kg의 CTLA4Ig + 에타네르셉트의 효능은 동일한 투여량의 CTLA4Ig + 메토틀렉세이트 요법 (실시예 5)을 투여한 대상체에서 관찰된 것과 유사하였다. 그러나, 메토틀렉세이트 시험 (실시예 5)에서의 평가를 위한 기준은 중심 요인 중 CRP를 포함하는 표준 ACR인 반면, 에타네르셉트 시험 (실시예 6)에서의 평가를 위한 기준은 CRP를 제외한 변형된 ACR이었다.

<450> **결론**

<451> 6개월의 연구의 예비 평가에서 에타네르셉트를 단독으로 사용한 경우와 비교하여, CTLA4Ig (2 mg/kg)를 에타네르셉트와 병용하는 경우에 류마티스성 관절염의 징후 및 증상이 감소된다는 것을 밝혔다. 변형된 ACR 20 및

ACR 70 분석에서의 증가가 통계적으로 유의하였다. CTLA4Ig + 에타네르셉트 요법의 효능은 치료의 개시 1개월 내에 관찰되었다. 일반적으로, CTLA4Ig를 에타네르셉트와 병용하여 투여하는 경우, 단독 에타네르셉트 요법과 유사한 안전성 프로파일로서 안전하고, 내성이 우수하다. CTLA4Ig는 6개월의 시험 기간 동안 면역원성이 아니었다. 또한, 에타네르셉트와 병용된 CTLA4Ig 요법 (실시예 6)의 효능은 동일한 투여량의 메토티렉세이트와 병용된 CTLA4Ig (실시예 5)와 유사하였다.

<452>

실시예 7

<453>

메토티렉세이트를 투여하면서 활성 류마티스성 관절염을 앓고 있는 대상체에게 정맥내 투여된 2개의 상이한 투여량의 BMS-188667의 안전성 및 임상 효능을 평가하기 위한 IIB기 다중심 (Multicenter) 랜덤화 이중-맹검 플라시보-대조 연구의 1년 결과

<454>

하기 실시예는 활성 류마티스성 관절염 (RA)를 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 메토티렉세이트와 병용 투여된 2개의 상이한 투여량의 CTLA4Ig의 안전성 및 임상 효능을 평가하기 위한 IIB기 다중심 랜덤화 이중-맹검 플라시보-대조 임상 연구의 1년 결과를 제공한다. 이 실시예에 나타난 연구는 실시예 5에 나타난 6개월의 연구의 연속이다.

<455>

상기 실시예 3 및 RA의 치료에서의 MTX에 대한 기타 요법을 추가하는 표준 실시의 예비 효능 결과를 기초로 하여, 이 연구는 MTX와 병용된 CTLA4Ig (BMS-188667)가 MTX 치료에도 불구하고 여전히 활성 질환을 앓고 있는 RA 대상체에서 MTX + 플라시보로의 치료와 비교하여 보다 우수한 임상 효능을 가질 것이라는 가설을 시험하기 위해 고안되었다.

<456>

이 임상 연구 보고서에 제시된 결과는 모든 대상체가 6개월의 치료를 완료한 다음, 다시 모든 대상체가 12개월의 치료를 완료한 이후에 수행된 분석으로부터의 데이터를 기초로 하였다.

<457>

이 실시예에서는, 10 mg/kg CTLA4Ig + MTX 군을 10 mg/kg 처리군으로 언급하고, 2 mg/kg CTLA4Ig + MTX 군을 2 mg/kg 군으로 언급하고, CTLA4Ig (BMS-188667) 플라시보 + MTX 군을 플라시보 군으로 언급하였다.

<458>

연구 방법

<459>

이 연구는 활성 RA를 앓고 있는 대상체에서 6개월 및 12개월 간격으로 ACR로 평가하여 메토티렉세이트 (MTX)와 병용되는 2개의 상이한 투여량 (10 및 2 mg/kg)의 CTLA4Ig (BMS-188667) 또는 MTX + 플라시보의 임상 효능을 비교하였다. 이 연구는 MTX에 대해 부적절한 반응을 가지고 있었던 활성 RA를 앓고 있는 성인 대상체를 등록하였다.

<460>

정맥내로 1) 체중 kg 당 2 mg의 투여량의 CTLA4Ig + 메토티렉세이트, 2) 체중 kg 당 10 mg의 투여량의 CTLA4Ig + 메토티렉세이트, 또는 3) 플라시보 + 메토티렉세이트 (이하 플라시보로서 공지함)를 투여한 활성 류마티스성 관절염을 앓고 있는 대상체를 1년간 모니터링한 이후의 결과를 본원에 나타내었다.

<461>

MTX로의 치료에도 불구하고 활성 RA를 앓고 있으며 이 연구를 위한 포함/배제 기준을 충족하는 대상체를 MTX 요법의 백그라운드 상에 하기 치료 중 하나를 수여받도록 1:1:1로 랜덤화하였다: CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg, CTLA4Ig (BMS-188667) 2 mg/kg, 또는 플라시보. 대상체는 제1일 이전에 28일 동안의 안정된 투여량으로 6개월 이상 MTX (주간 10 mg 내지 30 mg)로 치료받고 있어야 한다.

<462>

처리군: 대상체는 하기 3가지 처리군 중 하나로 1:1:1 랜덤화시켰다.

<463>

1) 군 1: CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg의 정맥내 주입

<464>

2) 군 2: CTLA4Ig (BMS-188667) 2 mg/kg의 정맥내 주입

<465>

3) 군 3: CTLA4Ig (BMS-188667) 플라시보의 정맥내 주입

<466>

주입 투여량은 제1일 방문 바로 직전의 치료 전 방문으로부터의 대상체 체중에 기초한다 (MTX 단일요법에 대한 대상체에 대해서는, 체중은 스크리닝 방문에서 수득하며, MTX 병용 요법 [기타 DMARD와의 병용]에 대한 대상체에 대해서는, 체중은 제-2일 장세적 방문으로부터 수득함). 주입 투여량은 제1일 내지 제360일 동안 변경하지 않았다.

<467>

주입은 이 연구 동안 대략 하루 중 동일한 시간에 수행하였다. 연구 의약의 모든 투여량은 대략 30 분에 걸쳐 일정한 속도로 75 mL의 고정된 부피로 투여하였다. 각각의 주입의 말기에 정맥주사 백 및 라인을 물 (D5W) 중 텍스트로스 5% 용액 25 mL로 플러싱시켰다. 모든 정맥내 주입은 앉은 자세에서 대상체에게 투여하였다. 대상

체를 각각의 주입 시작으로부터 (투여 전, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 분) 주입 시작 이후 최소 2 시간 동안 부작용 (Aes) 및 활력 징후 (혈압, 심장박동수, 체온)에서의 변화를 관찰하였다. 관찰 기간은 임상적으로 징조를 나타내는 경우 연장될 수 있었다.

- <468> 이 연구의 1차 단계 동안 (제1일 내지 제180일), 선택된 의약품들을 동시 투여하였다. 예정된 의약품은 하기를 포함한다.
- <469> • MTX: 현투여량을 계속 사용 (증가시키지 않으며, 단지 독성에 대해서만 감소시킴).
- <470> • 전신 (비-국소적) 코르티코스테로이드: 투여량이 안정하고, 총 투여량이 프레드니손 10 mg/일의 해당하는 양 이하가 되도록 제공. 관절내 주사는 피하지만, 필요한 경우 2회 이하의 관절내 주사는 허락하였음. 주의: 관절내 주사를 받은 관절은 모든 후속적인 평가/산정에서 "활성"으로서 계수하였음.
- <471> • ASA를 비롯한 NSAID: 안정량 투여량을 제공.
- <472> • 아세트아미노펜, 아세트아미노펜 및 마약성 진통제를 포함하는 병용 의약품 (즉, 코데인 포스페이트와의 아세트아미노펜, 프로폭시펜 납실레이트와의 아세트아미노펜, 옥시코돈 염산염과의 아세트아미노펜, 옥시코돈 비타르테이트와의 아세트아미노펜 등) 또는 트라마돌: 기저수준 또는 연구 의약품에 의해 적절하게 제어되지 않는 통증을 겪는 대상체에 대한 것임 (관절 평가 12 시간 이전에 대해서는 제외).
- <473> 표 16은 연구 절차 및 평가의 스케줄이다.

표 16

연구 절차 및 평가 스케줄

치료 기간	치료전 (일)	치료 일수 44,5															
		(-2)	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	
방문일	스크리닝 (-28 내지 -2)																
스크리닝 평가																	
사전 동의	X																
종합 병력 및 신체 검사	X																X ¹
CXR	X ⁴																
ECG	X ⁴																X
안정화/취하 의약품 금지 (필요한 경우) ⁶	X																
대상체 등록	X	X ²⁰															
대상체 랜덤화 ⁴		X															
투여 ⁵		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
중간 평가																	
조조 경직의 지속시간	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X			X
중간 병력 및 신체검사		X	X	X	X	X	X	X	X			X		X			
압동성 관절수	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X			X
부종성 관절수	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X			X
대상체의 통증 평가	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X			X
대상체의 질판 활성도의 전체 평가	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X			X
치료자의 질판 활성도의 전체 평가	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X			X
대상체의 신체 기능의 평가	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X			X
단형-36개 건강상태 설문지 (SF-36)	X	X					X			X							X
요법에 대한 대상체 반응							X			X							X
안전성 평가																	
부작용 모니터링			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X ⁰
체중 ⁸	X	X															X
유방조영상 (여성에 한함)	X																X
활력 징후	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
혈																	
CBC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

<474>

치료 기간	치료전 (일)	치료 일수 ^{a,b}															
		(-2)	1	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	
방문일	스크리닝 (-28 내지 -2)																
화학 판넬	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
요검사	X															X	
소변/혈청 임신 시험 ^d	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
B형 간염 표면 항원	X																
C형 간염 항체	X																
약역학 (PD)																	
류마티스 요인	X	X							X							X	
CRP	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
IL-2R		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X	X	
예시적인 사이토킨 (ICAM-1 e-셀렉틴, IL-6 및 TNF α)		X				X			X							X	
약동학		X			X	X			X								
면역글로불린 측정																	
정량적 면역글로불린 (IgG, IgA, IgM)		X							X							X	
면역원성																	
항-BMS-188667Ab 시험		X	X		X				X			X				X	
방사선 평가 ^m																	
X-선 (손/손목 및 발)		X							X							X	

- <475>
- <476> ^a 흉부 X-선 및 ECG는 6개월 이내에 수행하지 않았거나 기록되지 않은 경우 수행하였다.
- <477> ^b 대상체가 메토타렉세이트 요법의 최고점에서 DMARD로 치료받았으나, 초기 도입 기준을 충족하지 못한 경우, DMARD는 제1일 이전에 28일 이상 장세척하여야 하였다.
- <478> ^c 대상체가 MTX 요법을 받고 있는 경우에서만 이 방문이 필요하였다.
- <479> ^d 소변 또는 혈청 임신 시험을 아이를 임신한 가능성이 있는 모든 여성에 대하여 투여된 48 시간 이내에 수행하였다. 혈청 임신 시험은 국소적으로 처리하였다.
- <480> ^e 중단된 대상체는 "조기 종료" 방문을 해야만 하였다. 이 방문에서의 평가는 제360일에 수행된 평가와 동일하였다. 이 방문에 대한 평가는 중단 일에 대한 스케줄될 수 있는 평가와 대체되었다. 현재 DMARD, 스테로이드 또는 NSAID 요법에서의 변화는 이들 평가가 수행된 이후까지는 허가되지 않았다. 대상체는 캡처 안전 데이터 (부작용)에 대해 중단 이후 제30일 동안 접촉하였다.
- <481> ^f 모든 수행은 각각의 대상체에 대해 평가를 완료하는 동일한 평가자를 보증하여야 한다.
- <482> ^g 연구 약물 투여량을 계산하는데 가장 최근의 체중을 사용하여야 한다. 이 연구 동안 투여된 모든 투여량은 이 체중을 기초로 하였다.
- <483> ^h 제5일에 대해서는 +/-3 일 방문 창을 허가하였다. 이후의 방문에 대해서는 +/-7 일 방문 창을 허가하였다.
- <484> ⁱ * 종합 신체검사만 수행하였다.
- <485> ^j 모든 평가는 달리 지시하지 않는 한, 연구 약물 투여 이전에 수행되거나 투여하여야 한다.
- <486> ^k 모든 평가의 결과는 랜덤화를 위한 중앙 랜덤화 시스템(Central Randomization System)과 접촉하기 이전에 적격한 필수요건에 대해 검토되어야 한다.
- <487> ^l 유방조영술 이론적근거를 위한 프로토콜 섹션 2.1,4.3을 참조한다. 6개월 이전에 수행되지 않은 경우, 문서는 사전 동의 이전에 기록되어야 한다. 제1일 이후에 이 연구로부터 중단된 대상체는 스크리닝 기간 동안 수행되는 1주년의 유방조영술에 대한 사후-점검 유방조영상을 필요로한다.
- <488> ^m 대상체의 체중을 중앙 랜덤화 시스템에 제공하였다.
- <489> ⁿ 방사능 평가는 치료의 최초 9개월 내에 중단된 대상체에 대한 종료 방문에서는 필요하지 않았다.
- <490> ^o 조기 종료된 대상체는 부작용을 가졌으며, 연구 의약의 최종 투여 이후 제30일 및 제60일에 부대적인 의약이

기록되었다.

<491> 효능 평가

<492> 임상 측정 및 반응

<493> 임상 반응은 미국 류마티스 학회 (ACR) 핵심 데이터 세트 및 반응 정의를 사용하여 평가하였다. 이 평가를 위해, 데이터는 하기 7가지 요인에 대해 수집하였다: 1) 압통성 관절수 (표준화된 68개 관절수); 2) 부종성 관절수 (표준화된 66개 관절수); 3) 동통의 대상체 전체 평가; 4) 질환 활성도의 대상체 전체 평가; 5) 질환 활성도의 치료자 전체 평가; 6) 신체 기능 (MHAQ)의 대상체 평가; 및 7) 급성 단계 반응물질 값 CRP.

<494> 반응의 ACR 20, ACR 50 및 ACR 70 정의는 압통성 관절 및 부종성 관절 (요인 1 및 2)에서의 기저수준에 비해 각각 20%, 50% 및 70% 개선 및 나머지 5개의 핵심 데이터 세트 측정 (요인 3 내지 7) 중 3개에서 각각 20%, 50% 및 70% 개선에 해당한다. 주요 임상 반응은 연속 6개월에 걸쳐 ACR 70 반응의 유지로서 정의한다. 각각의 요인에 대한 데이터를 수집한 시험일에 대한 표 16을 참조한다.

<495> 1차 효능 분석을 6개월 (제180일)에서의 2개의 CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군 및 플라시보 군 사이의 ACR 20 반응에서의 차이에 대해 시험하였다. 순차적인 시험 절차를 수행하였다. 첫번째로, 카이-스퀘어 시험을 사용하여 10 mg/kg CTLA4Ig 군에 대한 데이터와 플라시보 군에 대한 데이터를 0.05 수준의 유의성으로 비교하였다. 이것이 유의한 경우, 2 mg/kg CTLA4Ig 군에 대한 데이터를 플라시보 군과 0.05 수준으로 비교하였다. 이 시험 절차를 전체 알파 수준을 5%로 보존하였다. 유사한 분석을 6개월에서 ACR 50 및 ACR 70 반응에 대해 수행하였다. 각각의 CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군 및 플라시보 군 사이의 ACR 20, ACR 50 및 ACR 70 반응 차이를 점추정 및 95% 신뢰 구간을 사용하여 요약하였다. 효능의 부족 (즉, RA 악화)으로 인하여 연구를 중단한 대상체는 모든 이후의 시점에서 ACR 무-반응자로 간주하였다. 다른 이유로 중단한 모든 대상체에 대해서는, 이들의 최종 ACR 반응을 이후에도 수행하였다.

<496> 제360일에서의 ACR 20, ACR 50 및 ACR 70 반응률을 각각의 CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군 및 플라시보 사이에서 두네트(Dunnett)-조정된 0.027 (양측) 수준의 유의성으로 비교하였다.

<497> 각각의 시점에서 ACR 20 반응을 달성한 반응자의 일부를 또한 시간에 대해 플로팅하고, 코크란 맨텔-헨첼 (Cochran Mantel-Haenszel) 시험 (문헌 [W. G. Cochran, 1954, Some Methods of Strengthening the Common Chi-Square Test, Biometrics 10: 417-451; N. Mantel and W. Haenszel, 1959, Biostatistical Aspects of the Analysis of Data from Retrospective Studies of Disease, J Nat Cancer Inst, 22: 719-748] 참조)을 사용하여 각각의 CTLA4Ig (BMS-188667) 군 대 플라시보 군에서의 ACR 20 반응을 달성한 대상체의 빈도를 비교하였다.

<498> 제15일, 제30일, 제60일, 제90일, 제120일, 제150일, 제180일, 제240일, 제300일 및 제360일에서의 ACR 20, ACR 50 및 ACR 70 반응을 또한 2개의 CTLA4Ig (BMS-188667) 군 및 플라시보 군에 대해 나타내었다. CTLA4Ig (BMS-188667) 군 및 플라시보 군 사이의 ACR 반응 차이를 95% 신뢰 구간을 사용하여 요약하였다. 시간에 대해 플로팅한 ACR 데이터를 사용하여 작용의 개시를 평가하고, 최대 반응까지의 시간을 결정하였다.

<499> 주요 임상 반응을 연속 6개월의 기간에 걸친 ACR 70 반응의 유지로서 정의하였다. 12개월의 분석에서, 3개의 군 중 주요 임상 반응을 달성한 대상체의 일부를 요약하였다.

<500> 계획한 분석의 일체성을 평가하기 위해, 연구 의약을 투여하고, 임의의 이유를 위해 연구를 중단한 모든 대상체를 중단 이후의 모든 스케줄된 연구 방문에서 ACR 비-반응자로서 간주하였다.

<501> 누적 지수, ACR-N을 각각의 사후-점검 평가에서 평가하고, AUC를 6개월 이하 및 12개월 이하 동안 평가하였다. 사다리꼴 법칙을 사용하여 AUC를 산정하였다. ACR-N AUC를 6 및 12개월의 데이터에 대한 변량 분석 (ANOVA)을 사용하여 2개의 CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군 및 플라시보 군 사이에서 비교하였다. 이로써 이 연구를 통해 대상체 반응을 평가하였다. 이들 분석은 LOCF 데이터 세트에 대하여 수행하였다.

<502> ACR-N AUC 데이터의 정상도에 관련한 분포 가정을 10% 수준의 유의성으로 ANOVA 모델로부터 표준화시킨 오차에 대해 샤피로-윌크스(Shapiro-Wilks) 시험을 사용하여 체크하였다.

<503> 또한 대리 바이오마커를 사용하여 CTLA4Ig + MTX 또는 플라시보 + MTX 치료 섭생법의 효능을 평가하였다. RA에서의 면역제어 또는 염증에 대한 잠재적인 바이오마커는 CRP, 가용성 IL-2r, RF, 가용성 ICAM-1, E-셀렉틴, 혈청 IL-6 및 TNF α를 포함한다. 이들 파라미터를 처리군에 의해 제180일 및 제360일에서의 빈도 및 기저수준으로

부터의 평균 변화를 사용하여 요약하였다.

<504> 부작용 (AE)은 인과성과 상관없이 연구의 과정 동안 조사자에 의해 인지된 임의의 새로운 또는 악화된 질병, 경 고 증상 또는 임상적으로 유의한 실험실 시험 비정상으로서 정의하였다. 중증 부작용 (SAE)은 다음의 기준 중 어느 하나를 충족시키는 AE로서 정의하였다: 치명적임; 생명을 위협함; 입원의 원인이 되거나 이를 연장시킴; 저항적이거나 유의한 장애 또는 무능의 원인이 됨; 암; 과다투여로 인한, 또는 약물 의존성 또는 약물 남용의 발전으로 인한 선천성 이상/선천성 결손 또는 중요한 의약 증상.

<505> 활력 징후 측정치는 연구 약물을 투여하는 동안 및 그 이후의 스크리닝 및 각각의 연구 방문에서 취득하였다. 활력 징후 측정치 (안정된 혈압, 심장박동수 및 체온)를 평균을 사용하여 처리군에 의해 요약하였다.

<506> 2개의 CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군 (10 및 2 mg/kg)을 플라시보 군과 비교하였다. 1차 분석은 10 mg/kg 및 플라시보 군에 대한 6-개월의 ACR 반응률의 비교였으며, 이것이 유의한 경우, 이어서 2 mg/kg과 플라시보를 비교하였다. 샘플 크기는 5% 수준 (양측)의 유의성을 기준으로 하였다. 6개월에서의 플라시보 군에 대한 ACR 20 반응률을 약 25%가 되도록 평가하였다 (문헌 [Weinblatt M, Kremer JM, Bankhurst AD et.al. A trial of etanercept, a recombinant TNF: Tc fusion Protein in patients with RA receiving methotrexate. NEJM 1999; 340: 253-259] 참조). 처리군 당 107명의 대상체의 샘플 (적절한 15%의 중단율을 위해 조절하였음)을 결정하여 5% 수준 (양측)으로 25%의 차이를 검출하는 94%의 검정력을 취득하였다. 표 17는 6개월에서 ACR 20, ACR 50 및 ACR 70 반응에서의 구체적인 치료 차이에 관련된 검정력을 요약하였다.

표 17

<507>

군 당 107 ^a 명의 대상체를 이용한 반응률 및 검정력			
반응	대조율(%)	치료 차이	검정력 (%)
ACR 20	25	25	94
ACR 50	5	20	95
ACR 70	0	14	90

^a 샘플 크기를 적절한 15%의 중단율을 위해 조정하였으며; 실제 샘플 크기는 91이었다.

<508>

<509> 10 mg/kg CTLA4Ig와 플라시보의 1차 비교가 유의한 경우, 이어서 2 mg/kg CTLA4Ig와 플라시보의 비교에 대해 시험의 검정력은 6개월에서의 ACR 20, ACR 50 및 ACR 70 반응을 포함한 비교에 대해 각각 0.88, 0.90 및 0.81 이 상이었다 (문헌 [Koch DD, Gansky SA. Statistical considerations for multiplicity in confirmatory protocols. Drug Info Journal 1996; 30: 523-534] 참조).

통계학적 분석

연구 집단

대상체 배치

<513> 본 연구에 등록된 524명의 대상체 중에서 339명의 대상체를, 10 mg/kg 처리군 115명, 2 mg/kg 처리군 105명 및 플라시보 대조군 119명으로 랜덤화하였다 (도 68). 랜덤화되지 못하는 가장 흔한 원인은 내삽법 및/또는 외삽법 기준을 만족시키지 못하기 때문이다.

제1 단계 (제1일 내지 제180일)

<515> 총 256명의 대상체 (상기 랜덤화된 대상체의 75.5%)가 연구의 제1 단계를 완수하였으며, 이 기간 동안 대상체 83명의 연구가 중단되었다 (표 18). 전반적으로, 중단된 대상체의 수준은 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군보다 플라시보 대조군이 2배 넘게 더 높았다. 효능 부재에 의한 중단 및 AE에 의한 중단도 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군보다 플라시보 대조군이 2배 넘게 더 높았다.

표 18

<516>

중단 원인: 제1 단계 (제1일 내지 제180일)			
	CTLA4Ig (BMS 188667)		

	10 mg/kg	2 mg/kg	플라시보	총
처리, n	115	105	119	339
중단, n(%)	17 (14.8)	25 (23.8)	41 (34.5)	83 (24.5)
부작용	3 (2.6)	7 (6.7)	9 (7.6)	19 (5.6)
효능 부재	12 (10.4)	16 (15.2)	28 (23.5)	56 (16.5)
투여 중단 완료	2 (1.7)	2 (1.9)	4 (3.4)	8 (2.4)
180일간의 치료 완료, n(%)	98 (85.2)	80 (76.2)	78 (65.5)	256 (75.5)

<517> 중단 누적 (제1일 내지 제360일)

<518> 총 235명의 대상체 (상기 랜덤화한 대상체의 69.3%)가 연구의 두 단계를 모두 완수하였으며, 제360일에 대상체 104명의 연구가 중단되었다 (표 19). 또한, 제1 단계에서 언급된 중단에서 동일한 일반적인 패턴 (CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에 비해 플라시보 대조군에서의 발병률이 2배 더 높음)이 전반적으로 관찰되었다 (제1일 내지 제360일). 이는 전반적인 중단율, 효능 부재에 의한 중단 및 AE에 의한 중단을 포함한다.

표 19

<519> 중단에 대한 원인: 제1 및 제2 단계 모두 (제1일 내지 제360일)

	CTLA4Ig (BMS-188667)			총
	10 mg/kg	2 mg/kg	플라시보	
처리한 수, n	115	105	119	339
중단한 수, n(%)	25 (21.7)	31 (29.5)	48 (40.3)	104 (30.7)
부작용	5 (4.3) ^b	9 (8.6)	11 (9.2)	25 (7.4)
사망	0	1 (1.0)	0	1 (0.3)
후처리 손실	1 (0.9)	2 (1.9)	0	3 (0.9)
기타 ^a	1 (0.9)	0	1 (0.8)	2 (0.6)
효능 부재	13 (11.3)	17 (16.2)	30 (25.2)	60 (17.7)
투여 중단 완료	5 (4.3)	2 (1.9)	6 (5.0)	13 (3.8)
360일간의 치료 완료, n(%)	90 (78.3)	74 (70.5)	71 (59.7)	235 (69.3)
^a 중단에 대한 기타 원인은 순응성과 관련되어 있다.				
^b CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서 대상체 IM101100-32-5가 연구 중단을 초래하는 것으로 기록된 AE로 보고되었으나, 이 대상체는 상기 표에 포함되지 않았다.				

<520> 최초 12개월 동안 임의의 원인으로 인해 중단된 대상체의 누적률의 카플란-마이어 플롯을 도 69에 도시하고; 효능 부재에 의해 중단된 대상체의 누적률도 도 70에 도시하였다. 두 개의 그래프 모두에서, 치료한지 대략 30일 후에 플라시보 대조군에서의 중단율이 CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군 둘 모두에 비해 일반적으로 더 높았음을 유의한다. 부가적으로, 치료한지 대략 150일 후에 CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군에 대한 중단율이 10 mg/kg 처리군에 대한 중단율보다 높았다.

<521> 인구 통계 및 대상체 특성

<522> 전반적으로, 기저수준의 인구 통계 특성 및 기저수준의 임상 RA 특성은 일반적으로 상기 3개의 처리군에 모두에서 유사하였으며, 임상 시행 중에 나타나는 상대적으로 진전된 RA가 통상적이다 (표 20 및 표 21). 대부분의 대상체는, RA의 평균 지속기간이 대략 9 내지 10 년이며 상대적으로 많은 수의 활성 관절 (대략 29개의 압통성 관절 및 21개의 부종성 관절) 및 대략 59-65 mm (100 mm 스케일)의 가시적으로 유사한 스코어 (VAS)를 갖는, 대략 55세 연령의 백인 여성이다.

표 20

기저수준의 인구 통계 지표			
	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg	2 mg/kg	플라시보

랜덤화수	115		105119
연령 (세)			
평균±SD(범위)	55.8±12.5(17,83)	54.4±11.3(28,80)	54.7±12.0(23,80)
체중 (kg)			
평균±SD(범위)	77.8±18.6 (40.1,144.0)	78.7±21.4 (48.4,186.8)	79.9±17.6 (44.0,140.0)
성별			
남성, n(%)	29 (25)	39 (37)	40 (34)
여성, n(%)	86 (75)	66 (63)	79 (66)
인종			
백인, n(%)	100 (87)	91 (87)	104 (87)
흑인, n(%)	6 (5)	0	3 (3)
기타, n(%)	9(8)	14 (13)	12 (10)
RA 지속기간 (년)			
평균±SD(범위)	n=114 ^a 9.7±9.8(0,38)	n=105 9.7±8.1(0,36)	n=117 ^a 8.9±8.3(0,41)

<524> 3명의 대상체에 대한 RA 지속기간은 보고되지 않았다.

<525> ACR 기준의 요인은 아니지만, 조조 경직의 지속기간도 평가하였으며, 그 결과 3개의 군 각각에서의 조조 경직의 지속기간은 거의 2시간이었다. 기저수준에서의 RF에 대한 양성 결과도 평가하였으며, 그 결과 CTLA4Ig(BMS-188667) 처리군에서 RF에 대해 양성으로 판정된 대상체의 백분율이 더 높게 나타났다 (플라시보 대조군의 경우에는 76%인데 비해 CTLA4Ig 10 mg/kg 및 2 mg/kg 처리군 둘 모두의 경우에는 86%임).

표 21

기저수준의 임상 류마티스성 관절염 지표

지표	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
암통성 관절, n	115	105	119
평균 ± SD	30.8 ± 12.2	28.2 ± 12.0	29.2 ± 13.0
범위	11.0, 66.0	3.0, 62.0	4.0, 68.0
부종성 관절, n	115	105	119
평균 ± SD	21.3 ± 8.4	20.2 ± 8.9	21.8 ± 8.8
범위	9.0, 54.0	4.0, 48.0	8.0, 64.0
동통 (VAS 100 mm), n	113	104	119
평균 ± SD	62.1 ± 21.4	64.3 ± 22.3	65.2 ± 22.1
범위	0.0, 99.0	8.0, 100.0	3.0, 95.0
신체 기능 (MHAQ 0-3), n	115	105	119
평균 ± SD	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.6
범위	0.0, 2.5	0.0, 2.5	0.0, 2.3
대상체 전체 평가 (VAS 100 mm), n	113	105	119
평균 ± SD	60.1 ± 20.7	59.4 ± 23.7	62.8 ± 21.6
범위	10.0, 100.0	8.0, 99.0	4.0, 94.0
MD 전체 평가 (VAS 100 mm), n	113	105	119
평균 ± SD	62.1 ± 14.8	61.0 ± 16.7	63.3 ± 15.5
범위	20.0, 98.0	8.0, 95.0	18.0, 93.0
CRP (mg/dL), n	112	99	115
평균 ± SD	2.9 ± 2.8	3.2 ± 2.5	3.2 ± 3.2
범위	0.2, 19.9	0.2, 10.8	0.2, 20.9
조조 경직 (분), n	115	103	119
평균 ± SD	97.9 ± 63.1	104.1 ± 63.9	106.0 ± 64.2
범위	0.0, 180.0	0.0, 180.0	0.0, 180.0
류마티스 인자 (IU/mL), n	99	90	90
양성%	86%	86%	76%

<526>

<527> 연구 약물을 한 가지 이상의 투여량을 투여하였으며 효능의 부재에 의해 연구가 중단된 대상체 전체 집단의 기저수준 통계 및 RA 특성은 일반적으로 전체 연구 집단과 유사하였으나, 10년이 넘는 기간 동안 RA로 진단받은 하위집단에서의 대상체의 비율 (45%)은 전체 연구 집단 (34%)에 비해 더 높았다.

<528> 병력 소견 및 사전 처방

<529> 본 연구에서 대상체에 대한 병력 소견은 상대적으로 진전된 RA를 수반하며, 일반적으로 치료군 모두에서 유사하였다. 가장 빈번하게 발생하는 소견 (대상체의 40%를 초과함)은 근골격 소견 (RA 징후를 포함하지 않음; 59.3%), 위장 소견 (45.1%) 및 비노생식기 소견 (42.2%)이다. 다른 중요한 병력 소견은 모든 치료군의 대상체 중 대략 39%에서의 심혈관 질환 및 모든 대상체 중 대략 29%에서의 내분비선/대사성 소견을 포함한다.

<530> 연구를 시작하기 전에 사용되는 MTX, 전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드, DMARD 및 생물학적 RA 의약의 양은 일반적으로 3개의 치료군에 모두에서 유사하였다 (표 22). 모든 대상체에게 MTX를 비롯한 류마티스 의약을 사전에 처치하여 연구에 적합하도록 하였다. 4명의 대상체의 경우에는 MTX로의 사전 처치가 기록되어 있지 않았다. 랜덤화 전에 사용하는 전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드의 양은 3개의 치료군 모두에서 유사하였으며, CTLA4Ig 2 mg/kg 치료군 및 플라시보 대조군에서 전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드를 투여한 대상체 (67 내지 68%)가 CTLA4Ig 10 mg/kg 치료군에서 투여한 대상체 (60.0%)에 비해 약간 더 많았다. 연구를 시작하기 전에 사용하는 다른 DMARD 및 생물학적 RA 의약의 양은 어떠한 치료군에서도 전반적으로 두드러지지 않으면서 치료군 사이에서 0 내지 12%로 달라졌다. 제1일의 MTX 및 전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드의 평균 투여량은 3개의 치료군 모두에서 유사하였다 (각각, 15 내지 16 mg/주, 6 내지 7 mg/일).

표 22

<531>

등록 전 류마티스 처방의 요약			
	CTLA4Ig (BMS-188667)		
사전 류마티스 처방, n(%) ^a	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
사전 처방 대상체 수	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
메토트렉세이트 ^b	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드	69 (60.0)	71 (67.6)	80 (67.2)
기타 DMARD	19 (16.5)	19 (18.1)	25 (21.0)
술파살라진	9 (7.8)	2 (1.9)	10 (8.4)
히드록시클로로퀸	8 (7.0)	6 (5.7)	14 (11.8)
시클로스포린	2 (1.7)	4 (3.8)	4 (3.4)
인플릭시마브	2 (1.7)	2 (1.9)	2 (1.7)
에타네르셉트	1 (0.9)	4 (3.8)	1 (0.8)
클로로퀸	1 (1.7)	0	0
레플루노미드	0	2 (1.9)	2 (1.7)

^a 류마티스 사전 처방의 기준은 서로 배제되지 않음.
^b 4명의 대상체의 경우에는 MTX 투여가 기록되지 않음.

<532> 치료 연구

<533> 3개의 치료군 중에서, CTLA4Ig 10 mg/kg 치료군이 연구 단계 둘 모두에 대하여 최장의 평균 노출 지속기간을 가졌으며, 플라시보 대조군은 연구 단계 둘 모두에 대하여 최단의 평균 노출 지속기간을 가졌다 (10 mg/kg 치료군, 2 mg/kg 치료군 및 플라시보 대조군 각각에 대하여, 제180일: 163일, 156일 및 140일; 제360일: 286일, 268일, 및 234일).

<534> 제180일 (제1 단계의 종점)에서, 주사한 대상체의 비율은 CTLA4Ig 2 mg/kg 치료군 (79%) 및 플라시보 대조군 (66%)에 비해 CTLA4Ig 10 mg/kg 치료군 (85%)에서 더 높게 나타났다 (표 23). 제330일 (제2 단계에서 계획된 주사의 마지막 투여일)에 주사한 대상체의 비율도 CTLA4Ig 2 mg/kg 치료군 (70%) 및 플라시보 대조군 (59%)에 비해 CTLA4Ig 10 mg/kg 치료군 (78%)에서 더 높게 나타났다.

표 23

주어진 연구일에 주사한 대상체

일	대상체 수 (%)		
	CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
1	115 (100)	105 (100)	119 (100)
15	114 (99)	104 (99)	117 (98)
30	113 (98)	101 (96)	111 (93)
60	108 (94)	97 (92)	103 (87)
90	106 (92)	94 (90)	94 (79)
120	100 (87)	86 (82)	83 (70)
150	98 (85)	83 (79)	81 (68)
180	98 (85)	83 (79)	78 (66)
210	94 (82)	80 (86)	78 (66)
240	95 (83)	78 (74)	76 (64)
270	93 (81)	77 (73)	73 (61)
300	90 (78)	74 (70)	72 (61)
330	90 (78)	73 (70)	70 (59)

<535>

<536> 메토티렉세이트

<537> 대상체를 제1일 전 28일 동안, 6개월 이상 "안정한" 투여량의 MTX (매주 10 내지 30 mg)로 처치하였다. 4명의 대상체를 제외하고는, 모든 대상체에게 제1 단계 기간 (제1일 내지 제180일) 동안 CTLA4Ig (BMS-188667) 이외에 매주 MTX 10 내지 30 mg을 투여하였다. 제2 단계 (제181일 내지 제360일) 동안, MTX의 투여량이 매주 10 내지 30 mg으로 유지되도록 조정할 수 있었다.

<538> 치료 순응성 측정

<539> 제1 단계 동안, 연구 약물을 주사하지 않은 대상체의 수는 임의의 시점에서 2명 이하였다 (표 24). 제2 단계 동안, 플라시보 대조군의 대상체는 CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군의 대상체보다 약간 적은 수에게 주사하지 않은 것으로 나타났다. 그러나, CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군의 대상체보다 많은 플라시보 대조군의 대상체가 이후의 시점에서 중단되었다 (상기 내용 참조).

표 24

연구 약물을 주사하지 않은 수

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
제1일	0	0	0
제15일	1	1	0
제30일	0	1	1
제60일	0	0	0
제90일	0	0	0
제120일	0	1	2
제150일	1	2	0
제180일	1	0	1
제210일	4	0	0
제240일	1	2	1
제270일	0	2	0
제300일	1	1	0
제330일	0	0	0

<540>

<541> 동시 치료

<542> 전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드의 사용 비율은, 일반적으로 스크리닝/등록 (58 내지 67%) 및 연구의 제1 단계 (67 내지 71%) 동안 3개의 처리군 모두에서 유사하였다 (각각, 표 25 및 26). 코르티코스테로이드의 사용량은 제360일에 3개의 처리군 모두에서 감소하였지만, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군은 다른 2개의 처리군 (CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군 및 플라시보 대조군의 경우에 각각 53.3% 및 45.4%)에 비해 더 많은 대상체 (63.5%)에게 전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드를 투여하였다. 여러 대상체 (CTLA4Ig: 0 내지 3%, 플라시보: 0 내지 10%)에게는 스크리닝/등록 기간 동안 MTX 대신에 DMARD를 투여하였다.

표 25

<543>

스크리닝/등록 기간 류마티스 동시 처방의 요약			
	CTLA4Ig (BMS-188667)		
사전 류마티스 처방, n(%) ^a	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
사전 처방 대상체 수	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
메토트렉세이트 ^b	114 (99.1)	103 (98.1)	118 (99.2)
전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드	67 (58.3)	70 (66.7)	75 (63.0)
기타 DMARD	5 (4.3)	6 (5.7)	14 (11.8)
숄과살라진	3 (2.6)	1 (1.0)	4 (3.4)
히드록시클로로퀸	2 (1.7)	3 (2.9)	12 (10.1)
시클로스포린	1 (0.9)	1 (1.0)	2 (1.7)
에타네르셉트	0	1 (1.0)	0

^a 약물 카테고리는 서로 배제되지 않음.

표 26

<544>

제1 및 제2 단계 동안 임상적으로 관련된 동시 처방을 받은 대상체			
	CTLA4Ig (BMS-188667)		
처방 ^a	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드 (제1 단계)	77 (67.0)	71 (67.6)	85 (71.4)
전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드 (제2 단계)	73 (63.5)	56 (53.3)	54 (45.4)

^a 약물 카테고리는 서로 배제되지 않음.

<545>

주: 제1일 내지 제180일 동안 대상체 IM101100-83-3 (CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군)에게 메플로퀸을 투여하고, 대상체 IM101100-28-7 (플라시보 대조군)에게 퀴닌을 투여함; 제181일 내지 제360일 동안 대상체 IM101100-18-11 (CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군)에게 항말라리아제로서 퀴닌을 투여하였으며, 이는 유의한 프로토콜 위배로 간주되지 않음.

<546>

효능 결과

<547>

CTLA4Ig (BMS-188667) 10 mg/kg 처리군은 제180일 및 제360일에 플라시보 대조군에 비해 우수한 효능을 나타내었다. CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우, 몇몇 효능 파라미터에 대한 결과는 플라시보 대조군에 비해 유의하게 양호하였으며, 대부분의 다른 효능 파라미터에 대한 결과는 플라시보에 비해 수치상으로 더 높았다.

<548>

제180일에서의 ACR 반응

<549>

본 연구에 유용한 제1 효능의 분석법인 제180일에서의 ACR20 반응률은 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군이 플라시보 대조군보다 유의하게 (p<0.001) 더 효과적임을 나타내었다 (표 27, 도 71A 및 도 71B).

<550>

제180일에서의 ACR50 및 ACR70 반응도 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군이 플라시보 대조군에 비해 유의하게 높았다 (표 27, 도 71A 및 도 71B). CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 제180일에서의 ACR50 및 ACR70 반응도 플라시보 대조군에 비해 유의하게 높았다. CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 제180일에서의 ACR20 반응이 플라시보 대조군에 비해 약간 높았으나, 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

표 27

제180일의 ACR 반응

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
ACR 20			
n (%)	70 (60.9)	44 (41.9)	42 (35.3)
CI	25.6 (12.8, 38.4)	6.6 (-6.2, 19.4)	N/A
p-값	<0.001 ^a	0.31	N/A
ACR 50			
n (%)	42 (36.5)	24 (22.9)	14 (11.8)
CI	24.8 (13.8, 35.7)	11.1 (1.2, 20.9)	N/A
p-값	<0.001 ^a	0.027 ^a	N/A
ACR 70			
n (%)	19 (16.5)	11 (10.5)	2 (1.7)
CI	14.8 (7.5, 22.2)	8.8 (2.7, 14.9)	N/A
p-값	<0.001 ^a	0.005 ^a	N/A

<551>

<552> ^a BMS-188667과 플라시보의 비교를 위한 통계학적으로 유의한 차이

<553> 제360일에서의 ACR 반응

<554> 제360일에서, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서의 ACR20, ACR50 및 ACR70 반응은 플라시보 대조군에 비해 유의하게 (p<0.001) 높았다 (표 28, 도 72A 및 도 72B). CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우에 동일한 반응률은 플라시보 대조군에 비해 수치상으로 더 높았으나, 이러한 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다.

표 28

제360일의 ACR 반응

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
ACR 20			
N (%)	72 (62.6)	43 (41.0)	43 (36.1)
CI	26.5 (13.7, 39.3)	4.8 (-7.9, 17.6)	N/A
P-값	<0.001 ^a	0.459	N/A
ACR 50			
N (%)	48 (41.7)	23 (21.9)	24 (20.2)
CI	21.6 (9.7, 33.4)	1.7 (-8.9, 12.4)	N/A
P-값	<0.001 ^a	0.75	N/A
ACR 70			
N (%)	24 (20.9)	13 (12.4)	9 (7.6)
CI	13.3 (4.4, 22.2)	4.8 (-3.0, 12.6)	N/A
P-값	0.003 ^a	0.227	N/A

<555>

<556> ^a CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군과 플라시보 대조군의 비교를 위한 통계학적으로 유의한 차이

<557> 방문에 의한 ACR 반응

<558> CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군을 플라시보 대조군과 비교한 결과, 제90일에서 3 가지 모든 반응률 (ACR20, ACR50 및 ACR70)에 대해 통계학적으로 유의한 개선이 관찰되었으며, 이들 값은 제360일을 포함한 제360일까지의 모든 시점에서 통계학적으로 유의하게 (3 가지 모든 ACR 반응률에 대해 p≤0.008) 유지되었다 (도 73A, 도 73B 및 도 73C). 실제로, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군의 경우에 ACR50 및 ACR70 반응의 통계학적으로 유의한 개선 (각각, p=0.039 및 p=0.04)은 제30일에 발생했을 정도로 빠르게 발생하였다.

<559> CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우, 제180일에 ACR50 및 ACR70 반응에서 플라시보에 비해 통계학적으로 유의한 개선 (각각, p=0.027 및 p=0.005)이 관찰되었다. 제360일에, CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군에서는 ACR 반응이 플라시보 대조군에 비해 약간 더 개선되었으나, 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

<560> 코크란-만텔 헨스젤 (Cochran-Mantel Haenszel) 시험을 이용하여 방문을 조정 한 후에, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서는 제180일 및 제360일에 플라시보 대조군에 비해 유의한 차이가 ACR20 반응에서 관찰되었다. 상기 두 시점에서 CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군과 플라시보 대조군 사이의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. ACR50 반응에 대해서는 상기 두 시점에 유사한 결과를 획득하였다. 상기 두 시점에서의 ACR70 반응의 경우, CTLA4Ig (BMS-

188667) 처리군 둘 모두에서 플라시보 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되었다.

<561> 주요 임상 반응의 요약

<562> 주요 임상 반응을 6개월 동안에 걸쳐 ACR70 반응이 계속 유지되는 것으로 정의하였다. 제360일에 주요 임상 반응을 달성한 대상체의 백분율은 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군 및 2 mg/kg 처리군 둘 모두가 (각각, 7.8% 및 5.7%) 플라시보 대조군과 비교하였을 때 유의하게 높았다 (0.8%; 각각, p=0.008 및 0.036) (표 29).

표 29

<563>

제360일의 주요 임상 반응의 요약			
	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
주요 반응을 나타내는 대상체의 수	9 (7.8)	6 (5.7)	1 (0.8)
편차 (CI)	7.0 (1.8, 12.1)	4.9 (0.3, 9.4)	N/A
p-값	0.008 ^a	0.036 ^a	N/A

^a BMS-188667과 플라시보의 비교를 위한 통계학적으로 유의한 절차를 나타냄

<564> 평균 ACR 수 (ACR-N) 및 ACR-N의 곡선 아래 면적 (ACR-N-AUC)

<565> 전반적으로, 모든 처리군에 대한 평균 ACR 수 (ACR-N)는 연구 기간의 최초 6개월 동안에 걸쳐 증가하였다 (도 74). 그 다음 6개월 동안, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서는 평균 ACR-N이 약간 증가하였으나, CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군 및 플라시보 대조군에서는 상대적으로 일정하게 유지되었다. 각각의 연구 방문시, ACR-N은 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군이 CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군 및 플라시보 대조군에 비해 일관적으로 더 높았다.

<566> 플라시보 대조군에 비해, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서의 ACR-N AUC (곡선 아래 면적)에 대한 값의 차이는 제 360일에 유의하게 (p<0.001) 높았다.

<567> 제180일의 기저수준으로부터의 개선 백분율

<568> CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군의 경우, 제180일에서의 각각의 개별 ACR 요인 (압통성 및 부종성 관절수, CRP, 동통, 대상체 전체 평가, 치료자 전체 평가 및 신체 기능)의 개선이 플라시보 대조군에 대한 개선에 비해 통계학적으로 유의하였다 (표 30).

<569> CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우, 제180일에 치료자 전체 평가 및 CRP에서 플라시보 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 개선이 관찰되었다. 또한, 플라시보 대조군의 CRP 수준은 제180일에 실제로 악화되었다. 조조 경직의 평균 지속기간의 기저수준으로부터의 변화는 제180일에 3개의 처리군 모두에서 유사하였다.

표 30

제180일의 기저수준으로부터의 평균 개선 백분율
(ACR 기준의 개별 요인)

요인	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
압통성 관절	n=114	n=104	n=118
평균 변화%	59.78*	43.15	31.88
부종성 관절	n=114	n=104	n=118
평균 변화%	55.28*	45.34*	33.49
CRP	n=108	n=98	n=114
평균 변화%	31.79*	16.41*	-23.43
동통	n=109	n=102	n=118
평균 변화%	46.19*	22.09*	8.20
대상체 전체 평가	n=111	n=103	n=118
평균 변화%	40.76*	9.07	17.48
MD 전체 평가	n=111	n=103	n=116
평균 변화%	51.91*	38.71*	25.14
신체 기능	n=107	n=98	n=110
평균 변화%	41.21*	21.63	13.71
조조경직 지속기간	n=98	n=82	n=80
평균 ± SD (분)	61.9 ± 55.4	60.8 ± 66.1	55.9 ± 66.2

<570>

<571> * 95% CI가 0을 포함하지 않으므로 플라시보와 비교시 p<0.05를 나타냄

<572> 제360일에서의 기저수준으로부터의 개선 백분율

<573> CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군의 경우, 제360일에서의 각각의 개별 ACR 요인 (압통성 및 부종성 관절수, CRP, 동통, 대상체 전체 평가, 치료자 전체 평가 및 신체 기능)의 개선이 플라시보 대조군에 대한 개선에 비해 통계학적으로 유의하였다. ACR 기준의 모든 임상 파라미터에 대한 제360일의 기저수준으로부터의 평균 개선 백분율은 표 31에 나타내었다.

<574> CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우, 제360일에 치료자 전체 평가 및 CRP에서 플라시보 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 개선이 관찰되었다. 또한, 플라시보 대조군의 CRP 수준이 제360일에 실제로 악화되었다. 제360일에, CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군의 조조 경직의 지속기간은 플라시보 대조군에 비해 기저수준으로부터 훨씬 크게 변화하였다.

표 31

제360일의 기저수준으로부터의 평균 개선 백분율
(ACR 기준의 개별 요인)

요인	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
압통성 관절	n=115	n=105	n=119
평균 변화%	66.39*	43.54*	29.97
부종성 관절	n=115	n=105	n=119
평균 변화%	59.74*	46.40	36.17
CRP	n=112	n=98	n=115
평균 변화%	27.59*	10.31*	-31.26
동통	n=112	n=104	n=119
평균 변화%	44.93*	26.26	12.55
대상체 전체 평가	n=113	n=105	n=119
평균 변화%	41.01*	16.08	1.99
MD 전체 평가	n=113	n=105	n=119
평균 변화%	53.48*	37.87*	24.14
신체 기능	n=109	n=100	n=111
평균 변화%	42.32*	22.94	10.25
조조경직 지속기간	n=88	n=71	n=72
평균 ± SD	66.2 ± 59.5*	66.6 ± 72.2	49.7 ± 73.9

<575>

<576> * 95% CI가 0을 포함하지 않으므로 플라시보와 비교시 p<0.05를 나타냄

- <577> **새로운 활성 관절**
- <578> 문헌 [Smollen JS, Breedveld FC, Eberl G, Jones I et al., Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of RA activity. Arthritis & Rheum 1993;38:38-43]에서 스몰렌 (Smollen) 등에 의해 제안된 바와 같이, (68개의 총 압통성 관절 및 66개의 총 부종성 관절 중에서) 입증된 28개의 관절을 사용하여 새로운 활성 관절의 비율을 측정하였다. CTLA4Ig 10 mg/kg을 투여한 대상체에서는 새로운 활성 관절 (압통성 및 부종성 관절 둘 모두)의 비율이 제180일에 가장 낮았다 (도 75).
- <579> 제180일에, 새로운 압통성 관절 및 새로운 부종성 관절이 없는 것으로 보고된 대상체의 백분율은 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서 가장 높았다 (도 76A, 도 77A). 새로운 압통성 관절 및 새로운 부종성 관절이 없는 것으로 보고된 대상체의 백분율은, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서 각각 대략 59% 및 52%, CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군에서 각각 38% 및 44%, 플라시보 대조군에서 각각 41% 및 37%였다.
- <580> 제360일에서의 새로운 활성 관절 (압통성 및 부종성 관절 둘 모두)의 비율은 CTLA4Ig 10 mg/kg을 투여한 대상체에서 가장 낮았다 (도 78). 이와 같은 새로운 활성 관절의 비율에 대한 패턴은 제180일에 관찰된 패턴을 반영한다.
- <581> 이와 유사하게, 제360일에, 새로운 압통성 관절 및 새로운 부종성 관절이 없는 것으로 보고된 대상체의 비율이 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서 가장 높았다 (도 76B 및 도 77B). 새로운 압통성 관절 및 새로운 부종성 관절이 없는 것으로 보고된 대상체의 백분율은, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서 각각 대략 71% 및 61%, CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군에서 각각 41% 및 44%, 플라시보 대조군에서 두 가지 관절에 대해 모두 42%였다.
- <582> **ACR 반응을 나타내는 대상체 중에서의 임상 파라미터의 개선**
- <583> ACR20, ACR50 및 ACR70 반응자 중에서, CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군 둘 모두에서의 ACR 기준의 핵심 요인이 플라시보 대조군에 비해 약간 더 개선되었다.
- <584> CTLA4Ig 10 mg/kg을 투여한 대상체의 경우 활동의 개시는 대략 15일 후에 발생하였으며, ACR50의 경우에는 제60일 이상, ACR70의 경우에는 제90일 이상 및 각각의 경우에는 제30일 이상에서 ACR20의 개선이 유의하게 증가하기 시작하여 제360일까지 계속 지속되었다 (도 73A, 도 73B 및 도 73C 참조).
- <585> **건강상태 결과 단답형 설문지 (SF-36)에 대한 기저수준으로부터의 변화**
- <586> 건강상태와 관련된 삶의 질에 대한 CTLA4Ig (BMS-188667)의 영향을 건강상태 결과 단답형 설문지 SF-36 (0 내지 100 범위의 요약 스코어, 이 스코어가 높을수록 삶의 질이 양호해짐을 나타냄)을 이용하여 평가하였다. LOCF (최후 관찰 수행된 진진) 데이터 세트 뿐만 아니라 관찰된 데이터 세트와 같은 세트 상에서 분석을 수행하였다.
- <587> CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군의 경우, LOCF 분석 (즉, 95% CI가 0을 포함하지 않음)을 이용하여 제180일에 SF-36의 4개의 모든 정신 건강 영역 및 4개의 모든 신체 건강 영역이 기저수준으로부터 플라시보 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 개선되는 것을 관찰하였다 (도 79A, 79B). CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우, 제180일에 정신 건강 또는 신체 건강 영역이 플라시보에 비해 수치상으로는 개선되었으나, 이러한 개선은 통계학적으로 유의하지 않았다.
- <588> 관찰된 바와 같은 데이터 세트 상에서 수행한 분석 결과는, 제180일에 "정서적 역할" 영역이 관찰된 바와 같은 데이터 세트를 이용하여 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군과 플라시보 대조군을 비교한 결과 유의하게 개선되지 않는 것 (하지만, 수치상으로는 개선됨)을 제외하고는 LOCF 데이터 세트에 대해 관찰된 결과와 유사하였다.
- <589> 제180일에서의 신체적 요인 및 정신 건강 요인 요약 내용을 표 32에 나타내었다.

표 32

제180일의 SF-36에 대한 기저수준으로부터의 평균 변화
(신체 건강 및 정신 건강 요인)

요약 스코어	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
정신 건강 요인	n=115	n=103	n=118
기저수준 평균	44.52	43.06	41.75
후기저수준 평균	48.69	45.59	44.04
기저수준으로부터의 평균 변화	4.17	2.53	2.30
95% CI	(2.46, 5.88)	(0.39, 4.67)	(0.42, 4.17)
신체적 요인	n=115	n=103	n=118
기저수준 평균	31.13	30.80	32.33
후기저수준 평균	39.30	35.47	35.21
기저수준으로부터의 평균 변화	8.16	4.67	2.88
95% CI	(6.33, 9.99)	(3.25, 6.09)	(1.54, 4.22)

<590>

<591>

제360일에서의 건강상태 결과는 제180일에 관찰된 결과와 유사하였다. CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군의 경우, LOCF 분석 (즉, 95% CI가 0을 포함하지 않음)을 이용하여 제360일에 SF-36의 4개의 모든 정신적 영역 및 4개의 모든 신체적 영역이 플라시보 대조군에 비해 기저수준으로부터 통계학적으로 유의하게 개선되는 것을 관찰하였다 (도 80A 및 80B). CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우, 제360일에서의 4개의 신체적 영역 중 3개 및 제360일에서의 4개의 정신적 영역 중 1개에서 플라시보 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되었다.

<592>

관찰된 바와 같은 데이터 세트 상에서 수행한 분석 결과는 LOCF 데이터 세트에서 관찰된 결과와 유사하였다.

<593>

제360일에서의 신체적 요인 및 정신 건강 요인 요약 내용을 표 33에 나타내었다.

표 33

제360일의 SF-36에 대한 기저수준으로부터의 평균 변화
(신체 건강 및 정신 건강 요인의 요약)

요약 스코어	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
정신 건강 요인	n=115	n=103	n=118
기저수준 평균	44.52	43.06	44.75
후기저수준 평균	48.83	45.65	43.22
기저수준으로부터의 평균 변화	4.31	2.59	1.47
95% CI	(2.64, 5.98)	(0.64, 4.55)	(-0.14, 3.08)
신체적 요인	n=115	n=103	n=118
기저수준 평균	31.13	30.80	32.33
후기저수준 평균	38.93	36.49	34.93
기저수준으로부터의 평균 변화	7.79	5.69	2.60
95% CI	(5.90, 9.68)	(4.10, 7.28)	(1.09, 4.11)

<594>

<595>

생체마커 및 약력학 데이터

<596>

제180일에 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서 6 가지 생체마커/약력학(PD) 파라미터 중 5 가지 (가용성 IL-2r, 류마티스 인자 (RF), ICAM-1, E-셀렉틴 및 IL-6)가 유의하게 개선 (감소)되었으며, TNF- α 가 수치상으로 감소하였다 (표 34). 제180일에 CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군에서 6 가지 생체마커/PD 파라미터 중 3 가지 (가용성 IL-2r, RF 및 IL-6)가 유의하게 개선 (감소)되었으며, ICAM-1이 수치상으로 개선되었다. 제180일에 플라시보 대조군은 어떠한 생체마커/PD 파라미터에서도 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 생체마커/PD 파라미터의 개선 (감소)은 투여량 반응과 관련되어 있는 것으로 나타났다.

표 34

제180일에서의 약리학 측정

파라미터	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
가용성 IL-2r (정상 범위 : 640-2543 pg/mL)	n=95	n=84	n=76
기저수준 평균 (±SD)	1426.19 ± 751.76	1396.82 ± 610.21	1429.13 ± 667.84
후기저수준 평균 (±SD)	1112.62 ± 699.68	1261.31 ± 473.66	1470.03 ± 637.75
평균 변화	-316.23	-135.51	43.59
95% CI	(-417.73, -214.72)	(-241.48, -29.53)	(-71.24, 158.43)
유마티스 인자 (정상 범위 : 0-20 IU/mL)	n=95	n=84	n=74
기저수준 평균 (±SD)	289.71 ± 401.95	256.19 ± 307.92	196.11 ± 265.48
후기저수준 평균 (±SD)	185.43 ± 269.52	227.82 ± 276.27	204.36 ± 320.09
평균 변화	-104.27	-28.12	-0.62
95% CI	(-151.53, -57.01)	(-52.13, -4.11)	(-31.67, 30.43)
ICAM-1	n=95	n=82	n=75
기저수준 평균 (±SD)	404.89 ± 137.72	393.47 ± 150.85	387.33 ± 230.93
후기저수준 평균 (±SD)	364.74 ± 109.47	387.25 ± 142.73	386.17 ± 163.82
평균 변화	-40.42	-6.22	1.09
95% CI	(-58.06, -22.78)	(-27.49, 15.05)	(-31.88, 34.05)
E-셀렉틴	n=89	n=80	n=71
기저수준 평균 (±SD)	68.07 ± 32.93	67.32 ± 37.13	68.23 ± 43.09
후기저수준 평균 (±SD)	61.01 ± 31.53	67.86 ± 40.20	67.37 ± 35.66
평균 변화	-8.41	0.54	-0.68
95% CI	(-13.24, -3.58)	(-5.95, 7.03)	(-6.87, 5.51)
혈청 IL-6 (정상 범위 : 0.3-14.8 pg/mL)	n=86	n=74	n=69
기저수준 평균 (±SD)	28.47 ± 38.28	31.75 ± 42.29	21.20 ± 26.51
후기저수준 평균 (±SD)	9.25 ± 15.85	16.00 ± 22.13	23.98 ± 37.92
평균 변화	-20.30	-16.10	1.98
95% CI	(-27.55, -13.06)	(-24.20, -8.00)	(-7.21, 11.17)
TNFα (1.2-8.0 pg/mL)	n=84	n=74	n=69
기저수준 평균 (±SD)	11.17 ± 23.72	7.51 ± 13.25	13.12 ± 23.20
후기저수준 평균 (±SD)	7.57 ± 7.90	6.20 ± 4.48	9.59 ± 11.21
평균 변화	-3.66	-1.21	-3.54
95% CI	(-8.62, 1.30)	(-4.32, 1.90)	(-7.82, 0.75)

<597>

<598>

전반적으로, 제360일에서의 생체마커/PD 데이터의 변화 패턴은 제180일에 관찰된 패턴과 유사하였다. 제360일에 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군에서 6 가지 생체마커/PD 파라미터 중 5 가지 (가용성 IL-2r, RF, ICAM-1, E-셀렉틴 및 IL-6)가 유의하게 개선 (감소)되었으며, 통계학적으로는 유의하지 않지만 수치상으로는 개선된 TNF-α가 관찰되었다 (표 35). 제360일에 CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군에서만 IL-6가 유의하게 개선 (감소)되었으나, RF 및 ICAM-1은 수치상으로도 개선되지 않았다. 제360일에 플라시보 대조군은 어떠한 생체마커/PD 파라미터에서도 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 제180일 데이터에 나타내 바와 같이, 생체마커/PD 파라미터의 모든 개선 (감소)는 투여량 반응 방식으로 발생한 것으로 나타났다.

<599>

제180일에서의 생체마커/PD 파라미터에 대한 후기저수준 평균을 제360일에서의 생체마커/PD 파라미터에 대한 후기저수준 평균과 비교한 결과 중요한 경향이 나타났다. CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군의 경우, 가용성 IL-2r이 약간 증가한 것을 제외하고는 모든 생체마커/PD 측정값이 계속해서 감소하였다. CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우, 3 가지 생체마커/PD 파라미터에 대한 평균값이 약간 감소하였거나 (ICAM-1, 혈청 IL-6) 또는 상대적으로 일정하게 유지되었으며 (E-셀렉틴), 다른 3 가지 생체마커/PD 측정값에 대한 평균값은 약간 증가하였다 (가용성 IL-2r, RF, TNFα). 플라시보 대조군의 경우, TNFα가 상대적으로 일정하게 유지되는 것을 제외하고는 제360일에 모든 생체마커/PD 파라미터에 대한 평균값이 약간 증가하였다.

표 35

제360일에서의 약리학 측정

측정	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
가용성 IL-2r (정상 범위 : 640-2543 pg/mL)	n=68	n=56	n=55
기저수준 평균 (±SD)	1372.10 ± 770.11	1373.86 ± 567.75	1459.93 ± 695.07
후기저수준 평균 (±SD)	1185.51 ± 638.95	1413.84 ± 452.50	1666.59 ± 611.97
평균 변화	-194.31	39.99	206.22
95% CI	(-305.67, -82.96)	(-69.87, 149.84)	(35.88, 376.56)
튜마티스 인자 (정상 범위 : 0-20 IU/mL)	n=69	n=55	n=58
기저수준 평균 (±SD)	261.43 ± 333.58	258.42 ± 318.65	179.12 ± 207.72
후기저수준 평균 (±SD)	143.13 ± 180.80	236.61 ± 287.36	206.42 ± 256.27
평균 변화	-118.30	-25.64	20.90
95% CI	(-175.19, -61.42)	(-58.50, 7.23)	(-10.72, 52.51)
ICAM-1	n=77	n=68	n=64
기저수준 평균 (±SD)	406.44 ± 145.22	393.41 ± 132.97	405.67 ± 245.16
후기저수준 평균 (±SD)	354.90 ± 111.40	380.42 ± 113.20	405.07 ± 194.15
평균 변화	-55.15	-12.98	1.47
95% CI	(-74.80, -35.49)	(-35.36, 9.39)	(-26.41, 29.35)
E-셀렉틴	n=75	n=68	n=62
기저수준 평균 (±SD)	68.84 ± 34.38	66.75 ± 37.10	69.72 ± 44.38
후기저수준 평균 (±SD)	58.77 ± 26.61	67.58 ± 31.50	71.90 ± 47.43
평균 변화	-10.89	0.83	2.34
95% CI	(-15.70, -6.08)	(-5.62, 7.28)	(-4.53, 9.20)
혈청 IL-6 (정상 범위 : 0.3-14.8 pg/mL)	n=56	n=47	n=48
기저수준 평균 (±SD)	27.68 ± 38.56	27.19 ± 32.45	17.27 ± 22.47
후기저수준 평균 (±SD)	7.64 ± 14.21	13.93 ± 19.00	17.72 ± 29.76
평균 변화	-20.88	-12.72	-0.19
95% CI	(-31.56, -10.19)	(-22.49, -2.94)	(-7.55, 7.18)
TNFα (1.2-8.0 pg/mL)	n=61	n=48	n=50
기저수준 평균 (±SD)	9.71 ± 22.80	6.27 ± 3.62	10.81 ± 21.24
후기저수준 평균 (±SD)	6.67 ± 4.80	7.18 ± 8.14	9.36 ± 26.43
평균 변화	-3.02	1.08	-1.41
95% CI	(-8.70, 2.67)	(-1.26, 3.42)	(-5.14, 2.33)

<600>

<601>

<602>

상기 생체마커/PD 측정값 뿐만 아니라 CRP 수준의 변화에 대한 데이터를 도 81 내지 87에 그래프로 나타내었다.

계획된 분석의 통합성을 평가하기 위해, 연구 의약을 투여한 후에 임의의 원인으로 인해 연구가 중단된 모든 대상체를 추후에 중단되는 모든 예정된 연구 방문에서 ACR 비-반응자로 간주하였다. 상기 분석 결과 (표 36)는 이미 제시된 효능 결과와 일치하였다. CTLA4Ig 10 mg/kg을 투여하여 제180일에 ACR20, ACR50, 또는 ACR70 반응을 달성한 대상체의 비율은 플라시보를 투여한 대상체의 비율보다 유의하게 ($p < 0.001$) 높았다. CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우, ACR50 또는 ACR70 반응을 달성한 대상체의 비율이 유의하게 ($p \leq 0.009$) 높았다.

표 36

제180일에서의 ACR 반응 (비-완수자는 비-반응자와 동일)

	CTLA4Ig (BMS-188667)		
	10 mg/kg (n=115)	2 mg/kg (n=105)	플라시보 (n=119)
ACR 20, n (%)	67 (58.3)	41 (39.0)	38 (31.9)
Diff (CI)	26.3 (13.6, 39.1)	7.1 (-5.4, 19.7)	N/A
p-값	<0.001 ^a	0.266	N/A
ACR 50, n (%)	41 (35.7)	24 (22.9)	12 (10.1)
Diff (CI)	25.6 (14.8, 36.3)	12.8 (3.1, 22.4)	N/A
p-값	<0.001 ^a	0.009 ^a	N/A
ACR 70, n(%)	19 (16.5)	11 (10.5)	2 (1.7)
Diff (CI)	14.8 (7.5, 22.2)	8.8 (2.7, 14.9)	N/A
p-값	<0.001 ^a	0.005 ^a	N/A

<603>

<604>

또한, 모든 제1 효능 분석을 WOCF (최악의 관찰 수행된 진전) 데이터 세트 상에서 수행하였다. WOCF 데이터 세트에 기초하는 ACR 반응은 표 13에 보고된 것보다 약간 감소하였으며, 표 36에 나타난 것과 유사하였다. 이와 같은 발견으로 CTLA4Ig (BMS-188667) 처리군에서의 ACR 반응률의 일관성을 확인하였다.

<605> 항-류마티스 동시 치료 의약의 투여량을 수집하여 제6개월 및 제12개월에서의 상기 의약에 대한 필요성을 평가 하였으나; 이용가능한 데이터는 상기 분석을 수행하는데 부적절하였다. 메토티렉세이트 및 전신성 (비-국소성) 코르티코스테로이드의 평균 투여량에 대한 기준값만이 제공되었다.

<606> **효능 결론**

<607> 10 mg/kg (+MTX)으로 투여된 CTLA4Ig (BMS-188667)는 제180일 및 제360일에서 플라시보 (+MTX)에 비해 우수한 효능을 갖는다. 하기 효능 파라미터의 경우, CTLA4Ig 10 mg/kg을 투여하는 것이 플라시보보다 유의하게 양호하였다:

<608> · 제1 효능 변수: 제180일에서의 ACR20 반응 ($p < 0.001$)

<609> · 제180일에서의 ACR50 및 ACR70 반응 ($p < 0.001$)

<610> · 제360일에서의 ACR20, ACR50 및 ACR70 반응 ($p \leq 0.003$)

<611> · 제30일에 관찰된 ACR50 및 ACR70 반응에서의 통계학적으로 유의한 차이 ($p = 0.039$ 및 $p = 0.04$), 제90일에 관찰된 3 가지 모든 반응률 (ACR20, ACR50 및 ACR70)에서의 통계학적으로 유의한 차이; 제360일을 포함한 제360일까지의 모든 시점에서 상기 값들이 통계학적으로 유의하게 유지됨 ($p \leq 0.008$)

<612> · 제360일에 주요 임상 반응을 달성한 대상체의 비율 (6개월 동안에 걸쳐 ACR70 반응이 계속 유지됨) ($p = 0.008$)

<613> · 제360일의 ACR-AUC 평균값 ($p < 0.001$)

<614> · 제180일 및 제360일에서의 각각의 개별 ACR 요인의 평균 개선 백분율 ($p < 0.05$; 95% CI가 0을 포함하지 않음)

<615> · 제180일 및 제360일 둘 모두에서의 건강상태 평가 (SF-36)의 4개의 모든 정신적 영역 및 4개의 모든 신체적 영역의 개선 ($p < 0.05$; 95% CI가 0을 포함하지 않음)

<616> 상기 통계학적으로 유의한 차이 이외에도, CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군은 제180일 및 제360일에서의 플라시보 대조군에 비해 새로운 활성 관절의 수가 더 적었으며, 새로운 활성 압통성 관절 및 부종성 관절이 없는 것으로 보고된 대상체의 수는 더 많았다.

<617> 플라시보 대조군에 비해 CTLA4Ig 10 mg/kg 처리군이 유의하게 개선된다는 것은 거의 모든 측정된 약력학 파라미터 (가용성 IL 12r, RF, ICAM-1, E-셀렉틴 및 IL-6)에서 관찰되었으며, 제1년째까지 TNF- α 가 수치상으로 개선되었다.

<618> CTLA4Ig 2 mg/kg 처리군의 경우, 몇몇 효능 파라미터는 플라시보 대조군에 비해 유의하게 양호하였다:

<619> · 제180일에서의 ACR50 반응 ($p = 0.027$)

<620> · 제180일에서의 ACR70 반응 ($p = 0.005$)

<621> · 제60일에 관찰된 ACR70의 통계학적으로 유의한 차이 ($p = 0.032$) 및 제180일에서의 ACR50과 ACR70의 통계학적으로 유의한 차이 ($p = 0.027$ 및 $p = 0.005$)

<622> · 제360일에 주요 임상 반응 (6개월 동안에 걸쳐 ACR70 반응이 계속 유지됨)을 달성한 대상체의 비율 ($p = 0.036$)

<623> · 제180일 및 제360일에서의 개별 ACR 요인 중 일부에서의 평균 개선 백분율 ($p < 0.05$, 95% CI는 0을 포함하지 않음)

<624> 다수의 다른 효능 파라미터의 경우, CTLA4Ig 2 mg/kg이 플라시보보다 수치상으로 양호하였다.

<625> **안전성 결과**

<626> 전반적으로, CTLA4Ig (BMS-188667)의 안전성 프로파일은 플라시보와 유사하였다. 중요한 안전성 문제는 나타나지 않았다.

<627> **임상 실험 평가**

<628> 전반적으로, 실험값의 평균 변화 평가로부터 새로운 안전성 문제가 대두되지 않았다. 헤모글로빈, WBC, 호중성

백혈구, 혈소판, ALT, AST, GGT 및 총 단백질에 대한 평균값은 기저수준에서 정상 범위내에 속하였으며, 연구 기간 동안 정상 범위내에서 유지되었다. 일반적으로, 실험실 시험 결과는 연구 처방에 귀착될 수 있는 일관된 범위 이탈 또는 예외적인 경향을 나타내지 않았다.

<629> **생명 징후, 신체 소견, 및 안전성 관련 소견**

<630> 연구 약물을 투여한 날마다, 생명 징후 (체온, 심박수 및 고정 혈압)를 예비투여시 및 주입후 제15, 30, 45, 60, 75, 90 및 120분에 모니터링하였다. 전반적으로, 모든 생명 징후 파라미터에 대한 평균값은 정상 범위내에 속하였으며, 모든 처리군이 360일의 연구 기간에 걸쳐 안정하였다.

<631> **실시예 8**

<632> 인간에서의 급성 관상동맥 증후군과 유사한 확립된 동물 모델이 존재하지는 않지만, 동물 모델에서 CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg를 사용하여 죽상동맥경화증을 억제할 수 있다. 무린 CTLA4Ig를 사용하여, 염증을 촉진시키는 자극 (즉, 감염제, 사이토킨 투여)의 존재 및 부재하에 계속해서 고지방 식이를 섭취시킨 아포지단백질 E 널 (null) 마우스 (apoE-/-)에서 죽상동맥경화증을 저해하는 능력을 조사하였다. CTLA4Ig는 플라시보 (삼)를 주사한 마우스에 비해 상기 동물 모델에서 죽상동맥경화증 플라크 형성을 감소시킬 수 있는 것으로 예상되었다.

<633> **실시예 9**

<634> CTLA4Ig 또는 L104EA29YIg의 잠재적인 용도를 여러 환자 집단에서 추가로 조사하였다.

<635> 불안정형 협심증 또는 비-ST-분절 상승 심근경색증 (비-STEMI)으로 입원한 환자 및 염증 발병 징후 (즉, 상승된 hsCRP)를 나타내는 입원 환자에게 랜덤적으로 플라시보 또는 CTLA4Ig/L104EA29YIg를 투여하였다. 환자에게 윤리적으로 요구되며 가장 최근의 미국 심장 협회/미국 심장병 정책 단체와 일치하는 표준 의학적 및 개재적 치료의 백그라운드를 제공하였다. 제1 목적은 추후의 환자 이환율 및 사망률의 감소 및/또는 hsCRP (또는 다른 염증성 마커(들))에 의해 측정되는 추후의 위험 감소의 감소를 반영하는 임상 혼합물일 것이다.

산업이용 가능성

<636> 본 발명의 리간드에 결합하여 내인성 B7 분자를 차단하는 가용성 CTLA4 분자를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 여러 질환, 특히 심혈관계 질환을 치료하거나 또는 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<637> 도 1a: 환자 코호트의 인구통계 데이터. 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이 성별, 인종 및 질환 지속기간을 포함하는 인구통계 데이터.

<638> 도 1b: 환자 코호트의 인구통계 데이터. 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이 성별, 연령, 체중, 및 환자와 치료자가 평가한 질환 활성도를 포함하는 인구통계 데이터.

<639> 도 1c: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같은 환자 코호트의 인구통계 데이터. 질환 활성도, 적혈구 침강 속도 (ESR), 신체 기능 (건강상태에 관한 설문조사로 평가된 장애) 및 C-반응성 단백질 (CRP)을 포함하는 인구통계 데이터.

<640> 도 1d: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같은 환자 코호트의 인구통계 데이터. 관절 부종, 관절 압통, 조조 경직 및 동통을 포함하는 인구통계 데이터.

<641> 도 1e: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같은 환자 코호트의 인구통계 데이터. 사전 치료를 포함하는 인구통계 데이터.

<642> 도 2: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같은 원인으로 인해 제85일에 임상 연구를 중단한 환자에 대한 요약.

<643> 도 3a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같은 제85일의 ACR 반응: ACR-20, ACR-50 및 ACR-70 반응.

<644> 도 3b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같은 제85일의 플라시보 반응을 비롯한 제85일의 ACR-20 반응: 신뢰 한계 95%의 ACR-20 반응.

<645> 도 3c: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같은 제85일의 ACR-20 반응: 95% 신뢰 구간을 갖는 ACR-20 반응차.

<646> 도 4a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 환자 백분율로 표시된 제85일의 부종성 및 압통성 관절수에 대한 기

초 (20% 개선) 임상 반응: 기초 임상 반응, ACR-20.

- <647> 도 4b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 환자 백분율로 표시된 제85일의 부종성 및 압통성 관절수에 대한 임상 반응 (개선률(%)): 개선률(%)로 표시된 임상 반응의 변화.
- <648> 도 5a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 환자 백분율로 표시된 제85일의 동통 반응 (기저선으로부터의 평균 단위 변화를 리커트 척도(Likert scale)로 표시함): 기저선으로부터의 동통 스코어 변화.
- <649> 도 5b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 환자 백분율로 표시된 제85일의 환자 전체 질환 변화 (기저선으로부터의 평균 단위 변화를 리커트 척도로 표시함): 환자가 평가한 전체 질환 활성화도 변화.
- <650> 도 5c: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 환자 백분율로 표시된 제85일의 치료자 전체 질환 변화 (기저선으로부터의 평균 단위 변화를 리커트 척도로 표시함): 치료자가 평가한 전체 질환 활성화도 변화.
- <651> 도 5d: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 환자 백분율로 표시된 제85일의 동통 (기저선으로부터의 평균 단위 변화를 리커트 척도로 표시함): 기저선으로부터의 동통 변화.
- <652> 도 6a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 제85일에 기저선으로부터 2 단위 범위의 질환 활성화도 변화에 대한 환자 전체 평가: 질환 활성화도 개선.
- <653> 도 6b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 제85일에 기저선으로부터 2 단위 범위의 질환 활성화도 변화에 대한 치료자 전체 평가: 질환 활성화도 개선.
- <654> 도 7a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 제85일에 C-반응성 단백질 (CRP) 수준의 감소율(%): 기저선으로부터 CRP 수준의 감소율(%).
- <655> 도 7b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 제85일에 C-반응성 단백질 (CRP) 수준의 감소차: 95% 신뢰 구간을 갖는 CRP 수준의 감소차 백분율(%).
- <656> 도 7c: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 제85일에 C-반응성 단백질 (CRP) 수준의 평균 감소: 기저선으로부터의 평균 변화.
- <657> 도 8: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 제85일에 가용성 IL-2 수용체 수준에 대한 기저선으로부터의 평균 변화 감소.
- <658> 도 9a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 압통성 관절에서 시간에 따른 CTLA4Ig의 효과: 기저선으로부터의 정중차(正中差).
- <659> 도 9b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 압통성 관절에서 시간에 따른 CTLA4Ig의 효과: 기저선으로부터의 평균차.
- <660> 도 10a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 부종성 관절에서 시간에 따른 CTLA4Ig의 효과: 기저선으로부터의 정중차.
- <661> 도 10b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 부종성 관절에서 시간에 따른 CTLA4Ig의 효과: 기저선으로부터의 평균차.
- <662> 도 11: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 동통 평가에 있어서 시간에 따라 기저선으로부터의 평균차로 나타낸 CTLA4Ig의 효과.
- <663> 도 12a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 질환 활성화도의 환자 평가에 있어서 시간에 따라 기저선으로부터의 평균차로 나타낸 CTLA4Ig의 효과.
- <664> 도 12b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 질환 활성화도의 치료자 평가에 있어서 시간에 따라 기저선으로부터의 평균차로 나타낸 CTLA4Ig의 효과.
- <665> 도 13a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 압통성 관절에서 시간에 따른 L104EA29YIg의 효과: 기저선으로부터의 정중차.
- <666> 도 13b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 압통성 관절에서 시간에 따른 L104EA29YIg의 효과: 기저선으로부터의 평균 변화.
- <667> 도 14a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 부종성 관절에서 시간에 따른 L104EA29YIg의 효과: 기저선으로부터

의 정중차.

- <668> 도 14b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 부종성 관절에서 시간에 따른 L104EA29YIg의 효과: 기저선으로부터의 평균 변화.
- <669> 도 15: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 동통 평가에 있어서 시간에 따른 L104EA29YIg의 효과: 기저선으로부터 시간에 따른 평균 변화.
- <670> 도 16a: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 질환 활성도의 환자 평가에 있어서 시간에 따라 기저선으로부터의 평균차에 대한 L104EA29YIg의 효과.
- <671> 도 16b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 질환 활성도의 치료자 평가에 있어서 시간에 따라 기저선으로부터의 평균차에 대한 L104EA29YIg의 효과.
- <672> 도 17: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, CTLA4Ig 및 L104EA29YIg를 처리했을 때 제85일의 건강상태 평가 설문지 (HAQ)로 평가하여 기저선과 비교한 환자 장애의 개선률(%).
- <673> 도 18: 하기 실시예 1에 기재된 바와 같은 L104EIg의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열 (서열 6 및 7).
- <674> 도 19: 하기 실시예 1에 기재된 바와 같은 L104EA29YIg의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열 (서열 8 및 9).
- <675> 도 20: 하기 실시예 1에 기재된 바와 같은 L104EA29LIg의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열 (서열 10 및 11).
- <676> 도 21: 하기 실시예 1에 기재된 바와 같은 L104EA29TIg의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열 (서열 12 및 13).
- <677> 도 22: 하기 실시예 1에 기재된 바와 같은 L104EA29WIg의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열 (서열 14 및 15).
- <678> 도 23: CTLA4 수용체의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열 (서열 16 및 17).
- <679> 도 24: CTLA4Ig의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열 (서열 18 및 19).
- <680> 도 25: CTLA4Ig (레인 1), L104EIg (레인 2) 및 L104EA29YIg (레인 3A)에 대한 SDS 겔 (도 25a); 및 CTLA4Ig (도 25b) 및 L104EA29YIg (도 25c)에 대한 크기 배제 크로마토그래프.
- <681> 도 26 (좌측 및 우측 도면): NMR 분광법으로 결정된 용액 구조로부터 생성된 CTLA4 세포의 IgV-유사 폴딩의 리본 다이어그램. 도 26 (우측 도면)은 결합력을 증가시키는 돌연변이 L104 및 A29의 위치 및 측쇄 배열을 나타내는 CDR-1 (S25 내지 33) 영역 및 MYPPPY 영역을 확대시켜 보여준다.
- <682> 도 27a 및 27b: 하기 실시예 2에 기재된 바와 같이, 인간 CD80- 또는 CD86-형질감염된 CHO 세포와 L104EA29YIg, L104EIg 및 CTLA4Ig의 결합을 보여주는 FACS 분석.
- <683> 도 28a 및 28b: 하기 실시예 2에 기재된 바와 같이, CD80-양성 및 CD86-양성 CHO 세포의 증식 억제를 보여주는 그래프.
- <684> 도 29a 및 29b: 하기 실시예 2에 기재된 바와 같이, L104EA29YIg가 1차 및 2차 동시자극 T 세포 증식을 억제하는데 있어서 CTLA4Ig보다 더 효과적임을 보여주는 그래프.
- <685> 도 30a 내지 30c: 하기 실시예 2에 기재된 바와 같이, L104EA29YIg가 동시자극된 인간 T 세포의 IL-2 (도 30a), IL-4 (도 30b) 및 감마(γ)-인터페론 (도 30c) 사이토킨 생성을 억제하는데 있어서 CTLA4Ig보다 더 효과적임을 예시하는 그래프.
- <686> 도 31: 하기 실시예 2에 기재된 바와 같이, L104EA29YIg가 피토헤마글루티닌 (PHA)-자극된 원숭이 T 세포 증식을 억제하는데 있어서 CTLA4Ig보다 더 효과적임을 입증하는 그래프.
- <687> 도 32: CD86Ig와 L104EA29YIg, L104EIg 및 야생형 CTLA4Ig의 평형 결합 분석을 보여주는 그래프.
- <688> 도 33a 및 33b: 하기 실시예 3에 기재된 바와 같이, 제85일에 기저선으로부터 가용성 ICAM-1 및 가용성 E-셀렉틴 수준의 평균 변화 감소.
- <689> 도 34: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 방문일에 메토타렉세이트 및 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg) 요법에 대한

반응에서의 ACR20 반응을 요약하여 보여주는 그래프.

- <690> 도 35: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 방문일에 메토티렉세이트 단독 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg) 요법에 대한 반응에서의 ACR50 반응을 요약하여 보여주는 그래프.
- <691> 도 36: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 방문일에 메토티렉세이트 단독 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg) 요법에 대한 반응에서의 ACR70 반응을 요약하여 보여주는 그래프.
- <692> 도 37: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트 단독 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg) 요법에 대한 반응에서 시간에 따른 평균 ACR-N을 보여주는 그래프.
- <693> 도 38: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트 단독 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg) 요법에 대한 반응에서 제180일의 ACR 반응을 보여주는, 95% 신뢰 구간을 갖는 막대 그래프.
- <694> 도 39: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트 단독 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg) 요법에 대한 반응에서 제180일에 새로운 활성 관절의 비율을 보여주는 막대 그래프.
- <695> 도 40: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후 제180일의 ACR 반응을 보여주는 막대 그래프.
- <696> 도 41: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후에 압통성 관절에서의 개선률(%)을 보여주는 그래프 (기저선으로부터의 평균 개선률(%)).
- <697> 도 42: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후에 부종성 관절에서의 개선률(%)을 보여주는 그래프 (기저선으로부터의 평균 개선률(%)).
- <698> 도 43: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후에 동통의 개선률(%)을 보여주는 그래프 (기저선으로부터의 평균 개선률(%)).
- <699> 도 44: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후에 대상체에 의해 보고된 질환 활성도의 개선률(%)을 보여주는 그래프 (기저선으로부터의 평균 개선률(%)).
- <700> 도 45: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후에 치료자에 의해 보고된 질환 활성도의 개선률(%)을 보여주는 그래프 (기저선으로부터의 평균 개선률(%)).
- <701> 도 46: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후에 신체 기능의 개선률(%)을 보여주는 그래프 (HAQ로 측정된, 기저선으로부터의 평균 개선률(%)).
- <702> 도 47: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후에 CRP 수준의 함수로서 개선률(%)을 보여주는 그래프 (기저선으로부터의 평균 개선률(%)).
- <703> 도 48: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후에 CRP 수준의 함수로서 개선률(%)을 보여주는 그래프 (기저선으로부터의 정중 개선률(%)).
- <704> 도 49: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트 (MTX)를 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)와 함께 사용한 요법 후의 2개 군을 메토티렉세이트만으로 처리된 군과 비교하여 제180일의 ACR 반응률 차이를 보여주는 그래프 (신뢰 한계 95%).
- <705> 도 50: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)와 함께 사용한 요법 후의 2개 군을 메토티렉세이트만으로 처리된 군과 비교하여 제180일에 SF-36 신체 건강 요소에 대한 기저선으로부터의 변화를 보여주는 그래프 (신뢰 한계 95%).
- <706> 도 51: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)와 함께 사용한 요법 후

의 2개 군을 메토티렉세이트만으로 처리된 군과 비교하여 제180일에 SF-36 정신 건강 요소에 대한 기저선으로부터의 변화를 보여주는 그래프 (신뢰 한계 95%).

- <707> 도 52: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후 제180일의 CRP 수준을 보여주는 막대 그래프.
- <708> 도 53: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후 제180일의 류마티스 인자 수준을 보여주는 막대 그래프.
- <709> 도 54: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후 제180일의 IL-2r 수준을 보여주는 막대 그래프.
- <710> 도 55: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후 제180일의 IL-6 수준을 보여주는 막대 그래프.
- <711> 도 56: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 사용하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 및 10 mg/kg)를 사용한 요법 후 제180일의 TNF α 수준을 보여주는 막대 그래프.
- <712> 도 57: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 10 mg/체중 kg의 CTLA4Ig로 처리된 처리군 BMS 10에 대한 스크리닝/등록시에 단일변수 메토티렉세이트 투여량을 나타낸 표.
- <713> 도 58: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 2 mg/체중 kg의 CTLA4Ig로 처리된 처리군 BMS 2에 대한 스크리닝/등록시에 단일변수 메토티렉세이트 투여량을 나타낸 표.
- <714> 도 59: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 플라시보군에 대한 스크리닝/등록시에 단일변수 메토티렉세이트 투여량을 나타낸 표.
- <715> 도 60: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 10 mg/체중 kg의 CTLA4Ig로 처리된 처리군 BMS 10에 대하여 연구 제 180일까지 및 제180일을 포함한 단일변수 메토티렉세이트 투여량을 나타낸 표.
- <716> 도 61: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 2 mg/체중 kg의 CTLA4Ig로 처리된 처리군 BMS 2에 대하여 연구 제 180일까지 및 제180일을 포함한 단일변수 메토티렉세이트 투여량을 나타낸 표.
- <717> 도 62: 하기 실시예 5에 기재된 바와 같이, 플라시보군에 대하여 연구 제180일까지 및 제180일을 포함한 단일변수 메토티렉세이트 투여량을 나타낸 표.
- <718> 도 63: 하기 실시예 6에 기재된 바와 같이, 에타네르셉트를 단독으로 (매주 2회 25 mg씩) 사용하거나 또는 CTLA4Ig (2 mg/kg)와 함께 사용한 요법 후의 2개 군에서 제180일에 변경된 ACR 반응률의 차이를 보여주는 막대 그래프.
- <719> 도 64a 내지 64c: 하기 실시예 6에 기재된 바와 같이, 에타네르셉트를 단독으로 (매주 2회 25 mg씩) 사용하거나 또는 CTLA4Ig (2 mg/kg)와 함께 사용한 요법 후에 각 방문일에 평가된, 변경된 ACR 기준의 개별 요소에서의 개선률(%)을 보여주는 그래프. a. 압통성 관절수, b. 부종성 관절수, c. 동통 평가.
- <720> 도 65: a. 하기 실시예 6에 기재된 바와 같이, 에타네르셉트 (격주로 25 mg씩)를 단독으로 사용하거나 또는 CTLA4Ig (2 mg/kg)와 함께 사용한 요법 후의 2개 군에서 제180일에 SF-36 신체 건강 요소에 대한 기저선으로부터의 변화를 보여주는 그래프 (신뢰 한계 95%). b. 하기 실시예 6에 기재된 바와 같이, 에타네르셉트 (격주로 25 mg씩)를 단독으로 사용하거나 또는 CTLA4Ig (2 mg/kg)와 함께 사용한 요법 후의 2개 군에서 제180일에 SF-36 정신 건강 요소에 대한 기저선으로부터의 변화를 보여주는 그래프 (신뢰 한계 95%).
- <721> 도 66: 신호 펩티드; 위치 +1의 메티오닌에서 개시하여 위치 +124의 아스파르트산까지이거나 또는 위치 -1의 알라닌에서 개시하여 위치 +124의 아스파르트산까지인 CTLA4 세포외 도메인의 야생형 아미노산 서열; 및 Ig 영역을 코딩하는 CTLA4Ig의 뉴클레오티드 서열 (서열 21).
- <722> 도 67: 신호 펩티드; 위치 +1의 메티오닌에서 개시하여 위치 +124의 아스파르트산까지이거나 또는 위치 -1의 알라닌에서 개시하여 위치 +124의 아스파르트산까지인 CTLA4 세포외 도메인의 야생형 아미노산 서열; 및 Ig 영역을 갖는 CTLA4Ig의 아미노산 서열 (서열 22).
- <723> 도 68: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 대상체를 3개의 코호트로 배치하는 것을 보여주는 개요도.
- <724> 도 69: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 연구의 초기 12개월 동안 임의의 원인으로 인해 연구를 중단한 대상

체의 누적 비율을 보여주는 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯.

- <725> 도 70: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 연구의 초기 12개월 동안 효능이 나타나지 않아 연구를 중단한 대상체의 누적 비율을 보여주는 카플란-마이어 플롯.
- <726> 도 71a: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제180일의 ACR 반응을 보여주는 그래프.
- <727> 도 71b: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제180일의 ACR 반응차를 보여주는, 95% 신뢰 구간을 갖는 그래프.
- <728> 도 72a: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제360일의 ACR 반응을 보여주는 그래프.
- <729> 도 72b: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제360일의 ACR 반응차를 보여주는, 95% 신뢰 구간을 갖는 그래프.
- <730> 도 73a: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 1년의 기간 동안 방문일에 따른 ACR 20 반응을 요약한 그래프.
- <731> 도 73b: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 1년의 기간 동안 방문일에 따른 ACR 50 반응을 요약한 그래프.
- <732> 도 73c: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 1년의 기간 동안 방문일에 따른 ACR 70 반응을 요약한 그래프.
- <733> 도 74: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 1년의 시간 기간에 걸친 평균 ACR-N을 보여주는 그래프.
- <734> 도 75: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제180일에 새로운 활성 관절의 비율을 보여주는 그래프.
- <735> 도 76a: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제180일에 대상체 1명 당 새로운 압통성 관절의 발생빈도를 보여주는 그래프.
- <736> 도 76b: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제360일에 대상체 1명 당 새로운 압통성 관절의 발생빈도를 보여주는 그래프.
- <737> 도 77a: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제180일에 대상체 1명 당 새로운 부종성 관절의 발생빈도를 보여주는 그래프.
- <738> 도 77b: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제360일에 대상체 1명 당 새로운 부종성 관절의 발생빈도를 보여주는 그래프.
- <739> 도 78: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제360일에 새로운 활성 관절의 비율을 보여주는 그래프.
- <740> 도 79: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, A) 제180일에 신체 건강 영역에 대한 기저선으로부터의 변화, 및 B) 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제180일에 정신 건강 영역에 대한 기저선으로부터의 변화를 보여주는 그래프.
- <741> 도 80: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, A) 제360일에 신체 건강 영역에 대한 기저선으로부터의 변화, 및 B)

메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 제360일에 정신 건강 영역에 대한 기저선으로부터의 변화를 보여주는 그래프.

- <742> 도 81: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 기저수준의 가용성 IL-2r 수준, 제180일과 제360일의 가용성 IL-2r 수준을 보여주는 그래프.
- <743> 도 82: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 기저수준의 류마티스 인자 수준, 제180일과 제360일의 류마티스 인자 수준을 보여주는 그래프.
- <744> 도 83: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 기저수준의 ICAM-1 수준, 제180일과 제360일의 ICAM-1 수준을 보여주는 그래프.
- <745> 도84: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 기저수준의 e-셀렉틴 수준, 제180일과 제360일의 e-셀렉틴 수준을 보여주는 그래프.
- <746> 도 85: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 기저수준의 혈청 IL-6 수준, 제180일과 제360일의 혈청 IL-6 수준을 보여주는 그래프.
- <747> 도 86a: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 기저수준의 CRP 수준, 제180일과 제360일의 CRP 수준을 보여주는 그래프.
- <748> 도 86b: 하기 실시예 7에 기재된 바와 같이, 메토티렉세이트를 단독으로 투여하거나 또는 메토티렉세이트와 CTLA4Ig (2 또는 10 mg/체중 kg)를 투여한 환자에서 기저수준의 TNF α 수준, 제180일과 제360일의 TNF α 수준을 보여주는 그래프.
- <749> 도 87: 혈관성형술 시편에서 활성화된 T-세포의 백분율(%).

도면

도면1a

인구통계 데이터 -1-

		플라시보 N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	전체 N=214
성별	남성	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
	여성	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
인종	백인종	30 (94%)	23 (88%)	30 (94%)	30 (94%)	29 (91%)	25 (86%)	27 (87%)	194 (91%)
	흑인종	2 (6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (3%)	3 (10%)	2 (6%)	9 (4%)
	기타	0 (0%)	3 (12%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	2 (6%)	11 (5%)
질환 지속기간	< 2년	12 (38%)	5 (19%)	8 (25%)	12 (38%)	10 (31%)	10 (34%)	11 (35%)	68 (32%)
	2-5년	14 (44%)	11 (42%)	18 (56%)	13 (41%)	14 (44%)	14 (48%)	12 (39%)	96 (45%)
	5-7년	6 (19%)	8 (31%)	6 (19%)	6 (19%)	6 (19%)	5 (17%)	7 (23%)	44 (21%)
	> 7년	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)	1 (3%)	2 (6%)	0 (0%)	1 (3%)	6 (3%)
질환 지속 시간 (년)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	평균	3.2	4.2	3.3	3.4	3.7	3.1	3	3.4
	Sd	2	2	1.7	2.1	2	1.8	2.2	2
	최소	0.3	0.2	0.4	0	0.7	0.4	0	0
	최대	7	7.5	6.8	7.3	7.6	7	7.1	7.6

도면1b

인구통계 데이터 -2-

		플라시보 N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	전체 N=214
성별	남성	6 (19%)	4 (15%)	9 (28%)	10 (31%)	9 (28%)	9 (31%)	7 (23%)	54 (25%)
	여성	26 (81%)	22 (85%)	23 (72%)	22 (69%)	23 (72%)	20 (69%)	24 (77%)	160 (75%)
연령	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	평균	48.3	46.9	46.2	51.5	49.3	50.8	45.6	48.4
	Sd	11.7	12.2	13.4	11.5	8.8	10.7	10.1	11.3
	최소	22	25	21	24	27	24	28	21
	최대	66	64	64	66	66	65	64	66
체중 (kg)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	평균	72.9	70.6	72.7	70	69.8	68.9	71.7	71
	Sd	13.5	17.4	14.4	16.7	12.8	12.1	15.8	14.6
	최소	46.7	45	50	40.1	48	47	39.2	39.2
	최대	98.2	101.3	99	101.3	95	93.8	99	101.3
질환 활성도 (환자)	N	32	26	32	32	32	29	31	215
	평균	3.6	3.6	3.7	3.6	3.5	3.6	3.5	3.6
	Sd	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8
	최소	2	2	2	2	2	2	2	2
	최대	5	5	5	5	5	5	5	5

도면1c

인구통계 데이터 -질환-

		플라시보 N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	전체 N=214
질환 활성도 (치료자)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	평균	3.6	3.5	3.5	3.7	3.4	3.4	3.5	3.5
	Sd	0.7	0.6	0.8	1	0.6	0.8	0.6	0.7
	최소	2	3	2	2	2	2	3	2
	최대	5	5	5	5	5	5	5	5
ESR	N	32	26	32	32	32	29	30	213
	평균	43.3	35.2	41.6	36.3	29.8	40.9	39.3	38.1
	Sd	29.4	22.5	27.4	27.9	24.2	30.2	24.6	26.8
	최소	2	4	4	3	0	6	2	0
	최대	116	90	94	98	91	110	102	116
신체 기능 (스코어)	N	32	26	31	32	32	29	31	213
	평균	16.8	15.5	16.2	17.1	15.3	16.3	16.1	16.2
	Sd	5.4	4.2	5.5	5.7	3.7	4.8	3.8	4.8
	최소	8	8	8	8	8	8	9	8
	최대	32	23	26	28	24	26	26	32
CRP	N	30	23	31	31	31	28	31	205
	평균	56.7	26.4	48	33.6	28.1	48.1	37.5	40.1
	Sd	62.7	30.3	47.3	46	39.1	64.5	35.2	48.6
	최소	2	5	3	3	3	3	3	2
	최대	248	115	198	182	200	333	135	333

도면1d

인구통계 데이터 -질환-

		플라시보 N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	전체 N=214
암종성 관절 (스코어)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	평균	32.1	32.5	32.1	29.4	25.6	30.7	30.6	30.4
	Sd	14.8	14.8	15	14.6	12	13.3	12.9	13.9
	최소	12	14	11	12	12	12	12	11
	최대	63	64	68.	68	61	63	59	68
부종성 관절 (스코어)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	평균	23.9	18.6	26.9	22.7	18.3	22.6	19.9	21.9
	Sd	10	6.3	11.4	12.7	7.6	8.5	8.9	10
	최소	10	10	10	10	10	10	10	10
	최대	51	33	53	58	36	40	44	58
동통 (스코어)	N	32	26	32	32	32	29	31	214
	평균	3.5	3.4	3.5	3.5	3.5	3.3	3.5	3.5
	Sd	0.9	0.6	0.6	1	0.7	0.8	0.7	0.8
	최소	2	2	2	1	2	2	3	1
	최대	5	5	5	5	5	5	5	5
AM 경직 (분)	N	31	26	32	31	32	29	30	211
	평균	156.6	211.5	145.2	149.5	160.9	160.3	147.5	160.5
	Sd	121.5	370.6	102.1	148.7	151.1	152.3	258.3	198.1
	최소	30	0	5	35	30	0	15	0
	최대	600	1440	420	720	600	720	1440	1440

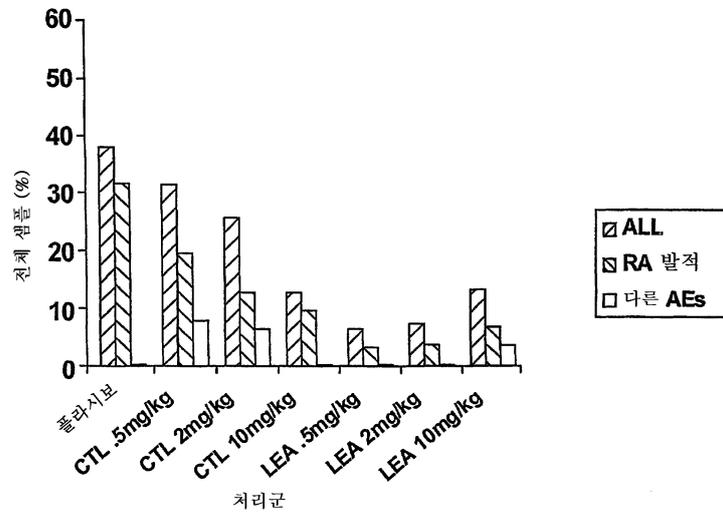
도면1e

인구통계 데이터 -사전 치료-

		플라시보 N=32	CTLA .5 N=26	CTLA 2 N=32	CTLA 10 N=32	LEA .5 N=32	LEA 2 N=29	LEA 10 N=31	전체 N=214
엔타네르셉트	치료	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	비치료	32 (100%)	26 (100%)	32 (100%)	32 (100%)	32 (100%)	29 (100%)	31 (100%)	214 (100%)
메트렉세이트	치료	23 (72%)	22 (85%)	26 (81%)	24 (75%)	24 (75%)	21 (72%)	28 (90%)	168 (79%)
	비치료	9 (28%)	4 (15%)	6 (19%)	8 (25%)	8 (25%)	8 (28%)	3 (10%)	46 (21%)
기타 DMARDs	치료	28 (86%)	23 (88%)	25 (78%)	26 (81%)	28 (86%)	24 (83%)	25 (81%)	179 (84%)
	비치료	4 (13%)	3 (12%)	7 (22%)	6 (19%)	4 (13%)	5 (17%)	6 (19%)	35 (16%)
C-스테로이드	치료	31 (97%)	26 (100%)	29 (91%)	27 (84%)	27 (84%)	28 (97%)	24 (77%)	192 (90%)
	비치료	1 (3%)	0 (0%)	3 (9%)	5 (16%)	5 (16%)	1 (3%)	7 (23%)	22 (10%)
NSAIDs	치료	27 (84%)	20 (77%)	30 (94%)	29 (91%)	26 (81%)	25 (86%)	25 (77%)	181 (85%)
	비치료	5 (16%)	6 (23%)	2 (6%)	3 (9%)	6 (19%)	4 (14%)	7 (23%)	33 (15%)
기타	치료	30 (94%)	22 (85%)	29 (91%)	30 (94%)	31 (97%)	29 (100%)	29 (94%)	200 (93%)
	비치료	2 (6%)	4 (15%)	3 (9%)	2 (6%)	1 (3%)	0 (0%)	2 (6%)	14 (7%)

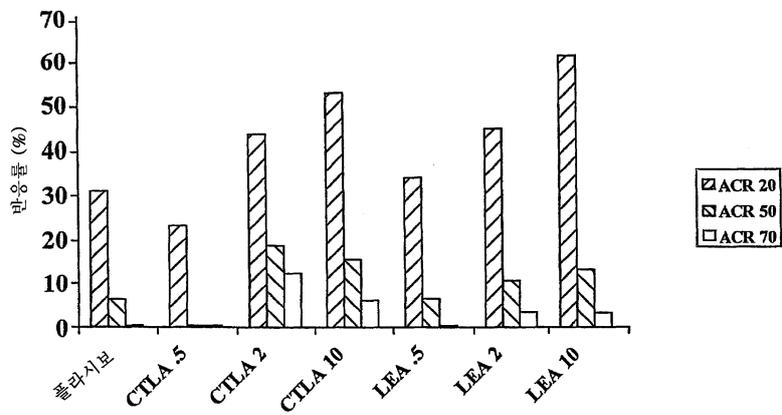
도면2

하기 원인으로 인해 제85일 또는 그전에 임상 연구를 중단한 환자에 대한 요약



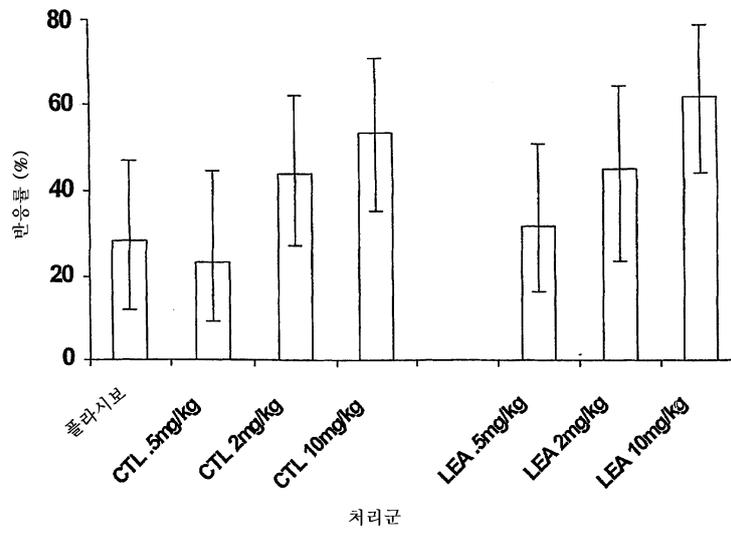
도면3a

제85일의 ACR 반응



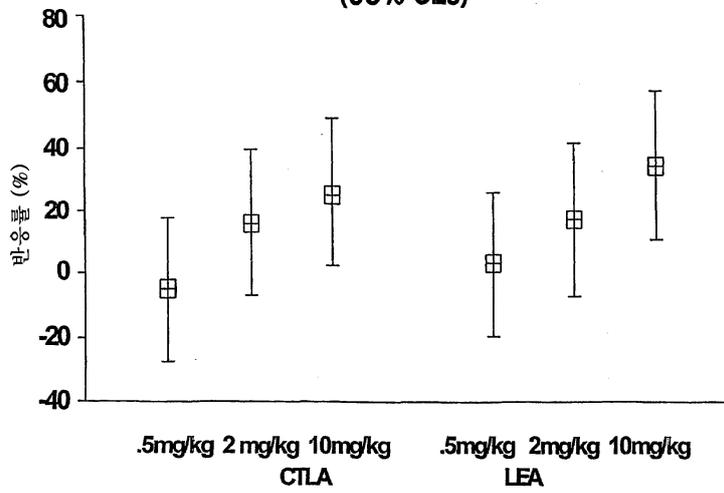
도면3b

신뢰 한계 95%를 갖는 제85일의 ACR-20 반응



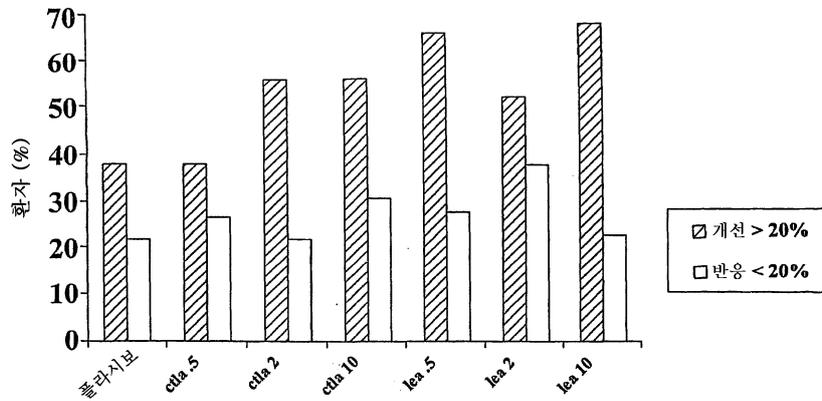
도면3c

제85일의 ACR-20 반응차 w.r.t (95% CLs)



도면4a

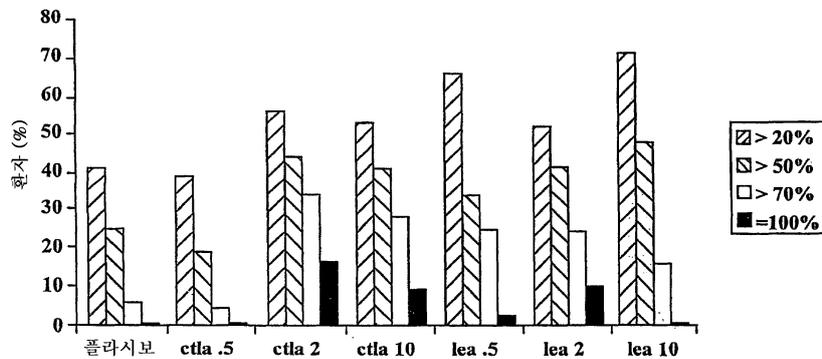
부종성 및 압통성 관절수에 대한 기초 (20%) 임상 반응



도면4b

제85일의 임상 반응

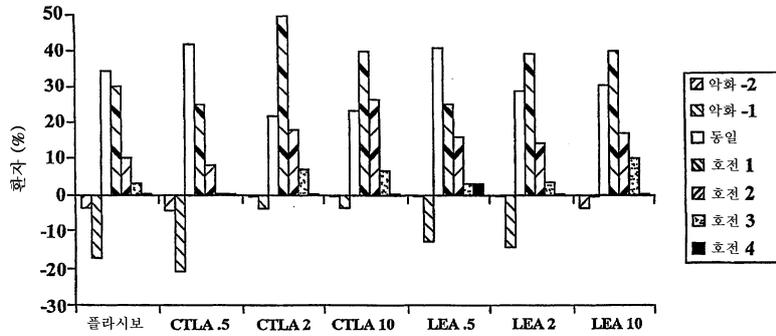
부종성 및 압통성 관절수에 대한 반응의 변화율 (%)



도면5a

동통 (리커트 척도 단위 변화)

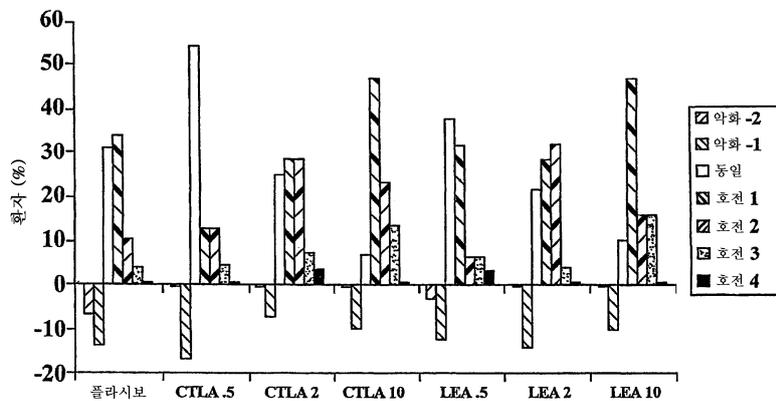
기저수준으로부터의 동통 스코어 변화



도면5b

환자 전체 질환 변화 (리커트 척도 단위 변화)

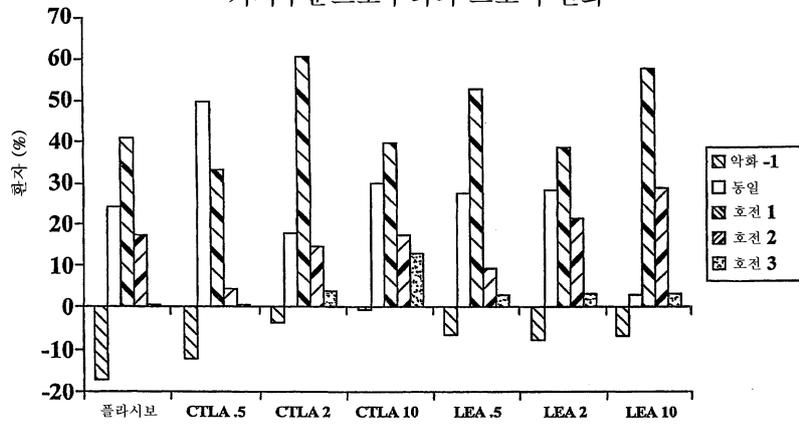
기저수준으로부터의 스코어 변화



도면5c

치료자 전체 질환 변화 (리커트 척도 단위 변화)

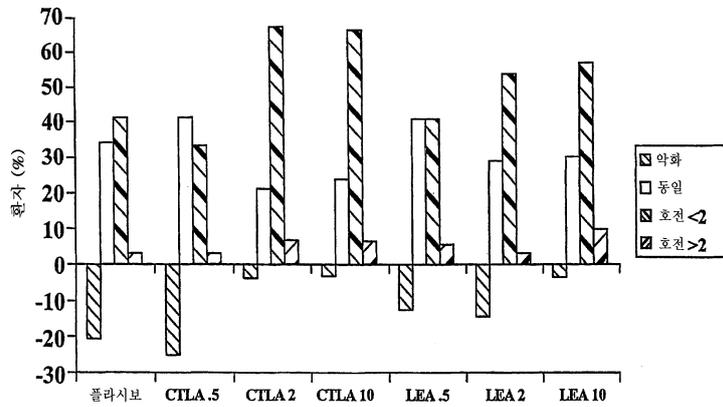
기저수준으로부터의 스코어 변화



도면5d

동통

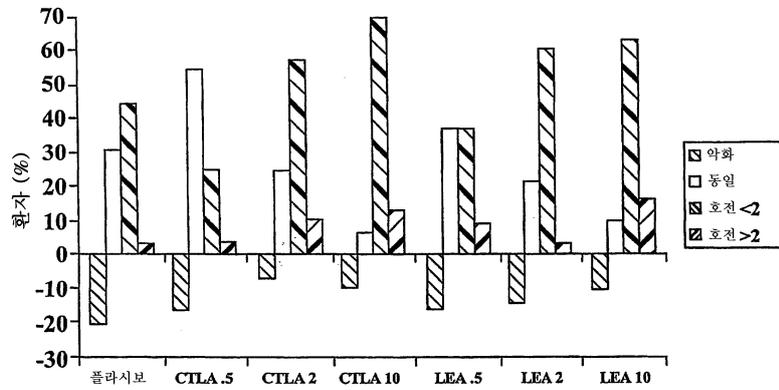
-기저수준으로부터의 변화-



도면6a

환자 전체 평가

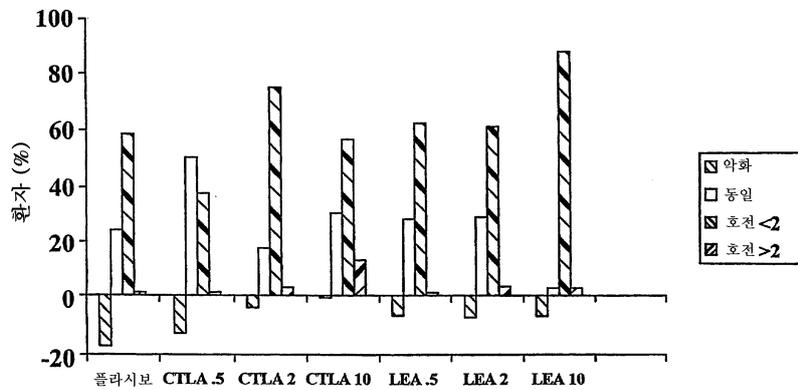
-기저수준으로부터 질환 활성화도 변화-



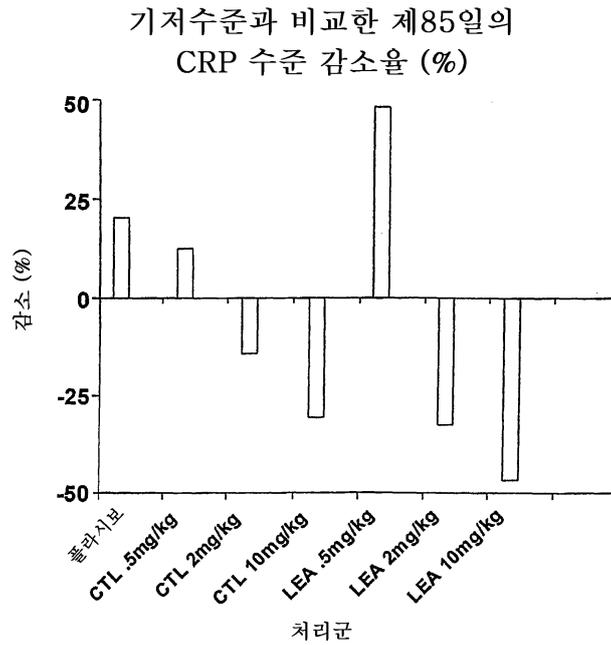
도면6b

치료자 전체 평가

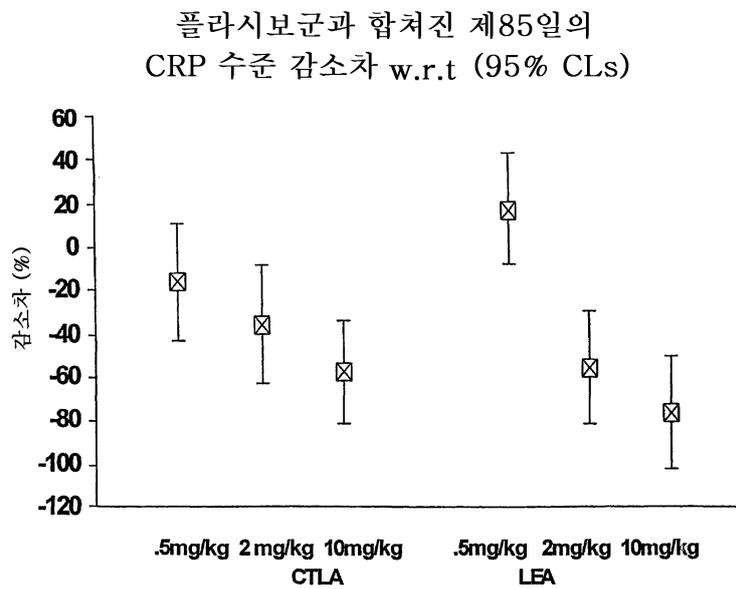
-기저수준으로부터 질환 활성화도 변화-



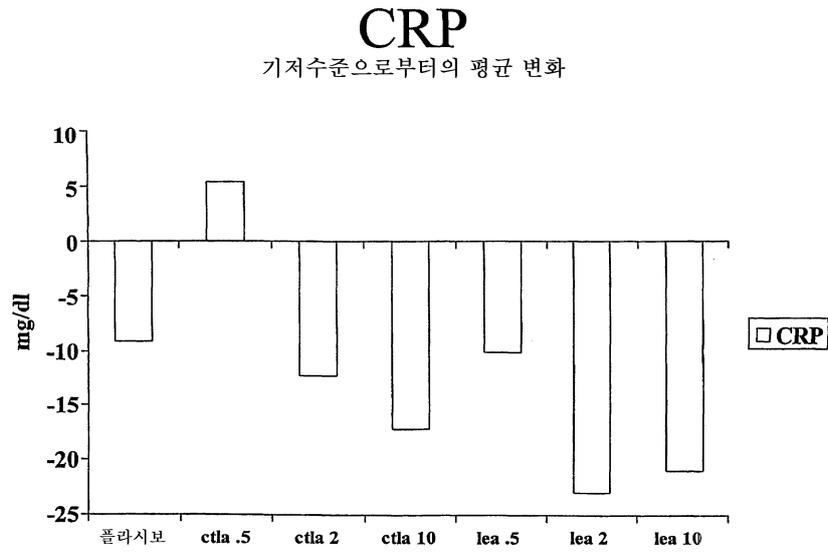
도면7a



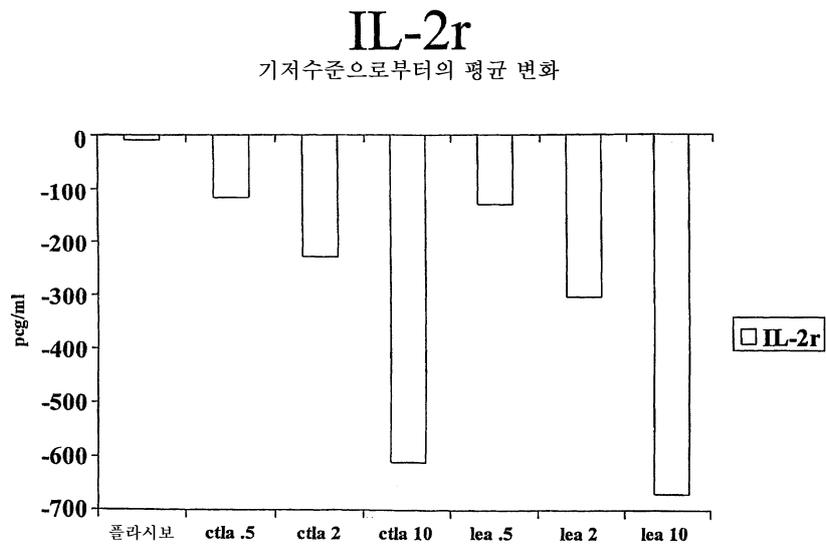
도면7b



도면7c



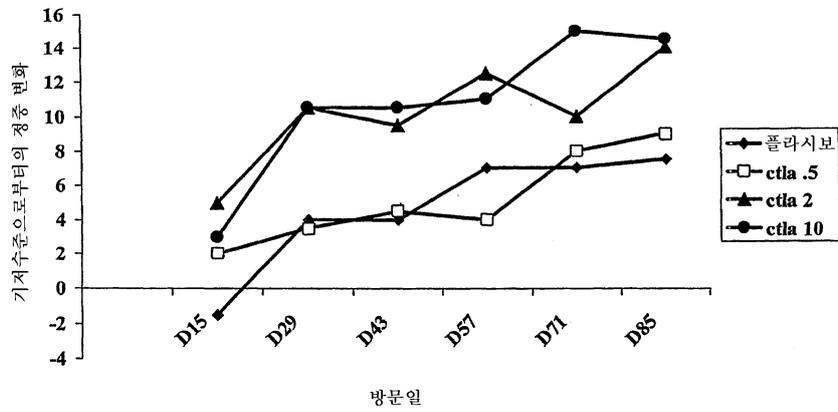
도면8



도면9a

CTLA 압통성 관찰

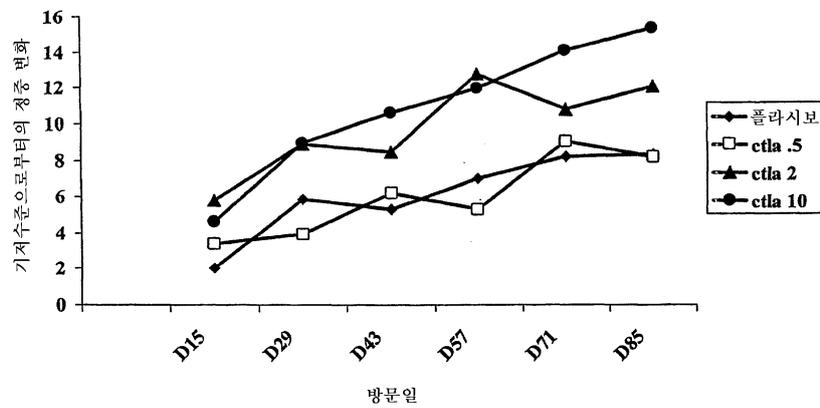
-기저수준으로부터의 정중차-



도면9b

CTLA 압통성 관찰

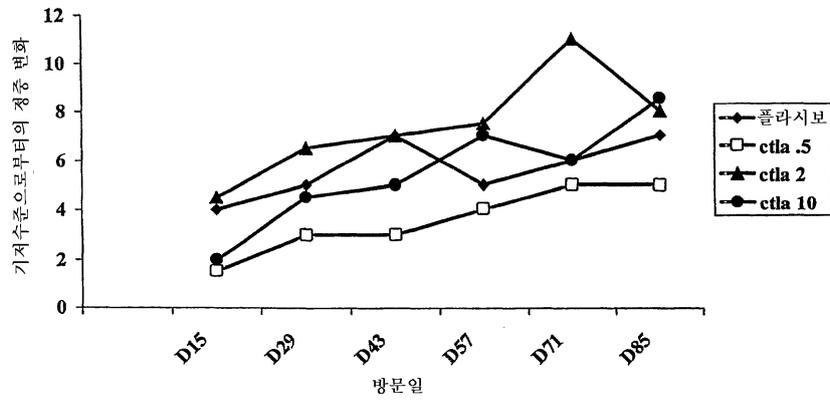
-기저수준으로부터의 정중차-



도면10a

CTLA 부종성 관절

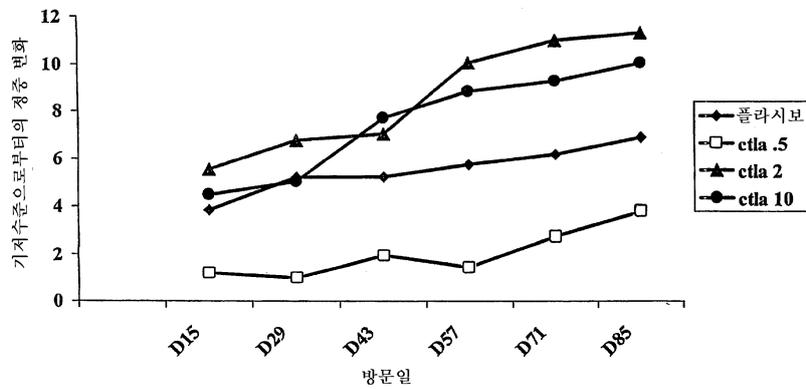
-기저수준으로부터의 정중차-



도면10b

CTLA 부종성 관절

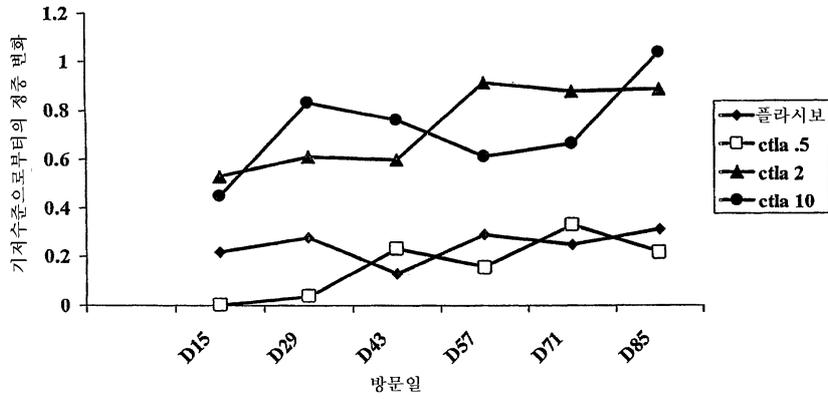
-기저수준으로부터의 정중차-



도면11

CTLA 동통 평가

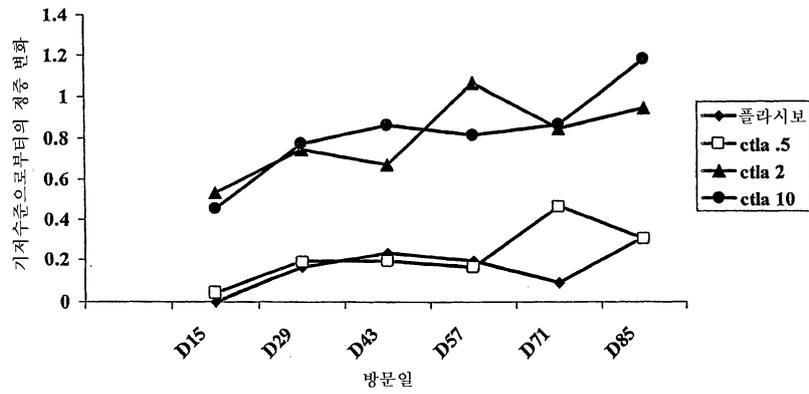
-기저수준으로부터의 정중차-



도면12a

CTLA 환자 평가 질환 활성도

-기저수준으로부터의 정중차-

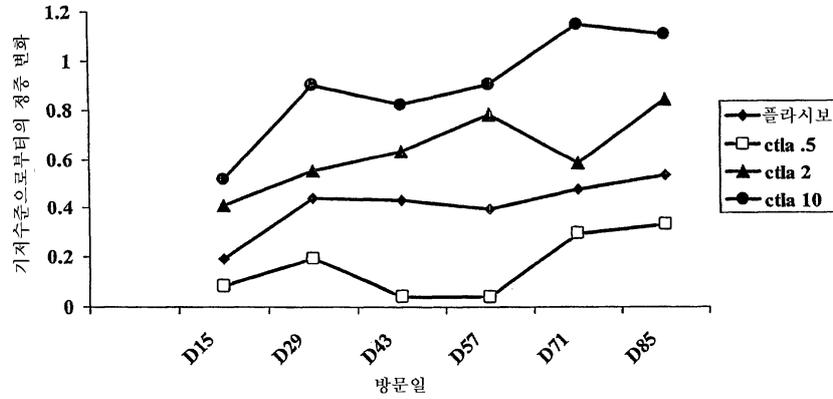


도면12b

CTLA

치료자 평가 질환 활성도

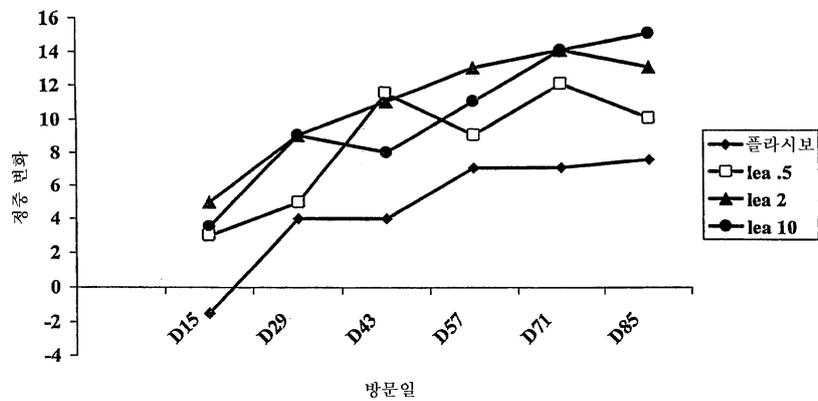
-기저수준으로부터의 정중차-



도면13a

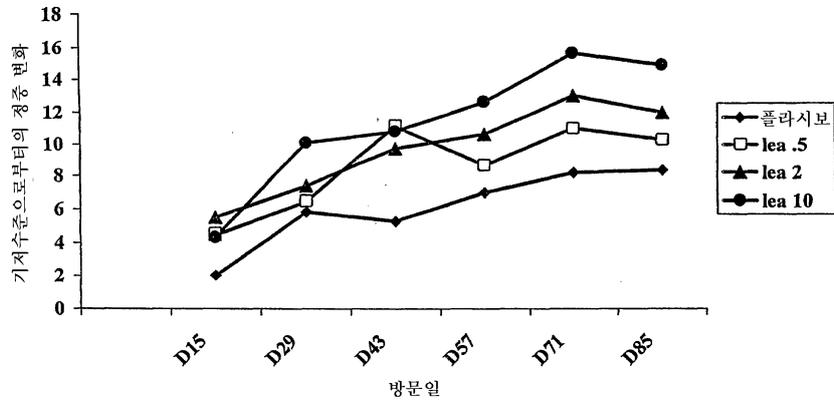
LEA 압통성 관절

-기저수준으로부터의 정중차-



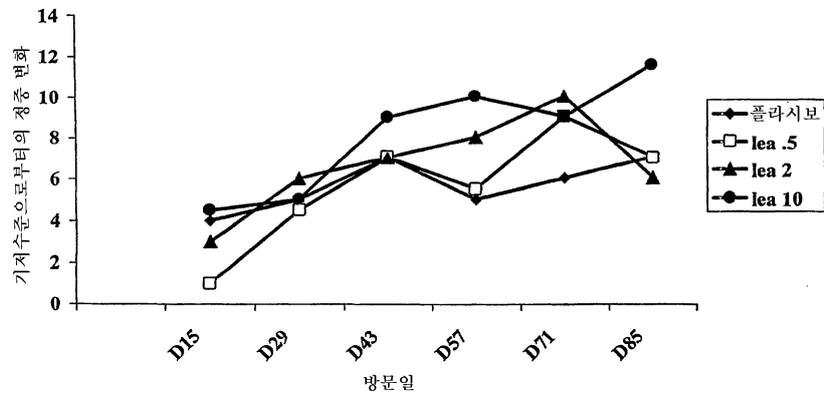
도면13b

LEA 압통성 관절 -기저수준으로부터의 정중차-



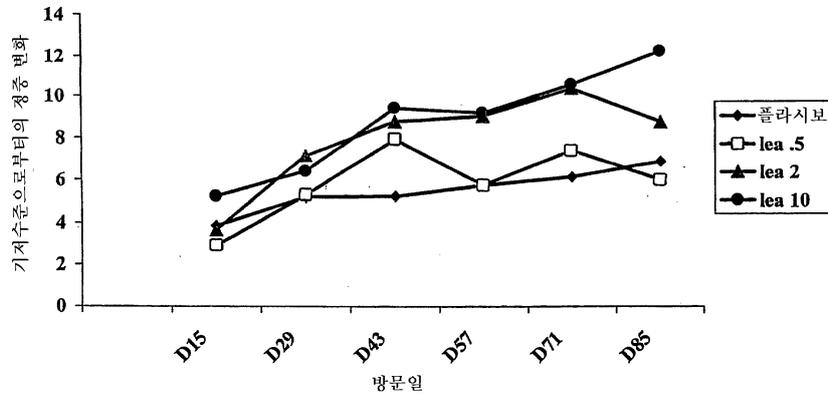
도면14a

LEA 부종성 관절 -기저수준으로부터의 정중차-



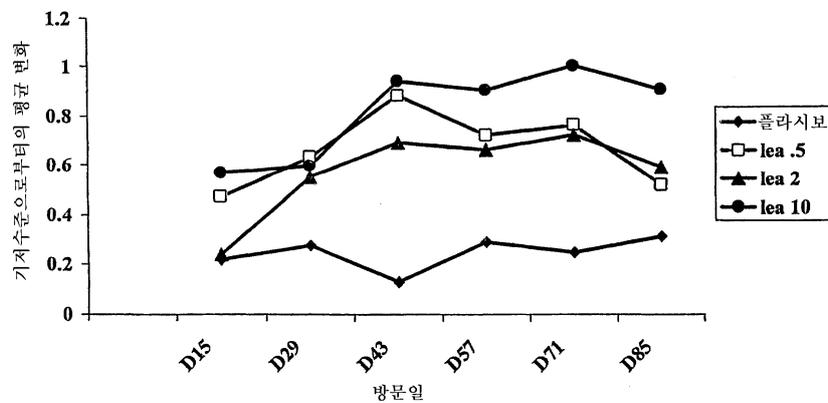
도면14b

LEA 부족성 관찰 -기저수준으로부터의 정중차-



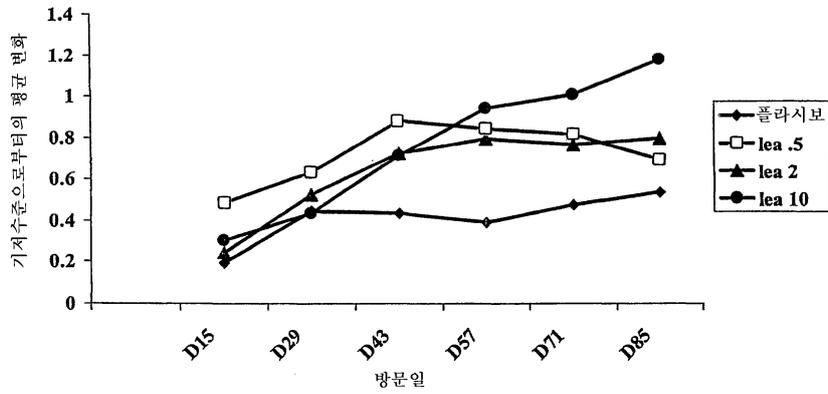
도면15

LEA 동통 평가 -기저수준으로부터의 평균 변화-



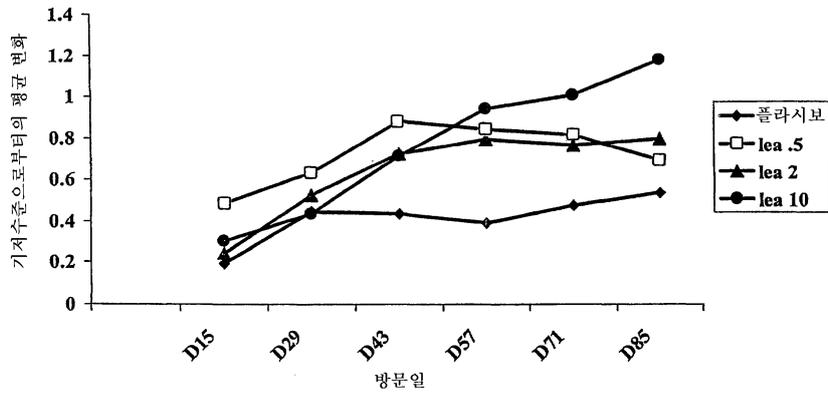
도면16a

LEA 치료자 평가 질환 활성화도 -기저수준으로부터의 평균차-



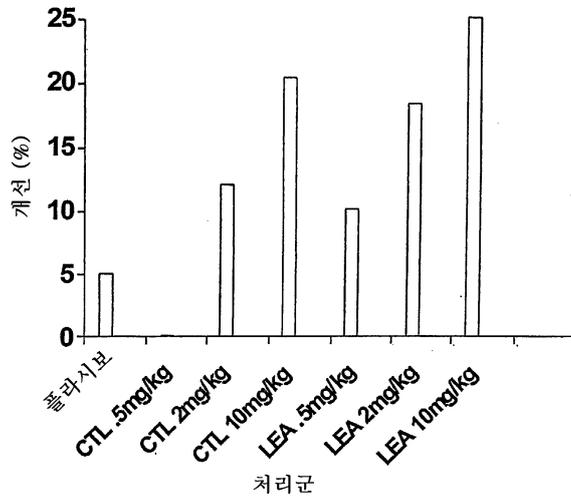
도면16b

LEA 치료자 평가 질환 활성화도 -기저수준으로부터의 평균차-



도면17

기저수준과 비교한 제85일의
HAQ 수준 개선율 (%)



도면18

ATGGGTGACTGCTCACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACCTCCTGTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--
-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--
+1
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGSTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--
+34
ACAGTCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--
+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATTCATCTGCACGGGCACTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--
+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGSCCATGACACCGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--
+94
GAGTCTATGTACCCACCGCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAAACCCAGATTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--
+114
ATTGATCCAGACCCGTCGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTCTGACAAACTCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--
+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAATCCTCCCGGGGATCGTCACTCTCCTCTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--S--S--V--F--L--F--P--
+154
CCAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCTGCTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--
+174
GACGTGAGCCACGAGACCCCTGAGTCAAGTTCACCTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--F--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--
+194
CATATGCCAAGCAAGCCGCGGGAGGACAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCCGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--
+214
GTCCTCACCCTCCTGCACCAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACRAGTGCRAAGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--N--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--
+234
ARCAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--
+254
GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCACTCCCGGRTGAGCTACCAAGAACCCAGGTGAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--
+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTARCCACAGCATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--N--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--
+294
GGGCGCCGGGAGAACAACTACAGACCCAGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGTCTCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--
+314
TTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGCAAGAGCAGTGGCAGCAGGGAAACGTTCTTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--G--N--V--F--S--
+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACCGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--
+354
CCGGTAAATGA
P--G--K--*

도면19

```

ATGGGTGACTGCTCACACAGAGACCGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCACCTCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--
-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--
+14
+1
GGCATCGTAGCTTTGTGTGATGATGCAATCCAGGCAAAATATACTGAGGTCCGGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--
+34
ACAGTGTCTCGGACGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--
+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCAGATGATCCATCTGCACGGGCACTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--
+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--
+94
GAGCTCATGTACCCAGCCGCACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--
+114
ATTGATCCAGAACCGTGGCCAGATTCTGATCAGGAGCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--R--T--H--
+134
ACATCCCCACCGTCCCGCAGCACTGCACTCCGGGGGATCGTCACTTCTCTTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--
+154
CCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--
+174
GACGTGAGCCCGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGCGCTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--
+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAACGACGACCTACCGTGTGGTCCAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--
+214
GTCTCACCCGCTCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--
+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--
+254
GAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCCAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--
+274
CTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--
+294
GGGACGCGGAGAACACTACAGACCCGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--
+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGACGCTCTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--
+334
TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAAGACCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--
+354
CGGGTAAATGA
P--G--K--*

```

도면20

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTTGCCTTGCCTCCCTGTTTCCA
 H--G--V--L--L--F--Q--R--E--L--L--E--V--L--A--L--L--P--P--
 AGCATGGCGAGCATGGCLATGCACGTGGCCAGCCCTGCTGTGTACTGGCCAGCAGCCGA
 S--H--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--P--A--V--V--L--A--S--S--S--R--
 GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTAGTATGCATCTCCAGGCAAAATGACTGAGTCCGSGGTG
 G--I--A--S--P--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--L--T--E--V--R--V--
 ACAFTGCTTGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAATCTGTGCGGCAJACTACATGATG
 T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--Q--Y--H--H--
 GGGAAATGAGTGCACCTTCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA
 G--H--E--L--R--P--P--L--D--D--S--I--C--T--G--R--S--S--G--N--Q--
 GTGAACTCAGTATCCAAAGGACTGAGGSCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG
 V--N--L--T--Q--G--L--R--A--M--D--P--G--L--Y--I--C--K--V--
 GAGCTCATGTACCCACGCCCATACTACGAGGCAATAGGCCAACGGAAACCAGATTTATGTA
 E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--P--Q--I--Y--V--
 ATTSATCCAGAAACGCTGCCAGATTCATGATCAGSAGGCCAAATCTTGTGACAAACTCAC
 I--D--P--H--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--
 ACATCCCCAGCGTCCCAAGCCTGALCTCCCTGGGGGATGCTGACTTCTCTCTCCCC
 P--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--S--S--V--P--L--P--P--
 CCAAAACCCLAGGACACCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCTGTGTGTG
 P--K--P--X--D--T--L--H--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--
 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAAGTTCAACTGTTACGTGAGCGCGTGGAGGTG
 D--Y--S--H--E--D--P--E--Y--K--F--N--M--Y--V--D--G--V--E--V--
 CATAAAGCCAAAGACAAAGCCGCGGGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCGTGTGTGAGC
 H--N--A--K--K--K--P--R--E--E--Q--Y--N--B--T--Y--R--V--V--S--
 GTCTCACCGTCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCC
 V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--
 AACAAAGCCCTCCAGGCCCAATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGACCCCGA
 N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--
 GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGGTACGC
 E--P--Q--V--Y--F--L--P--P--B--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--
 CTGACCTGCTGTGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 L--T--C--L--V--K--G--P--Y--P--S--D--I--A--V--E--H--E--S--N--
 GGGCAGCCGAGAACTACAAGACCCGCTCCCGTGTGGACTCCGAGGCTCCTTC
 G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--R--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--
 TTCCTCFACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA
 F--L--Y--S--K--L--N--V--D--X--S--R--H--Q--G--N--V--P--S--
 TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACATACACGACAGAGGCTCTCCCTGTCT
 C--S--V--H--H--B--A--L--H--N--H--V--T--Q--X--G--L--S--L--S--
 CCGGGTAAATGA-----
 P--G--K--I-----

도면21

ATGGGTGTACTGCTCACACAGGACCGCTGCTCAGTCTGGTCTGCACTCCCTGTTCCA
 H G V L T T Q R T L S L V L A S S A
 AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA
 S M A G M A M E V A Q V V L A S S A
 GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGATGCAATCCAGGCAAACTACTGAGGTCCGGGTG
 G I A S V C Z Y A S P G K T V R V
 ACAGTGTCTCGGACGGCTGACAGCCAGGTGACTGAACTCTGTGGGCAACCTACATGATG
 Z V L R Q A D S V T E V C A A Y M
 GCGAATGAGTGGACCTTCCTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAAATCAA
 G N E L T P L D D S I C A G T S G N Q
 GTGAACTTCACTATCCAAAGGACTGAGGCCAATGACAGGGACTCTACATCTCCAAAGGTG
 V N L T I Q G L R A H D T G L Y I C K V
 QAGCTCATGTACCCACCGCCATACACAGGGCCTAGGCAACGGAACCCAGATTATGTGA
 Z L M Y P P P Y Y E G I G M T Q I Y V
 ATTGATCCGAAACCGTGGCCAGATTCTGATCAGGAGCCAAATCTTCTGACAAAATCTCAC
 I D P Z B P C P D S D Q E G S D K P H
 ACATCCCGACCGTCCCGACCGTGAACCTCTGGGGGATCGTCACTTCTCTCCCC
 T S P B P A P B L G S V P L P
 CCAAAACCCAAAGGACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCCACTGCGTGGTGGT
 P K P K D T L H I S R T P Z V T C V V
 GACCTGAGCCACGAAGACCGCTGAGGTCAAAGTTCAACTGCTACGTGACGGCCGTGGAGGTG
 D V S H B D P E V K F N W Y V D G V E V
 CATAAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGACAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGTCAGC
 H N A K T K P K B S Q Y N S T Y R V V S
 GTCTTACCGTCCCTGACACAGGACTGGTGAATGGCAAGGATACAAATGCAAGTCAAGTCTCC
 V L T V L H Q D W L N G X E Y K C K V S
 AACAAAGCCCTCCAGCCCGCATCGAGAAACCAATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGA
 N X A L P A P I E K H I S X A K G P R R
 GAAACACAGGTGTACACCCCTGCCCGATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTCAAGC
 E P Q V Y T L P P S R D B L T K N Q V S
 CTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
 L T C L V K G P Y P S D I A V B W B S N
 GGCAGCCGGAGAACTACAAGACCCAGCCCTCCCGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
 G Q P E N N Y K R T P P V L D S D G S P
 TTCTCTACAGCAAGCTCACCCCTGGACAAAGCAGGTTGGCAGCGGGAAACGCTTCTCA
 F L Y S K L R V D K S R H Q G N V P S
 TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGACAAACCACTACACGCAAGAGCCCTCTCCCTGCT
 C S V H H B A L H N H Y T Q K S L S L S
 CCGGTAAATGA-----
 P G K

도면22

```

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGGCTGCTCAGTCTGGTCCCTTGCACCTGTTCCCA
M--G--V--L--L--L--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--
AGCATGGGAGCATGCAATGCACGTTGGCCAGCCCTGCTGTGCTAGCCAGCAGCCGGA
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--
GGCATGCGTAGCTTTGTGTGTGAGTATCCATCTCCAGCCAAATGGACTGAGGTCCGGGTG
G--I--A--S--F--V--C--B--Y--A--S--P--G--X--H--T--B--V--R--V--
ACAATGCTTGGCAGSCTGACAGCCAGSTGACTGAAAGTCTGTGGGCAACCTACATGATG
T--V--L--A--Q--A--D--S--Q--V--T--B--V--C--A--A--Z--Y--M--M--
GGGATGAGTGTACCTTCCTAGATGATTCCTGATGCAAGGGCACCCTCCAGTGGAAATCAA
G--H--B--L--F--P--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--
GTGAACTCAGTATCCAGAGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--N--G--L--Y--I--C--K--V--
GAGCTCAGTACCCACCGCCATACCTACGAGGCCATAGCCAAAGCAACCCAGATTATGTA
Z--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--B--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--
ATTGATCCAGAACCGTCCCGAGATCTGTATCAGGACCCCAATCTTCTGACAAAATCAAC
I--D--P--B--P--C--P--D--S--D--Q--S--P--K--S--S--D--K--T--H--
ACATCCCAACCCCTCCCGACCTGAACTCTGTTGGGGATCCTCAGTCTTCTCTCCCC
T--S--P--P--P--P--A--P--H--L--G--G--S--S--V--P--L--P--P--
CCAAAACCCAGCAGCACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCCGTGGTGTG
P--K--P--X--D--T--L--M--I--S--R--P--P--Z--V--T--G--V--V--V--
GACGTGAGCCACGAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAGTGTACGTGGACGGCCTGGAGGTG
D--V--S--H--B--D--P--B--V--X--F--M--M--Y--V--D--G--V--B--V--
CATAAATGCCAAGCAGCAGCCCGGGAGGAGCATACACAGCACCTACCTGTGGTTCAGC
H--N--A--X--T--K--P--R--B--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--
GTCTCACCCTCTCTGCAACGAGCTGGCTGAATGGCAAGGATACAAATGCCAAGGTCTCC
V--L--T--V--L--H--Q--D--M--L--N--G--K--B--Y--X--C--K--V--S--
AACAAAACCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAATCTCCAAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGA
N--K--A--L--P--A--P--I--Z--K--T--I--S--K--A--K--Q--P--K--
GAACCCAGBTGTACACCTCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAC
Y--P--Q--V--V--L--P--P--S--R--D--B--L--T--K--N--Q--V--S--
CTGACCTGCTGTCTCAAGGCTTCTATCCAGCGCATTCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--B--W--B--N--
GGCAGCCGGAGAACAACTACAGACCAACCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCTCTC
G--Q--P--B--M--H--Y--K--T--P--P--P--V--L--D--S--D--G--S--P--
TTCTCTACAGCAGCTCACCTGGACAAAGAGAGGTGGCAGCAAGGAACTCTTCTCA
P--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--M--Q--G--N--V--P--S--
TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAAACCACTACACGCAAGAGGCTCTCCCTGTCT
C--S--V--M--H--Z--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--
CCGGTAAATGA-----
P--G--K-----

```

도면23

은코스타인 M 신호 펩티드

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

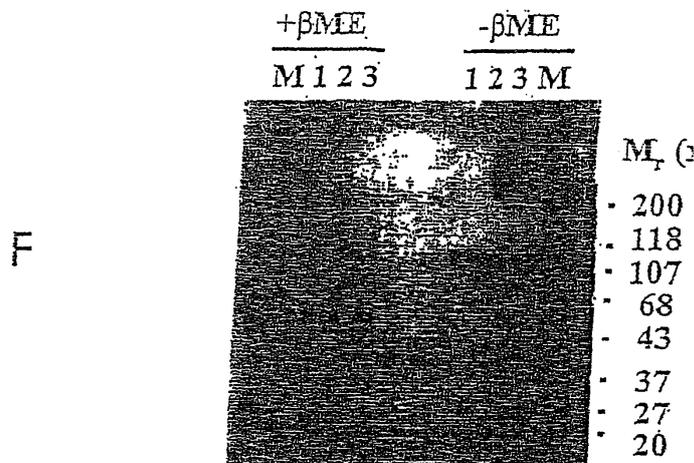
T E P E C E K Q F Q P Y F I P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC 630

I N
ATC AAT 636
    
```

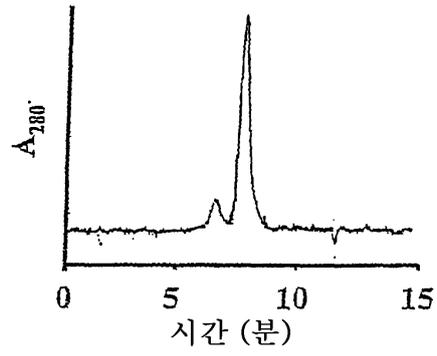
도면24

ATGGGTGTAAGTCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCTGCACTCCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7
AGCATGGCCAGCATGGCAATGCACTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--R--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
+1
GGCATCGTAGCTTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAGCCACTGAGSTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V-- +34
ACAGTCTCGCCAGGCTGACAGCCAGGTSACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54
GGGAATGAGTTGACCTTCTTAGATGATTCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGCCATGGACAGGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94
GAGCTCATGTACCACCCACTACTACCTGGSCATAGCAACGGAAACCGATTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114
ATTGATCCAGAACCSTGCCAGATTCATCAGGAGCCCAATCTCTGCAAAACTCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--E--P--K--S--D--K--T--H-- +134
ACATCCCACCCCTCCCAGCACCTGAACCTCGGTGGATGCTCAGTCTTCTCTTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154
CCAAAACCCAGGACACCOCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACTGCTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--E--V--T--C--V--V--V-- +174
GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194
CATAATGCCAAGACAAGCCCGGGGAGGAGCAGTACACAGCAGCTACCGGGTGGTCAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214
GTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGARTGGCAAGGACTACAGTGCAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254
GAACACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCCAGTCCAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--X--N--Q--V--S-- +274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--P--P--D--I--A--V--E--W--E--S--N-- +294
GGCCAGCCGGAGAACACTACAGACCAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGSCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--G--N--V--F--S-- +334
TGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGGCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354
CCGGTAAATGA
P--G--K--*

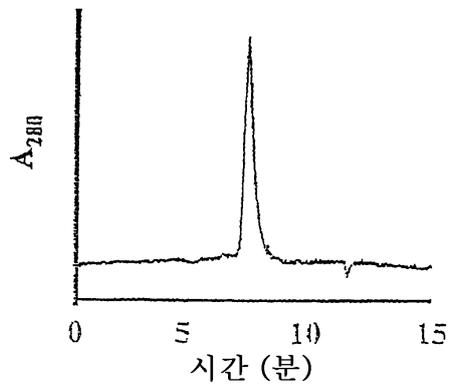
도면25a



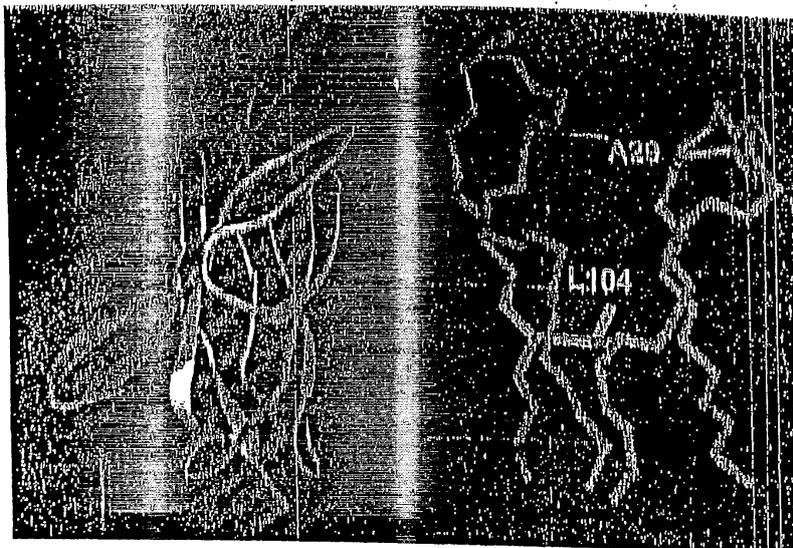
도면25b



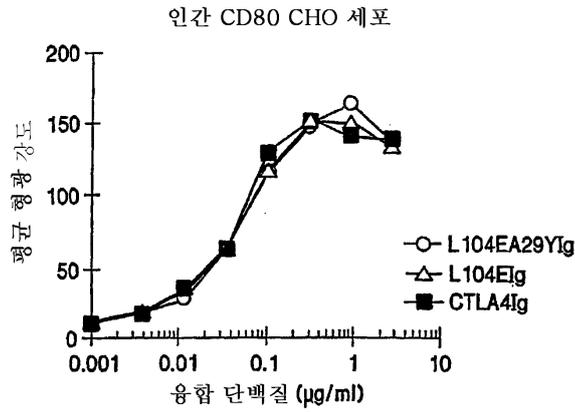
도면25c



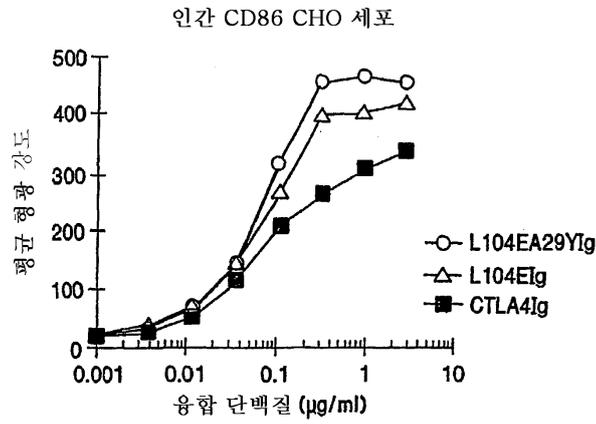
도면26



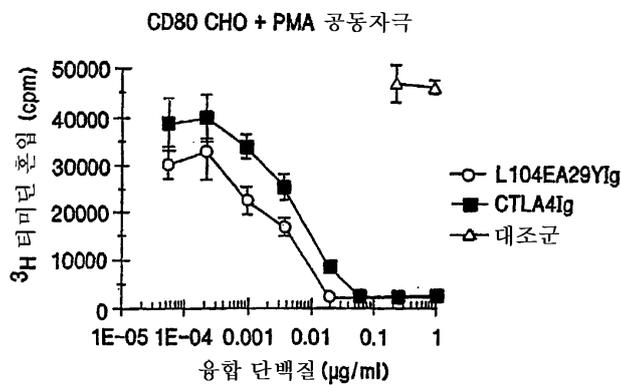
도면27a



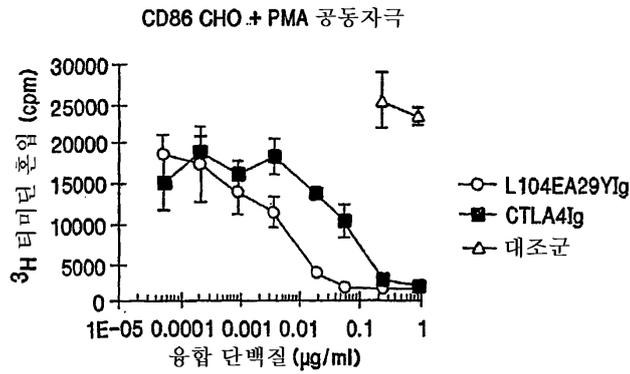
도면27b



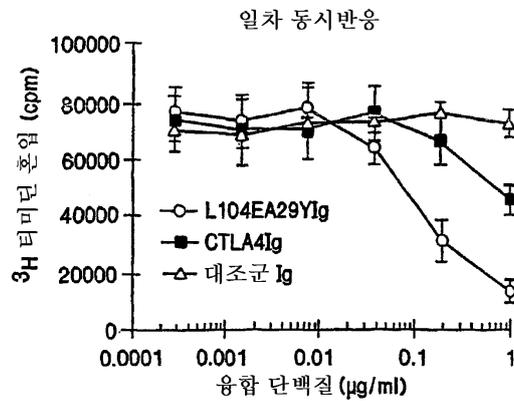
도면28a



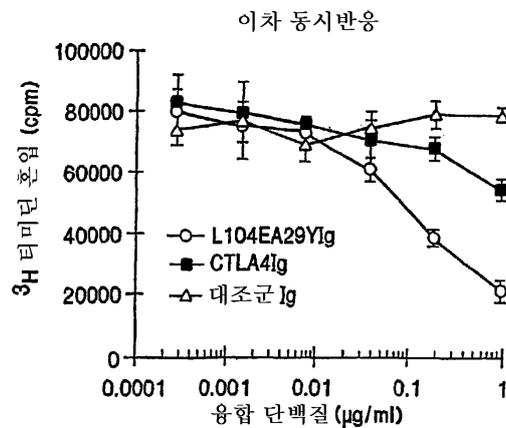
도면28b



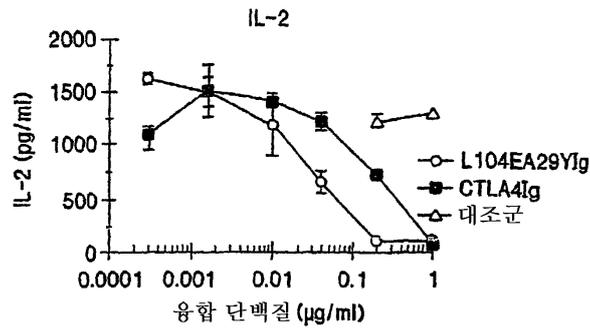
도면29a



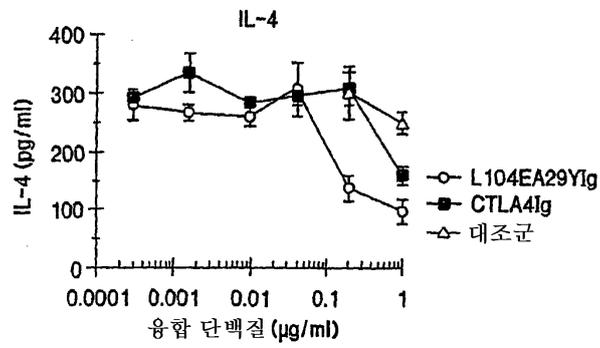
도면29b



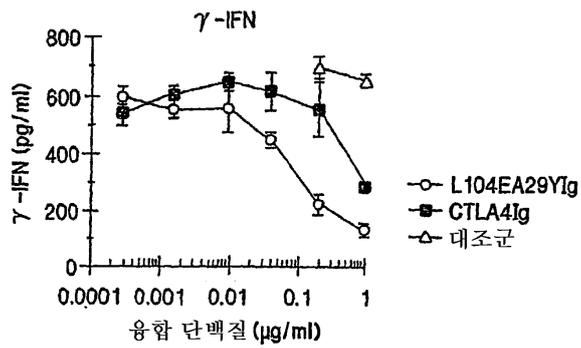
도면30a



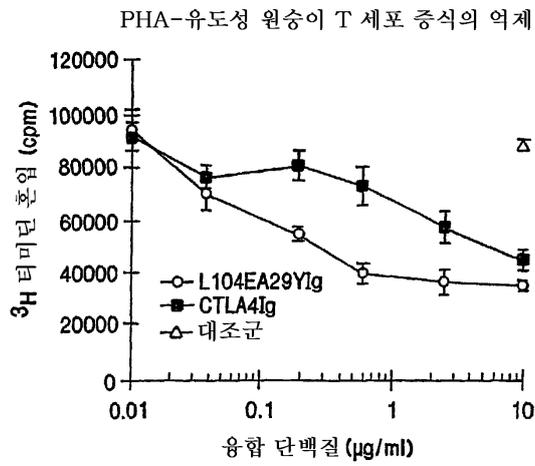
도면30b



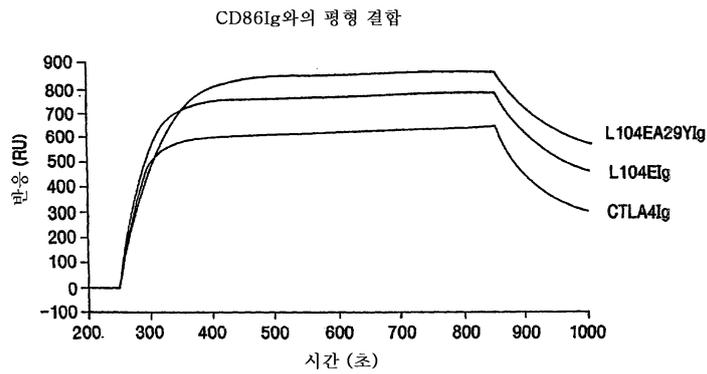
도면30c



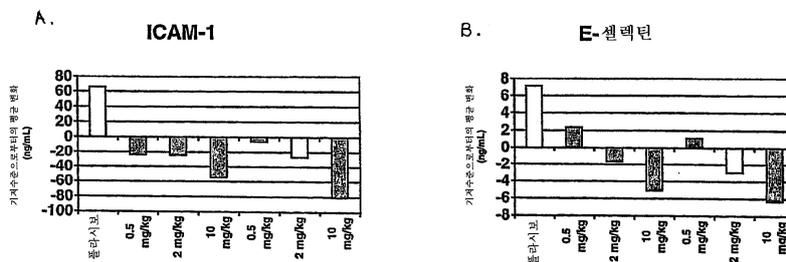
도면31



도면32

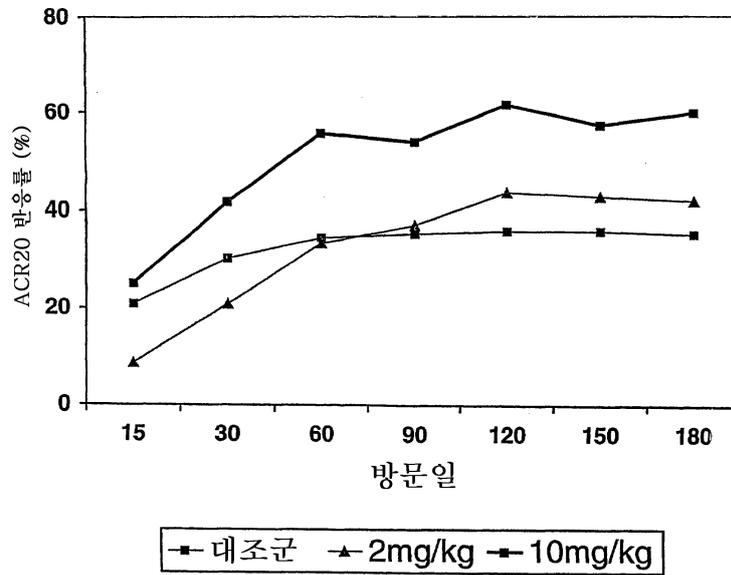


도면33



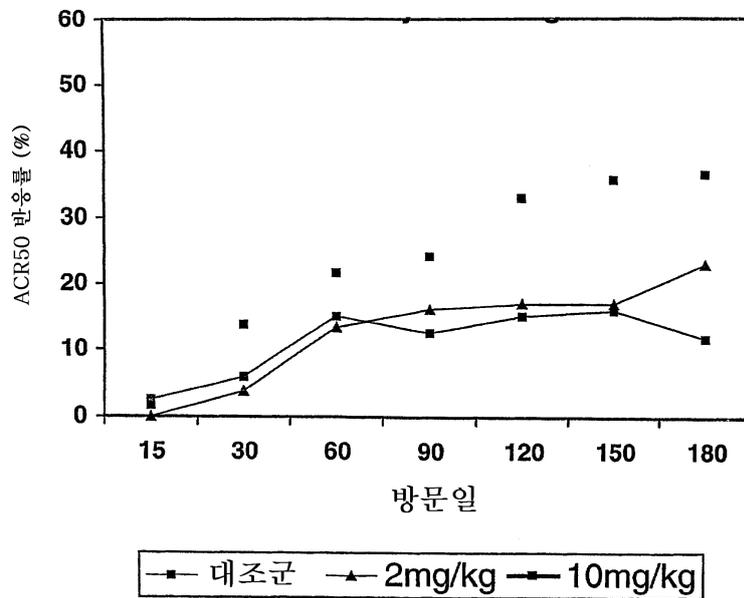
도면34

방문일에 CTLA4Ig 요법에서의 ACR20 반응 요약

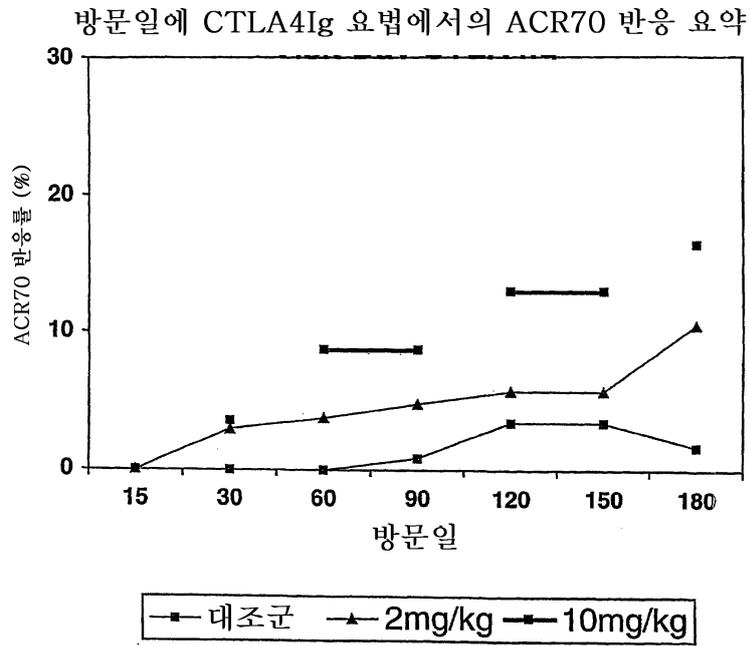


도면35

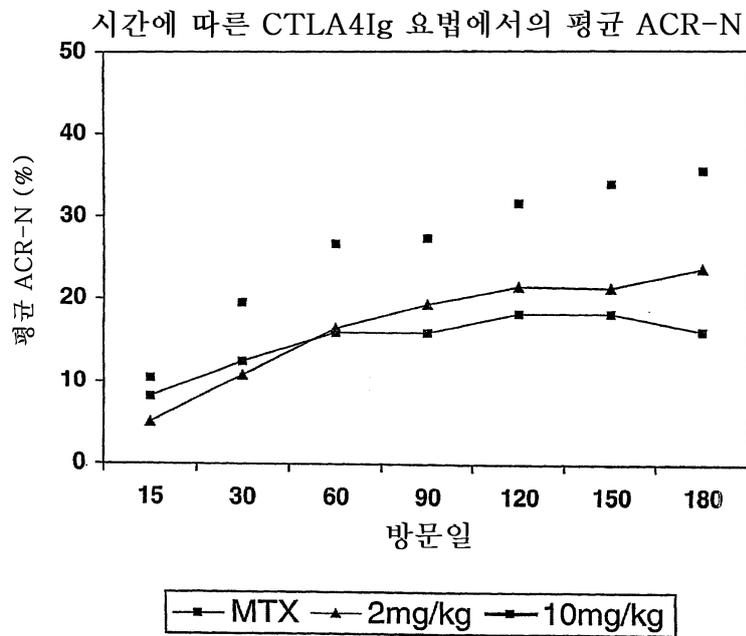
방문일에 CTLA4Ig 요법에서의 따른 ACR50 반응 요약



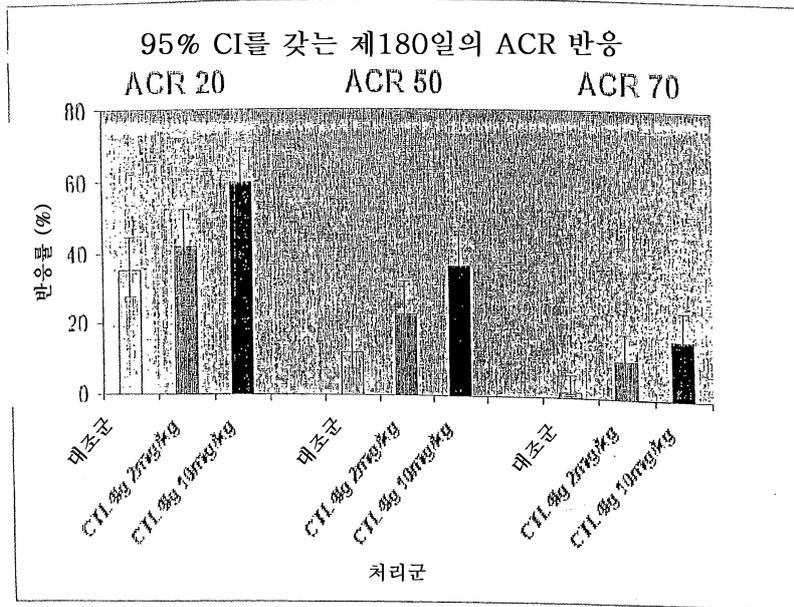
도면36



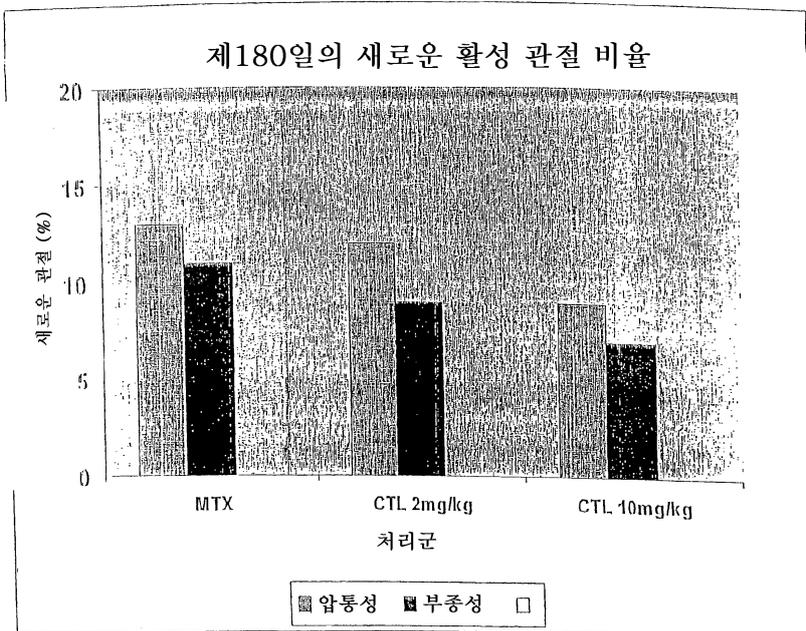
도면37



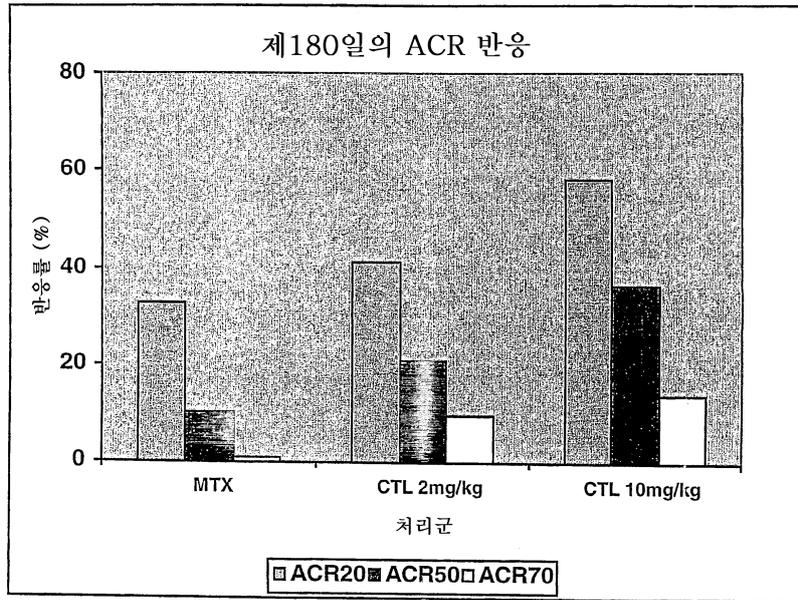
도면38



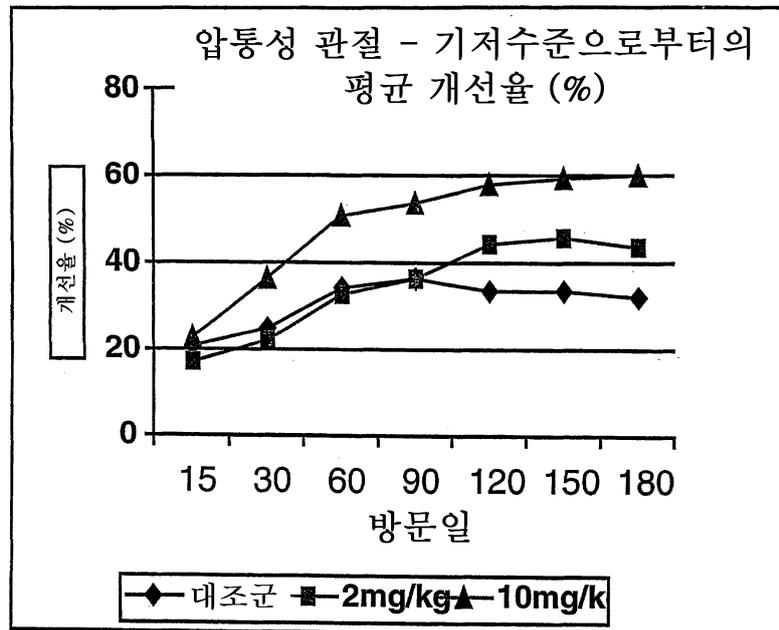
도면39



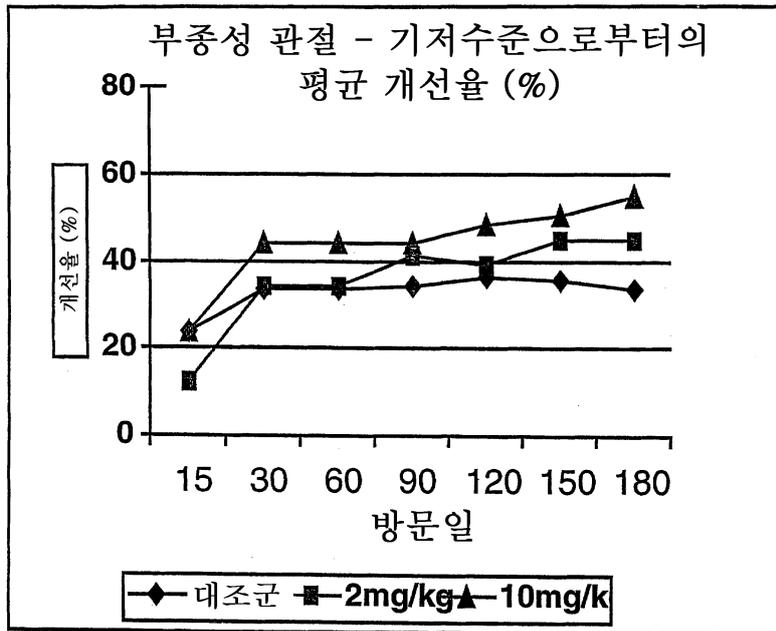
도면40



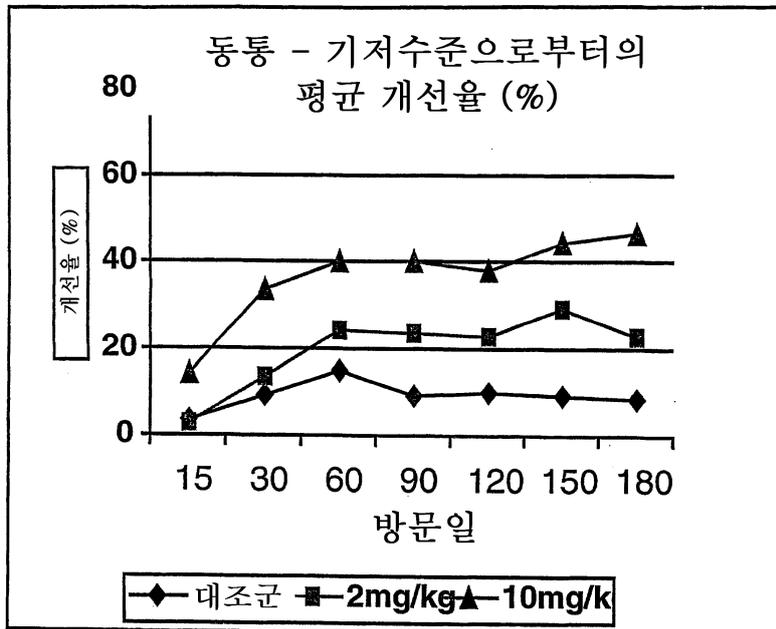
도면41



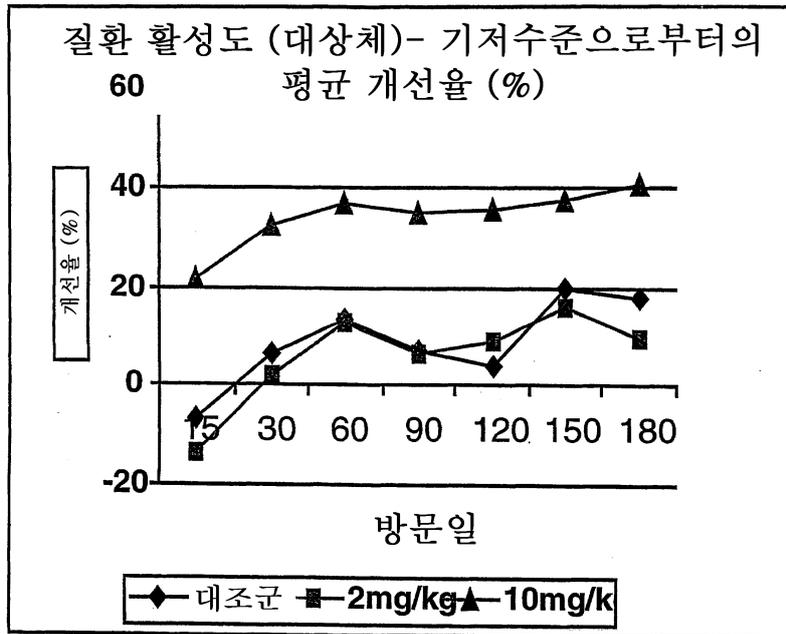
도면42



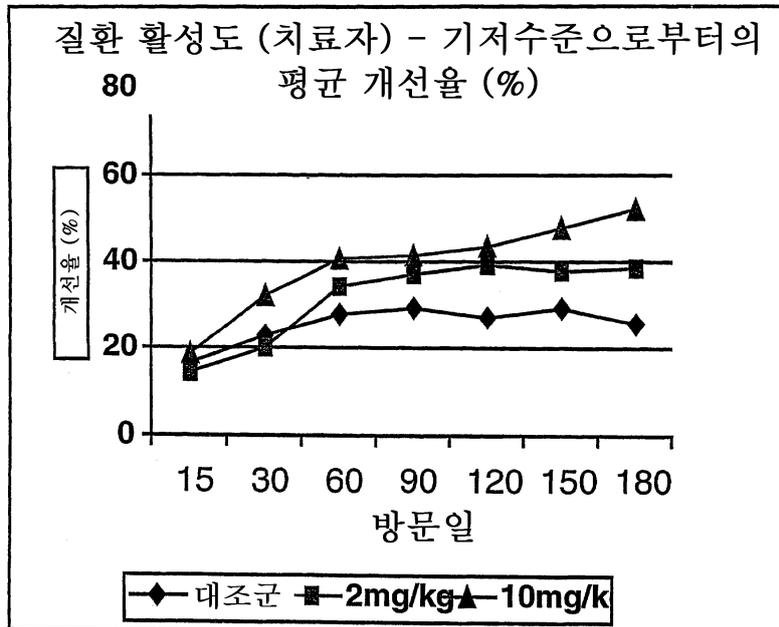
도면43



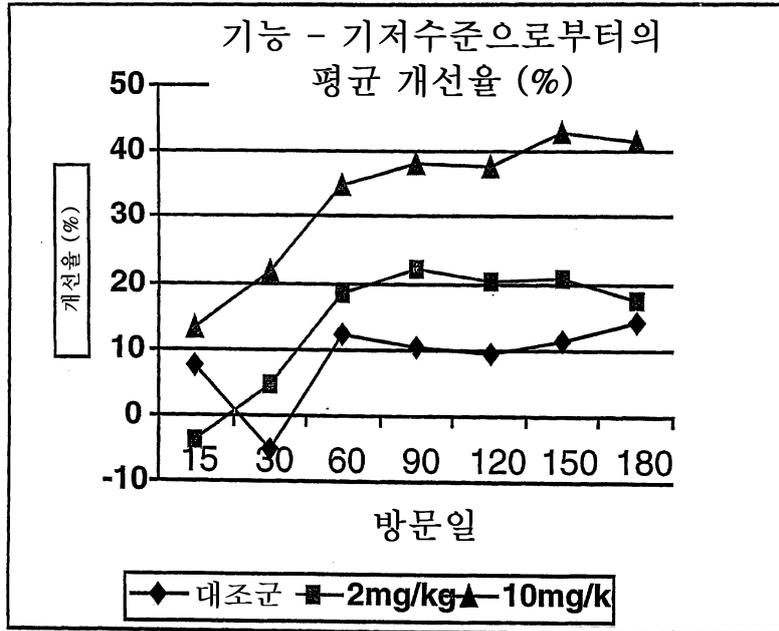
도면44



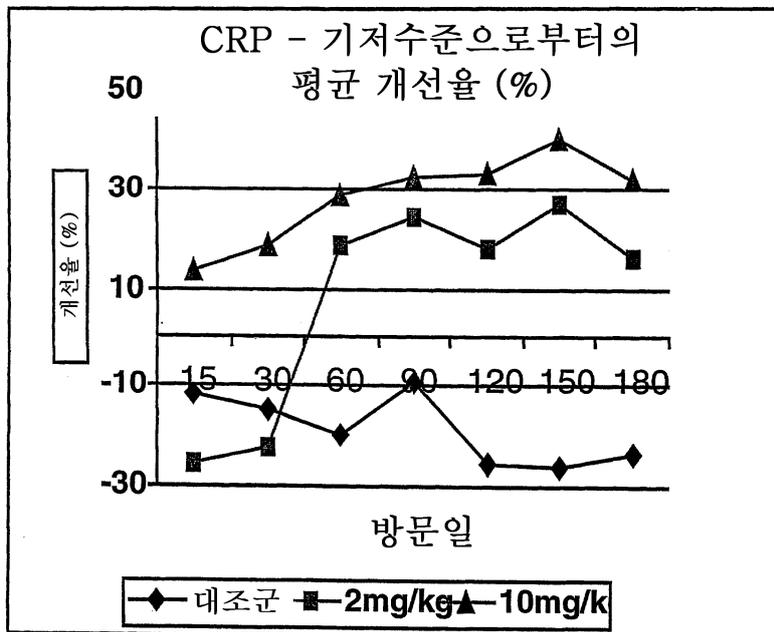
도면45



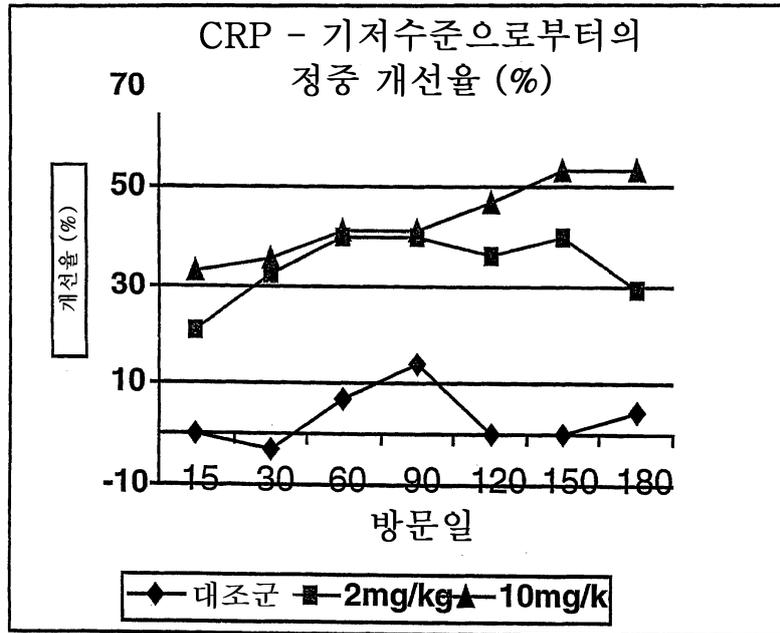
도면46



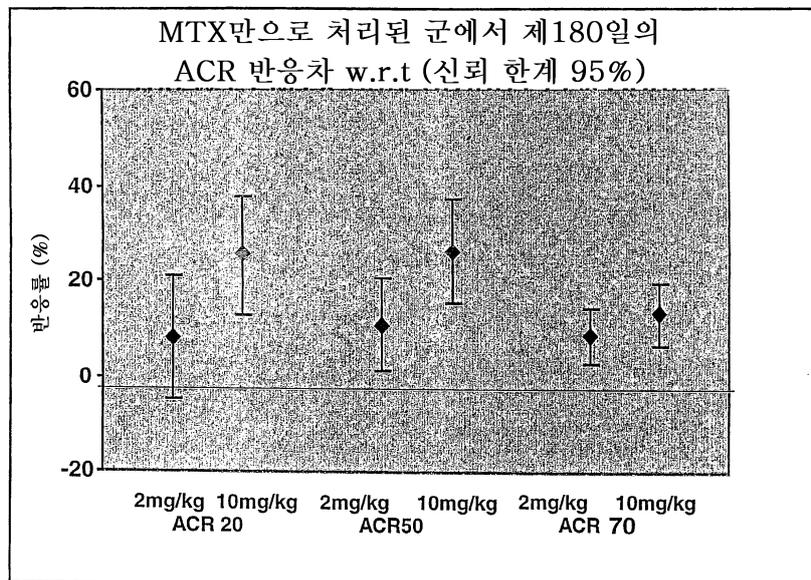
도면47



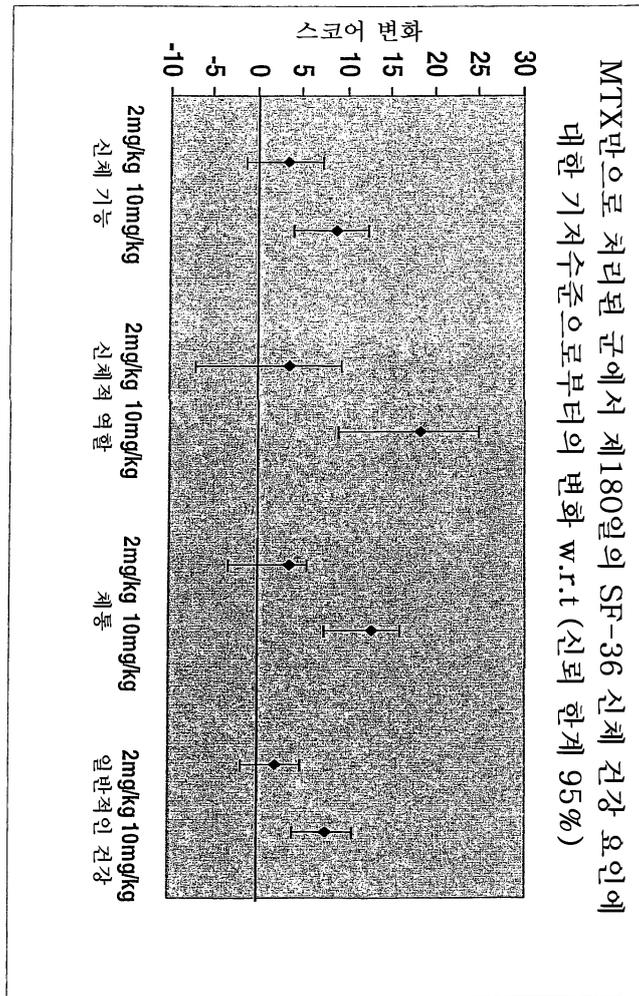
도면48



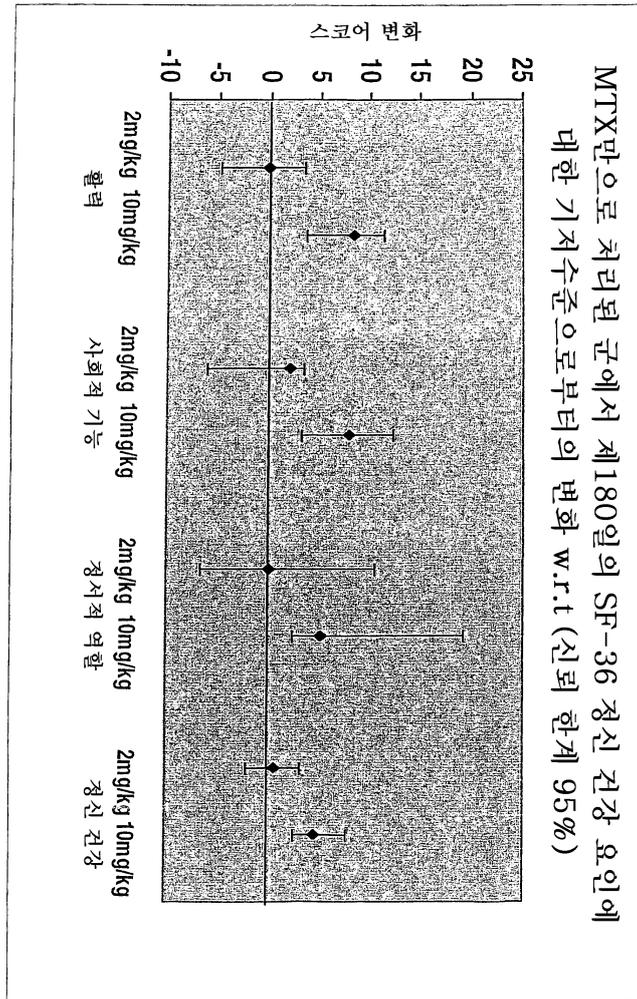
도면49



도면50

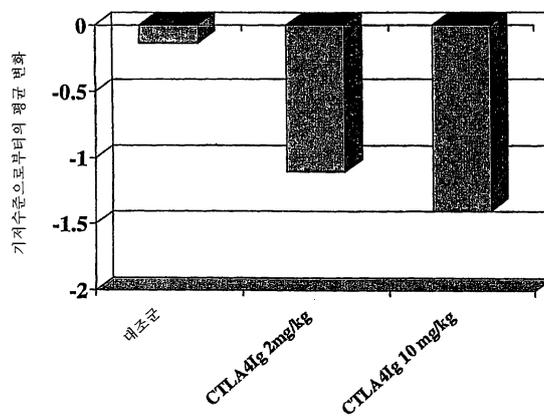


도면51



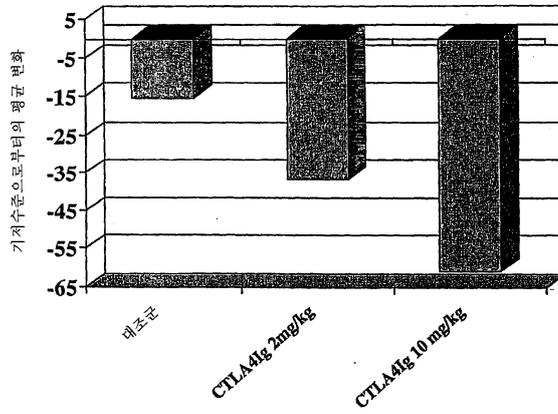
도면52

제180일의 CRP 수준



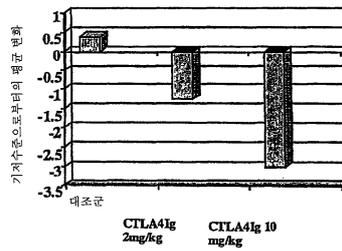
도면53

제180일의 류마티스 인자



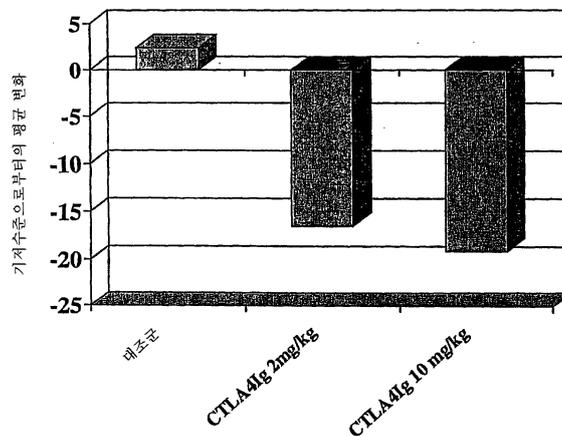
도면54

제180일의 IL-2r



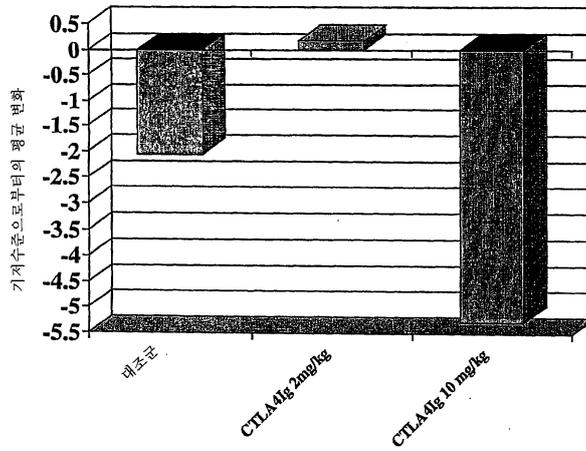
도면55

제180일의 IL-6



도면56

제180일의 TNF α 수준



도면57

프로토콜 : IM101-100

작업표: 치리군에 대한 스크리닝/동복에서 단일변수인 베타트랙세이트 투여량

Page: 1

군 = BMS 10
단일변수 결과

변수 = HEDDOSE		투여량		Moments					Quantiles (Def=5)					Extremes			
N	134	Sum	Wgts	134	100% Max	25	95%	25	Lowest	Obs	Highest	Obs	74				
Mean	14.35184	Sum	1921.35	75% Q3	17.5	95%	22.5	0.4	119	25	74	74					
Std Dev	1.841737	Variance	3.394848	50% Med	15	90%	20	0.0	120	25	74	74					
Skewness	-0.09514	Kurtosis	0.445504	25% Q1	10	70%	10	0.0	120	25	74	74					
USS	30751.33	CS	3141.652	0% Min	0.4	5%	10	0.0	75	25	74	74					
CV	13.01107	Std Mean	0.42592	Range	24.6	1%	0.0	2.11	70	25	74	74					
T-Mean=0	11.17814	P> T	0.0001	Q2-Q1	7.5	Mode	10	7.5	19	25	74	74					
Sum = 0	134	Num = 0	0.0001	Missing Value	Count	% Count/Obvs	0.74										
W Sign	27	P>= W	0.0001														
Sign Rank	6522.5	P>= S	0.0001														

도면58

프로토콜 : IM101-100

작업표: 치리군에 대한 스크리닝/동복에서 베타트랙세이트 투여량 단일변수

Page: 2

군 = BMS 2
단일변수 결과

변수 = HEDDOSE		투여량		Moments					Quantiles (Def=5)					Extremes			
N	116	Sum	Wgts	116	100% Max	30	95%	25	Lowest	Obs	Highest	Obs	319				
Mean	15.48876	Sum	1947.1	75% Q3	20	95%	25	0.7	125	25	120	120					
Std Dev	4.230921	Variance	17.9577	50% Med	15	90%	22.5	0.0	113	25	120	120					
Skewness	-0.02922	Kurtosis	0.719586	25% Q1	10	70%	10	0.0	145	25	121	121					
USS	33489.27	CS	3394.212	0% Min	0.7	5%	10	2.5	76	25	121	121					
CV	27.31925	Std Mean	0.468226	Range	29.3	1%	0.0	10	126	25	121	121					
T-Mean=0	33.29148	P> T	0.0001	Q2-Q1	7.5	Mode	15										
Sum = 0	116	Num = 0	0.0001	Missing Value	Count	% Count/Obvs	0.74										
W Sign	53	P>= W	0.0001														
Sign Rank	6000.5	P>= S	0.0001														

도면59

프로토콜 : IM101-100

작업표: 치리군에 대한 스크리닝/동복에서 베타트랙세이트 투여량 단일변수

Page: 3

군 = 풀시브
단일변수 결과

변수 = HEDDOSE		투여량		Moments					Quantiles (Def=5)					Extremes			
N	143	Sum	Wgts	143	100% Max	20	95%	25	Lowest	Obs	Highest	Obs	93				
Mean	15.13035	Sum	2164.79	75% Q3	10	95%	22.5	0.05	80	25	93	93					
Std Dev	4.879206	Variance	23.79763	50% Med	15	90%	20	0.0	6	25	93	93					
Skewness	-0.44892	Kurtosis	0.568925	25% Q1	10	70%	10	0.1	76	25	105	105					
USS	36148.44	CS	375.003	0% Min	0.05	5%	10	2.34	79	25	105	105					
CV	32.20432	Std Mean	0.46785	Range	24.9%	1%	0.4	5	72	25	105	105					
T-Mean=0	17.13235	P> T	0.0001	Q2-Q1	7.5	Mode	15										
Sum = 0	143	Num = 0	0.0001	Missing Value	Count	% Count/Obvs	2.05										
W Sign	71.5	P>= W	0.0001														
Sign Rank	3148	P>= S	0.0001														

도면60

프로그램 : IN101-100 Page: 1

직업표 : 제180일기간까지 및 제180일 기간을 포함한 DB 동안 처리군에 대한 페도트렉세이트

투여량 단일변수

군 = BMS 10

단일변수 결과

변수 = HEDDOSE		투여량		Moments					Quantiles (Def=5)					Extremes		
N	147	Sum	147	100% Max	75	99%	25	Lowest	Obs	Highest	Obs					
Mean	14.18373	Sum	2085.89	75% Q3	17.5	95%	28	0.5%	133	251	811					
Std Dev +/-	4.814826	Variance	23.18082	50% Med	15	90%	20	0.1%	133	251	831					
Skewness	-0.32495	Kurtosis	0.520994	25% Q1	10	10%	19	0.1%	88	251	891					
US	3587.58	CS	2381.17	0% Min	0.4	5%	7.5	2.1%	76	251	103					
CV	33.93036	Std Mean	0.397104	Range	24.6	1%	0.8	2.5%	78	251	124					
% Mean=0	35.71106	P<= T	0.0001	Q3-Q1	7.5											
Num = 0	147	Num = 0	0.0001	Mode	10											
H(Sign)	71.5	P<= H	0.0001													
Sgn Rank	5433	P<= S	0.0001													

Missing Value
Count: 1
% Count/Obvs: 0.68

도면61

프로그램 : IN101-100 Page: 2

직업표 : 제180일기간까지 및 제180일 기간을 포함한 DB 동안 처리군에 대한 페도트렉세이트

투여량 단일변수

군 = BMS 2

단일변수 결과

변수 = HEDDOSE		투여량		Moments					Quantiles (Def=5)					Extremes		
N	142	Sum	142	100% Max	30	99%	25	Lowest	Obs	Highest	Obs					
Mean	10.00211	Sum	2130.1	75% Q3	20	95%	28	0.5%	141	251	134					
Std Dev +/-	5.381696	Variance	28.9818	50% Med	15	90%	20	0.1%	140	251	135					
Skewness	-0.06985	Kurtosis	0.579853	25% Q1	10	10%	19	0.1%	128	251	136					
US	3605.77	CS	4884.79	0% Min	0.5	5%	10	0.1%	127	251	137					
CV	53.88625	Std Mean	0.45179	Range	29.5	1%	0.7	2.5%	128	251	138					
% Mean=0	33.20596	P<= T	0.0001	Q3-Q1	10											
Num = 0	142	Num = 0	0.0001	Mode	15											
H(Sign)	142	P<= H	0.0001													
Sgn Rank	5076.5	P<= S	0.0001													

도면62

프로그램 : IN101-100 Page: 3

직업표 : 제180일기간까지 및 제180일 기간을 포함한 DB 동안 처리군에 대한 페도트렉세이트 투여량 단일변수

군 = 플라시보

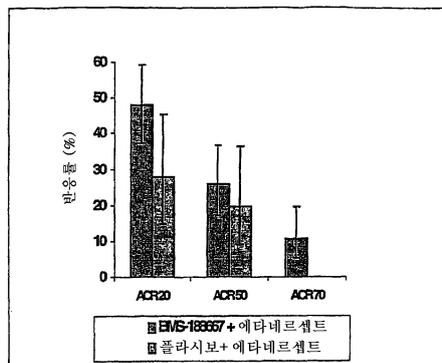
단일변수 결과

변수 = HEDDOSE		투여량		Moments					Quantiles (Def=5)					Extremes		
N	161	Sum	161	100% Max	250	99%	75	Lowest	Obs	Highest	Obs					
Mean	17.0018	Sum	2737.29	75% Q3	20	95%	25	0.05%	87	251	114					
Std Dev +/-	19.6713	Variance	387.9849	50% Med	15	90%	20	0.4%	81	251	118					
Skewness	10.6373	Kurtosis	124.5489	25% Q1	12.5	10%	19	0.1%	82	251	140					
US	108602.7	CS	60063.6	0% Min	0.05	5%	7.5	2.14%	85	251	151					
CV	115.8416	Std Mean	1.582159	Range	249.95	1%	0.8	5%	76	250	115					
% Mean=0	10.92139	P<= T	0.0001	Q3-Q1	7.5											
Num = 0	261	Num = 0	0.0001	Mode	15											
H(Sign)	80.5	P<= H	0.0001													
Sgn Rank	6520.5	P<= S	0.0001													

Missing Value
Count: 3
% Count/Obvs: 1.87

도면63

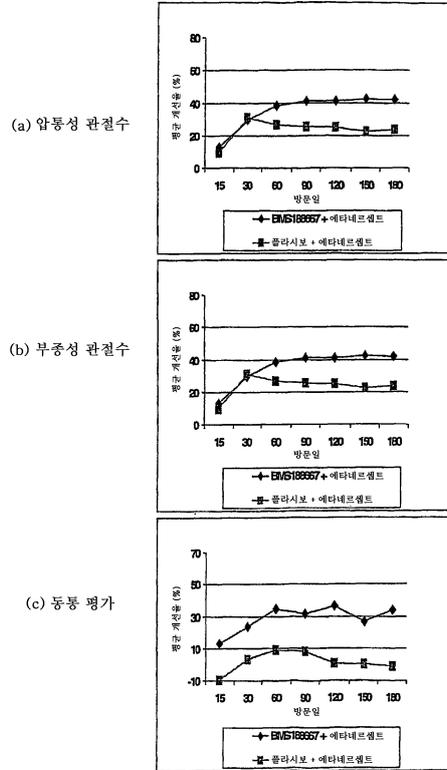
제180일의 변경된 ACR 반응 (95% CI)*



*평가에 대한 기준 참조

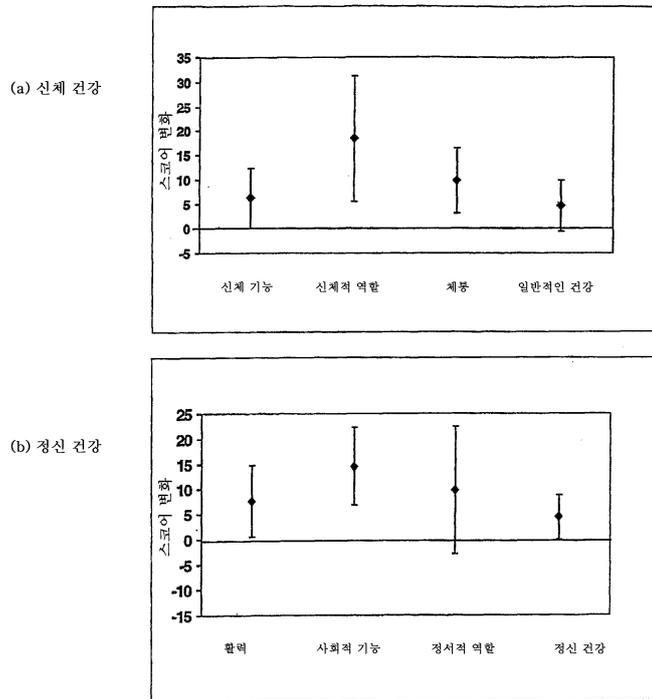
도면64

방문 시 변경된 ACR 기준의 개별 요인



도면65

제180일의 SF-36에 대한 기저수준으로부터의 변화 (±95% CI)



도면66

```

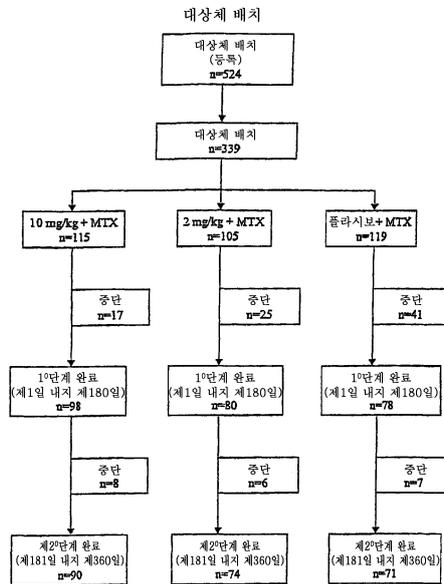
ATGGGTGTAG TGCACACAG GAGGACGCTG CTCAGTCTGG TCCTTGCACT CCTTTTCCA
AGCATGGCGA GCATGGCAAT GCACGTGGCC CAGCCTGCTG TGGTACTGGC CAGCAGCCGA
GGCATCCCA CCTTTGTCTG TGATATGCA TCTCCAGCCA AAGCCACTGA GGTCCGGGTG
ACAGTGCCTC GGCAGCCTGA CAGCCAGGTG ACTGAATCTT GTGGGGCAAC CTACATGATG
GGGATGAGT TGACCTTCCT AGATGATTCO ATCTGCACGG GCACCTCCAG TGGAAATCAA
GTGATCCTCA CTATCCAAAG ACTGAGGGCC ATGGACACGG GATCTACAT CTGCAAGGTG
GAGCTCATGT ACCCAGCGCC ATCTTCCTG GGCATAGCCA ACGGACCCA GATTTATGTA
ATTGATCCAG AACCGTGGC AGATTCGAT CAGGAGCCCA AATCTTCGTA CAAATTCAC
ACATCCCCAC GGTCCCGAGC ACCTGACTC CTGGGGGAT GGTCACTGTT CCTCTTCCC
CCAAACCCA AAGACACCTT CATGATCTCC CGGACCCGTG AGGTCAATG CGTGGTGGTG
GACCTGAGCC ACGAAGACCC TGAAGTCAAG TTCRACTGTT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
CATATGCCA AGACAAAGCC GCGGAGGAG CATACAAACA GCACGTACGG TGTGGTCCAGC
GTCCTCACCG TCGTGACCCA GCACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAATG CAGGTCTCC
AACAAAGCCC TCCAGCCCC CATCGAGTAA ACCATCTCCA AAGCCAAAG GCAGCCCGA
GATCCACAGG TGATCACCTT GCCCCOATCC CCGGATGAGC TGACCAAGA CCAAGTCCAGC
CTGACCTGCC TGTCAPAGG CTTCATGCC AGCGCATCG CGTGGAGTG GCAAGCAAT
GGCAGCCGG AATACACTA CAAGACACG CCTCCCTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
TTCCTTACA GCAAGCTCAC CFTGGACAG AECAGGTGC ACGAGGGGA CGTCTTCTCA
TGCTCCCTGA TGCATGGGC TGTGCACAC CACTACACG AEAAGACCT CTCCCTGTCT
CCGGTAAAT GA
    
```

도면67

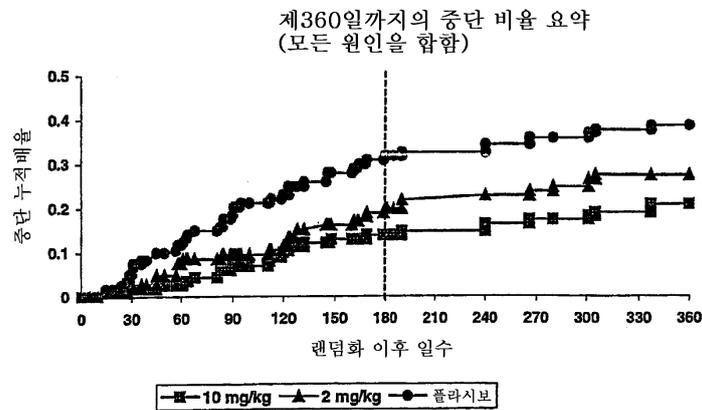
```

      ↓
MGVLLTQRTD LSLVLALLFF SMASHMAMEVA QPAVVLASSR GIASFVCEYA 50
SPGKATEFVRV TVLRLQADSQV TEVCAATYMM GNELTFLDDE ICTGTSSGNQ 100
VNLTIQGLRA MDTGLYICKV ELMYFFPYL GEGNGTQIYV IDPEFCFDSO 150
QEFRESORXTH TSPFSAPFEL LGGSSVFLFP EKPMDTLMTS RRFEVTCVVV 200
LVSHEDFEVR FNWYDGVZV HNAKTKFRSE QVMETYRVVE VLTVLHQDWL 250
NGKRYKCKVS NKLLAPFIEK TISKAKGQR EPQVYTLFES RDELTKNQVS 300
LTCLVKGFYF SDIAVEWESM GQPENNYKTT EFWLSDGSEF FLYSKLAVDK 350
ERWQQGNVTS CSVMHEALEN HYTKLSLSLS ECK
    
```

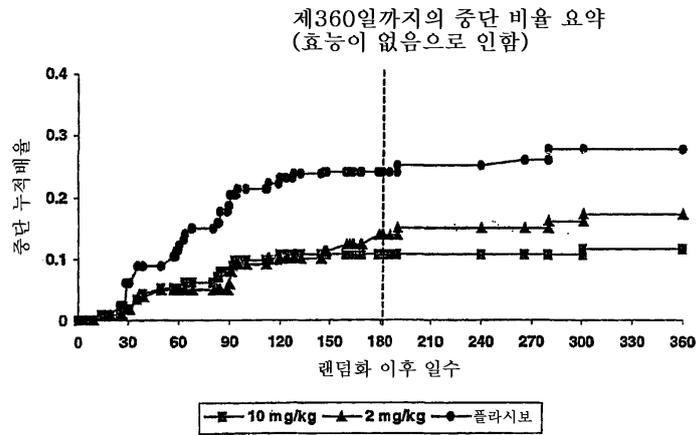
도면68



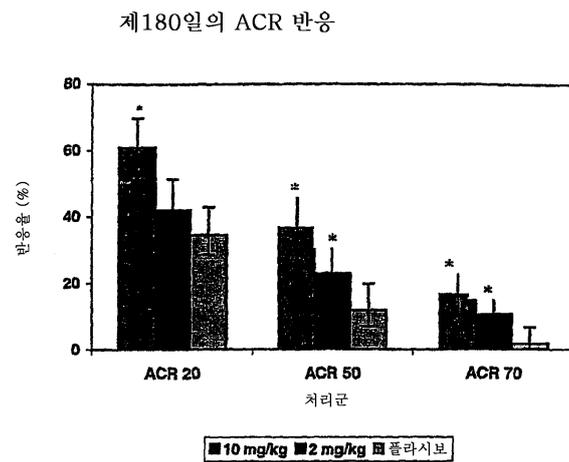
도면69



도면70

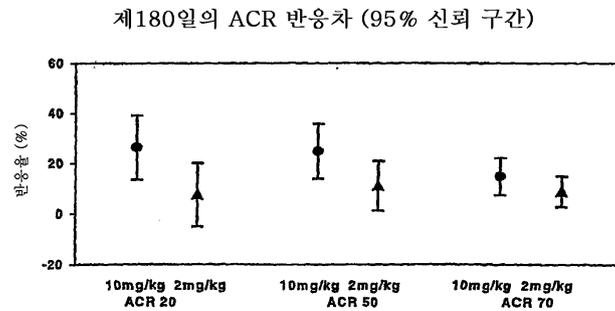


도면71a

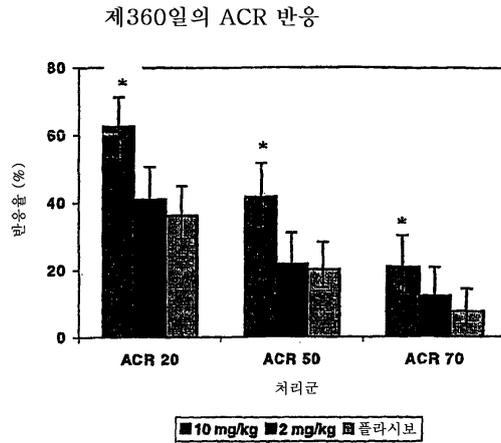


*플라시보에 대한 BMS-188667의 비교에서 상당히 유의한 결과를 나타냄.

도면71b

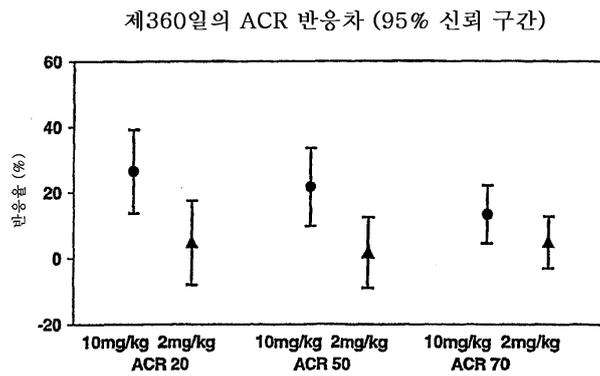


도면72a

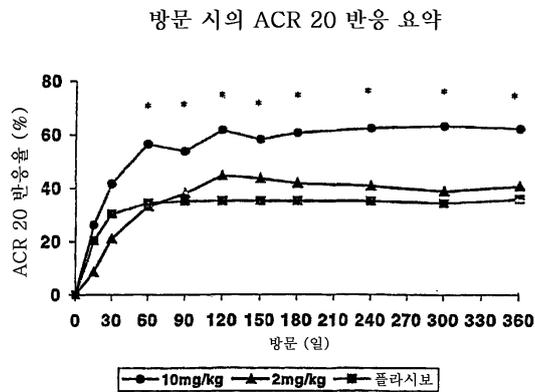


*플라시보에 대한 10 mg/Kg의 비교에서 상당히 유의한 결과를 나타냄.

도면72b

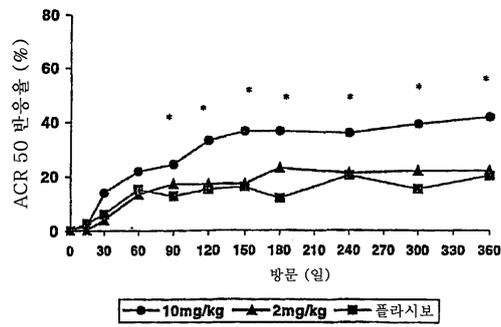


도면73a



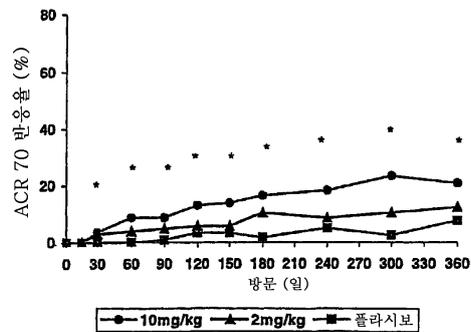
도면73b

방문 시의 ACR 50 반응 요약



도면73c

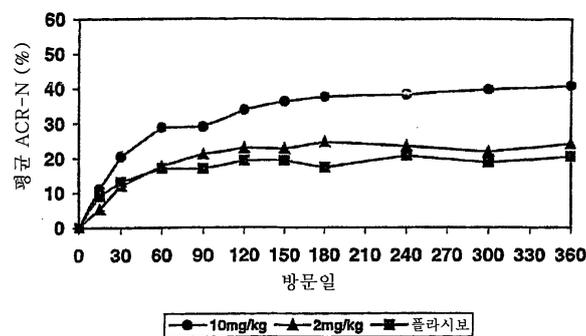
방문 시의 ACR 70 반응 요약



*플라시보에 대한 10 mg/Kg의 비교에서 상당히 유의한 결과를 나타냄.

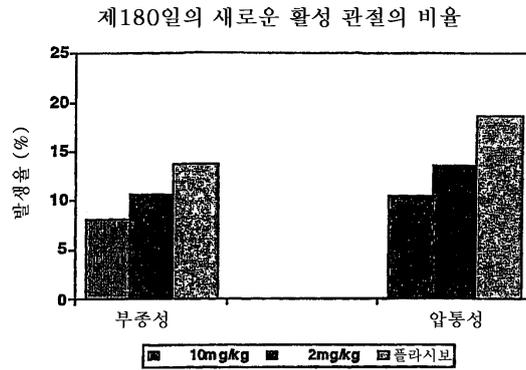
도면74

시간에 따른 평균 ACR-N

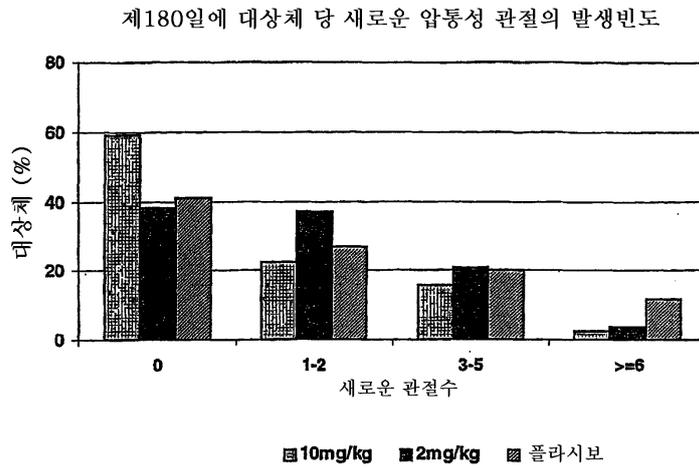


*플라시보에 대한 10 mg/Kg의 비교에서 상당히 유의한 결과를 나타냄.

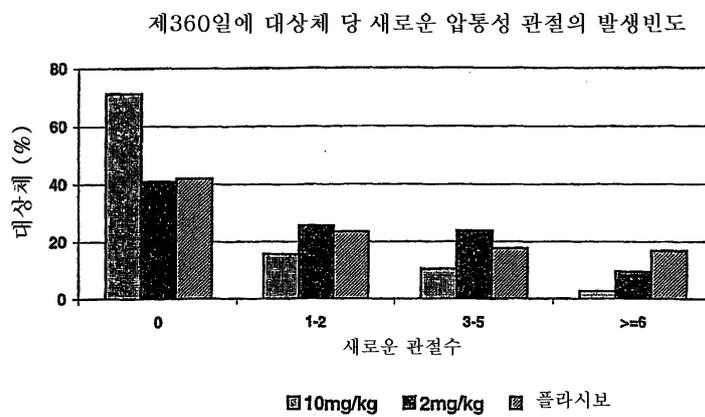
도면75



도면76a

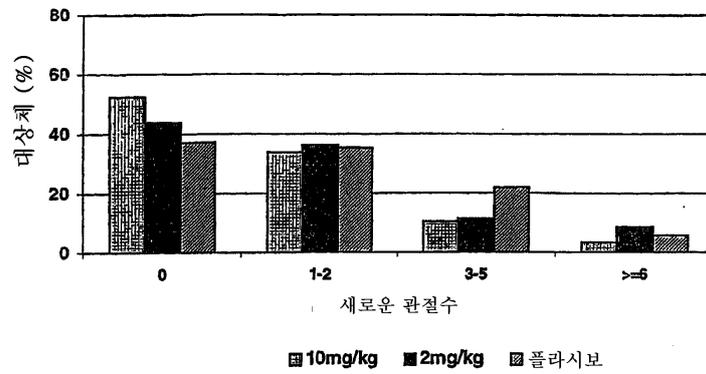


도면76b



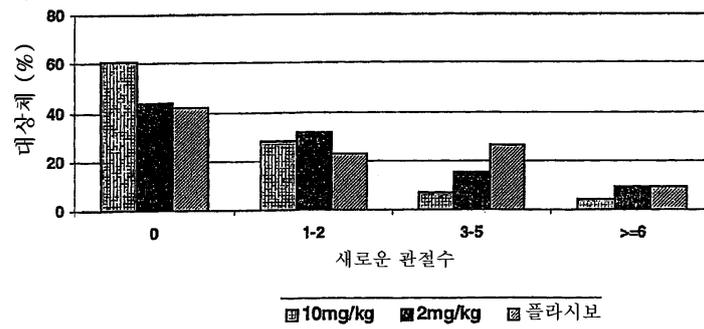
도면77a

제180일에 대상체 당 새로운 부종성 관절의 발생빈도



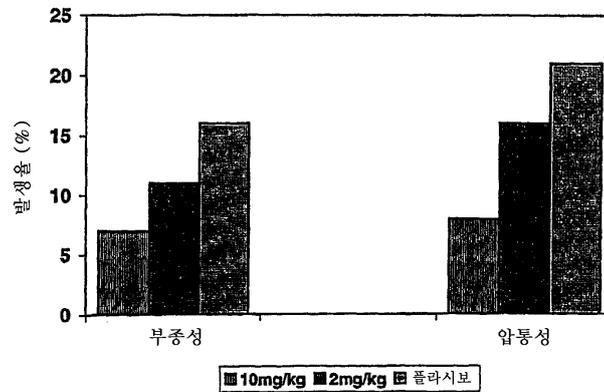
도면77b

제360일에 대상체 당 새로운 부종성 관절의 발생빈도



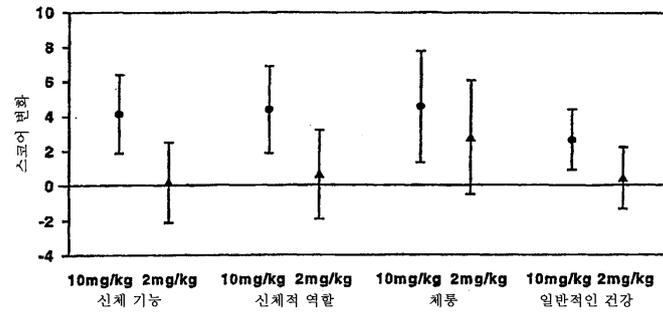
도면78

제360일의 새로운 활성 관절의 비율



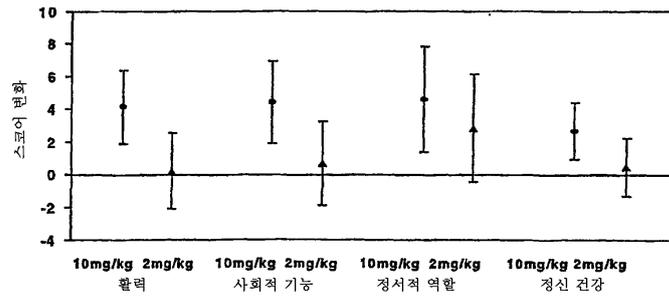
도면79a

제180일의 신체 건강 영역에서 기저수준으로부터의 변화



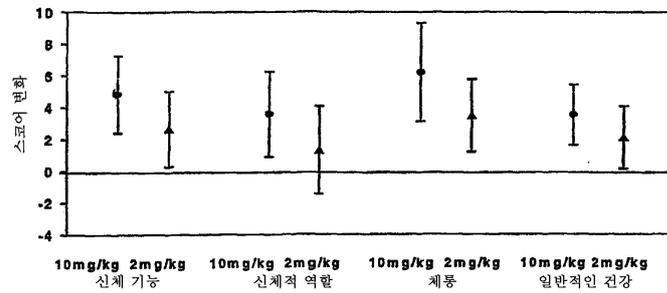
도면79b

제180일의 정신 건강 영역에서 기저수준으로부터의 변화

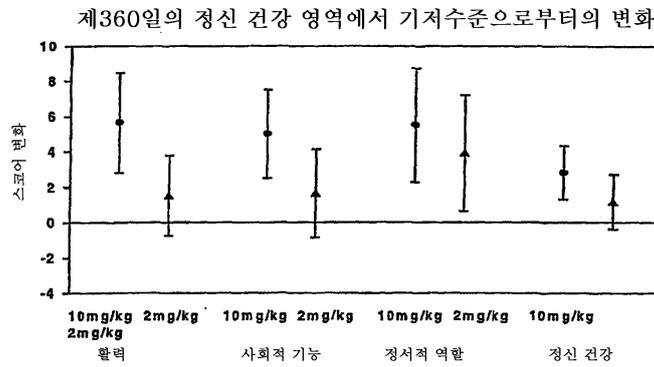


도면80a

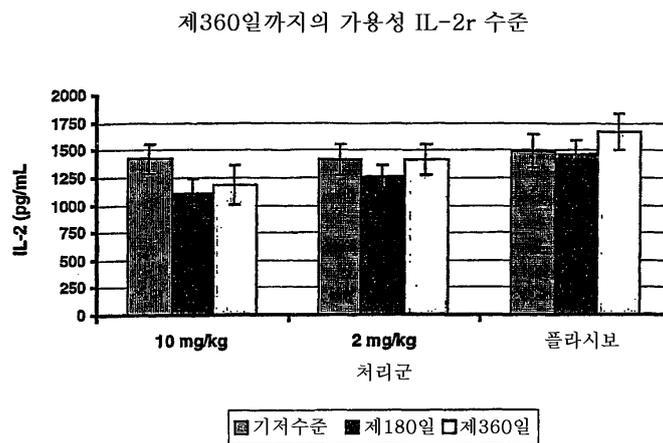
제360일의 신체 건강 영역에서 기저수준으로부터의 변화



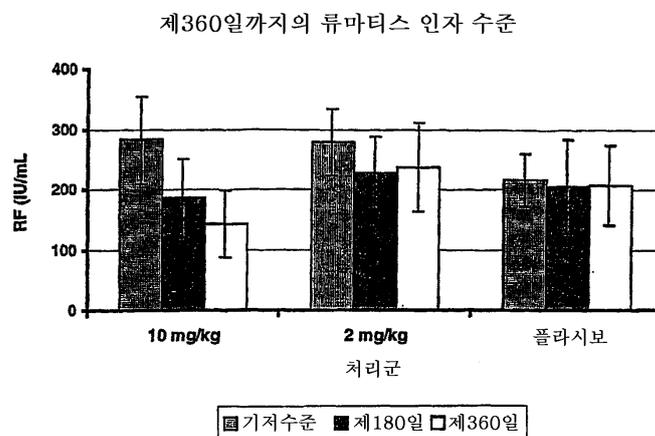
도면80b



도면81

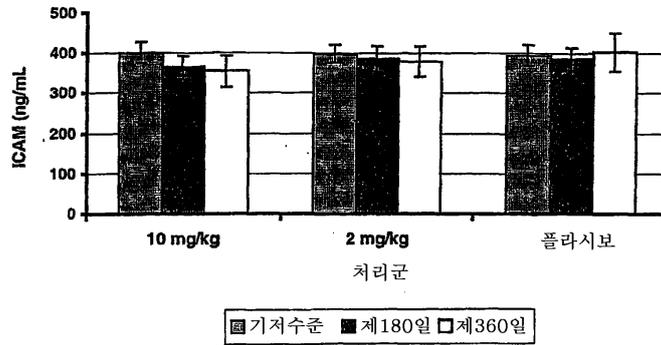


도면82



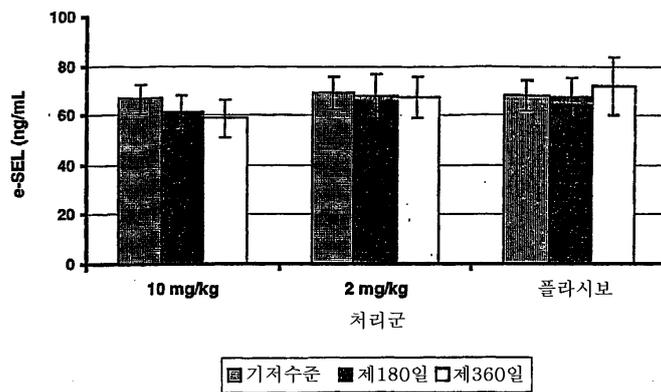
도면83

제360일까지의 ICAM-1 수준



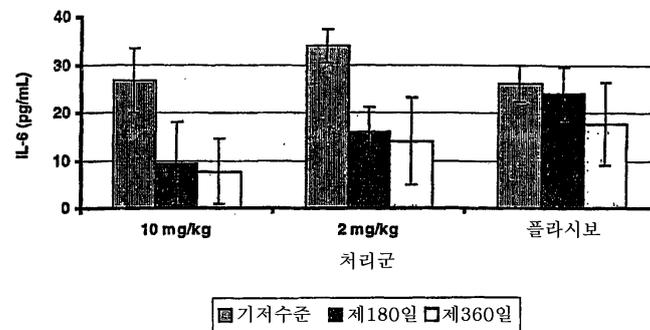
도면84

제360일까지의 e-셀렉틴 수준



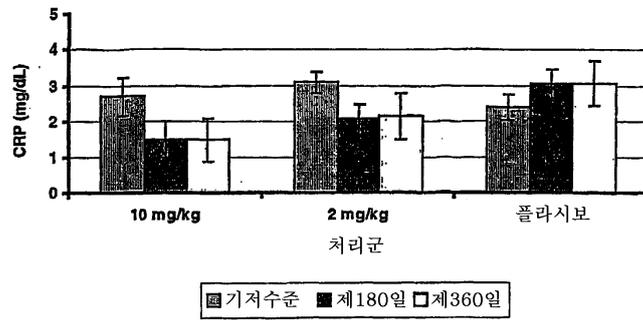
도면85

제360일까지의 혈청 IL-6 수준



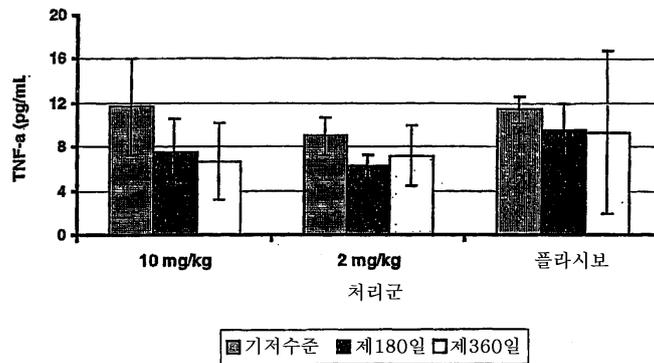
도면86a

제360일까지의 CRP 수준

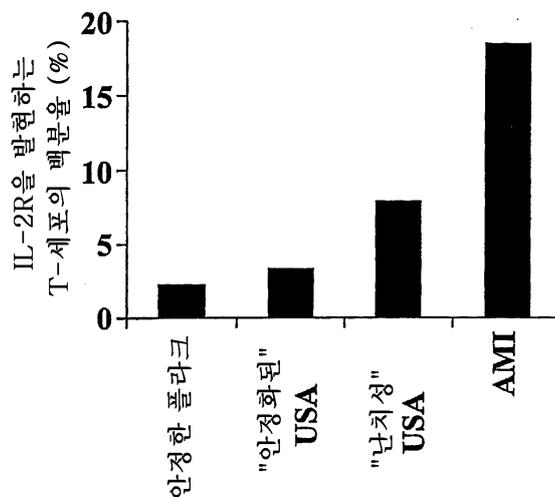


도면86b

제360일까지의 TNF α 수준



도면87



서열목록

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120> METHODS FOR TREATING CARDIOVASCULAR DISEASE USING A SOLUBLE CTLA4 MOLECULE

<130> D0340

<140> PCT/US04/24840

<141> 2004-08-03

<150> 60/492,430

<151> 2003-08-04

<160> 22

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oncostatin M CTLA4 forward primer

<400> 1

ctcagtctgg tccttgcaact cctgtttcca agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc 60

cagcc 65

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oncostatin M CTLA4 reverse primer

<400> 2

tttgggctcc tgatcagaat ctgggcacgg ttg 33

<210> 3

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oncostatin M CTLA4 forward primer

<400> 3

ctagccactg aagcttcacc aatgggtgta ctgctcacac agaggacgct gctcagtctg 60

gtccttgcac tc

72

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) forward primer

<400> 4

gaggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) reverse primer

<400> 5

gtggtgtatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc 42

<210> 6

<211> 1152

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> L104EIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<220>

<221> CDS
 <222> (1)..(1149)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (79)..()

<400> 6
 atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

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

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

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

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

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

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

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

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa 432
 Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 105 110 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac 480

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 120 125 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc 528
 Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 135 140 145 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 576
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 155 160 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 624
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 170 175 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 672
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 185 190 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc 720
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 200 205 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 768
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 215 220 225 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 816
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 235 240 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 864
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 250 255 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 912
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 265 270 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 960
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 280 285 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

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

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

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

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

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

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

250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 345 350 355

<210> 8
 <211> 1152
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L104EA29YIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1149)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (79)..()

<400> 8
 atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala

48

-25	-20	-15	
ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct			96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro			
-10	-5	-1 1	5
gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag			144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu			
	10	15	20
tat gca tct cca ggc aaa tat act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg			192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg			
	25	30	35
cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg			240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met			
	40	45	50
ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc			288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser			
55	60	65	70
agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac			336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp			
	75	80	85
acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac			384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr			
	90	95	100
tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa			432
Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu			
	105	110	115
ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac			480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His			
	120	125	130
aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc			528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val			
135	140	145	150
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc			576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	155	160	165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 624
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 170 175 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 672
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 185 190 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc 720
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 200 205 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 768
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 215 220 225 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 816
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 235 240 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 864
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 250 255 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 912
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 265 270 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 960
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 280 285 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 295 300 305 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1056
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 315 320 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1104
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 330 335 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 345 350 355

<210> 9
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L104EA29YIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<400> 9

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 -10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 25 30 35

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

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

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

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

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu

200	205	210	
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 768			
Val Leu Thr	Val Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys
215	220	225	230
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 816			
Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro Ile	Glu Lys Thr Ile
	235	240	245
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 864			
Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu Pro
	250	255	260
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 912			
Pro Ser Arg	Asp Glu Leu Thr Lys	Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys Leu
	265	270	275
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 960			
Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser Asn
	280	285	290
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008			
Gly Gln Pro	Glu Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser
295	300	305	310
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1056			
Asp Gly Ser	Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser Arg
	315	320	325
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1104			
Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met	His Glu Ala Leu
	330	335	340
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152			
His Asn His	Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser	Pro Gly Lys
	345	350	355

<210> 11
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> L104EA29LIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<400> 11

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 -10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Leu Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 25 30 35

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

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

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

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

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 105 110 115
 Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

155

160

165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

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

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

tac gag ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa 432
 Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 105 110 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac 480
 Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 120 125 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tgc tca gtc 528
 Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 135 140 145 150

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 576
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 155 160 165

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 624
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 170 175 180

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 672
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 185 190 195

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc 720
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 200 205 210

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 768
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 215 220 225 230

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 816
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 235 240 245

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 864
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 250 255 260

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 912
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 265 270 275

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 960
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 280 285 290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 295 300 305 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1056
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 315 320 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1104
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 330 335 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 345 350 355

<210> 13
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L104EA29TIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<400> 13

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro

<223> L104EA29WIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1149)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (79)..()

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu	
105 110 115	
ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac	480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His	
120 125 130	
aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc	528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val	
135 140 145 150	
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc	576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	
155 160 165	
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag	624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	
170 175 180	
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag	672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	
185 190 195	
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc	720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	
200 205 210	
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag	768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	
215 220 225 230	
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc	816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	
235 240 245	
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc	864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	
250 255 260	
cca tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg	912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	
265 270 275	
gtc aaa gcc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat	960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	

280

285

290

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1008
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 295 300 305 310

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1056
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 315 320 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1104
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 330 335 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 345 350 355

- <210> 15
- <211> 383
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> L104EA29WIg, fusion protein containing mutated extracellular domain of human CTLA4

<400> 15

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 -10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Trp Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 25 30 35

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 155 160 165
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 280 285 290

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 295 300 305 310

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 315 320 325

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 330 335 340

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 345 350 355

<210> 16
 <211> 636
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(636)
 <220>

<221> mat_peptide
 <222> (79)..()

<400> 16
 atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala

-25	-20	-15	
ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct			96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro			
-10	-5	-1 1	5
gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag			144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu			
	10	15	20
tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg			192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg			
	25	30	35
cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg			240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met			
	40	45	50
ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc			288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser			
55	60	65	70
agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac			336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp			
	75	80	85
acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac			384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr			
	90	95	100
tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa			432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu			
	105	110	115
ccg tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctt gca gca gtt agt			480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser			
	120	125	130
tcg ggg ttg ttt ttt tat agc ttt ctc ctc aca gct gtt tct ttg agc			528
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser			
135	140	145	150
aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt aca aca ggg gtc tat gtg aaa			576
Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys			

155

160

165

atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct tat ttt 624
 Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
 170 175 180

att ccc atc aat 636
 Ile Pro Ile Asn
 185

<210> 17
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 -10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 25 30 35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Pro Ile Asn
 185

<210> 18
 <211> 1152
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CTLA4Ig, fusion protein containing extracellular domain of human CTLA4

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1149)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (79)..()

<400> 18
 atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca
 Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala

-25	-20	-15	
ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct			96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro			
-10	-5	-1 1	5
gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gct agc ttt gtg tgt gag			144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu			
	10	15	20
tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg			192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg			
	25	30	35
cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg			240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met			
	40	45	50
ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc			288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser			
55	60	65	70
agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac			336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp			
	75	80	85
acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac			384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr			
	90	95	100
tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa			432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu			
	105	110	115
ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac			480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His			
	120	125	130
aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggt gga tcg tca gtc			528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val			
135	140	145	150
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc			576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			

155	160	165	
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag			624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
170	175	180	
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag			672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
185	190	195	
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc			720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
200	205	210	
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag			768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
215	220	225	230
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc			816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
235	240	245	
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc			864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
250	255	260	
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg			912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
265	270	275	
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat			960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
280	285	290	
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc			1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
295	300	305	310
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg			1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
315	320	325	
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg			1104
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			

330

335

340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 345 350 355

<210> 19

<211> 383

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CTLA4Ig, fusion protein containing extracellular domain of human CTLA4

<400> 19

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 -10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 25 30 35

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 280 285 290

<400> 21
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca 48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

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

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

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

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

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

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

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac 384

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

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa 432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

ccg tgc cca gat tct gat cag gag ccc aaa tct tct gac aaa act cac 480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
120 125 130

aca tcc cca ccg tcc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga tcg tca gtc 528
Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val

135	140	145	150	
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc				576
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	155	160	165	
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag				624
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	170	175	180	
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag				672
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	185	190	195	
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc				720
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	200	205	210	
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag				768
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	215	220	225	230
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc				816
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	235	240	245	
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc				864
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	250	255	260	
cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg				912
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	265	270	275	
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat				960
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	280	285	290	
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc				1008
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	295	300	305	310
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg				1056
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg				

315 320 325

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1104
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 330 335 340

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1152
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 345 350 355

- <210> 22
- <211> 383
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CTLA4Ig, fusion protein containing extracellular domain of human CTLA4

<400> 22

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 -25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 -10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 25 30 35

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 120 125 130

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 135 140 145 150

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 155 160 165

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 170 175 180

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 185 190 195

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 200 205 210

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 215 220 225 230

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 235 240 245

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 250 255 260

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 265 270 275

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

