(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6] A61K 39/395 C07K 16/28		(45) 공고일자	1999년11월15일
		(11) 등록번호	10-0231090
		(24) 등록일자	1999년08월26일
(21) 출원번호	10-1993-0701887	(65) 공개번호	특1993-0702999
(22) 출원일자	1993년06월19일	(43) 공개일자	1993년11월29일
번역문제출일자	1993년06월19일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 91/009711	(87) 국제공개번호	WO 91/11018
(86) 국제출원일자	1991년12월19일	(87) 국제공개일자	1992년07월09일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 말라위 수단		
	EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 룩셈부르크 네덜란드 스웨덴		
	OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		
	국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 헝가리 일본 대한민국 북한 스리랑카 마다가스카르 노르웨이 루마니아 소련 몽고 폴란드		
(30) 우선권주장	634,278 1990년12월19일 미국(US)		

(73) 특허권자 프로테인 디자인 랩스 인코오토레이티드 캐리 엘.퀸
미합중국 캘리포니아 94043 마운틴 뷰 가르시아 애비뉴 2375

(72) 발명자 퀸,캐리.엘.
미합중국 캘리포니아94022,로스알토스 벤베뉴스트리트622
코,맨,성
미합중국 캘리포니아95014,쿠페르티노 요시노플레이스10230
쉬네이더,윌리암,피.
미합중국 캘리포니아94041,마운틴뷰 로레토스트리트484
랜돌피,니콜라스,에프.
미합중국 캘리포니아95035,밑피타스 씨사이드드라이브246
실링,캐들린,엘.
미합중국,캘리포니아94114,샌프란시스코,돌로레스애비뉴1509

(74) 대리인 나영환, 조태연

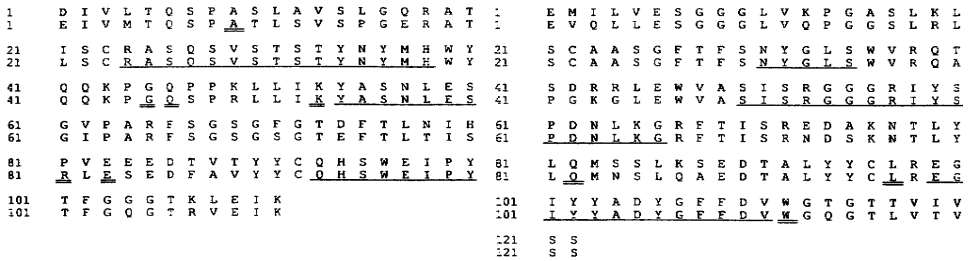
심사관 : 조명선

(54) 인체화된면역글로불린

요약

본 발명은 많은 항원들에 대해 제공될 수 있는 하나 이상의 상보성 결정부위(CDR) 및 가능하게는 공급자 면역글로불린으로부터 유래된 추가 아미노산 및 수용자의 사람 면역글로불린으로부터 유래된 프레임워크 영역을 가진 신규한 인체화된 면역글로불린에 관한 것이다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

인체화된 면역글로불린

[발명의 분야]

본 발명은 신규 치료제를 개발하기 위한 재조합 DNA 및 모노클로날 항체기법을 조합한 방법 및, 더욱 특히 소정의 항원에 대해 강한 친화력을 가진 비-면역원성 항체의 생성에 관한 것이다.

[발명의 배경]

1970년대 중반에 모노클로날 항체 기법의 도래는 의약의 새로운 시대를 열었다. 처음, 연구자 및 임상가들은 소정의 항원부위에 결합할 수 있고 다양한 면역학적 작동 기능을 가진 균일한 항체를 거의 무제한양으로 생성하려고 시도했다.

"모노클로날 항체"(monoclonal antibody)로 알려진 이 단백질들은 예를 들면 생체내의 해로운 세포를 제거하는데 상당히 유망한 것으로 생각되었다. 실제로, 모노클로날 항체의 임상적 가치는 이러한 용도에만 한정되지 않는 것 같다.

불행하게도, 상기 단백질을 기초로 한 적합한 치료 제품의 개발은 모노클로날 항체 생산에 고유한 많은 단점들에 의해 상당히 방해되었다. 예를 들면, 대부분의 모노클로날 항체는 마우스 유래의 것이며, 따라서 사람의 보체에 잘 고정되지 않는다. 이들은 또한 사람에게 사용될때 다른 중요한 면역글로불린 작용상의 특징이 결핍되어 있다.

아마도 가장 중요하게는, 비-사람 모노클로날 항체는 사람 환자에게 주입될때 면역원성을 갖게 되는 아미노산 서열의 실질적인 부분을 함유한다. 이종 항체의 주입후, 환자에 의해 개시되는 면역응답은 상당히 강력한 것으로서, 초기 치료후 그항체의 치료적 유용성을 본질적으로 제거시킬 수 있다는 것을 수 많은 연구는 나타내고 있다. 더욱, 여러가지 다른 마우스의 모노클로날 항체 또는 다른 항원성(인체에 대해) 모노클로날 항체의 수를 증가시켜 다양한 질환을 치료하도록 개발할 수 있을 것으로 예측되기도 하지만, 임의의 비-사람 항체로 1회 또는 수회 치료후에는 관련이 없는 치료법들일지라도 연속된 치료들은 비효과적이거나 또는 교차-반응성 때문에 그들 자신에게 위험할 수도 있다.

소위 "키메라 항체"(예, 인체의 불변부(constant region)에 결합된 마우스의 가변부(variable region)의 생산은 다소 성공적인 것으로 밝혀졌지만, 중요한 면역원성의 문제점이 남아 있다. 더욱, 사람 B-세포를 무한증식시키려는 노력 또는 원하는 항원에 대해 사람 면역글로불린을 생산할 수 있는 인체 하이브리도마를 생성시키고자 하는 노력은 일반적으로 성공적이지 못하였고, 특히 많은 중요한 사람 항원에 대해서는 성공하지 못하였다. 가장 최근, 재조합 DNA 기법이 도너(donor)인 마우스 또는 래트 면역 글로불린 유래의 상보성 결정 부위(CDR)와 결합된 사람 프레임워크 영역을 가지고 있는 면역글로불린을 제조하는데 사용되었다(예, EPO 공개 번호 0239400 참조).

이 신규 단백질은 "재형성된(reshaped)" 또는 "인체화된(humanized)" 면역글로불린이라 명명되며, 공급(도너; donor) 면역글로불린을 인체-유사 면역글로불린으로 전환시키기 위해 도너의 CDR을 사람의 프레임워크와 결합시키는 방법을 "인체화(humanization)"라고 한다.

인체화된 항체는 그것의 본래의 항체와 동일한 항원에 결합하지만, 사람에게 주입했을 때 면역원성이 보다 적기 때문에 중요하다.

그러나, 인체화 방법에 있어서의 주요 문제점은 항원에 대한 친화성이 상실된다는 것이고(Jones 등, Nature, 321, 522-525(1986)), 어떤 경우에는, 특히 항원이 단백질인 경우에는 10배 또는 그 이상까지도 상실된다는 것이다(Verhoeyen 등, Science, 239, 1534-1536(1988)). 어떤 친화성의 상실도 물론 매우 바람직하지 못하다. 이것은 적어도 인체화된 항체가 더 높은 비용과 더 큰 부작용의 위험성하에 더 많이 환자에게 주입되어야 함을 의미한다. 더욱 중요하게는, 경감된 친화성을 가진 항체는 보체 용해, 항체-의존적 세포의 세포독성, 또는 비루스 중화와 같은 더 나쁜 생물학적 작용을 가질 수 있다.

예를 들면, 부분적으로 인체화된 항체 HuVHCAMP에 있어서, 친화성의 상실은 보체 용해를 매개하는 모든 작용을 상실시킬 수 있다(Riechmann 등,Nature.332.323-327(1988)참조;표 1).

따라서, 소정의 항원에 대한 강한 친화성을 가진 특이적으로 반응하는 인체화된 항체에 대한 요구가 있다. 이 인체화된 면역글로불린은 인체내에서 실질적으로 비-면역원성을 유지해야 하며, 치료 조성물 및 다른 용도에 적합한 방법으로 용이하고도 경제적으로 제조되어야 한다. 본 발명은 이런 요구조건 외에도 다른 요구조건도 충족시킨다.

[본 발명의 개요]

본 발명은 예를 들면, T-세포 매기의 인체 질환을 치료하는데 유용한 신규 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 특이적으로 사람 IL-2와 그것의 수용체의 결합을 저해할 수 있고/ 및 또는 사람 IL-2 수용체의 p75 단백질에 결합할 수 있는 인체-유사 면역글로불린을 함유한다. 상기 면역글로불린은 두쌍의 경쇄(lighchain)/중쇄(heavy chain) 복합체를 가질 수 있고, 일반적으로 적어도 하나의 사슬은 사람의 프레임워크 영역 분절에 작용적으로 결합된 마우스 상보성 결정 부위를 함유하고 있다. 예를 들면, 자연적으로-결합된 마우스 아미노산 잔기를 추가로 갖고 있거나 갖고 있지 않은 마우스 상보성 결정 부위는 약 10^7 M^{-1}이상의 친화도로 p75 단백질에 결합할 수 있는 인체-유사 항체를 제조하는데 사용될 수 있다.

이 인체화된 면역글로불린은 또한 p75에 대한 CDR-공급 마우스 모노클로날 항체의 결합을 차단시킬 수 있을 것이다.

본 발명은 또한 예를 들면, HSV 매개의 인체 질환을 치료하는데 유용한 신규 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 특이적으로 HSV가 그것의 수용체에 대해 결합하는 것을 차단할 수 있고 및/또는 HSV 특이적인 단백질에 결합할 수 있는 인체화된 면역글로불린을 함유한다. 상기 면역글로불린은 두쌍의 경쇄/중쇄 복합체를 가질 수 있고, 적어도 하나의 사슬은 사람의 프레임워크 영역 분절에 작용적으로 결합된 하나 또는 그 이상의 마우스 상보성 결정 부위를 함유하고 있다. 예들 들면, 자연적으로-결합된 마우스 아미노산 잔기를 추가로 갖고 있거나 갖고 있지 않은 마우스 상보성 결정 부위를 사람의 프레임워크 영역내에 도입하

여 약 $10^7 M^{-1}$ 이상의 친화도로 HSV 표면 단백질에 결합할 수 있는 인체화된 면역글로불린을 제조할 수 있다. 이 인체화된 면역글로불린은 또한 HSV에 대한 CDR-공급성 마우스 모노클로날 항체의 결합을 차단시킬 수 있을 것이다. 이 인체화된 면역글로불린은 거의 순수한 형태로 단독으로 사용되거나, 또는 아시클로비르같은 항비루스제 또는 비루스 표면에 활성적인 세포독성제와 함께 사용될 수 있다. 이들 화합물들은 모두 HSV 매개 질환을 치료하는데 특히 유용할 것이다.

본 발명은 또한 예를 들면, 골수성 백혈병-관련된 인체 질환을 치료하는데 유용한 신규 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 특이적으로 CD33 항원에 결합할 수 있는 인체화된 면역글로불린을 함유한다. 상기 면역글로불린은 두쌍의 경쇄/중쇄 복합체를 가질 수 있고, 적어도 하나의 사슬은 사람의 프레임워크 영역 분절에 작용적으로 결합된 하나 이상의 마우스 상보성 결정 부위를 함유하고 있다. 예를 들면, 자연적으로-결합된 마우스 아미노산 잔기를 추가로 갖고 있거나 갖고 있지 않은 마우스 상보성 결정 부위는 사람의 프레임워크 영역내로 도입되어 약 $10^7 M^{-1}$이상의 친화도로 CD33 항원에 결합할 수 있는 인체화된 면역글로불린을 생성할 수 있다. 이 인체화된 면역글로불린은 또한 CD33에 대한 CDR-공급 마우스 모노클로날 항체의 결합을 차단시킬 수 있을 것이다. 이 인체화된 면역글로불린은 거의 순수한 형태로 단독으로 사용되거나, 또는 백혈병 세포에 대하여 활성적인 사이토신 아라비노사이드 또는 다우노루비신과 같은 화학치료제와 함께 사용되거나, 또는 요오드-131과 같은 방사핵종과 결합될 수 있다. 이들 화합물들은 모두 백혈병 및 골수성 세포-매개 질환을 치료하는데 특히 유용할 것이다. 본 발명은 또한 예를 들면, CMV-매개 인체 질환을 치료하는데 유용한 신규 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 특이적으로 CMV가 그것의 수용체에 대해 결합하는 것을 차단할 수 있고 및/또는 CMV 항원에 결합할 수 있는 인체화된 면역글로불린을 함유한다. 예를 들면, 자연적으로-결합된 마우스 아미노산 잔기를 추가로 갖고 있거나 갖고 있지 않은 마우스 상보성 결정 부위는 사람 프레임워크 영역내로 도입되어 약 $10^7 M^{-1}$이상의 친화도로 CMV에 결합할 수 있는 인체화된 면역글로불린을 생산할 수 있다. 이 인체화된 면역글로불린은 또한 CMV에 대한 CDR-공급마우스 모노클로날 항체의 결합을 차단시킬 수 있다. 이 인체화된 면역글로불린은 거의 순수한 형태로 단독으로 사용되거나, 또는 CMV-감염 세포에 대하여 활성적인 아시클로비르 또는 간시클로비르와 같은 화학치료제와 함께 사용되거나, 또는 세포 독성제에 결합될 수 있다. 이들 화합물들은 모두 CMV-매개 질환을 치료하는데 특히 유용할 것이다.

본 발명은 또한 예를 들면, 사람의 자가면역 질환을 치료하는데 유용한 신규 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 특이적으로 γ-IFN에 결합할 수 있는 인체화된 면역글로불린을 함유한다. 예를 들면, 자연적으로-결합된 마우스 아미노산 잔기를 추가로 갖고 있거나 갖고 있지 않은 마우스 상보성 결정 부위는 사람의 프레임워크 영역내에 도입되어 약 $10^7 M^{-1}$ 이상의 친화도로 γ-IFN에 결합할 수 있는 인체화된 면역글로불린을 생성할 수 있다. 이 인체화된 면역글로불린은 또한 γ-IFN에 대한 CDR-공급성 마우스 모노클로날 항체의 결합을 차단시킬 수 있다. 이 인체화된 면역글로불린은 거의 순수한 형태로 단독으로 사용되거나, 또는 비-스테로이드성항-염증제, 코르티코스테로이드, 또는 면역 억제제와 같은 화학치료제와 함께 사용될 수도 있다. 이들 화합물들은 모두 자가면역 질환을 치료하는데 특히 유용할 것이다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 신호 서열(signal sequence)을 함유하지 않은 마우스 Fd79 항체(위)와 인체화된 항체(아래)의 가변부를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 아미노산 서열(1-문자 코드)을 나타낸 것이다. 각 사슬의 3개의 CDR은 밑줄로 표시되어 있다. 마우스의 아미노산 또는 일반적인 인체 아미노산으로 대체된 인체화된 항체의 프레임워크 내의 잔기들에는 이중 밑선이 그어져 있다. 각 줄의 처음 위치의 번호는 왼쪽에 제시된다.

제2도는 신호 서열을 함유하지 않는 마우스 Fd138-80 항체(위)와 인체화된 항체(아래)의 가변부를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 아미노산 서열(1-문자 코드)을 나타낸 것이다. 각 사슬의 3개의 CDR에는 밑줄이 그어져 있다. 마우스의 아미노산 또는 일반적인 인체 아미노산으로 대체된 인체화된 항체의 프레임워크 내의 잔기들에는 이중 밑선이 그어져 있다. 각 줄의 처음 위치의 번호는 왼쪽에 제시된다.

제3도는 신호 서열을 함유하지 않는 마우스 M195 항체(위)와 인체화된 항체(아래)의 가변부를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 아미노산 서열(1-문자 코드)을 나타낸 것이다. 각 사슬의 3개의 CDR에는 밑줄이 그어져 있다. 마우스의 아미노산 또는 일반적인 인체 아미노산으로 대체된 인체화된 항체의 프레임워크 내의 잔기들에는 이중 밑선이 그어져 있다. 각 줄의 처음 위치의 번호는 왼쪽에 제시된다.

제4도는 신호 서열을 함유하지 않는 마우스 mik-β1 항체(위)와 인체화된 항체(아래)의 가변부를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 아미노산 서열(1-문자 코드)을 나타낸 것이다. 각 사슬의 3개의 CDR에는 밑줄이 그어져 있다. 마우스의 아미노산 또는 일반적인 인체 아미노산으로 대체된 인체화된 항체의 프레임워크 내의 잔기들에는 이중 밑선이 그어져 있다. 각 줄의 처음 위치의 번호는 왼쪽에 제시된다.

제5도는 신호 서열을 함유하지 않는 마우스 CMV5 항체(위)와 인체화된 항체(아래)의 가변부를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 아미노산 서열(1-문자 코드)을 나타낸 것이다. 각 사슬의 3개의 CDR에는 밑줄이 그어져 있다. 마우스의 아미노산 또는 일반적인 인체 아미노산으로 대체된 인체화된 항체의 프레임워크 내의 잔기들에는 이중 밑선이 그어져 있다. 각 줄의 처음 위치의 번호는 왼쪽에 제시된다.

제6도는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인내의 cDNA를 고정된 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)으로 클로닝하는 도식을 나타낸 것이다. 고온 페놀 추출법을 사용하여 약 10^7 하이브리도마 세포로부터 RNA를 제조하였다. 요컨대, 세포를 RNA 추출 완충액(50mM 아세트산 나트륨 pH 5.2/1% SDS) 1ml 중에 재현탁시키고 와동시킨후, 페놀(pH 5.2) 0.5ml로 65℃에서 15분동안 추출하고 얼음상에서 추가로 15분동안 추출하였다. 수층을 회수하여 2배의 에탄올로 침전시켰다. 총 RNA 10㎍으로부터 역전사 효소(BRL, Betheseda, MD) 및 프라이머로서 올리고 $-dT_{12-18}$(Pharmacia, Piscatway, New Jersey)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 폴리(dG) 테일을 말단 데옥시뉴클레오티드 트랜스퍼라제(BRL)를 사용하여 cDNA의 3'말단에 결합시키고(E.Y.Loh 등, Science 243. 271(1989)), 가변 도메인 유전자(V)를 폴리(dG)테일에 하이브리드하는 프라이머 mc045(TAATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCC) 및 불변부 유전자(C)에 하이브리드하는 프라이머들과 함께 AmpliTaq(Perkin Elmer-Cetus)를 사용하여 증폭시켰다.

경쇄에 있어서, 프라이머는 mc045(TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGG TGC)를 사용한다.

중쇄에 있어서는, 프라이머로서 mc047(TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC(CAT)GATGGGG(GC)TGT(TC)GTTTTGGC)을 사용한다. 괄호안의 서열은 염기 축퇴(degeneracy)를 나타내고 있다. 그 축퇴는 상기 프라이머가 대부분의 κ쇄에 하이브리드할 수 있도록 도입되었다. 다음, 증폭된 단편들을 EcoR I 및 Hind III로 절단하고 서열 결정용 pUC 18 벡터내로 클로닝하였다.

제7도는 항체 mik-β1의 가변부를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 cDNA 서열 및 해독된 아미노산 서열을 나타낸 것이다. CDR 서열은 밑줄친 부분이다. 성숙한 경쇄 단백질은 아미노산 23Q로 시작하고, 성숙한 중쇄 단백질은 아미노산 20Q로 시작하며, 각각의 신호 서열이 선행하고 있다.

제8도는 플라스미드 pVg1-dhfr(A) 및 pVk(B)의 도해이다. 플라스미드 pVgl-dhfr은 다음과 같은 부분을 함유한다: amp 및 dhfr 유전자를 함유하는 약 4200 염기쌍의 BamHI-EcoR I 단편; EcoR I 및 Xba I 링커에 의해 5' 및 3' 말단에 각각 근접한 인체 시토메갈로비루스 IE1 유전자 프로모터 및 인헨서(enhancer)(Boshart 등,Cell 41,521(1985))를 함유하는 630-bp 단편; 및 선행하는 인트론 및 폴리(A) 시그널의 215bp를 가진 인체의 감마-1 불변부 유전자를 함유하는 2800bp의 Xbal-BamHI 단편. 플라스미드 pVk는 상기 dhfr 유전자 대신 gpt 유전자를, 감마-1 유전자 대신 1530-bp의 인체 카파 불변부 유전자를 가지고 유사하게 작제하였다. 상기 플라스미드들은 본 기술 분야의 공지된 방법(Maniatis 등,Molecular Cloning:A Laboratory Manual.2판,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y(1989) 참조)을 사용하여 표시된 부분들로부터 작제하였다. 예를 들면, pVgl-dhfr은 플라스미드 pVgl(1990. 9. 28. 출원된 미국 특허 출원 제07/790,274호로서 공동 양도됨)로부터 hyg 유전자를 함유하는 Hind III-Bgl II 단편을, dhfr유전자를 함유하고 Bgl II 부위까지 신장되어 있는 660bp단편으로 대치시킴으로써 작제하였다. (Simonsen 등, Proc, Natl. Acad. Sci. USA 80. 2495(1983)).

제9도는 아이소타입(isotype)이 부합하는 대조용 항체(－), 인체화된 mik-β1 항체(---), 키메라 mik-β1 항체(· · ·)로 염색된 YTJB 세포의 형광세포 측정법(fluorocytometry)으로 측정한 결과이다. 세포 약 5 x 10^6/㎖를 FACS 완충액(PBS + 2% BSA + 0.1% 아지드)중에 현탁시켰다. 세포 현탁액 100㎕를 폴리스티렌 튜브로 옮기고 정제된 항체 100ng과 얼음상에서 30분동안 배양하였다. 그 세포를 FACS 완충액으로 세정하고 염소 항-사람 Ig 항체와 함께 얼음상에서 추가 30분동안 배양하였다. 그 다음 세포를 세정하고 FITC 표지된 토끼 항-염소 Ig 항체와 함께 30분동안 배양하였다. 그 세포를 다시 세정하고 마지막으로 PBS + 1% 파라포름알데히드 중에 재현탁시켰다. 세포를 FACSmate(Becton Dickinson)상에서 분석하였다.

제10도는 신호 서열을 함유하지 않는 인체화된 mik-β1 항체(아래 및 사람 Lay 항체(위)의 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 각 사슬의 3개의 CDR에는 밑줄이 그어져 있다. 인체화된 항체 중의 마우스 아미노산 또는 공통(consensus) 인체 아미노산으로 대체된 프레임워크내의 아미노산에는 이중 밑줄이 그어져 있다.

제11도는 인체화된 mik-β1 중쇄(B) 및 경쇄(A)의 작제에 사용된 올리고 뉴클레오티드이다. 다음 올리고 뉴클레오티드 쌍을 혼합하고 시쿼나제(sequenase)로 신장시킨 뒤 하기 제시된 효소로 절단하여 pBluescript II ks(+)벡터내로 결찰시켰다. Xba I 및 Sal I 부위를 가진 wps54 및 vcII, Xba I 및 Sal I 부위를 가진 vc 12 및 wps 57, Xba I 및 Kpn I부위를 가진 vc16 및 vc13, Xba I 및 Kpn I 부위를 가진 vc14 및 vc15. 그 다음 wps 54-vc11 및 vc12-wps57 단편을 Xba I 및 Sal I으로 절단하여 pVgl-dhfr의 Xba I 부위 내에 함께 연결시키고; vc16-vc13 단편 및 vc14-vc15 단편을 Xba I 및 Kpn I으로 절단하여 pVk의 Xba I 부위내에 함께 연결시켰다.

제12도는 YTJB 세포에 대한 표지된 mik-βI 추적인자(tracer)의 경쟁적 결합을 나타낸 것이다. 약 10^6 YTJB 세포를 200㎕의 결합 완충액(PBS +10% 태아 송아지 혈청 + 0.1% NaN_3 + 10㎍/ml 마우스 모노클로날 Ig)중의 방사성-요오드화된 마우스 mik-βI 항체(6μCi/㎍) 3.0ng 및 다양한 양의 비표지된 마우스 mik-βI 항체(●) 또는 인체화된 mik-βI 항체(○)와 함께 배양하였다. 0℃에서 2시간동안 배양한후, 세포를 마우스 IgO이 첨가되지 않은 결합 완충액으로 2회 세정하고 원심분리하여 수거하였다. 세포에 결합된 방사능을 측정하고 결합형/유리형 cpm의 비율로서 표시하였다.

제13도는 인체화된 mik-β1 + 인체화된 항-Tac 항체에 의한 인체 PHA 아세포(blast)의 IL-2 자극된 증식의 저해를 나타낸 것이다. 항체 무첨가(□), 인체화된 mik-β1 및 인체화된 항-Tac 각각 2㎍ 첨가(■).제14도는 뮤린 및 인체화된 Fd79 항체의 중쇄(A) 및 경쇄(B)의 아미노산 서열과 뮤린 및 인체화된 Fd138-80 항체의 중쇄(C) 및 경쇄(D)의 아미노산 서열에 관한 것이다. cDNA로부터 추론된 뮤린 항체의 서열(위)을 인체화된 항체 서열(아래)과 정렬시켜 나타내었다. 인체화된 Fd79 및 Fd138-80 프레임워크 서열은 각각 Pom 항체 및 Eu항체로부터 유도된 것이다. 그 잔기들을 카베트(Kabat) 시스템[E. A. Kabat 등, 면역학적으로 흥미로운 단백질들의 서열(National Institutes of Health, Bethesda, MD)(1987)]에 따라 번호를 매긴다. 각 쇄중의 3개의 CDR에는 박스를 그려놓았다. 뮤린 서열 또는 공통 인체 서열로 대체된 Pom 또는 Eu 프레임워크내의 잔기들에는 밑줄이 그어져 있다.

제15도는 플라스미드 pVgl(A) 및 pVk(B)의 모식도이다. 플라스미드 pVgl은 다음 단편들로부터 작제된다; amp 및 hyg 유전자를 함유하는 플라스미드 pSV2hph 유래의 약 4850 염기쌍의 Bam HI-EcoR I 단편; EcoR I 및 Xba I 링커에 의해 5' 및 3'말단에 각각 근접한 사람 시토메가로비루스 IE1 유전자 프로모터 및 인헨서(enhancer)(Boshart 등 , Cell 41, 521(1985))를 함유하는 630-bp 단편; 및 선행하는 인트론 및 폴리(A) 시그널의 215bp를 가진 사람의 감마-1 불변부 유전자를 함유하는 2800bp의 Xbal-BamHI 단편. 플라스미드 pVk는 상기 hyg 유전자 대신 gpt 유전자, 감마-1 유전자 대신 1530-bp의 사람 카파불변부 유전자를 가지고 유사하게 작제한다.

제16도는 Fd79(A) 및 Fd138-80(B) 항체로 염색한 HSV-1 감염된 베로(Vero) 세포를 형광세포 측정법으로 측정한 결과이다. 아이소타입이 부합하는 대조용 항체(· ·), 인체화된 항체(· · ·), 키메라 항체(－). 베로 세포를 3pfu/세포의 HSV-1(△305 돌연변이(F 균주))로 밤새동안 감염시킨다. 그 세포를 1분동안 0.5mg/ml의 트립신으로 처리하고, PBS로 충분히 세정한 후, FACS완충액(PBS + 2% BSA + 0.1% 아지드)내에

약 5 x 10^6/ml 정도로 재현탁시킨다. 세포 현탁액 100μl를 폴리스티렌 튜브로 전이하여 정제된 항체 100ng과 얼음상에서 30분동안 배양한다. 그 세포를 FACS 완충액으로 세정하고 FITC로 표지된 염소 항-사람 항체(Cappel)와 함께 추가 30분동안 얼음상에서 배양한다. 그 다음 세포를 세정하고 마지막으로 PBS + 1% 파라포름알데히드 내에 재현탁시킨다. 세포를 FACSmate(Becton Dickinson)상에서 분석한다.

제17도는 Fd79(A) 및 Fd138-80(B)에 의한 HSV-1의 중화 반응을 나타낸 것이다. 항체 연속 희석물과 비루스 100pfu를 혼합하고 37℃에서 1시간 동안 배양한다. 그 비루스를 6-웰 평판상에 응집성 베로 세포와 함께 접종하고 37℃에서 1시간 동안 흡착시킨다. 세포를 1% 아가로스를 함유한 배지로 피복하고 4일동안 배양한다. 플라크를 중성적(赤)으로 염색한다.

제18도는 뮤린 또는 인체화된 Fd79(A), 뮤린 또는 인체화된 Fd138-80(B)이 조직 배양중에 비루스 전파로부터 세포를 보하할 수 있는지를 조사하기 위해 감염된 베로 세포 단층을 면역염색한 것이다. 응집성 베로 세포를 접종한 24-웰 평판에 0.1 pfu/세포의 비루스를 접종하고 37℃에서 2시간동안 흡착시킨뒤, 배지중에 10μg/ml 의 항체 200μl를 첨가한다. 4일후 배양 배지를 제거하고 평판을 37℃ 배양기내에 밤새동안 방치함으로써 건조시킨다. 비루스 항원을 검출하기 위해, 각 웰을 0.5μg/ml의 항-gB 항체 200μl와 함께 37℃에서 1시간동안 배양한 뒤, 2회 세정하고 그 다음 퍼옥시다제 결합된 염소 항-마우스 IgG(Cappel,1:300 희석율) 200μl와 함께 37℃에서 1시간 동안 배양한다. 평판을 세정한 다음 기질 3-아미노-9-에틸-카르바졸(AEC)(Sigma, St. Louis, MO)로 실온에서 15분 동안 발색시킨다. 물로 세정하여 반응을 중지시키고 공기 건조시킨다.

제19도는 항체 M195의 가변부를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 cDNA 서열 및 해독된 아미노산 서열을 나타낸 것이다. CDR 서열은 밑줄친 부분이다. 성숙한 경쇄 단백질은 아미노산 21 D로 시작하고, 성숙한 중쇄 단백질은 아미노산 20E로 시작하며, 그 각각은 신호 서열이 선행하고 있다.

제20도는 플라스미드 pVg-1-dhfr(A) 및 pVk(B)의 모식도이다. 플라스미드 pVgl-dhfr 다음과 같은 부분을 함유한다 : amp 및 dhfr유전자를 함유하는 약 4200 염기쌍의 Bam H I-EcoR I 단편; EcoR I 및 Xba I 링커에 의해 5' 및 3'말단에 각각 근접한 사람 시토메가로비루스 IE1 유전자 프로모터 및 인헨서 (enhancer)(Boshart 등, Cell 41, 521(1985))를 함유하는 630-bp 단편; 및 선행하는 인트론 및 폴리(A)시그널의 215bp를 가진 사람의 감마-1 불변부 유전자를 함유하는 2800bp의 Xbal-BamHI 단편. 플라스미드 pVk는 상기 dhfr 유전자 대신 gpt 유전자, 감마-1 유전자 대신 1530-bp의 사람 카파 불변부 유전자를 가지고 유사하게 작제한다. 상기 플라스미드들은 본 기술 분야에 공지된 방법(Maniatis 등,Molecular Cloning:A Laboratory Manual.2판,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989) 및 1989.4.13 출원된 PCT/89/01578 참조)을 사용하여 표시된 부들로 각제한다. 예를 들면, pVg 1-dhfr은 플라스미드 pVgl중에서 hyg 유전자를 함유하는 Hind III-Bg1 II 단편을 dhfr유전자를 함유하고 Bgl II 부위까지 신장되어 있는 660bp단편으로 대치시킴으로써 작제한다(Simonsen 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80. 2495(1983)).

제21도는 항체 무(· ·), 인체화된 M195 항체(· · ·), 키메라 M195 항체(---)로 염색된 U937 세포를 형광세포 측정법으로 측정한 결과이다. 세포 약 5 x 10^6/ml를 FACS 완충액(PBS + 2% FCS + 0.1% 아지드)중에 현탁시킨다. 세포 현탁액 100μl 폴리스티렌 튜브로 전이하여 정제된 항체 50ng과 얼음상에서 30분동안 배양한다. 그 세포를 FACS 완충액으로 세정하고 FITC 표지된 염소항-사람 Ig 항체와 함께 얼음상에서 추가 30분동안 배양한다. 그 세포를 다시 세정하고 마지막으로 PBS + 1% 파라포름알데히드 내에 재현탁시킨다. 세포를 FACSmate(Becton Dickinson)상에서 분석한다.

제22도는 신호 서열을 함유하지 않는 인체화된 M195 항체(아래) 및 사람 Eu 항체(위)의 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 각 쇄중의 3개의 CDR에는 밑줄이 그어져 있다. 인체화된 항체 중의 마우스 아미노산으로 대체된 프레임워크내의 잔기에는 이중 밑선이 그어져 있다.

제23도는 인체화된 M195 중쇄(A; ma1-4) 및 경쇄(B; ma5-8)의 작제에 사용된 올리고누클레오티드이다. 다음 올리고누클레오티드 쌍을 혼합하고 클레노우 폴리머라제(Klenow polymerase)로 신장시킨 뒤 하기 제시된 효소로 절단하여 pUC18내로 라이게이션 한다 : Xba I 및 Kpn I 부위를 가진 ma1 및 ma2, Xba I 및 Kpn I 부위를 가진 ma3 및 ma4, Xba I 및 Hind III 부위를 가진 ma5 및 ma6, Xba I 및 Hind III 부위를 가진 ma7 및 ma8. 그 다음 ma1-ma2 및 ma3-ma4 단편을 pUC18로부터 Xba I 및 KpnI으로 절단하여 pVgl-dhfr의 Xba I 부위 내에 함께 연결시키고; ma5-ma6 단편 및 ma7-ma8 단편을 Xba I 및 Hind III으로 절단하여 pVk의 Xba I 부위내에 함께 연결시킨다.

제24도는 U937 세포에 대한 표지된 M195 추적인자의 경쟁적 결합을 나타낸 것이다. 약 4 × 10^5 U937 세포를 200μl의 결합 완충액(PBS + 2% 태내 송아지 혈청 + 0.1% 아지드화 나트륨)중의 방사능-요오드화된 마우스 M195항체(6μCi/μg) 4.5ng 및 다양한 양의 비표지된 마우스 M195 항체(●)또는 인체화된 M195 항체(○)와 함께 배양한다. 0℃에서 2시간 동안 배양한 후, 세포를 결합 완충액으로 2회 세정하고 원심분리하여 수거한다. 세포에 결합된 방사능을 측정하고 결합형/유리형 cpm의 비율로서 표기한다.

제25도는 항체 CMV 5의 가변부를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 cDNA 서열 및 해독된 아미노산 서열에 관한 것이다. CDR 서열은 밑줄친 부분이다. 성숙한 단백질 서열의 출발부위는 화살표로 표시되어 있고, 그 각각은 신호서열이 선행하고 있다.

제26도는 플라스미드 pVg 1-dhfr(A) 및 pVk(B)의 모식도이다. 플라스미드 pVgl-dhfr은 다음과 같은 부분을 함유한다 : amp 및 dhfr유전자를 함유하는 약 4200 염기쌍의 BamH I-EcoR I 단편; EcoR I 및 Xba I 링커에 의해 5' 및 3'말단에 각각 근접한 사람 시토메가로비루스 IE1 유전자 프로모터 및 인헨서 (enhancer)(Boshart 등, Cell 41, 521(1985))를 함유하는 630-bp 단편; 및 선행하는 인트론 및 폴리(A) 시그널의 215bp를 가진 사람의 감마-1 불변부 유전자를 함유하는 2800bp의 Xbal-BamHI 단편. 플라스미드 pVk는 상기 dhfr 유전자 대신 gpt 유전자, 감마-1 유전자 대신 1530-bp의 사람 카파 불변부 유전자를 가지고 유사하게 작제한다. 상기 플라스미드들은 본 기술 분야의 공지된 방법(Maniatis 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2판, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)

및 1988. 4. 15. 출원되고 공동 양도된 미합중국 특허 출원 일련 번호 제07/181,862호 참조)을 사용하여 표시된 부들로 작제한다. 예를 들면, pVgl(본 출원인에 의해 1990년 9월 28일자 출원된 미국 특허 출원된 07/590,274)은 플라스미드 hyg 유전자를 함유하는 Hind III-Ball dhfr유전자를 함유하고 Bgl II부위까지 신장되어 있는 660bp 단편으로 대치시킴으로써 작제한다(Simonsen 등, Proc. Natl. Acead. S챠. USA 80.2495(1983)).

제27도는 신호 서열을 함유하지 않는 인체화된 CMV 5 항체(아래) 및 사람 Wol 항체(위)의 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 각 쇄중의 3개의 CDR에는 밑줄이 그어져 있다. 인체화된 항체 중의 마우스 아미노산 또는 일반적인 사람 아미노산으로 대체된 프레임워크내의 잔기에는 이중 밑선이 그어져 있다.

제28도는 인체화된 CMV 5 경쇄(A;jb16-jb19) 및 중쇄(B;jb20-jb22)의 작제에 사용된 올리고누클레오티드이다. 다음 올리고누클레오티드 쌍을 혼합하고 클레노우 폴리머라제로 신장시킨 뒤 하기 제시된 효소로 절단하여 pUC18 내로 라이게이션 한다 : Xba I 및 EcoR I 부위를 가진 jb16 및 jb17, Xba I 및 EcoR I 부위를 가진 jb18 및 jb19, Xba I 및 Kpn I 부위를 가진 jb20 및 jb21, Xba I 및 Kpn I 부위를 가진 jb22 및 jb23. 그 다음 jb16-jb17 및 jb18-jb19 단편을 Xba I 및 Mlu 1으로 절단하여 pVk의 Xba I부위 내에 함께 연결시키고; jb20-jb21 단편 및 jb22-jb23 단편을 Xba I 및 Kpn I으로 절단하여 pVgl-dhfr의 Xba I 부위내에 함께 연결시킨다.

제29도는 CMV-감염된 세포에 대한 표지된 CMV 5 추적인자의 경쟁적 결합을 나타낸 것이다. 마우스(●) 또는 인체화된(○)CMV5 항체의 증가량을 추적인자인 방사능-요오드화된 마우스 CMV5와 함께 CMV-감염된 HEL 세포에 첨가하고, 그 세포에 결합된 추적인자의 양을 결정한다.

제30도는 항체 AF2의 가변부를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄(B)의 cDNA 서열 및 해독된 아미노산 서열을 나타낸 것이다. CDR 서열은 밑줄친 부분이다. 성숙한 경쇄 단백질은 아미노산 30N으로 시작하고 성숙한 중쇄 단백질은 아미노산 36Q로 시작하며, 그 각각은 신호서열이 선행하고 있다.

제31도는 플라스미드 pVgl-dhfr(A) 및 pVk(B)의 모식도이다. 플라스미드 pVgl-dhfr은 다음과 같은 부분을 포함한다 : amp 및 dhfr유전자를 함유하는 약 4200 염기쌍의 BamH I-EcoR I 단편; EcoR I 및 Xba I 링커에 의해 5' 및 3'말단에 각각 근접한 사람 시토메가로비루스 IE1 유전자 프로모터 및 인헨서 (enhancer)(Boshart 등,Cell 41,521(1985))를 함유하는 630-bp 단편; 및 선행하는 인트론 및 폴리(A) 시그널의 215bp를 가진 사람의 감마-1 불변부 유전자를 함유하는 2800bp의 XbaI-BamHI 단편. 플라스미드 pVk는 상기 dhfr 유전자 대신 gpt 유전자, 감마-1 유전자 대신 1530-bp 사람 카파 불변부 유전자를 가지고 유사하게 작제한다. 상기 플라스미드들은 본 기술 분야의 공지된 방법(Maniatis 등,Molecular Cloning:A Laboratory Manual.2판,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989) 및 1988.4.15.출원되고 공동 양도된 미합중국 특허 출원 일련 번호 제07/181,862호 참조)을 사용하여 표시된 부들로 작제한다. 예를 들면, pVgl-dhfr은 플라스미드 pVgl(1990. 9. 28. 출원된 미합중국 특허 출원 일련 번호 제07/590,274호로서 공동 양도됨)중에서 hyg 유전자를 함유하는 Hind III-Bgl II 단편을 dhfr유전자를 함유하고 Bgl II 부위까지 신장되어 있는 660bp 단편으로 대치시킴으로써 작제한다(Simonsen 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80. 2495(1983)).

제32도는 신호 서열을 함유하지 않는 인체화된 AF2 항체(아래) 및 사람 Eu 항체(위)를 구성하는 경쇄(A) 및 중쇄 (B)의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 각 쇄중의 3개의 CDR에는 밑줄이 그어져 있다. 인체화된 항체 중의 마우스 아미노산 또는 일반적인 사람 아미노산으로 대체된 프레임워크내의 잔기에는 이중 밑선이 그어져 있다.

제33도는 인체화된 AF2 경쇄(A;rh10-rh13) 및 중쇄(B;rh20-23)의 작제에 사용된 올리고누클레오티드이다. 다음 올리고누클레오티드 쌍을 혼합하고 클레노우 폴리머라제로 신장시킨 뒤 하기 제시된 효소로 절단하여 pUC18내로 라이게이션 한다 : Xba I 및 Hind III 부위를 가진 rh10 및 rh11, Xba I 및 Hind III 부위를 가진 rh12 및 rh13, Xba I 및 EcoR I 부위를 가진 rh20 및 rh21, Xba I 및 EcoR I 부위를 가진 rh22 및 rh23. 그 다음 rh10-rh11 및 rh12-rh13 단편을 Xba I 및 Hind III으로 절단하여 pVk의 Xba I 부위 내에 함께 연결시키고; rh20-rh21 단편 및 rh22-rh23 단편을 Xba I 및 Xho I으로 절단하여 pVgl-dhfr의 Xba I 부위내에 함께 연결시킨다.

제34도는 γ-IFN + 다양한 농도의 마우스 AF2 항체와 함께 배양하고 항-HLA-D 항체로 염색한 HS294T 세포의 형광성을 나타낸 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명에 의하면, 소정의 항원에 강한 친화력으로 특이적으로 결합할 수 있는 신규의 인체화된 면역글로불린을 제공한다. 이 면역글로불린은 사람내에서 거의 면역원성이 없으나 결합 친화도가 약 $10^8\ M^{-1}$ 이상이고, 바람직하게는 $10^9\ M^{-1}$ 내지 $10^{10}\ M^{-1}$ 이거나 그 이상이다. 인체화된 면역글로블빈은 사람 프레임워크(framework) 및 항원과의 특이적 반응성을 지난 공급자 면역글로불린으로부터 유래된 하나이상의 상보성 결정부위(CDR)와 일정 수의 다른 아미노산을 지닌다. 이 면역글로불린은 다량으로 경제적으로 생성될수 있으며, 다양한 기술로 각종 사람 질환을 치료하는 방법에 사용될 수 있다.

본 발명을 더 완전하게 이해하기 위하여, 본 명세서에서 사용하고 있는 용어에 대하여 이하에서 정의하고자 한다. "면역글로불린"은 면역글로불린 유전자에 의해 거의 암호되는 폴리펩티드 하나 이상을 포함한 단백질을 의미한다. 인지되는 면역글로불린 유전자로는 카파, 람다, 알파, 감마(IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4), 델타, 엡실론 및 뮤(mu) 불변부 유전자 뿐만 아니라 매우 많은 면역글로불린 가변부 유전자를 포함한다. 완전한 길이의 면역 글로불린 "경쇄"(약 25Kd 또는 214 아미노산)는 NH_2-말단에 가변부 유전자(약 110 아미노산)와 COOH-말단에 카파 또는 람다 불변부 유전자에 의해 암호된다. 완전한-길이의 면역글로불린 "경쇄"(약 50Kd 또는 446 아미노산)도 유사하게 가변부 유전자(약 116 아미노산)및 기타 전술한 불변부 유전

자중 하나(예, 감마;약 330 아미노산 암호)에 의해 암호된다.

면역글로불린의 한예는 항체의 염기성 구조 단위를 포함한다. 이 형태는 4량체로서 두개의 동일한 면역글로불린 쇄의 쌍으로 구성되고, 각쌍은 하나의 경쇄와 하나의 중쇄를 지닌다. 각쌍의 경우, 경쇄 및 중쇄 가변부는 함께 항원에 대한 결합작용을 지니며, 불변부는 항체 작동기능을 지닌다. 항체이외에, 면역글로불린은 다양한 형태로 존재할 수 있으며, 예를 들어 Fv, Fab 및 $(Fab')_2$ 뿐만 아니라, 2 작용성 하이브리드 항체(예, 랑자베치아 등, Eur. J. Immunol. 17, 105(1987))및 단일쇄(예, 휴스톤 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.. 85, 5879-5883(1988) 및 버어드 등. Science, 242, 423-426(1988))로 존재할 수 있다[참고문헌 후드등, "Immunology", 벤자민, N.Y., 2판,(1984), 및 헌카필러 및 후드, Nature, 323, 15-16(1986)].

면역글로불린 경쇄 또는 중쇄의 가변부는 3개의 초가변부(또한 CDR 이라 명명)가 삽입된 "프레임워크"영역을 포함한다. 프레임워크 영역 및 CDR의 길이는 정확하게 규명되어 왔다(참고, 면역학적으로 흥미로운 단백질의 서열" E.카베트등. 미합중국 위생국(1983)). 상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 종마다 상당히 보존된다. "인체 프레임워크 영역"은 천연적으로 발생하는 인체 면역글로불린의 프레임워크 영역과 거의 동일한(약 85% 이상, 일반적으로 90-95%이상) 프레임워크 영역을 의미한다. 항체의 프레임워크 영역, 즉 구성 경쇄 및 중쇄의 결합된 프레임워크 영역은 소정의 위치에 CDR의 위치를 정하고 정렬시키는데 제공된다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합능력을 지닌다.

키메라 항체는 그것의 경쇄 및 중쇄가, 보통 유전공학적으로 작제된 항체로서, 면역글로불린 가변부 및 불변부 유전자는 상이한 종으로부터 유도된다. 예를 들면, 마우스 모노클로날 항체로부터 유도된 유전자의 가변부 분절을 사람 불변부분절(예,감마 1 및 감마 3)에 결합시킨다. 따라서, 대표적인 치료용 키메라 항체는 마우스 항체의 가변부 또는 항원-결합성 도메인 및 사람 항체의 불변부 또는 작동인자 도메인을 포함하는 하이브리드 단백질(예, ATCC 수탁번호 CRL 9688은 항-Tac 키메라 항체를 분비함)이나, 기타 포유류종도 사용될 수 있다.

본원에 사용된 "인체화된" 면역글로불린이란 용어는 사람 프레임워크 영역과 비-인간(대개 마우스나 랫트) 면역글로불린 원의 하나이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린을 의미한다. CDR을 제공하는 비-인간 면역글로불린은 "공급자(donor)"로 명명하고 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린은 "수용자(acceptor)"로 명명한다. 불변부가 존재할 필요는 없지만, 만일 존재하는 경우는 사람 면역글로불린 불변부와 거의 동일해야 하며, 즉 약 85-90% 이상, 바람직하게는 약 95% 이상 동일해야 한다. 따라서, CDR을 제외하고, 인체화된 면역글로불린의 모든부분은 자연 발생의 사람 면역글로불린 서열과 해당 부분이 거의 동일하다. "인체화된 항체"는 인체화된 경쇄 및 인체화된 중쇄 면역글로불린을 포함하는 항체이다. 예를 들어, 인체화된 항체는, 키메라 항체의 전체 가변부가 비-인체인 경우, 전술한 일반적인 키메라 항체를 포함하지 않는다. 공급자 항체는 "인체화"과정에 의해 "인체화"되며, 그로써 산출된 인체화 항체는 CDR을 제공하는 공급자 항체와 도일한 항원에 결합하는 것으로 생각된다고 한다.

본 발명의 방법에 의해 고안돤 인체화된 항체는 항원 결합력이나 기타 면역글로불린 기능에 거의 영향을 미치지 않는 추가의 보존적인 아미노산 치환이 있을 수 있다고 생각된다. 보존적 치환에 의해 의도된 조합의 예는 gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; 및 phe, tyr이 있다.

인체화된 항체를 비롯하여, 인체화된 면역글로불린은 유전공학법에 의해 작제된다. 공지된 대부분의 인체화된 면역글로불린(죤스 등,상기 인용문헌;베로연등,상기 인용문헌;라이크만 등,상기 인용문헌)은 특정의 사람 면역글로불린 쇄의 프레임워크와 동일한 프레임워크, 즉 수용자, 및 비-인체 공급자 면역글로불린쇄로부터 유래된 3개의 CDR을 포함한다. 한 예로서(라이크만 등, 인용문헌), 상기 프레임워크 중에 2개의 추가 아미노산이 다른 사람 프레임워크 영역의 아미노산과 같은 것으로 변경된 경우도 있다.

본 발명은 인체화된 면역글로불린 쇄의 프레임워크중에 제한된 수의 아미노산을 수용자보다 공급자의 그 위치에 있는 아미노산과 동일한 것을 선택하여, 이로써 인체화된 면역글로불린 쇄를 포함하는 항체의 친화도를 증가시키는 기준을 포함한다.

본 발명은 부분적으로는 인체화된 항체를 산출하는 종래의 방법(CDR 원으로서 마우스 항체를 사용)에서 결합력을 감소시키는 2가지 주요원인이 다음과 같다는 모델에 근거한 것이다 :

(1) 마우스 CDR을 사람 프레임워크와 결합하는 경우, CDR에 근접한 프레임워크내의 아미노산은 마우스 대신 사람의 아미노산이 된다. 이론에 제한없이, 이러한 변경된 아미노산은 CDR을 약간 비틀며, 그때문에 공급자 마우스 항체에서 보다 정전기성 또는 소수성이 상이해지며, 따라서 그 비틀린 CDR은 공급자 항체에서 처럼 항원과 효과적으로 접촉할 수 없을 것으로 생각된다;

(2) 또한, CDR의 일부분이 아니라 그에 인접해 있는(즉,프레임워크의 일부임) 본래의 마우스 항체에 있는 아미노산은 친화력에 기여하는 항원과의 접촉을 가능케 한다. 이 아미노산들은 항체가 인체화 되었을때 소실되며, 이때문에 모든 프레임워크 아미노산은 인체화 된다.

(3) 주입된 마우스 항체는 인체 순환계 내에서 정상 항체의 반감기 보다 더 짧은 반감기를 갖은 것으로 보고되어 왔다(D.쇼우 등,J.Immunol.,138,4534-4538(1987)). 주입된 인체화된 항체는 자연발생의 사람 항체와 더 유사한 반감기를 지니는 것으로 추정되며, 따라서 더 소량을 긴 간격으로 투여할 수 있게 된다.

이러한 문제점을 해결하고, 원하는 항원에 대해 매우 강한 친화력을 지니는 인체화된 항체를 산출하기 위하여, 본 발명은 다음의 인체화된 면역글로불린의 고안원칙중 하나이상의 원칙을 사용한다. 또한 원하는 친화력이나 기타 특성을 수득하기 위해, 그 기준은 단독적으로 사용되거나, 필요한 경우 병행하여 사용할 수 있다.

첫번째 원칙은, 수용자로서 인체화될 공급자 면역글로불린과 특이적으로 상동성인 특정의 사람 면역글로불린의 프레임워크를 사용하거나, 또는 많은 사람 항체의 고통(consensus)프레임워크를 사용하는 것이다. 예를 들어, 데이타 뱅크(예,더 내쇼날 바이오메디칼 리서어치 파운데이숀 프로테인 아이덴티피게이숀 리소스)에 있는 사람 중쇄(또는 경쇄)가변부에 대한 마우스 중쇄(또는 경쇄) 가변부의 서열을 비교하여 여러가지 사람 영역에 대한 상동성 정도가 약 40% 내지 약 60-70%로 크게 다양함을 알았다. 공급자 면역글

로불린의 중쇄(내지 경쇄) 가변부와 가장 상동한 사람 중쇄(내지 경쇄)가변부중 하나를 수용자 면역글로불린으로서 선택함으로써, 더 적은 아미노산이 공급자 면역글로불린으로부터 인체화된 면역글로불린으로 변화될 것이다.

따라서, 이론에 제한됨이 없이, CDR의 형태를 변화시키는 CDR 근처의 아미노산 변화 가능성이 더 적어질 것으로 믿어진다. 또한, 인체화된 면역글로불린 쇄를 포함하는 인체화된 항체의 전체적인 정확한 형태는 공급자 항체의 형태와 더욱 유사해질 것이며, 또한 CDR의 변형 기회가 감소된다. 일반적으로, 대표적인 약 10 내지 20 개 이상의 상이한 사람 중쇄 수집물에 있어서, 3-5개의 가장 상동성이 있는 중쇄 가변부 서열중 하나를 수용자로서 선택하여 중쇄 프레임워크를 제공하며, 경쇄의 경우도 유사하게 제조한다. 바람직하게는 1-3개의 가장 상동성이 있는 가변부중 하나를 사용한다. 가장 바람직하게는, 선정된 수용자 면역글로불린 쇄가 공급자 면역글로불린에 대해 프레임워크 영역에 있어서 약 65% 이상의 상동성을 갖는 것이다.

맑은 경우에 있어서, 수용자 서열과 동일한 사람 항체의 경쇄 및 중쇄를 사용하는 것이 바람직한 것으로 간주되며, 이로써 인체화된 경쇄 및 중쇄는 서로 양호하게 접촉하게 될 것이다. 이 경우, 공급자의 경쇄 및 중쇄는 그것의 완전한 서열이 공지된 사람 항체, 예를 들어, Eu, Lay, Pom, Wol, Sie, Gal, Ou 및 WEA 항체의 쇄에 대응하여서만 비교될 것이다(카베트등,인용문헌;때로는,상기 공지된 사람 쇄의 최종 몇개 아미노산은 공지되지 않았으며 기타 사람 항체와의 상동성에 근거하여 추론해야 함).

상기의 사람 항체는 경쇄와 중쇄 가변부 서열이, 함께 선택된다면, 공급자 중쇄 및 경쇄 가변부 서열과 전체적으로 가장 상동한 것을 선택해야 한다. 때때로 중쇄서열에 더 큰 비중이 부여되기도 한다. 선택된 사람 항체는 경쇄와 중쇄 수용자 서열 둘다를 제공할 것이다. 실제로, 사람의 Eu 항체는 이러한 역할을 제공하는 것으로 밝혀졌다.

수용자 면역글로불린이 어떻게 선택되는지에 상관없이, 인체화된 면역글로불린 쇄의 프레임워크내에 소수의 아미노산을 수용자 보다 공급자내의 그 위치의 아미노산과 동일한 것을 선택함으로써 높은 친화력을 얻을 수 있다. 두번째 원칙은 이하의 카테고리에 따라 공급자로부터 임의의 아미노산을 선택하는 것이다. 바람직하게는, 이 카테고리중 하나에 있어서 많은 또는 모든 아미노산 위치에는 공급자 아미노산이 실제로 선택된다.

카테고리1 : DCR에서의 아미노산 위치는 카베트, 등(kabat,et al.,상기 인용문헌)의 문헌에 의해 규정된 바 있다.

카테고리2 : 사람 수용자 면역글로불린의 프레임워크에 있는 아미노산이 특이적인 경우(즉,"희귀한"것으로서,대표적인 데이타 뱅크에있는 중쇄(내지 경쇄)영역 서열의 약 20% 이하,대개는 약 10% 이하로 해당위치에 나타나는 아미노산을 의미함), 및 그 해당 위치에서 공급자 아미노산이 사람 서열에 대해 일반적인 경우(즉, "공통"인 것으로서, 대표적인 데이타 뱅크에 있는 서열과 약 25% 이상, 대개는 약 50% 이상으로 나타나는 아미노산을 의미함), 수용자 보다는 공급자의 아미노산이 선택될 것이다. 이러한 요건은 사람 프레임워크중의 불규칙적인 아미노산이 항체 구조를 변형시키지 않도록 보조하는 것이다. 또한, 특이적인 아미노산을 사람 항체에 일반적으로 나타나는 공급자 항체의 아미노산으로 대체함으로써, 인체화된 항체는 면역원성이 다소 감소될 수 있다.

모든 인체 경쇄 및 중쇄의 가변부 서열은 각각 서열의 "서브그룹(subgroup)"으로 그룹화되는데, 이 서열은 특히 서로 상동성이 있고 임의의 중요한 위치에서 동일한 아미노산을 갖는다(카베트 등,상기 인용문헌). 사람 수용자 서열내의 아미노산이 인체서열과 "공통적"인지 "희귀한"지를 결정할때, 수용자 서열 과 동일한 서브그룹내의 인체 서열만을 고려하는 것이 바람직하기도 하다.

카테고리3 : 인체화된 면역글로불린 쇄의 일차 서열에 있어서 3개중 1개이상의 CDR에 인접한 위치에는, 수용자보다 공급자의 아미노산(들)이 선택될 수 있다. 이러한 아미노산은 특히 CDR의 아미노산과 서로 작용하기 쉽고, 만일 수용자로부터 선택된다면 공급자의 CDR을 변형시키고 친화력을 경감시키기 쉽다.

또한, 인접한 아미노산은 직접적으로 항원과 작용하며(아미트 등,Science 233,747-753(1986)), 공급자로부터 이러한 아미노산을 선택하는 것이 본래 항체의 친화력을 제공하는 모든 항원 접촉성을 보유하는데 바람직하다.

카테고리4 : 일반적으로 본래의 공급자 항체의 3-차원적 모델은 CDR의 외측의 특정한 아미노산이 CDR에 인접해 있고, 수소결합, 반데르 발스력, 소수성 상호작용등에 의해 CDR 내의 아미노산과 상호작용할 가능성이 있음을 나타낸다.

이러한 아미노산의 위치에는 수용자 보다 공급자의 면역글로불린 아미노산이 선택될수 있다. 이러한 요건에 의거한 아미노산은 일반적으로 CDR의 몇몇 원자의 약 3Å 단위내에 측쇄원자를 지니며, 전술한 기존화학적 힘에 의해 CDR 원자와 상호 작용할 수 있는 원자를 포함해야만 한다.

수소결합을 형성하는 원자의 경우, 그들의 핵사이 거리는 3 Å으로 측정되나, 결합을 형성하지 않는 원자의 경우, 그들의 반데르 발스 표면 사이의 거리가 3 Å이다. 따라서, 후자의 경우 핵은 상호작용할 수 있을 것으로 간주되는 원자의 경우 약 6Å(3 + 반데르발스 반경의 합)이내여야만 한다. 수 많은 경우에, 핵은 4 또는 5 내지 6Å 떨어져 있다. 아미노산이 CDR과 상호작용하는지를 결정함에 있어, CDR의 일부로서 중쇄 CDR 2의 마지막 8 아미노산은 고려하지 않는것이 바람직하며, 이것은 구조면에서 상기 8개 아미노산이 프레임워크의 일부로서 작용하기 때문이다.

CDR 내의 아미노산과 상호작용할 수 있는 프레임워크내의 아미노산은 카테고리 4에 속하는 것으로서, 다른 방법으로 구별될 수 있다. 용매가 접근할 수 있는 각각의 프레임워크 아미노산의 표면적은 이하 두 방법으로 계산된다 : (1) 고유의 항체내에서, 및 (2) CDR을 제거할 항체로 이루어진 가설의 분자내에서, 그들사이에 약10$Å^2$이상의 큰차이가 나는것은 용매에 대한 프레임워크 아미노산의 접근이 CDR에 의해 적어도 부분적으로 차단되고, 그로써 상기 아미노산이 CDR과 접촉하게 됨을 나타낸다. 용매가 접근가능한 아미노산의 표면적은 항체의 3-차원적 모델에 근거하여 당분야의 공지된 연산을 사용하여 계산할 수 있다(예,코

놀리,J.Appl.Cryst.16.548(1983) 및 리 및 리챠드,J.Mol.Biol.55.379 (1971)).

프레임워크 아미노산은 또한 CDR과 접촉하는 다른 프레임워크 아미노산의 구조에 영향을 미침으로써 CDR과 간접적으로 상호작용할 수 있다.

프레임워크 내의 몇몇 위치에서의 아미노산, 특히 경쇄의 위치 2, 48, 64 및 71과 중쇄의 위치 26-30, 71 및 94(카베트에 의해 번호매겨짐,상기 인용문헌)의 아미노산은 많은 항체의 CDR과 상호작용할 수 있는것으로 공지되었으며(코티아 및 레스크,J.Mol.Biol.196,901(1987),코티아 등,Nature 342,877(1989), 및 트라몬타노 등.,J.Mol.Biol.215,175(1990)), 따라서 이러한 아미노산은 일반적으로 카테고리 4에 속할 것이다. 일반적으로, 본 발명의 인체화된 면역글로불린은 상기 아미노산에 추가하여 카테고리 4의 공급자 아미노산(상이한 위치에)를 포함한다. 경쇄 35 위치 및 중쇄 93 및 103 위치의 아미노산들도 CDR과 상호작용하는 것으로 추정된다. 상기의 모든 위치에는, 수용자 아미노산(상이한 경우) 보다는 공급자 아미노산이 인체화된 면역글로불린에 존재하는 것이 바람직하다. 한편, 카테고리 4에 포함되는 특정한 위치, 예를 들어 경쇄의 처음 5개 아미노산은 인체화된 면역글로불린의 친화력을 감소시킴이 수용자 면역글로불린으로부터 선택되디고 한다.

콘티아 및 레스크(상기 인용문헌)은 카베트 등(상기 인용문헌)과 상이하게 CDR을 규정한다. 특히 CDR1은 잔기 26-32를 포함하는 것으로 규정한다. 따라서, 라이크만, 등(인용문헌)은 공급자 면역 글로불린으로부터 상기 아미노산을 선택한다.

상기 항체와 같은 단백질의 모델을 창안하기 위한 컴퓨터 프로그램은 일반적으로 당분야에서 입수가능하며 공지되어 있다(참고,레비,등.,Biochemistry,28, 7168-7175(1989);브루콜레리 등.,Nature,335,564-568(1988);코티아 등,Science,233,755-758(1986)). 이는 본 발명의 일부에 속하지 않는다. 실제로, 모든 항체들은 유사한 구조를 가지기 때문에, Brookhaven Protein Data Bank에서 입수가능한 공지된 항체 구조가 필요하다면 다른 항체의 참고용 모델로 사용될 수 있다. 시판되고 있는 컴퓨터 프로그램은 컴퓨터 모니터에 이러한 모델을 전시하여, 원자간의 거리를 계산하고, 그리고 상이한 아미노산의 상호작용 가능성을 예측하는데 사용할 수 있다(참고,페린 등,J.Mol.Graphics,6,13-27(1988)).

전술한 카테고리 외에도, 인체화된 면역 글로불린의 아미노산이 공급자로부터 수득되는 경우, 인체화된 면역 글로불린의 특정아미노산은 공급자나 수용자로부터 수득될수 없으며 그런경우, 다음의 가능성이 있다 :

카테고리5 : 전술한 바와 같이 공급자 면역 글로불린내에 제시된 위치에서의 아미노산이 사람 서열에 있어서 "희귀"하다면, 그리고 수용자 면역글로불린의 그 위치에서의 아미노산 역시 사람 서열에 있어서 "희귀"하다면, 인체화된 면역글로불린내에 그 위치의 아미노산은 사람 서열의 "대표적인" 아미노산으로 선택된다. 바람직한 선택은 수용자 서열과 동일한 서브그룹에 속하는 공지된 사람 서열내의 그 위치에서 가장 빈번하게 나타나는 것이다.

일반적으로 인체화된 항체는 인체 치료를 위한 용도에 있어서 마우스 또는 어떤 경우에는 키메라 항체에 비해 3가지 이상의 유력한 장점을 지닌다 :

1) 작용자 일부가 사람의 것이기 때문에, 사람 면역 시스템의 다른 부분과 더 상호작용을 잘 할수 있다(예, 보체-의존적 세포 독성(CDC) 또는 항체-의전적 세포의 세포 독성(ADCC)에 의해 더 효율적으로 표적 세포를 파괴시킴).

2) 사람 면역시스템은 인체화된 항체의 프레임워크 또는 불변부를 이종으로서 인지하지 않아야 하며, 그런 주입된 항체에 대한 항체 응답은 완전한 이종 마우스 항체 또는 부분적으로 이종인 키메라 항체에 대한 것보다 적어야 한다.

일면으로서, 본 발명은 공급자 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄 CDR을 암호하는 제조합 DNA 분절을 형질발현함으로써 산출되는 인체화된 면역글로불린을 작제하는 것에 관한 것으로서, 상기 공급자 면역글로불린은 수용자 사람 프레임워크영역을 암호하는 DNA 분절에 부착되는 바람직한 항원(예, 사람 IL-2 수용체)에 결합할 수 다. 본 발명에 의거하여 고안된 DNA 서열의 예는 제1도 내지 제4도에 제시된 사람 프레임워크 영역과 함께 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하는 폴리펩타이드 쇄를 암호한다. 코돈 축퇴 및 중요치 않은 아미노산의 치환으로 인해, 다른 DNA 서열도 후술하는 바와 같이 상기 서열로 쉽게 치환될 수 있다.
일반적으로, 본 발명의 기준은 실질적으로 임의의 인체화된 면역글로불린을 작제하는데 응용할 수 있다는 것이다.

상기 DNA 분절은, 자연적으로 -관련이 있거나 또는 이종의 프로모터 영역을 비롯하여 인체화된 면역글로불린 암호서열에 작용적으로 결합되는 형질발현 조절 DNA 서열을 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 형질발현 조절서열은 벡터중의 진핵성 프로모터 시스템으로서 진핵 숙주세포를 형질전환 시키거나 형질감염 시키지만, 원핵 숙주세포에 대한 조절서열도 사용할 수 있다. 상기 벡터가 일단 적당한 숙주에 주입되면, 숙주는 누클레오티드 서열을 고 수율로 형질발현 하기에 적당한 조건하에 유지시키며, 필요하다면, 인체화된 경쇄, 중쇄, 경쇄/중쇄 이량체 또는 본래의 항체, 결합 단편이나 또는 기타, 면역글로불린 형태를 회수 및 정제할 수 있다(참고.S..베이코크,Cell of Immunoglobulin Synthesis,Academic Press,뉴욕,(1979)).

사람의 불변부 DNA 서열은 공지된 방법에 의거하여 각종의 사람 세포, 바람직하게는 불사의 B-세포로부터 분리할 수 있다(참고,카베트;상기 인용문헌 및 WP87/02671). 본 발명이 면역글로불린을 산출하기 위한 CDR은 소정의 항원에 결합할 수 있는 모노클로날 항체(예,사람 IL-2 수용체)로부터 유사하게 유도될수 있으며, 항체를 산출할 수 있는 임의의 용이한 포유류(마우스 랫트,토끼 또는 기타 척추동물)로부터 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 상기 불변부와 프레임워크 DNA 서열에 적당한 제공원 세포 및 면역글로불린 형질발현 및 분비에 적당한 숙주세포는 미합중국 모식균 배양 수집소("Catalogue of cell Lines and Hybridomas",6판(1988),미합중국,메릴랜드주,록크빌 소재) 등에서 입수할 수 있다.

본원 명세서에서 구체적으로 기재한 인체화된 면역 글로불린 이외에, 자연서열과 "거의 상동한" 기타 변형된 면역 글로불린도 쉽게 작제할 수 있으며, 당업자들에게 공지된 여러가지 재조합 DNA 법을 사용하여

제조할 수 있다. 예를 들어, 프레임워크 영역은 몇개 아미노산의 치환, 말단 및 중간부 첨가 및 결실 등에 의해 1차 구조상의 제1도 내지 4도의 서열이 특이적으로 변화될 수 있다. 또한, 상이한 다수의 사람 프레임워크 영역은 본 발명의 인체화된 면역글로불린의 기초로써, 단독 또는 조합하여 사용할 수 있다. 일반적으로, 상기 유전자의 변형은 부위-지시성 돌연변이와 같은 공지된 여러가지 기법에 따라 쉽게 실시할 수 있다(참고. 길만및 스미스, Gene, 8, 81-97(1979) 및 S. 로버츠 등, Nature, 328, 731-734(1987)).

거의 상동한 면역글로불린 서열은 대조 면역글로불린 단백질과 약 85% 이상의 상동성, 일반적으로 약 90% 이상의 상동성 및 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 나타내는 서열이다.

또한, 1차 항체 구조의 한 부위만을 포함하는 폴리펩티드 단편을 제조할 수 있으며, 이 단편은 하나이상의 면역글로불린 활성(예, 보체 고정활성)을 보유한다.

이러한 폴리펩티드 단편은 당분야에 공지된 방법으로 본래의 항체를 단백질분해 효소로 절단하거나, 부위-지지성 돌연변이를 사용하여 원하는 부위에 종지코돈을 삽입(예를 들어 Fab 단편을 산출하기 위해서는 CH1 뒤에, $(Fab')_2$ 단편을 산출하기 위해서는 힌지(hinge) 영역뒤에 삽입)한다. 단일 쇄 항체는 DNA 링커를 이용하여 VL과 VH를 결합함으로써 산출할 수 있다(참고.휴스톤 등,상기 인용문헌,및 버드 등,상기 인용문헌). 또한 많은 유전자 처럼, 면역글로불린-관련 유전자도 그각각이 하나이상의 상이한 생물학적 활성을 지니고있는 분리된 작용성 영역을 포함하기 때문에, 이 유전자는 다른 유전자(예,효소:1987년 12월 15일에 출원된 공동 양도된 U.S.S.N 132, 387호 참고)의 작용성 부위에 융합되어 신규한 특성을 지니는 융합 단백질(예,면역독소)를 산출할 수도 있다. 본 발명의 핵산 서열은 궁극적으로 원하는 인체화된 항체를 형질 발현할 수 있으며, 여러 상이한 폴리누클레오티드(게놈 또는 cDNA,RNA,합성 올리고누클레오티드,등) 및 성분(예,V,J,D 및 C영역)으로부터 형성될수 있을 뿐만 아니라 여러 상이한 방법으로도 제조될 수 있다. 적당한 합성서열과 게놈서열을 결합시키는 방법이 현재 가장 일반적인 제조 방법으로 제시되지만 cDNA 서열도 또한 사용될 수 있다(참고,유럽 특허공고 번호 제0239400호 및 L.라이크만 등,Nature,332,323-327(1988)).

전술한 바와같이, DNA 서열은 형질발현 조절 서열에 작동가능하게 결합 (즉, 작용할수 있게 하는 위치에)된 이후 숙주내에서 형질발현될 것이다.

이러한 형질발현 벡터는 일반적으로 숙주 염색체 DNA의 필수 부분으로서 또는 에피좀으로서 숙주내에서 복제가능하다. 보통 형질발현 벡터는 원하는 DNA 서열로 형질전환된 세포를 검출할 수 있도록 선택표지인자(예, 테트라시클린이나 네오마이신)을 포함한다(참고, US 특허 제 4,304,362호).

이 콜리는 특히 본 발명의 DNA 서열을 클로닝하는데 특히 유용한 원핵숙주 중 하나이다. 기타 사용하기 적당한 미생물 숙주로는 바실러스 서브틸리스 같은 바실러스, 살모넬라, 세라티아 같은 장내 박테리아과, 및 여러가지 슈도모나스 종을 포함한다.

이러한 원핵 숙주에 있어서, 숙주세포와 화합성이 있는 형질 발현 조절서열(예, 복제오리진(origin))을 포함하는 형질발현 벡터를 작제할 수 있다. 추가로 수많은 공지된 프로모터의 임의의 수가 제공될수 있으며, 그예로는 락토즈 프로모터 시스템, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 베타-락타마제 프로모터 시스템 또는 파지 람다의 프로모터 시스템이 있다. 상기 프로모터는 임의로 오퍼레이터 서열과 함께 형질발현을 조절하며 전사 및 해독의 개시 및 완료를 위한 리보좀 결합부위서열 등을 포함한다.

효모와 같은 기타 미생물이 형질발현에 사용되기도 한다. 사카로마이세스는 적당한 벡터를 갖는 바람직한 숙주로서, 상기 벡터는 3-포스포글리세레이트 키나제나 기타 해당작용 효소를 비롯한 프로모터와 같은 형질발현 조절서열, 및 바람직하다면, 복제오리진, 종지 서열 등을 포함한다.

미생물이외에, 포유류 조직세포 배양물을 사용하여 본 발명이 폴리펩티드를 형질발현하여 산출할 수 있다(참고.위네커,"From Geneto Clones",VCH Publishers,뉴욕주,뉴욕시 소재(1987)). 진핵세포는 실제로 더욱 바람직한데, 그 이유는 본래의 면역글로불린을 분비할 수 있는 다수의 적당한 숙주 세포주가 당분야에서 개발되어 왔기 때문이며, 그 예로는 CHO 세포주, 각종 COS 세포 주, HeLa 세포주, 바람직하게는 골수종 세포주 등과 형질전환된 B-세포 또는 하이브리도마를 포함한다. 이러한 세포들의 형질발현 벡터는 복제오리진, 프로모터, 인헨서 등과 같은 형질발현 조절 서열(퀸외,Immunol.Rev,89,49-68(1986)) 및 리보좀 결합 부위 RNA 접목 부위, 폴리아데닐화 부위와 같은 필요한 프로세싱 정보부위, 및 전사 종지 서열을 포함한다. 바람직한 형질발현 조절 서열은 면역글로불린 유전자, SV40, 아데노비루스, 시토메가로비루스, 소유두종 비루스 등으로부터 유도된 프로모터이다.

주요 DNA 분절(예,중쇄 및 경쇄 암호 서열 및 형질발현 조절서열)을 포함하는 벡터는 공지된 방법에 의해 숙주 세포로 전이되며, 상기 사용되는 전이 방법은 세포 숙주의 종류에 따라 결정된다. 예를 들어 염화칼슘 형질 감염법은 일반적으로 원핵세포에 사용되는 반면, 인산칼슘 처리 나 일렉트로포레이션은 다른 세포 숙주에 사용될 수 있다(참고,Maniatis 등 Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,(1982)).

형질발현 된 후, 본 발명의 전체적인 항체, 그것의 이량체, 각각의 경쇄 및 중쇄 또는 기타 면역글로불린 형태는 황산 암모늄 침전법, 친화성컬럼, 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동법 등을 비롯하여 당분야의 표준방법에 따로 정제할 수 있다(참고,R.스코프스,"Protein Purification",Spninger-Verlag,뉴욕(1982)).

거의 정제된 면역글로불린을 약학적 용도로 사용하기 위해서는 약 90내지 95% 이상의 동질성을 갖는 것이 바람직하고, 98 내지 99% 또는 그이상의 동질성을 갖는 것이 바람직하다. 부분적으로 정제되거나 원하는 동질성을 지니는 경우, 상기 폴리펩티드는 치료용으로 사용되거나(체외적으로) 또는 분석방법을 개발하고 실시 하는데, 면역형광성 염색등에 사용될 수 있다(참고,Immunological Methods Vol.I 및 II,레프코비츠 및 퍼니스 편집,Academic Press,뉴욕시,뉴욕주 소재(1979,1981).

본 발명의 바람직한 약학적 조성물은 면역독소에 하나이상의 본 발명 항체를 사용하는 것을 포함한다. 면역독소는 두개 성분으로 특징지워지며, 특히 생체네에서 또는 시험관내에서 세포를 선택적으로 치사시키는데 특히 유용하다. 한 성분은 세포 독소제로서 일반적으로 세포에 부착되거나 흡수되었을 때 치명적이다. 두번째 성분은, "전달 담체"로 공지된 것으로서, 특정한 세포 종류, 예를 들어 종양 세포등에 상기

독소제를 운반하는 수단으로 제공된다. 이들 두 성분은 공통적으로 공지된 여러가지 화학적 방법에 의해 함께 화학적으로 결합된다. 예를 들어, 세포 독소제가 단백질인 경우, 두번째 성분은 본래의 면역 글로불린으로서, 헤테로이작용성가교제, 예를 들어 SPDP, 카르보디이미드, 글루타르알데히드 등에 의해 결합된다.

각종의 면역독소의 제조방법은 당분야에 공지되어 있다(예,"Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates:Aiming the Magic Bullet" 토르페 등,Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine.Academic Press,pp.168-190(1982)). 또한 상기 성분은 유전자적으로 결합되기도 한다(참고, 챠우헤리 등, Nature 339, 394 (1989)).

각종의 세포독성 제가 면역독소에 사용하기에 적당하다. 세포독성제는 요오드-131 또는 요오드의 기타 동위원소, 이트륨-90, 레늄-188 및 비스뮤드-212와 같은 방사성 핵종이나 기타 알파선 방출제; 다수의 화학치료 약물(예,빈데신,메토트렉세이트,아드리아마이신 및 시스플라티늄); 및 세포 독소 단백질(예,포크위드 항비루스 단백질과 같은 비로좀 억제 단백질,슈도모나스 외독소 A,라이신,디프테리아 독소,라이신 A 쇄등), 또는 포스포리파제 효소(예,포스포리파제 C)와 같은 세포 표면에 작용하는 제제를 포함한다(참고,WO90/07861,1990.7.26 공개;"키메라 독소",올슨 및 필,Pharmac.Ther.,25,355-381(1982);및 "암진단 및 치료용 모노클로날 항체" 발드윈 및 바이어, p 159-179, 224-266, Academic Press(1985)).

면역독소의 전달성분은 본 발명의 인체화된 면역 글로불린을 포함할 것이다. 본래의 면역글로불린이나 그것의 결합 단편(예,Fa6)를 사용하는 것이 바람직하다. 일반적으로, 면역독소내의 항체는 사람 IgM 또는 IgG 아이소타입이며, 그러나 기타 포유류의 불변부도 원하는 바대로 사용될 수 있다.

인체화된 항체 및 그것의 약학적 조성물은 특히 비경구투여(즉, 피하, 근육내 또는 정맥내로)에 유용하다. 비경구 투여용 조성물은 일반적으로 허용가능한 담체, 바람직하게는 수용성 담체중에 용해된 면역글로불린 용액이나 그것의 칵꼬리를 포함할 것이다. 각종의 수용성 담체가 사용될 수 있는데, 그예로는 물, 완충수, 0.4% 생리식염수, 0.3% 글리신 등이 있다. 상기 용액은 멸균된 것으로서 일반적으로 미립자 물질이 없다. 상기 조성물은 통상의 공지된 멸균방법에 의해 멸균될수 있다. 상기 조성물은 pH 조절 및 완충제, 독성조절제 등과 같은 적합한 생리적 조건에 필요한 약학적 허용성 보조물질을 포함할 수 있으며, 그예로는 초산나트륨, 염화나트륨, 염화칼슘, 염화칼륨, 젖산나트륨, 사람 알부민 등을 포함할 수 있다.

상기 제제중의 항체 농도는 다양하며, 즉 약 0.5 중량% 이상, 일반적으로 약 1중량% 이상 내지 약 15 또는 20중량% 정도로서, 선택된 투여 방식에 따라 용량, 점도등을 일차적으로 기준하여 선택한다.

따라서, 대표적인 주사용 약학적 조성물은 1ml 멸균 완충수와 1-10mg의 면역글로불린을 포함할 수 있다. 대표적인 정맥내 주입용 조성물은 250ml의 멸균링게르 용액과 150mg 항체를 포함할 수 있다. 비경구적 투여용 조성물을 제조하는 실질적인 방법은 공지되어 있거나 당분야의 전문가들에게 주지된 사실이며, 문헌에 상세히 기재되어 있다(Remington's Pharmaceutial Science,15 판,Mack Publishing Company,이스톤,펜실베이니아(1980);본원에서 참고인용함).

본 발명의 항체들은 냉동 또는 동결건조에 의해 보관되었다가 사용전에 적합한 담체중에서 재구성될 수 있다. 이 기술은 통상의 면역글로불린에 효과적인 것으로 밝혀졌으며, 당해 기술분야에 공지된 동결건조 및 재구성 기술을 사용할 수 있다. 동결건조 및 재구성이 다야한 정도로 항체 활성의 소실을 야기시킬 수 있으며(예,통상의 면역글로불린에서,IgM 항체는 IgG 항체보다 활성의 소실이 더 큰 경향이 있다), 사용수준이 보충에 의해 조정될 수 있다는 사실은 당업자라면 쉽게 이해할 것이다.

본 발명의 인체화된 항체들 또는 그것의 칵꼬리를 함유하는 조성물은 예방 및/또는 치료를 목적으로 투여할 수 있다. 치료 용도의 경우, 조성물은 질환 및 그 합병증을 치유하거나 적어도 부분 억제하기에 충분한 양으로 환자에게 투여한다. 이를 달성하는데 적절한 양은 "치료적 유효 용량"으로 정의된다. 이러한 용도에 효과적인 양은 감염의 심각도 및 환자 자신의 면역계의 전반적인 상태에 따라 좌우되며, 일반적으로 투여용량당 약 1 내지 약 200mg의 항체 범위로, 더욱 보편적으로는 5 내지 25mg의 용량이 사용된다. 본 발명의 물질은 일반적으로 심각한 질환 상태 즉, 치명적인 또는 잠재적으로 치명적인 상황에 사용될 수 있음을 명심해야 한다. 이러한 경우, 외부 물질을 최소한도로 하고 본 발명의 인체화된 면역글로불린에 의해 수행되는 "이종 물질"거부의 가능성을 저하시키려는 의도에서, 처치의가 이들 항체를 상당정도 과량으로 투여하는 것은 가능하며 바람직한 것으로 여겨질 수도 있다.

예방 용도의 경우, 본 발명의 면역글로불린 또는 그것의 칵꼬리를 함유하는 조성물은 내성을 높이기 위해 사전에 질환을 앓은 적이 없는 환자에게 투여한다. 이때의 양은 "예방적 유효 용량"으로 정의된다. 이러한 용도에 있어, 정확한 양은 또한 환자의 건강 상태 및 전반적인 면역 수준에 따라 좌우되지만 일반적으로 투여 용량당 0.1 내지 25mg의 범위이다.

조성물의 1회 또는 수회 투여는 처치의에 의해 선택되는 용량 수준과 형태로 수행될 수 있다. 어떠한 경우에서도, 약제는 환자를 효과적으로 치료하기에 충분한 양의 본 발명의 항체를 제공해야 한다.

진단용의 경우, 항체는 표지 또는 비표지될 수 있다. 비표지된 항체는 사람 면역글로불린 불변부에 특이적인 항체와 같이 인체화된 항체와 반응성인 다른 표지된 항체(제2항체)와 함께 사용할 수 있다. 대안 방법으로, 항체를 직접 표지할 수 도 있다. 광범위하게 다양한 표지, 예컨대 방사성뉴클리드(radionuclides), 플루오르(fluors), 효소, 효소 기질, 효소 보조인자, 효소 억제인자, 리간드(특히 합텐)등을 사용할 수 있다. 수많은 종류의 면역검정법이 이용가능하며 당업자에게 잘 알려져 있다.

다음의 예는 제한 의도가 아니라 설명을 위해 제공된 것이다.

5가지의 특이적인 인체화된 항체의 생성에 대해 후술된다. 항체는 각각 헤르페스 단순 비루스의 gB 및 gD 당단백질에 결합하는 Fd79 및 Fd138-80(Metcalf et al.,Intervirology 29,39 (1988)), CD33 항원에 결합하는 M195(Tanimoto et al.,Leukemia 3.339 (1989)), IL-2 수용체의 p75연쇄에 결합하는 mik-β1(Tusdo et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,1982,(1989)) 및 사이토메갈로비루스의 gH 당단백질에 결합하는 CMV5

이다.

기본적으로, 각 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 유전자에 대한 cDNA는 HindIII 부위를 포함하고 불변부에 하이브리드화되는 3' 프라이머 및 EcoRI 부위를 포함하고 dG 꼬리에 하이브리드화되는 5' 프라이머를 사용하여 고착된 폴리머라제 연쇄 반응(Loh et al.,Science 243,219(1989))을 이용함으로써 클로닝되었다(제6도에 제시된 도식). PCR 증폭된 단편을 서열결정을 위해 EcoRI과 HindIII로 분해하고 pUC18 벡터내로 클로닝하였다. 각 항체당 적어도 2개의 중쇄 및 2개의 카파 클론을 서열결정한 결과, 동일한 서열인 것으로 밝혀졌다. 성숙된 경쇄 및 중쇄 가변부의 추정 아미노산 서열은 제1-5도의 상단에 제시되어 있다.

인체화된 항체의 결합 친화력을 높은 수준으로 유지하기 위해서는, 항체 제작시에 전술한 원칙과 카테고리를 이용하였다. 높은 서열 상동성에 의거하여, 사람항체는 마우스 항체에 대한 수용자 경쇄 및 중쇄 사람 프레임워크를 제공하도록 다음과 같이 선택되었다 : Fd79의 경우 사람 Pom, Fd138-80의 경우 사람 Eu, M195의 경우 사람 Eu, mik-β1의 경우 사람 Lay 및 CMV5의 경우 사람 Wol.

컴퓨터 프로그램 ABMOD 및 ENCAD (Levitt,J.Mol.Biol.,168,595 (1983) 및 Zilber et al.,Biochemistry 29,10032(1990))를 사용하여 각 마우스 항체의 가변부 모델을 구성하였다. 이 모델을 사용하여, 잠재적으로 CDR과 상호작용할 수 있도록 CDR에 충분히 인접해 있는 각 프레임워크내의 아미노산을 결정하였다(상기 카테고리 4). 각 항체의 경우, 전술한 카테고리 (1)-(5)내에 속하는 것으로 밝혀진 위치는 표 1에 제시되어 있으며 제1-5도에서와 같이 번호 매겨진다.

[표 1]

카테고리	경쇄	중쇄
1	24-38, 54-50, 93-100	31-35, 50-66, 99-111
2	9, 45, 46, 83	82, 112
3	53	112
4	53	97
5	81	

Fd138-80 항체

카테고리	경쇄	중쇄
1	24-34, 50-56, 89-97	31-35, 50-66, 99-110
2	48, 63	93, 98, 111, 112, 113, 115
3	--	30, 67, 98, 111
4	36, 48, 87	27, 30, 37, 48, 67, 68, 98

M195 항체

카테고리	경쇄	중쇄
1	24-38, 54-60, 93-101	31-35, 50-66, 95-105
2	10, 52, 67, 110	93, 95, 98, 106, 107, 108, 110
3	--	30, 67, 98, 106
4	40, 52, 74	27, 30, 48, 68, 98

mik-β1 항체

카테고리	경쇄	중쇄
1	24-33, 49-55, 88-96	31-35, 50-65, 98-108
2	13	84, 89, 90
3	--	30, 49
4	70	29, 30, 72, 73
5	41	1

CMV5 항체

카테고리	경쇄	중쇄
1	24-34, 50-56, 89-97	31-35, 50-66, 99-108
2	--	69, 80
3	49	30
4	49	24, 27, 28, 30, 97
5	--	5

각 인체화된 항체를 제작하는데 있어, 각 위치에서의 아미노산은 인체 수용자 서열에서와 동일하도록 선택되었는데, 이때 그 위치는 마우스 공급자 서열로부터의 아미노산이 사용된 경우인 카테고리 (1)-(4) 또는 상기 위치에서 사람 서열에 전형적인 아미노산이 사용된 경우인 카테고리 (5)에 속하지 않을 때에 한한다.

인체화된 항체에 대한 유전자를 구성하는데 있어, 일반적으로 마우스 서열에서 발견된 코돈을 이용하여 통상 마우스 항체 연쇄로부터 유래된 신호 펩티드를 비롯한 인체화된 중쇄 및 경쇄의 단백질 서열을 암호하는 뉴클레오티드 서열이 선택되었다. 몇몇 축퇴성 코돈이 제한 부위의 산출 또는 원치 않는 제한 부위의 제거를 위해 변경되었다. 뉴클레오티드 서열은 또한 면역글로불린 유전자에 전형적인 접속(splice) 공급자 신호 서열과 각 말단부에 Xbal 부위를 포함하였다. 각 유전자는 4개의 중첩하는 합성 올리고뉴클레오티드로부터 구성되었다. 각 가변 도메인 유전자에 있어, 교번(alternating) 가닥상의 신호 펩티드와 접속 공급자 신호 서열뿐 아니라 전체 암호 서열을 포함하는 두 쌍의 중첩 올리고뉴클레오티드를 합성하였다. 올리고뉴클레오티드는 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 380B DNA 합성장치로 합성하였다. 각 올리고는 15-20 염기 중첩부를 가진 길이 약 110-140의 염기였다. 이중 가닥의 DNA 단편은 클레노우(Klenow) 또는 Taq 폴리머라제 또는 시쿼나제(sequenase)를 이용하여 각 쌍의 올리고뉴클레오티드로부터 합성하고 제한 효소로 분해한 후, pUC18 벡터로 결찰하여 서열결정하였다. 그후, 각각 정확한 절반-서열을 가진 두개의 단편을 pVgl(Fd79 및 Fd138-80의 중쇄) 또는 pVgl-dhfr(M195, mik-β1, CMV5의 중쇄) 또는 pVk(모든 경쇄)발현 벡터의 Xbal 부위내에 적절한 방향으로 결찰시켜 완전한 중쇄 및 경쇄 유전자를 생성하였다. 반응은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 조건하에서 수행하였다(Maniatis et al.,op.cit.).

중쇄 및 경쇄 플라스미드를 전기침투(electroporation)에 의해 Sp2/0 마우스 골수종 세포내로 형질감염시키고, gpt 형질발현에 대해 세포를 선별하였다. ELISA에 의해 배양 상층액내 인체 항체 생성에 대하여 분석함으로써 클론을 스크리닝하고 최다-생산 클론으로부터 항체를 정제하였다. 포도상구균의 단백질 A-세파로스 CL-4B (Pharmacia)의 컬럼에 조직 배양액을 통과시켜 항체를 정제하였다. 결합된 항체는 0.2M 글리신-HCl(pH 3.0)으로 용출시키고 1M 트리스(pH 8.0)으로 중화시켰다. PD10 컬럼 (Pharmacia)에 PBS를 통과시켜 완충액을 PBS로 교체하였다.

다음의 대응 항온을 형질발현하는 세포형에 대한 인체화된 항체의 결합을 시험하였다: Fd79 및 Fd138-80의 경우 HSV-감염 세포, M195의 경우 U937 세포, mik-β1의 경우 YTJB 세포 및 CMV5의 경우 CMV-감염 세포. 형광세포계산 결과, 원래의 마우스 항체 및 대응하는 키메라 항체뿐 아니라 인체화된 항체도 비슷하게 결합한다. 또한, 인체화된 항체는 대응하는 마우스 항체와 마찬가지로, 세포에 대한 결합에 있어서 방사능표지된 마우스 항체와 비슷하게 경쟁하므로, 인체화된 항체는 마우스 항체와 거의 동등한 통상 약 2-배이내 또는 그 이상의 결합 친화력을 가진다 (참조예, 표 2)

[표 2]

쥐 항체 및 인체화된 항체의 결합 친화력

	마우스 항체	인체화된 항체
	Ka (M^{-1})	Ka (M^{-1})
Fd79 (항-gB)	1.1×10^{8}	5.3×10^{7}
Fd138-80 (항-gD)	5.2×10^{7}	4.8×10^{7}

상기한 바를 통해, 본 발명의 인체화된 면역글로불린이 다른 항체를 능가하는 다수의 잇점을 제공한다는 것을 알 수 있다. 다른 모노클로날 항체에 비해, 본 발명의 인체화된 면역글로불린은 더욱 경제적으로 생산할 수 있으며 상당히 적은 이종의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 사람 환자에 주사후, 이러한 항원성의 감소 가능성은 상당한 치료효과의 개선을 나타낸다.

이후, 각각의 인체화된 면역글로불린에 대해 상세히 기술된다.

[실시예 I]

[P75에 대한 인체화된 면역글로불린]

포유동물에 있어, 면역 반응은 이물 즉, 항원과 특이적으로 상호작용하는 두종류의 세포에 의해 중개된다. 이들 세포형의 하나인, B-세포는 항체 생성에 역할을 담당하고 있다. 두번째 세포 부류인 T-세포는 T-세포를 비롯하여 기타 다양한 조혈 세포 및 B-세포 둘다의 생체내 작용을 조절하는 다양한 세포성 서브셋트(subset)를 포함한다 (참조,일반적으로 Paul,W.E.,ed.,Fundamental Immunology,2nd ed.,Raven Press,New York (1989)). T-세포가 이러한 조절을 수행하는 방법중 하나는 처음에 T-세포 성장 인자로 지칭되었고 인터류킨-2 (IL-2)로 공지된 림포킨의 생성을 통한 것이다. IL-2의 주된 작용은 T-세포의 자극 및 유지인 것으로 나타났다. 또한, 일부 면역학자는 IL-2가 전체 면역 반응의 중심일 가능성이 있는 것으로 생각한다(참조,Farrar,J.,et al.,Immunol.Rev.63,129-166(1982)).

생물학적 효과를 나타내기 위해서, IL-2는 특이적 고-친화성 막 수용체와 상호작용한다(Greene,W.,et al.,Progress in Hematology XIV,E.Brown,Ed.,Grune 및 Statton,New Yo가(1986),at pgs,283 ff 및 Waldmann,Ann.Rev.Biochem.58. 875(1989)). 인체 IL-2 수용체는 Tac 펩티드 또는 α 연쇄로 공지된 하나의 연쇄의 크기가 약 55kD인 복합 다중연쇄 당단백질이다(참조,Leonard,W.,et al.,J.Biol. Chem.260,1872(1985)). 두번째 연쇄는 p75 또는 β 연쇄로 공지되어 있다 (Tsudo et al.,Proc.Nat.Acad.Sci.USA.83.9694(1986) 및 Sharon et al.,Science 234, 859(1986)). p55 또는 Tac 연쇄 및 p75 연쇄는 각각 독립적으로 IL-2와 낮은 친화력 또는 중간 친화력으로 결합하며, 반면에 두 연쇄의 IL-2 수용체 복합체는 높은 친화력으로 IL-2와 결합한다. 인체 IL-2 수용체의 p75 연쇄는 종종 본명세서에서 간략히 p75 단백질로 지칭된다.

특이적 반응성인 모노클로날 항체의 개발로 인하여 사람 IL-2 수용체의 구조 및 작용에 대해 많은 부분이 설명되었다. 특히, 항-Tac으로 공지된 하나의 마우스 모노클로날 항체(Uchiyama,et al.,J.Immunol.126,1393(1981))를 사용하여, IL-2 수용체가 T-세포, 또한 단핵구-대식세포 계통의 세포, 간의 쿱퍼(Kupffer)세포, 외피의 랑게르한스 세포 및 물론 활성화된 T-세포상에서 감지될 수 있다는 것이 입증되었다. 휴지의 T-세포, B-세포 또는 순환하는 대식세포가 통상 IL-2 수용체를 발현하지 않는다는 것은 중요한 사실이다. (Herrmann,et al.,J.Exp.Med.162,1111(1985)). 다른 항체, Mik-β1은 p75 연쇄에 결합한다(Tsudo et al.,Proc.Natl.Acad. Sci.USA 86.1982(1989)).

항-Tac 모노클로날 항체는 또한 IL-2 상호작용을 필요로 하는 임파구의 작용을 설명하는데 사용되었으며, 이것은 세포 배양액내 세포독성 및 억제인자 T 임파구의 생성을 비롯한 다양한 T-세포 작용을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또한 항-Tac 및 기타 항체의 연구에 의거하면, 각종 질환은 T-세포, 특히 성체 T-세포 백혈병에 의한 부적절한 IL-2 형질발현과 관련이 있다.

더욱 최근에는, IL-2 수용체가 T-세포 매개의 질환에 접근하는 신규의 치료 방법에 있어 이상적인 대상임이 밝혀졌다. 항-Tac 모노클로날 항체 또는 mik-β1과 같은 IL-2 수용체 특이적 항체를 단독으로 또는 면역접합체(예컨대 리신 A,동위원소등과 함께)로서 사용하여 IL-2 수용체를 가진 세포를 효과적으로 제거할 수 있다는 사실이 제시되었다. 이러한 제제는 이론적으로는 예를 들면 IL-2 수용체-형질발현 백혈병 세포, 질환상태에 있는 특정 B-세포 또는 활성화된 T-세포를 제거하고 필요시 정상적인 T-세포 면역 반응을 개시하는 능력을 가지도록 성숙된 정상 T-세포와 그 전구체를 유지시킬 수 있다. 일반적으로 대부분의 다른 T-세포 특이적 제제는 거의 모든 말초 T-세포를 파괴할 수 있어, 제제의 치료 효능을 제한한다. IL-2 수용체에 특이적인 적절한 모노클로날 항체를 사용함으로써 자가면역질환, 기관 이식 및 활성화된 T-세포에 의한 원치않는 반응에 있어 치료면에서의 유용성을 가질 수 있다. 실제로, 예를 들어 항-Tac 항체를 이용한 임상적 시도가 시작되었다 (Kirkman et al.,Transplant.Proc.21,1766(1989) 및 Waldmann et al.,Blood 72.1805(1988)).

불행하게도, 항-Tac, mik-β1 및 기타 비-사람 모노클로날 항체를 사용하는데에는 특히 후술된 바와 같이 반복 치료 요법시 몇몇 단점이 있다. 마우스 모노클로날 항체는 예컨대 일반적으로 사람 보체를 잘 고정시키지 못하며 사람에게 사용시 다른 중요한 면역글로불린의 작용 특성이 부족하다. 항-Tac, mik-β1 및 기타 비-인체 모노클로날 항체는 사람 환자에 주사시 면역원이 되는 상당한 범위의 아미노산 서열을 포함한다는 것이 더욱 중요하다.

본 발명에 따라, 사람 IL-2 수용체의 p75 연쇄와 특이적으로 반응하는 인체-유사형 면역글로불린이 제공된다. 결합 친화력이 적어도 10^{7} 내지 10^{-8} M^{-1} 및 바람직하게는 10^{9} M^{-1} 내지 10^{10} M^{-1} 또는 더욱 강력한 것인 이들 면역글로불린은 예컨대 사람 IL-2 수용체에 대한 IL-2의 결합을 차단할 수 있다. 인체-유사형 면역글로불린은 인체-유사형 프레임워크를 가지며, p75 단백질상의 에피토프와 특이적으로 반응하는 면역글로불린, 통상 마우스 면역글로불린으로부터의 상보성 결정부(CDR)를 가질 수 있다. 경제적으로 대량 생산될 수 있는 본 발명의 면역글로불린은 예컨대 다양한 기술로 환자의 T-세포 매개의 질환을 치료하는 용도가 밝혀졌다.

한 양태에 있어, 본 발명은 mik-β1 모노클로날 항체와 같이 사람 IL-2 수용체상의 목적하는 에피토프에 결합할 수 있는 면역글로불린으로부터의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR을 암호하는 재조합 DNA 분절에 관한 것이다. 이들 영역을 암호하는 DNA 분절은 통상 적합한 인체-유사형 프레임워크 영역을 암호하는 DNA 분절에 연결된다. 형질발현시에 mik-β1 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하는 폴리펩티드 연쇄를 암호하는 DNA 서열의 예는 제7도에 제시되어 있다. 코돈 축퇴성 및 중요하지 않은 아미노산 치환에 의해, 상세히 전술한 바와 같이 이들 서열대신에 다른 DNA 서열들로 쉽게 치환할 수 있다.

항체는 통상 T-세포 매개의 질환 상태를 치료하는 용도가 개별적으로 발견될 것이다. 일반적으로, 질환과 관련되어 있는 세포가 IL-2 수용체를 가지고 있는 것으로 확인된 경우, 사람 IL-2 수용체에 대한 IL-2의 결합을 차단할 수 있는 인체-유사형 항체가 적합하다(참조,"Treating Human Malignancies and Disorder"라는 표제의 U.S.S.N.085,707). 예를 들어, 치료에 적합한 통상의 질환 상태는 심장, 폐, 신장, 간 등과 같은 기관 이식을 수행한 환자의 이식편대숙주 질환 및 이식 거부를 포함한다. 기타 질환으로는 자가면역 질환, 예컨대 타입 I 당뇨병, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 국소적 홍반성 루푸스 및 중력성 근실조증이 포함된다.

본 발명의 인체-유사형 항체는 또한 다른 항체, 특히 질환에 대한 원인 세포상의 다른 마커와 반응하는 사람 모노클로날 항체와 함께 사용할 수도 있다. 예를 들어, 적합한 T-세포 마커로는 제1차 국제 백혈구 분화에 관한 워크샵에서 소위 "분화군"으로 명칭된 그룹에 속하는 것들을 들 수 있다 (Leukocyte Typing.Bernard,et al.,Eds.,Springer-Verlag,N.Y.(1984)). 바람직한 용도는 p55에 결합하는 인체-유사형 항체 및 IL-2 수용체의 p75에 결합하는 인체-유사형 항체 즉, 인체화된 항-Tac와 인체화된 mik-β1를 병용하여 환자를 치료하는 것이다.

본 발명의 인체-유사형 항체에서 광범위하게 다양한 생체외 유용성을 더욱 발견할 수 있다. 예로서, T-세포 분류, 특이적 IL-2 수용체 보유 세포 또는 수용체의 단편 분리, 백신 제조등에 상기 항체들을 이용할 수 있다.

[실험]

[중쇄 및 경쇄 cDNA의 클로닝]

불변부에 하이브리드화하고 HindIII 부위를 포함하는 3' 프라이머와 dG 꼬리에 하이브리드화하고 EcoRI 부위를 포함하는 5' 프라이머를 사용하여 고착된 폴리머라제 연쇄 반응(E.Y.Loh et al.,Science 243,217(1989)을 이용함으로써 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 유전자에 대한 cDNA를 클로닝하였다 (제6도에 제시된 도식). 서열결정을 위해 PCR 증폭된 단편을 EcoRI과 HindIII로 분해하고 pUC19 벡터내로 클로닝하였다. mik-β1의 경우, 두개의 감마-2a 특이적 클론 및 두개의 카파 특이적 클론에 대한 서열을 결정하였다. 두개의 감마-2a 클론과 두개의 카파 클론의 서열은 각각 동일하다. cDNA 가변 도메인 서열이 추정 아미노산 서열이 제7도에 제시되어 있다.

[카메라 항체의 구성 및 형질발현]

키메라 항체 유전자의 구성과 형질발현을 위해 두개의 플라스미드 벡터를 제조하였다. 플라스미드 pVgl-dhfr (제8A도)은 선별을 위해 사람 사이토메갈로비루스 IE1 프로모터 및 증진인자 (M. Boshart et al.,Cell 41,521(1985)), 선행 인트론의 일부를 포함하는 사람 게놈의 Cγ1 분절 및 디히드로폴레이트 환원효소 (dhfr) 유전자(Simonsen et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80,2495(1983))를 포함한다. 플라스미드 pVk (제8B도)는 pVgl-dhfr과 유사하지만 사람 게놈의 Cκ분절과 gpt 유전자를 포함한다. 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 cDNA로부터 mik-β1 중쇄 및 경쇄 가변부의 유도체를 제조하였다. 5'프라이머는 ATG 코돈에서 시작하는 V 영역에 하이브리드화하고 XbaI 부위를 포함하며, 3' 프라이머는 J 영역의 최종 15 뉴클레오티드에 하이브리드화하고 접속 공급자 신호 서열 및 XbaI 부위를 포함한다(참조,C.Queen et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029(1989)). 변형시킨 V 영역을 CMV 프라이머와 불변부의 인트론 일부 사이의 각 플라스미드 벡터의 XbaI 부위내로 클로닝하였다.

키메라 항체의 형질발현을 위해, 전기침투에 의해 Sp2/0 마우스 임파종 세포내로 중쇄 및 카파 연쇄 플라스미드를 형질감염시키고 gpt 형질발현에 대해 세포를 선별하였다. 최대량의 완전 항체를 분비하는 클론을 ELISA에 의해 검출하였다. 정제된 키메라 mik-β1 항체는 유동 세포계산법에 의해 p75 항원을 형질발현 하는 YTJB 세포에 결합하는 것으로 나타났다(제9도).

[인체화된 항체의 컴퓨터 모델링]

인체화된 항체에 있어 높은 결합 친화력을 위해, 퀸 등의 일반적인 절차를 후속 수행하였다(C.Queen et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86.10029(1989)). 사람 항체는 원래의 쥐 항체와 더욱 상동적이며, 쥐의 CDR을 사람 프레임워크와 결합시키면 CDR내에 뒤틀림을 유발시켜 친화력 감소가 더욱 적을 것같다. 동일한 사람 항체로부터의 정상적인 중쇄 및 경쇄는 프레임워크 서열 제공에 의해 두개의 연쇄 조립시 부적합성의 가능성이 저하되도록 선택된다. 서열 데아타 베이스(마이크로제니 (MicrorGenie) 서열 분석 소프트웨어 (Beckman)으로 시험)에 의거하여, mik-β1의 인체화를 위한 프레임워크 서열을 제공하도록 항체 Lay를 선택하였다.

컴퓨터 프로그램 ENCAD (M.Levitt,J.Mol.Biol.168,595 (1983))를 사용하여 mik-β1 가변부의 모델을 구성하였다. 이 모델을 사용하여 CDR과 잠재적으로 상호작용하기에 CDR과 충분히 인접한 mik-β1 프레임워크

내의 아미노산을 결정하였다(이하 카테고리 4). 인체화된 경쇄 및 중쇄 mik-β1 가변부를 제작하기 위해, 각 위치의 아미노산을 Lay 항체에서와 동일하도록 선택하였는데, 이때 그 위치는 다음 5종의 카테고리를 하나이상의 카테고리에 속하지 않는다 :

(1) 위치는 CDR내에 속함.

(2) Lay 아미노산은 그 위치에서 사람 항체에 대해 색다르며, 반면 mik-β1 아미노산은 그 위치에서 사람 항체에 대해 전형적임.

(3) 위치는 CDR에 직접 인접함.

(4) 전술된 모델은 아미노산이 항원 결합 부위 (CDR)에 물리적으로 인접해 있을 수도 있음을 제시함.

이들 카테고리에서 위치선정을 위해, (마우스) mik-β1 항체로부터의 아미노산을 사용하였다. 다음의 경우 그 위치는 5번째 카테고리에 속한다.

(5) Lay 아미노산은 그 위치에서 사람 항체에 대해 매우 색다르며, mik-β1 아미노산은 상이하지만 또한 색다름. 따라서 그 위치에서 사람 항체에 대해 전형적인 아미노산이 사용될 수 있다. 각 카테고리의 아미노산은 표 3에 제시되어 있다. 몇몇 아미노산은 1종 이상의 카테고리에 속할 수도 있다. 인체화된 mik-β1 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 최종적인 서열은 Lay 서열과 비교하여 제10도에 제시되어 있다.

[표 3]

카테고리	경쇄	중쇄
1	24-33, 49-55, 88-96	31-35, 50-65, 98-108
2	13	84, 89, 90
3		30, 49
4	70	29, 30, 72, 73
5	41	1

인체화된 항체에 대한 유전자를 구성하기 위해, 일반적으로 마우스 서열에서 밝혀진 코돈을 이용하여 마우스 mik-β1 연쇄에서와 동일한 신호 펩티드를 비롯한 인체화된 중쇄 및 경쇄의 단백질 서열을 암호하는 뉴클레오티드 서열이 선택되었다(제7도). 수개의 축퇴성 코돈을 변화시켜 제한 부위를 산출하거나 원치않는 것을 제거하였다. 뉴클레오티드 서열은 또한 키메라 유전자에서 사용된 동일한 접속 공급자 신호 서열과 각 말단부에 Xbal 부위를 포함한다. 각 서열은 4개의 중첩하는 합성 올리고뉴클레오티드로부터 구성하였다. 각 가변 도메인 유전자에 있어, 교번가닥상의 신호 펩티드와 접속 공급자 신호 서열뿐 아니라 전체 암호 서열을 포함하는 두쌍의 중첩하는 올리고뉴클레오티드를 합성하였다(제11도). 올리고뉴클레오티드를 어플라이드 바이오시스템즈 380B DNA 합성장치로 합성하였다. 각 올리고는 약 20개의 염기가 중첩된 약 110-140 염기 길이이다. 이중 가닥의 DNA 단편들을 세쿼나제를 이용하여 각 쌍의 올리고뉴클레오티드로부터 합성하고 제한 효소로 분해하며 p블루스크립트 II KS (+) (스트라타유전자) 벡터에 결찰하고 서열 결정하였다. 그후, 각각의 정확한 절반-서열과 함께 두개의 단편들을 pVgl-dhfr 또는 pVk 형질발현 벡터의 Xbal 부위내로 결찰시켰다. 생체외 돌연변이유발을 이용하여 뉴클레오티드 CT를 AG로 교차함으로써 원래 올리고뉴클레오티드 wps54에 의해 암호된 Ala 아미노산을 인체화된 중쇄의 위치 1의 Glu(E)로 변화시켰다(제10b도). 반응을 당해 기술분야에 잘 알려진 조건하에서 수행하였다(Maniatis et al.,op.cit.). 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 전기침투에 의해 Sp2/0 마우스 골수종 세포내로 형질감염시키고 gpt 형질발현에 대해 세포를 선별하였다. ELISA에 의해 배양상층액내 사람 항체 생성을 분석하여 클론을 스크리닝하고 최다-생성 클론으로부터 항체를 정제했다. 포도상구균의 단백질 A-세파로스 CL-4B (Pharmacia)의 컬럼에 조직 배양 상층액을 통과시킴으로써 항체를 정제하였다.결합된 항체를 0.2M 글리신-HCl(pH 3.0)으로 용출시키고 1M 트리스 (pH 8.0)으로 중화시켰다.

PBS를 PD10 컬럼(Pharmacia)에 통과시킴으로써 완충액을 PBS로 교체하였다.

[인체화된 항체의 특성]

쥐의 항체 및 키메라 항체와 비교하여 인체화된 mik-β1 항체의 특성을 규명하였다. 인체화된 항체는 형광세포계산 분석시 높은 수준으로 p75 연쇄를 형질 발현하는 YTJB 세포에 키메라 항체와 유사한 방식으로 결합하는데 (제9도), 이는 인체화된 항체가 동일한 p75 단백질을 인식함을 나타낸다.

인체화된 항체의 친화도는 방사능-요오드화된 마우스 mik-β1 항체 (제12도)와의 경쟁에 의해 측정하였다. 결합 친화력은 베조프스키의 방법에 따라 계산하였다 (J.A.Berzofsky and I.J.Berkower,in Fundamental Immunology(ed.W.E.Paul),Raven Press(New York),595(1984)). 인체화된 mik-β1 항체의 결합 친화력은 마우스 mik-β1 항체 결합력의 약 2배이내였다.

사람 임파구의 IL-2 자극된 증식을 억제할 수 있는 인체화된 mik-β1과 인체화된 항-Tac 항체의 능력을 측정하였다 (1990년 7월 26일자 공개된 WO90/07861). 피콜-파크(Pharmacia)로 원심분리하여 사람 혈액으로부터 수거한 사람 단핵구를 RPMI 배지 + 10% 소 태자 혈청 (FCS)중에서 2×10^6 세포수/ml로 희석하였다.

1/200 용적의 파이토헤마글루티닌 P(Difco)를 첨가하고 세포를 4일간 배양하였다. 세포를 RPMI+10% FCS + 10u/ml IL-2중에서 이후 4일간 배양하였다. 10^5개의 이들 PHA 활성화된 블라스트를 96-웰 평판의 웰내에 RPMI + 10% FCS 150μl 중에서 인체화된 mik-β1과 인체화된 항-Tac 각각 2㎍ 존재 및 부재하에서 1시간 동안 배양하고, 여기에 다양한 희석율의 IL-2(Amgen)를 배지 50㎕중에 내재시켜 첨가했다. 이 세포들을 48시간동안 배양하고 0.5μCi 메틸-^{3}H-티미딘 (Amersham,82 Ci/mmol)을 첨가한 후, 세포들을 24시간 동안 배양하였다. 세포 수확기로 세포를 수거하고 방사능을 측정하였다. 항체의 혼합물은 IL-2에 반응하는 세포의 증식을 상당히 억제하는데 (제13도), 이는 항체의 혼합물이 강력한 면역억제 특성을 가지게 됨을 의미한다. 인체화된 mik-β1과 인체화된 항-Tac은 항체 단독의 경우 보다 더욱 더 강력히 증식을 억제했다.

[실시예 II]

[HSV 항원에 대한 인체화된 면역글로불린]

헤르페스 단순 비루스 I형 및 II형 (HSV-1 및 HSV-2)은 세계에서 성접촉에 의해 전염되는 질환의 두번째로 가장 빈번한 원인균인 것으로 추정된다. 완전히 정확한 데이타가 필요한 것은 아니지만, 감염 정도는 미합중국 인구의 약 20 내지 40% 범위로 추정된다. 무증후성 질병에서부터 생명에 위협을 가하는 질병에 이르는 다수의 질병은 HSV 감염과 관련이 있다. 특히 임상학적 관심사중, HSV-1 감염에 의한 뇌염 및 HSV-2의 임산부로부터 태아로의 형질 유전은 종종 치명적이다. 면역 억제성 환자는 또한 비루스에 감염되었을 경우 심각한 합병증에 걸리기 쉽다.

7개 이상의 주세포 표면 당단백질을 포함하여, 50개 이상의 HSV 폴리펩티드가 HSV-감염 세포에서 확인되었다 (Whitley,R.,Chapt.66 및 Roizman Sears,Chapt.65,Virology,Eds.Fields 외 다수,2판,Raven 출판, 뉴욕소재(1990)참고). 이들 당단백질의 특이적 생물학적 기능은 잘 규정되지 않았으나, gB 및 gD는 세포 융합 활성과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(W.Cai 외 다수,J.Virol.62. 2596(1988) 및 Fuller Spear,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,5454(1987) 참고). gB 및 gD는 형태-특이적 항원 결정인자와 형태-공통적 항원 결정인자를 형질 발현한다. Oakes 와 Lausch는 gB 및 gE에 대한 모노클로날 항체가 삼차 신경절에서 HSV-1의 복제를 억제한다는 것을 증명하였다(Oakes 와 Lausch,J.Virol.51,656(1984)). Dix등은, 항-gC 및 gD 항체가 비루스-유도적, 급성 신경학적 질병에 대해 마우스를 보호한다는 것을 밝혔다 (Dix 등,Infect.Immun.34,192(1981)). Whitley와 그의 동료들은 HSV-1 에 대한 뮤린 모노클로날 항체의 패널을 만들었고, 그 항체들중 몇몇은 비루스를 눈에 접종함에 따른 뇌염 및 치사로부터 쥐를 보호한다는 것을 밝혔다(Koga등,Virology 151,385(1986);Metcalf 등,Cur.Eye Res.6,173(1987) 및 Metcalf등, Intervirology 29,39(1988) 참고). 클론 Fd 79(항-gB)는 감염 후 48시간이 될때까지 면역화가 지연될지라도 뇌염을 예방한다. Fd 79 및 Fd 138-80(항-gD)은 상피 각막염의 심각도를 크게 경감시키며 교배된 마우스 모델에 대해 영속적으로 비루스 감염의 빈도를 저하시킨다.

본 발명에 따르면, 비루스에 직접적으로 반응하거나 또는 감염된 세포상의 HSV 관련 에피토프와 특이적 반응성을 가진 인체화된 면역글로불린이 제공된다.

이들 면역글로불린은 HSV 특이 항원에 대한 결합 친화도가 약 10^7M^{-1}이상, 바람직하게는 10^8M^{-1} 내지 $10^{10}M^{-1}$ 또는 그 이상이며, 예를 들어 HSV 형질 유전으로 부터 세포를 보호할 수 있다. 인체화된 면역글로불린은 인체 프레임워크를 가지며 HSV 단백질(예,gB 및 gD 단백질)과 특이적 반응성을 가진 면역글로불린, 일반적으로 마우스 면역글로불린의 하나 또는 그 이상의 상보성 결정 부위(CDR'S)를 가질 것이다. 본 발명의 면역글로불린은 경제적으로 다량으로 생성될 수 있고, 예를 들어 많은 방법을 통해 HSV-매개 질환을 가진 환자를 치료하는데 사용될 수 있음이 밝혀졌다.

HSV는 모든 비루스중에서 가장 집중적으로 연구되고 있으며, HSV 비리온의 구조는 약 33개의 단백질을 포함하는 것으로 밝혀졌다. 이들 단백질, 특히 8개의 표면 당단백질(예,gB,gC,gD,gE,gG,gH 및 gI)과 반응성이 있는 모노클로날 항체의 CDR을 사용하는 인체화된 면역글로불린이 본 발명의 바람직한 실시태양을 대표한다(Spear,P.G.,The Herpesviruses.vol.3,pp.315-356(1984)(Roizman,B.편집), Plenum 출판(뉴욕소재) 및 Spear,P.G.,Immunochemistry of Viruses.The Basis for Serodiagnosis and Vaccines,pp.425-446(1985)(Neurath,A.R.편찬), Amsterdam: Elsevier 참고).

한 특징으로서, 본 발명은 HSV gB 및 gD 당단백질에 반응성이 있는 모노클로날 항체와 같은 HSV 단백질의 바람직한 에피토프에 결합할 수 있는 면역글로불린의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR을 암호하는 재조합 DNA 분절에 관한 것이다. 이들 영역을 암호하는 DNA 분절은 통상적으로 적당한 인체화된 프레임워크 영역을 암호하는 DNA 분절에 결합할 것이다. 예시적인 DNA 서열은 제14도에 제시된 모노클로날 항체 Fd79 및 Fd 138-80의 중쇄 및 경쇄의 초가변부를 함유하는 폴리펩티드 쇄(사람 프레임워크 영역도 함께 포함)를 암호한다. 코돈 축퇴 및 비-결정적 아미노산 치환으로 인해, 기타 다른 서열들이 하기 설명된 바와 같은 DNA 서열로 쉽게 치환될 수 있다.

본 발명의 임의의 인체화된 면역글로불린은 또한 다른 항체, 구체적으로 다른 HSV 항원과 반응성이 있는 인체화된 항체와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 인체화된 면역글로불린의 칵꼬리가 반응할 수 있는 적합한 HSV 항원으로는 gC, gE, gF, gG 및 gH가 있다(Rector,J 등,Infect.Immun.38,168(1982)와 Fuller 등,J.Virol.63,3435(1989)).

항체는 또한 아사이클로비르 또는 다른 항 비루스제와 함께 제공될때, 별도로 투여되는 조성물로서 사용될 수 있다. 통상적으로, 상기 제제로는 아이독스우리딘 또는 트리플루오로티미딘이 있으나, HSV 치료분야의 당업자에게 공지된 다수의 부가 제제(예,비다라빈)도 또한 사용될 수 있다(Corey,L.상기 인용문헌 참조). 본 발명의 바람직한 약학적 조성물은 HSV 감염된 세포를 치사시키기 위해 면역독소에 본 발명의 면역글로불린을 사용하는 것을 포함한다.

이들 인체화된 항체는 생체외에서 다양한 효능을 발휘할 수 있다. 실시예를 통해, 항체는 HSV 항원의 검출, 비루스 단편 또는 특이적 HSV 감염된 세포의 분리, 백신 제조등에 사용될 수 있다.

[실험]

[중쇄 및 경쇄 cDNA의 클로닝]

고착된 폴리머라제 연쇄 영역(E.Y.Loh등,Science 243,217(1989)), 불변 부에 하이브리드되고 Hind III 부위를 포함한 3'프라이머, 및 dG 꼬리에 하이브리드되고 EcoR I 부위를 가진 5'프라이머를 사용하여 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 유전자의 cDNA를 클로닝하였다(제6도에 제시된 도식). 이 방법은 가변 도메인 서열에 어닐링 하도록 고안된 혼합 프라이머를 사용하는 다른 방법과는 달리 본래의 가변 도메인 서열을 가진 클론을 산출한다(J.W.Larrick 등,Bio/Technology 7,934(1989) 및 Y.L. Chiang 등,BioTech.7,360(1989)) PCR 증폭된 단편을 EcoR I 및 Hind III로서 분해하고 서열 결정용 pUC18 벡터로 클로닝하였다. Fd 79의 경우, 2개의 감마-1 특이 클론 및 5개의 카파 특이 클론을 서열 결정하였다. 2개의 감마-1 특이 클론은 서열이 동일하였다. 이 중쇄 cDNA 단편은 19개 아미노산의 신호 펩티드, 마우스 중쇄 아군 IIIB중의 V 영역, D 분절, 및 게놈 J_H1서열과 비교시 4개의 변화가 있는 J_H1분절을 암호한다. 추론된 아미노산 서열은 제14a도에 제시한다. 5개의 카파 특이 클론은 2그룹에 속한다. 2개의 클론은 동일한 것으로서, 보존성 아미노산 23 시스테인이 티로신(비-증식성 대립형질을 나타냄)으로 치환된 카파 쇄를 암호한다. 다른 3개의 클론은 20개의 아미노산으로된 신호 펩티드 서열, 마우스 카파 쇄 아군 III의 V 영역, 및 게놈 J_K2 서열과 비교시 1부분이 다른 J_K2 분절을 암호하는 동일한 서열을 가지고 있다(제14b도). 중쇄 및 카파 쇄서열의 유효성은 이어서 하기 기술되는 바와 같이 키메라 항체의 작제및 형질발현을 통해 확인하였다. Fd 138-80의 중쇄 및 카파 쇄는 유사하게 클로닝하였다. 중쇄 및 카파 쇄의 각각을 함유하는 3개의 클론이 서열결정되었다. 3개의 중쇄 클론은 모두 19개의 아미노산으로 된 신호 펩티드 서열, 마우스 중쇄 아군 II의 V 영역, D 분절 및 J_H3 분절을 암호하는 동일한 서열을 가지고 있다(제14도 참고). 3개의 카파 결합은 또한 서열상에서 동일하다. 이것의 경쇄 단편은 20개의 아미노산으로 된 신호 펩티드 서열, 마우스 카파 쇄 아군 V의 V 영역 유전자 및 J_K5 분절을 암호한다(제14d도 참고). 상기 두가지 쇄는 모두 암호 서열중에서 불규칙성이 거의 없는 것으로 밝혀졌으며; 이어서 그것의 유효성은 키메라 항체의 작제 및 형질 발현을 통해 확인되었다.

[키메라 항체의 작제 및 형질발현]

키메라 항체 유전자의 작제 및 형질발현을 위해 2개의 플라스미드 벡터를 제조하였다.

플라스미드 pVgI(제15a도)은 사람 시토메가로비루스 IE1 프로모터 및 인헨서(M.Boshart 등,Cell 41,521(1985)), 선행하는 인트론의 부분을 포함한 사람 게놈 Cγ1 분절, 및 선별용 하이그로마이신 유전자(Blochlinger 등,Mol.Cell.Biol. 4,2929(1984))를 포함하고 있다. 플라스미드 pVk(제15b도)는 pVgI과 유사하나 사람 게놈 Cκ 분절 및 gpt 유전자를 포함한다. Fd 79 및 Fd138-80 중쇄 및 경쇄 가변부의 유도체를 폴리머라제 연쇄반응을 통해 cDNA 로부터 제조했다. 5'프라이머는 ATG 코돈에서 시작하는 V 영역에 하이브리드하고 Xba I 부위를 포함하며; 3' 프라이머는 J 영역의 마지막 15개의 누클레오티드에 하이브리드하고 접목 공급 신호 및 Xba I 부위를 포함한다(C.Queen등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029(1989) 참고). 변형된 V영역을 CMV 프로모터와 불변부의 부분적 인트론 사이에 있는 각 플라스미드 벡터의 Xba I 부위로 클로닝하였다.

키메라 항체의 형질 발현을 위해, 중쇄 및 카파 쇄 플라스미드를 사용하여 일렉트로포레이션을 통해 Sp2/0 마우스 골수종 세포를 형질 감염시켰는데, gpt 형질발현에 대하여 세포를 선별했다. 최대량의 완전 항체를 분비하는 클론을 ELISA로 검출하였다. 정제된 키메라 Fd 79 와 Fd 138-80항체는 유동 세포분석기를 통해 HSV-1 감염된 베로 세포에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 또한 비루스 중화 분석을 통해, 키메라 항체가 뮤린 항체의 중화 활성을 보유하고 있음을 알 수 있었다(데이타는 제시되지 않았으나, 하기 제시되는 인체화된 항체의 결과와 유사함).

[인체화된 항체의 컴퓨터 모델링]

인체화된 항체의 높은 결합 친화력을 보유하기 위해, 퀸등의 통상적인 방법을 사용했다(C.Queen 등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029(1989)).

인체 항체가 원래의 뮤린 항체와 상동성이 클수록, 인체 프레임워크와 뮤린 CDR이 결합할때 친화력을 저하시킬 수 있는 CDR의 변형을 더욱 경감시킬 것이다. 통상적으로, 동일한 사람 항체의 중쇄 및 경쇄를 프레임워크 서열로서 제공하도록 선택하여 상기 2가지 쇄의 어셈블리시 불화합성의 가능성을 줄일 수 있다. NBRF 단백질 서열의 데이타 베이스에 대한 서열 상동성 연구(MicroGenie Sequence Analysis Software(Beckman)으로써 수행)를 기초로 하여, Fd79의 인체화를 위한 프레임워크 서열에 항체 Pom을 선택하였다.

컴퓨터 프로그램 ENCAD(Levitt,J.Mol.Biol.168,595(1983))을 사용하여 Fd79 가변부의 모델을 작제하였다. 뮤린 Fd 79의 정밀 모델을 조사한 결과, 프레임워크중의 2개의 아미노산 잔기가 CDR잔기와 상당히 접할 정도로 밀착되어 있다는 것이 밝혀졌다(표 4 참고).

경쇄 NBRF 위치 49의 Lys는 경쇄의 CDR2중에 있는 3개의 아미노산(L50 Tyr,L53 Asn,L55 Glu) 및 중쇄의 CDR3 중에 있는 2개의 아미노산(H99 Asp,H100 Tyr)과 접촉되어 있다. 중쇄위치 93의 Leu는 또한 중쇄의 CDR2 중에 있는 2개의 아미노산(H35 Ser, H37 Val) 및 중쇄의 CDR3중에 있는 1개의 아미노산(H100C Phe)과 상호작용을 하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같이, L49 Lys 및 H93 Leu는 인체화된 Fd 79의 작제시 보유되는 데, 이는 그것의 인체 Pom 프레임워크 잔기로 대체됨으로써 CDR의 변형을 유도하기 쉽다.

또한, Pom 프레임워크내의 7개의 다른 잔기(경쇄에 5개, 중쇄에 2개)는 통상적인 인체 잔기(선택된 잔기 중 6개는 뮤린 Fd 79 서열과 동일)로 치환되는데, 이것은 다른 인체항체에서는 거의 드문것이기 때문이다. 프레임워크내의 특이적인 아미노산을 제거함으로써 면역원성을 더욱 저하시킬 수 있다. 뮤린 Fd 79서열 및 이에 상응하는 인체화된 서열은 제14a, b도에 제시한다.

Pom 프레임워크내의 치환된 잔기는 밑줄로 표시된다.

[표 4]

잔기 번호[1]	아미노산	접촉 CDR 잔기[2]
Fd79		
L49	Lys	L50Y, L53N, L55E, H99D, H100Y
H93	Leu	H35S, H37V, H100CF
Fd138-80		
L36	His	L34V, L89Q
H27	Tyr	H32H, H34I
H30	Tyr	H32H, H53R
H48	Phe	H63F
H66	Lys	H63F
H67	Ala	H63F

1. 아미노산 잔기는 Kabat 시스템에 따라 번호가 매겨진다(E.A.Kabat 등,Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1987)) : 맨앞의 문자(H 또는 L)는 중쇄 또는 경쇄를 상징한다. 그 뒤의 번호는 잔기 번호이다. 맨끝의 문자는 아미노산의 하나의 문자 코드이다.

2. 카베트에 따라 초가변부를 나타낸다:

경쇄 CDR 1 : 잔기 24-34 ; CDR 2 : 50-56 ; CDR 3 : 89-97.

중쇄 CDR 1 : 31-35 ; CDR 2 : 50-65 ; CDR3 : 95-102.

이와 유사하게, Fd 138-80의 뮤린 중쇄 및 경쇄 서열을 NBRF 단백질 서열의 데이타 베이스에 대하여 서열 상동성을 연구하였다. 인체 항체 Eu의 서열은 인체화된 Fd 138-80의 프레임워크 서열을 제공하도록 선택된다. Fd 138-80의 컴퓨터-유래의 모델을 고찰한 결과, 프레임워크의 6개 아미노산 잔기가 CDR 잔기와 상당한 접촉을 가질 수 있을 정도로 밀착되어 있는 것으로 밝혀졌다. 잔기 및 그것의 접촉 상응부분은 표 4에 제시하며; 이들 뮤린 잔기는 인체화된 Fd 138-80의 작제시 보유된다. 2개의 다른 잔기(L87 Phe 와 H37 Met)는 CDR3와 근접한 L98 Phe와 상당히 접촉하고 있는 것으로 밝혀졌고, 이들 두개의 마우스 잔기도 또한 보유되었다. Eu 프레임워크내의 8개의 아미노산(경쇄에서 2개,중쇄에서 6개)은 다른 인체 항체에서는 거의 드문것이기 때문에 뮤린 잔기(이것은 또한 인체의 공통잔기와 일치)로 치환된다. 뮤린 Fd 138-80서열 및 이에 상응하는 인체화된 서열은 제14c도에 제시한다. Eu 프레임워크중의 치환된 잔기는 밑줄로 표시된다.

인체화된 항체에 대한 유전자 작제에 있어서, 통상적으로 마우스 서열에서 발견되는 코돈을 사용하여 신호 펩티드를 포함한 인체화된 중쇄 및 경쇄의 단백질 서열을 암호하는 누클레오티드 서열을 선택했다. 몇몇개의 축퇴 코돈을 변경하여 제한부위를 형성하거나 바람직하지 않은 부위를 제거한다. 상기 누클레오티드 서열에는 또한 키메라 유전자에서 사용된것과 동일한 접목 공급 신호 서열 및 각 말단부에 Xba I 부위가 포함된다. 각 유전자는 4개의 중첩 합성 올리고누클레오티드를 사용하여 작제한다. 각 가변 도메인 유전자에 있어서, 신호 펩티드와 접목 공급신호서열 뿐만 아니라 전체 암호 서열을 포함하는 상호 가닥 위에 2 쌍의 중첩 올리고누클레오티드를 합성한다. Applied Biosystems 380B DNA 합성 장치 상에서 올리고누클레오티드를 합성하였다. 각 올리고는 길이가 약 110-140개의 염기이고 15개 염기는 중첩된다. 이중 가닥의 DNA 단편을 클레노우 폴리머라제로 합성하여, 제한 효소로 분해하고, pUC18 벡터에 연결시킨 후 서열결정하였다. 이어서 정확한 서열을 가진 2개의 단편을 pVgl 또는 pVk 형질 발현 벡터의 Xba I 부위내에 연결시켰다.

이어서 합성 유전자를 pVgl 및 pVk 형질 발현 벡터내에 클로닝하였다. 작제된 각 인체화된 항체의 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 사용하여 일렉트로포레이션을 통해 Sp2/0마우스 골수종 세포를 형질감염시키고, gpt를 형질 발현하는 세포를 선택하였다. 클론은 ELISA를 통해 배양 상등액중의 인체 항체 생성여부를 측정함으로써 선별하고, 최고-생산 클론으로부터 항체를 정제하였다. 조직 배양 상등액을 포도상 구균 단백질 A-세파로즈 CL-4B(Pharmacia) 컬럼상에 통과시킴으로써 항체를 정제하였다. 결합 항체는 0.2M 글리신-HCl(pH 3.0)으로 용출하고 1M의 트리스(pH 8.0)로 중화시켰다. 완충액은 PD 10 컬럼(Pharmacia)상에 통과시킴으로써 PBS로 교환하였다.

[인체화된 항체의 특성]

인체화된 Fd79 및 Fd138-80 항체를 뮤린 및 키메라 항체와 비교하여 특징화하였다. 상기 두개의 인체화된 항체는 모두, 키메라 항체(제16도)와 유사한 방식으로 형광 세포 측정 분석시 HSV-1로 감염된 베로세포에 결합하는것으로 나타났고, 이로써 상기 항체가 그것의 각각의 비루스 항원을 인식함을 알 수 있다. 결합 활성을 보다 정량적으로 측정하기 위해, 방사능 요오드화된 뮤린 항체를 비루스 감염된 세포에 결합시키고 스캐챠드(Scatchard) 분석을 수행하였다.

인체화된 항체의 친화력은 요오드화 항체와의 경쟁 반응을 통해 결정하였다.

HSV-1 감염된 베로 세포를 gB 및 gD 항원의 원천으로서 사용하였다. 경쟁인자항체(마우스 또는 인체화된 항체)의 증가량에 1.5ng의 방사능 요오드화된 추적인자 마우스 항체(2μCi/㎍)를 첨가하고 0.2ml의 결합 완충액(PBS + 2% FCS + 0.1% 아지드)중의 4 x 10^5 감염된 베로세포와 함께 4℃에서 1시간동안 배양하였다. 세포를 세척하고 펠릿화한 후, 그것의 방사능을 측정하였다. 결합 추적인자 항체 및 유리 추적인자 항체의 농도를 측정하였다. 베르조프스키(Berzofsky) 방법(J.A.Berzofsky 와 I.J.Berkower Fundamental Immunology(W.E.Paul 편집), Raven 출판(뉴욕 소재), 595(1984))에 따라 결합 친화력을 측정하였다.

측정치는, 인체화된 항체(표 5)의 결합 친화력에 거의 손실이 없음을 나타낸다. 구체적으로, 뮤린 Fd79에 비해 인체화된 Fd79의 친화력은 약 2배 감소하였다(Ka: 5.3 x $10^7 M^{-1}$ 대 1.1 x $10^8 M^{-1}$). 인체화된 Fd138-80의 친화력은 뮤린 항체와 거의 비슷하였다(Ka: 4.8 x $10^7 M^{-1}$ 대 5.2 x $10^7 M^{-1}$).

[표 5]

뮤련과 인체화된 항체의 결합 친화력

	마우스의 항체	인체화된 항체
	$K_a(M^{-1})$	$K_a(M^{-1})$
Fd79(항-gB)	1.1 x 10^8	5.3 x 10^7
Fd138-80(항-gD)	5.2 x 10^7	4.8 x 10^7

뮤린 Fd79와 Fd138-80은 보체없이도 생체외에서 HSV-1을 중화시키는 것으로 밝혀졌고 (J.Koda 등,Virology 151,385(1986)), 인체화된 항체의 중화활성이 마우스의 항체와 비교되었다. 동량의 뮤린 항체와 인체화된 항체의 연속 희석물을 베로 세포 상에 접종하기 전에, 1시간동안 비루스와 함께 배양하였다. 4일후, 세포를 중성적으로 염색함으로써 플라크를 가시화하였다. 이들 플라크 감소 분석은 인체화된 Fd79와 Fd138-80이 모두 그것의 뮤린 상응물과 같이 효과적으로 비루스를 중화시킨다는 것을 나타낸다(제17a도 및 제17b도). 인체화된 Fd79 및 뮤린 Fd79는 모두 항체 농도 10nM(1.5㎍/ml)에서 플라크를 90% 감소시킨다. 이와 유사하게, 인체화된 Fd 138-80 및 뮤린 Fd 138-80은 동량의 수준에서 플라크를 90% 감소시킬 수 있었다.

상기 항체는 또한 조직 배양액중에서 비루스 전파로부터 세포를 보호할 수 있는 항체 능력에 대해서도 연구되었다. 베로세포를 0.1 pfu/세포의 비루스로 접종한 후 10㎍/ml의 항체를 첨가하기 전에 37℃에서 2시간동안 흡착시켰다. 4일 후, 감염된 세포상의 비루스 항원을 감지하기 위해 세포를 항-gB항체로 염색하였다. 결과로써, 10㎍/ml의 뮤린 및 인체화된 Fd 79가 배양 세포의 감염을 방지한다는 것을 나타냈다(제38a도). 그러나, 뮤린 이나 인체화된 Fd 138-80은 접종전에 비루스를 중화시킬 수는 있으나, 비루스 전파에 대해 세포를 보호할 수는 없었다(제18b도). gB 와 gD는 모두 세포 융합 및 비루스 감염도와 관련이 있는 것으로 생각된다(W.Cai등, J.Virol.62,2596(1988)와 A.O.Fuller 및 P.G.Spear,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84,5454(1987)). 그러나, Fd79는 gB의 감염 기능과 세포 융합 기능을 모두 차단하는 반면, Fd 138-80은 gD의 감염 기능만을 차단함에 따라, 비루스는 여전히 세포와 세포로 확산될 수 있다.

결합, 중화 및 보호 실험결과는, 인체화된 Fd 79 및 Fd138-80 항체가 뮤린 모노클로날 항체의 생물학적 특성 및 결합 활성을 보유하고 있음을 나타냈다. 그중에서도, HSV gB 와 gD에 대한 특이성을 지닌 인체화된 항체의 유용성은 비루스성 질병의 치료시 인체화된 항체의 생체내 잠재성 및 면역원성에 대한 연구기회를 제공한다. gB와 gD의 형태-공통적 에피토프를 Fd 79와 Fd138-80이 인식한다는 것은 (J.Koda 등,Virology 151.385(1986)) 헤르페스 단순 비루스 타입2분만아니라 타입 1에 대한 치료적 잠재성을 확정시킨 것이다.

[인체화된 Fd 79와 Fd 138-80에 의한 마우스 모델내의 헤르페스 단순 비루스 타입 2 치사 감염으로부터의 보호]

생체내의 헤르페스 감염에 대한 인체화된 항체의 효능을 판정하기 위해, 치사량의 HSV-2를 접종하기전 및 후에 인체화된 항체를 마우스에 주사하고, 치사율을 기록하였다. 동물군에 대하여 비루스 접종 24시간전 또는 24시간후에 인체화된 Fd79 또는 Fd138-80을 각각 0.9, 0.3 또는 0.1mg 복강내 주입하였다. 10마리의 마우스군에게 치사량의 HSV-2를 비강내 투여하였다. 3주 동안 마우스를 관찰하였다. 치사율을 하기 표에 제시하였다.

결과를 통해, 인체화된 Fd 79와 인체화된 Fd 138-80이 마우스의 HSV-2 감염에 대하여 상당히 예방할 수 있음을 알 수 있다.

[표 6]

HSV-2가 비강내 접종된 마우스의 치사율에 대한 HSV 항체의 예비처리(24시간 전)의 효과

	치사율		
처리	수	퍼센트	P-값
대조군	13/15	87	---
위약군	13/15	87	NS
Mu Fd 138			
0.9 mg	3/10	30	<0.001
0.3 mg	5/10	50	0.01
0.1 mg	5/10	50	0.08
Hu Fd 138			
0.9 mg	1/10	10	<0.001
0.3 mg	8/10	80	NS
0.1 mg	7/10	70	NS
Mu Fd 79			
0.9 mg	0/10	0	<0.001
0.3 mg	2/10	20	<0.01
0.1 mg	4/10	40	<0.05
Hu Fd 79			
0.9 mg	1/10	10	<0.01
0.3 mg	3/10	30	0.08
0.1 mg	5/10	50	0.08

[표 7]

HSV-2가 비강내 접종된 마우스의 치사율에 대한 HSV 항체의 후처리(24시간 후)효과

치사율

처리	수	퍼센트	P-값
대조군	12/15	80	---
위약군	15/15	100	NS
Mu Fd 138			
0.9 mg	2/10	20	<0.001
0.3 mg	4/10	40	0.001
0.1 mg	5/10	50	<0.01
Hu Fd 138			
0.9 mg	3/10	30	<0.001
0.3 mg	3/10	30	<0.001
0.1 mg	9/10	90	NS
Mu Fd 79			
0.9 mg	5/10	50	<0.01
0.3 mg	3/10	30	<0.001
0.1 mg	6/10	60	<0.05
Hu Fd 79			
0.9 mg	3/10	30	<0.001
0.3 mg	3/10	30	<0.001
0.1 mg	9/10	90	NS

치료시 2 또는 그 이상의 인체화된 항체를 조합하여 사용하는 것은, 항체 내성 균주의 발생을 저하시키는데 중요하다. 아사이클로비르와 같은 다른 항 비루스 제제를 인체화된 항체와 혼합하여 치료함으로써, 화학 치료 제제만으로는 효과적이지 않던 질병을 치료할 수 있는 부가의 기회를 제공한다. Fd 79와 Fd 138-80은 뮤린 안구 모델(J.F.Metcalf 등,Cur.Eye Res.6,173(1987))에서 비루스의 지속성 빈도수를 저하시키므로, 통상적으로 다른 항 비루스 제제와 함께 인체화된 항체는 통상적인 항-비루스 제제가 효과적이지 않았던 분야인 희귀성 생식기 감염의 에피소드를 저하시킬 수 있다(L.Corey 등,N.Engl.J.Med.306,1313(1982)). 인체 불변도메인의 병입은 또한, 환자의 치료효과를 상승시키는 항체-의존적 세포의 세포 독성과 같은 작동 기능을 향상시킬 수 있다.

[실시예 III]

[CD33 항원에 대한 인체화된 면역글로불린]

매년 미국에서는 신종 골수성(또한 비-임파구성 또는 과립성이라 명명) 백혈병이 약 10,000-15,000건씩 생겨난다(Cancer Facts Figures,American ancer Society,1987). 골수성 백혈병에는 2개의 주요 형태가 있다 : 급성의 골수성 백혈병(AML) 및 만성의 골수성 백혈병(CML). 화학요법으로의 치료에도 불구하고, AML 환자의 장기간 생존 가능성은 10 내지 20%이하이고(Clarkson등,CRC Critical Review in Oncology/Hematology 4,221(1986)), CML 및 관련질병, 예를 들면 만성의 골수성 단구 백혈병(CMML), 만성의 단구 백혈병(CMMOL) 및 골수형성이상증(MDS)환자의 생존율은 극히 낮다.

p67 단백질 또는 CD33 항원은 선대의 골수세포 및 대부분의 AML의 백혈병 세포 표면상에서 발견되나, 임

파구 세포 또는 비-조혈 세포상에서는 발견되지 않는다(A.J.McMichael 편집,Leucocyte Typing III,Oxford University 출판,pp 622-629(1987)참고). CD33 항원에 결합되는 것으로 공지된 항체로는 L4B3, L1B2 및 MY9 가 있다(Andrews 등,Blood 62,124(1983) 및 Griffin 등,Leukemia Research 8,521(1984)). CD33에 결합하는 또 다른 항체는 M 195이다(Tanimoto 등,Leukemia 3,339(1989) 및 Scheinberg 등,Leukemia 3,440(1989)).

다양한 세포와 조직을 가진 M195의 반응성을 테스트했다.

보통 세포중에서, M 195는 일부 단구 및 골수성 선조 세포에만 결합하는 것으로 공지되었다. 또한 상기 연구 결과, M195는 다른 조혈세포 또는 비-조혈 조직에는 결합되지 않는 것으로 보고되었다. M 195는 골수아구성 상의 대부분의 AML 및 모든 CML상태의 세포에 결합된다. AML에 대한 M 195의 I단계 임상시도가 수행되었다(Scheinberg 등,Proc.ASCO 9,207(1990)). 요오드-131로 방사능 표지된 M195는 혈액 및 골수내의 표적 백혈구 세포에서 급속하고도 특이적으로 발견되었다.

본 발명에 따르면, CD33 관련 에피토프와 특이적 반응성을 띠는 인체화된 면역글로불린이 제공된다. 이들 면역글로불린은 CD33에 대한 결합 친화력이 약 $10^{7}M^{-1}$이상, 바람직하게는 $10^{8}M^{-1}$ 내지 $10^{10}M^{-1}$ 또는 그 이상이며, 예를 들어 백혈병 세포를 파괴할 수 있다.

인체화된 면역글로불린은 인체 프레임워크를 가질 것이며 면역글로불린, 통상적으로 CD33 항원과 특이적 반응성을 띠는 마우스의 면역 글로불린유래의 하나 또는 그이상의 상보성 결정 부위(CDR)를 가질 것이다. 바람직한 구체예로서, 하나 또는 그 이상의 CDR이 M195항체로부터 유래되는 것이다. 특히 M195는 궁극적 조혈계 세포와 결합하지 않아, 치료에 사용된 M195는 모든 혈액 세포를 형성하는데 결정적인 상기 세포와 최소로 반응하여 파괴될 것이다.

따라서, 본 발명의 CD33 특이 면역글로불린은 경제적으로 다량 생성될 수 있으며, 예를 들어 많은 방법을 통해 환자의 골수성 세포-매개 질병의 치료에 사용할 수 있다.

한 특징으로서, 본 발명은 모노클로날 항체 M195, L4B3, L1B2 또는 MY9와 같은 CD33항원의 바람직한 에피토프와 결합할 수 있는 면역글로불린의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR을 암호하는 재조합 DNA 분절에 관한 것이다. 이들 영역을 암호하는 DNA 분절은 통상적으로 적당한 인체의 프레임워크 영역을 암호하는 DNA 분절에 결합될 것이다. 형질 발현시, 모노클로날 항체 M195의 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하는 폴리펩티드 쇄를 암호하는 대표적인 DNA 서열은 제19도에 제시한다. 코돈 축퇴 및 비결정적 아미노산 치환으로 인해, 다른 DNA 서열들이 하기 기술된 바와 같은 DNA서열로 쉽게 치환될 수 있다.

본 발명의 항체는 통상적으로 혈액학적 악성종양의 치료에 각각 사용할 수 있다. 예를 들어, 치료에 적당한 통상적인 질병상태로는 AML, CML, CMML, CMMOL 및 MDS가 포함된다(Hoffbrand Pettit,Essential Haematology,Blackwell Scientific Publications,Oxford(1980)참고). 항체는 골수이식이전에 골수절제시에 사용할 수도 있다.

본 발명의 임의의 인체화된 면역글로불린은 또한 다른 항체, 특히 다른 골수 항원과 반응성을 띠는 인체화된 항체와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 인체화된 면역글로불린의 칵꼬리가 반응할 수 있는 적당한 항원으로는 CD13, CD14, CD15, CD16 및 CD34가 있다(Leukocyte Typing III,상기 인용문헌 참조,pp 576-732).

항체는 화학적 치료 제제와 함께 제공될때 투여되는 조성물과 따로 투여될수 있다. 통상적으로, 상기 제제로는 시토신 아라비노사이드 및 다우노루비신이 있으나, 백혈병 치료를 위한 것으로 당업자에게 공지된 많은 부가제제(예,6-티오구아닌)을 사용할 수도 있다(Hoffbrund Pettit.,상기 인용문헌 참고). 본 발명의 바람직한 약학적 조성물은, 백혈병 세포를 치사시키기 위해 면역독소중에 본 발명의 면역글로불린을 사용하는 방법을 포함한다.

본 발명의 인체화된 항체는 생체외에서 다양한 용도를 부가로 지닐 수 있다. 예를 들면, CD33 항원의 검출, 특이적 골수세포의 분리등에 상기 항체를 사용할 수 있다.

하기 실험은 CD33 항원에 높은 결합 친화력을 가진 인체화된 항체를 생성하는 M195 항체에 관한 것이나, 또한 CD33의 에피토프에 결합하는 L4B3, L1B2, MY9 또는 다른 모노클로날 항체의 CDR도 사용할 수 있다는 것이 고려되어야 한다.

[실험]

[중쇄와 경쇄 cDNA의 클로닝]

중쇄와 경쇄의 가변성 도메인 유전자의 cDNA를 고착된 폴리머라제 연쇄 반응(E.Y.Loh 등,Science 243,217(1989)),불변부에 하이브리드된 Hind III부위를 포함하는 3'프라이머, 및 dG 꼬리에 하이브리드된 EcoR I 부위를 가진 5'프라이머를 사용하여 클로닝하였다. (제6도에 제시된 도식) PCR 증폭된 단편을 EcoR I 및 Hind III로 분해하고 서열결정용 pUC 18벡터내로 클로닝하였다. M195의 경우, 2개의 감마-2a 특이 클론 및 2개의 카파 특이 클론을 서열결정했다. 2개의 감마-2a 클론 및 2개의 카파클론은 서열상에서 각각 동일하다.

cDNA 가변성 도메인 서열 및 추론된 아미노산 서열은 제19도에 제시된다.

[키메라 항체의 작제 및 형질 발현]

키메라 항체 유전자의 작제 및 형질 발현을 위해 2개의 플라스미드 벡터를 제조하였다. 플라스미드 pVgl-dhfr(제20a도)는 인체의 시토메가로비루스 IE1 프로모터 및 안헨서(M.Boshart등,Cell 41,521(1985)), 선행하는 인트론의 부분을 포함한 인체의 게놈 Cγ1 분절, 및 선별용 디히드로폴레이트 환원효소(dhfr) 유전자(Simonsen 등,Proc.Natl Acad.Sci.USA 80,2495(1984))를 포함한다. 플라스미드 pVk(제20b도)는 pVgl-dhfr과 유사하나 인체의 게놈 Cκ 분절 및 gpt 유전자를 포함한다. M195 중쇄 및 경쇄 가변부의 유도체를 폴리머라제 연쇄반응을 통해 cDNA 로부터 제조했다. 5'프라이머는 ATG 코돈에서 시작하고, V 영역과 하이

브리드되고 Xba I 부위를 포함하며; 3' 프라이머는 J 영역의 마지막 15개 누클레오티드에 하이브리드되고 접목 공급 신호서열 및 Xba I 부위를 포함한다(Queen 등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029(1989)참고). 변형된 V 영역을 불변부의 CMV 프로모터와 부분적 인트론 사이의 각 플라스미드 벡터의 Xba I 부위로 클로닝하였다.

키메라 항체의 형질 발현을 위해, 중쇄 및 카파 쇄를 함유한 플라스미드를 사용하여 일렉트로포레이션을 통해 Sp2/0 마우스 골수종 세포를 형질 감염시키고, gpt를 형질발현하는 세포를 선정했다. 클론을 분비하는 최대량의 완전 항체를 분비하는 클론을 ELISA로 검측하였다. 정제된 키메라 M195 항체는 유동 세포측정기를 통해, CD33 항원을 형질 발현하는 U937 세포와 결합하는 것으로 밝혀졌다(제21도).

[인체화된 항체의 컴퓨터 모델링]

인체화된 항체의 높은 결합 친화력을 보유하기 위해, 퀸등의 통상적인 방법을 사용했다(Queen 등,Proc.Natl.Acad.Scii.USA 86,10029(1989) 및 WO 90/07861 참고). 인체 항체가 원래의 뮤린 항체와 비슷할 수록, 인체 프레임 워크와 뮤린 CDR의 결합이 친화력을 저하시킬 수 있는 CDR의 변형의 유도를 경감시킬 것이다. 통상적으로, 동일한 인체 항체의 중쇄 및 경쇄가 프레임워크 서열로서 제공되도록 선택하면 2개 쇄의 어셈블링시 불화합성이 가능성을 줄일 수 있다. NBRF 단백질 서열의 데이타 베이스에 대한 서열 상동성 연구(MicreGenie Sequence Analysis Software(Beckman)으로써 수행)를 기초로 하여, M195의 인체화를 위한 프레임워크 서열로서 Eu 항체를 선택하였다.

컴퓨터 프로그램 ENCAD(M.Levitt,J.Mol.Biol.168,595(1983))를 사용하여 M195 가변부의 모델을 작제하였다. 상기 모델을 사용하여 CDR과 잠재적으로 상호작용할 수 있을 정도로 밀접한 M195 프레임워크 중의 아미노산을 결정하였다(하기 카테고리 4). 인체화된 경쇄 및 중쇄 M195의 가변부를 고안하기 위해, 각 위치의 아미노산을 Eu항체와 동일하게 선택하였고, 단, 위치는 하기 4개의 카테고리중 하나 또는 그 이상에 해당되어야 한다 :

(1) 위치는 CDR내에 속한다.

(2) Eu 아미노산은 그 위치에서 인체 항체에 특이적인 것인 반면, M195 아미노산은 그 위치에서 인체 항체에 통상적인 것이다.

(3) 위치는 CDR과 근접해 있다.

(4) 상기된 모델을 통해, 그 아미노산이 항원 결합 부위(CDR)에 물리적으로 밀접해질 수 있음을 알 수 있다.

카테고리(2)에서, "특이적인"은 Eu 경쇄 및 중쇄에서와 동일한 아군(Kabat등, 상기 인용 문헌)으로서 약 20% 이하의 인체 서열에 존재하는 아미노산을 의미하고, "통상적"은 상기 아군중에서 25%이상, 통상적으로는 50%이상의 인체 서열중에 존재하는 아미노산을 의미한다. 이들 카테고리의 위치에 마우스 M195 항체중의 아미노산을 사용했다 : 각 카테고리의 아미노산은 표 8에 제시된다. 일부 아미노산을 하나이상의 카테고리에 속하는 것일 수 있다. 인체화된 M195 경쇄 및 중쇄 가변성 도메인의 최종 서열은, Eu서열과 비교하여 제22도에 제시한다.

[표 8]

카테고리	경쇄	중쇄
1	24-38, 54-60, 93-101	31-35, 50-66, 99-105
2	10, 52, 67, 110	93, 95, 98, 106, 107, 108, 110
3	--	30, 67, 98, 106
4	40, 52, 74	27, 30, 48, 68, 98

인체화된 항체에 대한 유전자 작제의 경우, 통상적으로 마우스 서열에서 발견되는 코돈을 사용하여 마우스 M195 쇄중의 신호 펩티드와 동일한 것을 함유한 인체화된 중쇄 및 경쇄의 단백질 서열을 암호하는 누클레오티드 서열을 선택했다(제19도). 몇몇개의 축퇴 코돈을 변경시켜 제한부위를 형성하거나 바람직하지 않은 부위를 제거한다. 그 누클레오티드 서열에는 또한 키메라 유전자에 사용되었던 동일한 접목 공급 신호서열 및 각 말단부에 Xba I 부위가 포함된다. 각 유전자는 4개의 중첩된 합성 올리고누클레오티드로 작제된다. 각각의 가변성 도메인 유전자의 경우, 상호 가닥위에 2쌍의 중첩 올리고누클레오티드를 합성하였고, 이 서열은 신호 펩티드와 접목 공급 신호서열 뿐만 아니라 전체 암호와 서열의 포함되도록 하였다(제23도). Applied Biosystems 380B DNA 합성 장치 상에서 올리고누클레오티드를 합성하였다. 각 올리고는 길이가 약 110-140 염기이고 15염기가 중첩된다. 이중 가닥의 DNA 단편은 클레노우 폴리머라제를 사용하여, 각 쌍의 올리고 누클레오티드로부터 합성하고, 제한 효소로 분해하여, pUC18 벡터내에 연결시킨 후 서열결정하였다. 이어서 각각 정확한 절반-서열을 가진 2개의 단편을 적합한 배향으로 pVgl-dhfr 또는 pVk 형질 발현 벡터의 Xba I 부위내에 연결시킴으로써 완전한 중쇄 및 경쇄 유전자를 생산하였다. 반응은 당해 기술분야에 공지된 조건하에 수행하였다(Maniatis등,상기 인용 문헌).

일렉트로포레이션을 통해 중쇄 및 경쇄 플라스미드도 Sp2/0 마우스 골수종세포를 형질감염시키고 gpt를 형질 발현하는 세포를 선택하였다. 클론은 ELISA를 통해 배양 상등액중의 인체 항체 생성여부를 측정함으로써 선별하고, 최다-생산 클론으로부터 항체를 정제하였다. 조직 배양 상등액을 포도상 구균 단백질 A-세파로즈 CL-4B(Pharmacia)컬럼상에 통과시킴으로써 항체를 정제하였다. 결합 항체는 0.2M 글리신-HCl(pH

3.0)으로 용출시키고 1M의 트리스(pH 8.0)로 중화시켰다. 완충액은 PD 10 컬럼(Pharmacia)상에 통과시킴으로써 PBS로 교환하였다.

[인체화된 항체의 특성]

인체화된 M195 항체를 뮤린 및 키메라 항체와 비교하여 특징화하였다. 상기 인체화된 항체는 모두, 키메라 항체(제21도)와 유사한 방식으로 형광세포 측정 분석시 U937세포에 결합되어 있고(제21도), 이로써 그것들이 동일한 CD33 항원을 인식함을 알 수 있다.

인체화된 항체의 친화력은 방사능-요오드화 마우스 M195 항체와의 경쟁을 통해 결정하였다(제24도). 베르조프스키(Berzofsky) 방법(J.A.Berzofsky와 I.J.Berkower Fundamental Immunology(W.E.Paul 편집),Raven 출판(뉴욕 소재),595(1984))에 따라 결합 친화력을 측정하였다. 마우스 M195의 친화력은 공지된 값(Tanimoto등, 상기 인용 문헌 참조)과 거의 비슷했으며 인체화된 M195 항체는 실험오차 범위이내에서 마우스 M195의 친화력과 동일했다. 인체화된 M195는, 인체 작동 세포 및 인체 CD33-형질 발현 세포가 사용되는 경우 항체-의존적 세포의 세포독성을 조정하는데 유용하다. 이것은 정한스 등, Cancer Research 50, 1495(1990)에 공지된 바와 같은 다른 인체화된 항체와 유사하다.

불운하게도, M195와 같은 비-인체 모노클로날 항체의 사용은 인체 치료시, 특히 반복적인 치료법에서 임의의 결점을 보인다.

[실시예 IV]

[CMV 항원에 대한 인체화된 면역글로불린]

시토메가로비루스는 면역절충된 개체, 특히 골수 이식 수용체, 장기 이식 수용체, 및 AIDS 환자의 주요 병원체이다(문헌 [Fields 등,Eds.Virology.2nd ed.,Raven Press,뉴욕,pp.1981-2010 (1990)]을 전반적으로 참조). 골수이식 환자의 약 15%가 CMV 폐염에 걸리며, 그 사망률은 85%이다. (문헌 [Meyers,Rev.Inf.Dis.11(suppl.7),S1691 (1989)] 참조). AIDS 환자의 약 10%는 극심한 CMV 질병에 걸리며; 상당히 높은 이환율과 사망율을 가지는 경우가 많은 선천적인 CMV는 1%의 신생아에게 영향을 준다(전술한 Fields의 문헌 참조).

약물인 간시클로비르는 특정 형태의 CMV 감염, 구체적으로 맥락망막염 및 위장염에 대해 유효하지만, CMV 폐염에 대해서는 매우 효과적이지 못하며, 극심한 독성을 가진다. 혼주된 사람 면역글로불린 제제를 사용하는 방법은 골수 이식 환자에 있어서 CMV의 예방에 대해 몇가지 유리한 효과를 갖는 것으로 밝혀졌으며(전술한 Meyers의 문헌 참조), 고-용량 면역글로불린과 간시클로비르의 혼합제제가 CMV 폐염에 대해 유효한 것으로 보고되었다 (문헌 [Emanuel 등,Trans.Proc.XIX (suppl.7),132 (1987)]참조). 그러나, 시판되는 사람 면역글로불린의 최저 효능, 가변적인 효력 및 많은 비용은 중대한 문제점으로 남아 있다. 따라서, CMV에 대해 유효한 신규 약물에 대한 필요성이 매우 크다. CMV는 비루스중의 헤르페스비루스족 구성원이며, 그 자체로서 대형 이중가닥 DNA 핵, 단백질 캡시드, 및 표면상에 비루스성 당단백질을 가진 외곽 지질 외피를 갖는다. CMV의 외피상에서 최소한 8종의 단백질이 검출되었으며 (Britt 등,J.Virol.62,3309 (1988)), 그밖의 단백질은 CMV의 DNA서열에 근거하여 존재할 것으로 예측된 바 있다(Chee 등,Nature 344,774 (1990)). 쥐의 모노클로날 항체가 2종의 특히 중요한 CMV 당단백질,즉 gB (p130/55 또는 gp55-116으로도 명명됨) 및 gH (p86으로도 명명됨)에 대해 생성되었으며(Rasmussen 등,비루스학 163,308 (1988) 및 상기 인용한 Britt 등의 문헌), 비루스의 감염성을 중화시키는 것으로 밝혀졌다. gH에 대한 다른 3개의 중화 항체는 CMV5, CMV109 및 CMV115로 지정되어 있다. CMV에 대한 사람의 모노클로날 항체도 생성되었다 (Ehrlich로 등,하이브리도마 6,151(1987)).

동물 모델에서, 쥐의 모노클로날 항체는 헤르페스비루스족의 구성원을 비롯한 각종 비루스에 의해 유발되는 감염을 치료하는데 유효한 것으로 밝혀졌다. 이에 대한 참조문헌의 예는 [Metcalf 등,Intervirol.29,39 (1988)]이다.

따라서, 이러한 항체는 CMV 감염의 치료에 유용할 수 있다. 불행히도, CMV5 및 CMV115와 같은 사람이외의 모노클로날 항체를 사용하는 방법은 사람을 치료하는데 있어서, 특히 후술되는 바와 같은 반복된 치료 섭생에 있어서 다소 단점을 갖는다.

그러므로, 사람에 있어서 면역원성이 거의 없는 CMV 항원에 대해 특이적이되, 치료 제제 및 그밖의 용도에 적합한 방식으로 용이하고 경제적으로 제조되는, 개선된 형태의 인체화된 면역글로불린이 필요하다. 본 발명은 이와 같은 필요성 및 그밖의 필요요건을 만족시킨다.

본 발명에 의해, CMV 및 CMV-감염 세포와 특이적으로 반응하는 인체화된 면역글로불린이 제공된다. 이러한 면역글로불린은 적어도 약 $10^{7}M^{-1}$, 바람직하게는 $10^{8}M^{-1}$ 내지 $10^{10}M^{-1}$ 또는 그 이상의 CMV 특이적 항원에 대한 결합 친화도를 가지며, 예를 들면 세포의 CMV 감염을 차단할 수 있다. 인체화된 면역글로불린은 사람의 프레임워크를 가질 것이며, 면역글로불린, 통상적으로 마우스 면역글로불린, 구체적으로 CMV 항원과의 반응성이 있는 면역글로불린으로부터 유래한 하나 이상의 보체 결정 영역(CDR)을 가질 것이다. 바람직한 구체예에 있어서 하나이상의 CDR이 CMV5 또는 CMV109 또는 CMV115 항체로부터 유래할 것이다. 본 발명의 면역글로불린은 경제적으로 대량 생산될 수 있으며, 예를 들면, 각종 기법에 의해 환자(사람)에서의 CMV-매개된 질병을 치료하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 일면은, 모노클로날 항체 CMV5 또는 CMV115와 같은, CMV항원의 소정의 에피토프에 결합할 수 있는 면역글로불린으로부터 유래한 중쇄 및/ 또는 경쇄 CDR을 암호하는 재조합 DNA 분절에 관한 것이다. 상기 영역들을 암호하는 DNA 분절은 통상적으로 적절한 사람 프레임워크 영역을 암호하는 DNA 분절에 결합될 것이다. 폴리펩티드 연쇄에 대한 형질발현 코드상에 모노클로날 항체 CMV5의 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하는 DNA 서열에 예에는 제25도에 제시된 것들이 포함된다. 코돈 축퇴성 및 비-임계적 아미노산 치환에 기인하여, 이하에 상세히 설명되는 바와 같이, 그밖의 DNA 서열들이 이들 서열을 쉽게 대체할 수 있다.

주요 항체 구조 부분만을 포함하는 폴리펩티드 단편이 제조될 수도 있으며, 이때 분절은 1종이상의 면역글로불린 합성(예:보체 고정 활성)을 소유한다. 이러한 폴리펩티드 단편은 당해 기술분야에 공지된 방법

으로 본래의 항체를 단백질 분해하거나, 또는 부위-지시성 돌연변이를 사용하여 벡터 pVk 및 pVgl-dhfr 내의 소정의 위치에(제26도), 예를 들면 Fab 단편을 제조하기 위해서는 CH1뒤에, 또는 $(Fab')_2$ 단편을 제조하기 위해서는 힌지 영역뒤에 스톱 코돈을 삽입함으로써 제조될 수 있다. 단일 연쇄 항체는 VL 및 VH를 DNA 링커와 결합시켜 제조할 수 있다(전술한 Huston 등의 문헌과 상기 Bird등의 문헌 참조).

본 발명의 항체들은 CMV-관련 질병을 치료하는데 있어서 개별적으로 유용할 것이다. 예를 들면, 치료하기에 적합하기에 적합한 통상적인 질병에는 CMV 폐염, 신생아의 CMV 감염, CMV 단핵증 및 CMV-관련 맥락망막염 및 위장염이 포함된다. 본 발명의 어떤 인체화된 면역글로불린도 다른 인체화된 항체, 구체적으로 상이한 CMV 항원과의 반응성이 있는 인체화된 항체와 배합시켜 사용할 수 있다.

예를 들면, 인체화된 면역글로불린의 혼합제가 반응하기에 적합한 항원에는 gB 및 gH 단백질이 포함된다. 또한 본 발명의 항체는 화학요법제와 함께 제공된 별도 투여용 조성물로서 사용될 수도 있다.
통상적으로, 상기 화학요법제에는 아시클로비르 또는 간시클로비르가 포함될 수 있으나, 당해 기술분야에 CMV 치료제로서 공지된 다수의 다른 화학요법제를 사용할 수도 있다. 본 발명의 바람직한 약학 조성물은 CMV-감염 세포를 사멸시키기 위해 면역독소로 본 발명의 면역글로불린을 사용한다.

본 발명의 CMV 특이적인 인체화된 항체는 생체외에서 광범위하게 이용될 수 있다. 예를 들면, 항체는 특이적인 CMV-감염 세포를 분리시키기 위해서, CMV 항원등을 검출하는데 사용될 수 있다.

특히, 본 발명에서 인체화된 CMV5를 생성시키기 위해 사용한 바와 동일한 방법을 사용하여, 인체화된 CMV109, CMV115 또는 기타 항-CMV 항체를 생성시킬 수 있다.

[실험예]

[중쇄 및 경쇄 cDNA의 클로닝]

중쇄 및 경쇄 가변부 유전자에 대한 cDNA를, 불변부로 하이브리드되고 HindIII 부위를 함유한 3' 프라이머, 및 dG 꼬리로 하이브리드되고 EcoR I 부위를 함유한 5' 프라이머(제6도에 도시한 도표 참조)를 이용하는 고착된 폴리머라제 연쇄 반응(E.Y.Loh등,Science 243, 217(1989))을 사용하여 클로닝하였다.

PCR 증폭된 단편을 EcoR I 및 HindIII으로 분해하고 서열분석을 위해 pUC18 벡터로 클로닝하였다. CMV 5에 대해, 2개의 감마-2a 특이적 클론 및 2개의 캅파 특이적 클론을 서열분석하였다. 상기 2개의 감마-2a 클론과 2개의 캅파클론은 각각 서열면에서 동일하다. cDNA 가변부 서열 및 연역된 아미노산 서열을 제25a도 및 25b도에 도시하였다. 마찬가지로, 당분야에 공지된 기법을 사용하여 CMV109 및 CMV115 항체에 대한 cDNA를 얻고 그 서열을 결정하였다.

[키메라 항체의 작제 및 형질발현]

키메라 항체 유전자의 작제 및 형질발현을 위해 2개의 플라스미드 벡터를 제조했다. 플라스미드 pVgl-dhfr (제26a도)은 선별을 위해 사람의 시토메가로비루스 IE1 촉진제와 증강제(M.Boshart 등,Cell 41,521(1985)), 선행되는 인트론 부분을 포함한 사람의 게놈 $C_{\gamma}1$ 분절, 및 디히드로폴레이트 리덕타제(dhfr) 유전자(Simonsen 등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80,2495 (1983))를 함유한다.

플라스미드 pVk (제26b도)는 pVgl-dhfr과 유사하지만, 사람의 게놈 C_K분절과 gpt 유전자를 함유한다. CMV5 중쇄 및 경쇄 가변부의 유도체를 cDNA로부터 폴리머라제 연쇄 반응을 통해 제조했다. 5' 프라이머는 ATG 코돈에서 시작하는 V 영역으로 하이브리드되고 Xbal 부위를 함유하였으며; 3' 프라이머는 J 영역의 최종 15개 누클레오티드로 하이브리드되고 접목 공급자 신호 및 Xbal 부위를 함유하였다(Queen 등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029 (1989) 참조). 변형된 V 영역을 시토메가로비루스 촉진제와 불변부의 부분 인트론 사이에서 각각의 플라스미드 벡터의 Xbal 부위로 클로닝하였다.

키메라 항체의 형질발현을 위해, 중쇄 및 캅파 연쇄 플라스미드를 전기영동법에 의해 Sp2/0 마우스 골수세포로 형질감염시키고, gpt 형질발현에 대해 세포를 선별하였다. 최대량의 완전한 항체를 분비하는 클론을 ELISA에 의해 검출하였다. 정제된 키메라 CMV5 항체는, CMV-감염된 태아의 폐 섬유아세포의 면역염색을 통해, gH 항원을 형질발현하는 CMV-감염 세포에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[인체화된 항체의 컴퓨터 모델링]

인체화된 항체에서 고도의 결합 친화도를 보유하기 위해서, Queen 등의 일반적인 절차를 수행했다(Queen 등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029(1989) 및 WO 90/07861 참조). 사람의 항체는 원래의 쥐의 항체와의 상동성이 클수록 사람의 프레임워크를 가진 쥐의 CDR과 결합하여 친화도를 감소시킬 수 있는 CDR로의 비틀림을 유도하는 가능성이 더욱 적을 것이다. 통상적으로 동일한 사람의 항체로부터 유래한 중쇄와 경쇄는 두 연쇄의 조립에 있어서의 부적합 가능성을 감소시키기 위해, 프레임워크 서열을 제공하도록 선택된다. NBRF 단백질 서열 데이타베이스에 대한 서열 상동성에 근거하여 (마이크로제니 서열 분석 소프트웨어(베크만)을 사용하여 수행함), 항체 Wol은 CMV5의 인체화에 대한 프레임 워크 서열을 제공하도록 선택되었다.

컴퓨터 프로그램 ENCAD (M.Levitt,J.Mol.Biol.168,595 (1983))를 사용하여 CMV5 가변부의 모델을 작제하였다. 그 모델을 사용하여 CDR에 충분히 근접하여 이들과 잠재적으로 상호작용하는 (이하의 카테고리 4) CMV5 프레임워크내의 아미노산을 결정하였다. 인체화된 경쇄 및 중쇄 CMV5 가변부를 구성하기 위해서, 각각의 위치에서 아미노산은, 그 위치가 하기의 5개 카테고리중 하나 이상에 포함되지 않는 한, Wol 항체내에서의 아미노산과 동일하도록 선택되었다 :

(1) CDR 범위내에 포함되는 위치,

(2) 그 위치에서 사람의 항체에 대해 Wol 아미노산은 특이적인 반면에, 그 위치에서 사람의 항체에 대해 CMV5 아미노산은 일반적인 위치,

(3) CDR에 직접 근접한 위치,

(4) 아미노산이 항원 결합 영역(CDR)에 물리적으로 근접될 수 있는, 상기 제안된 바와 같은 모델.

상기 카테고리(2)에서, "특이적인" 이라는 용어는 Wol 경쇄 및 중쇄와 동일한 아군(상기 인용한 Kabat 등의 문헌에서 정의된 바와 같음)내에서 사람의 서열중에 약 20% 이하로 존재하는 아미노산을 포함하고, "알반적인"이라는 용어는 상기 아군내에서 사람의 서열중에 약 25%이상, 일반적으로는 50% 이상 존재하는 아미노산을 포함하는 것으로 해석된다. 상기 카테고리들에 포함되는 위치에 대하여, 마우스 CMV5 항체로부터 유래한 아미노산을 사용했다. 또한, Wol 아미노산이 사람의 항체에 대해 매우 특이적이고, CMV 아미노산은 상이하지만 마찬가지로 특이적인 위치일 경우, 그 위치는 제5의 카테고리에 존재한다. 이 경우에는 그 위치에서 사람의 항체에 대해 일반적인 아미노산을 사용할 수 있다.

전술한 각각의 카테고리내의 아미노산은 하기 표 9에 제시되어 있다. 일부의 아미노산은 하나이상의 카테고리내에 존재할 수 있다. 인체화된 CMV5 경쇄 및 중쇄 가변부의 최종 서열은 Wol 서열과 비교하여 제27a-b도에 도시하였다.

[표 9]

카테고리	경쇄	중쇄
1	24-34, 50-56, 89-97	31-35, 50-66, 99-108
2		69,80
3	49	30
4		24, 27, 28, 30, 97
5		5

인체화된 항체에 대한 유전자를 작제하기 위해서, 일반적으로 마우스 서열에서 발견되는 코돈을 이용하여, 마우스 CMV5 연쇄(제25도)에서와 동일한 신호 펩티드를 포함하는, 인체화된 중쇄 및 경쇄의 단백질 서열을 암호하는 누클레오티드 서열을 선별했다. 몇가지 축퇴된 코돈을 변화시켜 제한 부위를 만들거나 불필요한 부위를 제거했다. 또한 누클레오티드 서열은 키메라 유전자에 사용된 동일한 접목 공급자 신호 및 각 단부에 Xbal 부위를 포함하였다. 각각의 유전자를 4종의 중첩하는 합성 올리고누클레오티드로부터 작제했다. 각각의 가변부 유전자에 대하여, 교대하는 균주상의 2쌍의 중첩하는 올리고누클레오티드를 합성하였으며, 상기 올리고누클레오티드는 전체의 암호 서열 뿐만 아니라 신호 펩티드 및 첨접 공급자 신호(제28도)도 포함한다. 올리고누클레오티드는 어플라이드 바이오시스템즈 380B DNA 합성기상에서 합성하였다. 각각의 올리고누클레오티드는 약 110-140 염기길이이며, 15개의 염기가 중첩되었다. 이중가닥 DNA 단편은 클레노우(Klenow)폴리머라제를 사용하여, 제한 효소로 분해하고 pUC18 벡터에 연결하고 서열분석한 각 쌍의 올리고누클레오티드로부터 합성하였다. 이어서 각각 정확한 절반의 서열을 가지는 단편을 pVgl-dhfr 또는 pVk 형질발현 벡터내로 적절한 방향에서 연결시켜 완전한 중쇄 및 경쇄 유전자를 생성시켰다. 당해기술분야에 공지된 조건하에(상기 인용한 Maniatis 등의 문헌) 반응을 수행하였다.

중쇄 및 경쇄 플라스미드를 전기영동법에 의해 Sp2/0 마우스 골수 세포로 형질감염시키고, 세포를 gpt 형질발현에 대해 선별하였다. 클론을 ELISA를 통해 배양 상청액중에서의 사람의 항체 생성을 분석함으로써 검색하고, 최적-생성 클론으로부터 항체를 정제했다. 항체는 스타필로코커스의 단백질 A-세파로오즈 CL-4B(파마시아) 컬럼상에 조직 배양 상청액을 통과시킴으로써 정제했다. 결합된 항체는 0.2M 글리신-HCl (pH 3.0)을 사용하여 용출시켰고, 1M Tris(pH 8.0)을 사용하여 중성화시켰다. PD10 컬럼(파마시아)상에 통과시킴으로서 완충액을 PBS로 교환시켰다.

또한 인체화된 항체를 일시적 형질감염에 의해 제조하였다. 중쇄 및 경쇄 플라스미드를 DEAE-덱스트란 기법(Queen 등,Mol.Cell.Biol.4,1043(1984))에 의해 S194 세포(ATCC TIB 19)로 형질감염시키고, 전술한 바와 같이 배지 상청액으로부터 인체화된 CMV5 항체를 정제했다. 항체를 사람의 Ig에 대한 ELISA 분석을 통해 정량분석하였다.

[인체화된 항체의 성질]

인체화된 CMV5 항체를 쥐 및 키메라 항체와 비교하여 특성규명하였다. 인체화된 CMV5 항체는, CMV-감여된 태아의 폐(HEL) 세포 (ATCC CCL 137)의 면역염색에 의해, CMV 항원에 대한 마우스 및 키메라 항체 주위에도 결합하는 것으로 밝혀졌다. 96-웰 평판에서 HEL 세포를 0.01 pfu/세포의 비율하에, 4일동안 배양하여 37℃에서 건조시키고 4℃에서 포장하여 보관한 CMV로 감염시켰다. 100μl의 블로토(blotto) (pH 7.4의 PBS중의 카네이션 인스턴트 밀크)를 각각의 웰에 첨가하고 30분동안 배양하였다. 블로토를 흘러 넘치게하고 마우스, 키메라 및 인체화된 CMV5 항체의 일련의 2-배 희석액 75μl를 웰에 첨가했다. 평판을 1시간동안 37℃에서 배양하고 블로토로 2회 세척했다(각 세척액을 10분동안 방치함). 이어서 희석된 퍼옥시다제(HRP) 결합된 염소의 항-마우스 또는 항-인체 IgG (타고, Tago) 75μl를 각각의 웰에 첨가하고 1시간동안 37℃에서 항온처리하였다. 평판을 PBS로 2회 세척하고 150μl의 HRP 기질 용액을 각 웰에 첨가했다. 실온에서 발색되도록 하였다. 평판을 물로 세척하고 공기중에서 건조시켰다. 웰을 현미경으로 조사하여 CMV-감염 세포상에서 착색 침전을 형성한 항체의 최고 희석율을 측정하였다. 세 종류의 모든 항체에 대해, 검출가능한 침전을 생성시키는 항체의 최저량은 63ng/ml 이었으며, 이는 인체화된 CMV5가 마우스 및 키메라 항체 주위에도 결합함을 시사한다.

마우스 및 인체화된 CMV5의 친화도를 다른 방식으로 비교하기 위해서, 경쟁 실험을 수행했다. 전술한 바와 같은 CMV-감염 HEL 세포의 평판을 37℃에서 30분동안 블로토와 함께 배양하였다. 블로토를 흘러 넘치게하고 마우스 또는 인체화된 CMV5 희석액을 75μl의 PBS중에서 각각의 웰에 첨가했다. 이어서 28,000cpm을 함유한, PBS중의 방사능-요오드화된 마우스 CMV 5 (1μCi/㎍) 125μl를 각각의 웰에 첨가하고 37℃에서 2.5시간동안 배양하였다. 평판을 BPS로 5회 세척하고, 각 웰의 내용물을 2% SDS 200μl로 용해시키고

방사능을 계수하였다. 마우스 및 인체화된 CMV5 농도의 증가는 동등하게 웰 주위에 방사능표지화된 CMV5가 결합하는 것을 억제하므로 (제29도), 인체화된 CMV5는 마우스 CMV5와 거의 동일한 결합 친화도를 가진다. 무관계한 항체는 전술한 바와 같은 분석시 경쟁하지 않는다.

인체화된 CMV5가 CMV를 중화시키는 능력을 마우스 CMV5의 그것과 비교했다. 마우스 및 인체화된 CMV5를 96-웰 평판의 웰에서 100μl의 DEM 매질 + 2% FCS로 연속적으로 2-배 희석하였다. 100단위의 조직 배양액 감염 용량 -50% (TCID50)를 함유하도록 희석된, 100μl의 CMV를 각 웰에 첨가하고 37℃에서 60분동안 배양하였다. 항체-비루스 혼합물을 함유한 각각의 웰을 매질이 제거된 96-웰 평판내의 하위융합성 HEL 세포의 웰에 첨가했다. 세포를 5일동안 배양하고 현미경으로 각 웰에서의 세포병리학적 효과(CPE)를 조사했다. CPE를 90%까지 억제하는 항체의 최고 희석율은 항체의 중화 능력의 척도이다. 인체화된 CMV5 항체는 마우스 CMV5 항체와 거의 대등하게 CMV 항체를 중화시킬 것이다.

[실시예 V]

포유류에 있어서, 면역 반응은 이종 물질, 즉, 항원과 특이적으로 상호작용 하는 몇가지 유형의 세포에 의해 매개된다. 이러한 세포 유형중 하나인 B세포는 항체 생성의 원인이 된다. 또 다른 유형의 세포인 T 세포는 비루스 감염된 세포를 파괴하거나 B 세포 및, T 세포를 비롯한 기타 조혈 세포의 생체내 기능을 조절하는 각종의 세포 하위집단을 포함한다. 제3의 유형의 세포는 대식세포로서, 이는 T 세포에 대한 주요 조직적합성 복합체(MHC) 단백질과 결합하여 항원을 작성하고 제공한다. 이러한 유형의 세포들간의 교통은 인터류킨 1-6 및 γ-IFN과 같은 림포킨에 의해 복잡한 방식으로 매개된다(Paul,W.E.,ed.,기초 면역학,제2판,Raven Press,뉴욕 (1989) 참조).

중요한 림포킨중 하나인 γ-IFN은 일부의 T 세포에 의해 분비된다. 항-비루스 활성외에도, γ-IFN은 천연 킬러 (NK) 세포를 촉진시키고, 대식세포를 활성화시키며, MHC 분자의 세포 표면상의 형질발현을 촉진시킨다(상기 인용한 Paul 의 문헌 pp. 622-624). 그러므로 γ-IFN은 일반적으로 면역 기능의 많은 양상을 증강시키도록 도모하며, 이와 같은 면역기능의 증강이 요구되는 경우에, 예를 들면 암 치료시에 치료 약물로서의 이론적인 가능성이 있다. 반대로, 면역 시스템이 과다-활성화된 질병 상태에서, 예를 들면, 자기면역 장애 및 장기 이식 거부에 있어서, γ-IFN의 길항제를 사용하여 γ-IFN의 촉진 효과를 중화시킴으로써 질병을 치료할 수 있다.

γ-IFN의 유효한 길항제의 한가지 부류는 γ-IFN에 결합하여 이를 중화시키는 모노클로날 항체이다(참조예:Van der Meide 등,J.Gen.Virol,67,1059(1986)). 생체외 및 생체내 마우스 이식 모델에서, 항-γ-IFN 항체는 거부현상을 지연시키거나 방지하는 것으로 밝혀졌다(Landolfo 등,Science 229,176(1985) 및 Rosenberg 등,J.Immunol.144,4648 (1990)). 전신성 낭창 홍반증(SLE)와 같은 증후군이 진전되는 경향이 있는 마우스의 치료는 질병의 개시를 상당히 지연시킨다(Jacob 등,J.Exp.Med.166,798 (1987)). 일부 조건하에서, 항-γ-IFN 항체는 래트에서 부수적인 관절염을 경감시키며(Jacob 등,J.Immunol.142,1500 (1989), 이는 항-γ-IFN이 환자(사람)에 있어서 때때로 류머토이드 관절염에 대해 유효할 수 있음을 제시한다. 환자의 다발성경화증(MS)는 γ-IFN을 사용한 치료에 의해 악화되므로 (Panitch 등, 신경학 36(suppl.1),285 (1986)),항-γ-IFN 항체는 MS를 경감시킬 수 있다. 따라서, 항-γ-IFN 항체는 이들 질병 및 그밖의 자기면역 장애를 치료하는데 유효할 수 있다. 환자(사람)의 치료를 위해, 사람의 γ-IFN에 결합하여 이를 중화시키는 쥐의 모노클로날 항체를 사용할 수 있다(Yamamoto 등,Microbiol.Immunol.32,339 (1988)참조). 사람의 γ-IFN을 중화시키며, γ-IFN가 그것의 세포 수용체에 결합하는 것을 억제하는, AF2로 지정된 또 다른 쥐의 모노클로날 항체도 여기에 개시되어 있다.

불행히도, AF2와 같은 비-인체 모노클로날 항체를 사용하는 방법은 사람을 치료하는데 있어서, 특히 반복되는 치료 섭생에 있어서, 몇가지 단점을 갖는다.

본 발명에 의해, γ-IFN 에피토프와 특이적으로 반응하는 인체화된 면역글로불린이 제공된다. 이러한 면역글로불린은 적어도 약 $10^{7}M^{-1}$, 바람직하게는 $10^{8}M^{-1}$ 내지 $10^{10}M^{-1}$ 또는 그 이상의 γ-IFN에 대한 결합 친화도를 가지며, 예를 들면, 사람의 γ-IFN을 중화시킬 수 있다. 인체화된 면역글로불린은 사람의 프레임워크를 가질 것이며, 면역글로불린, 통상적으로 마우스 면역글로불린, 구체적으로 γ-IFN과의 반응성이 있는 면역글로불린으로부터 유래한 보체 결정 영역(CDR)을 가질 것이다. 바람직한 구체예에 있어서, 하나이상의 CDR은 AF2 항체로부터 유래할 것이다. 따라서, 본 발명의 면역글로불린은 경제적으로 대량 생산될 수 있으며, 예를 들면 각종 기법에 의해 환자(사람)에서의 자기면역 장애를 치료하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 일면은, 모노클로날 항체 AF2와 같은 소정의 γ-IFN 에피토프에 결합할 수 있는 면역글로불린으로부터 유래한 중쇄 및/또는 경쇄 CDR을 암호하는 재조합 DNA 분절에 관한 것이다. 상기 영역을 암호하는 DNA 분절은 통상적으로 적절한 사람 프레임워크 영역을 암호하는 DNA 분절에 결합될 것이다. 폴리펩티드 연쇄에 대한 형질발현 코드상에 모노클로날 항체 AF2의 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하는 DNA 서열의 예에는 제30도에 도시된 것들이 포함된다. 코돈 축퇴성 및 비-임계적 아미노산 치환에 기인하여, 이하에 상세히 설명되는 바와 같이, 그밖의 DNA 서열들이 이들 DNA 서열을 쉽게 대체할 수 있다.

또한 주요 항체 구조 부분만을 포함하는 폴리펩티드 단편이 제조될 수도 있으며, 이들 단편은 1종이상의 면역글로불린 활성 (예:보체 고정 활성)을 소유한다. 이러한 폴리펩티드 단편은 당분야에 공지된 방법으로 본래의 항체를 단백질 분해하거나, 또는 부위-지시성 돌연변이를 사용하여 벡터 pVk 및 pVgl-dhfr내의 소정의 위치에(제31도), 예를 들면 Fab 단편을 제조하기 위해서는 CH1 뒤에, 또는 $(Fab')_2$ 단편을 제조하기 위해서는 힌지 영역뒤에, 스톱 코돈을 삽입함으로써 제조될 수 있다. 단일 연쇄 항체는 VL 및 VH를 DNA 링커와 결합하여 제조할 수 있다(전술한 Huston 등의 문헌과 상기 Bird 등의 문헌 참조).

본 발명의 항체들은 자기면역 증상을 치료하는데 있어서 개별적으로 사용될 수 있다. 예를 들면, 치료하기에 적합한 통상적인 질병에는 장기 이식, 예를 들면 심장, 폐, 신장, 간등의 이식 수술은 받은 환자에 있어서의 조직이식 대비 숙주 질병과 이식 거부증이 포함된다. 그밖의 질명에는 타입 I 당뇨병과 같은 자기면역 장애, 다발성 경화증, 류머토이드 관절염, 전신성 낭창 홍반증 및 위마비성 중증성근 무력증이 포함된다.

본 발명의 인체화된 면역글로불린은 다른 항체, 구체적으로 다른 림포킨 또는 림포킨 수용체와 함께 사용될 수 있다. 예를 들면, 인체화된 면역글로불린의 혼합제가 반응하기에 적합한 항원에는 인터류킨 1-10 및 IL-2 수용체의 p55와 p75 연쇄가 포함된다 (Waldmann,Annu.Rev.Biochem.58,875 (1989) 및 Queen 등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029 (1989) 참조). 그밖의 항원에는 예를 들면 소위 "분화 집락(Clusters of Differentiation)"과 같은 질병의 원인이 되는 세포상의 항체가 포함된다(A.J. McMichael 편집, 류코사이트 타이핑 III, 옥스포드 유니버시티 프레스 (1987)).

또한 본 발명의 항체는 화학요법제와 함께 제공된 별도 투여용 조성물로서 사용될 수도 있다. 통상적으로, 상기 화학 요법제에는 비스테로이드계 항-염증제(예:아스피린,이부프로펜), 스테로이드(예:프레드니손) 및 면역억제제(예:사이클로스포린 A,사이톡산)이 포함되지만, 당분야에 공지된 다수의 다른 요법제를 사용할 수도 있다. 본 발명의 바람직한 조성물은, 예를 들면 γ-IFN -분비 세포를 사멸시키기 위한 면역독소로 본 발명의 면역글로불린을 사용하는 것을 포함한다. 본 발명의 인체화된 항체는 생체외에서 광범위하게 사용될 수 있다. 예를 들면, 항체는 γ-IFN 항원등을 검출하는데 이용될 수 있다.

[실험예]

[중쇄 및 경쇄 cDNA의 클로닝]

중쇄 및 경쇄 가변부 유전자에 대한 cDNA를, 불변부로 하이브리드되고 HindIII 부위를 함유한 3' 프라이머, 및 dG 꼬리로 하이브리드되고 EcoR I 부위를 함유한 5' 프라이머 (제6도에 도시한 도표 참조)를 이용하는 고착 폴리머라제 연쇄 반응(E.Y. Loh등, Science 243, 217 (1989))을 사용하여 클로닝하였다.

PCR 증폭된 단편을 EcoR I 및 HindIII으로 분해하고 서열분석을 위해 pUC18벡터로 클로닝하였다. AF2에 대해, 2개의 감마-2b 특이적 클론 및 2개의 캅파 특이적 클론을 서열분석하였다. 상기 2개의 감마-2b 클론과 2개의 캅파 클론은 각각 서열면에서 동일하다. cDNA 가변부 서열 및 연역된 아미노산 서열을 제30도에 도시하였다.

[키메라 항체의 작제 및 형질발현]

키메라 항체 유전자의 작제 및 형질발현을 위해 2개의 플라스미드 벡터를 제조했다. 플라스미드 pVgl-dhfr(제31a도)은 선별을 위해 사람의 시토메가로비루스 IE1 촉진제와 증강제(M.Boshart 등,Cell 41,521(1985)), 선행되는 인트론 부분을 포함한 사람의 게놈 Cγ1 분절, 및 디히드로폴레이트 리덕타제(dhfr)유전자(Simonsen 등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80,2495 (1983))를 함유한다. 플라스미드 pVk(제31b도)는 pVgl-dhfr과 유사하지만, 사람의 게놈 C_k분절과 gpt 유전자를 함유한다. AF2중쇄 및 경쇄 가변부의 유도체를 cDNA로부터 폴리머라제 연쇄 반응을 통해 제조했다. 5' 프라이머는 ATG 코돈에서 시작하는 V 영역으로 하이브리드되고 Xbal 부위를 함유하였으며; 3' 프라이머는 J 영역의 최종 15개 누클레오티드로 하이브리드되고 접목 공급자 신호 및 Xbal 부위를 함유하였다(Queen 등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029 (1989) 참조). 변형된 V 영역을 시토메가로비루스 촉진제와 불변부의 부분 인트론 사이에서 각각의 플라스미드 벡터의 Xbal 부위로 클로닝하였다.

키메라 항체의 형질발현을 위해, 중쇄 및 캅파 연쇄 플라스미드를 전기영동법에 의해 Sp2/0 마우스 골수세포로 형질감염시키고, gpt 형질발현에 대해 세포를 선별하였다. 최대량의 완전한 항체를 분비하는 클론을 ELISA에 의해 검출했다. 키메라 AF2 항체는 ELISA 분석결과 γ-IFN에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[인체화된 항체의 컴퓨터 모델링]

인체화된 항체에서 고도의 결합 친화도를 보유하기 위해서, Queen 등의 일반적인 절차를 수행했다(Queen 등,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,10029(1989) 및 WO 90/07861 참조). 사람의 항체는 원래의 쥐의 항체와의 상동성이 클수록 사람의 프레임워크를 가진 쥐의 CDR과 결합하여 친화도를 감소시킬 수 있는 CDR로의 변형을 유도하는 가능성이 더욱 적을 것이다. 통상적으로 동일한 사람의 항체로부터 유래한 중쇄와 경쇄는 두 연쇄의 조립에 있어서의 부적합 가능성을 감소시키기 위해, 프레임워크 서열을 제공하도록 선택된다. NBRF 단백질 서열 데이타베이스에 대한 서을 상동성에 근거하여 (마이크로제니 서열 분석 소프트웨어(베크만)을 사용하여 수행함), 항체 Eu은 AF2의 인체화에 대한 프레임워크 서열을 제공하도록 선택되었다.

컴퓨터 프로그램 ENCAD(M.Levitt.J.Mol.Biol.168,595 (1983))를 사용하여 AF2 가변부의 모델을 작제하였다. 그 모델을 사용하여 CDR에 충분히 근접하여 이들과 잠재적으로 상호작용하는 (이하의 카테고리 4) AF2 프레임워크내의 아미노산을 결정하였다. 인체화된 경쇄 및 중쇄 AF2 가변부를 구성하기 위해서, 각각의 위치에서 아미노산은, 그 위치가 하기의 5개 카테고리중 하나이상에 포함되지 않는 한, Eu 항체내에서의 아미노산과 동일하도록 선택되었다 :

(1) CDR 범위내에 포함되는 위치,

(2) 그 위치에서 사람의 항체에 대해 Eu 아미노산은 특이적인 반면에, 그 위치에서 사람의 항체에 대해 AF2 아미노산은 일반적인 위치,

(3) CDR에 직접 근접한 위치,

(4) 아미노산이 항원 결합 영역(CDR)에 물리적으로 근접될 수 있는, 상기 제안된 바와 같은 모델.

상기 카테고리(2)에서, "특이적인" 이라는 용어는 Eu 경쇄 및 중쇄와 동일한 아군(상기 인용한 Kabat 등의 문헌에서 정의된 바와 같음)내에서 사람의 서열중에 약 20% 이하로 존재하는 아미노산을 포함하고, "일반적인"이라는 용어는 상기 아군내에서 사람의 서열중에 약 25%이상, 일반적으로는 50% 이상 존재하는 아미노산을 포함하는 것으로 해석된다. 상기 카테고리들에 포함되는 위치에 대하여, 마우스 AF2 항체로부터 유래한 아미노산을 사용했다. 또한, Eu 아미노산이 사람의 항체에 대해 매우 특이적이고, AF2 아미노산은 상이하지만 마찬가지로 특이적인 위치일 경우, 그 위치는 제5의 카테고리에 존재한다. 이 경우에는 그 위치에서 사람의 항체에 대해 일반적인 아미노산을 사용할 수 있다.

전술한 각각의 카테고리내의 아미노산은 하기 표 10에 제시되어 있다. 일부의 아미노산은 하나이상의 카

테고리내에 존재할 수 있다. 인체화된 AF2 경쇄 및 중쇄 가변부의 최종 서열은 Eu 서열과 비교하여 제32도에 도시하였다.

[표 10]

카테고리	경쇄	중쇄
1	24-34, 50-56, 89-97	31-35, 50-66, 99-106
2	48	93, 95, 98, 107, 108, 109, 111
3		30, 98, 107
4	48, 70	27, 28, 30, 98, 107
5	63	

인체화된 항체에 대한 유전자를 작제하기 위해서, 일반적으로 마우스 서열에서 발견되는 코돈을 이용하여, 인체화된 중쇄 및 경쇄의 단백질 서열을 암호하는 누클레오티드 서열을 선별했다. 몇가지 축퇴된 코돈을 변화시켜 제한 부위를 만들거나 불필요한 부위를 제거했다. 또한 누클레오티드 서열은 키메라 유전자에 사용된 동일한 접목 공급자 신호 및 가 단부에 Xbal 부위를 포함하였다. 각각의 유전자를 4종의 중첩하는 합성 올리고누클레오티드로부터 작제했다.

각각의 가변부 유전자에 대하여, 교대하는 균주상의 2쌍의 중첩하는 올리고누클레오티드를 합성하였으며, 상기 올리고누클레오티드는 전체의 암호 서열 뿐만 아니라 신호 펩티드 및 접목 공급자 신호(제33도)도 포함한다.

올리고누클레오티드는 어플라이드 바이오시스템즈 3808 DNA 합성기상에서 합성하였다. 각각의 올리고누클레오티드는 약 110-140염기 길이이며, 15개의 염기가 중첩되었다. 이중가닥 DNA 단편은 클레노우(Klenow) 폴리머라제를 사용하여, 제한 효소로 분해하고 pUC18 벡터에 연결 하고 서열분석한 각 쌍의 올리고누클레오티드로부터 합성하였다. 이어서 각각 정확한 절반의 서열을 가지는 단편을 pVgl-dhfr 또는 pVk 형질발현 벡터내로 적절한 방향에서 연결시켜 완전한 중쇄 및 경쇄 유전자를 생성시켰다. 당해기술분야에 공지된 조건하에(상기 인용한 Maniatis 등의 문헌) 반응을 수행하였다.

중쇄 및 경쇄 플라스미드를 전기영동법에 의해 Sp2/0 마우스 골수 세포로 형질감염시키고, 세포를 gpt 형질발현에 대해 선별하였다. 클론을 ELISA를 통해 배양 상청액중에서의 사람의 항체 생성을 분석함으로써 검색하고, 최적-생성 클론으로부터 항체를 정제했다. 항체는 스타필로코커스의 단백질 A-세파로오즈 CL-4B(파마시아)컬럼상에 조직 배양 상청액을 통과시킴으로써 정제했다. 결합된 항체는 0.2M 글리신-HCl(pH 3.0)을 사용하여 용출시켰고, 1M Tris(pH 8.0)을 사용하여 중성화시켰다. PD10 컬럼(파마시아)상에 통과시킴으로서 완충액을 PBS로 교환시켰다.

[인체화된 항체의 성질]

인체화된 AF2 항체를 쥐 및 키메라 항체와 비교하여 특성규명하였다. 인체화된 항체는, ELISA 분석에서 마우스 및 키메라 항체에 결합하는 것과 유사한 방식으로 γ-IFN에 결합할 것이며, 이는 항체가 γ-IFN을 인식함을 보여준다.

마우스 AF2 항체와 인체화된 AF2 항체의 결합 친화도를 비교하기 위해서, 경쟁에 의한 ELISA 분석을 수행했다. ELISA 평판은 PBS중의 γ-IFN 500mg/ml 용액 100μl를 각각의 웰에 첨가하고 밤새 4℃에서 항온 처리함으로써 사람의 재조합 γ-IFN으로 피복하였다. 차후의 단계는 실온에서 수행하였다. γ-IFN 용액을 제거하고 200μl의 ELISA 완충액 (0.1% Tween-20,PBS중의 1% 소 혈청 알부민)을 각 웰에 첨가한후 1시간동안 배양시켰다. 용액을 제거한 후에, 100μl PBS중의 다양한 양의 경쟁 항체(마우스 AF2 또는 인체화된 AF2)를 우수한 ELISA 반응을 제공하도록 예정된 양의 바이오티닐화 AF2와 함께 각웰에 첨가했다. 평판을 1시간동안 항온처리한후 ELISA 완충액으로 세척했다. 과량으로 계산된 양의 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)-결합 스트레파비딘을 100μl PBS중의 용액상태로 각 웰에 첨가하고 30분동안 배양시켰다. 평판을 ELISA 완충액중에서 3회 세척하고 HRP에 대한 100μl의 기질 용액을 각 웰에 첨가했다.

평판을 10-30분 동안 항온처리하고, 각 웰의 광학밀도를 ELISA 판독기(BioRad사 제품)를 사용하여 측정했다. 경쟁 항체 마우스 AF2 및 인체화된 AF2의 농도를 증가시키는데 따른 광학밀도의 감소를 그래프로 도시하였다. 마우스 AF2와 인체화된 AF2는 유사하게 경쟁할 것이며, 이는 이들의 γ-IFN에 대한 결합 친화도가 거의 동일함을 나타낸다. 사용된 절차는 당해기술분야에 공지되어 있다(예:상기 인용한 Harlow 및 Lane의 문헌).

γ-IFN의 중요한 생물학적 활성은 세포상의 군 II HLA 항원의 형질발현을 유도하는 것이다. 이러한 활성을 중화시키는 마우스 및 인체화된 AF2의 능력을 측정하기 위해, 약 5 × 10^4 HS294T 세포 (Basham 등,J.Immunol.130.1492(1983))를 24-웰 평판의 각 웰내에서 1.0ml DMEM 배지 + 10% FCS중에 평판배양했다. 밤새 배양시킨 후에, 0.1nM 인터페론 및 다양한 양의 마우스 또는 인체화된 AF2를 세포에 첨가하고, 평판을 72시간동안 배양시켰다. 0.05M EDTA를 사용하여 평판으로부터 세포를 제거하고, 미합중국 모식균 배양 수집소(ATCC)로부터 입수한 HLA-D 항원에 대한 모노클로날 항체 L243으로 염색하고, 세척하여, FITC-결합된 염소 항-마우스 Ig로 염색한후 FACScan(Becton-Dickinson사 제품)을 사용하여 분석했다. 마우스 AF2 농도의 증가는 세포의 형광성을 감소시키는데, 이는 항체가 γ-IFN에 의한 HLA-D의 유도를 방지함을 시사한다. 이러한 분석에서 인체화된 AF2는 마우스 AF2와 유사하게 작용할 것이며, 이는 인체화된 AF2가 γ-IFN의 생물학적 활성을 중화시킴을 보여준다.

전술한 바로부터, 본 발명의 인체화된 면역글로불린이 다른 γ-IFN 특이적항체에 비해 많은 장점을 제공함을 알 수 있을 것이다. 마우스 모노클로날 항체에 비해, 본 발명의 인체화된 면역글로불린은 더욱 경제

적으로 생산될 수 있으며, 이종 아미노산 서열을 상당히 적게 함유한다. 환자에게 투여한 후의 항원성이 이와 같이 감소됨은 현저한 치료학적 향상을 나타낸다.

본 명세서에 참고인용한 것으로서 구체적으로 별도 제시한 개개의 특허공보 또는 특허출원 명세서인 경우에, 이들 모든 특허공보와 특허출원 명세서는 동등한 정도로 본 명세서에 참고인용하였다. 이상에서는 본 발명을 명확하게 나타내고 본 발명의 이해를 도모하고자 도면과 실시예에 의거하여 본 발명을 상세히 기술하였지만, 본 발명은 첨부된 청구항의 범위내에서 변형 및 수정이 가능할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

경쇄 및 중쇄 가변부가 제4a도(윗쪽 서열) 및 제4b도(윗쪽 서열)에서 보여지는 마우스 M195 항체로부터 유래된 인체화된 면역글로불린으로서, 인체화된 항체가 $10^{7} M^{-1}$ 이상의 결합 친화도를 갖고 사람 CD33 항원에의 결합에 대하여 마우스 항체와 경쟁하는 인체화된 면역글로불린.

청구항 2

제1항에 있어서, 사람 면역글로불린 중쇄의 가변부 프레임워크 및 마우스 M195 항체의 중쇄 가변부의 3개의 상보성 결정 부위(CDR)를 포함하는 인체화된 중쇄 가변부, 및 사람 면역글로불린 경쇄의 가변부 프레임워크 및 마우스 M195 항체의 경쇄 가변부의 3개의 상보성 결정 부위(CDR)를 포함하는 인체화된 경쇄 가변부를 함유하는 인체화된 면역글로불린.

청구항 3

제2항에 있어서, 인체화된 경쇄 가변부는 제4a도(아랫쪽 서열)에서 보여지는 서열을 함유하고, 인체화된 중쇄 가변부는 제4b도(아랫쪽 서열)에서 보여지는 서열을 함유하는 인체화된 면역글로불린.

청구항 4

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서, 순수한 형태인 인체화된 면역글로불린.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인체화된 면역글로불린은 EU 면역글로불린 프레임워크와 거의 상동성인 사람의 프레임워크를 함유하는 인체화된 면역글로불린.

청구항 6

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서, 사람의 표적 세포 및 작동 세포의 존재하에 항체-의존적 세포의 세포독성을 조정할 수 있는 인체화된 면역글로불린.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한 세포 독성제와 결합된 인체화된 면역글로불린.

청구항 8

제1항의 인체화된 면역글로불린 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 골수성 세포-매개 질환을 치료하는데 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 추가로 세포 독성제를 함유하는 약학 조성물.

도면

도면1a

1	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T
1	E	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T
21	I	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	T	S	T	Y	N	Y	M	H	W	Y
21	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	T	S	T	Y	N	Y	M	H	W	Y
41	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	N	L	E	S
41	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	R	L	L	I	K	Y	A	S	N	L	E	S
61	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	N	I	H
61	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S
81	P	V	E	E	E	D	T	V	T	Y	Y	C	Q	H	S	W	E	I	P	Y
81	R	L	E	S	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	H	S	W	E	I	P	Y
101	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K									
101	T	F	G	Q	G	T	R	V	E	I	K									

도면1b

```
1    E M I L V E S G G G L V K P G A S L K L
1    E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L

21   S C A A S G F T F S N Y G L S W V R Q T
21   S C A A S G F T F S N Y G L S W V R Q A

41   S D R R L E W V A S I S R G G G R I Y S
41   P G K G L E W V A S I S R G G G R I Y S

61   P D N L K G R F T I S R E D A K N T L Y
61   P D N L K G R F T I S R N D S K N T L Y

81   L Q M S S L K S E D T A L Y Y C L R E G
81   L Q M N S L Q A E D T A L Y Y C L R E G

101  I Y Y A D Y G F F D V W G T G T T V I V
101  I Y Y A D Y G F F D V W G Q G T L V T V

121  S S
121  S S
```

도면2a

```
1    D I V M T Q S H K F M S T S V G D R V S
1    D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T

21   I T C K A S Q D V G S A V V W H Q Q K S
21   I T C K A S Q D V G S A V V W H Q Q K P

41   G Q S P K L L I Y W A S T R H T G V P D
41   G K A P K L L I Y W A S T R H T G V P S

61   R F T G S G S G T D F T L T I T N V Q S
61   R F T G S G S G T E F T L T I S S L Q P

81   E D L A D Y F C Q Q Y S I F P L T F G A
81   D D F A T Y F C Q Q Y S I F P L T F G Q

101  G T R L E L K
101  G T K V E V K
```

도면2b

```
1    Q V Q L Q Q S D A E L V K P G A S V K I
1    Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V

21   S C K V S G Y T F T D H T I H W M K Q R
21   S C K A S G Y T F T D H T I H W M R Q A

41   P E Q G L E W F G Y I Y P R D G H T R Y
41   P G Q G L E W F G Y I Y P R D G H T R Y

61   S E K F K G K A T L T A D K S A S T A Y
61   A E K F K G K A T I T A D E S T N T A Y

81   M H L N S L T S E D S A V Y F C A R G R
81   M E L S S L R S E D T A V Y F C A R G R

101  D S R E R N G F A Y W G Q G T L V T V S
101  D S R E R N G F A Y W G Q G T L V T V S

121  A
121  S
```

도면3a

```
1    D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T
1    D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T

21   I S C R A S E S V D N Y G I S F M N W F
21   I T C R A S E S V D N Y G I S F M N W F

41   Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S N Q G S
41   Q Q K P G K A P K L L I Y A A S N Q G S

61   G V P A R F S G S G S G T D F S L N I H
61   G V P S R F S G S G S G T D F T L N I S

81   P M E E D D T A M Y F C Q Q S K E V P W
81   S L Q P D D F A T Y Y C Q Q S K E V P W

101  T F G G G T K L E I K
101  T F G Q G T K V E I K
```

도면3b

```
1    E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I
1    Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V

21   S C K A S G Y T F T D Y N M H W V K Q S
21   S C K A S G Y T F T D Y N M H W V R Q A

41   H G K S L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y
41   P G Q G L E W I G Y I Y P Y N G G T G Y

61   N Q K F K S K A T L T V D N S S S T A Y
61   N Q K F K S K A T I T A D E S T N T A Y

81   M D V R S L T S E D S A V Y Y C A R G R
81   M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G R

101  P A M D Y W G Q G T S V T V S S
101  P A M D Y W G Q G T L V T V S S
```

도면4a

```
1    Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T
1    D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T

21   M T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q R P G
21   I T C S G S S S V S F M Y W Y Q Q K P G

41   S S P R L L I Y D T S N L A S G V P V R
41   K A P K L L I Y D T S N L A S G V P S R

61   F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E
61   F S G S G S G T D Y T F T I S S L Q P E

81   D A A T Y Y C Q Q W S T Y P L T F G A G
81   D I A T Y Y C Q Q W S T Y P L T F G Q G

101  T K L E L K
101  T K V E V K
```

도면4b

```
1     Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I
1     E V Q L L E S G G G L V Q P G Q S L R L

21    T C T V S G F S V T S Y G V H W I R Q S
21    S C A A S G F T V T S Y G V H W V R Q A

41    P G K G L E W L G V I W S G G S T D Y N
41    P G K G L E W V G V I W S G G S T D Y N

61    A A F I S R L T I S K D N S K S Q V F F
61    A A F I S R F T I S R D N S K N T L Y L

81    K V N S L Q P A D T A I Y Y C A R A G D
81    Q M N S L Q A E D T A I Y Y C A R A G D

101   Y N Y D G F A Y W G Q G T L V T V S A
101   Y N Y D G F A Y W G Q G T L V T V S S
```

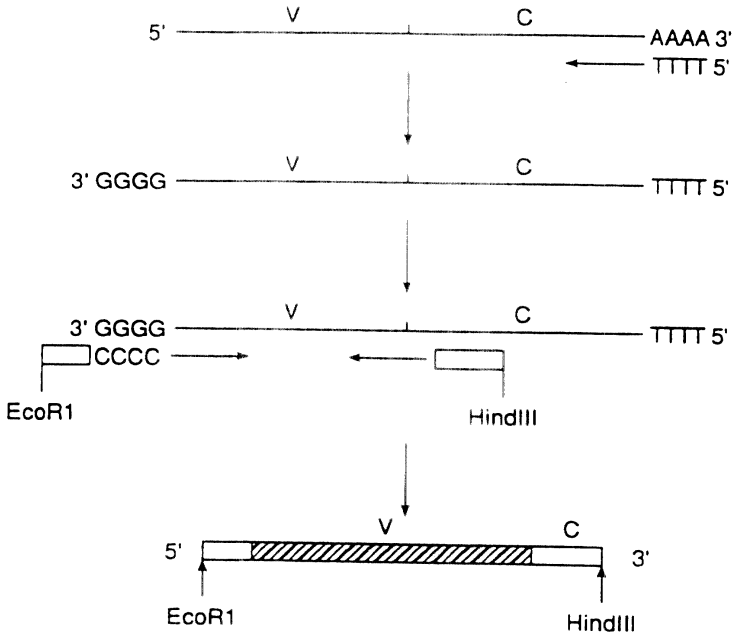
도면5a

```
1     D I V L T Q S P A T L S V T P G D S V S
1     E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T

21    L S C R A S Q S I S N N L H W Y Q Q K S
21    L S C R A S Q S I S N N L H W Y Q Q K P

41    H E S P R L L I K Y A S Q S I S G I P S
41    G Q A P R L L I K Y A S Q S I S G I P D

61    R F S G S G S G T D F T L S V N G V E T
61    R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P

81    E D F G M Y F C Q Q S N S W P H T F G G
81    E D F A V Y Y C Q Q S N S W P H T F G Q

101   G T K L E I K
101   G T K V E I K
```

도면5b

```
1     E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S M K I
1     Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V R V

21    S C K A S V Y S F T G Y T M N W V K Q S
21    S C K A S G Y S F T G Y T M N W V R Q A

41    H G Q N L E W I G L I N P Y N G G T S Y
41    P G K G L E W V G L I N P Y N G G T S Y

61    N Q K F K G K A T L T V D K S S N T A Y
61    N Q K F K G R V T V S L K P S F N Q A Y

81    M E L L S L T S A D S A V Y Y C T R R G
81    M E L S S L F S E D T A V Y Y C T R R G

101   F R D Y S M D Y W G Q G T S V T V S S
101   F R D Y S M D Y W G Q G T L V T V S S
```

도면6



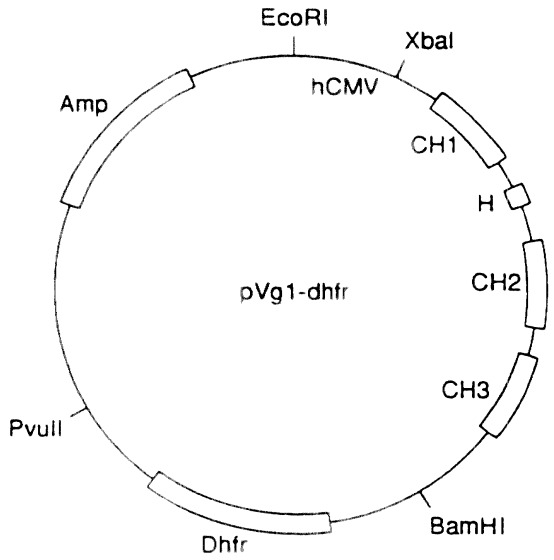
도면7a

```
          .         .        30         .         .        60
ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATACTGTCC
 M  D  F  Q  V  Q  I  F  S  F  L  L  I  S  A  S  V  I  L  S

          .         .        90         .         .       120
AGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCGTCTCCAGGGGCGAAG
 R  G  Q  I  V  L  T  Q  S  P  A  I  M  S  A  S  P  G  E  K

          .         .       150         .         .       180
GTCACCATGACCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTTCATGTACTGGTACCAGCAGAGG
 V  T  M  T  C  S  G  S  S  S  V  S  F  M  Y  W  Y  Q  Q  R

          .         .       210         .         .       240
CCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT
 P  G  S  S  P  R  L  L  I  Y  D  T  S  N  L  A  S  G  V  P

          .         .       270         .         .       300
GTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAG
 V  R  F  S  G  S  G  S  G  T  S  Y  S  L  T  I  S  R  M  E

          .         .       330         .         .       360
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTACTTACCCGCTCACGTTCGGT
 A  E  D  A  A  T  Y  Y  C  Q  Q  W  S  T  Y  P  L  T  F  G

          .         .
GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
 A  G  T  K  L  E  L  K
```

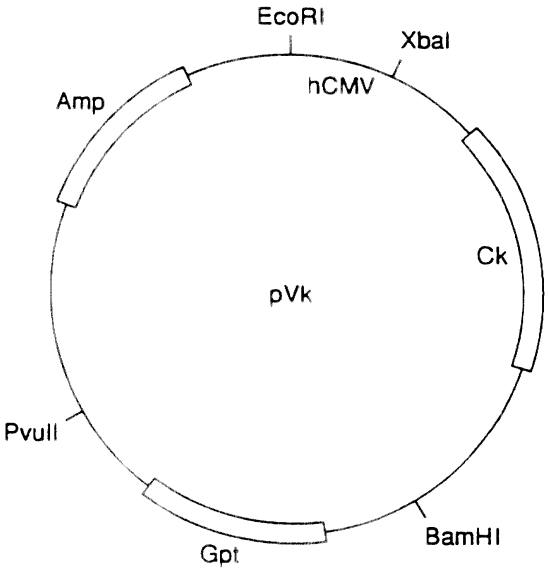
도면7b

```
          .         .        30         .         .        60
ATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCTGCCTGGTGACATTCCCAAGCTGTGTCCTATCCCAG
 M  A  V  L  G  L  L  F  C  L  V  T  F  P  S  C  V  L  S  Q

          .         .        90         .         .       120
GTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACC
 V  Q  L  K  Q  S  G  P  G  L  V  Q  P  S  Q  S  L  S  I  T

          .         .       150         .         .       180
TGCACAGTCTCTGGTTTCTCAGTAACAAGTTATGGTGTACACTGGATTCGCCAGTCTCCA
 C  T  V  S  G  F  S  V  T  S  Y  G  V  H  W  I  R  Q  S  P

          .         .       210         .         .       240
GGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGAAGCACAGACTATAATGCA
 G  K  G  L  E  W  L  G  V  I  W  S  G  G  S  T  D  Y  N  A

          .         .       270         .         .       300
GCTTTCATATCCAGACTGACCATCAGCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAA
 A  F  I  S  R  L  T  I  S  K  D  N  S  K  S  Q  V  F  F  K

          .         .       330         .         .       360
GTGAACAGTCTGCAACCTGCTGACACAGCCATATACTATTGTGCCAGAGCTGGGGACTAT
 V  N  S  L  Q  P  A  D  T  A  I  Y  Y  C  A  R  A  G  D  Y

          .         .       390         .         .
AATTACGACGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCG
 N  Y  D  G  F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  A
```

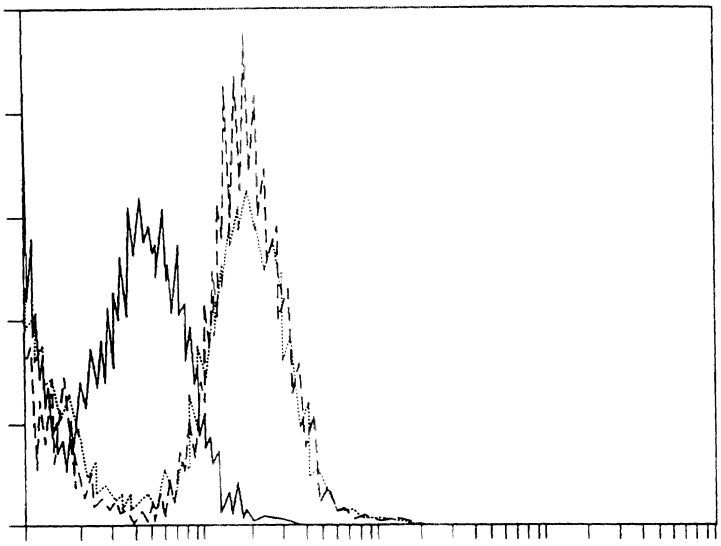
도면8a



도면8b



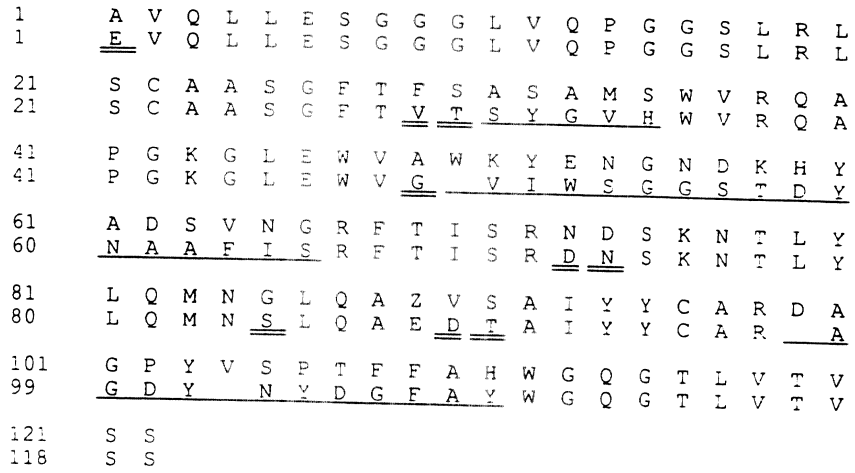
도면9



도면10a

```
1     D I Q M T Q S P S S L S V S V G D R V T
1     D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T

21    I T C Q A S Q N V N A Y L N W Y Q Q K P
21    I T C S G S S S V   S F M Y W Y Q Q K P

41    G L A P K L L I Y G A S T R E A G V P S
40    G K A P K L L I Y D T S N L A S G V P S

61    R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P
60    R F S G S G S G T D Y T F T I S S L Q P

81    E D I A T Y Y C Q Q Y N N W P P T F G Q
80    E D I A T Y Y C Q Q W S T Y P L T F G Q

101   G T K V E V K
100   G T K V E V K
```

도면10b



도면11a

vc13

```
        10          20          30          40          50          60
TTCTGCTGGT ACCAGTACAT GAAACTTACA CTTGAGCTGC CACTGCAGGT GATGGTGACG

        70          80          90         100
CGGTCACCCA CTGAGGCACT GAGGCTAGAT GGAGACTGGG TCATTTG
```

vc14

```
        10          20          30          40          50          60
CATGTACTGG TACCAGCAGA AGCCAGGAAA AGCTCCGAAA CTTCTGATTT ATGACACATC

        70          80          90         100         110         120
CAACCTGGCT TCTGGAGTCC CTTCCCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCGATTACAC

       130
CTTTACAATC TCTTCA
```

vc15

```
        10          20          30          40          50          60
TGTGTCTAGA AAAGTGTACT TACGTTTTAC CTCGACCTTG GTCCCTTGAC CGAACGTGAG

        70          80          90         100         110         120
CGGGTAAGTA CTCCACTGCT GGCAGTAATA AGTGGCTATA TCTTCCGGCT GAAGTGAAGA

       130
GATTGTAAAG GTGTAAT
```

vc16

```
        10          20          30          40          50          60
CACATCTAGA CCACCATGGA TTTTCAAGTG CAGATCTTCA GCTTCCTGCT AATCAGTGCC

        70          80          90         100
TCAGTCATAC TGTCCAGAGG AGATATTCAA ATGACCCAGT CTCCATCT
```

도면11b

vc11

```
        10          20          30          40          50          60
TAGTCTGTCG ACCCACCACT CCATATCACT CCCACCCACT CGAGTCCCTT TCCAGGAGCC

        70          80          90         100         110         120
TGGCGGACCC AGTGTACACC ATAACTTGTT ACGGTGAAAC CACTGGCGGC ACAAGACAGT

       130
CTCAGAGATC CTCCTGGC
```

vc12

```
        10          20          30          40          50          60
TGGTGGGTCG ACAGACTATA ATGCAGCTTT CATATCCAGA TTTACCATCA GCAGAGACAA

        70          80          90         100         110         120
CAGCAAGAAC ACACTGTATC TCCAAATGAA TAGCCTGCAA GCCGAGGACA CAGCCATATA

TTATTG
```

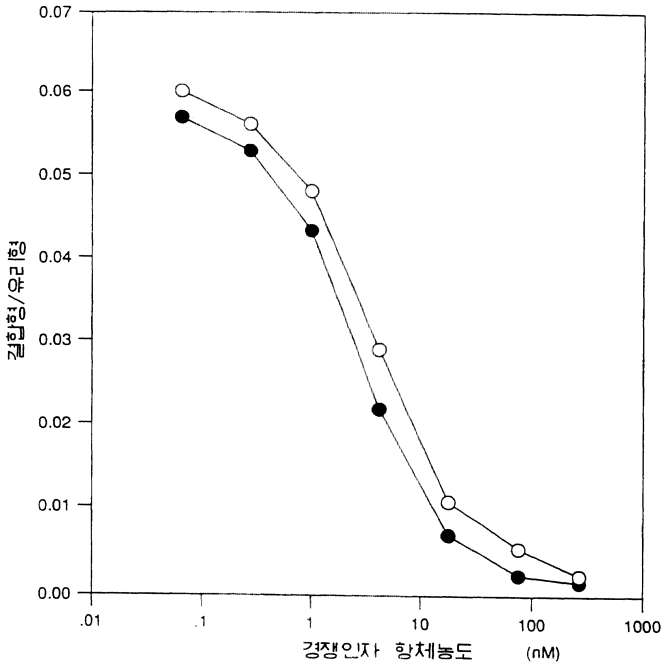
wps54

```
        10          20          30          40          50          60
ACACTCTAGA CCACCATGGC TGTCTTGGGG CTGCTCTTCT GCCTGGTGAC ATTCCCAAGC

        70          80          90         100         110         120
TGTGTCCTAT CCGCTGTCCA GCTGCTAGAG AGTGGTGGCG GTCTGGTGCA GCCAGGAGGA

       130
TCTCTGAGAC
```

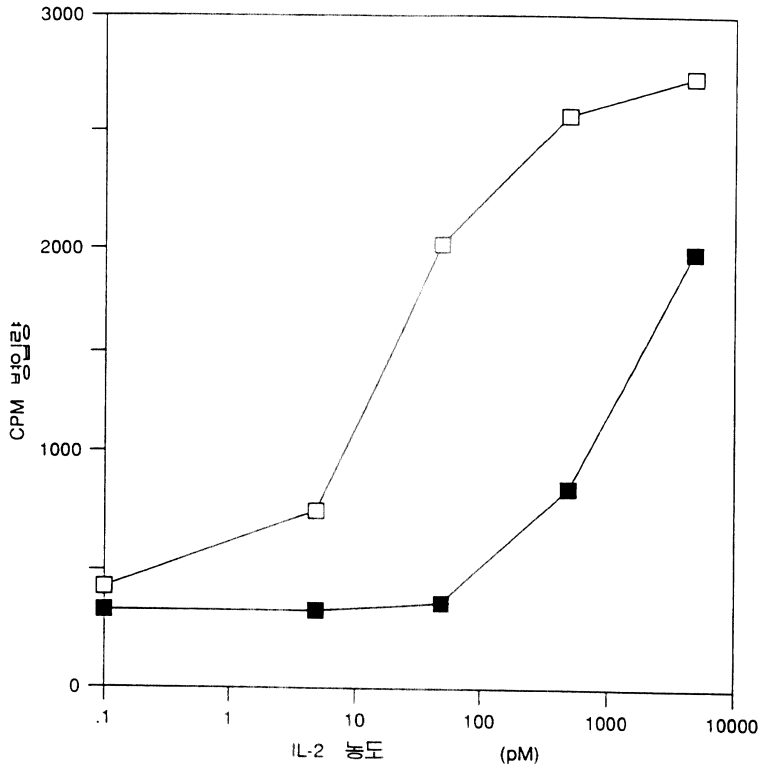
wps57

```
        10          20          30          40          50          60
ACACTCTAGA AGTTAGGACT CACCTGAAGA GACAGTGACC AGAGTCCCTT GGCCCCAGTA

        70          80          90         100         110
AGCAAAACCG TCGTAATTAT AGTCCCCAGC TCTGGCACAA TAATATATGG CTGTGTCC
```

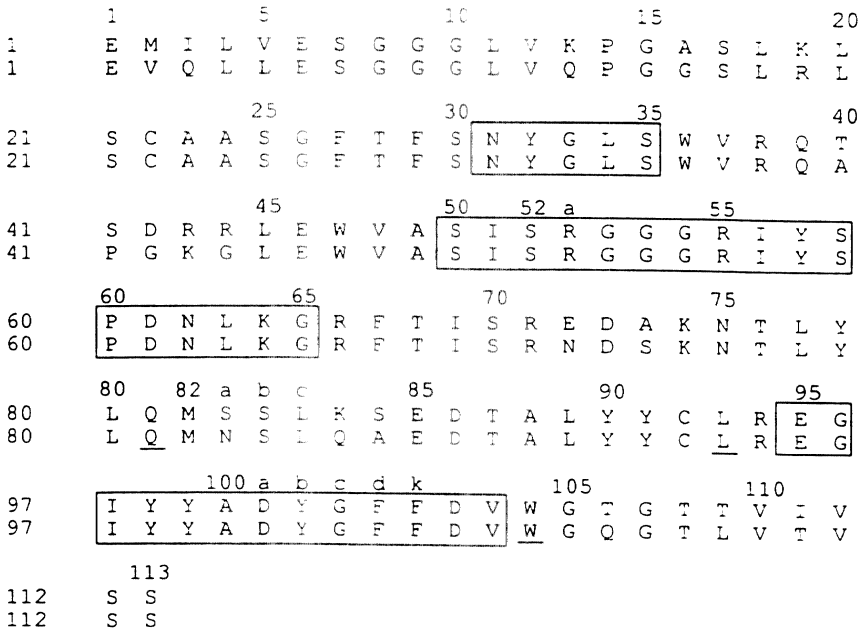
도면12


0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
결합형/유리형
.01
.1
1
10
100
1000
경쟁인자 항체농도
(nM)

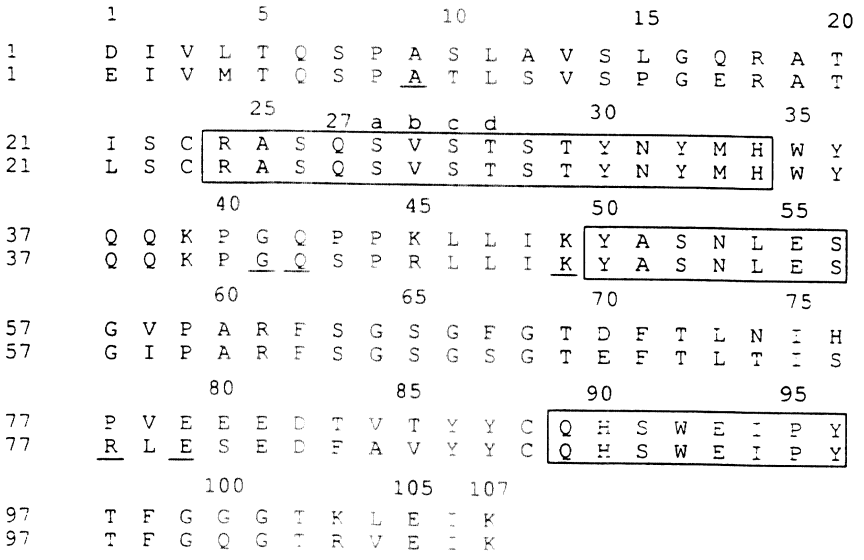
도면13


3000
2000
1000
0
CPM 방사량
.1
1
10
100
1000
10000
IL-2 농도
(pM)

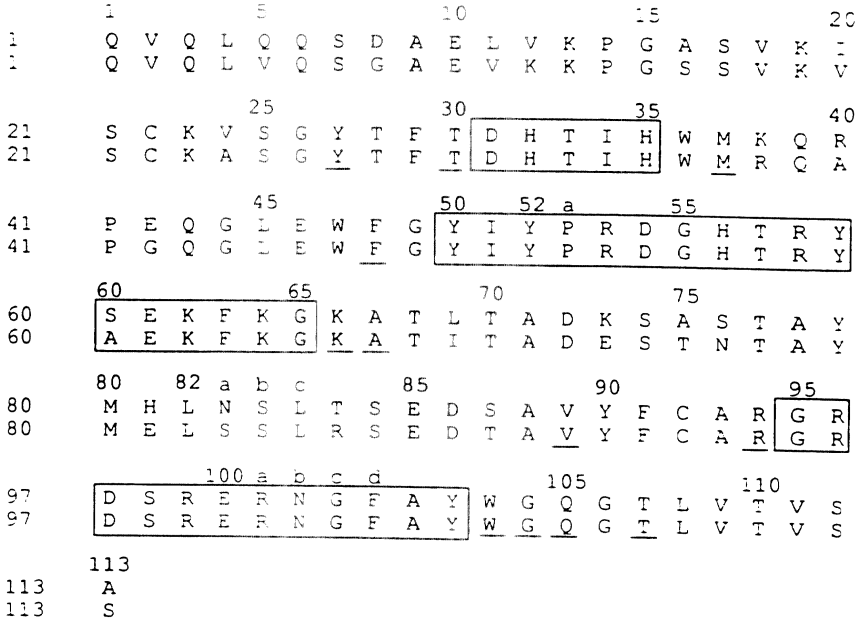
도면14a



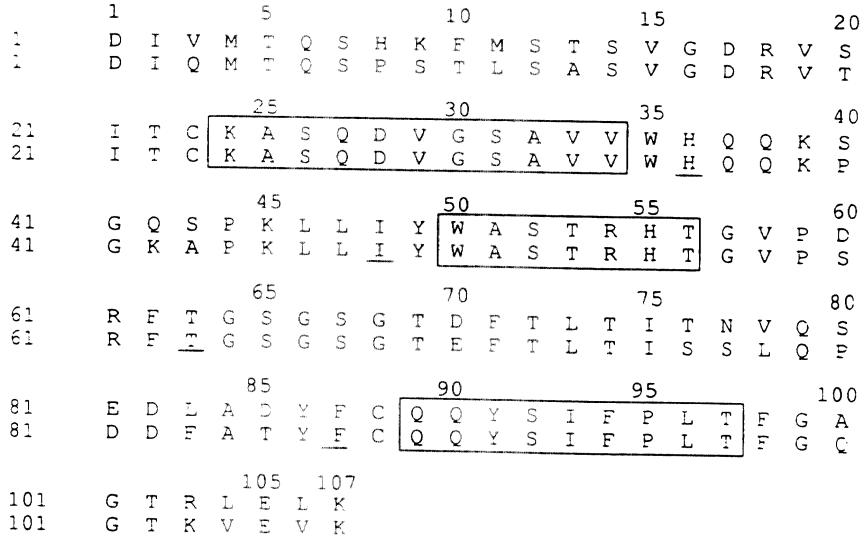
도면14b



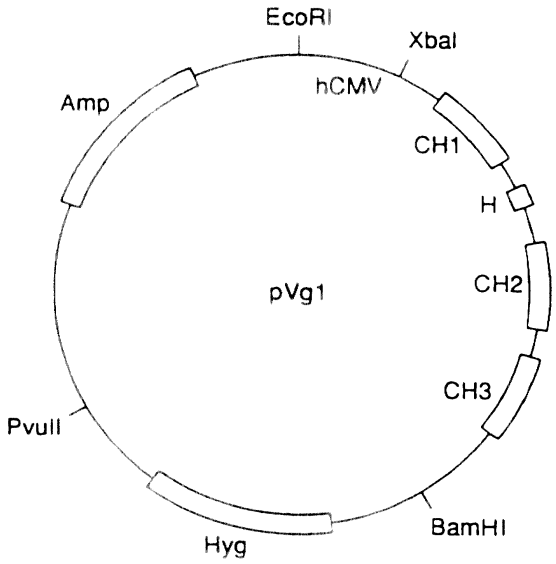
도면14c



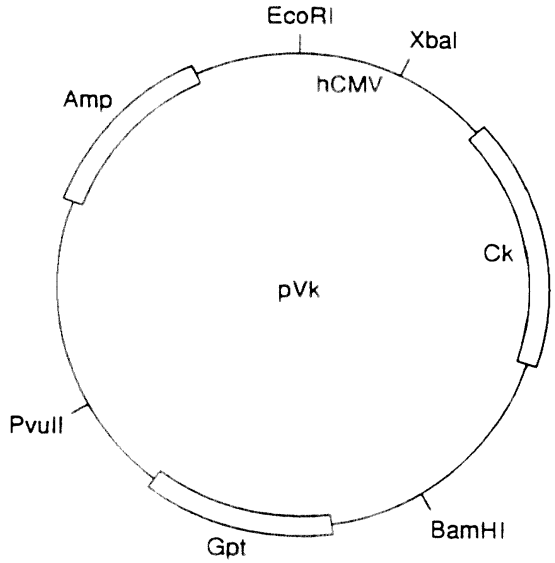
도면14d



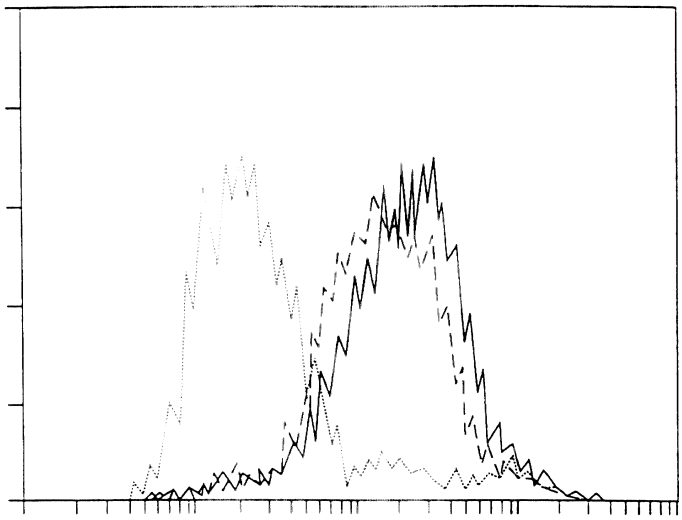
도면15a


EcoRI
XbaI
hCMV
Amp
CH1
H
pVg1
CH2
CH3
PvuII
BamHI
Hyg

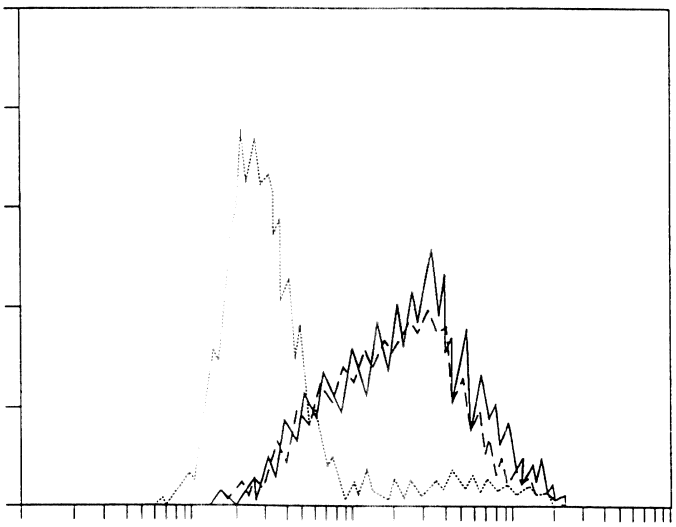
도면15b


EcoRI
XbaI
hCMV
Amp
Ck
pVk
PvuII
BamHI
Gpt

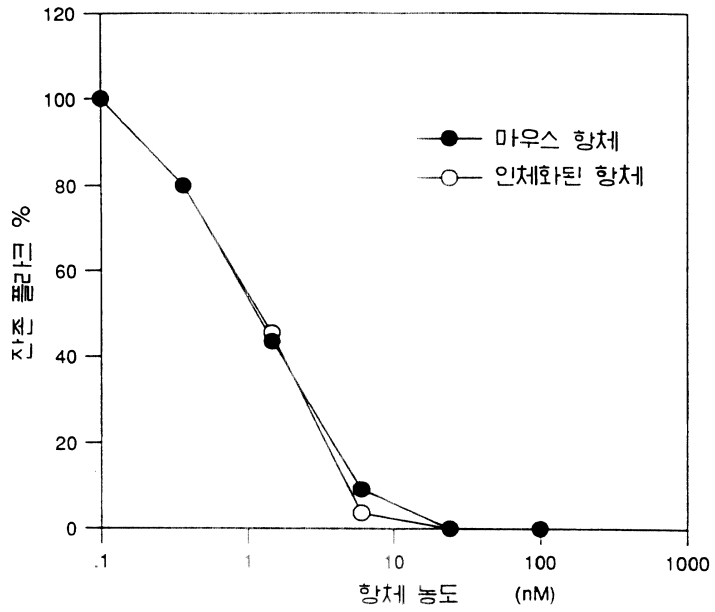
도면16a



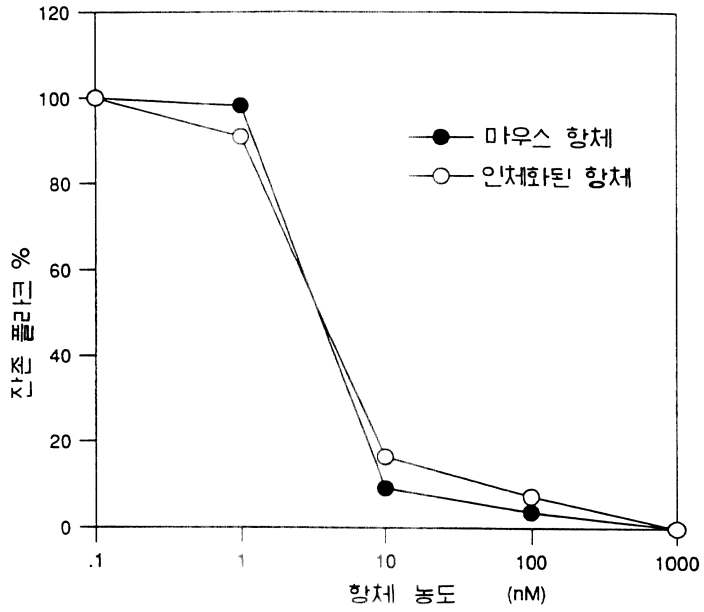
도면16b



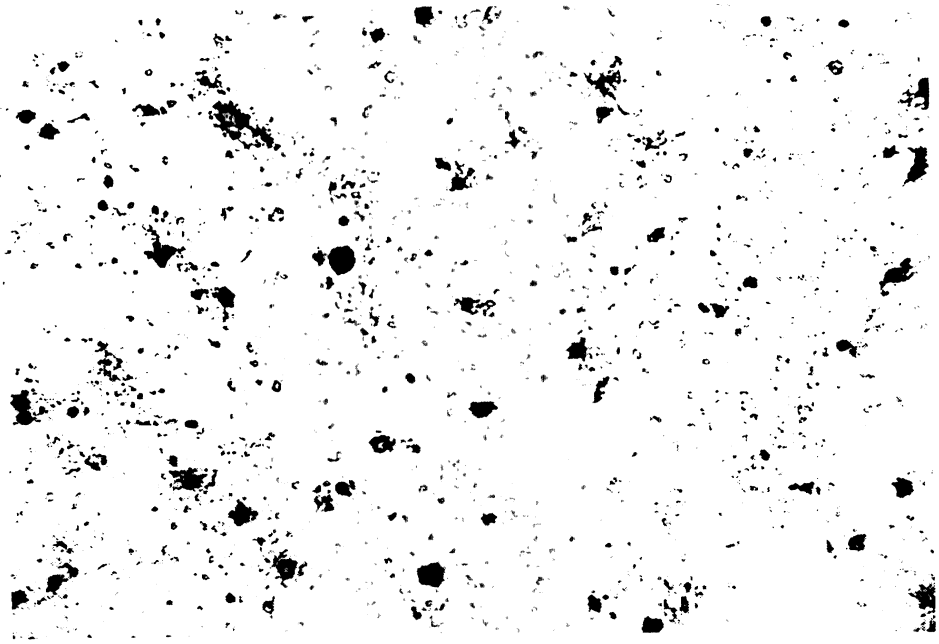
도면17a


120
100
80
60
40
20
0
잔존 폴리큰 %
마우스 항체
인체화된 항체
.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)

도면17b


120
100
80
60
40
20
0
잔존 폴리큰 %
마우스 항체
인체화된 항체
.1
1
10
100
1000
항체 농도 (nM)

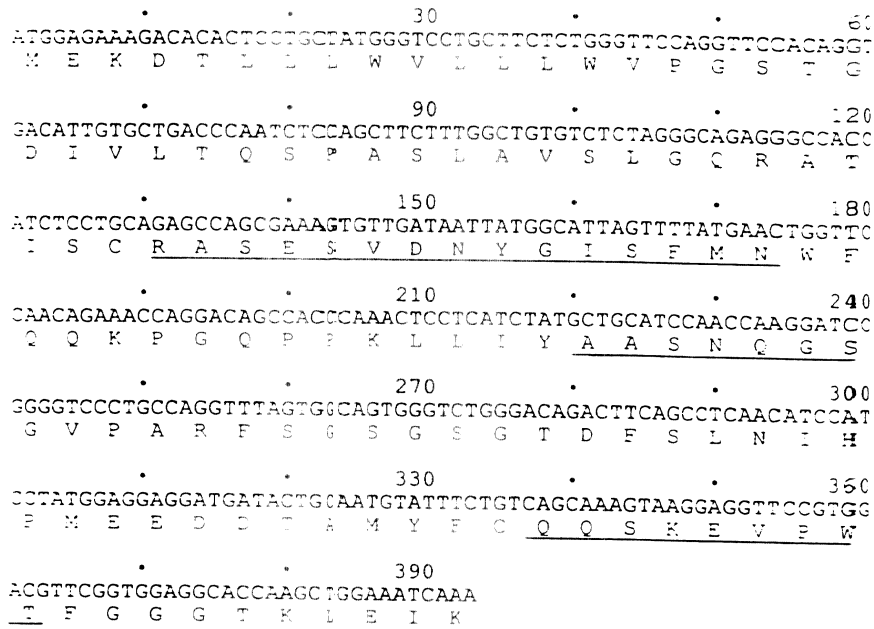
도면18a



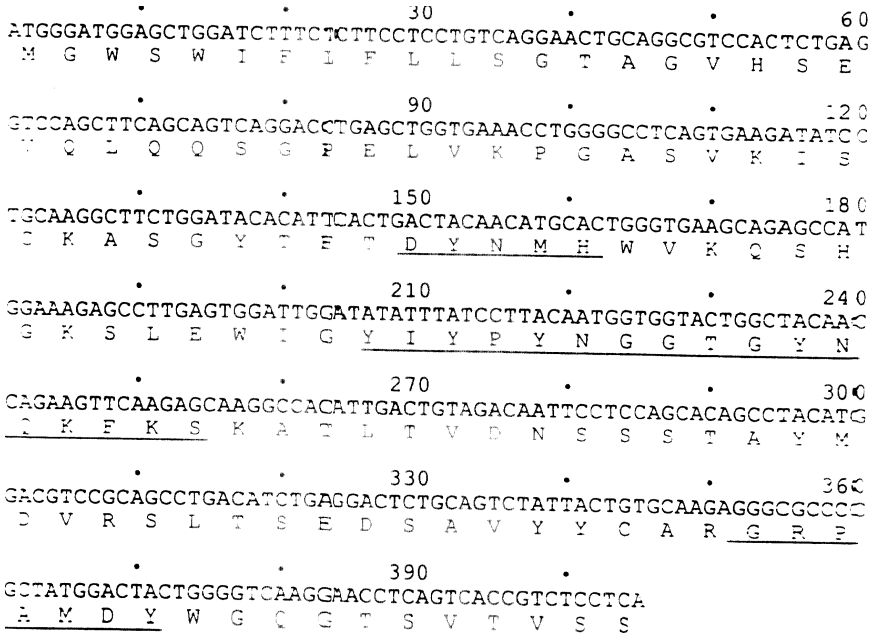
도면18b



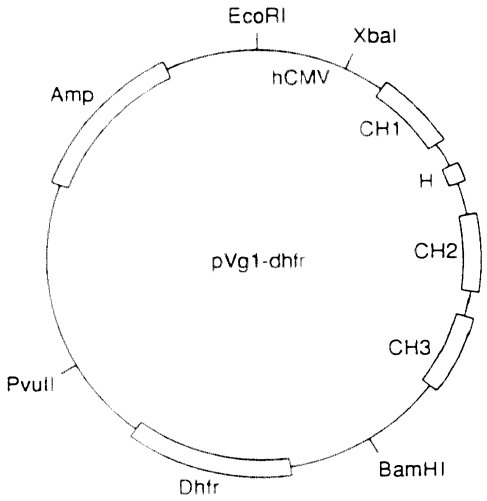
도면19a



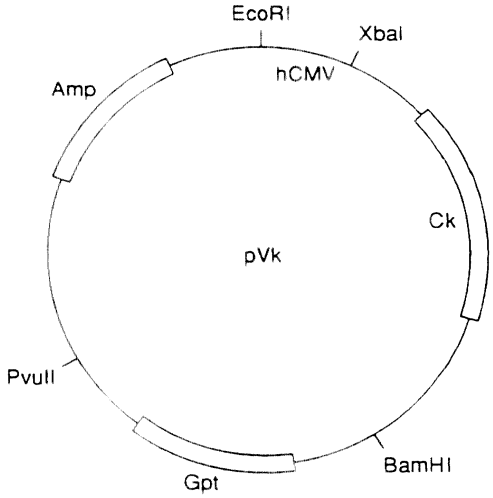
도면19b



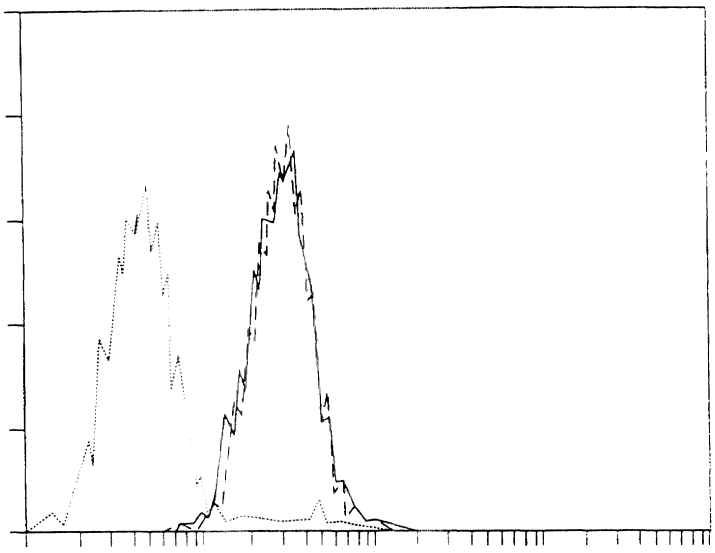
도면20a



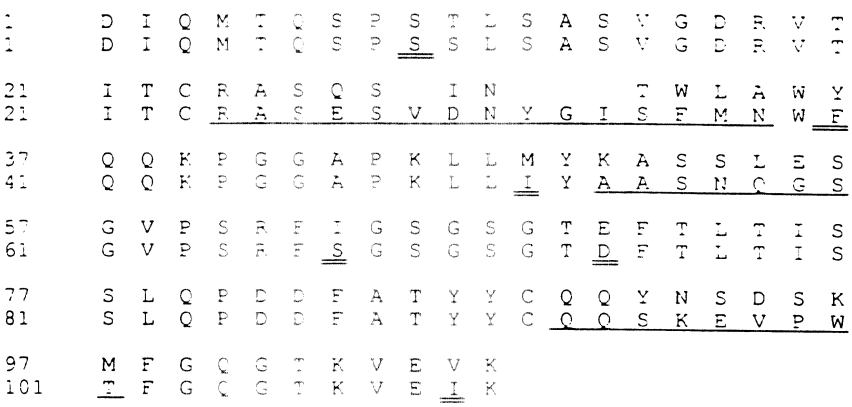
도면20b



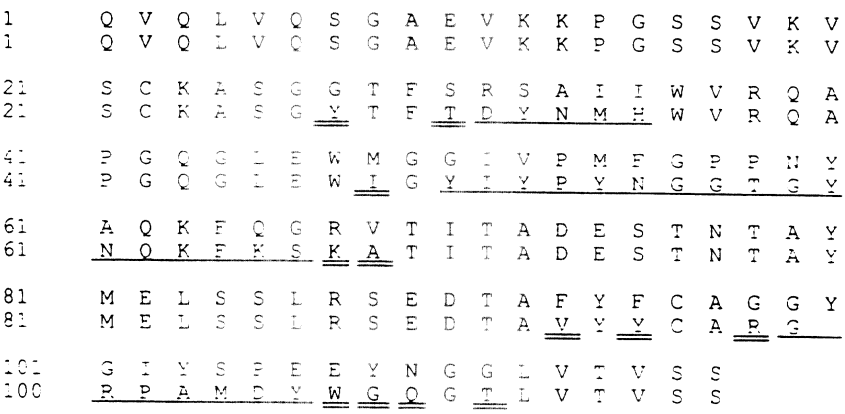
도면21



도면22a



도면22b



도면23a

ma1

```
        10          20          30          40          50          60
TATATCTAGA CCACCATGGG ATGGAGCTGG ATCTTTCTCT TCCTCCTGTC AGGAACTGCT

        70          80          90         100         110         120
GGCGTCCACT CTCAGGTTCA GCTGGTGCAG TCTGGAGCTG AGGTGAAGAA GCCTGGGAGC

       130
TCAGTGAAGG TT
```

ma2

```
        10          20          30          40          50          60
AGCCGGTACC ACCATTGTAA GGATAAATAT ATCCAATCCA TTCCAGGCCT TGGCCAGGAG

        70          80          90         100         110         120
CCTGCCTCAC CCAGTGCATG TTGTAGTCAG TGAAGGTGTA GCCAGAAGCT TTGCAGGAAA

       130
CCTTCACTGA GCT
```

ma3

```
        10          20          30          40          50          60
TGGTGGTACC GGCTACAACC AGAAGTTCAA GAGCAAGGCC ACAATTACAG CAGACGAGAG

        70          80          90         100         110
TACTAACACA GCCTACATGG AACTCTCCAG CCTGAGGTCT GAGGACACTG CA
```

ma4

```
        10          20          30          40          50          60
TATATCTAGA GGCCATTCTT ACCTGAAGAG ACAGTGACCA GAGTCCCTTG GCCCCAGTAG

        70          80          90         100         110
TCCATAGCGG GGCGCCCTCT TGCGCAGTAA TAGACTGCAG TGTCCTCAGA C
```

도면23b

ma5

```
         10         20         30         40         50         60
TATATCTAGA CCACCATGGA GAAAGACACA CTCCTGCTAT GGGTCCTGCT TCTCTGGGTT

         70         80         90        100        110        120
CCAGGTTCCA CAGGTGACAT TCAGATGACC CAGTCTCCGA GCTCTCTGTC CGCATCAGTA

GG
```

ma6

```
         10         20         30         40         50         60
TCAGAAGCTT AGGAGCCTTC CGGGGTTTCT GTTGGAACCA GTTCATAAAG CTAATGCCAT

         70         80         90        100        110        120
AATTGTCGAC ACTTTCGCTG GCTCTGCATG TGATGGTGAC CCTGTCTCCT ACTGATGCGG

AC
```

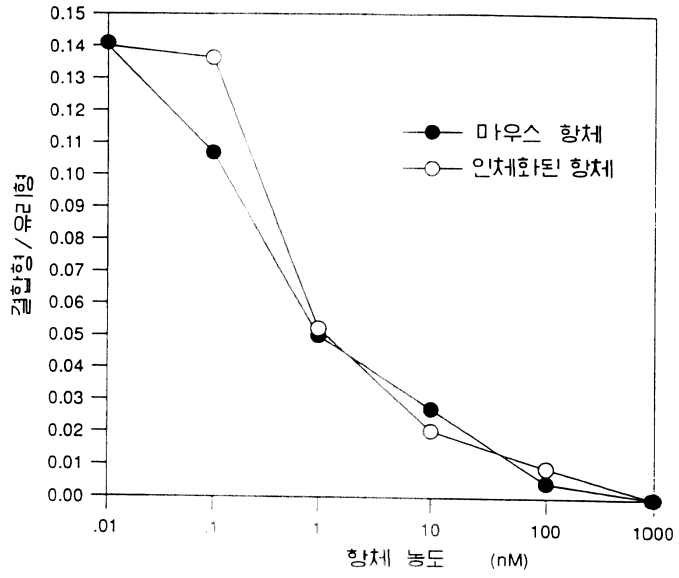
ma7

```
         10         20         30         40         50         60
TCCTAAGCTT CTGATTTACG CTGCATCCAA CCAAGGCTCC GGGGTACCCT CTCGCTTCTC

         70         80         90        100        110
AGGCAGTGGA TCTGGGACAG ACTTCACTCT CACCATTTCA TCTCTGCAGC CTGATGACT
```

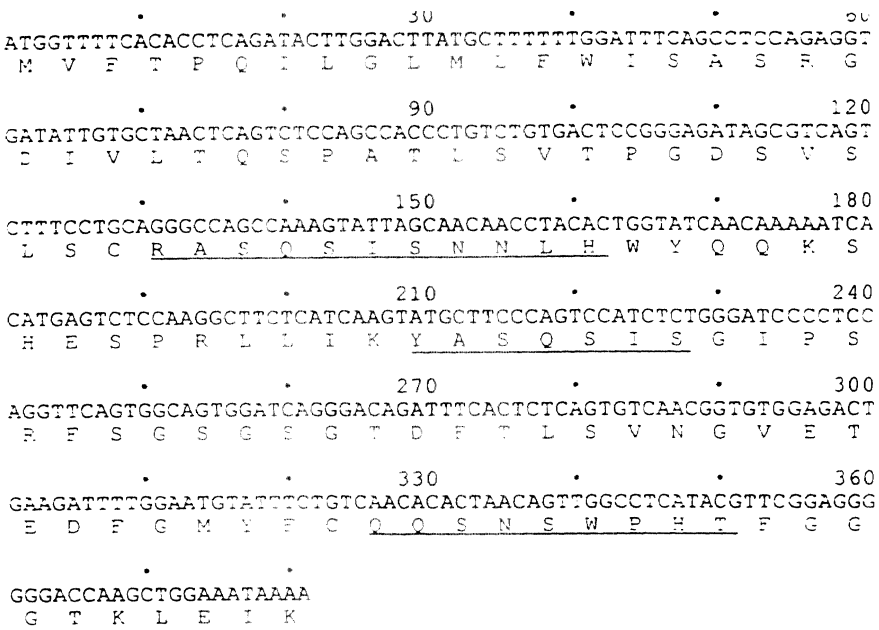
ma8

```
         10         20         30         40         50         60
TATATCTAGA CTTTGGATTC TACTTACGTT TGATCTCCAC CTTGGTCCCT TGACCGAACG

         70         80         90        100        110
TCCACGGAAC CTCCTTACTT TGCTGACAGT AATAGGTTGC GAAGTCATCA GGCTGCAG
```

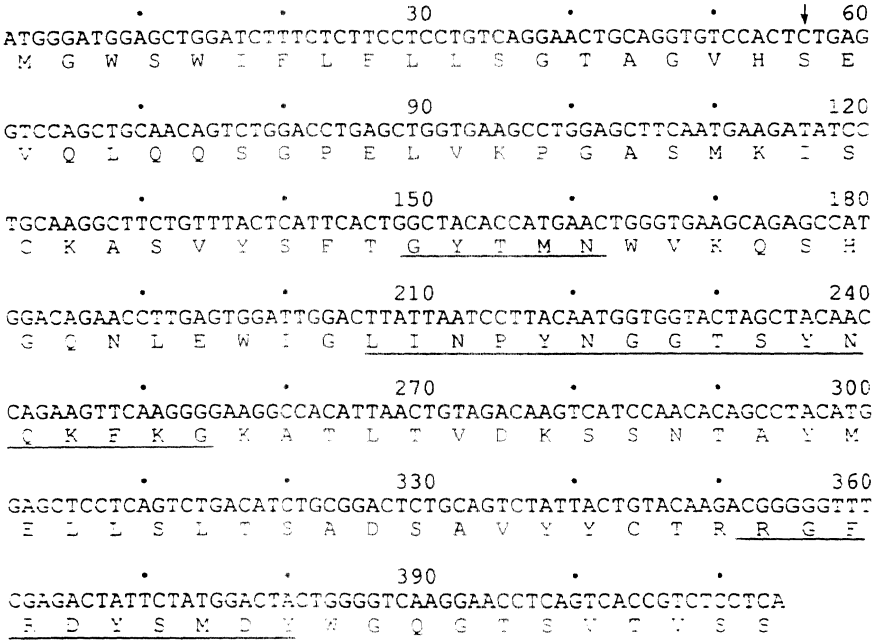
도면24



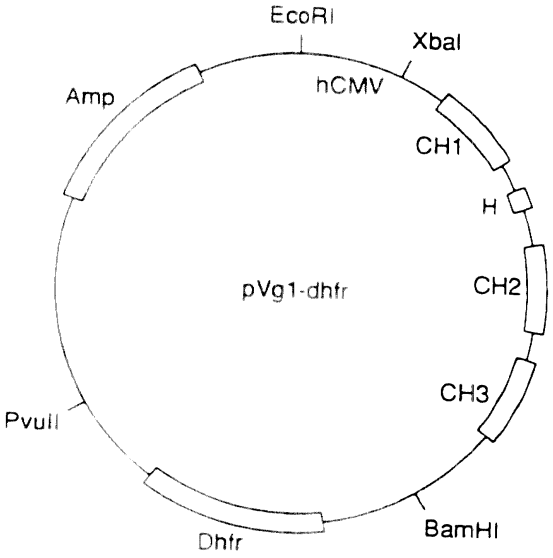
도면25a



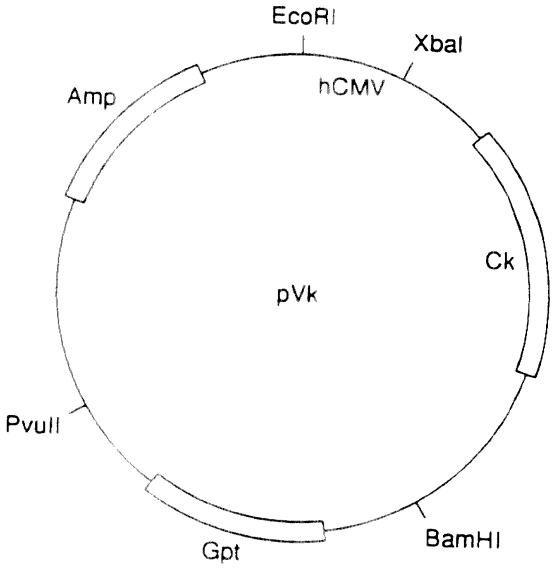
도면25b



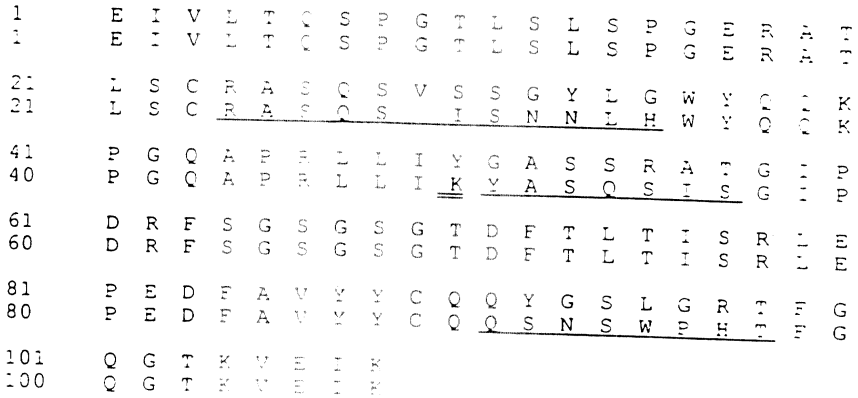
도면26a



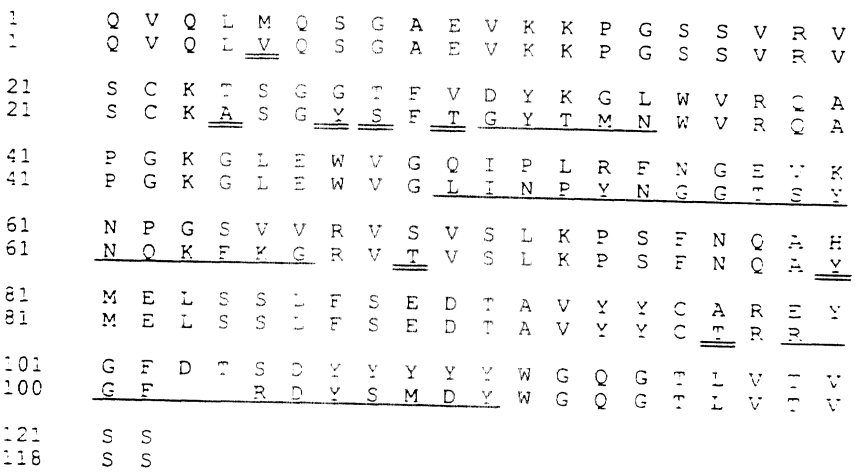
도면26b



도면27a



도면27b



도면28a

jb16

```
        10          20          30          40          50          60
TAGATCTAGA CCACCATGGT TTTCACACCT CAGATACTAG GACTCATGCT CTTCTGGATT

        70          80          90          100         110         120
TCAGCCTCCA GAGGTGAAAT TGTGCTAACT CAGTCTCCAG GCACCCTAAG CTTATCACCG

GGAGAAAGG
```

jb17

```
        10          20          30          40          50          60
TAGACAGAAT TCACGCGTAC TTGATAAGTA GACGTGGAGC TTGTCCAGGT TTTTGTTGGT

        70          80          90          100         110         120
ACCAGTGTAG GTTGTTGCTA ATACTTTGGC TGGCCCTGCA GGAAAGTGTA GCCCTTTCTC

CCGGTGAT
```

jb18

```
        10          20          30          40          50          60
AAGAGAATTC ACGCGTCCCA GTCCATCTCT GGAATACCCG ATAGGTTCAG TGGCAGTGGA

        70          80          90          100         110
TCAGGGACAG ATTTCACTCT CACAATAAGT AGGCTCGAGC CGGAAGATTT TGC
```

jb19

```
        10          20          30          40          50          60
TAGATCTAGA GTTGAGAAGA CTACTTACGT TTTATTTCTA CCTTGGTCCC TTGTCCGAAC

        70          80          90          100         110
GTATGAGGCC AACTGTTACT CTGTTGACAA TAATACACAG CAAAATCTTC CGGCTC
```

도면28b

jb20

```
        10          20          30          40          50          60
TATATCTAGA CCACCATGGG ATGGAGCTGG ATCTTTCTCT TCCTCCTGTC AGGAACTGCA

        70          80          90         100         110         120
GGTGTCCACT CTCAAGTCCA ACTGGTACAG TCTGGAGCTG AGGTTAAAAA GCCTGGAAGT

       130
TCAGTAAGAG TTTC
```

jb21

```
        10          20          30          40          50          60
TATATAGGTA CCACCATTGT AAGGATTAAT AAGTCCAACC CACTCAAGTC CTTTTCCAGG

        70          80          90         100         110         120
TGCCTGTCTC ACCCAGTTCA TGGTATACCC AGTGAATGAG TATCCGGAAG CTTTGCAGGA

       130
AACTCTTACT GAAC
```

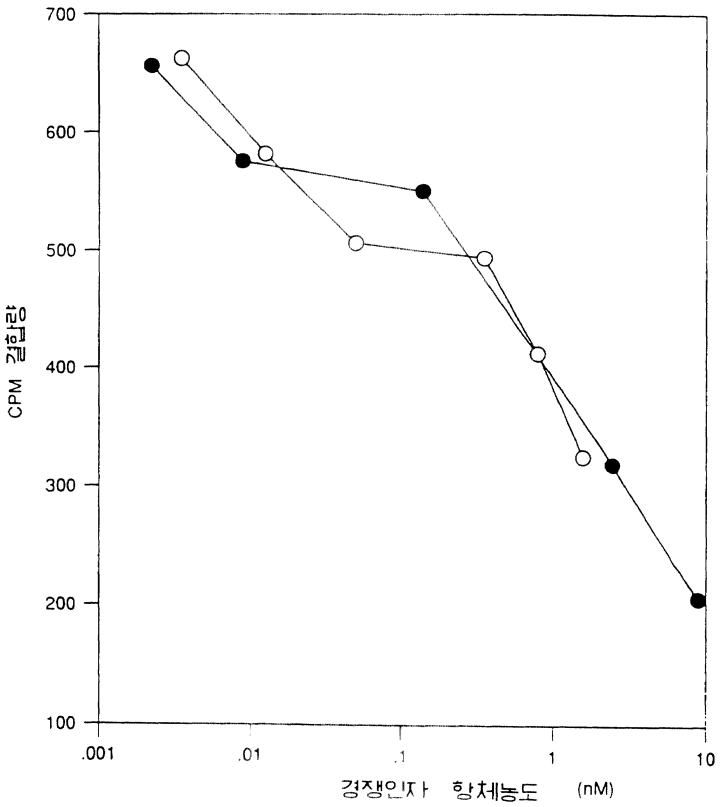
jb22

```
        10          20          30          40          50          60
TATATAGGTA CCAGCTACAA  CCAGAAGTTC AAGGGCACAG TTACAGTTC TTTGAAGCCT

        70          80          90         100         110
TCATTTAACC AGGCCTACAT GGAGCTCAGT AGTCTGTTTT CTGAAGACAC TGCAGT
```

jb23

```
        10          20          30          40          50          60
TATATCTAGA GGCCATTCTT ACCTGAGGAG ACGGTGACTA AGGTTCCTTG ACCCCAGTAG

        70          80          90         100         110
TCCATAGAAT AGTCTCGAAA CCCCCGTCTT CTACAGTAAT AGACTGCAGT GTCTTC
```

도면29



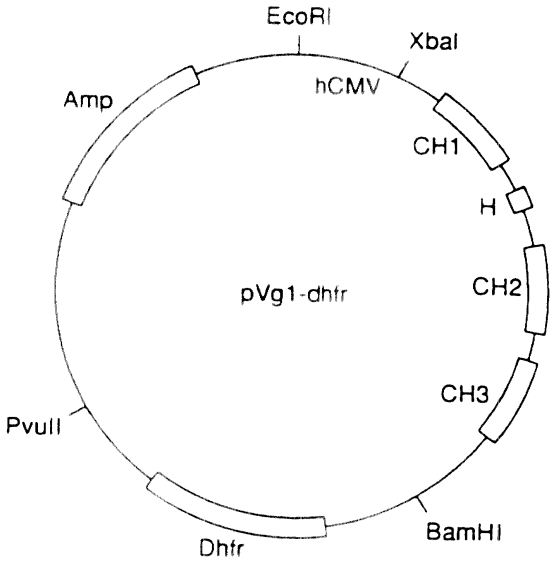
도면30a

```
          .         .        30         .         .        60
ATGACATCACTGTTCTCTCTACAGTTACCGAGCACACAGGACCTCGCCATGGGATGGAGC
 M  T  S  L  F  S  L  Q  L  P  S  T  Q  D  L  A  M  G  W  S

          .         .        90         .         .       120
TGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCTCTCCCAGGTCCAACTGCAG
 C  I  I  L  F  L  V  A  T  A  T  G  V  L  S  Q  V  Q  L  Q

          .         .       150         .         .       180
CAGCCTGGGGCTGACCTTGTGATGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCTGTCCTGCTTGGCTTCT
 Q  P  G  A  D  L  V  M  P  G  A  P  V  K  L  S  C  L  A  S

          .         .       210         .         .       240
GGCTACATCTTCACCAGCTCCTGGATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTC
 G  Y  I  F  T  S  S  W  I  N  W  V  K  Q  R  P  G  R  G  L

          .         .       270         .         .       300
GAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTCCGATGGTGAAGTTCACTACAATCAAGATTTCAAG
 E  W  I  G  R  I  D  P  S  D  G  E  V  H  Y  N  Q  D  F  K

          .         .       330         .         .       360
GACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATCCAACTCAACAGC
 D  K  A  T  L  T  V  D  K  S  S  S  T  A  Y  I  Q  L  N  S

          .         .       390         .         .       420
CTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCTAGAGGATTTCTGCCCTGGTTTGCT
 L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  R  G  F  L  P  W  F  A

          .         .       450
GACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
 D  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  A
```

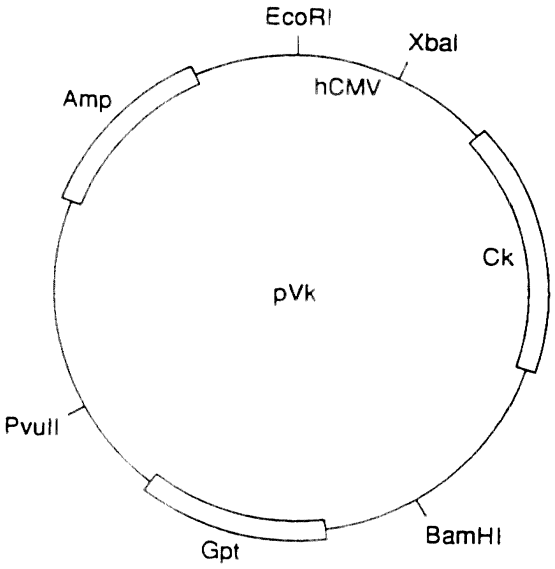
도면30b

```
          .         .        30         .         .        60
ATGCATCAGACCAGCATGGGCATCAAGATGGAATCACAGACTCTGGTCTTCATATCCATA
 M  H  Q  T  S  M  G  I  K  M  E  S  Q  T  L  V  F  I  S  I

          .         .        90         .         .       120
CTGCTCTGGTTATATGGTGCTCATGGGAACATTGTTATGACCCAATCTCCCAAATCCATG
 L  L  W  L  Y  G  A  D  G  N  I  V  M  T  Q  S  P  K  S  M

          .         .       150         .         .       180
TACGTGTCAATAGGAGAGAGGGTCACCTTGAGCTGCAAGGCCAGTGAAAATGTGGATACT
 Y  V  S  I  G  E  R  V  T  L  S  C  K  A  S  E  N  V  D  T

          .         .       210         .         .       240
TATGTATCCTGGTATCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATATGGGGCA
 Y  V  S  W  Y  Q  Q  K  P  E  Q  S  P  K  L  L  I  Y  G  A

          .         .       270         .         .       300
TCCAACCGGTACACTGGGGTCCCACGATCGCTTCACGGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTC
 S  N  R  Y  T  G  V  H  D  R  F  T  G  S  G  S  A  T  D  F

          .         .       330         .         .       360
ACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGACAGAGT
 T  L  T  I  S  S  V  Q  A  E  D  L  A  D  Y  H  C  G  Q  S

          .         .       390         .
TACAACTATCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAG
 Y  N  Y  P  F  T  F  G  S  G  T  K  L  E  I  K
```

도면31a



도면31b



도면32a

```
1    D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T
1    D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T

21   I T C R A S Q S I N T W L A W Y Q Q K P
21   I T C K A S E N V D T Y V S W Y Q Q K P

41   G K A P K L L M Y K A S S L E S G V P S
41   G K A P K L L I Y G A S N R Y T G V P S

61   R F I G S G S G T E F T L T I S S L Q P
61   R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

81   D D F A T Y Y C     Q Q Y N S D S K M F G
81   D D F A T Y Y C G Q S Y N     Y P F T F G

100  Q G T K V E V K
100  Q G T K V E V K
```

도면32b

```
1    Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V
1    Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V

21   S C K A S G G T F S R S A I I W V R Q A
21   S C K A S G Y I F T S S W I N W V R Q A

41   P G Q G L E W M G G I V P M F G P P N Y
41   P G Q G L E W M G R I D P S D G E V H Y

61   A Q K F Q G R V T I T A D E S T N T A Y
61   N Q D F K D R V T I T A D E S T N T A Y

81   M E L S S L R S E D T A F Y F C A G G Y
81   M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G F

101  G I Y S P E E Y N G G L V T V S S
101  L P W F A D W G Q G T L V T V S S
```

도면33a

rh10

```
        10          20          30          40          50          60
TTTTTTCTAG ACCACCATGG AGACCGATAC CCTCCTGCTA TGGGTCCTCC TGCTATGGGT

        70          80          90         100         110
CCCAGGATCA ACCGGAGATA TTCAGATGAC CCAGTCTCCG TCGACCCTCT CTGCT
```

rh11

```
        10          20          30          40          50          60
TTTTAAGCTT GGGAGCTTTG CCTGGCTTCT GCTGATACCA GGATACATAA GTATCCACAT

        70          80          90         100         110         120
TTTCACTGGC CTTGCAGGTT ATGGTGACCC TATCCCCGAC GCTAGCAGAG AGGTTCCACG
```

rh12

```
        10          20          30          40          50          60
TTTTAAGCTT CTAATTTATG GGGCATCCAA CCGGTACACT GGGGTACCTT CACGCTTCAG

        70          80          90         100         110
TGGCAGTGGA TCTGGGACCG ATTTCACCCT CACAATCAGC TCTCTGCAGC CAGATGAT
```

rh13

```
        10          20          30          40          50          60
TTTTTTCTAG AGCAAAAGTC TACTTACGTT TGACCTCCAC CTTGGTCCCC TGACCGAACG

        70          80          90         100         110         120
TGAATGGATA GTTGTAACTC TGTCCGCAGT AATAAGTGGC GAAATCATCT GGCTCCAGAG
```

도면33b

rh20

```
        10         20         30         40         50         60
TTTTTCTAGA CCACCATGGG ATGGAGCTGG ATCTTTCTCT TCCTCCTGTC AGGTACCGCG

        70         80         90        100        110
GGCGTGCACT CTCAGGTCCA GCTTGTCCAG TCTGGGGCTG AAGTCAAGAA ACCT
```

rh21

```
        10         20         30         40         50         60
TTTTGAATTC TCGAGACCCT GTCCAGGGGC CTGCCTTACC CAGTTTATCC AGGAGCTAGT

        70         80         90        100        110        120
AAAGATGTAG CCAGAAGCTT TGCAGGAGAC CTTCACGGAG CTCCCAGGTT TCTTGACTTC

A
```

rh22

```
        10         20         30         40         50         60
TTTTGAATTC TCGAGTGGAT GGGAAGGATT GATCCTTCCG ATGGTGAAGT TCACTACAAT

        70         80         90        100        110        120
CAAGATTTCA AGGACCGTGT TACAATTACA GCAGACGAAT CCACCAATAC AGCCTACATG

       130
GAACTGAGCA GCCTGAG
```

rh23

```
        10         20         30         40         50         60
TTTTTCTAGA GGTTTTAAGG ACTCACCTGA GGAGACTGTG ACCAGGGTTC CTTGGCCCCA

        70         80         90        100        110        120
GTCAGCAAAC CAGGGCAGAA ATCCTCTTGC ACAGTAATAG ACTGCAGTGT CCTCTGATCT

       130
CAGGCTGCTC AGTT
```

도면34

