(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년06월22일
(11) 등록번호 10-1151477
(24) 등록일자 2012년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 38/21* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7011437
(22) 출원일자(국제) 2004년12월10일
심사청구일자 2009년12월09일
(85) 번역문제출일자 2006년06월09일
(65) 공개번호 10-2007-0011243
(43) 공개일자 2007년01월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/041777
(87) 국제공개번호 WO 2005/059106
국제공개일자 2005년06월30일
(30) 우선권주장
60/528,757 2003년12월10일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20030166228 A1
전체 청구항 수 : 총 37 항

(73) 특허권자
메다렉스, 인코포레이티드
미국 08540 뉴저지주 프린스톤 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
위트, 앨리슨
미국,95066 캘리포니아, 스콧츠 밸리, 빈 크리크 로드3505
윌리암스, 데니스
미국, 95123 캘리포니아, 산호세, 체스브로 애브뉴 3511
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
조용식

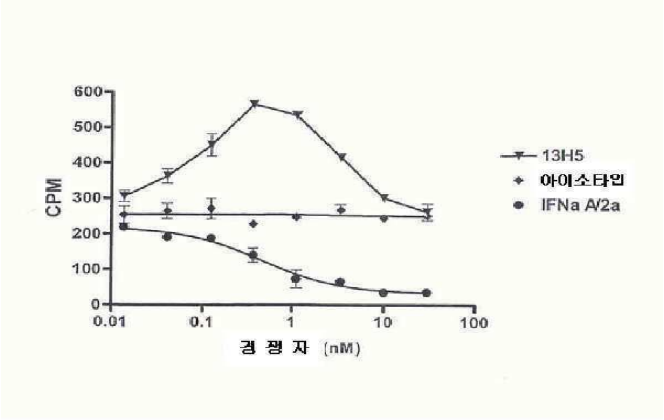
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 **인터페론 알파 항체 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 분리된 모노클론 항체, 더욱 상세하게는 여러 INF 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하나 INF 알파 21의 생물학적 활성 또는 INF 베타 또는 INF 오메가의 어느 하나의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는 인간 모노클론 항체를 제공한다. 본 발명의 항체를 포함하는 면역 접합체, 이중 특이성 분자 및 제약 조성물도 제공된다. 본 발명은 본 발명의 항체를 투여함으로써, 본 발명의 항체를 사용하는 IFN 알파의 생물학적 활성을 억제하는 방법 및 자기 면역병, 이식 거부증 및 이식 숙주 반응과 같은 인터페론 알파에 의해 매개된 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 또한 제공한다.

대 표 도 - 도7



(72) 발명자

카다렐리, 조세핀, 엠

미국, 94070 캘리포니아, 산 카를로스, 레슬리 드라이브126

킹, 데이비드

미국, 94002 캘리포니아, 벨몬트, 테라스 드라이브 1744

패스모어, 데이비드

미국, 94041 캘리포니아, 마운틴 뷰, 쳐치 스트리트 98,Apt. 6

특허청구의 범위

청구항 1

(a) SEQ ID NO: 1을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;

(b) SEQ ID NO: 4를 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;

(c) SEQ ID NO: 7을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;

(d) SEQ ID NO: 10을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;

(e) SEQ ID NO: 13을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및

(f) SEQ ID NO: 16을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함하는,

분리된 항-인터페론 알파 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 2

(a) SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및

(b) SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역;을 포함하는,

분리된 항-인터페론 알파 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 3

(a) SEQ ID NOs: 34, 35, 36 및 37로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및

(b) SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역;을 포함하는,

분리된 항-인터페론 알파 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 4

SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하는 항체에 의해 인지된 인간 인터페론 알파 폴리펩티드 상에 에피토프를 결합하는,

분리된 항-인터페론 알파 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분이 말초 혈액 단일핵 세포에서 CD38 또는 MHC 클래스 I의 IFN-유도 표면 발현을 억제하는,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 6

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분이 말초 혈액 단일핵 세포에 의한 IP-10의 IFN-유도 발현을 억제하는,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 7

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분이 전신 홍반성 낭창(SLE) 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제하는,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 8

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 인간 항체인,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 9

제 1항 또는 제 4항에 있어서,

항체가 불명의 항체인,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 10

제 1항 또는 제 4항에 있어서,

항체가 인간화된 항체인,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 11

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

항체가 IgG1 또는 IgG4 항체인,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 12

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

항원-결합 부분이 Fab 항체 단편인,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 13

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

항원-결합 부분이 단일 사슬 항체(scFv)인,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에서의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 제약학적 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서,

제약학적 조성물이 동결건조된,

제약학적 조성물.

청구항 16

제 14항에 있어서,

제약학적 조성물이 수성 용액 또는 분산체인,

제약학적 조성물.

청구항 17

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 18

치료제에 결합된, 제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 면역접합체.

청구항 19

제 18항에 있어서,

치료제가 세포독소인,

면역접합체.

청구항 20

제 18항에 있어서,

치료제가 방사성 동위원소인,

면역접합체.

청구항 21

제 18항의 면역접합체 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 22

하기의 항체, 또는 그의 항원-결합부분과 다른 결합 특이성을 갖는 이차적인 기능성 성분에 결합된 제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 이중특이성 분자.

청구항 23

제 22항의 이중특이성 분자 및 제약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 24

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 25

제 24항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 26

제 25항의 발현 벡터를 포함하는 분리된 숙주 세포.

청구항 27

쥐가 제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 발현하는,

인간 면역글로불린 중 및 경 사슬 이식유전자를 포함하는 유전자 이식 쥐.

청구항 28

하이브리도마가 상기 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 생산하는,

제 27항의 쥐로부터 제조된 하이브리도마.

청구항 29

인터페론 알파의 생물학적 활성이 억제되도록, 제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분과 인터페론 알파를 접촉시키는 것을 포함하는,

생체 외에서 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제하는 방법.

청구항 30

약제로서 사용되는,

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 31

치료가 필요한 환자의 인터페론 알파-매개 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에 사용되는,

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 32

제 31항에 있어서,

질병 또는 장애가 전신 홍반성 낭창인,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 33

제 31항에 있어서,

질병 또는 장애가 다발성 경화증, 염증성 장 질환, 인슐린의존성 당뇨, 건선, 자기면역 갑상선염, 류마티스 관절염 및 사구체신염으로 구성된 군으로부터 선택되는,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 34

제 31항에 있어서,

질병 또는 장애가 이식거부 또는 이식숙주반응인,

항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 35

인터페론 알파의 생물학적 활성이 억제되도록, 제 14항 내지 제 16항 중 어느 한 항의 제약학적 조성물과 인터페론 알파를 접촉시키는 것을 포함하는,

생체 외에서 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제하는 방법.

청구항 36

약제로서 사용되는,

제 14항 내지 제 16항 중 어느 한 항의 제약학적 조성물.

청구항 37

치료가 필요한 환자의 인터페론 알파-매개 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에 사용되는,

제 14항 내지 제 16항 중 어느 한 항의 제약학적 조성물.

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

명 세 서

기 술 분 야

관련 특허 출원의 참고

본 특허출원은 2003년 12월10일 출원된 미국 임시 특허출원 일련번호 60/528,757의 우선권을 주장하며, 그 내용은 참고로 여기에 전부 포함시킨다.

배 경 기 술

타입 I 인터페론(IFN)(IFN-α, IFN-β, IFN-ω, IFN-τ)은 항바이러스, 항종양 및 면역조절 효과를 갖는 구조적으로 연관된 시토킨의 집단이다.(하디 등. (2001) Blood 97:473;커트론 및 랭거(2001) J. Biol. Chem. 276:17140). 인간 IFNα 위치는 두개의 부집단을 갖는다. 첫 번째 부집단은 적어도 14개의 비대립 유전자와 적어도 75%의 동일성을 갖는 4개의 허위유전자를 갖는다. 두 번째 부집단, αⅡ 또는 오메가(ω)는 IFNα 유전자와 70%의 동일성을 나타내는 1개의 기능 유전자와 5개의 허위유전자를 갖는다. IFNα의 서브타입들은 서로 다른 특유의 활성들을 갖지만 동일한 생물학적 스펙트럼을 보이고(스트로우리 등 (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2848) 동일한 세포 수용체를 갖는다(아그넷 M 등 (1983) Interferon 5 Ed. I. Gresser p. 1-22, Academic Press, 런던).

모든 인간 타입 I 인터페론은 두 개의 전이막 단백질, IFNAR-1 및 IFNAR-2로 구성된 세포 표면 수용체(IFN 알파 수용체, IFNAR)에 결합한다(우체 등 (1990) Cell 60:225; 노비크 등 (1994) Cell 77:391; 페스트카 등 (1987) Annu Rev. Biochem. 56:727; 모겐센 등 (1999) J. Interferon Cytokine Res. 19:1069). IFNAR-1은 IFNAR 복합체의 높은 친화성 결합과 서로 다른 특이성에 필수적이다(커트론(2001) 위와 같음). 타입I IFN 서브타입 각각의 기능의 차이가 밝혀지지는 않았으나 각각은 잠재적으로 다양한 신호표시로 이끄는 IFNAR 수용체 성분과 서로 다른 작용을 보이는 것으로 생각된다(쿡 등 (1996) J. Biol. Chem. 271:13448). 특히 IFNAR-1 및 IFNAR-2의 변이형을 사용하는 연구에서 알파 및 베타 인터페론이 각각의 사슬과 차등있게 반응함으로 수용체를 통해 다르게 신호를 나타내는 것이 제안되었다(루워렌즈 등 (1998) J. Mol. Biol. 282:585).

타입 I INF의 기능에 대한 초기의 연구는 바이러스 감염에 대한 선천적 방어에 초점이 맞추어 졌다(할러 등 (1981) J. Exp. Med. 154:199; 린더만 등 (1981) Methods Enzymol. 78:181). 그러나 더욱 최근의 연구는 적응 면역 감응에서 효력있는 면역조절 시토킨으로서 타입 I IFN에 관한 것이다. 특히 타입 I IFN는 Th1통로에서 원래의 T 세포의 변이를 용이하게 하고(브릴크만 등 (1993) J. Exp. Med. 178:1655), 항체 생성을 높이고(핀켈만 등 (1991) J. Exp. Med. 174:1179), 기억 T 세포의 기능적 활성과 생존을 지지하는 것으로(산티니 등 (2000) J. Exp. Med. 191:1777; 토우 등 (1996) Science 272:1947) 나타났다.

여러 그룹의 최근의 연구에서 IFN-α는 수지상 세포(DCs)의 성숙 또는 활성화를 증진시킬 수 있음을 제안하였다(산티니 등 (2000) J. Exp. Med. 191:1777; 루푸트 등(1998) J. Immunol. 161:1947; 루푸트 등 (2002) Int. Immunol. 14:367; 라드바니 등 (1999) Scand. J. Immunol. 50:499; 패퀴트 등 (1998) J. Leukoc. Biol. 64:358). 더욱이, 타입 I 인터페론의 증가된 발현이 다수의 자기면역병에 기술되어 있다(포울리스 등 (1987) Lancet 2:1423; 혹스 등 (1982) Arthritis Rheum. 25:396; 헤르츠조그 등 (1988) Clin. Immunol. Immunopathol. 48:192; 홉킨스 및 메걸 (1988) Clin. Exp. Immunol. 73:88; 알빈 및 밀러 (1984) Arthritis Rheum. 27:582). 이의 가장 연구된 예에는 IFN α의 높아진 수준과 모두 관련이 있는, 인슐린-의존성 당뇨(IDDM)(포울리스 (1987) 위와 같음), 전신 홍반성 낭창(SLE)(혹스 (1982) 위와 같음; 블란코 등 (2001) Science 294:1540; 에터버그 및 쉬니쳐 (1982) Arthritis Rheum. 25:401; 바토익스 등 (1999) Eur. Cytokine Netw. _:509), 및 자기면역 갑상선염(프룸멜 및 로우버그 (2003) Thyroid 13:547; 마찌오티 등 (2002) J. Endocrinol. Invest. 25:624; 유 등 (1999) Chin. Med. J. 112:61; 코 등 (1997) Thyroid 7:891) 및 IFN-β가 더욱 중요한 역할을 하는 류마티스성 관절염(RA)(헤르츠조그 (1988), 홉킨스 및 메거 (1988), 알빈 및 밀러 (1984), 위와 같음)이 있다.

더욱이, 인터페론 α의 투여는 건선, 자기면역 갑상선염 및 다발성 경화증의 환자에는 기본적 질병을 악화시키고 자기면역병의 이전 경험이 없는 환자에는 SLE 유사 증상을 유도하는 것으로 보고되었다. 인터페론 α는 또한 정상적인 쥐에서 사구체신염을 유도하고 NZB/W 쥐의 동시적 자기면역병의 발생을 가속화하는 것이 나타났다. 더 나아가, IFN-α 치료법은 몇몇 경우에 발열 및 신경 장애를 포함하는 바람직하지 못한 부작용을 유도하는 것이 나타났다. 따라서, IFN-α 활성의 억제가 환자에게 유익할 수 있으며 IFN-α 활성을 억제하는데 효과적인 물질이 필요한 병리적 상황이다.

발명의 요약

본 발명은 IFN 알파에 결합하고 여러 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하나 IFN 알파 서브타입 21 또는 IFN 베타 또는 IFN 오메가의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는 분리된 모노클론 항체를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는 IFN 알파에 의해 유도된 세포 마아커의 표면 발현을 억제하고 IFN 알파에 의해 유도된 IP-10 발현을 억제하고/하거나 전신 홍반성 낭창(SLE) 환자로부터의 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제할 수 있다. 이들 항체는 예를 들면 인터페론 알파의 생산 또는 발현이 병리적 증상과 연관되는 상황에서, 예방약을 포함하는 치료목적에 사용할 수 있다. 그러한 항체는 여러 가지 질병의 진단 또는 그러한 질병의 진화의 연구에도 사용할 수 있다.

한 구체예에서, 본 발명은 IFN 알파, 바람직하게는 인간 IFN 알파(예를 들면, 인간 IFN 알파 2a, 인간 IFN 알파 2b)에 결합하고, 여러 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하나 IFN 알파 서브타입 21 또는 IFN 베타 또는 IFN 오메가의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 덧붙여서, 여러 구체예에서, 본 발명의 항체는 IFN 알파에 의해 유도된 세포 마아커의 표면 발현을 억제하고 IFN 알파에 의해 유도된 IP-10 발현을 억제하고/하거나 전신 홍반성 낭창(SLE) 환자로부터의 혈장에 의해 전달된 수지상 세포 발달을 억제할 수 있다. 항체 또는 항체 단편은 바람직하게는 인간 항체 또는 항체 단편이거나 대체적으로는 쥐의, 키메릭 또는 인간화된 항체일 수 있다. 어떤 구체예에서, 본 발명의 항체는 반응의 비-경쟁적 기구에 의해 작용한다. 예를 들면, 바람직한 구체예에서, 항체는: (ⅰ) IFN 알파 2a와 같은 IFN 알파가 인터페론 알파 수용체(IFNAR)를 발현하는 세포에 결합하는 것을 억제하지 않고 (ii)IFN 알파 2a와 같은 IFN 알파의 존재하에서 IFNAR을 발현하는 세포에 결합한다.

일면으로, 본 발명은 :항체가

(a) 인간 VH 1-18 또는 4-61 유전자의 중 사슬 가변 지역을 포함하고;

(b) 인간 A27 유전자의 경 사슬 가변 지역을 포함하고;

(c) 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제하는(예를 들면, 적어도 하나의 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하는):

분리된 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다.

다른 일면으로, 본 발명은 CDR1, CDR2, 및 CDR3서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역과 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서

(a) 중 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 7, 8, 또는 9의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함하고;

(b) 경 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 16, 17, 또는 18의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함하고;

(c) 항체가 여러 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하나 IFN 알파 21의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않고;

(d) 항체가

(ⅰ) 항체가 IFN 베타 또는 IFN 오메가의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는다;

(ii) 항체가 말초 혈액 단일핵 세포에서 CD38 또는 MHC 클래스 I의 IFN-유도 표면 발현을 억제한다;

(iii) 항체가 말초 혈액 단일핵 세포에 의한 IP-10의 IFN-유도 발현을 억제한다;

(iv) 항체가 전신 홍반성 낭창(SLE) 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제한다:의 성질들 중 적어도 하나를 나타내는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다.

그러한 항체에서, 중 사슬 가변 지역 CDR2 서열은 SEQ ID NO: 4, 5, 또는 6의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함할 수 있고; 경 사슬 가변 지역 CDR2 서열은 SEQ ID NO: 13, 14, 또는 15의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함할 수 있다. 더욱이, 그러한 항체에서 중 사슬 가변 지역 CDR1 서열은 SEQ ID NO: 1, 2, 또는 3의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함할 수 있고; 경 사슬 가변 지역 CDR1 서열은 SEQ ID NO: 10, 11, 또는 12의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함할 수 있다.

다른 일면으로, 본 발명은 중 사슬 가변 지역과 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서

(a) 중 사슬 가변 지역은 SEQ ID NO: 19, 20, 또는 21에 적어도 80%가 동일한 아미노산 서열을 포함하고;

(b) 경 사슬 가변 지역은 SEQ ID NO: 22, 23, 또는 24에 적어도 80%가 동일한 아미노산 서열을 포함하고;

(c) 항체가 여러 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하나 IFN 알파 21의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않고;

(d) 항체가

(ⅰ) 항체가 IFN 베타 또는 IFN 오메가의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는다;

(ii) 항체가 말초 혈액 단일핵 세포에서 CD38 또는 MHC 클래스 I의 IFN-유도 표면 발현을 억제한다;

(iii) 항체가 말초 혈액 단일핵 세포에 의한 IP-10의 IFN-유도 발현을 억제한다;

(iv) 항체가 전신 홍반성 낭창(SLE) 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제한다:의 성질들 중 적어도 하나를 나타내는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다.

다른 일면으로, 본 발명은 중 사슬 가변 지역과 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서

(a) 중 사슬 가변 지역은 SEQ ID NO: 19, 20, 또는 21의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하고;

(b) 경 사슬 가변 지역은 SEQ ID NO: 22, 23, 또는 24의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하고;

항체가 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제하는(예를 들면, 적어도 하나의 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하는):

분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다.

또 다른 일면으로, 본 발명은 증가된 안정성을 갖는 SEQ ID NO: 19의 돌연변이 변종에 관한 것이다. 바람직한 구체예에는

(a) SEQ ID NOs: 34, 35, 36 및 37로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및

(b) SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역;을 포함하고,

항체가 적어도 하나의 인터페론 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 포함된다.

또 다른 일면으로, 본 발명은

(a) SEQ ID NOs: 1, 2, 및 3으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;

(b) SEQ ID NOs: 4, 5, 및 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;

(c) SEQ ID NOs: 7, 8, 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;

(d) SEQ ID NOs: 10, 11 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;

(e) SEQ ID NOs: 13, 14, 및 15로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및

(f) SEQ ID NOs: 16, 17, 및 18로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함하고;

항체가 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제하는(예를 들면, 적어도 하나의 IFN 알파 서브타입의 생물학적

활성을 억제하는) 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다.

또 다른 일면으로, 본 발명은 임의의 상기 언급한 항체와 IFN 알파 2a 또는 IFN 알파 2b에 대한 결합을 경쟁하는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다.

또 다른 일면으로, 본 발명은 항체가 인터페론 알파 수용체(IFNAR)-발현 세포에 대한 IFN 알파의 결합을 억제하지 않으며, 항체가 IFN 알파의 존재하에서는 IFNAR-발현 세포와 결합하고 부재 하에서는 결합하지 않고, 여러 인터페론(IFN) 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하는, 분리된 인간 항체 또는 그의 항원-결합 부분에 관한 것이다.

본 발명은 또한 임의의 상기 언급한 항체로 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 암호화하는 핵산 분자를 포함한다.

본 발명의 항체는 임의의 아이소타입일 수 있다. 바람직한 항체는 IgG1 또는 IgG4 아이소타입이다. 본 발명의 항체는 가변 및 일정 지역을 포함하는 전-길이 항체일 수 있으며, 이들은 단일 사슬 항체 또는 Fab 단편과 같은 그의 항원-결합 단편일 수 있다.

본 발명은 또한 항체가 세포독성 또는 방사성 동위원소와 같은 치료제에 결합되는, 본 발명의 항체의 면역접합체를 포함한다. 본 발명은 또한 항체가 항체와는 다른 결합 특성을 갖는 둘째의 기능 부분에 결합되는, 본 발명의 항체를 포함하는 이중특이성 분자를 포함한다.

항체 또는 그의 항원 결합 부분, 또는 면역접합체 또는 그의 이중특이성 분자를 포함하는 제약 조성물도 제공된다. 그러한 제약 조성물은 활성제와 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.

다른 일면으로, 본 발명은 인터페론 알파의 생물학적 활성이 억제되도록 인터페론 알파를 본 발명의 항-IFN 알파 항체와 접촉시키는 것을 포함하는 생체내 또는 시험관내에서 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제하는 방법을 포함한다.

다른 일면으로, 본 발명은 환자의 인터페론-알파 매개 질병이 치료되도록 본 발명의 항-IFN 알파 항체를 환자에 투여하는 것을 포함하는 환자의 인터페론-알파 매개 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 포함한다. 치료할 수 있는 질병의 예에는 자기면역병(예를 들면, 전신 홍반성 낭창, 다발성 경화증, 인슐린 의존성 당뇨, 염증성 장 질환, 건선, 자기면역 갑상선염, 류마티스성 관절염 및 사구체신염), 이식 거부증 및 이식 숙주 반응이 포함된다.

본 발명의 다른 특징 및 장점들은 제한하는 것으로 해석되지 않는 다음의 상세한 설명과 실시예로 분명해질 것이다. 본 출원에 인용된 모든 참고자료, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 참고로 여기에 밝혀 포함시킨다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 IFN 알파에 결합하고 여러 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성은 억제하나 IFN 알파 서브타입 21, 또는 IFN 베타 또는 IFN 오메가의 생물학적 활성은 억제하지 않는 분리된 모노클론 항체에 관한 것이다. 본 발명의 항체는 IFN 알파에 의해 유도된 세포 마커의 표면 발현을 억제하고, IFN 알파에 의해 유도된 IP-10 발현을 억제하고, 전신 홍반성 낭창(SLE) 환자의 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제할 수 있다. 본 발명은 분리된 항체, 그러한 항체를 만드는 방법, 그러한 항체를 포함하는 면역접합체 및 이중특이성 분자 및 본 발명의 항체, 면역접합체 또는 이중특이성 분자를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 예를 들면 자기면역 병의 치료, 또는 이식 거부의 억제 또는 방지, 또는 이식 숙주 반응치료에 있어서, IFN 알파 활성을 억제하는데 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위해서 어떤 용어는 먼저 정의하였다. 부가적인 정의는 상세한 설명을 통해 주어질 것이다.

"인터페론 알파" 및 "IFN 알파"라는 용어는 번갈아 사용되며, IFN 알파 1과 75%이상 서열이 동일한 인터페론 알파 유전자 위치의 기능 유전자에 의해 암호화되는 IFN 알파 단백질을 언급하는 것으로 의도되었다.(겐뱅크 번호 NP_076918 또는 겐뱅크 번호 NM_024013에 의해 암호화되는 단백질). IFN 알파 서브타입의 예에는 IFN 알파 1, 알파 2a, 알파 2b, 알파4, 알파5, 알파6, 알파7, 알파8, 알파10, 알파13, 알파14, 알파16, 알파17 및 알파21가 포함된다. 인터페론 알파라는 용어는 여러 가지 IFN 알파 서브타입의 재조합 형태 뿐만 아니라, 백혈구 IFN 및 림파아구증 IFN와 같은 IFN 알파 단백질을 포함하는 자연적으로 발생하는 조제물을 포함하는 것

으로 의도된다. IFN 알파라는 용어는, IFN 알파 및 IFN 오메가 둘다를 포함하는 조성물이 IFN 알파라는 용어에 포함되는데도 불구하고, IFN 오메가 만을 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

여기서 사용되는 "IFN 알파 수용체"라는 용어는 리간드 IFN 알파의 수용체인 분자의 다수의 IFN 알파 수용체 집단을 언급하는 것으로 의도된다. IFN 알파 수용체의 예에는 IFN 알파 수용체 1 및 IFN 알파 수용체 2가 있다.

"면역 반응"이란 용어는 병원체가 침입한 인체, 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 암세포 또는 자기면역 또는 병적 염증의 정상적인 인간 세포 또는 조직의 경우에 선택적인 손상, 파괴 또는 제거를 초래하는 예를 들면 림프톨, 항원 제공 세포, 식세포, 과립성 백혈구 및 상기 세포나 간으로부터 생성된 용해성 거대분자(항체, 시토킨 및 보체를 포함하는)의 작용을 말한다.

"신호 형질도입 통로"는 세포의 한 부분에서 세포의 다른 부분으로 신호를 전달하는 역할을 하는 여러 가지 신호 형질도입 분자사이의 생화학적 관계를 말한다. 여기서 사용된 세포 표면 수용체는 예를 들면 신호를 받고 세포의 원형질막사이로 그러한 신호를 전달할 수 있는 분자 및 분자의 복합체를 포함한다. 본 발명의 세포 표면 수용체의 예에는 IFN 알파 수용체 1 및 IFN 알파 수용체 2가 있다.

여기서 언급된 "항체"라는 용어는 전체 항체 및 임의의 항원 결합 단편(즉, 항원-결합 부분) 또는 그의 단일 사슬을 포함한다. 항체는 디설파이드 결합에 의해 상호-연결된 적어도 두 개의 중(H) 사슬 및 두 개의 경(L) 사슬을 포함하는 글리코단백질을 말한다. 각각의 중 사슬은 중 사슬 가변 지역(여기에서는 V_H로 약함)과 중 사슬 일정 지역으로 구성되어 있다. 중 사슬 일정 지역은 세 개의 영역, C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}으로 구성되어 있다. 각각의 경 사슬은 경 사슬 가변 지역(여기에서는 V_L로 약함)과 경 사슬 일정 지역으로 구성되어 있다. 경 사슬 일정 지역은 하나의 영역, C_L로 구성되어 있다. V_H 및 V_L 지역은 고가변성의 지역, 상보성 결정 지역(CDR), 더욱 보존되는 군데군데 끼워 넣어진 지역, 골격 지역(FR)으로 더욱 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L는 다음 순서로: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 아미노-말단에서부터 카르복시-말단으로 배열된 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 구성되어 있다. 중 및 경 사슬의 가변 지역은 항원과 작용하는 결합 지역을 포함한다. 항체의 일정 지역은, 면역계의 여러 가지 세포(예를 들면, 효과기세포) 및 고전적인 보체계의 첫 번째 성분(C1q)을 포함하며, 숙주 조직 또는 인자에 면역글로불린이 결합하는 것을 매개할 수 있다.

여기서 사용된 항체의 "항원-결합 부분"(또는 간단히 항체 부분)이라는 용어는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 항체(예를 들면, IFN 알파)의 하나 또는 그 이상의 단편을 말한다. 항체의 항원-결합 기능은 전-길이 항체에 의해 수행될 수 있음이 나타났다. 항체의 항원-결합 부분이라는 용어 내에 포함된 결합 단편의 예에는 (i) V_L V_H C_L 및 C_H 영역들로 구성된 일가 단편, Fab 단편; (ii) 이음 지역에서 디설파이드 다리로 결합된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편, $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 영역들로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 V_L 및 V_H 영역들로 구성된 Fv 단편, (v) V_H 영역으로 구성된 dAb 단편(왈드 등(1989) Nature 341:544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 지역(CDR)이 포함된다. 그러한 단일 사슬 항체는 또한 항체의 항원-결합 부분에 포함되는 것으로 의도된다. 이들 항체 단편들은 당업자에 잘 알려진 통상적인 기술을 사용하여 얻어지며, 온전한 항체와 동일한 방법으로 사용을 위해 선별한다.

여기서 사용된 "분리된 항체"는 다른 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 언급하는 것으로 의도된다(예를 들면, IFN 알파에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 IFN 알파이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나 IFN 알파에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종으로부터의 IFN 알파 분자와 같은 다른 항원에 상호-반응성을 갖는다. 더욱이, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학제가 없다.

여기서 사용된 "모노클론 항체" 또는 "모노클론 항체 조성물"이란 용어는 단일 분자 조성물의 항체 분자의 제조물을 언급한다. 모노클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 단일 결합 특이성과 친화성을 나타낸다.

여기서 사용된 "인간 항체"라는 용어는 골격 및 CDR 지역 둘 다가 인간 생식계열 면역 글로불린 서열로부터 유도된 가변 지역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 더욱이 항체가 일정 지역을 포함한다면, 일정 지역은 또한 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들면, 시험관내에서의 임의의 또는 자리-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내에서의 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이). 그러나 여기서 사용된 "인간 항체"라는 용어는 쥐와 같은 다른 포유류 종의 생식계열로부터 유도된 CDR 서열이 인간 골

격 서열에 이식된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

"인간 모노클론 항체"라는 용어는 골격 및 CDR 지역 둘 다가 인간 생식계열 면역 글로불린 서열로부터 유도된 가변 지역을 갖는 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 말한다. 한 구체예에서 인간 모노클론 항체는 인간 중사슬 이식 유전자와 죽지 않은 세포에 접합된 경 사슬 이식 유전자를 포함하는 유전자 이식 비인간 동물, 예를 들면 유전자 이식 쥐로부터 얻어진 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다.

여기서 사용된 "재조합 인간 항체"라는 용어는 (a)인간 면역 글로불린 유전자의 유전자 이식 또는 염색체 이식 또는 그로부터 제조된 하이브리도마인 동물(예를 들면, 쥐)로부터 분리된 항체(아래에 더욱 기술됨), (b)인간 항체를 발현하기위해서 형질 전환된 숙주 세포 예를 들면, 트란스펙토마로부터 분리된 항체, (c)재조합, 결합 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체, 및 (d)인간 면역 글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 짜깁기하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조된, 발현된, 만들어진 또는 분리된 항체와 같은 재조합 수단에 의해 제조된, 발현된, 만들어진 또는 분리된 모든 인간 항체를 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체는 골격 및 CDR 지역이 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 지역을 갖는다. 그러나 어떤 구체예에서, 그러한 재조합 인간 항체는 시험관내에서 돌연변이가 유발될 수 있으며(또는 인간 Ig 서열의 동물 유전자 이식이 사용될 때, 생체 내에서의 체세포 돌연변이 유발) 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 지역의 아미노산 서열이 인간 생식계열 V_H 및 V_L 서열에 연관되고 이로부터 유도되는 한편 생체 내에서 인간 항체 생식계열 목록 내에 자연적으로 존재하지 않는 서열이다.

여기서 사용된 "아이소타입"은 중 사슬 일정 지역 유전자에 의해 암호화되는 항체 클래스(예를 들면, IgM 또는 IgG1)를 말한다.

여기서 사용된, IFN 알파 서브타입의 "생물학적 활성을 억제하는" 항체는 예를 들면 다우디 세포 증식 분석과 같은, 실시예에 기술된 것과 같은 기능 분석을 사용하여, 항체의 부재시의 활성의 수준에 비교하여 적어도 10%, 더욱 바람직하게는 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%로 서브타입의 활성을 억제하는 항체를 말한다. 대체적으로, IFN 알파 서브타입의 "생물학적 활성을 억제하는" 항체는 200nM 이하, 더욱 바람직하게는 100nM 이하, 더더욱 바람직하게는 50nM 이하, 및 더더욱 바람직하게는 10 nM 이하의 EC_{50}을 갖는 서브타입의 활성을 억제하는 항체를 말한다.

여기서 사용된, IFN 알파 서브타입, 또는 IFN 베타 또는 IFN 오메가의 "생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는" 항체는 10%미만, 더욱 바람직하게는 5%미만 및 더더욱 바람직하게는 원래 감지할 수 없는 양으로 그 서브타입의 활성을 억제하는 항체를 말하는 것으로 의도된다. 대체적으로, IFN 알파 서브타입의 "생물학적 활성을 억제하지 않는" 항체는 300nM 이상의 EC_{50}을 갖는 서브타입의 활성을 억제하는 항체를 말한다.

여기서 사용된, "특이적 결합"은 미리 결정된 항원에 결합하는 항체를 말한다. 전형적으로, 항체는 10^{-8}M 이하의 분리 상수(K_D)로 결합하고 미리 결정된 항원 또는 밀접하게 연관된 항원이외의 비-특이적 항원(예를 들면, BSA, 카제인)에 결합할 때는 그의 K_D보다 적어도 두배 적은 K_D로 미리 결정된 항원에 결합한다. "항원 인식 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 여기서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어로 대체적으로 사용된다.

여기서 사용된, K_{assoc} 또는 K_a 는 특정 항체-항원 상호작용의 결합율을 말하는 것으로 의도되는 한편. 여기서 사용된, K_{dis} 또는 K_d 는 특정 항체-항원 상호작용의 분리율을 말하는 것으로 의도된다. 여기서 사용된, K_D는 K_a 에 대한 K_d 의 비율(즉, K_d/K_a)로 얻어지는 분리상수로 모랄 농도(M)로 나타내는 것으로 의도된다. 항체의 K_D 값은 이 기술 분야에 잘 알려진 방법으로 결정할 수 있다. 항체의 KD를 결정하는 바람직한 방법은 표면 세포질 유전자 공명을 사용하는, 바람직하게는 Biacore?? 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하는 것이다.

여기서 사용된, IgG 항체의 "높은 친화성"이란 용어는 10^{-8}M 이하, 더욱 바람직하게는 10^{-9}M 이하, 더더욱 바람직하게는 10^{-10}M 이하의 K_D 를 갖는 항체를 말한다. 그러나 "높은 친화성" 결합은 다른 항체 아이소타입에 따라 변할 수 있다. 예를 들면, IgG 아이소타입에 대한 "높은 친화성" 결합은 10^{-7}M 이하, 더욱 바람직하게는 10^{-8}M 이하의 KD 를 갖는 항체를 말한다.

여기서 사용된, "환자"라는 용어는 임의의 인간 또는 인간이 아닌 동물을 포함한다. "인간이 아닌 동물"이란

용어는 인간이 아닌 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등과 같은, 예를 들면, 포유류 및 비-포유류의 모든 척추동물을 포함한다.

본 발명의 여러 가지 면들은 다음의 하부항목에서 더욱 상세히 기술한다.

항-IFN 알파 항체

본 발명의 항체는 항체의 특별한 기능적 특성 또는 성질에 의해 특징 지워진다. 예를 들면, 특정 구체예에서, 본 항체는 IFN 알파 2a 및 IFN 알파 2b와 같은 IFN 알파의 여러 서브타입에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 예를 들면 10^{-8}M 이하, 또는 10^{-9}M 이하, 또는 10^{-10}M 이하의 K_D로, 높은 친화성을 갖는 IFN 알파 2a 및/또는 IFN 알파 2b에 결합한다. 바람직한 구체예에서, 본 항체는 인간 IFN 알파 2a 및 인간 IFN 알파 2b에 결합한다. 본 발명의 항체의 결합 친화력 및 역학은 예를 들면 실시예에 기술된 바와 같은 비아코어 분석에 의해 검사할 수 있다.

더욱이 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 여러 가지 기능적 성질을 나타냈다. 예를 들면, 본 항체는 여러 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성은 억제하나 IFN 알파 21의 생물학적 활성은 실질적으로 억제하지 않을 수 있다. 본 항체는 또한 IFN 베타 또는 IFN 오메가의 생물학적 활성은 실질적으로 억제하지 않는다. 본 발명의 항체는 또한 정상의 인간 말초 혈액 단일핵 세포상에 CD38 또는 MHC 클래스I과 같은, 세포 마커의 IFN-유도 발현을 억제할 수 있다. 본 항체는 또한 정상의 인간 말초 혈액 단일핵 세포에 의한 IP-10의 IFN-유도 발현을 억제할 수 있다. IFN 알파 서브타입, IFN 베타 및/또는 IFN 오메가의 생물학적 활성 억제는 다우디 세포 증식 분석과 같은, 실시예에 기술된 것들과 같은 기능 분석을 사용하여 평가할 수 있다.

더 나아가, 본 항체는 전신 홍반성 낭창(SLE) 환자의 혈장으로 매개된 수지상 세포의 발달을 억제할 수 있다. 수지상 세포의 발달은 실시예에 기술된 바와 같이, CD38, MHC 클래스 I 및/또는 CD123과 같은 세포 표면 마커의 발현을 검사함으로 평가할 수 있다.

어떤 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는 비-경쟁적 작용 기구에 의해 IFN 알파의 생물학적 활성을 억제한다, 즉 항체가 IFNAR에 대한 IFN 알파의 결합에 대해 경쟁하지 않는다. 오히려, 그러한 항체는 IFN 알파 존재 하에서 세포-표면 IFNAR과 결합하여 IFNAR을 통한 세포 신호표시를 억제한다. 다른 바람직한 구체예에서, 이런 결합 성질을 갖는 항체는 중대한 ADCC 활성을 나타내지 않는다. 항체의 기능적 성질을 검사하는 분석들은 이 기술분야에 알려져 있고, 실시예8 및 9에 기술된 분석들이 있다. 예를 들면, IFNAR-발현 세포에 대한 방사능 표지된 IFN 알파의 결합을 억제하는 항체의 능력을 검사할 수 있다. IFNAR에 대한 방사능 표지된 IFN 알파의 결합을 억제하는 항체의 무능력함은 비-경쟁적 작용 기구로 표시된다. 이러한 작용 기구를 더욱 검사하기 위해서, IFN 알파의 존재 하 또는 부재 하에서, IFNAR-발현 세포에 대한 방사능 표지된 항체의 결합을 평가할 수 있다. IFN 알파의 존재 하에서는 IFNAR-발현 세포에 대해 방사능 표지된 항체가 결합하나 부재하에서는 결합하지 않음이 이 작용 기구의 표시이다.

한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는 IFN 알파만의(하나 또는 그 이상의 서브타입) 및/또는 IFNAR 만의 것보다 더욱 큰 친화성(예를 들면, K_D)을 갖는 IFN 알파-IFNAR 복합체에 결합한다. 예를 들면, 어떤 구체예에서, 본 발명의 항체는 10^{-8}M 이상의 K_D 친화성, 10^{-9}M 이상의 K_D 친화성, 또는 10^{-10}M 이상의 K_D 친화성을 갖는 IFN 알파-IFNAR 복합체에 결합한다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는, 항체가 IFN 알파 및 IFNAR(IFNAR1 및/또는 IFNAR2) 둘 다와 결합하는 것을 의미하는, IFN 알파(하나 또는 그 이상의 서브타입) 및 IFNAR(IFNAR1 및/또는 IFNAR2)에 대해 이중 특이성을 갖는다. 따라서, 본 발명은 IFN 알파에 대한 적어도 하나의 첫 번째 결합 특이성과 IFNAR1에 대한 두 번째 결합 특이성을 갖는 이중 특이성 분자를 포함하며, 여기서 예를 들면, IFNAR1에 대한 두 번째 결합 특이성은 IFN 알파와 항체의 결합에 의해 형성될 수 있다. 본 발명은 또한 IFN 알파에 대한 적어도 하나의 결합 특이성과 IFNAR2에 대한 두 번째 결합 특이성을 갖는 이중 특이성 분자를 포함하며, 여기서 예를 들면, IFNAR2에 대한 두 번째 결합 특이성은 IFN 알파와 항체의 결합에 의해 형성될 수 있다.

모노클론 항체 13H5, 13H7 및 7H9

본 발명의 바람직한 항체는 실시예에 기술된 바와 같이 분리되고 특징 지워진 인간 모노클론 항체 13H5, 13H7 및 7H9이다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_H 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NOs: 19, 20 및 21에 나타냈다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_L 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NOs: 22, 23 및 24에 나타냈다. 각각의 이들 항체가 IFN 알파

에 결합할 수 있게 되면, V_H 및 V_L 서열들은 "혼합되고 연결되어" 본 발명의 다른 항-IFN 알파 결합 분자들을 만들 수 있다. 그러한 "혼합되고 연결된" 항체들의 IFN 알파 결합 또는 중화 활성은 실시예에서와(예를 들면, ELISA, 비아코어(Biacore) 분석, 다우디 세포 평가) 상기에 기술된 결합 평가를 사용하여 시험할 수 있다. 바람직하게는, 13H5 및 7H9의 V_H 서열이 혼합되고 연결되며, 이들 항체가 동일한 생식계열 서열(VH1-18)로부터 유도된 V_H 서열을 사용하므로 이들은 구조 유사성을 나타낸다. 부가적으로 또는 대체적으로, 13H5, 13H7 및 7H9의 V_L 서열이 혼합되고 연결되며, 이들 항체가 동일한 생식계열 서열(V_KA27)로부터 유도된 V_L 서열을 사용하므로 이들은 구조 유사성을 나타낸다.

따라서, 일면으로 본 발명은

(a) SEQ ID NOs: 19, 20, 및 21로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및

(b) SEQ ID NOs: 22, 23, 및 24로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역;을 포함하고: 여기서

항체가 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제하는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

바람직한 중 및 경 사슬 조합에는:

(a) SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및

(b) SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역; 또는

(a) SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및

(b) SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역; 또는

(a) SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및

(b) SEQ ID NO: 24의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역이 포함된다.

다른 일면으로, 본 발명은 13H5, 13H7 및 7H9의 중 사슬 및 경 사슬 CDR1s, CDR2s, 및 CDR3s 또는 그의 조합물을 포함하는 항체를 제공한다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_H CDR1s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 1, 2, 및 3에 나타냈다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_H CDR2s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 4, 5, 및 6에 나타냈다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_H CDR3s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 7, 8, 및 9에 나타냈다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_L CDR1s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 10, 11, 및 12에 나타냈다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_L CDR2s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 13, 14, 및 15에 나타냈다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_L CDR3s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 16, 17, 및 18에 나타냈다. CDR 지역은 카뱉 시스템을 사용하여 나타냈다(카뱉. E. A., 등(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Departme丅t of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)

각각의 이들 항체가 IFN 결합 활성을 기준으로 하여 선택되고 항원-결합 특이성이 CDR1,2 및 3지역에 의해 일차적으로 제공되면, V_H CDR1, 2 및 3 서열과 V_L CDR1, 2 및 3서열이 혼합되고 연결되어(즉, 각각의 항체가 V_H CDR1, 2 및 3과 V_L CDR1, 2 및 3을 함유해야함에도 불구하고, 서로 다른 항체로부터의 CDRs가 혼합되고 연결될 수 있다) 본 발명의 다른 항-IFN 알파 분자를 생성할 수 있다. 그러한 혼합되고 연결된 항체의 IFN 알파 결합은 실시예에 기술된(예를 들면, ELISA 및/또는 비아코어) 결합 분석를 사용하여 시험할 수 있다. 바람직하게는 V_H CDR 서열들이 혼합되고 연결될 때, 특정 V_H 서열로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열이 구조적으로 유사한 CDR 서열들로 대치될 수 있다. 유사하게, V_L CDR 서열들이 혼합되고 연결될 때, 특정 V_L 서열로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열이 바람직하게는 구조적으로 유사한 CDR 서열들로 대치될 수 있다. 예를 들면, 13H5 및 7H9의 V_H CDR1s가 일부 구조적 유사성을 공유하므로 혼합되고 연결되는 것이 용이하다. 모노클론 항체 13H5, 13H7 및 7H9에 대해 여기에 나타낸 CDR 서열과 구조적으로 유사한 서열로 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L CDR 지역 서열이 치환됨으로 신규의 V_H 및 V_L 서열이 생성될 수 있음이 당업자에게는 자명하다.

따라서, 다른 일면으로, 본 발명은

(a) SEQ ID NOs: 1, 2, 및 3으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;

(b) SEQ ID NOs: 4, 5, 및 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;

(c) SEQ ID NOs: 7, 8, 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;

(d) SEQ ID NOs: 10, 11 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;

(e) SEQ ID NOs: 13, 14, 및 15로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및

(f) SEQ ID NOs: 16, 17, 및 18로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함하고;

항체가 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제하는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

한 바람직한 구체예에서, 항체는

(a) SEQ ID NO: 1을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;

(b) SEQ ID NO: 4를 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;

(c) SEQ ID NO: 7을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;

(d) SEQ ID NO: 10을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;

(e) SEQ ID NO: 13을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및

(f) SEQ ID NO: 16을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함한다.

다른 바람직한 구체예에서, 항체는

(a) SEQ ID NO: 2를 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;

(b) SEQ ID NO: 5를 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;

(c) SEQ ID NO: 8을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;

(d) SEQ ID NO: 11을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;

(e) SEQ ID NO: 14를 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및

(f) SEQ ID NO: 17을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함한다.

다른 바람직한 구체예에서, 항체는

(a) SEQ ID NO: 3을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;

(b) SEQ ID NO: 6을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;

(c) SEQ ID NO: 9를 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;

(d) SEQ ID NO: 12를 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;

(e) SEQ ID NO: 15를 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및

(f) SEQ ID NO: 18을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함한다.

특정 생식계열 서열을 갖는 항체

어떤 구체예에서, 본 발명의 항체는 특정 생식계열 중 사슬 면역글로불린 유전자로부터의 중 사슬 가변 지역

및/또는 특정 생식계열 경 사슬 면역글로불린 유전자로부터의 경 시슬 가변 지역을 포함한다.

예를 들면, 한 바람직한 구체예에서, 본 발명은: 항체가

(a) 인간 VH 1-18 또는 4-61 유전자의 중 사슬 가변 지역을 포함하고;

(b) 인간 Vk A27 유전자의 경 사슬 가변 지역을 포함하고;

(c) 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제하는:

분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

한 구체예에서, 항체는 인간 VH 1-18 유전자의 중 사슬 가변 지역을 포함한다. VH 1-18 및 Vk A27의 VH 및 Vk 유전자 서열을 갖는 항체의 예에는 각각 13H5 및 7H9이 포함된다. 다른 구체예에서, 항체는 인간 VH 4-61 유전자의 중 사슬 가변 지역을 포함한다. VH 4-61 및 Vk A27의 VH 및 Vk 유전자 서열을 갖는 항체의 예는 각각 13H7이다.

여기서 사용된, 인간 항체는 항체의 가변 지역이 인간 생식계열 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 얻은 것이라면, 특정 생식계열 서열의(즉, 의 생성물) 또는 로부터 유도된 중 또는 경 사슬 가변 지역을 포함한다. 그러한 시스템은 관심 있는 항원으로 인간 면역글로불린 유전자를 옮기는 유전자 이식 쥐를 면역시키거나 또는 관심 있는 항원으로 파아지에 전시한 인간 면역글로불린 유전자를 스크린하는 것을 포함한다. 인간 생식계열 면역글로불린 서열의(즉, 의 생성물) 또는 로부터 유도된 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 생식계열 면역글로불린의 아미노산 서열에 비교하고 인간 항체의 서열에 근접한(즉, 가장 큰 %의 동일성) 인간 생식계열 면역글로불린 서열을 선택함으로 확인할 수 있다. 특정 인간 생식계열 면역글로불린 서열의(즉, 의 생성물) 또는 로부터 유도된 인간 항체는 예를 들면, 자연적으로-발생하는 체세포 돌연변이 또는 위치-지적 돌연변이의 의도된 도입에 의해, 생식계열 서열에 비교하여 다른 아미노산을 포함할 수 있다. 그러나 선택된 인간 항체는 전형적으로 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 아미노산 서열이 적어도 90% 동일하고 다른 종의 생식계열 면역글로불린 아미노산 서열(예를 들면, 쥐의 생식계열 서열)에 비교할 때 인간으로 인간 항체와 동일한 아미노산 잔기를 포함한다. 어떤 경우에, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 아미노산 서열이 적어도 95% 또는 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%까지도 동일하다. 전형적으로, 특정 인간 생식계열 서열로부터 유도된 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 다른 아미노산이 10개에 지나지 않는다. 어떤 경우에, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 다른 아미노산이 5개 또는 4, 3, 2 또는 1개에 지나지 않는다.

동일한 항체

다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 여기에 기술된 바람직한 항체의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중 및 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서 항체는 본 발명의 항-IFN 알파 항체의 바람직한 기능적 성질을 유지한다.

예를 들면, 본 발명은 중 사슬 가변 지역과 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서

(a) 중 사슬 가변 지역은 SEQ ID NOs: 19, 20, 및 21로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 적어도 80%가 일치하는 아미노산 서열을 포함하고;

(b) 경 사슬 가변 지역은 SEQ ID NOs: 22, 23, 및 24로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 적어도 80%가 일치하는 아미노산 서열을 포함하고;

(c) 항체가 여러 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하나 IFN 알파 21의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않고;

(d) 항체가

(ⅰ) 항체가 IFN 베타 또는 IFN 오메가의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는다;

(ii) 항체가 말초 혈액 단일핵 세포에서 CD38 또는 MHC 클래스I의 IFN-유도 발현을 억제한다;

(iii) 항체가 말초 혈액 단일핵 세포에 의한 IP-10의 IFN-유도 발현을 억제한다;

(iv) 항체가 전신 홍반성 낭창(SLE) 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제한다:의 성질들 중

적어도 하나를 나타내는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

다른 구체예에서, V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열이 상기에 주어진 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 일치할 수 있다. SEQ ID NOs: 19, 20, 및 21 및 22, 23 및 24의 V_H 및 V_L 지역에 높은(즉, 80% 또는 그보다 더 큰) 일치성을 갖는 V_H 및 V_L 지역을 갖는 항체는 각각 SEQ ID NOs: 19, 20 및 21 및/또는22, 23, 및 24을 암호화하는 핵산 분자를 돌연변이시키고(예를 들면, 위치-지적 또는 PCR-매개 돌연변이 유발), 이어서 여기에 기술된 기능 분석을 사용하여 유지된 기능에 대해(즉, 상기 (c) 및 (d)에 주어진 기능들) 암호화된 개조 항체를 시험하여 얻어질 수 있다.

여기서 사용된 아미노산 서열들 사이의 일치성 퍼센트는 두 서열들 사이의 동일성 퍼센트와 등가이다. 두 서열들 사이의 동일성 퍼센트는 두 서열의 최적의 배열을 위해 도입되어야 할, 각각의 간격의 길이와 간격들의 수를 계산하여, 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수이다(즉, 일치성%=동일한 위치의 #/위치의 총# x100). 서열들의 비교와 두 서열사이의 동일성 퍼센트의 결정은 아래의 비제한 실시예에서 기술된 바와 같이, 수학적 연산을 사용하여 얻을 수 있다.

두 아미노산 서열 사이의 동일성 퍼센트는 PAM120가중치 유수표, 간격 길이 페널티 12 및 간격 페널티 4를 사용하는, ALIGN 프로그램(버젼 2)에 포함시킨 E. 메이어 및 W. 밀러(Comput. Appl. Biosci.,4:11-17(1988))의 연산을 사용하여 결정할 수 있다. 부가하면, 두 아미노산 서열사이의 동일성 퍼센트는 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 간격 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 5의 길이 가중치을 사용하는, GCG 소프트웨어 패키지의 GAP프로그램(http://www.gcg.com 에서 이용가능한)에 포함된 니들만과 운쉬의 연산(J. Mol. Biol. 48:444-453(1970))을 사용하여 결정할 수 있다.

부가적으로 또는 대체적으로, 본 발명의 단백질 서열은 예를 들면, 동일성 관련 서열들에 대해 공개적 데이터베이스에 대한 탐색을 수행하는데, "의문 서열"로 더욱 사용할 수 있다. 그러한 탐색은 알트슐, 등의 (1990)J. Mol. Biol. 215:403-10의 XBLAST 프로그램(버젼 2.0)을 사용하여 수행할 수 있다. BLAST 단백질 탐색은 본 발명의 항체 분자와 일치하는 아미노산 서열을 얻기 위해서 XBLAST 프로그램, 스코어=50, 워드렝쓰=3으로 행할 수 있다. 비교를 목적으로 하는 간격이 있는 배열을 얻기 위해, 알트슐, 등의 (1997)Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402에 기술된 바와 같이 간격이 있는 BLAST를 사용할 수 있다. BLAST 및 간격이 있는 BLAST 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램의(예를 들면, XBLAST 및 NBLAST) 애초의 매개변수를 사용할 수 있다. http://www.ncbi.nlm.nih.gov. 참조.

보존성 변형물을 갖는 항체

어떤 구체예에서, 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2, 및 CDR3서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역과 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서

하나 또는 그 이상의 CDR 서열은 여기에 기술된 바람직한 항체(예를 들면, 13H5, 13H7, 또는 7H9)를 기본으로 하는 특정의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함하고, 항체가 본 발명의 항-IFN 알파 항체의 바람직한 기능적 성질을 보유한다. 예를 들면, 본 발명의 바람직한 항체는 중 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함하고, 경 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함하는 것들이다. 따라서, 본 발명은 CDR1, CDR2, 및 CDR3서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역과 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서

(a) 중 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 7, 8, 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 그의 보존성 변형물을 포함하고;

(b) 경 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 16, 17, 및 18로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함하고;

(c) 항체가 여러 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성은 억제하나 IFN 알파 21의 생물학적 활성은 실질적으로 억제하지 않고;

(d) 항체가

(ⅰ) 항체가 IFN 베타 또는 IFN 오메가의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는다;

(ii) 항체가 말초 혈액 단일핵 세포에서 CD38 또는 MHC 클래스 I의 IFN-유도 표면 발현을 억제한다;

(iii) 항체가 말초 혈액 단일핵 세포에 의한 IP-10의 IFN-유도 발현을 억제한다;

(iv) 항체가 전신 홍반성 낭창(SLE) 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제한다:의 성질들 중 적어도 하나를 나타내는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

다른 구체예에서, 중 사슬 가변 지역 CDR2 서열은 SEQ ID NO: 4, 5, 및 6의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 그의 보존성 변형물을 포함하고; 경 사슬 가변 지역 CDR2 서열은 SEQ ID NO: 13, 14, 및 15의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 그의 보존성 변형물을 포함한다. 또 다른 구체예에서 중 사슬 가변 지역 CDR1 서열은 SEQ ID NO: 1, 2, 및 3의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 그의 보존성 변형물을 포함하고; 경 사슬 가변 지역 CDR1 서열은 SEQ ID NO: 10, 11, 및 12의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함한다.

여기서 사용된 "보존성 서열 변형물"이란 용어는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성에 중대하게 영향을 미치지 않거나 개조하지 않은 아미노산 변형물을 말한다. 그러한 보존성 변형물은 아미노산 치환, 첨가 및 삭제를 포함한다. 자리-지적 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이 유발과 같은 이 기술 분야에 알려진 표준 기술로 본 발명의 항체에 변형을 도입할 수 있다. 보존성 아미노산 치환물은 아미노산 잔기가 유사한 측면 사슬을 갖는 아미노산 잔기로 대치된 것 들이다. 유사한 측면 사슬을 갖는 아미노산 잔기의 집단은 이 기술 분야에 규정되어 있다. 이 집단에는 염기성 측면 사슬(예를 들면, 라이신, 알기닌, 히스티딘), 산성 측면 사슬(예를 들면, 아스팔트산, 글루타민산), 비전하 극성 측면 사슬(예를 들면, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측면 사슬(예를 들면, 알라닌, 발린, 로이신, 이소로이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-가지 측면 사슬(예를 들면, 트레오닌, 발린, 이소로이신) 및 방향족 측면 사슬(예를 들면, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 갖는 아미노산이 있다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 지역내의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측면 사슬 집단으로부터의 다른 아미노산 잔기로 대치될 수 있고, 개조된 항체는 여기에 기술된 기능 분석을 사용하여 보유 기능(즉, 상기 (c) 및 (d)에 주어진 기능들)을 시험할 수 있다.

본 발명의 항-IFN 알파 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체

다른 구체예에서, 본 발명은 여기에 기술된 13H5, 13H7 및 7H9 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 다른 인간 항체와 같은, 여기에 제공된 본 발명의 여러 인간 IFN 알파로 작용하는 동일한 에티토프에 결합하는 항체를 제공한다. 그러한 항체는 표준 IFN 알파 결합 분석에서 13H5, 13H7 또는 7H9와 같은 본 발명의 다른 항체와 서로 경쟁하는(예를 들면, 통계학적으로 중요한 방식으로, 결합을 경쟁적으로 억제하는) 능력을 기준으로 규명할 수 있다. 예를 들면, 비아코어 분석에 의해 실시예에서 나타낸바와 같이, 13H5는 IFN 알파 2a 및 IFN 알파 2b에 높은 친화성을 가지고 결합한다. 따라서, 한 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 다른 항체와(예를 들면, 13H5, 13H7 또는 7H9) IFN 알파 2a 및 IFN 알파 2b에 결합하는 것을 경쟁하는 항체, 바람직하게는 인간 항체를 제공한다. IFN 알파 2a 또는 IFN 알파 2b에 대한 예를 들면, 13H5, 13H7 또는 7H9의 결합을 억제하는 시험 항체의 능력은 시험 항체가 IFN 알파 2a 또는 IFN 알파 2b에 결합하는 것에 대해 그 항체와 경쟁할 수 있다;즉, 한 항체가, 비-제한 이론에 따라, 그것이 경쟁하는 항체로서 IFN 알파 2a 또는 IFN 알파 2b에서 동일한 또는 관련된(예를 들면, 구조적으로 유사한 또는 공간적으로 근접한) 에피토프에 결합할 수 있다는 것을 설명한다. 바람직한 구체예에서, 예를 들면, 13H5, 13H7 또는 7H9와 같은 IFN 알파 2a 또는 IFN 알파 2b에서 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 인간 모노클론 항체이다. 그러한 인간 모노클론 항체는 실시예에서 기술된 바와 같이 제조되고 분리될 수 있다.

제조되고 변형된 항체

본 발명의 항체는 변형된 항체가 출발 항체에 대해 개조된 성질을 갖는, 변형된 항체를 제조하기 위해, 출발 물질로서, 여기에 기술된 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열을 갖는 항체를 사용하여 제조할 수 있다. 항체는 하나 또는 둘의 가변 지역 내에서(즉 V_H 및/또는 V_L) 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 CDR 지역 내에서 및/또는 하나 또는 그 이상의 골격 지역 내에서 하나 또는 그 이상의 잔기를 변형시킴으로 제조될 수 있다. 부가적으로 또는 대체적으로 항체는 예를 들면, 항체의 효과기 기능을 개조하기 위해서, 일정 지역 내에서 잔기를 변형함으로 제조될 수 있다.

수행할 수 있는 가변 지역 제조의 한 유형은 CDR 이식이다. 항체는 6개의 중 및 경 사슬 상보성 결정 지역(CDR)내에 위치한 아미노산 잔기를 통해 목표 항원과 우세하게 상호작용한다. 이 이유로 인해, CDR 내의 아미

노산 서열은 CDR의 바깥쪽 서열보다 개개의 항체사이에서 더욱 다양하다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원 상호작용에 기여하므로 상이한 성질을 갖는 상이한 항체로부터의 골격 서열에 이식된 특정의 자연적으로 발생하는 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 조립함으로 특정의 자연적으로 발생하는 항체의 성질을 모방하는 재조합 항체를 발현시킬 수 있다.(예를 들면, 리치만, L. 등 (1998) Nature 332:323-327; 존스, P. 등 (1986) Nature 321:522-525; 퀸, C. 등 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; 윈터의 미국 특허번호 5,225,539, 및 퀸 등의 미국특허번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762및 6,180,370 참조).

따라서, 본 발명의 다른 구체예는 각각 SEQ ID NO: 1, 2, 및 3, SEQ ID NO:4, 5, 및 6 및 SEQ ID NO:7, 8 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 CDR1, CDR2, 및 CDR3서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역과 각각 SEQ ID NO:10, 11 및 12, SEQ ID NO:13, 14 및 15 및 SEQ ID NO:16, 17 및 18로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하는 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 따라서, 그러한 항체는 모노클론 항체 13H5, 13H7 또는 7H9의 V_H 및 V_L CDR 서열을 포함하고, 이들 항체로부터의 서로 다른 골격 서열도 포함할 수 있다.

그러한 골격 서열은 생식계열 항체 유전자 서열을 포함하는 출판된 참고문헌 또는 공개 DNA 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 예를 들면, 인간 중 및 경 사슬 가변 지역 유전자의 생식계열 DNA 서열은 "V베이스" 인간 생식계열 서열 데이터베이스(인터넷상에서 www.mrccpe.cam.ac.uk/vbase에서 얻을 수 있음), 뿐만 아니라 카뱉, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Education, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242; 톰린슨, I. M., 등 (1992) "the repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; 및 콕스, J. P. L. 등 (1994) "A Directory of Human Germ-lone V_H Segments Reveals s Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836;에서 발견할 수 있고, 그 각각의 내용은 참고로 여기에 특별히 포함시킨다.

본 발명의 항체에 사용되는 바람직한 골격 서열은 본 발명의 선택된 항체에 사용되는 골격 서열과 구조적으로 유사한, 예를 들면, 본 발명의 바람직한 모노클론 항체에 사용되는 VH1-18 또는 4-61 및 VK A27 골격 서열과 유사한 것들이다. V_H CDR1, 2 및 3 서열 및 V_L CDR1, 2 및 3 서열은 골격 서열이 유도된 생식계열 면역글로불린 유전자에서 발견된 것과 동일한 서열을 갖는 골격 지역에 이식될 수 있거나 또는 CDR 서열이 생식계열과 비교할 때 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함하는 골격 지역에 이식될 수 있다. 예를 들면, 몇몇 경우에 항체의 항원 결합 능력을 유지하거나 증진시키기 위해 골격 지역 내에서 잔기를 돌연변이시키는 것이 이롭다는 것이 발견되었다(예를 들면, 퀸 등의 미국 특허 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 참조).

가변 지역 변형의 다른 유형은 V_H 및/또는 V_L CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 지역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이시켜서, 이로써 관심있는 항체의 하나 또는 그 이상의 결합 성질(예를 들면, 친화성)을 개선한다. 자리-지적 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발로 돌연변이가 도입되고 항체 결합상 효과 또는 관심있는 다른 기능적 성질이 실시예에 제공되고 여기에 기술된 시험관내 또는 생체 내 분석으로 평가될 수 있다. 바람직하게는 보존성 변형물(상기한 것)이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 첨가, 또는 삭제이나, 바람직하게는 치환이다. 더욱이 전형적으로 기껏해야 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 잔기가 CDR 지역이 개조되는 내에서 개조된다.

따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NOs: 1, 2, 및 3으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 1, 2, 또는 3에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 지역;

(b) SEQ ID NOs: 4, 5, 및 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 4, 5, 또는 6에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 지역;

(c) SEQ ID NOs: 7, 8, 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 7, 8, 또는 9에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3 지역;

(d) SEQ ID NOs: 10, 11 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 10, 11 또는 12에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함

하는 V_L CDR1 지역;

(e) SEQ ID NOs: 13, 14, 및 15로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 13, 14, 또는 15에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2 지역; 및

(f) SEQ ID NOs: 16, 17, 및 18로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 16, 17, 또는 18에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3 지역을 포함하는; 중 사슬 가변 지역을 포함하는, 분리된 항-IFN 알파 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

본 발명의 제조된 항체에는 예를 들면, 항체의 성질을 개선하기 위해서, V_H 및/또는V_L 내의 골격 잔기에 변형이 행해진 것들이 포함된다. 전형적으로 그러한 골격 변형은 항체의 면역원성을 감소시킨다. 예를 들면, 한 접근법은 하나 또는 그 이상의 골격 잔기를 상응하는 생식계열 서열로 복귀돌연변이 시키는 것이다. 더욱 특히 체세포 돌연변이를 수행한 항체는 항체가 유도된 생식계열 서열과 다른 골격 잔기를 포함할 수 있다. 그러한 잔기는 항체가 유도된 생식계열 서열에 항체 골격 서열을 비교함으로 밝힐 수 있다. 예를 들면, 13H5에서, V_H의 아미노산 잔기 #81(FR3내에서)은 로이신인 반면, 상응하는 VH1-18 생식계열 서열내의 이 잔기는 메티오닌이다(도 4참조). 골격 지역 서열을 이들의 생식계열 배열로 되돌리기 위해서, 체세포 돌연변이를 예를 들면 자리-지적 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발에 의해 생식계열 서열로 복귀 돌연변이 시킬 수 있다(예를 들면, 13H5의 V_H의 잔기 81을 로이신에서 메티오닌으로 복귀돌연변이 시킬 수 있다. 그러한 복귀돌연변이된 항체는 또한 본 발명에 포함되는 것으로 한다.

골격 변형의 또 다른 유형은 항체의 잠재적 면역원성을 감소시키기 위해서 T 세포 에피토프를 제거하려고, 골격 지역 내에서 또는 하나 또는 그이상의 CDR 지역 내에서 하나 또는 그 이상의 잔기를 돌연변이시키는 것을 포함한다. 이 접근은 또한 탈면역화로도 언급되며, 칼 등의 미국 특허 공개 번호 20030153043에 상세히 기술되어 있다.

골격 또는 CDR 지역 내에 행한 변형에 부가 또는 대체하여, 본 발명의 항체는, 혈장 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존 세포독성과 같은 항체의 하나 또는 그 이상의 기능적 성질을 전형적으로 고치기위해서 Fc 지역 내에 변형을 하도록 제조될 수 있다. 더욱이 본 발명의 항체는 화학적으로 변형 시키거나(예를 들면, 하나 또는 그 이상의 화학성분을 항체에 부착시킬 수 있다) 또는 그의 글리코실화를 변경시키기 위해서 변형하여 다시 항체의 하나 또는 그 이상의 기능적 성질을 변경할 수 있다. 각각의 이들 구체예는 아래에 더욱 상세히 기술되어 있다. Fc 지역 내의 잔기 번호는 카뱉의 EU 인덱스의 것이다.

한 구체예에서, CH1의 이음 지역이 이음 지역 내의 시스테인 잔기의 수가 변경되게 예를 들면 증가하거나 감소하게 변형될 수 있다. 이 접근은 보드머 등의 미국 특허 번호 5,677,425에 더욱 기술되어 있다. CH1의 이음 지역 내의 시스테인 잔기의 수가 변경되어 예를 들면 경 및 중 사슬의 조립을 용이하게 하거나 항체의 안정성을 증가 또는 감소시킬 수 있다.

또 다른 구체예에서, 항체의 Fc 이음 지역이 돌연변이되어 항체의 생물학적 반감기가 감소된다. 더욱 특히 항체가 자연 Fc-이음 영역 SpA 결합에 대해 손상된 스타필로코실 단백질 A (SpA)를 갖도록 Fc-이음 단편의 CH2-CH3 영역 계면 지역에 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이가 도입된다. 이 접근은 왈드 등의 미국 특허 번호 6,165,745에 더욱 상세히 기술되어 있다.

또 다른 구체예에서, 항체는 그의 생물학적 반감기를 증가시키도록 변형된다. 예를 들면, 왈드의 미국 특허 번호 6,277,375에 기술된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 다음의 돌연변이가 도입된다: T252L, T254S, T256F. 대체적으로, 생물학적 반감기를 증가시키기 위해서, 항체를 프레스타 등의 미국 특허 번호 5,869,046 및 6,121,022에 기술된 바와 같이, IgG의 Fc 지역의 CH2 영역의 두 개의 루프로부터 취한 구제 수용체 결합 에피토프를 포함시키도록 CH1 또는 CL 지역 내에서 변경시킬 수 있다.

다른 구체예에서, Fc 지역은 항체의 효과기 기능을 변경시키기 위해서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 대치함으로 변경될 수 있다. 예를 들면, 항체가 효과기 리간드에 대해 변경된 친화성을 갖지만 모 항체의 항원-결합 능력을 유지하도록, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 다른 아미노산 잔기로 대치할 수 있다. 친화성이 변경된 효과기 리간드는 예를 들면, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이 접근은 윈터 등의 미국 특허 번호 5,624,821

및 5,648,260에 더욱 상세히 기술되어 있다.

다른 실시예에서, 아미노산 잔기 329, 331 및 322으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소 또는 폐지 보체 의존 세포 독성(CDC)을 갖도록 다른 아미노산 잔기로 대치될 수 있다. 이 접근은 이드소지 등의 미국 특허 번호 6,194,551에 더욱 상세히 기술되어 있다.

*다른 실시예에서, 아미노산 위치 231 및 239내의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 변경하여 이로서 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경할 수 있다. 이 접근은 보드머 등의 PCT 공개 WO 94/29351에 더욱 상세히 기술되어 있다.

또 다른 실시예에서, 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 또는 439의 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산을 변형시킴으로 Fcγ 수용체에 대한 항체의 친화성을 증가시키고/거나 항체 의존 세포 독성을 매개하는 항체의 능력을 증가시키도록 Fc 지역을 변형한다. 이 접근은 프레스타의 PCT 공개 WO 00/42072에 더욱 기술되어 있다. 더욱이 FcγRⅠ, FcγRⅡ, FcγRⅢ 및 FcRn의 인간 IgG 상의 결합 자리는 지도가 그려졌고, 결합이 증진된 변이도 기술되었다(실드, R.L. 등(2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604 참조). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339상의 특정 돌연변이는 FcγRⅢ 에 대한 결합을 증진시키는 것으로 나타났다. 부가하여, 다음의 조합 돌연변이들은 FcγRⅢ 결합을 증진시키는 것으로 나타났다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

또 다른 구체예에서, 항체의 글리코실화를 변형하였다. 예를 들면, 항글리코실화된 항체를 만들 수 있다(즉, 항체가 글리코실화가 결여된다). 글리코실화가 변경되어 예를 들면, 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 그러한 카보하이드레이트 변형은 예를 들면 항체 서열내의 글리코실화의 하나 또는 그 이상의 자리를 변경함으로 성취할 수 있다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 가변 지역 골격 글리코실화 자리를 제거하는 결과를 초래하게 되는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환이 행해져서 이로서 그 자리에서의 글리코실화를 제거할 수 있다. 그러한 항글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 그러한 접근은 코 등의 미국 특허 번호 5,714,350 및 6,350,861에 더욱 상세히 기술되어 있다.

부가하여 또는 대체적으로, 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 하이포푸코실화 항체 또는 증가된 이분 GlcNac 구조를 갖는 항체와 같은 글리코실화의 변경된 유형을 갖는 항체를 만들 수 있다. 그러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증진시키는 것으로 나타났다. 그러한 카보하이드레이트 변형은, 예를 들면, 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현시킴으로 성취할 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 이 기술 분야에 기술되어 있으며, 본 발명의 재조합 항체를 발현시켜서 이로서 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생산하기 위해 숙주 세포로 사용될 수 있다. 예를 들면, 하나이 등의 EP 1,176,195에는 세포주 내에서 발현된 항체가 하이포푸코실화를 나타내는, 푸코실 전이효소를 암호화하는, FUT8 유전자가 기능상 찢겨진 세포주가 기술되어 있다. 프레스타의 PCT 공개 WO03/035835에는 Asn(297)-연결 카보하이드레이트에 푸코오스를 부착시키는 능력이 감소되어, 숙주 세포에서 발현된 항체의 하이포푸코실화를 초래하는 변이 CHO 세포주, Lec 13 세포가 기술되어 있다.(또한 쉴드, R.L. 등, (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740을 보라) 우마나 등의 PCT 공개 WO 99/54342에는 제조된 세포주에서 발현된 항체가 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 증가된 이분 GlcNac 구조를 나타내도록 글리코프로테인-변형 글리코실 전이효소(예를 들면, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐 전이효소 Ⅲ(GnTⅢ)를 발현시키도록 제조된 세포주가 기술되어 있다.(또한 우마나 등(1999) Nat. Biotech. 17:176-180 참조).

본 발명에 의해 고려된 본 명세서의 항체의 다른 변형은 페그화(pegylation)이다. 항체를 예를 들면, 항체의 생물학적(예를 들면, 혈장) 반감기를 증가시키기 위해서 페그화할 수 있다. 항체를 페그화하기 위해서, 하나 또는 그 이상의 PEG 기가 항체 또는 항체 단편에 부착하는 조건하에서 PEG의 알데히드 유도체 또는 반응성 에스테르와 같은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 항체 또는 그 단편을 전형적으로 반응시킨다. 바람직하게는 페그화는 반응성 PEG 분자(유사 반응성 수용성 중합체)의 알킬화 반응 또는 아실화 반응을 통해 수행한다. 여기에서 사용된 "폴리에틸렌 글리콜"이란 용어는 모노(C1-C10)알콕시-또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드와 같은 다른 단백질을 유도하기위해 사용할 수 있는 임의의 PEG 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 어떤 구체예에서, 페그화된 항체는 항글리코실화된 항체이다. 단백질을 페그화하는 방법은 이 기술 분야에 잘 알려져 있으며 본 발명의 항체에 적용할 수 있다. 예를 들면 니시무라 등의 EP 0 154 316 및

이시카와 등의 EP 0 401 384를 참조한다.

증가된 안정성을 갖는 변형된 항체

다른 일면으로, 본 발명은 야생-타입 13H5에 비교하여 증가된 안정성을 보이는 13H5 항체의 변형된 형태를 제공한다. 실시예 10에서 더욱 상세히 기술하는 바와 같이, 13H5 항체는 V_H 사슬의 CDR2내의 Asn-55에 탈아미드화 자리를 포함한다. 위치55에서 58까지의 이 자리에서의 아미노산 서열은 N G N T(SEQ ID NO: 19의 아미노산 잔기 55-58)이다. 따라서 어떤 구체예에서, 13H5 V_H 의 아미노산 서열은 위치55에서 아스파라긴에서 다른 아미노산으로 돌연변이되었다. 부가하여 또는 대체적으로, 탈아미드화에 영향을 주는 Asn-55주위의 아미노산 위치에서 돌연변이될 수 있다. 위치55에서의 바람직한 아미노산 치환물은 아스파르트산 및 글루타민이며, 글루타민이 더욱 바람직하다. N55D 치환을 갖는 13H5의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 34에 나타냈다. N55Q 치환을 갖는 13H5의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 35에 나타냈다. 다른 구체예에서, 13H5 V_H 사슬의 Asn-57도 Asn-55의 돌연변이와 함께 돌연변이시킬 수 있다. N55Q 및 N57Q 치환을 갖는 13H5의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 36에 나타냈다. 이 세 개가 돌연변이된 항체는 실시예11에 더욱 기술된 바와 같이, 야생-타입 13H5에 비해 강압적인 탈아미드화 조건하에서 증가된 안정성을 나타낸다.

다른 실시예에서, 탈아미드화 비율이 알라닌에 인접한 글리신 보다 아스파라긴에 인접한 알라닌을 가질 때 거의 20배 적다는 것이 모델 펩티드로부터 결정되었기 때문에, 아미노산 위치56의 글리신을 알라닌으로 돌연변이시켰다(G56A)(아헤른,T.와 마닝,M.C. 편집, Stability of Protein Pharmaceuticals, Pharmaceutical Biotechnology, 2건, 1장, 페이지 1-30 참조). 따라서, G56A 돌연변이는 야생 타입 서열에 비해 감소된 반응성과 적은 구조적 변화사이의 균형을 나타내서 활성을 유지하면서 안정성이 증가되었다. G56A 치환을 갖는 13H5의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 37에 나타냈다.

따라서, 여러 구체예에서, 본 발명은 그 야생 타입 서열이 SEQ ID NO:19에 나타나 있는, 13H5 V_H 서열의 CDR2의 Asn-55, Gly-56 및/또는 Asn-57에서 아미노산 치환을 갖는 본 발명의 IFN 알파 항체를 갖는다. 바람직하게 돌연변이된 항체는 SEQ ID NOs: 34, 35, 36 및 37로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역을 포함한다. 바람직하게는 항체 VH 사슬은 SEQ ID NO: 22에 주어진 13H5의 VK 사슬과 쌍을 이룬다.

항체를 제조하는 방법

상기한 바와 같이, 여기서 기술된 VH 및 VL 서열을 갖는 항-IFN 알파 항체를 사용하여 VH 및/또는 VL 서열 또는 그에 부착된 일정 지역을 변형함으로 새로운 항-IFN 알파 항체를 만들 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 일면에서, 본 발명의 항-IFN 알파 항체 예를 들면, 13H5, 13H7 또는 7H9의 구조적 특징을 이용하여 IFN 알파에 결합하는 것과 같은 본 발명의 항체의 기능적 성질 적어도 하나를 보유하는 구조적으로 연관된 항-IFN 알파 항체를 만들 수 있다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 13H5, 13H7 또는 7H9의 CDR 지역 또는 그의 돌연변이를 알려진 골격 지역 및/또는 다른 CDR과 재조합으로 결합시켜서 상기한 바와 같은 본 발명의 부가적인, 재조합-제조된, 항-IFN 알파 항체를 만들 수 있다. 변형의 다른 유형에는 앞의 부분에서 기술된 것들이 포함된다. 제조하는 방법의 출발 물질은 여기에 제공된 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열 또는 하나 또는 그 이상의 그의 CDR 지역이다. 제조된 항체를 만들기 위해서, 여기에 제공된 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열 또는 하나 또는 그 이상의 그의 CDR 지역을 갖는 항체를 실제로 제조하는 것(즉, 단백질을 발현시키는 것)은 필요하지 않다. 오히려, 서열 내에 포함된 정보가 출발 물질로 사용되어 원래의 서열로부터 유도된 제2의 서열을 만들고 다음에 제 2의 서열이 제조되고 단백질로 발현된다.

따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은

(a) (ⅰ)SEQ ID NOs: 1, 2, 및 3으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 CDR1; 및/또는 SEQ ID NOs: 4, 5, 및 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 CDR2; 및/또는 SEQ ID NOs: 7, 8, 및 9로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 CDR3를 포함하는 중 사슬 가변 지역 항체 서열; 및/또는 (ⅱ) SEQ ID NOs: 10, 11 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 CDR1; 및/또는 SEQ ID NOs: 13, 14, 및 15로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 CDR2; 및/또는 SEQ ID NOs: 16, 17, 및 18로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 CDR3을 포함하는 경 사슬 가변 지역 항체 서열을 제공하고;

(b) 적어도 하나의 변경된 항체 서열을 만들기 위해서 중 사슬 가변 지역 항체 서열 및/또는 경 사슬 가변 지역 항체 서열내의 아미노산 잔기 적어도 하나를 변경하고;

(c) 변경된 항체 서열을 단백질로 발현하는 것을: 포함하는 항-IFN 알파 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

표준 분자 생물학 기술을 사용하여 변경된 항체 서열을 제조하고 발현시킨다.

바람직하게는, 변경된 항체 서열에 의해 암호화된 항체는 기능적 성질이

(i) 인터페론 알파의 생물학적 활성을 억제한다;

(ii) 여러 IFN 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제하나 IFN 알파 21의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는다;

(iii) IFN 베타 또는 IFN 오메가의 생물학적 활성을 실질적으로 억제하지 않는다;

(iv) 말초 혈액 단일핵 세포에서 CD38 또는 MHC 클래스 I의 IFN-유도 표면 발현을 억제한다;

(v) 말초 혈액 단일핵 세포에 의한 IP-10의 IFN-유도 발현을 억제한다;

(vi) 전신 홍반성 낭창(SLE) 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제한다;

(vii) 높은 친화성을 갖고 인간 인터페론 알파 2a에 결합한다;

(viii) 높은 친화성을 갖고 인간 인터페론 알파 2b에 결합한다;

이에 제한되지는 않으나 이를 포함하는, 여기에 기술된 항-IFN 알파 항체의 기능적 성질 하나, 몇몇 또는 전부를 보유하는 것이다.

*변경된 항체의 기능적 성질은 여기에 기술된 및/또는 이 기술분야에서 사용가능한 표준 분석을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들면, 항체의 IFN 알파에 결합하는 능력은 실시예에 주어진 것과 같은 표준 분석 평가(예를 들면, ELISA 및/또는 비아코어)를 사용하여 결정할 수 있다. 인터페론 알파의 여러 가지 기능적 활성을 억제하는 항체의 능력은 실시예에 기술된 것들과 같은(예를 들면, 다우디 세포 증식, IFN-유도 세포 마커 발현, IFN-유도 IP-10 발현 등) 분석을 사용하여 결정할 수 있다.

본 발명의 항체를 제조하는 방법의 어떤 구체예에서, 돌연변이가 항-IFN 알파 항체 암호화 서열(예를 들면, 13H5 암호화 서열)의 일부분 또는 전부에서 임의로 또는 선택적으로 도입되어서 결과의 변형된 항-IFN 알파 항체를 여기에 기술된 바와 같이 결합 활성 및/또는 다른 기능적 성질에 대해 스크린할 수 있다. 돌연변이 방법은 이 분야에 기술되어 있다. 예를 들면, 솔트의 PCT 공개 WO 02/092780에 포화 돌연변이 유발, 합성 리간드 조립 또는 그의 조합을 사용하는 항체 돌연변이를 만들고 스크린하는 방법이 기술되어 있다. 대체적으로, 라잘 등의 PCT 공개 WO 03/074679에는 항체의 물리화학적 성질을 최적화하는 컴퓨터 스크린 방법이 기술되어 있다.

본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자

본 발명의 다른 일면은 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 핵산은 전체 세포, 세포 용균물 또는 부분적으로 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 알카리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 칼럼 크로마토그라피, 아가로우스 겔 전기영동 및 이 기술분야에 잘 알려진 다른 것을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 다른 불순물, 예를 들면, 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제했을 때, 분리되거나 또는 실질적으로 순수하게 된다. (F. 어서벨 등 ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York 참조) 본 발명의 핵산은 예를 들면 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 인트론(intronic) 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마(예를 들면, 아래에 더욱 기술되는 바와 같이 인간 면역글로불린 유전자를 옮기는 유전자 이식 쥐로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현된 항체에 대해서는, 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 경 및 중 사슬을 암호화하는 cDNA를 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 얻을 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리(예를 들면, 파아지 디스플레이 기술)로부터 얻어진 항체에 대해서는, 항체를 암호화하는 핵산을 라이브러리로부터 얻을 수 있다.

본 발명의 바람직한 핵산 분자는 13H5, 13H7 또는 7H9 모노클론 항체의 V_H 및 V_L 서열을 암호화하는 것이다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_H 서열을 암호화하는 DNA 서열은 SEQ ID NOs: 25, 26 및 27에 각각 나타나 있다. 13H5, 13H7 및 7H9의 V_L 서열을 암호화하는 DNA 서열은 SEQ ID NOs: 28, 29 및 30에 각각 나타나 있다.

일단 V_H 및 V_L 단편을 암호화하는 DNA 단편을 얻고, 이 DNA 단편을 표준 재조합 DNA 기술, 예를 들면, 가변 지역 유전자를 전-길이 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시킴으로 더욱 조작할 수 있다. 이 조작에서, V_H 또는 V_L-암호화 DNA 단편은 항체 일정 지역 또는 유연성 연결자와 같은 다른 단백질을 암호화하는 다른 DNA 단편에 의도적으로 연결된다. 본 명세서에서 사용된 "의도적으로 연결된"이란 용어는 두 개의 DNA 단편에 의해 암호화된 아미노산 서열이 골격에 유지되도록 두 개의 DNA 단편을 결합시키는 것을 의미하는 것으로 의도된다.

V_H 지역을 암호화하는 분리된 DNA는 중 사슬 일정 지역(CH1, CH2 및 CH3)을 암호화하는 다른 DNA 분자에 V_H-암호화 DNA를 의도적으로 연결시킴으로 전-길이 중 사슬 유전자로 전환시킬 수 있다. 인간 중 사슬 일정 지역 유전자의 서열은 이 기술분야에 알려져 있고(예를 들면, 카뱉, E. A., 등 (1991) Sequences if Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 미국 Department of Health and Human Services, NIH공개 번호 91-3242 참조), 이 지역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻어질 수 있다. 중 사슬 일정 지역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 일정 지역일 수 있으나, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 일정 지역이다. Fab 단편 중 사슬 유전자에 대해서는, V_H-암호화 DNA를 단지 중 사슬 CH1 일정 지역을 암호화하는 다른 DNA 분자에 의도적으로 연결할 수 있다.

V_L 지역을 암호화하는 분리된 DNA는 경 사슬 일정 지역, CK를 암호화하는 다른 DNA 분자에 V_L-암호화 DNA를 의도적으로 연결시킴으로 전-길이 경 사슬 유전자(뿐만 아니라 Fab 경 사슬 유전자)로 전환시킬 수 있다. 인간 경 사슬 일정 지역 유전자의 서열은 이 기술 분야에 알려져 있고(예를 들면 카뱉, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 미국 Department of Heath and Human Services, NIH 공개 번호 91-3242 참조), 이 지역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻어질 수 있다. 경 사슬 일정 지역은 카파 또는 람다 일정 지역일 수 있으나, 가장 바람직하게는 카파 일정 지역이다.

scFv 유전자를 만들기 위해서, V_H-및 V_L-암호화 DNA 단편을 유연성 연결자를 암호화하는 예를 들면, 아미노산 서열 $(Gly_4-Ser)_3$을 암호화하는, 유연한 연결자에 의해 합해진 V_H 및 V_L 지역을 갖는 다른 단편에 의도적으로 연결하여 V_H 및 V_L 서열이 인접한 단일-사슬 단백질로 발현될 수 있도록 한다(예를 들면, Bird 등 (1988) Science 242:423-426; Huston 등 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 맥카페르티 등 (1990) Nature 348:552-554 참조).

본 발명의 모노클론 항체의 생성

본 발명의 모노클론 항체(mAbs)는 통상적인 모노클론 항체 방법론 예를 들면 코흘러 및 밀스테인(1975) Nature 256:495의 표준 체세포 교잡 기술을 포함하는, 여러 가지 기술로 생성될 수 있다. 체세포 교잡 기술이 바람직하지만, 원칙적으로 모노클론 항체를 생성하는 다른 기술, 예를 들면, B 림프구의 바이러스 또는 종양발생 형질전환을 사용할 수 있다.

하이브리도마를 제조하기 위한 바람직한 동물계는 쥐과이다. 쥐에서의 하이브리도마 생성은 매우 잘 확립된 공정이다. 접합용의 면역된 비장 세포 분리를 위한 기술 및 면역 프로토콜이 이 분야에 알려져 있다. 접합 파트너(예를 들면, 쥐의 골수종 세포) 및 접합 공정도 알려져 있다.

본 발명의 불명의 또는 인간화된 항체는 상기한 바와 같이 제조된 쥐의 모노클론 항체의 서열을 기본으로 제조할 수 있다. 중 및 경 사슬 면역글로불린을 암호화하는 DNA는 관심있는 쥐의 하이브리도마로부터 얻고, 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 쥐가 아닌(예를 들면, 인간) 면역글로불린 서열을 포함하기 위해서 제조될 수 있다. 예를 들면, 불명의 항체를 만들기 위해서, 쥐의 가변 지역을 이 분야에 알려진 방법을 사용하여 인간 일정 지역에 연결할 수 있다(예를 들면, 카빌리 등의 미국 특허 번호 4,816,567 참조). 인간화된 항체를 만들기 위해서는, 쥐의 CDR 지역을 이 분야에 알려진 방법을 사용하여 인간 골격에 삽입시킬 수 있다.(예를 들면, 윈터의 미국 특허 번호 5,225,539 및 퀸 등의 미국 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 참조).

바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는 인간 모노클론 항체이다. IFN 알파에 대한 그러한 인간 모노클론 항체는 쥐의 시스템보다는 인간 면역 시스템 일부를 옮기는 유전자 이식 또는 염색체 이식 쥐를 사용하여 생성될 수 있다. 이 유전자 이식 및 염색체 이식 쥐는 여기서 각각 HuMAb 쥐 및 KM 쥐로 언급되는 쥐를 포함하며, 총체적으로 "인간 Ig 쥐"로 언급한다.

HuMAb mouse®(Medarex, Inc.)는 내생의 μ 및 κ 사슬 자리를 불활성화시키는 표적의 돌연변이를 갖는 재배열되지 않은 인간 중(μ 및 γ) 및 κ 경 사슬 면역글로불린 서열을 암호화하는 인간 면역 글로불린 유전자 미니자리를 포함한다(예를 들면, 론버그, 등의 (1994) Nature 368(6474):856-859 참조). 따라서, 쥐는 감소된 쥐의 IgG 또는 κ의 발현을 나타내고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중 및 경 사슬 이식 유전자는 클래스 전환 및 체세포 돌연변이를 하여 높은 친화성의 인간 IgGκ 모노클론을 생성한다(론버그, N. 등 (1994) 위와 같음; reviewed in 론버그, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; 론버그, N. 및 허스잘, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:65-93, 및 하딩, F. 및 론버그, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). HuMab 쥐의 제조와 사용 및 그러한 쥐에 의해 옮겨지는 게놈 변형은 테일러, L., 등 (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6259; 첸 J., 등 (1993) International Immunology 5:647-656; 투아일론 등 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 90:3720-3724; 최 등 (1993) Nature Genetics 4:117-123; 첸 J., 등 (1993) EMBO J. 12:821-830; 투아일론 등 (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; 테일러 L., 등 (1994) International Immunology 6:579-591;; 및 피쉬와일드 D., (1996) Nature Biotechnology 14:845-851,에 더욱 기술되어 있고, 이 모든 것의 내용은 참고로 전체를 여기에 특별히 포함시킨다. 모두 론버그 및 케이의 미국 특허 번호 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 및 5,770,429; 수라니 등의 미국 특허 번호 5,545,807 모두 론버그 및 케이의 PCT 공개 번호 WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 및 WO 99/45962 및 코르만 등의 PCT 공개 번호 WO 01/14424를 더욱 참조한다.

다른 구체예에서, 본 발명의 인간 항체는 인간 중 사슬 이식 유전자 및 인간 경 사슬 이식염색체를 옮기는 쥐와 같은 이식유전자 및 이식염색체상에 인간 면역글로불린 서열을 옮기는 쥐를 사용하여 증식시킬 수 있다. 여기에서 "KM 쥐"로 언급되는 그러한 쥐는 이시다 등의 PCT 공개 WO 02/43478에 상세히 기술되어 있다.

더욱이 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대체적인 유전자이식 동물계는 이 분야에서 얻을 수 있으며, 본 발명의 항-IFN 알파 항체를 증가시키는데 사용할 수 있다. 예를 들면, 제노마우스(Xenomous; Abgenix, Inc)로 언급되는 대체적인 이식유전자 시스템이 사용될 수 있으며; 그러한 쥐는 예를 들면, 쿠처라파티 등의 미국 특허 번호 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 및 6,162,963에 기술되어 있다.

더욱이 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대체적인 이식염색체 동물계는 이 분야에서 얻을 수 있으며, 본 발명의 항-IFN 알파 항체를 증가시키기 위해 사용할 수 있다. 예를 들면, "TC 쥐"로 언급되는, 인간 중 사슬 이식염색체 및 인간 경 사슬 이식염색체 둘 다를 옮기는 쥐를 사용할 수 있으며; 그러한 쥐는 토미주카 등 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727에 기술되어 있다. 더욱이, 인간 중 및 경 사슬 이식염색체를 옮기는 소는 이 분야에 기술(쿠로이와 등 (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) 되어 있으며, 본 발명의 항-IFN 알파 항체를 증식시키기 위해 사용할 수 있다.

본 발명의 인간 모노클론 항체는 또한 인간 면역글로불린 유전자의 스크리닝 라이브러리의 파아지 배열법을 사용하여 제조될 수 있다. 인간 항체를 분리하는 그러한 파아지 배열법은 이 분야에 잘 설정되어 있다. 예를 들면:라드너 등의 미국특허번호 5,223,409; 5,403,484; 및 5,571,698; 다월 등의 미국 특허번호 5,427,908 및 5,580,717; 맥카페르티 등의 미국특허번호 5,969,108 및 6,172,197; 및 그리피쓰 등의 미국특허번호 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 및 6,593,081을 참조한다.

본 발명의 인간 모노클론 항체는 인간 항체 반응이 면역에 대해 생성될 수 있도록 그 안에서 인간 면역 세포가 재구성된 SCID 쥐를 사용하여 제조될 수 있다. 그러한 쥐는 예를 들면 윌슨 등의 미국특허번호 5,476,996 및 5,698,767에 기술되어 있다.

인간 Ig 쥐의 면역

본 발명의 인간 항체를 증식시키기 위해서 인간 Ig 쥐를 사용할 때, 그러한 쥐는 론버그 L. 등 (1994) Nature 368(6474): 856-859; 피쉬윌드, D. 등 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851; 및 PCT 공개 WO 98/24884 및 WO 01/14424에 기술된 바와 같이 IFN 알파 항원의 정제된 또는 재조합 제조물로 면역시킬 수 있다. 바람직하게는, 쥐의 나이는 첫 번째 주입시 6-16주이다. 예를 들면, 세포주가 여러 IFN 알파 서브타입(IFN 오메가가 아님)을 포함하는 IFN 알파 제조물을 생산하도록 림파아구증 세포주를 바이러스로 처리함으로 제조된, 림파아구증 IFN(25-100㎍)의 정제된 제조물을 사용하여 인간 Ig 쥐 복강내 면역을 시킬 수 있다. 대체적으로, IFN 알파 서브타입의 재조합 형태의 혼합물을 면역원으로 사용할 수 있다.

IFN 알파에 대한 전체 인간 모노클론 항체를 생성하는 자세한 공정은 하기 실시예 1에 기술되어 있다. 여러

항원으로 누적된 경험은 완전한 Freund 보조제에서 항원으로 처음에 복강내 면역(IP)시키고, 이어서 불완전한 Freund 보조제에서 항원으로 격주로 IP 면역(총 6번 까지)을 시킬 때 유전자이식 쥐가 반응한다는 것을 보였다. 그러나 Freund 이외의 보조제도 효과적인 것으로 발견되었다. 덧붙여, 보조제가 없을 때 전체 세포는 높은 면역원성인 것으로 나타났다. 면역 반응은 역궤도 블리드(retroorbital bleed)로 얻어진 혈장 시료의 면역 프로토콜 과정을 감시할 수 있다. 혈장을 ELISA(상기한 바와 같은)로 스크리닝하고, 항-IFN 알파 인간 면역글로불린의 충분한 적정량을 갖는 쥐를 접합에 사용할 수 있다. 쥐는 죽여서 비장을 제거하기 3일전에 항원3을 정맥 내에 집어넣었다. 각각의 면역에 대해 2-3주입을 수행할 필요가 있는 것으로 생각된다. 6-24의 쥐가 각각의 항원에 대해 전형적으로 면역되었다. HuMab 쥐에 대해서는, 항상 HCo7 및 Hco12 균주를 사용한다. 부가하여, HCo7 및 Hco12 이식유전자 둘 다를 두 개의 서로 다른 인간 중 사슬 이식유전자(HCo7/Hco12)를 갖는 하나의 쥐에 함께 주입한다. 대체적으로 또는 부가적으로 KM 쥐 균주는 실시예 2에서 기술된 바와 같이, 사용할 수 있다.

본 발명의 인간 모노클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

본 발명의 인간 모노클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기위해서, 면역된 쥐로부터 비장세포 및/또는 림프절 세포를 분리하고 쥐 골수종 세포주와 같은 적절한 죽지 않는 세포주에 접합시킨다. 결과의 하이브리도마를 항원-특이성 항체의 생산에 대해 스크리닝한다. 예를 들면, 면역된 쥐로부터의 비장 림프구의 단일 세포 현탁액을 1/6 P3X63-Ag8.653의 미분비 쥐 골수종 세포(ATCC, CRL 1580) 수의 1/6에 50% PEG을 사용하여 접합시킨다. 세포는 바닥이 편평한 미세 적정량 플레이트 내에 약 $2x10^5$ 로 바르고, 이어서 20% 태아 클론 혈청, 18% "653" 조절된 매체, 5% 오리겐 (IGEN), 4-mM L-글루타민, 1mM 피루브산 나트륨, 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50단위/ml 페니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신, 50 mg/ml 젠타마이신과 1xHAT (시그마, HAT를 접합 후 24시간 첨가한다)을 포함하는 선택적 매체 내에서 약 2주간 배양한다. 약 2주 후, 세포를 HAT가 HT로 대치된 매체 내에서 배양한다. 각각의 웰을 인간 모노클론 IgM 및 IgG 항체에 대해 ELISA에 의해 스크리닝한다. 일단 하이브리도마가 크게 성장하며, 매체는 보통 10-14일후에 관찰한다. 하이브리도마를 분비하는 항체를 다시 바르고, 또 스크리닝하고, 인간 IgG에 대해 아직 양성이면, 모노클론 항체를 희석을 제한하면서 적어도 두 번 서브클로닝할 수 있다. 안정한 서브클론을 특징짓기 위한 조직 배양 매체에서 소량의 항체를 생성하기 위해서 시험관내에서 배양한다.

인간 모노클론 항체를 정제하기 위해서, 선택된 하이브리도마를 모노클론 항체 정제를 위한 2-리터 스피너-플라스크에서 성장시킨다. 상청액을 여과하고 농축한 후 단백질 A-세파로스(Pharmacia, Piscataway, N.J.)로 친화성 크로마토그라피한다. 용출된 IgG를 순도를 확정하기위해서 전기영동 및 고 성능 액체 크로마토그라피로 체크한다. 완충액을 PBS로 바꾸고 농축을 1.43의 소광 계수를 사용하여 OD280으로 결정한다. 모노클론 항체를 나누어서 -80℃에서 저장한다.

본 발명의 모노클론 항체를 생산하는 트랜스펙토마의 생성

본 발명의 항체는 또한 이 분야에 잘 알려진 바와 같이(예를 들면, 모리슨, S. (1985) Science 229:1202) 재조합 DNA 기술 및 유전자 트랜스펙션 방법을 사용하여 숙주 세포 트랜스펙토마로 생산할 수 있다.

예를 들면, 항체 또는 그의 항체 단편을 발현시키기 위해서, 부분 또는 전-길이 경 및 중 사슬을 암호화하는 DNA를 표준 분자 생물학 기술(예를 들면, PCR 증폭 또는 관심있는 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용하는 cDNA 크로닝)로 얻고, DNA를 유전자가 전사 및 번역 표준 서열에 의도적으로 연결될 수 있도록 발현 벡터내로 삽입시킬 수 있다. 여기서, "의도적으로 연결된"이란 용어는 벡터내의 전사 및 번역 표준 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 그들의 의도된 기능으로 작용하도록 항체 유전자를 벡터에 결찰(結紮)하는 것을 의미하는 것으로 의도한다. 발현 벡터 및 발현 표준 서열은 사용된 발현 숙주 세포에 양립할 수 있는 것으로 선택한다. 항체 경 사슬 유전자 및 항체 중 사슬 유전자는 분리 벡터내로 삽입하거나 또는 더욱 전형적으로 두 유전자를 동일한 발현 벡터내로 삽입한다. 항체 유전자는 표준 방법(예를 들면,항체 유전자 단편 및 벡터상의 상보적 제한 자리의 결찰 또는 제한 자리가 존재하지 않으면 무딘 끝 결찰)으로 발현 벡터내로 삽입시킨다. 여기에 기술된 항체의 경 및 중 사슬 가변 지역은 V_H 단편이 벡터내의 C_H 단편에 의도적으로 연결되고 V_L 단편이 벡터내의 C_L 단편에 의도적으로 연결되도록 원하는 아니소타입의 중 사슬 일정 지역 및 경 사슬 일정 지역을 이미 암호화하는 발현 벡터내로 삽입함으로 임의의 항체 아이소타입의 전-길이 항체 유전자를 만들기 위해 사용할 수 있다. 부가적으로 또는 대체적으로 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터의 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 신호 펩티드가 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 골격이 연결되도록 벡터 안으로 클로닝할 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드

또는 이종 신호 펩티드(즉, 비-면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩티드)일 수 있다.

항체 사슬 유전자에 부가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포내의 항체 사슬 유전자의 발현을 조절하는 조절 서열을 옮긴다. "조절 서열"이라는 용어는 프로모터, 증진인자 및 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 조절하는 다른 발현 조절 요소를 포함하는 것으로 의도된다. 그러한 조절 서열은 예를 들면, Goeddel (유전자 발현 기술. 효소학에서의 방법 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))에 기술되어 있다. 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 고안은 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 의존한다는 것을 당업자는 알고 있다. 포유류 숙주 세포 발현을 위한 바람직한 조절 서열은 사이토메갈로바이러스(CMV), 시미안 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스(예를 들면, 아데노바이러스 메이져 레이트 프로모터(AdMLP) 및 폴리오마바이러스로부터 유도된 증진 인자 및/또는 프로모터와 같은, 포유류 세포내의 높은 수준의 단백질 발현을 지시하는 바이러스 요소를 포함한다. 대체적으로 바이러스가 아닌 조절 서열 유비퀴틴 프로모터 또는 β-글로빈 프로모터 같은 것을 사용할 수 있다. 더욱이 조절 요소는 인간 T 세포 백혈병 바이러스 타입 1(타케베, Y. 등 (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)의 긴 말단 반복 부분 및 SV40 초기 프로모터로부터의 서열을 포함하는, SRα 프로모터 시스템과 같은, 서로 다른 원천으로부터의 서열로 구성되어 있다.

항체 사슬 유전자 및 조절 서열에 부가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 선택 가능한 마커 유전자 및 숙주 세포(예를 들면 복제의 오리진)에서 벡터의 복제를 조절하는 서열과 같은 부가적인 서열을 옮길 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 벡터가 도입되는 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다(예를 들면, 엑셀 등의 미국특허 번호 4,399,216, 4,634,665 및 5,179,017, 참조). 예를 들면, 전형적으로 선택 가능한 마커 유전자는 벡터가 도입되는 숙주 세포상에서, G418, 하이그로마이신 또는 메토트렉세이트와 같은 의약에 저항성을 준다. 바람직한 선택가능한 마커 유전자에는 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR) 유전자(메토트렉세이트 선택/증폭과 함께 dhfr-숙주세포에서 사용하기 위해) 및 네오 유전자(G418 선택을 위해)가 포함된다.

경 및 중 사슬 발현을 위해, 경 및 중 사슬을 암호화하는 발현 벡터를 표준 기술로 숙주세포에 트랜스펙트시킨다. 트랜스펙션이라는 용어의 여러 가지 형태는 원핵 또는 진핵 숙주 세포내로 외래 DNA를 도입하는데 일반적으로 사용할 수 있는 매우 다양한 기술, 예를 들면, 일렉트로포레이션, 인산칼슘 침착, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 및 이와 유사한 것과 같은 것을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 항체를 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현시키는 것이 이론적으로 가능하지만, 진핵 세포 및 더욱 바람직하게는 포유류 숙주세포에서의 항체의 발현이 가장 바람직한데 그 이유는 그러한 진핵세포 및 특히 포유류 세포가 원핵세포보다 적절히 포개지고 면역학적으로 활성인 항체를 조립하고 분비하는데 더욱 좋기 때문이다. 항체 유전자의 원핵세포 발현은 활성 항체의 높은 수율 생산에 비효율적인 것으로 보고되었다(보스 M. A. 및 우드 C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

본 발명의 재조합 항체를 발현하기위한 바람직한 포유류 숙주세포는 중국 햄스터 난소(CHO 세포)(얼러브 및 체이슨 (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 77:4216-4220에 기술되어 있는 바 dhfr-CHO 세포를 포함하며, 예를 들면 R. J. 카프만 및 P. A. 샤프 (1982) Mol. Biol. 159:601-621에 기술되어 있는 바 DHFR 선택가능한 마커와 함께 사용되는) NSO 골수종 세포, COS 세포, 및 SP2 세포를 포함한다. 특히 NSO 골수종 세포를 사용할 때는 바람직한 발현 시스템이 WO87/04462, WO89/01036 및 EP 338,841에 기술된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터를 포유류 숙주세포에 도입시킬 때, 항체를 숙주세포 내에서 발현시키기에 또는 더욱 바람직하게는 항체 세포가 자라는 배양 매체로 항체를 분비하기에 충분한 시간동안 숙주세포를 배양함으로 항체를 생산한다. 항체를 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 매체로부터 회수할 수 있다.

항원에 대한 항체 결합의 특성화

본 발명의 항체를 예를 들면, 표준 ELISA에 의해 또는 비아코어 분석에 의해 IFN 알파에 대한 결합을 시험할 수 있다. 간단히, ELISA에 대해서는, 미세적정 플레이트에 IFN 알파(예를 들면, 상이한 IFN 알파 서브타입의 재조합체, 또는 백혈구 또는 림파아구증 IFN)를 PBS내의 0.25μg/ml로 바르고, 다음에 PBS내의 5% 소 혈청 알부민으로 차단한다. 항체 희석물들(예를 들면, IFN 알파-면역 쥐의 혈장 희석물들)을 각각의 웰에 첨가하고, 37C°에서 1-2시간 배양한다. 플레이트를 PBS/트윈으로 씻고 알칼리성 인산분해효소에 접합된 이차 시약(예를 들면, 인간 항체에 대해서는, 염소-항-인간 IgG fc-특이성 폴리클론 시약)으로 37C°에서 1시간 배양한다. 씻은 후, 플레이트를 pNPP 기질(1mg/ml)로 발달시키고, 405-650의 OD에서 분석한다. 바람직하게는, 가장 큰 적정물로 발달된 쥐를 접합에 사용한다.

상기한 바와 같은 ELISA 분석은 또한 IFN 알파 면역원과 양성의 반응성을 보여주는 하이브리도마를 스크리닝하기 위해 사용할 수 있다. IFN 알파에 높은 견인으로 결합하는 하이브리도마를 서브크론화하고 더욱 특성화한다. -140°C에서 저장되는 5-10 병 세포 뱅크를 만들고 또한 항체 정제를 위해, 모 세포의 반응성을 유지하는(ELISA에 의해) 각각의 하이브리도마로부터 한 클론을 선택할 수 있다.

*항-IFN 알파 항체를 정제하기 위해서, 선택된 하이브리도마를 모노클론 항체 정제를 위한 이-리터 스핀너-플라스크에서 배양시킬 수 있다. 상청액을 여과하고 농축한 후에 단백질 A-세파로스(Pharmacia, Piscataway, NJ)로 친화성 크로마토그라피할 수 있다. 용출된 IgG를 순도가 확정되도록 겔 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그라피하여 검사할 수 있다. 완충 용액을 PBS로 바꾸고, 1.43의 소광 계수를 사용하여 OD_{280}으로 농축을 결정할 수 있다. 모노클론 항체는 나누어서 -80°C에서 저장한다.

선택된 항-IFN 알파 모노클론 항체가 특정 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하기 위해서, 각각의 항체를 시중에서 구입가능한 시약(Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 바이오틴화한다. 표지되지 않은 모노클론 항체 및 바이오틴화 모노클론 항체를 사용하는 경쟁적인 연구는 상기한 바와 같은 IFN 알파 피복-ELISA 플레이트를 사용하여 수행할 수 있다. 바이오틴화 mAb 결합은 스트렙-아비딘-알칼리성 인산분해효소로 검출할 수 있다.

정제된 항체의 아이소타입을 결정하기위해서, 특정 아이소타입의 항체에 대해 특이성을 갖는 시약을 사용하여 아이소타입 ELISA를 수행할 수 있다. 예를 들면, 인간 모노클론 항체의 아이소타입을 결정하기위해서, 미세적정 플레이트의 웰에 항-인간 면역글로불린 1 μg/ml로 4°C에서 밤새 발라 놓는다. 1% BSA로 차단한 후 플레이트를 시험 모노클론 항체 또는 정제된 아이소타입 표준 1 μg/ml 또는 그 이하와 주변 온도에서 1-2시간동안 반응시킨다. 다음에 웰을 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이성 알칼리성 인산분해효소-접합 탐침체와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 발달시키고 상기한 바와 같이 분석한다.

항-IFN 알파 인간 IgG를 웨스턴 블롯팅으로 IFN 알파 항원과의 반응성을 더욱 시험할 수 있다. 간단히, IFN 알파를 발현하는 세포로부터의 세포 추출물을 제조하고, 소디움 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동시킬 수 있다. 전기영동 후, 분리된 항원을 니트로셀룰로오스 막에 전이시키고, 10% 태아 송아지 혈청으로 차단하고, 시험할 모노클론 항체로 탐침한다. 인간 IgG 결합은 항-인간 IgG 알칼리성 인산분해효소를 사용하여 검출할 수 있고 BCIP/NBT 기질 정제(tablet)(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo)로 발달시킬 수 있다.

<u>면역접합체</u>

다른 일면에서, 본 발명은 세포독소, 의약(예를 들면, 면역억제제) 또는 방사능 독소와 같은 치료학적 성분에 접합된 항-IFN 알파 항체 또는 그의 단편을 특징으로 한다. 그러한 접합체는 여기서 "면역접합체"로 언급한다. 하나 또는 그 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소"로 언급한다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한(예를 들면, 죽이는) 임의의 것을 포함한다. 예에는 탁솔, 사이토칼라신 B., 글라미시딘 D., 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈불라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디돈, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D., 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀올 및 퓨로마이신 및 그에 유사체 또는 상사체가 있다. 또한 치료제에는 예를 들면 안티메타볼리트, (예를 들면 메토트레세이트, 6-메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 싸이클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C., 및 시스-디클로로디안민 프라티눔(II)(DDP) 시스플라틴) 안트라사이클린, (예를 들면, 다우노루비신, (포르멀리 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들면, 닥티노마이신(포르멀리악티노마이신), 블레노마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)), 및 항-유사분열제(예를 들면, 빈크리스틴 및 빈불라스틴)이 포함된다.

본 발명의 항체에 접합시킬 수 있는 치료학적 세포독소의 다른 바람직한 예에는 두오카르마이신, 칼리체아미신, 메이탄신 및 오우리스타틴 및 그의 유도체가 포함된다. 칼리체아미신 항체 접합체의 예는 시중에서 구입할 수 있다(Mylotag™; Wyeth-Ayerst).

세포독소는 이 분야에서 이용한 링커 기술을 사용하여 본 발명의 항체에 접합시킬 수 있다. 항체에 세포독소를 접합시키는데 사용될 수 있는 링커 유형의 예에는 히드라존, 티오에테르, 에스테르, 디설파이드 및 펩티드-포함 링커가 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 링커는 예를 들면, 리소솜 구역에서 낮은 pH에 의한 분열에 민감한 또는 카텝신(예를 들면, 카텝신 B, C, D)와 같은 종양 조직에서 우세하게 발현되는 단백질분해효소와 같은 단백질분해효소에 의한 분열에 민감한 것을 선택할 수 있다.

항체에 치료제 접합을 위한 세포독소, 링커 및 방법 유형에 대한 또 다른 논의는 사이토 G., 등 (2003) Adv.

Drug Deliv. Rev. 55:199-215; 트레일, P.A 등 (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; 페이네 G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; 알렌, T. M. (2002) Nat. Rev Cancer 2:750-753; 페스탄, I. 및 크레이트맨, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; 센터, P. D. 및 스프링걸, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264를 참조한다.

본 발명의 항체는 또한 방사능 면역접합체로도 언급되는, 세포독성 방사능 제약품을 생성하는 방사성 동위원소에 접합될 수 있다. 진단용 또는 치료용으로 사용될 수 있는 항체에 접합시킬 수 있는 방사성 동위원소의 예에는 요오드^{131}, 인듐^{111}, 이트륨^{90} 및 루테튬^{177}이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 방사능 면역접합체를 제조하는 방법은 이 분야에 설정되어 있다. 방사능 면역접합체의 예에는 Zevalin™(IDEC Pharmaceuticals) 및 Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals)이 포함되며, 시중에서 구입가능하고, 본 발명의 항체를 사용하여 방사능 면역접합체를 제조하기 위한 유사한 방법을 사용할 수 있다.

본 발명의 항체 접합체를 주어진 생물학적 반응을 변형시키기 위해서 사용할 수 있으며, 의약 성분을 고전적인 화학 치료제로 제한하는 것으로 생각되어서는 안 된다. 예를 들면, 의약 성분은 원하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 그러한 단백질에는 예를 들면, 압린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소같은 효소 활성 독소 또는 그의 활성 단편; 종양 괴사 인자 또는 인터페론-γ과 같은 단백질; 또는 예를 들면, 림포킨, 인터로이킨-1("IL-1"), 인터로이킨-2("IL-2") 인터로이킨-6("IL-6"), 과립구 거대 파아지 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 집락 자극 인자("G-CSF"), 또는 다른 성장 인자들과 같은 생물학적 반응 변형제가 포함될 수 있다.

항체에 그러한 치료학적 성분을 접합하는 기술은 잘 알려져 있으며, 예를 들면, 아론 등, "암 치료에 있어서 의약의 면역표적을 위한 모노클론 항체", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, 레이스펠드 등(eds) pp.243-56 (알란 R. 리스, Inc. 1985); 헬스트롬 등, "의약전달을 위한 항체", Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), 로빈슨 등 (eds), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, 암" 치료에 있어서 세포 독성 시약의 항체 담체 재고", Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications, Pinchera 등 (eds), pp. 475-506 (1985); "암 치료에 있어서 방사능표지된 항체의 치료 용도의 분석, 결과 및 미래 전망", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin 등 (eds), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe 등, "항체-독성 접합체의 제조 및 세포독성", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)을 참조한다.

이중 특이성 분자

다른 일면으로, 본 발명은 본 발명의 항-IFN 알파 항체 또는 그의 단편을 포함하는 이중특이성 분자를 특징으로 한다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 적어도 두 개의 서로 다른 결합 자리 또는 표적 분자에 결합하는 이중 특이성 분자를 생성하기위해 다른 기능성 분자 예를 들면, 다른 펩티드 또는 단백질(예를 들면, 수용체를 위한 다른 항체 또는 리간드)에 결합하거나 유도될 수 있다. 본 발명의 항체는 둘 이상의 서로 다른 결합 자리 및/또는 표적 분자에 결합하는 다중특이성 분자를 생성하기 위해서 하나 이상의 기능성 분자에 사실상 결합하거나 또는 유도될 수 있으며; 그러한 다중특이성 분자는 또한 여기에서 사용되는 "이중특이성 분자"라는 용어에 포함되는 것으로 의도된다. 본 발명의 이중특이성 분자를 만들기 위해서, 본 발명의 항체는 이중특이성 분자가 얻어지도록, 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체와 같은 하나 또는 그 이상의 다른 결합 분자에 기능적으로 결합시킬 수 있다.

따라서, 본 발명은 IFN 알파에 대한 적어도 하나의 첫 번째 결합 특이성 및 두 번째 표적 에피토프에 대한 두 번째 결합 특이성을 포함하는 이중특이성 분자를 포함한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 두 번째 표적 에피토프는 Fc 수용체, 예를 들면, 인간 FcγRI(CD64) 또는 인간 FCα 수용체(CD89)이다. 그러므로, 본 발명은 FcγR, FcαR 또는 FcεR 발현 효과기 세포(예를 들면, 단핵세포, 거대파아지 또는 다형핵 세포(PMN)) 및 IFN 알파를 발현하는 표적 세포 둘 다에 결합할 수 있는 이중특이성 분자를 포함한다. 이들 이중특이성 분자는 효과기 세포에 대해 IFN 알파 발현 세포를 표적으로 하여 IFN 알파 발현 세포의 식균작용, 항체 의존 세포-매개 세포독성(ADCC), 시토킨 방출 또는 과산화물 음이온과 같은 Fc 수용체-매개 효과기 세포 활성을 개시시킨다.

이중특이성 분자가 다중특이성인 본 발명의 한 구체예에서, 분자는 항-Fc 결합 특이성 및 항-IFN 알파 결합 특이성에 부가하여, 세 번째 결합 특이성을 더욱 포함한다. 한 구체예에서, 세 번째 결합 특이성은 항-증진 인자(EF) 부분, 예를 들면, 세포독성 활성이 포함된 표면 단백질에 결합하여 표적 세포에 대한 면역 반응을 증진시키는 분자이다. "항-증진 인자 부분"은 주어진 분자 예를 들면, 항원 또는 수용체에 결합하여 이로서

Fc 수용체 또는 표적 세포에 대한 결합 결정체의 효과를 증진시키는 리간드 항원 또는 기능성 항원 단편일 수 있다. 항-증진 인자 부분"은 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 결합할 수 있다. 대체적으로, 항-증진 인자 부분은 첫 번째 및 두 번째 결합 특이체가 결합하는 실체와는 다른 실체에 결합할 수 있다. 예를 들면, 항-증진 인자 부분은 세포독성 T-세포(예를 들면, CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 또는 표적 세포에 대해 면역 반응이 증가되는 다른 면역 세포)에 결합할 수 있다.

한 구체예에서, 본 발명의 이중특이성 분자는 결합 특이성으로 예를 들면, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv 또는 단일 사슬 Fv를 포함하는 적어도 하나의 항체 또는 그의 항체 단편을 포함한다. 항체는 경 사슬 또는 중 사슬 이합체 또는 래드너 등의 미국 특허 번호 4,946,778(그 내용은 참고로 포함시킨다)에 기술된 바와 같은 단일 사슬 구조물 또는 Fv와 같은 그의 임의의 최소 단편일 수 있다.

한 구체예에서, Fcɣ 수용체에 대한 결합 특이성은 그 결합이 인간 면역글로불린 G(IgG)에 의해 차단되지 않는 모노클론 항체에 의해 제공된다. 여기서 사용된 IgG 수용체라는 용어는 염색체 1에 위치한 8개의 ɣ-사슬 유전자를 말한다. 이 유전자는 세 개의 Fcɣ 수용체 클래스: FcɣRI(CD64), FcɣRII(CD32), 및 FcɣRIII(CD16)로 분리되는 12개의 전이막 또는 수용성 수용체 아니소폼 전부를 암호화한다. 한 바람직한 구체예에서, Fcɣ 수용체는 인간 높은 친화성 FcɣRI 이다. 인간 FcɣRI은 단량체 IgG(10^{8}-$10^{9}M^{-1}$)에 높은 친화성을 나타내는, 72kDa 분자이다.

어떤 바람직한 항-Fcɣ 모노클론 항체의 생산 및 특성화는 팡거 등의 PCT 공개 WO 88/00052 및 미국 특허 번호 4,954,617에 기술되어 있고 그 내용은 여기에 참고로 전부 포함시킨다. 이 항체는 수용체의 Fcɣ 결합 자리와 다른 자리에서 FcɣRI, FcɣRII 또는 FcɣRIII의 에피토프에 결합하고, 따라서 이들의 결합은 IgG의 생리학적 수준에 의해 실질적으로 차단되지 않는다. 본 발명에 유용한 특정 항-FcɣRI 항체는 mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 및 mAb 197이다. mAb 32를 생산하는 하이브리도마는 American Type Culture Collection, ATCC Accession No. HB9469 로 얻을 수 있다. 다른 구체예에서, 항-Fcɣ 수용체 항체는 모노클론 항체 22(H22)의 형태로 인간화된다. H22 항체의 생산 및 특성화는 그라지아노, R.F. 등 (1995) J. Immunol 155(10):4996-5002 및 PCT WO 94/10332에 기술되어 있다. 세포주를 생산하는 H22 항체는 HA022CL1으로 American Type Culcure Collection에 기탁되어 있고 기탁 번호는 CRL 11177이다.

다른 바람직한 구체예에서, Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 인간 IgA 수용체, 예를 들면, Fc-알파 수용체(FcαRI(CD89))에 결합하는 항체에 의해 제공된다. "IgA 수용체"라는 용어는 염색체 19에 위치한 하나의 α-유전자(FcαRI)의 유전자 생산물을 포함하는 것을 의도한다. 이 유전자는 55-110kDa의 여러 대체적인 삽입 전이막 아이소폼을 암호화하는 것으로 알려져 있다. FcɣRI(CD89)은 단핵세포/거대 파아지, 호산성 및 호중성 과립구에서는 구성 성분으로 발현하지만, 비-효과기 세포 서식물에서는 발현하지 않는다. FcαRI는 IgA1 및 IgA2 둘 다에 대해 매체 친화성(??5x10^{7} M^{-1})을 가지며, 이는 G-CSF 또는 GM-CSF와 같은 시토킨에 노출되었을 때 증가한다(모르톤, H.C. 등 (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440). A3, A59, A62 및 A77로 규정되고, IgA 리간드 결합 영역 바깥쪽의 FcαRI에 결합하는 4개의 FcαRI-특이성 모노클론 항체는 (몬테리오, R.C. 등 (1992) J. Immunol. 148:1764)에 기술되어 있다.

FcαRI 및 FcɣRI 은 본 발명의 이중특이성 분자에 사용하기에 바람직한 개시 수용체인데 그 이유는 이들이 (1)면역 효과기 세포, 예를 들면, 단핵세포, PMN, 거대파아지 및 수지상 세포에서 일차적으로 발현되고; (2) 높은 수준(예를 들면, 세포당 5,000-100,000)으로 발현되고; (3)세포독성 활성의 매개체(예를 들면, ADCC, 식균작용)이고; (4)그들을 표적으로 하는, 자체-항원을 포함하는, 항원의 증진된 항원 표시를 매개하기 때문이다.

인간 모노클론 항체가 바람직하지만, 본 발명의 이중특이성 분자에 사용할 수 있는 다른 항체에는 쥐의, 불명의 및 인간화된 모노클론 항체가 있다.

본 발명의 이중특이성 분자는 구성원 결합 특이체, 예를 들면, 항-FcR 및 항-IFN 알파 결합 특이체들을 이 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 접합함으로 제조할 수 있다. 예를 들면, 이중특이성 분자의 각각의 결합 특이체는 별도로 생성되고 다음에 서로 접합시킬 수 있다. 결합 특이체가 단백질 또는 펩티드일 때, 여러 가지 커플링 또는 교차-결합제가 공유 접합에 사용될 수 있다. 교차-결합제의 예에는 단백질 A, 카보디이미드, N-석시니미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)(DTNB), o-페닐렌디말레이미드(oPDM), N-석시니미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 및 설포석시니미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(설포-SMCC)가 포함된다.(예를들면, 칼포브스카이 등 (1984) J. Exp. Med.

160:1686; 리우, MA 등 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 82:8648 참조). 다른 방법에는 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. 번호 78, 118-132; 브레넨 등 (1985) Science 229:81-83), 및 글래니 등 (1987) J. Immunol. 139:2367-2375)에 기술된 것들이 포함된다. 바람직한 접합제는 SATA 및 설포-SMCC이고, 둘다 Pierce Chemical Co.(Rockford, IL)로부터 구입할 수 있다.

결합 특이체가 항체일 때, 이들은 두 개의 중 사슬의 C-말단 이음 지역의 설프히드릴 결합을 통해 접합될 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 이음 지역은 접합에 앞서 설프히드릴 잔기 홀수 개 바람직하게는 하나를 포함하도록 변형될 수 있다.

대체적으로, 두개의 결합 특이체는 동일한 벡터에서 암호화되고 발현되고 동일한 숙주 세포에서 조립될 수 있다. 이 방법은 이중특이성 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x $F(ab')_2$, 또는 리간드 x Fab 접합 단백질일 때 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이성 분자는 하나의 단일 사슬 항체와 결합 결정체를 포함하는 단일 사슬 분자 또는 두 개의 결합 결정체를 포함하는 단일 사슬 이중특이성 분자일 수 있다. 이중특이성 분자는 적어도 두 개의 단일 사슬 분자를 포함할 수 있다. 이중특이성 분자를 제조하는 방법은 예를 들면, 미국 특허 번호 5,260,203; 미국 특허 번호 5,455,030; 미국 특허 번호 4,881,175; 미국특허 번호 5,132,405; 미국 특허 번호 5,091,513; 미국 특허 번호 5,476,786; 미국 특허 번호 5,013,653; 미국 특허 번호 5,258,498; 및 미국특허 번호 5,482,858에 기술되어 있다.

그들의 특이성 표적에 대한 이중특이성 분자의 결합은 예를 들면, 효소-연결 면역흡착제 분석(ELISA), 방사능 면역분석(RIA), FACS 분석, 생분석(예를 들면, 성장억제), 또는 Western Blot 분석으로 확인할 수 있다. 이들 각각의 분석은 일반적으로 관심 있는 복합체에 대해 특이성을 가지는 표지된 시약(예를 들면, 항체)을 사용하여, 특정의 관심 있는 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들면, FcR-항체 복합체는 예를 들면, 항체-FcR 복합체를 인식하고 특이적으로 결합할 수 있는 효소-연결 항체 또는 항체 단편을 사용하여 검출할 수 있다. 대체적으로, 복합체는 임의의 다양한 다른 면역 분석법을 사용하여 검출할 수 있다. 예를 들면, 항체는 방사능 표지되어 방사능면역분석(RIA)에 사용될 수 있다.(예를 들면, 웨인트러브, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 3월 1986을 참조하고, 이는 참고로 여기에 포함시킨다). 방사성 동위원소는 γ 계수기 또는 섬광 계수기의 사용과 같은 수단에 의해 또는 자가방사선술로 검출할 수 있다.

제약학적 조성물

다른 일면으로, 본 발명은 제약학적으로 허용 가능한 담체와 배합된, 본 발명의 모노클론 항체 또는 그의 항원-결합 부분 하나 또는 그 조합을 포함하는 조성물 예를 들면, 제약학적 조성물을 제공한다. 그러한 조성물은 본 발명의 항체, 또는 면역접합체 또는 이중특이성 분자 하나 또는 조합(예를 들면, 둘 또는 그 이상의 상이한)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 제약학적 조성물은 표적 항원상의 상이한 에피토프에 결합하거나 또는 상보적 활성을 갖는 항체(또는 면역접합체 또는 이중특이체)의 조합을 포함한다.

본 발명의 제약학적 조성물은 또한 조합 치료로 투여할 수 있다, 즉 다른 치료제와 조합될 수 있다. 예를 들면, 조합 치료는 적어도 하나의 다른 항-IFN 알파제(예를 들면, 면역억제제)와 조합된 본 발명의 항-IFN 알파 항체를 포함할 수 있다.

여기서 사용된 "제약학적으로 허용 가능한 담체"에는 임의의 및 모든 용제, 분산 매체, 피복물, 항세균제 및 항진균제, 등장 흡착 지연제 및 생리학적으로 양립 가능한 이와 유사한 것들이 포함된다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(예를 들면,주사 또는 주입에 의해)에 적절하다. 투여 통로에 따라, 화합물을 불활성화 시킬 수 있는 다른 자연 조건 및 산의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위해서 활성 성분 즉, 항체, 면역접합체 또는 이중특이성 분자를 물질로 피복시킬 수 있다.

본 발명의 제약학적 화합물은 하나 또는 그 이상의 제약학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. "제약학적으로 허용 가능한 염"은 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 임의의 원하지 않는 독성 효과를 전하지 않는 염을 말한다.(예를 들면, 벌지, S. M. 등 (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19 참조). 그러한 염의 예에는 산부가염 및 염기부가염이 포함된다. 산부가염에는 히드로클로릭, 니트릭, 포스포릭, 설퍼릭, 히드로부로믹, 히드로아이오딕, 포스포러스, 및 이와 유사한 것과 같은 비독성 무기산 뿐만 아니라 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환 알카노익산, 히드록시 알카노익산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 설폰산, 및 이와 유산한 것들과 같은 비독성 유기산으로부터 유도된 것들이 포함된다. 염기부가염에는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 및 이와 유사한 것과 같은 알카리성 토금속류 뿐만 아니라 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로푸로카인, 클로린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인, 및 이와 유사한 것들로부터 유도된 것들이

포함된다.

본 발명의 제약학적 조성물은 또한 제약학적으로 허용 가능한 항산화제를 포함한다. 제학학적으로 허용 가능한 항산화제의 예에는 : (1) 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 소디움 바이설페이트, 소디움 메타바이설피트, 소디움 설피트, 및 이와 유사한 것과 같은 수용성 항산화제; (2) 팔미트산 아스코르빌, 부틸화 히드록시아니솔(BHA), 부틸화 히드록시톨로엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 및 이와 유사한 것과 같은 지용성 항산화제; 및 (3) 구연산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 솔비톨, 타르트산, 인산, 및 이와 유사한 것과 같은 금속 킬레이트화제가 포함된다.

본 발명의 제약학적 조성물에 사용할 수 있는 적절한 수용성 및 비수용성 담체의 예에는 물, 에탄올, 폴리올(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 이와 유사한 것과 같은), 및 그의 적절한 혼합물, 올리브유와 같은 식물성 기름, 및 에틸 올레에이트, 와 같은 주사용 유기 에스테르가 포함된다. 적절한 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 피복 물질을 사용함으로, 분산의 경우에 필요한 입자 크기를 유지함으로, 및 계면 활성제를 사용함으로 유지할 수 있다.

이 조성물들은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 포함할 수 있다. 미생물의 존재를 방지하는 것은 상기의 살균 공정 또는 여러 가지 항세균제 및 항진균제 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산, 및 이와 유사한 것들의 함입 둘 다에 의해 확정될 수 있다. 조성물에 당, 염화나트륨 및 이와 유사한 것과 같은 등장제를 함유시키는 것이 또한 바람직하다. 부가하여, 주사할 수 있는 제약학적 형태의 연장된 흡착은 모노스테아르산 알루미늄 및 젤라틴과 같은 흡착을 지연시키는 약제를 포함시킴으로 일어날 수 있다.

제약학적으로 허용 가능한 담체는 살균 수용액 또는 분산액 및 살균 수용액 또는 분산액의 즉석 제조용 살균 분말이 포함된다. 제약학적 활성 기질의 약제와 그러한 매체의 사용은 이 분야에 알려져 있다. 임의의 통상적인 매체 또는 약제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 한을 제외하고, 본 발명의 제약학적 조성물에서 그의 사용은 고려된다. 보충 활성 화합물도 본 조성물에 포함시킬 수 있다.

치료용 조성물은 전형적으로 살균되어야 하며 제조 및 저장의 조건하에서 안정성이 있어야 한다. 조성물은 용액, 미세현탁액, 리포솜, 또는 높은 의학농도에 적합한 다른 지시 구조물로 배합될 수 있다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이와 유사한 것.), 및 그의 적절한 혼합물을 포함하는 용제 또는 분산 매체 일수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 피복을 사용함으로, 분산의 경우에 필요한 입자 크기를 유지함으로, 및 계면 활성제를 사용함으로 유지할 수 있다. 많은 경우에 조성물 내에 등장제 예를 들면, 당, 만니톨과 같은 폴리알코올, 솔비톨 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡착은 흡착을 지연시키는 약제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로 일어날 수 있다.

살균 주사 용액은 적절한 용제에 필요한 양으로 활성 화합물을 필요에 따라 상기에 열거한 성분들 하나 또는 그 조합과 함께 함입시키고 이어서 살균 미세여과함으로 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 상기 열거한 것들과는 다른 필요한 성분 및 염기성 분산 매체를 포함하는 살균 담체에 활성 화합물을 함입시킴으로 제조할 수 있다. 살균 주사 용액의 제조를 위한 살균 분말의 경우에는, 바람직한 제조법은 사전의 살균-여과 용액으로부터의 임의의 부가적인 원하는 성분과 활성 성분의 분말을 내는 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조)이다.

단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 결합할 수 있는 활성 성분의 양은 치료할 환자와 특정 투여 방식에 따라 변하게 된다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합할 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 일으키는 조성물의 양이 될 것이다. 일반적으로 100% 중에서 이 양은 제약학적으로 허용가능한 담체와 조합된 활성 성분이 약 0.01%부터 99%까지의 범위가 될 것이고, 바람직하게는 약 0.1%에서 70%까지, 가장 바람직하게는 활성 성분이 약 1%부터 약 30%가 될 것이다.

투여 방법은 최적의 원하는 반응(예, 치료 반응)을 제공하도록 조절된다. 예를 들어 하나의 큰 알약으로 투여할 수 있고 몇 개로 나누어서 시간을 두고 투여할 수도 있으며, 또는 투여량을 치료 상황의 위급성에 의해 지시하는 대로 비례해서 감소하거나 증가시킬 수 있다. 투여의 용이성과 균등한 투여량을 위해서 투여 단위로 비경구 조성물을 처방하는 것이 특히 유리하다. 여기서 사용된 투여 단위 형태는 치료할 환자를 위해 단일의 투여량으로 알맞은 물리적으로 분리된 단위를 일컫는다; 각 단위는 요구되는 제약 담체와 관련하여 요구되는 치료 효과를 생성하기 위해서 계산하여 미리 결정된 활성 화합물의 양을 포함한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 상세한 내역은 (a) 활성 화합물의 유일한 특성과 성취되어야 할 특정 치료 효과, 및 (b) 개개인의 민감도 처치를 위한 활성 화합물을 조합하는 분야에 있어 고유한 한계에 의해 지시되거나 직접적으로 의존된다.

항체의 투여에 있어서, 투여량은 숙주 체중의 약 0.0001에서 100 mg/kg 까지,, 더 일반적으로는 0.01에서 5 mg/kg까지의 범위이다. 예를 들어 투여량은 0.3 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중 또는 1-10 mg/kg 범위 내가 될 수 있다. 전형적인 처치 요법은 주당 한번, 매 2주에 한번, 매 3주에 한번, 매 4주에 한번, 한달에 한번, 매 3달에 한번 또는 매 3-6달에 한번 투여를 행한다. 본 발명이 항-IFN 알파 항체에 대한 바람직한 투여 요법은 다음의 투여 계획 중 하나를 사용하여 주어진 항체를 가지고 정맥주사를 통해 1 mg/kg 체중 또는 3 mg/kg 체중을 포함한다: (ⅰ) 6번의 투여에 대해 매 4주, 그다음 매 3달; (ii) 매 3주; (iii) 3 mg/kg 체중 한번에 이어서 매 3주에 1 mg/kg 체중.

몇 가지 방법에서, 다른 결합 특이성을 가진 둘 또는 그 이상의 모노클론 항체를 동시에 투여하고 이 경우 투여된 각 항체의 투여량은 지시된 범위 안이다. 항체는 보통 여러 경우로 투여된다. 예를 들어 단일 투여 사이의 간격은 매주, 매달, 매 3달 또는 매년이 될 수 있다. 간격은 또한 환자에 있어서의 표적 항원에 대한 항체의 측정 혈액 수준에 의해 가리키는 대로 불규칙하게 될 수도 있다. 어떤 방법에서는 투여량이 약 1-1000 μg/ml의 원형질 항체 농도를, 또한 어떤 방법에서는 약 25-300 μg/ml의 원형질 항체 농도를 성취하도록 조절된다.

다른 방도로, 항체를 지속적 방출 배합물로 투여할 수 있는데, 이 경우에는 투여를 자주 하지 않게 된다. 투여량과 횟수는 환자에서의 항체의 반감기에 의존해 변화하게 된다. 일반적으로 인간 항체는 가장 긴 반감기를 나타내며 그 뒤에 인간화된 항체, 불명의 항체 및 비인간 항체가 따른다. 투여량과 투여횟수는 처치법이 질병예방인지 치료를 위한 것인지에 따라 변화될 수 있다. 질병예방적 적용에서는, 장기간에 걸쳐 비교적 빈번하지 않게 비교적 적은 용량이 투여된다. 어떤 환자는 그들의 살아 있는 동안 계속해서 처치를 받기도 한다. 치료적 적용에서는 질병의 진행이 완화되거나 끝나게 되고 바람직하기는 환자가 부분적으로 또는 완전히 질병의 증상이 고쳐질 때까지 비교적 짧은 간격으로 비교적 많은 투여량이 때때로 요구된다. 그 이후에 환자를 질병예방 요법으로 투여될 수 있다.

본 발명의 제약 조성물에서 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 없이 특별한 환자, 조성물, 및 투여 형태에 있어서 요구되는 치료 반응을 달성하기 위한 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위해서 변화될 수 있다. 선택된 용량 수준은 이용된 본 발명의 특별한 조성물의 활성, 또는 에스테르, 염 또는 그것의 아미드, 투여 통로, 투여 시간, 사용된 특별한 화합물의 배출 속도, 처치 지속 기간, 다른 약품, 이용된 특별한 조성물과 조합되어 사용된 화합물 및/또는 물질, 처치 환자의 나이, 성별, 몸무게, 건강상태, 일반적인 건강과 이전의 의학적인 병력, 그리고 의학적 분야에 잘 알려진 요인들과 마찬가지로 이들을 포함하는 약물 동력학의 다양성에 의존할 것이다.

본 발명에서 항-IFN 알파 항체의 "치료에 효과적인 투여량"은 바람직하게는 질병 증상의 심각성의 감소와, 질병 증상이 없는 기간의 횟수와 지속기간의 증가, 또는 질병 고통으로 인한 손상이나 불구의 방지를 가져온다. 예를 들어 전신 홍반성 낭창 (SLE), 치료에 효과적인 투여량은 바람직하게는 SLE과 관련된 육체적 증상, 예를 들어 가령 통증과 피로가 더 악화되는 것을 방지한다. 치료에 효과적인 투여는 바람직하게는 또한 SLE의 발병을 방지하거나 지연시키는 것 가령 이 병의 초기 또는 예비 증상이 나타날 때 요구될 것이다. 마찬가지로 이는 SLE와 관련된 만성적인 진행을 지연시키는 것을 포함한다. SLE 진단에 이용된 실험실 시험들은 화학 (IFN 알파 수준의 측정 포함), 혈액학, 혈청학 및 방사선학을 포함한다. 따라서 특정 처치가 SLE를 치료하는데 있어 치료학적으로 효과적인 투여량인지 아닌지를 결정하는데 전술한 것의 어떤 것들을 모니터링하는 어떤 임상 또는 생화학적 분석이 사용될 것이다. 이 분야에서 통상적으로 숙련된 사람은 환자의 칫수, 환자 증상의 심각성, 그리고 특별한 조성물 또는 선택된 투여 통로와 같은 요인에 기초하여 그러한 양을 결정할 수 있다.

본 발명의 조성물은 이 분야에 알려진 다양한 방법 중에서 하나 이상을 사용하여 하나 이상의 투여 통로를 통해 투여될 수 있다. 숙련된 자에 의해 평가되는 대로 투여 통로와 처방은 요구된 결과에 의존해 변할 것이다. 본 발명의 항체에 대한 바람직한 투여 통로는 예를 들어 주사 또는 주입에 의해서 정맥내의, 근육내의, 피내의, 복강내의, 피하의, 척추 또는 다른 비경구 투여 통로를 포함한다. 여기서 사용된 "비경구 투여"라는 말은 보통 주사에 의해, 장내의 국부적인 투여와는 다른 투여 방식을 의미하며, 제한 없이, 정맥내의, 근육내의, 동맥내의, 척수강내의, 캡슐내의, 안구내의, 심장내의, 피내의, 복강내의, 경기관의, 피하의, 손톱밑의, 관절내의, 캡슐하의, 지주막하의, 척추강내의, 경막외 및 흉골내의 주사 및 주입을 포함한다.

다른 방도로, 본 발명의 항체는 가령 국부적인, 외피의 또는 접막의 투여 통로와 같은 비경구가 아닌 통로를

통해, 예를 들어 비강내로, 구강내로, 질내로, 직장내로, 설하(혀밑) 또는 국부적으로 투여할 수 있다.

활성 화합물은 급속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체를 사용하여 준비될 수 있는데, 이는 가령 조절된 방출 처방으로 이식체, 경피 부착포 및 미세캡슐 전달 시스템을 포함한다. 생체분해가 가능하고 생체적합한 가령 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안히드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 중합체가 사용될 수 있다. 그러한 처방을 준비하기 위한 많은 방법들은 특허로 되어 있거나 이 분야의 숙련된 자에게 일반적으로 알려져 있다. 예를 들면, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. 로빈손 편집, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참조.

치료 조성물은 이 분야에 알려진 의학 기구로 투여될 수 있다. 예를 들어 바람직한 구체예에서 본 발명의 치료 조성물은 바늘없는 피하 주사 기구, 가령 미국 특허 번호 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941880; 4,790,824; 또는 4,596,556에 나타낸 기구로 투여될 수 있다. 본 발명에 유용한 잘 알려진 이식체 및 모듈의 예에는: 조절된 속도로 투약을 하기 위한 이식가능한 미세 주입 펌프를 나타내는 미국 특허 번호 4,487,603; 피부를 통해 약물을 투여하는 치료 기구를 나타내는 미국 특허 번호 4,486,194; 정밀한 주입 속도로 약물을 전달하는 약물 주입 펌프를 나타내는 미국 특허 번호 4,447,233; 연속적인 약물 전달을 위한 가변 유량의 이식가능한 주입 기구를 나타내는 미국 특허 번호 4,447,224; 많은 격실을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 나타내는 미국 특허 번호 4,439,196; 삼투성 약물 전달 시스템을 나타내는 미국 특허 번호 4,475,196이 포함된다. 이들 특허들은 참고로 여기에 포함시킨다. 많은 다른 그런 이식체, 전달 시스템 및 모듈들은 이 분야의 숙련자에게 알려져 있다.

어떤 구체예에서, 본 발명의 인간 모노클론 항체는 생체 내 적절한 분포를 확정하도록 처방될 수 있다. 예를 들어 혈액뇌장벽(BBB)은 많은 고 친수성 화합물을 제외한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 말살하는 것(요구된다면)을 확정하기 위해서, 그들을 예를 들어 리포솜 내에 배합할 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법에 대해서는 예를 들면, 미국 특허 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331을 참조한다. 리포솜은 특이 세포 또는 기관 내로 선택적으로 옮겨진 하나 이상의 성분을 포함하게 되며 따라서 표적의 약물 전달을 향상시킨다(예를 들면, V.V. 라나드(1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685 참조). 전형적인 표적 성분은 폴레이트 또는 비오틴(예를 들면, 로우 등의 미국 특허 5,416,016 참조); 만노시드 (우메자와 등, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 항체 (P.G. 블로만 등 (1995) FEBS Lett. 357:140; M. 오와이스 등 (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); 표면활성제 단백질 A 수용체 (브리스코 등 (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (슈레이어 등 (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)이 포함된다; 또한 K. 케이나넨: M.L. 라우크카넨 (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. 킬리온; I.J. 피들러 (1994) Immunomethods 4:273을 참조한다.

본 발명의 용도 및 방법

본 발명의 모노클론 항-IFN 알파 항체와 관련 유도체/접합체 및 조성물은 다양한 시험관내와 생체내 진단과 치료 용도를 갖고 있다. 예를 들어 항체는 시험관 내나 생체 내에서 표준 항체/항원 결합 분석 (예, ELISA, RIA)을 사용하여 IFN 알파 단백질을 탐지하는데 사용될 수 있다. 나아가서 이 분자들은 IFN 알파가 역할을 수행하는 다양한 장애를 치료하고 방지하거나 진단하기 위해 환자에게 예를 들어 생체내로 투여될 수 있다. 여기 사용되는 "환자"라는 용어는 인간과 비인간 동물 둘 다 포함하는 것으로 의도된다. 바람직한 환자는 자기면역 장애를 나타내는 인간 환자를 포함한다. 본 발명의 "비인간 동물"이라는 말은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물과 비포유동물, 가령 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.

본 발명의 항체 조성물은 전신 홍반성 낭창(SLE), 다발성 경화증(MS), 염증성 장 질환(IBD; 크론병, 궤양성 대장염 및 셀지악병을 포함), 인슐린 의존성 당뇨(IDDM), 건선, 자기면역 갑상선염, 류마티스 관절염(RA) 및 사구체신염과 같은 자기면역병의 치료에 사용할 수 있다. 더욱이 본 발명의 항체 조성물은 이식거부의 억제 또는 방지 또는 이식 숙주 반응(GVHD)의 치료에 사용할 수 있다.

본 발명의 항체는 시험관내에서, 치료학적 용도와 연결된 결합 활성을 초기에 시험할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물은 하기 실시예에 기술된 비아코어, ELISA 및 유동 세포측정 분석을 사용하여 시험할 수 있다. 더욱이, 이 분자들의 활성은 예를 들면, 하기 실시예에 기술된 바와 같이, 세포 증식 분석에 이어 IFN 알파에 노출시켜서 평가할 수 있다. 본 발명의 항체 및 조성물을 투여하는 적절한 방법은 이 분야에 잘 알려져 있고 위에 더욱 기술되어 있다. 적절한 투여량은 이 분야에 능숙한 사람들이 결정할 수 있고 환자의 나이와 체중 및 특정 사용 의약에 따라 다르다. 전형적인 투여량은 위에 기술하였다.

본 발명의 항-IFN 알파 항체도 상기한 바와 같이 다른 치료제와 함께 같이 투여될 수 있다.

상기한 바와 같이, 치료 목적으로, 인간 항체 조성물과 제약학적으로 허용 가능한 담체를 치료학적 유효량으로 환자에 투여한다. 항체 조성물과 제약학적으로 허용 가능한 담체의 조합은 투여된 양이 생리학적으로 의미있다면, "치료학적 유효량"으로 투여되었다고 이야기된다. 시약은 그의 존재로 수용 환자의 생리에 검출할 수 있는 변화를 초래할 때 "생리학적으로 의미있는"이 된다. 표적의 치료제가 동등량의 비표적 치료제의 체계적인 투여에 의해 표적에서 자연적으로 생기는 것보다 의도된 표적에 더 높은 비율로 투여량이 전달된다면 "치료학적으로 효과적인" 것이 된다.

본 발명의 조성물(예를 들면, 인간 항체, 면역접합체 및 이중특이성 분자)을 포함하는 키트 및 사용에 대한 지시는 또한 본 발명의 범위 내이다. 키트는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 부가적인 인간 항체(예를 들면, IFN 알파 활성을 억제하지만 첫 번째의 인간 항체와는 다른 상보적 활성을 갖는 인간 항체)와 같은 적어도 하나의 부가적 시약을 포함할 수 있다

본 발명은 제한으로 해석되어서는 안 되는 다음의 실시예로 더욱 설명된다. 본 출원에 인용된 모든 도면 및 모든 참고문헌, 특허 및 공개 특허 출원의 내용은 참고로 여기에 밝히 포함시킨다.

실 시 예

실시예1: IFN 알파에 대한 인간 모노클론 항체의 생성:

항원

IFN 오메가 이외의 여러 IFN 알파 서브타입을 생산하는, 바이러스-자극 인간 림파아구증 세포주로부터 정제된 여러 서브타입을 포함하는 천연 인간 IFNα를 항원으로 사용하였다.

유전자이식 염색체이식 KM Mice™:

IFN 알파에 대한 완전한 인간 모노클론 항체를 인간 항체 유전자를 발현하는, 유전자이식 염색체이식 쥐의 KM 균주를 사용하여 제조하였다. 이 쥐 균주에서, 내생의 쥐 카파 경 사슬 유전자는 Chen 등의 (1993) EMBO J. 12:811-820에 기술된 바와 같이 동형접합적으로 찢기어졌고, 내생의 쥐 중 사슬은 HuMab 쥐에 대해 PCT 공개 WO 01/09187의 실시예 1에 기술된대로 동형접합적으로 찢기어졌다. 쥐는 피시와일드 등의 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851에 기술된대로 인간 카파 경 사슬 이식유전자, KCo5를 운반한다. 쥐는 또한 PCT 공개 WO 02/43478에 기술된대로 인간 중 사슬 이식염색체, SC20을 운반한다.

KM Mice™ 면역:

IFN 알파에 대한 완전한 인간 모노클론 항체를 생성하기 위해, KM mice™를 바이러스-자극 인간 림파아구증 세포주로부터 정제된 다중 서브타입을 포함하는 천연 인간 IFNα로 면역시켰다. 일반적인 면역 개략들이 론버그, N. 등의 (1994) Nature 368: 856-859; 피시와일드, D 등의 Nature Biotechnology 14:845-851와 PCT 공개 WO 98/24884에 기술되었다. 쥐가 6-16주 되었을 때에 첫 번째로 항원을 주입하였다. IFN 알파 항원의 (즉 바이러스 자극 림파아구증 세포로부터 정제된) 정제된 천연 제조물(25-100ug)을 KM mice™ 복강내(IP) 또는 피하(Sc) 면역시키는데 사용하였다.

유전자이식 염색체이식 쥐는 완전한 Freund의 보조제 내의 항원으로 두 번 복강내(IP) 또는 피하(Sc) 면역시켰고, 2-4주 지나 불안전한 Freund의 보조제내의 항원으로 IP 면역(총 8번까지 면역)을 하였다. 면역반응은 역궤도 블리드에 의해 모니터하였다. 혈장을 ELISA(아래 기술된대로)에 의해 스크리닝하였고, 항-IFNα 인간 면역글로불린의 충분한 적정량을 가진 쥐를 접합에 사용하였다. 쥐는 죽여서 비장을 제거하기 2일 전에 항원 3을 정맥 내에 집어넣었다.

항-IFNα 항체를 생산하는 KM Mice™ 의 선택

IFNα를 묶는 항체를 생산하는 KM Mice™를 선택하기 위해, 면역된 쥐로부터 나온 혈청을 Fishwild, D. 등 (1996)에 의해 기술된대로 ELISA에 의해 시험하였다. 간단하게 미세적정량의 플레이트를 PBS 내 1-2 ug/ml, 50 ul/well로 림파아구증 세포로부터 정제된 천연 IFNα로 바르고, 4℃에서 밤새 배양한 후 PBS/Tween(0.05%) 내 5%의 병아리 혈청 200 ul/well로 차단하였다. IFNα 면역된 쥐로부터의 혈장 희석물을 각 웰에 첨가하고 상온에서 1-2시간 동안 배양하였다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세척하고 그 다음 호오스래디시 과산화효소(HRP)로 접합된 염소-항-인간 IgG Fc 폴리클론 항체로 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척한 후, 플레이

트를 ABTS 기질 (시그마, A-1888, 0.22 mg/ml)로 발달시키고, 495 nm에서 백그라운드 교정이 되고 415 nm 파장으로 세팅된 스펙트로포토미터를 사용하여 각 웰에서의 광학적 밀도를 측정하였다. 항-IFNα 항체의 최고 적정량을 발달시킨 쥐를 접합에 사용하였다. 접합은 아래 기술한대로 수행하였으며 하이브리도마 상청액을 ELISA로 항-IFNα 활성에 대해 시험하였다.

IFNα에 대한 인간 모노클론 항체를 생성하는 하이브리도마의 생성

비장세포를 KM mice™으로부터 분리하여 PEG를 사용하는 표준 프로토콜을 기반으로 쥐 골수종 세포주에 접합시켰다. 그 다음 결과의 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산을 위해 스크리닝하였다.

면역된 쥐로부터 나온 비장 림프세포의 단일 세포 현탁액을 50% PEG(시그마)를 사용하여 P3X63-Ag8.653 미분비 쥐 골수종 세포 (ATCC, CRL 1580) 또는 SP2/0 미분비 쥐 골수종 세포 (ATCC, CRL 1581) 수의 1/4로 접합시켰다. 세포는 바닥이 편평한 미세 적정량 플레이트 내에 약 $1x10^5$/well의 밀도로 바르고 10% 태아 소 혈청, 10% P388D1(ATCC, CRL TIB-63) 조절 매체, DMEM (Mediatech, CRL 10013, 고글루코스, L-글루타민 및 피루브산나트륨)과 5 mM HEPES 내의 3-5% 오리겐 (IGEN), 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50 mg/ml 젠타마이신 및 1xHAT (시그마, CRL P-7185)를 포함한 선택적 매체 내에서 약 2주간 배양하였다. 1-2주 후 세포를 HAT가 HT로 대치된 매체 내에서 배양하였다. 그 다음 각 웰을 인간 항-IFNα IgG 항체에 대해 (위에 기술된) ELISA에 의해 스크리닝하였다.

ELISA에 의해 확인된 하이브리도마를 분비하는 항체로부터의 조절된 매체를 IFNα의 항-증식 효과를 차단하는 능력에 대해 (아래 기술된) 다우디(Daudi) 증식 분석으로 시험하였다. 다우디 분석 스크린에서 최고의 중화 활성을 갖는 하이브리도마를 제한 희석으로 적어도 두 번 서브클로닝하였다. 그 다음 결과의 안정된 서브클론을 시험관 내에 배양하여 조직 배양 매체 내에서 모노클론 항체 소량을 생성하였다. 서브클론의 활성을 확인하기 위해 다우디 증식 분석 스크린을 반복하였다. 특성분석용 모노클론 항-IFNα의 정제를 위한 충분한 조절된 매체(전형적으로 1L)를 제조하기 위해 다우디 분석에서 최고의 활성을 갖는 서브클론을 증가시켰다.

항-IFNα 항체를 중화하기 위한 하이브리도마의 스크린: 다우디 증식 분석

인터페론 알파는 용량 의존 방식으로 다우디 (Burkitts 림프종, ATCC#CCL-213) 세포의 증식을 억제한다. 그의 수용체에 인터페론이 결합하는 것을 차단하는 중화 항체는 증식을 복원시킬 것이다. 다우디 상의 천연 림파아구증 IFNα의 항-증식 효과에 대한 용량 반응 곡선을 측정하였고 50%(EC50)으로 다우디 성장을 억제하기에 충분한 농도를 계산하였다.

96웰의 바닥이 편평한 세포 배양 플레이트 내에 IFNα을 첨가한 및 미첨가한 상태로 배양 매체 (10% FCS, 1x2-ME, L-글루타민 및 페니실린 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640) 내에서 다우디 세포와 하이브리도마 조절매체를 혼합하였다. 시약의 최종 혼합물은 다음과 같다: 1×10^4 Duadi 세포 + 10% 하이브리도마 상층물 (supernate) +/- 100 ul/well당 EC50에서 IFNα. 세포는 37℃, 5% CO_2에서 72시간 배양하였다. 증식은 MTS (프로메가), 20ul/well 첨가로 분석하였고 3시간 동안 더 배양을 한 다음 490 nm에서의 O.D.를 읽었다. 생존하는 세포 수는 읽혀진 O.D.에 비례하였다. 다우디 억제 비율은 하이브리도마 상층물 단독에 대해 하이브리드 상층물 + IFNα로 계산하고 IFNα의 첨가 및 미첨가 매체 표준과 비교하였다. 하이브리도마는 IFNα 차단 능력에 따라 순서가 정해지고 최고 활성의 중화 하이브리도마를 서브클로닝을 위해 선택하였다.

더 분석하기 위해 하이브리도마 클론 13H5, 13H7 및 7H9을 선택하였다.

실시예 2: 인간 모노클론 항체 13H5, 13H7 및 7H9의 구조적 특성

13H5, 13H7 및 7H9 모노클론 항체의 중 및 경 사슬 가변 지역을 암호화하는 cDNA 서열을 각각 표준 PCR 기술을 이용하여 13H5, 13H7 및 7H9 하이브리도마로부터 얻고 표준 DNA 서열화 기술을 이용하여 서열화하였다.

13H5의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 1A에서 SEQ ID NO:25 및 19에 각각 도시하였다.

13H5의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 1B에서 SEQ ID NO:28 및 22에 각각 도시하였다.

13H5 중 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 중 사슬 서열과 비교하여 13H5 중 사슬이 인간 생식계열 VH 1-18로부터의 V_H 단편, 결정되지 않은 D 단편 및 인간 생식계열 J_H 4b로부터의 J_H 단편

을 이용한다는 것을 설명하였다. 13H5 V_H 서열을 생식계열 VH 1-18 서열에 정렬시킨 것을 도 4에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카뱉 시스템을 사용하여 13H5 V_H 서열을 더 분석함으로써 각각 도 1A와 4 에서 SEQ ID NO: 1, 4 및 7에 보여진대로 중 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.

13H5 경 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 경 사슬 서열과 비교하여 13H5 경 사슬이 인간 생식계열 VK A27로부터의 V_L 단편 및 인간 생식계열 JK 1로부터의 JK 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 13H5 V_L 서열을 생식계열 VK A27 서열에 정렬시킨 것을 도 6에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카뱉 시스템을 사용하여 13H5 V_L 서열을 더 분석함으로써 각각 도 1B와 6 에서 SEQ ID NO: 10, 13 및 16에 보여진대로 경 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.

13H7의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 2A에서 SEQ ID NO:26 및 20에 각각 도시하였다.

13H7의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 2B에서 SEQ ID NO:29 및 23에 각각 도시하였다.

13H7 중 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 중 사슬 서열과 비교하여 13H7 중 사슬이 인간 생식계열 VH 4-61로부터의 V_H 단편, 인간 생식계열 3-10로부터의 D 단편 및 인간 생식계열 J_H 4b로부터의 J_H 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 13H7 V_H 서열을 생식계열 VH 4-61 서열에 정렬시키는 것을 도 5에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카뱉 시스템을 사용하여 13H7 V_H 서열을 더 분석함으로써 각각 도 2A와 5 에서 SEQ ID NO: 2, 5 및 8에 보여진대로 중 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.

13H7 경 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 경 사슬 서열과 비교하여 13H7 경 사슬이 인간 생식계열 VK A27로부터의 V_L 단편 및 인간 생식계열 JK 2로부터의 JK 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 13H7 V_L 서열을 생식계열 VK A27 서열에 정렬시키는 것을 도 6에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카뱉 시스템을 사용하여 13H7 V_L 서열을 더 분석함으로써 각각 도 2B와 6에서 SEQ ID NO: 11, 14 및 17에 보여진대로 경 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.

7H9의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 3A에서 SEQ ID NO:27 및 21에 각각 도시하였다.

7H9의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 3B에서 SEQ ID NO:30 및 24에 각각 도시하였다.

7H9 중 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 중 사슬 서열과 비교하여 7H9 중 사슬이 인간 생식계열 VH 1-18로부터의 V_H 단편, 인간 생식계열 6-6으로부터의 D 단편 및 인간 생식계열 J_H 4b로부터의 J_H 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 7H9 V_H 서열을 생식계열 VH 1-18 서열에 정렬시키는 것을 도 4에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카뱉 시스템을 사용하여 7H9 V_H 서열을 더 분석함으로써 각각 도 3A와 4에서 SEQ ID NO: 3, 6 및 9에 보여진대로 중 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.

7H9 경 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 경 사슬 서열과 비교하여 7H9 경 사슬이 인간 생식계열 VK A27로부터의 V_L 단편 및 인간 생식계열 JK 1로부터의 JK 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 7H9 V_L 서열을 생식계열 VK A27 서열에 정렬시키는 것을 도 6에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카뱉 시스템을 사용하여 7H9 V_L 서열을 더 분석함으로써 각각 도 3B와 6에서 SEQ ID NO: 12, 15 및 18에 보여진대로 경 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.

실시예 3: 항-IFN 알파 인간 모노클론 항체가 여러 인터페론 알파 서브타입의 생물학적 활성을 억제한다

실시예 1에 기술한대로 인터페론 알파는 용량 의존 방식으로 다우디(Burkitts 림프종, ATCC #CCL-213) 세포의 증식을 억제한다. 그의 수용체에 결합하는 인터페론을 차단하는 중화항체는 증식을 복원할 것이다. 이 세포 증식 분석을 사용하여, 정제된 인간 항-IFN 알파 항체의 특이성은 자연 림파아구증 IFNα, 자연 백혈구 인터페론, 13 재조합체 IFN 알파 서브타입, IFN 베타 및 IFN 오메가의 차단을 시험함으로 검사하였다.

다우디 세포를 96웰의 바닥이 편평한 세포 배양 플레이트 내에 IFNα 첨가 및 미첨가로 배양 매체 (10% FCS,

1x2-ME, L-글루타민 및 페니실린 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640) 에서 성장시켰다. 시험된 각 타입 I 인터페론은 EC50에서 분석하였고 각 항체의 2배 연속 적정량과, 전형적으로 50 ug/ml(312 nM)부터 381 pg/ml(2.4 pM)까지로 혼합되었다. 항체/IFN 혼합물은 $1x10^4$ 다우디 세포/100ul/well의 최종밀도로 96 웰 플레이트 내 다우디 세포에 첨가하였고 37℃, 5% CO_2에서 72시간 배양하였다. 증식을 MTS(프로메가), 20ul/well을 첨가하여 분석하였고 3시간 동안 더 배양을 한 다음 490 nm에서의 O.D.를 측정하였다. 생존할 수 있는 세포수는 읽혀진 O.D.에 비례하였다. 인터페론 차단 비율은 IFN이 없을 때(=100% 차단)와 IFN만 있을 때(=0% 차단)의 다우디 증식에 비교하여 계산되었다. 차단 정도에 따라 항체 수를 세어 시험된 각각의 항체에 대한 IFNα 서브타입 특이성의 프로필을 얻었다. EC_{50}은 비선형 복귀; S자형의 용량 응답; 가변 기울기 곡선 피팅을 사용하여 PRISM™ 소프트웨어로 유도되었다. 그 결과 인간 항-IFN 알파 항체 13H5가 특히 IFNα 6, 2b, 2a, 1, 16, 10, 8, 5 및 14 이고 IFNα 21, IFNβ 또는 IFNω이 아닌 여러 인터페론 알파 서브타입의 활성을 억제하는 것을 설명하였다. 13H5는 IFN 알파 서브타입 17, 7 및 4의 낮은 수준 억제재이다. 인터페론의 EC_{50} 값과 차단 %는 아래 표 1 에 나타내었다.

표1: 여러 IFN 알파 서브타입의 항체 억제

13H5 IFN 차단		
IFN	EC50	1000X
림파아구증 IFN	127 pM	82%
IFNα 6	208 pM	95%
IFNα 2b	432 pM	80%
IFNα 2a	448 pM	95%
IFNα 1	4.6 nM	68%
백혈구 IFN	5.5 nM	70%
IFNα 16	6.8 nM	80%
IFNα 10	19.6 nM	40%
IFNα 8	26 nM	37%
IFNα 5	56 nM	47%
IFNα 14	70 nM	34%
IFNα 17	110 pM	13%
IFNα 7	>300 nM	15%
IFNα 4	>300 nM	7%
IFNα 21	>300 nM	NS
IFN-베타	>300 nM	NS
IFN-오메가	>300 nM	NS

NS = 의미 없음

실시예 4: 항-IFN 알파 항체에 의한 세포표면 마커의 IFN 알파 유도 억제

세포배양 매체에 IFN 알파 2b를 첨가하는 정상의 말초 혈액 단일핵 세포 (PBMNC)에서 세포 표면 마커 CD38과 MHC 클래스 I의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 일차의 인간 세포 배양물에서 인터페론 유도 세포표면 마커 발현 억제에 대해 인간 항-IFN 알파 항체 13H5의 활성을 시험하고 FACS 분석법에 의해 평가하였다.

항-IFNα 모노클론 항체 13H5와 아이소타입 표준을 PBMNC 배양매체(RPMI 1640+10%FBS+1% 인간 혈장) 내에 각각 20ug/ml로 희석하였다. 항체를 구멍뚫린 마개의 배양 플라스크 T25 내에 1.5ml/well로 분배하고 동일 부피의 400iu/ml 백혈구 IFN, IFN 알파 또는 IFN ω와 혼합하고, 배양매체에서 희석하거나 매체만으로 희석하였다. PBMNC를 제조자의 추천(벡톤 디킨손사)에 따라 헤파린 피복 Vacutainer??CPT™ 튜브를 사용하여 정상 인간 혈액으로부터 분리하였다. 세포를 배양매체(RPMI1640+10%FBS+1% 인간 혈장) 내에 $2x10^6$ 세포/ml로 다시 현탁시키고 동일 부피로 Ab/IFN 혼합물에 첨가하여 최종 분석이 6 ml 매체당 $6x10^6$ PBMNC +5ug/ml Ab +/- 100 iu/ml IFN을 포함하도록 하였다. 플라스크를 37℃, 5% CO_2에서 24시간 또는 48시간 배양하였다.

각 플라스크로부터 조절된 매체를 수거하고 현탁 세포를 솔발(Sorvall) RTH-750 회전기에서 1000 rpm으로 원

심분리하여 회수하였다. 펠렛으로 된 세포를 얼음 위에 놔두고 상층물(supernate)을 ELISA를 위해 -80℃에서 동결시켰다. 부착된 세포를 PBS로 세척(2ml)하여 플라스크로부터 회수하였고 이어서 베르센(versene)(3ml) 내에서 15분간 배양하였다. 플라스크를 베르센 배양 끝에 벗겨내고 플라스크를 최종적으로 PBS 세척(2ml)으로 씻는다. PBS 세척과 베르센 각각을 조합하여 조절 매체 수거물로부터 세포를 회수한다. 모아진(pooled) 세포 현탁액을 솔발(Sorvall) RTH-750 회전기에서 100 rpm으로 원심분리시키고 그 결과 생긴 펠렛을 착색 완충제 (staining buffer) (PBS+0.1M EDTA+2% FBS+1% HS)에서 300 ul로 다시 현탁시키고 V-바닥의 96-well 플레이트에 100 ul/well로 분배하였다.

플레이트를 솔발(Sorvall) RTH-750 회전기에서 2800 rpm으로 펄스-원심분리하고 펠렛으로 된 세포는 다음과 같이 플로로크롬 표지된 항체 내에 25μl/well로 다시 현탁시켰다.: (1) 쥐 항-MHC Ⅰ-FITC + 쥐 항-CD38-PE, 및 (2) 아이소타입 표준, 쥐 IgG-FITC + 쥐 IgG-PE. 플레이트를 45분간 얼음 위에서 배양하였고 광으로부터 보호하였다. 세포를 200 ul 착색 완충제를 첨가하여 3번 세척하였고 이어서 펄스-원심분리를 하였으며 최종적으로 PBS 내 2% 파라포름알데히드 200 ul에 다시 현탁시켰다. 단핵세포(monocyte cell)를 벡톤 디킨손 FACScalibur™으로 유동 세포측정법에 의해 분석하고, 분석으로부터 오염된 세포를 제거하기 위해 전방산란(Forward Scatter) 대 측면산란(Side Scatter) 그래프 상에 게이트를 그려넣었다. 그 결과 인간 모노클론 항체 13H5가 정상 PBMNC 상에 CD38과 MHC 클래스 I의 발현에 있어 백혈구 IFN과 재조합된 IFNα 2b 유도 변화를 억제한다는 것이 설명되었다. 인간 모노클론 항체 13H5는 CD38과 MHC 클래스 I의 세포 표면 마커 발현에서 IFNω 매개 변화를 방해하지 않는다. 이러한 결과를 아래 표2와 표3에 나타내었다.

표 2: 정상 PBMNC 상의 IFN-유도 MHC 클래스 I 발현에서 퍼센트 변화

Ab 처리	백혈구 IFN (100 u/ml)	IFN 알파 2b (100 u/ml)	IFN 오메가 (100 u/ml)
항체 없음	31	21	28
13H5 (5 μg/ml)	-1	-1	29
표준 (5 μg/ml)	16	25	26

표 3: 정상 PBMNC 상의 IFN-유도 CD38 발현에서 퍼센트 변화

Ab 처리	백혈구 IFN (100 u/ml)	IFN 알파 2b (100 u/ml)	IFN 오메가 (100 u/ml)
항체 없음	774	426	782
13H5 (5 μg/ml)	195	16	760
표준 (5 μg/ml)	614	392	829

실시예 5: 항-IFN 알파 항체에 의한 IP-10의 IFN-유도 발현의 억제

세포 배양 매체에 IFN 알파 2b를 첨가하면 정상 말초 혈액 단일핵 세포(PBMNC) 내의 IP-10 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. ELISA 결합 분석에 의해 정상 PBMNC 배양물 내의 IP-10의 인터페론 유도 발현 억제에 대한 인간 항-IFN 알파 항체 13H5의 활성을 시험하였다.

백혈구 IFN, IFN 알파 2b, 또는 IFNω로 조절하여, 실시예4에 기술한대로 PBMNC 배양물을 준비하였다. 제조자의 추천에 따라 1:30으로 희석하여 양적 샌드위치 ELISA 키트(Quantikine??, R&D 시스템)를 사용하여 IP-10/CXCL10 발현에 대해 조절된 매체를 분석하였다. 그 결과로 인간 모노클론 항체 13H5가 정상 PBMNC 배양물 내의 IP-10의 백혈구 IFN 및 재조합 IFNα 2b 유도 발현은 억제하지만 IFNω 유도 IP-10 발현은 차단하지 않는 것이 설명되었다. 이러한 결과를 표4에 나타내었다.

표 4: 정상 PBMNC 상의 IFN-유도 IP-10 발현에서의 항체 변화

Ab 처리	IFN 없음	백혈구 IFN (100 u/ml)	IFN 알파 2b (100 u/ml)	IFN 오메가 (100 u/ml)
항체 없음	907	2665	2739	2904
13H5 (5 μg/ml)	946	1765	1262	3862
표준 (5 μg/ml)	838	3512	3117	3960

실시예 6: 항-IFN 알파 인간 모노클론 항체의 친화 특성

이 실시예에서 모노클론 항체 13H5를 재조합 IFN 알파 2a와 IFN 알파 2b의 결합 친화성에 대해 비아코어 (Biacore) 분석을 사용하여 시험하였다.

10 ug/ml로 정제된 항체를 프로트-G(Prot-G)로 피복된 CM5 칩 상에서 포집하였다. HBS-EP 작동 완충제 내 80 nM으로부터 10 nM까지의 항원 농축물을 25 ul/min 속도로 칩을 통과시켰다. 결합 시간을 5분 주고 그 다음 10분간 분리시간을 주었다. 칩과 항체 둘다에 대한 항원의 비특이적 결합 및 백그라운드는 포집된 아이소타입 표준 인간-IgG(시그마) 및 완충제로 표면에 대한 결합을 검출함으로 제거되었다. 칩의 재생성은 20mM NaOH + 400 mM NaCl을 사용하여 0.4분간 100 ul/min 유속으로 이루어졌다. 결합 및 분리 곡선은 BIA 평가 소프트웨어 (비아코어 AB)를 사용하여 랑뮤어(Langmuir) 결합 모델에 맞추었다. 이 결과를 아래 표5에 나타내었다.

표 5: 모노클론 항체 13H5의 결합 특성

IFN 알파 서브타입	K_D	K_{on}	K_{off}
IFN 알파 2a	1.0×10^{-10} M	3.3×10^{-5} 1/Ms	3.5×10^{-5} q/Ms
IFN 알파 2b	1.0×10^{-10} M	5.1×10^{-5} 1/Ms	5.3×10^{-5} q/Ms

실시예 7: SLE 혈장으로 매개된 수지상 세포 발달의 항체 억제

SLE 혈장은 정상 인간 단핵세포로부터 수지상 세포 발달을 유도한다. 이 실시예에서, SLE 혈장에 의한 세포 표면 마커 CD38, MHC 클래스 I 및 CD123의 유도를 억제하는 항체의 능력을 평가하여, 수지상 세포 발달의 억제에 대해 정제된 모노클론 인간 항-IFN 알파 항체를 시험하였다.

25 ml의 황갈색 피복을 PBS로 4배 희석하였다. 이 시료를 4 x 50 ml 원뿔 튜브에 분리하고, 15 ml의 림프구 분리 매체 (ICN 생의학)를 하부에 층으로 만들었다. 이어서 500 x g에서 30분간 회전시키고 PBMNC를 포함하는 황갈색 층을 제거하여 PBS로 세척하였다. 세포를 $4x10^6$ 세포/ml로 배양 매체에서 다시 현탁시켰다. 배양 매체 내에서 37 ℃로 1.5시간 동안 PBMC($2.0x10^7$ 세포/5ml/$25cm^2$ 플라스크)를 배양하고 그 다음 비부착 세포를 두 번 세척함으로 단핵세포를 분리하였다. 두 번째 세척에 이어서 1% 가열 불활성된 인간 혈청을 포함하는 매체 내에서 세포를 배양하였다. 25% SLE 환자 혈장 +/- 중화 항체 및 아이소타입 표준 (30ug/ml)을 배양 플라스크에 첨가하였다; IFN 알파 2b (100 & 10 iu/ml) + 25% 정상 인간 혈장을 마커 유도용 양성 표준으로 사용하였다. 플라스크를 37℃, 5% CO_2에서 3-7일간 배양하였다. 그 다음 PBMNC 배양물 내의 마커 유도의 차단에 대해 기술된대로(상기 실시예4에 기술된대로) 착색되기 전에 필요하면 PBS 및 베르센 처리를 한 조절된 매체로부터 수지상 세포를 회수하였다. 수지상 세포의 착색을 벡톤 디킨손 FACScalibur™으로 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 분석으로부터 오염된 세포를 제거하기 위해 전방산란(Forward Scatter) 대 측면산란(Side Scatter) 그래프 상에 게이트를 그려넣었다. 13H5 존재 하에서 세포 표면 마커 MHC 클래스 I, CD38, 및 CD123의 정상 발현에 의해 설명된대로, 항-IFN 알파 인간 모노클론 항체 13H5는 수지상 세포 발달의 IFN 알파 의존 공정을 억제하였다. 그 결과를 아래 표6에 나타내었으며, 이 표에서 (A), (B), (C) 및 (D)는 4개의 대표적인 SLE 공여 시료의 결과를 요약한 것이다.

표 6: 수지상 세포 성숙의 억제

(A)

	공여 혈장 40 (13 iu/ml IFN)		
배양 조건	MHC I	CD123	CD38
0 IFN	148.34	14.22	39.78
10 iu/ml IFNa 2b	199.84	18.92	44.18
100 iu/ml IFNa 2b	229.05	26.27	63.36
0 Ab	206.02	22	46.78
13H5	144.92	13.67	35.11
표준 IgG	193.52	21.5	62.04

(B)

	공여 혈장 39 (19 iu/ml IFN)		
배양 조건	MHC I	CD123	CD38
0 IFN	248.83	18.63	32.69
10 iu/ml IFNa 2b	331.82	21.42	63.23
100 iu/ml IFNa 2b	430.87	30.56	60.61
0 Ab	443.21	17.53	44.87
13H5	330.59	14.18	20.56
표준 lgG	432.43	17.88	39.33

(C)

	공여 혈장 36		
배양 조건	MHC I	CD123	CD38
0 IFN	358.88	15.25	45.75
10 iu/ml IFNa 2b	457.133	17.41	58.48
100 iu/ml IFNa 2b	496.32	20.63	64.55
0 Ab	488.58	28.92	88.31
13H5	429.31	15.44	73.88
표준 lgG	485.7	19.75	115.18

(D)

	공여 혈장 59 (75 iu/ml IFN)		
배양 조건	MHC I	CD123	CD38
0 IFN	228.96	10.5	58
10 iu/ml IFNa 2b	271.19	11.95	86.49
100 iu/ml IFNa 2b	293.99	12.73	112.49
0 Ab	202.04	14.74	61.61
13H5	127.22	9.17	30.79
표준 lgG	266	14.4	55.46

실시예 8: 모노클론 항체 13H5의 작용 기구

이 실시예에서, 13H5의 작용 기구를 결정하기 위해, IFNAR 발현 세포에 대해 방사능 표지된 시토킨 및 항체를 사용한 몇 가지 결합 실험을 행하였다.

실험의 첫째 세트에서, 재조합 IFNα 2a를 29.3 Ci/mmole (피얼스 IODO-GEN[?] 튜브)의 특이 활성으로 방사능 요오드화하고 약 1nM의 K_d를 갖는 다우디 세포와 특이적으로 결합하는 것이 측정되었다. 세포에 대한 이 리간드(ligand)의 경쟁적 결합을 검사 시험하기 위해, 유리섬유 플레이트를 200 μl/well 밀크 완충제로 4℃에서 밤새도록 차단시켰다. 다우디 세포를 RPMI 1640 매체 내에 $2x10^6$ 세포/well로 분배하였고 13H5, 아이소타입 표준 항체 또는 표지되지 않은 IFNα(30 nM에서 14 pM까지)와 경쟁상대를 3배로 희석한 시리즈+^{125}I-IFNα (2nM)와 혼합시켰다. 플레이트를 교반기에서 4℃에서 2시간 배양시키고, RPMI로 세척하고 공기건조시켰다. 필터를 유리튜브로 옮겨 방사능 활성에 대해 분석하였다.

몇 가지 실험으로부터의 대표적인 결과를 도 7에 나타내었다. 표지되지 않은 리간드는 양성 표준으로 사용되었고 약 0.5 nM의 IC_{50}로 ^{125}I-IFNα 결합을 특이적으로 차단하는 것이 관찰되었다. 그러나 13H5 항체는 요오

드화 리간드의 결합을 차단하지 않았으나 대신 아이소타입 표준 항체의 행동과는 대비적으로, 처리된 세포와 관련된 방사성 신호를 증가시키는 것으로 관찰되었으며 이는 ^{125}I-IFNα이 세포와 결합하는데 어떤 효과도 없다. 이러한 결과는 13H5가 비경쟁적인 작용 기구를 갖고 있고 리간드 결합의 차단에 의한 것이 아니라 신호 표시의 차단에 의해 생물학적 활성을 중화시킨다는 것을 가리킨다.

또한 상기의 결과는 13H5가 IFNα 존재시 세포표면과 결합될 것이라는 것을 말해주고 있다. 각 13H5 분자는 두개의 IFNα 분자와 결합할 능력을 가지고 있으므로 이러한 결과들이 또한 세포막에 연결되어 있는 둘째 리간드를 만들어내는 것이 가능하다. 이러한 가설은 13H5 결합자리에 대한 IFNα의 비율이 1:1로 일정한 리간드와 항체의 농도에서 세포-결합 방사성이 약 2배 증가된다는 관찰에 의해 뒷받침된다.

13H5의 작용 기구를 더 검사하기 위해서, IFNα 2a가 있는 경우 또는 없는 경우에 방사능표지된 항체를 사용하여 항체의 다우디 세포에의 결합을 분석하였다. 이전의 결합 연구에 근거하여 IFNAR 결합을 포화시키는 농도 (10 nM)로 시토킨을 사용하였다. 13H5 항체를 414 Ci/mmole (피얼스 IODO-GEN?? 튜브)의 특이 활성으로 방사능 요오드화하였다. 항체가 세포와 결합하는 것을 검사하기 위해, 유리섬유 플레이트를 200 μl/well 밀크 완충제로 4℃에서 밤새도록 차단시켰다. 다우디 세포를 RPMI 1640 매체 내에 2x10^{6} 세포/well로 분배하였고 ^{125}-13H5(20 nM에서 20 pM까지), +/- IFNα 2a (10 nM)의 2배로 희석한 시리즈와 혼합시켰다. 플레이트를 RPMI로 세척하고 공기건조시키기 전에 교반기에서 4℃에서 2시간 배양시켰다. 필터를 유리튜브로 옮겨 방사성을 분석하였다. IFNα 2a 의존성 결합을 결정하기 위해 ^{125}-13H5 단독의 결합에 대해 측정된 CPM 값을 IFNα 2a가 있는 경우 측정된 값으로부터 뺐다. 여러번의 실험으로부터의 대표적인 결과들을 도 8에 나타내었다. 이 결과들은 IFNα 2a가 있는 경우 ^{125}-13H5의 다우디 세포와의 결합이 용량 의존성 포화가능한 결합이고 ^{125}-13H5만으로는 결합이 무시할만하다는 것을 보여주고 있다. 13H5의 특이적 IFNα-의존 결합을 도 8에 원으로 도시하였고 IFNα가 있는 경우에 13H5 결합에 대한 전체 CPM으로부터 항체 단독에 대한 CPM을 빼서 계산하였다.

따라서 요약하면 13H5 작용기구는 13H5에 결합된 IFNα 복합체가 세포표면 위의 IFNAR과 결합할 수 있으며 IFNα의 생물학적 활성이 IFNAR을 통한 신호표시 차단에 의해 중화되는 비경쟁적인 것이다.

실시예 9: 13H5의 항체 의존 세포-매개 세포독성 분석

13H5는 IFNα가 있을 경우에 세포 표면과 결합될 수 있으므로, ^{51}Cr-방출 분석을 사용하여 항체 의존 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 조사하였다. 라지(Raji) 세포를 새로운 인간 단일핵 세포에 의한 용균용 표적으로 사용하였다. 피콜 히파크 밀도 원심분리법 (Ficoll Hypaque density centrifugation) 에 의해 헤파린으로 된 전체 혈액으로부터 단일핵 세포를 정제하였다. 바닥이 U 모양인 미세 적정량 플레이트로 웰(well) 당 10^{4} 세포씩 분배하기에 앞서 1시간 동안 10^{6} 세포당 100μCi의 Cr 으로 표적세포를 표지하고, 효과기 세포 (효과기:표적 비 = 50:1) + 적정량의 항체와 결합하였다. 이어서 37℃에서 4시간 동안 배양하고 상청액 조절 매체를 수집하여 방사성을 분석하였다. 항체가 없을 때의 방사성 방출을 백그라운드에 대한 표준으로 사용하였고 표적세포를 세척제로 처리하여 100% 용균을 측정하였다. 세포독성은 다음 공식으로 계산하였다: 용균%=(실험 cpm - 표적 누출 cpm)/(세척제 용균 cpm - 표적 누출 cpm) x 100%. 특이적 용균 = 13H5로 용균% - 13H5 없이 용균%. 분석은 세번 수행되었다.

도 9에 요약된 ADCC 분석 결과는 13H5가 라지 세포 단독 또는 IFNα 2b가 있는 경우에 라지세포 상에 어떤 중요한 ADCC 활성도 가지고 있지 않다는 것을 설명하고 있다. 마찬가지로 아이소타입 매칭 IgG는 어떠한 활성도 나타내지 않았고 반면에 양성 표준 (Rituximab)은 강한 용량 의존 세포독성을 나타내었다. 이러한 결과는 IFNAR 발현 세포의 세포표면과 13H5의 IFNα 매개 결합이 ADCC를 매개하는데 충분하지 않다는 것을 가리킨다.

실시예 10: 13H5의 안정성 시험

13H5 항체는 중 사슬의 CDR2 지역 내 Asn-55에 잠재적인 탈아미드화 자리를 포함한다. 아스파라긴 잔기의 탈아미드화는 재조합 DNA 기술을 사용하여 얻어진 단백질과 폴리펩티드의 일반적인 변형이며 탈아미드화가 항상 생물학적 활성의 손실과 상호 관련되지는 않지만 감소된 생물학적 활성 및/또는 안정성을 일으키게 된다. 아스파르트산(및 아이소-Asp) 을 형성하는 아스파라긴의 탈아미드화는 순 전하의 변화를 일으키는데 이는 전하-기반 분석법에 의해 검출될 수 있다. 가속된 조건(염기성 pH) 하에서 13H5의 탈아미드화를 검사하기 위해서,

IEX-HPLC와 모세관 등전점 집속 (cEIF)에 의한 Fab 단편의 탈아미드화 변형물 검출 방법을 사용하였다.

13H5의 탈아미드화를 가속하기 위해, 항체를 알칼리성 pH에서 완충제에 노출시켰다. 출발 물질로서 13H5의 102 μl 분취량을 (600 μg 전체에 대해 5.9 mg/ml로) 498 μl의 PBS와 6 μl의 100X 소디움 아지드 스톡(2% 용액)에 첨가하였다. 시간이 영(zero)일 때 PBS 시료로는 130 μl의 출발 물질을 30 μ의 PBS와 혼합하고 시료를 더 분석할 때까지 -20℃에 놓아두었다. 탈아미드화 완충제 내에서 시간이 영일 때 시료로는 130 μl의 출발 물질을 15 μl의 10X 탈아미드화 완충제(10% 암모니움 비카르보네이트, pH 8.5) 및 15 μl의 pH 조정 완충제 (1M MES, pH 6.0)와 혼합하여 더 분석할 때까지 -20℃에 놓아두었다. 둘째날 PBS 내 시료로는 130 μl의 출발 물질을 30 μl의 PBS와 혼합하여 48시간 동안 40℃에서 배양하고 시료를 그 다음 더 분석할 때까지 -20℃에 놓아두었다. 둘째날 탈아미드화 조건하의 시료로는 130 μl의 출발 물질을 15 μl의 10X 탈아미드화 완충제와 혼합하여 48시간 동안 40℃에서 배양하였다. 48시간 후 15 μl의 pH 조정 완충제를 첨가하여 더 분석할 때까지 시료를 -20℃에 놓아두었다.

분석을 위한 상기 시료들을 준비하기 위해, 파파인 소화(digestion)를 수행하였다. 사용된 반응 조건은: 160 μl의 시료 (130μg의 13H5), 3.2 μl의 50 mM 시스테인 및 1.0 mg/ml 용액에서 6.5 μl의 파파인 효소. 시료를 40℃에서 4시간 놓아두었고 4.8 μl의 1M 요오드아세트아미드 첨가로 반응을 중지시켰다. 파파인 소화 후에 Fab 및 Fc 단편의 존재를 확인하기 위해 비감소 SDS-PAGE를 수행하였다.

시료에 IEX-HPLC를 수행하기 위해 모든 시료를 우선 3시간 동안 물에 대해 투석하였다. 그 다음 50 μl의 각 시료를 다음의 크로마토그라피 조건으로 HPLC에 적용하였다.

칼럼 = Dionex WCX-10 약 양이온 교환 칼럼

"A" 완충제 = 10 mM MES, pH 5.5

"B" 완충제 = 10 mM MES, pH 5.5; 1.0 M NaCl

용출 = 4-25% "B", 0.8 ml/min에서 30분 이상

검출 = 280 nM에서 자외선(UV) 흡수도

IEX-HPLC 분석 결과를 아래 표7에 요약하였고, 이 표는 탈아미드화 조건 하에서 시간이 영(0)일 때와 둘째날 시료들에 대해 탈아미드화된 Fab의 피크 면적을 보여주고 있다:

표 7:

시료	피크 면적 탈아미드화된 Fab	(% 피크 면적) 탈아미드화된 Fab	피크 면적 Fab	(% 피크 면적) Fab	전체 피크 면적
시간 0	89,244	6.13	1,366,233	93.87	1,455,477
둘째 날	459,759	43.95	586,428	56.01	1,046,187

cIEF 분석을 수행하기 위해서, 시료를 3시간 동안 물에 대해 투석하고 그 다음 표준 분석 방법을 사용하여 cIEF에 적용하였다. cIEF 분석 결과를 아래 표8에 요약하였고, 이 표는 탈아미드화 조건 하에서 시간이 영(0)일 때와 둘째날 시료들에 대해 탈아미드화된 Fab의 피크 면적을 보여주고 있다:

표 8:

시료	피크 면적 탈아미드화된 Fab	(% 피크 면적) 탈아미드화된 Fab	피크 면적 Fab	(% 피크 면적) Fab	전체 피크 면적
시간 0	75,902	13.96	467,987	86.04	543,889
둘째 날	251,317	58.81	176,040	41.19	427,357

강화된 탈아미드화의 pH 의존성을 검사하기 위해서, PBS (pH 7.0) 내 둘째 날 시료에 대해 IEX-HPLC 데이터를 탈아미드화 조건 하에서 둘째 날 시료와 비교하였다. 그 결과를 아래 표 9에 요약하였고, 이 표는 둘째 날 PBS에 대한 및 탈아미드화 조건 하의 둘째 날에 대한 탈아미드화된 Fab의 피크 면적을 보여주고 있다:

표 9:

시료	피크 면적 탈아미드화된 Fab	(% 피크 면적) 탈아미드화된 Fab	피크 면적 Fab	(% 피크 면적) Fab	전체 피크 면적
PBS	106,344	7.0	1,413,233	93.0	1,519,577
탈아미드화됨	459,759	43.95	586,428	56.01	1,046,187

이 데이터는 단백질 분해에 대한 현재 이론을 뒷받침하고 있고, 이는 베타-아스파르틸 전환 기구에 의한 폴리펩티드의 탈아미드화가 중성 pH에 비교하여 염기성 pH 에서 증가된 속도로 일어나는 것을 예고하고 있다.

실시예 11: 향상된 안정성을 갖는 13H5 돌연변이체의 제조와 특성화

이 실시예에서, Asn-55에서 아미노산 치환을 갖는 13H5 돌연변이체를 제조하고 강화 탈아미드화 조건 하에서 둘째 날에 실시예 10에 기술한대로 cIEF 분석에 의해 이 돌연변이체의 안정성을 시험하였다. 표준 재조합 DNA 돌연변이 유발 기술에 의해 돌연변이체를 제조하였다. 야생형 13H5에 비교하여 V_H의 아미노산 위치 55-58에서의 돌연변이체의 서열은 다음과 같다:

13H5 야생형: N G N T(SEQ ID NO: 19의 아미노산 잔기 55-58)

돌연변이체 #1: **D** G N T(SEQ ID NO: 38)

돌연변이체 #2: **Q** G N T(SEQ ID NO: 39)

돌연변이체 #3: **Q** G **Q** T(SEQ ID NO: 40)

돌연변이체 #1, #2 및 #3의 전-길이 V_H 아미노산 서열을 각각 SEQ ID NO: 34, 35 및 36에 나타내었다.

cIEF 분석 결과를 아래 표 10에 나타내었으며, 이 표는 야생형 및 둘째날 탈아미드화 조건에서의 돌연변이체에 있어서 탈아미드화 Fab의 피크 면적을 보여주고 있다:

표 10:

시료	피크 면적 탈아미드화된 Fab	(% 피크 면적) 탈아미드화된 Fab	피크 면적 Fab	(% 피크 면적) Fab	전체 피크 면적
13H5 야생형	24,065	54.2	20,304	45.8	44,369
돌연변이체 1	10,382	9.7	96,584	90.3	106,966
돌연변이체 2	4,592	8.0	52,460	92.0	57,052
돌연변이체 3	7,733	8.9	79,077	91.1	86,810

이러한 결과들은 세 가지의 Asn-55 돌연변이체 각각이 야생형 13H5 항체보다 강화된 탈아미드화 조건 하에서 더 큰 안정성을 나타내는 것을 설명하고 있다.

서열 목록의 요약

SEQ ID NO:	서열	SEQ ID NO:	서열
1	VH CDR1 a.a. 13H5	19	VH a.a. 13H5
2	VH CDR1 a.a. 13H7	20	VH a.a. 13H7
3	VH CDR1 a.a. 7H9	21	VH a.a. 7H9
4	VH CDR2 a.a. 13H5	22	VK a.a. 13H5
5	VH CDR2 a.a. 13H7	23	VK a.a. 13H7
6	VH CDR2 a.a. 7H9	24	VK a.a. 7H9
7	VH CDR3 a.a. 13H5	25	VH n.t. 13H5
8	VH CDR3 a.a. 13H7	26	VH n.t. 13H7
9	VH CDR3 a.a. 7H9	27	VH n.t. 7H9
10	VK CDR1 a.a. 13H5	28	VK n.t. 13H5

11	VK CDR1 a.a. 13H7	29	VK n.t. 13H7
12	VK CDR1 a.a. 7H9	30	VK n.t. 7H9
13	VK CDR2 a.a. 13H5	31	VH 1-18 생식계열 a.a.
14	VK CDR2 a.a. 13H7	32	VH 4-61 생식계열 a.a.
15	VK CDR2 a.a. 7H9		
		33	VK A27 생식계열 a.a.
16	VK CDR3 a.a. 13H5		
17	VK CDR3 a.a. 13H7	34	VH a.a. 13H5 N55D mut.
18	VK CDR3 a.a. 7H9	35	VH a.a. 13H5 N55Q mut.
		36	VH a.a. 13H5 N55Q mut. N57Q mut.
		37	VH a.a. 13H5 G56A mut.
		38	VH a.a. 55-58 13H5 N55D mut.
		39	VH a.a. 55-58 13H5 N55Q mut.
		40	VH a.a. 55-58 13H5 N55Q mut. N57Q mut.

도면의 간단한 설명

[0313] 도1A는 13H5 인간 모노클론 항체의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 25)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 19)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 4) 및 CDR3(SEQ ID NO: 7)지역이 나타나 있고, V, D 및 J 생식계열 유도물이 나타나 있다.

[0314] 도1B는 13H5 인간 모노클론 항체의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 28)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 22)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 10), CDR2 (SEQ ID NO: 13) 및 CDR3(SEQ ID NO: 16)지역이 나타나 있고, V, D 및 J 생식계열 유도물이 나타나 있다.

[0315] 도2A는 13H7 인간 모노클론 항체의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 26)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 20)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 2), CDR2 (SEQ ID NO: 5) 및 CDR3(SEQ ID NO: 8)지역이 나타나 있고, V, D 및 J 생식계열 유도물이 나타나 있다.

[0316] 도2B는 13H7 인간 모노클론 항체의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 29)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 23)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 11), CDR2 (SEQ ID NO: 14) 및 CDR3(SEQ ID NO: 17)지역이 나타나 있고, V, D 및 J 생식계열 유도물이 나타나 있다.

[0317] 도3A는 7H9 인간 모노클론 항체의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 27)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 21)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 6) 및 CDR3(SEQ ID NO: 9)지역이 나타나 있고, V, D 및 J 생식계열 유도물이 나타나 있다.

[0318] 도3B는 7H9 인간 모노클론 항체의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 30)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 24)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 15) 및 CDR3(SEQ ID NO: 18)지역이 나타나 있고, V, D 및 J 생식계열 유도물이 나타나 있다.

[0319] 도4는 인간 생식계열 VH1-18 아미노산 서열(SEQ ID NO: 31)과 13H5 및 7H9의 중 사슬 가변 지역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다.

[0320] 도5는 인간 생식계열 VH4-61 아미노산 서열(SEQ ID NO: 32)과 13H7의 중 사슬 가변 지역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다.

[0321] 도6은 인간 생식계열 VK A27 아미노산 서열(SEQ ID NO: 33)과 13H5, 13H7 및 7H9의 경 사슬 가변 지역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다.

[0322] 도7은 mAb 13H5(▼)에 의해 ^{125}I-IFNα 2a 결합의 증진에 대한 표지되지 않은 IFNα 2a(●)에 의해 IFNAR-발현 다우디(Daudi) 세포에 ^{125}I-IFNα 2a의 결합의 경쟁을 나타내는 그래프이다. 아이소타입 표준 항체는 결합에 어떠한 효과도 없다(◆).

[0323] 도8은 IFNα 2a 존재하(■)에서는 다우디 세포에 ^{125}I-13H5가 결합되나 IFNα 2a 부재하(▲)에서는 결합하지 않는 것을 나타내는 그래프이다. 13H5의 특정 IFNα-의존 결합은 원으로 표시하였다(●).

[0324] 도9는 13H5(■), 13H5+IFNα(▲), 아이소타입 표준 항체+IFNα(▼), 또는 양성 표준 항체(●)의 존재하에서 신선한 인간 단핵 세포에 의한 라지(Raji) 세포 용균작용의 ADCC 분석 결과를 나타내는 그래프이다. 용균작용은 단지 양성 표준에서 나타났다.

도면

도면1A

양 – IFNα 13H5 VH

V 단편 : 1-18
D 단편 : 결정되지 않음
J 단편 : JH4b

```
      Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   A   S   V
1     CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                                      CDR1 (SEQ ID NO:1)
                                                      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      K   V   S   C   K   A   S   G   Y   T   F   T   S   Y   S   I   S   W
55    AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTT ACC AGC TAT AGT ATC AGC TGG

                                                              CDR2
                                                              ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   M   G   W   I   S   V   Y
109   GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AGC GTT TAC

                      CDR2 (SEQ ID NO:4)
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      N   G   N   T   N   Y   A   Q   K   F   Q   G   R   V   T   M   T   T
163   AAT GGT AAC ACA AAC TAT GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC ACA

      D   T   S   T   S   T   A   Y   L   E   L   R   S   L   R   S   D   D
217   GAC ACA TCC ACG AGC ACA GCC TAC CTG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAC GAC

                                          CDR3 (SEQ ID NO:7)
                                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   P   I   A   A   G   Y   W   G   Q
271   ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CCC ATA GCA GCA GGC TAC TGG GGC CAG

      G   T   L   V   T   V   S   S           (SEQ ID NO:19)
325   GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA          (SEQ ID NO:25)
```

도면1B

항 – IFNα 13H5 VK

V 단편 : A27
J 단편 : JK1

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
  1   GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                  CDR1 (SEQ ID NO:10)
                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   T   Y   L   A   W
 55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC ACC TAC TTA GCC TGG

                                                                  CDR2
                                                              ~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109   TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

        CDR2 (SEQ ID NO:13)
      ~~~~~~~~~~~
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                          ~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217   ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

            CDR3 (SEQ ID NO:16)
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~                   (SEQ ID NO:22)
      Q   Y   G   S   S   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271   CAG TAT GGT AGC TCA CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
                                                        (SEQ ID NO:28)
```

도면2A

항-IFNα 13H7 VH

V 단편 : 4-61
D 단편 : 3-10
J 단편 : JH4b

```
      Q   V   Q   L   Q   E   S   G   P   G   L   M   K   P   S   E   T   L
1     CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG ATG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                                          CDR1 (SEQ ID NO:2)
                                                      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      S   L   T   C   T   V   S   G   G   S   V   S   S   G   S   Y   Y   W
55    TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GGT AGT TAC TAC TGG

      ~~~~                                                        ~~~~~~~~~~~
      S   W   I   R   Q   P   P   G   M   G   L   E   W   I   G   Y   I   Y
109   AGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG ATG GGA CTG GAG TGG ATT GGT TAT ATC TAT

                      CDR2 (SEQ ID NO:5)
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      S   G   G   G   A   N   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S
163   TCC GGG GGA GGC GCC AAC TAC AAC CCT TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA

      V   D   T   S   K   N   Q   F   S   L   K   L   N   S   V   T   A   A
217   GTG GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG ACC GCT GCG

                                                  CDR3 (SEQ ID NO:8)
                                              ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      D   T   A   V   Y   F   C   A   R   G   I   P   M   V   R   G   I   L
271   GAC ACG GCC GTG TAT TTC TGT GCG AGA GGA ATT CCT ATG GTT CGG GGA ATT CTT

      ~~~~~~~~
      H   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   (SEQ ID NO:20)
325   CAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA  (SEQ ID NO:26)
```

도면2B

항 - IFNα 13H7 VK

V 단편 : A27
J 단편 : JK2

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1     GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                  CDR1 (SEQ ID NO:11)
                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   F   L   A   W
55    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TTC TTA GCC TGG

                                                                CDR2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109   TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

        CDR2 (SEQ ID NO:14)
      ~~~~~~~~~~~~
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

      CDR3
                                                                        ~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217   ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                CDR3 (SEQ ID NO:17)
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~                  (SEQ ID NO:23)
      Q   Y   G   S   S   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I   K
271   CAG TAT GGT AGC TCA CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
                                                        (SEQ ID NO:29)
```

도면3A

항 – Interferon α 7H9 VH

V 단편 : 1-18
D 단편 : 6-6
J 단편 : JH4b

```
      Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   A   S   V
  1   CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

                                                          CDR1 (SEQ ID NO:3)
                                                      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      K   V   S   C   K   A   S   G   Y   T   F   S   S   Y   G   I   S   W
 55   AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAT ACC TTT TCC AGC TAT GGT ATC AGC TGG

                                                              CDR2
                                                      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   M   G   W   I   S   A   Y
109   GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGA CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AGC GCT TAC

                      CDR2 (SEQ ID NO:6)
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      N   G   N   T   N   Y   L   Q   K   L   Q   G   R   V   T   L   T   T
163   AAT GGT AAC ACA AAC TAT CTA CAG AAG CTC CAG GGC AGA GTC ACC CTG ACC ACA

      D   T   S   T   N   T   A   Y   M   E   L   R   S   L   R   S   D   D
217   GAC ACA TCC ACG AAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAC GAC

                                        CDR3 (SEQ ID NO:9)
                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   V   Y   Y   C   T   R   D   P   I   A   A   G   Y   W   G   Q
271   ACG GCC GTG TAT TAC TGT ACG AGA GAT CCC ATA GCA GCA GGT TAC TGG GGC CAG

      G   T   L   V   T   V   S   S         (SEQ ID NO:21)
325   GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA         (SEQ ID NO:27)
```

도면3B

양 – Interferon α 7H9 VK

V 단편 : A27
J 단편 : JK1

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1     GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                    CDR1 (SEQ ID NO:12)
                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   T   Y   L   A   W
55    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC ACC TAC TTA GCC TGG

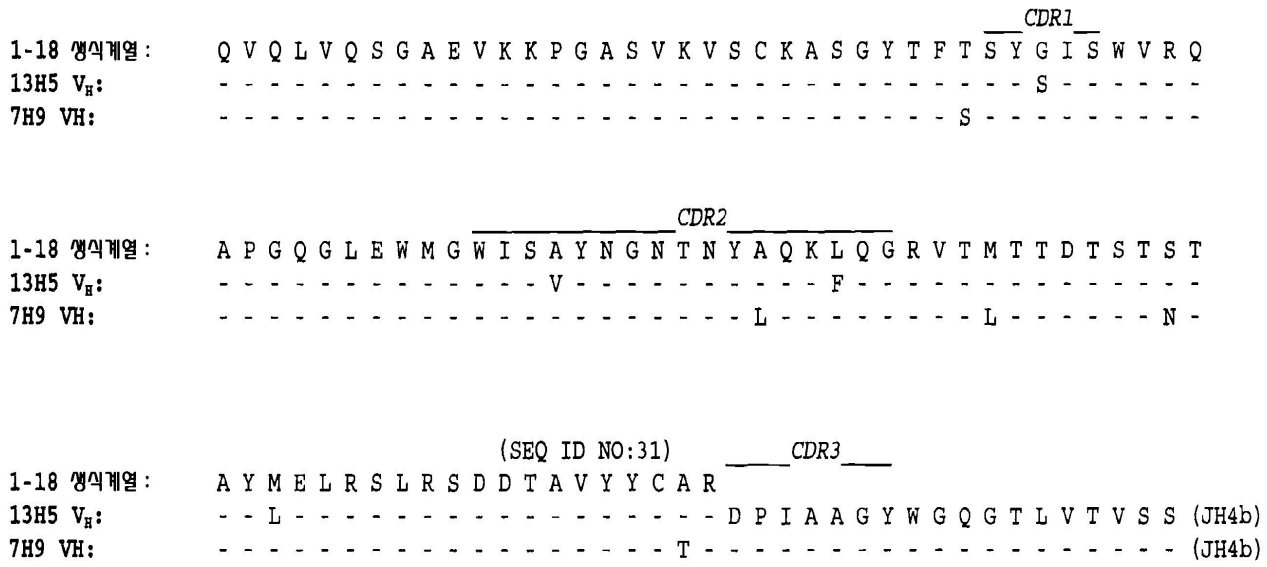
                                                                CDR2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109   TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

        CDR2 (SEQ ID NO:15)
      ~~~~~~~~~~~~~
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

      CDR3
                                                                        ~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217   ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                CDR3 (SEQ ID NO:18)
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~                  (SEQ ID NO:24)
      Q   Y   G   S   S   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271   CAG TAT GGT AGC TCA CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
                                                        (SEQ ID NO:30)
```

항-IFNα V_H 지역


CDR1
1-18 생식계열: Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y G I S W V R Q
13H5 V_H: - S - - - - - -
7H9 VH: - S - - - - - - - - -
CDR2
1-18 생식계열: A P G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T
13H5 V_H: - V - - - - - - - - - - - F - - - - - - - - - - - - - - - - -
7H9 VH: - L - - - - - - - - - - - L - - - - - - - N -
(SEQ ID NO:31)
CDR3
1-18 생식계열: A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R
13H5 V_H: - - L - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

도면5

항-IFNα V_H 서열

```
                                                                CDR1
4-61 생식계열:  Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G S Y Y W S W I R Q P
13H7 VH:        - - - - - - - - - - M - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                CDR2
4-61 생식계열:  P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L
13H7 VH:        - - M - - - - - - - - - - S G - G A - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

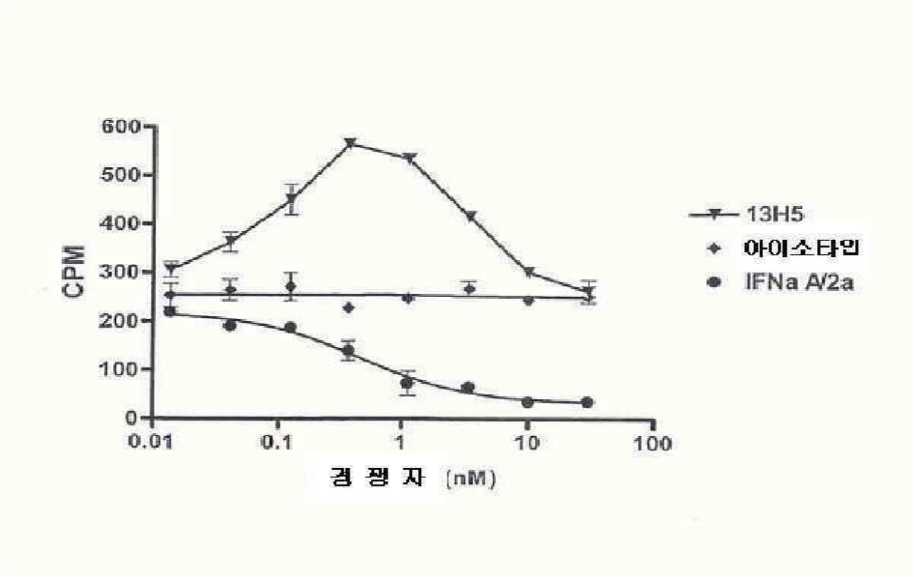
                                                                CDR3
                                (SEQ ID NO:32)
4-61 생식계열:  S S V T A A D T A V Y Y C A R
13H7 VH:        N - - - - - - - - - - F - - - G I P M V R G I L H Y W G Q G T L V T V S S (JH4b)
```

도면6

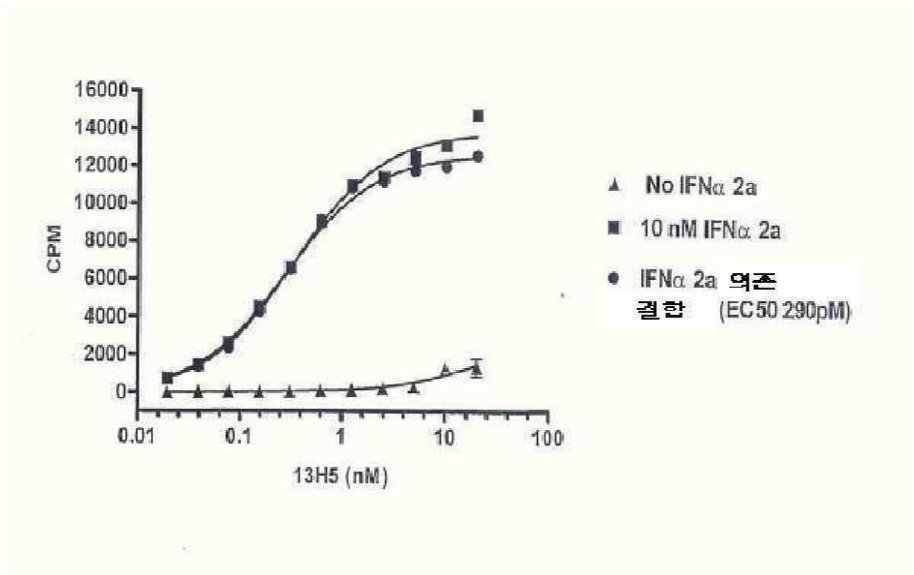
항-IFNα V_K 지역

```
                                                
```

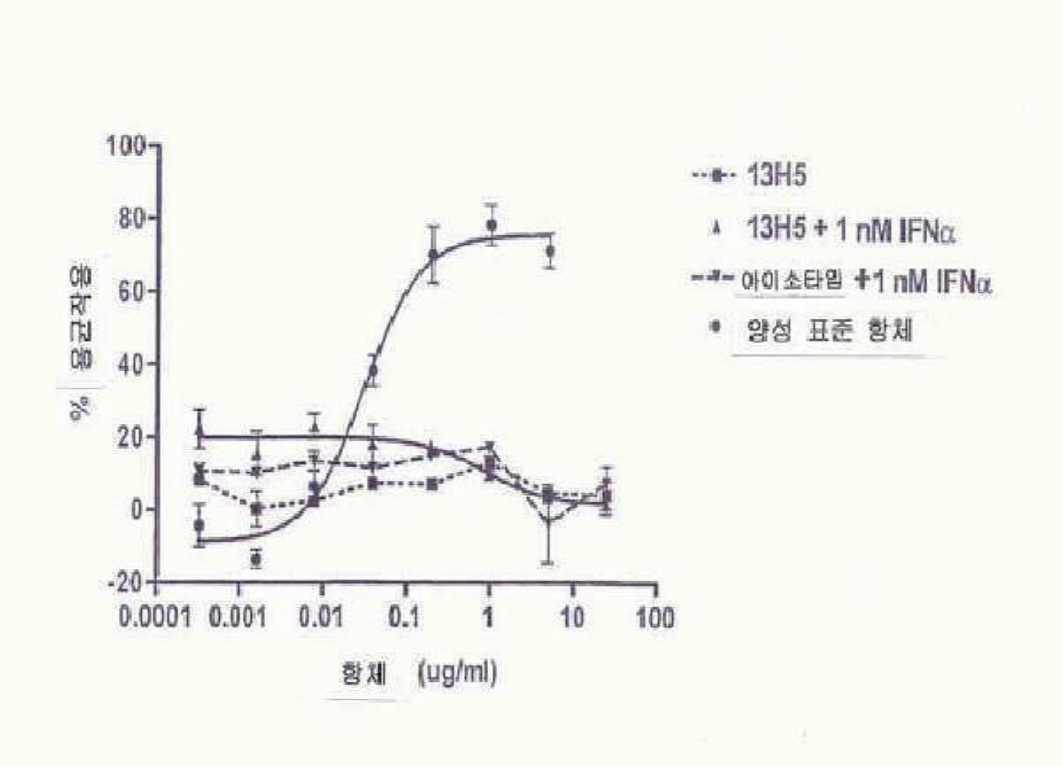
도면7


600
500
400
300
200
100
0
CPM
0.01
0.1
1
10
100
경 쟁 자 (nM)
13H5
아이소타입
IFNa A/2a

도면8


16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CPM
0.01
0.1
1
10
100
13H5 (nM)
No IFNα 2a
10 nM IFNα 2a
IFNα 2a 억존
결합 (EC50 290pM)

도면9



서 열 목 록

<110> MEDAREX, INC.
<120> INTERFERON ALPHA ANTIBODIES AND THEIR USES

<150> US
<151> 2003-12-10

<160> 37

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
agctatagta tcagc 15

<210> 2
<211> 21
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2
agtggtagtt actactggag c 21

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
agctatggta tcagctgg 18

<210> 4
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
aatggtaaca caaactatgc acagaagttc cagggc 36

<210> 5
<211> 48
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
tatatctatt ccgggggagg cgccaactac aacccttccc tcaagagt 48

<210> 6
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
tggatcagcg cttacaatgg taacacaaac tatctacaga agctccaggg c 51

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gatcccatag cagcaggcta c 21

<210> 8
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
ggaattccta tggttcgggg aattcttcac tac 33

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gatcccatag cagcaggtta c 21

<210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
agggccagtc agagtgttag cagcacctac ttagcc 36

<210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
agggccagtc agagtgttag cagcagcttc ttagcctgg 39

<210> 12
<211> 36
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
agggccagtc agagtgttag cagcacctac ttagcc 36

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
ggtgcatcca gcagggccac t 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
ggtgcatcca gcagggccac t 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
ggtgcatcca gcagggccac t 21

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
cagcagtatg gtagctcacc tcggacg 27

<210> 17
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
cagcagtatg gtagctcacc gtacact 27

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 18
cagcagtatg gtagctcacc tcggacg 27

<210> 19
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ser Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Val Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Ile Ala Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Met Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Met Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Ser Gly Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Ile Pro Met Val Arg Gly Ile Leu His Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Leu Gln Lys Leu
50 55 60

```
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Arg Asp Pro Ile Ala Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
  1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
             20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
         35                  40                  45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
                85                  90                  95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25
<211> 348
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr
20 25 30

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys
35 40 45

Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr
50 55 60

Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Ala
65 70 75 80

Cys Ala Cys Cys Thr Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr
85 90 95

Ala Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Cys
100 105 110

Gly Ala Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Ala
115 120 125

Ala Gly Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Gly
130 135 140

Gly Gly Ala Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr Thr Thr
145 150 155 160

Ala Cys Ala Ala Thr Gly Gly Thr Ala Ala Cys Ala Cys Ala Ala Ala

165 170 175

Cys Thr Ala Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys
180 185 190

Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Gly Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Ala
195 200 205

Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys
210 215 220

Cys Ala Cys Gly Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala Cys
225 230 235 240

Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys
245 250 255

Thr Gly Ala Gly Ala Thr Cys Thr Gly Ala Cys Gly Ala Cys Ala Cys
260 265 270

Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
275 280 285

Gly Cys Gly Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Cys Ala Thr Ala Gly
290 295 300

Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly
305 310 315 320

Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys
325 330 335

Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala
340 345

<210> 26
<211> 363
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr
20 25 30

Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Ala Gly
35 40 45

Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Thr
50 55 60

Gly Cys Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly
65 70 75 80

Cys Thr Cys Cys Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Thr
85 90 95

Ala Gly Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr
100 105 110

Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys
115 120 125

Ala Gly Gly Gly Ala Thr Gly Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly
130 135 140

Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Thr Thr Ala Thr Ala Thr Cys Thr
145 150 155 160

Ala Thr Thr Cys Cys Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Gly Cys
165 170 175

Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Cys Thr Thr Cys Cys
180 185 190

Cys Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Thr Cys Gly Ala Gly Thr Cys Ala
195 200 205

Cys Cys Ala Thr Ala Thr Cys Ala Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Cys
210 215 220

Gly Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys
225 230 235 240

Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr
245 250 255

Cys Thr Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Cys Thr Gly Cys Gly Gly Ala
260 265 270

Cys Ala Cys Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Thr Cys
275 280 285

Thr Gly Thr Gly Cys Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Ala Thr Thr Cys
290 295 300

Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Ala Thr
305 310 315 320

Thr Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys
325 330 335

Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala
340 345 350

Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala
355 360

<210> 27
<211> 348
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr
20 25 30

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys
35 40 45

Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr
50 55 60

Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Ala
65 70 75 80

```
Thr Ala Cys Cys Thr Thr Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr
                85                  90                  95

Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Cys
            100                 105                 110

Gly Ala Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Ala
        115                 120                 125

Ala Gly Gly Ala Cys Thr Thr Gly Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ala Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Cys Gly Cys Thr Thr
145                 150                 155                 160

Ala Cys Ala Ala Thr Gly Gly Thr Ala Ala Cys Ala Cys Ala Ala Ala
                165                 170                 175

Cys Thr Ala Thr Cys Thr Ala Cys Ala Gly Ala Ala Gly Cys Thr Cys
            180                 185                 190

Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Gly Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Cys
        195                 200                 205

Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys
    210                 215                 220

Cys Ala Cys Gly Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala Cys
225                 230                 235                 240

Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys
                245                 250                 255

Thr Gly Ala Gly Ala Thr Cys Thr Gly Ala Cys Gly Ala Cys Ala Cys
            260                 265                 270

Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
        275                 280                 285

Ala Cys Gly Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Cys Ala Thr Ala Gly
    290                 295                 300

Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly
305                 310                 315                 320
```

Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys
325 330 335

Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala
340 345

<210> 28
<211> 324
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Gly Cys
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr
20 25 30

Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr
50 55 60

Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala
65 70 75 80

Gly Ala Gly Thr Gly Thr Thr Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys
85 90 95

Thr Ala Cys Thr Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys
100 105 110

Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Ala
115 120 125

Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr Cys
130 135 140

Ala Thr Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr Cys Cys Ala
145 150 155 160

Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Thr

165 170 175

Cys Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Thr
180 185 190

Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala
195 200 205

Cys Ala Gly Ala Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys
210 215 220

Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly
225 230 235 240

Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Gly
245 250 255

Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala
260 265 270

Gly Thr Ala Thr Gly Gly Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Cys Cys Thr
275 280 285

Cys Gly Gly Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly
290 295 300

Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr
305 310 315 320

Cys Ala Ala Ala

<210> 29
<211> 324
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29
Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Gly Cys
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr
20 25 30

Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr
50 55 60

Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala
65 70 75 80

Gly Ala Gly Thr Gly Thr Thr Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys
85 90 95

Thr Thr Cys Thr Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys
100 105 110

Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Ala
115 120 125

Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr Cys
130 135 140

Ala Thr Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr Cys Cys Ala
145 150 155 160

Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Thr
165 170 175

Cys Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Thr
180 185 190

Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala
195 200 205

Cys Ala Gly Ala Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys
210 215 220

Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly
225 230 235 240

Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Gly
245 250 255

Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala
260 265 270

Gly Thr Ala Thr Gly Gly Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Cys Cys Gly
275 280 285

Thr Ala Cys Ala Cys Thr Thr Thr Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly
290 295 300

Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Thr
305 310 315 320

Cys Ala Ala Ala

<210> 30
<211> 324
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Gly Cys
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr
20 25 30

Gly Thr Cys Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr
50 55 60

Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala
65 70 75 80

Gly Ala Gly Thr Gly Thr Thr Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys
85 90 95

Thr Ala Cys Thr Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys
100 105 110

Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Ala
115 120 125

```
Gly Gly Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr Cys
    130                 135                 140

Ala Thr Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr Cys Cys Ala
145                 150                 155                 160

Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Thr
                165                 170                 175

Cys Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Thr
            180                 185                 190

Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala
        195                 200                 205

Cys Ala Gly Ala Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys
    210                 215                 220

Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly
225                 230                 235                 240

Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Gly
                245                 250                 255

Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala
            260                 265                 270

Gly Thr Ala Thr Gly Gly Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Cys Cys Thr
        275                 280                 285

Cys Gly Gly Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr
305                 310                 315                 320

Cys Ala Ala Ala
```

<210> 31
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 32
<211> 99
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

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

85 90 95

Cys Ala Arg

<210> 33
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

<210> 34
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ser Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Val Tyr Asp Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Ile Ala Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ser Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Val Tyr Gln Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Ile Ala Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ser Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Val Tyr Gln Gly Gln Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Ile Ala Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Ser Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Val Tyr Asn Ala Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Ile Ala Ala Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115