



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년02월17일
(11) 등록번호 10-0942863
(24) 등록일자 2010년02월09일

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-7017019(분할)

(22) 출원일자 2000년08월24일

심사청구일자 2006년08월24일

(85) 번역문제출일자 2006년08월24일

(65) 공개번호 10-2006-0100950

(43) 공개일자 2006년09월21일

(62) 원출원 특허 10-2002-7002451

원출원일자 2002년02월25일

심사청구일자 2004년05월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2000/023356

(87) 국제공개번호 WO 2001/14424

국제공개일자 2001년03월01일

(30) 우선권주장

60/150,452 1999년08월24일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20020001604 A1

전체 청구항 수 : 총 49 항

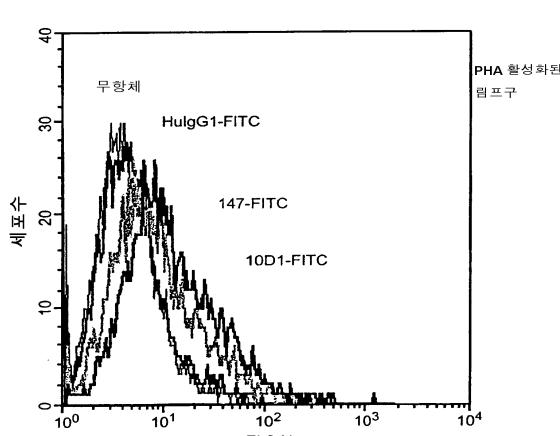
심사관 : 김지윤

(54) 인간 씨티엘에이-4 항체 및 그의 용도

(57) 요 약

본 발명은 인간 CTLA-4에 대한 새로운 인간 서열 항체 및 이를 항체를 이용하여 인간의 질환, 감염증 및 기타 증상을 치료하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도14b



(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

(a) 서열번호 27, 32 및 37에 나타낸 CDR 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열번호 24, 29 및 35에 나타낸 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 인간 CTLA-4에 $10^8 M^{-1}$ 이상의 결합 친화도로 결합할 수 있는 항체.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

(a) 서열번호 27, 33 및 37에 나타낸 CDR 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열번호 25, 30 및 35에 나타낸 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 인간 CTLA-4에 $10^8 M^{-1}$ 이상의 결합 친화도로 결합할 수 있는 항체.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

(a) 서열번호 28, 34 및 38에 나타낸 CDR 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및

(b) 서열번호 26, 31 및 36에 나타낸 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 인간 CTLA-4에 $10^8 M^{-1}$ 이상의 결합 친화도로 결합할 수 있는 항체.

청구항 26

삭제

청구항 27

(a) 서열번호 19에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 아미노산 서열; 및

(b) 서열번호 9에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 아미노산 서열

을 포함하는, CTLA-4에 결합할 수 있는 항체.

청구항 28

(a) 서열번호 17에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 아미노산 서열; 및
(b) 서열번호 7에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 아미노산 서열
을 포함하는, CTLA-4에 결합할 수 있는 항체.

청구항 29

(a) 서열번호 23에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 아미노산 서열; 및
(b) 서열번호 13에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 아미노산 서열
을 포함하는, CTLA-4에 결합할 수 있는 항체.

청구항 30

제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 31

제 30 항에 있어서,

서열번호 6, 8 또는 12에 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 32

제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 33

제 32 항에 있어서,

서열번호 16, 18 또는 22에 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 34

(a) 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산,
(b) 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산으로서, 서열번호 6, 8 또는 12에 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산,
(c) 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산, 및
(d) 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산으로서, 서열번호 16, 18 또는 22에 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산
으로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 35

제 34 항에 있어서,

플라스미드 또는 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 36

제 34 항에 따른 벡터로 형질전환된, 단리된 재조합 숙주 세포.

청구항 37

제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체를 생산할 수 있는, 단리

된 세포 또는 세포주.

청구항 38

- (a) 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산,
- (b) 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산으로서, 서열번호 6, 8 또는 12에 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산,
- (c) 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산, 및
- (d) 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 단리된 핵산으로서, 서열번호 16, 18 또는 22에 나타낸 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환된,

제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체를 생산할 수 있는, 단리된 세포 또는 세포주.

청구항 39

- (a) 인간 서열 중쇄 변형유전자(transgene); 및
- (b) 인간 서열 경쇄 변형유전자

를 포함하는 게놈을 갖고, 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 인간 서열 항체를 발현하는, 유전자변형 비-인간 동물.

청구항 40

- (a) 항원에 대한 면역 반응을 유도, 증진 또는 연장시키는데 효과적인 양의 제 15 항, 제 20 항, 제 25 항 및 제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 따른 항체; 및
- (b) 약학적으로 허용되는 담체

를 포함하는, 면역 반응을 유도, 증진 또는 연장시키기 위한 약학 조성물.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

항원이 (a) 종양 항원 또는 (b) 병원체 유래 항원인 약학 조성물.

청구항 42

제 41 항에 있어서,

항원이 병원체 유래 항원이고, 이 병원체가 바이러스, 세균, 진균 또는 기생충인 약학 조성물.

청구항 43

제 42 항에 있어서,

병원체가 인간 면역결핍 바이러스(HIV)인 약학 조성물.

청구항 44

제 41 항에 있어서,

항원이 종양 항원이고, 이 종양이 전립선암, 흑색종 및 상피암으로 구성된 군에서 선택되는 약학 조성물.

청구항 45

삭제

청구항 46

- (a) 서열번호 17에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 아미노산 서열; 및
 (b) 서열번호 7에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 아미노산 서열

을 포함하는 치료상 효과적인 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 항원에 대한 면역 반응을 유도, 증진 또는 연장시키기 위한 약학 조성물.

청구항 47

제 40 항에 있어서,
 화학요법제를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 48

제 40 항에 있어서,
 항원을 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 49

제 48 항에 있어서,
 항원이 병원체 유래인 조성물.

청구항 50

제 49 항에 있어서,
 상기 병원체가 바이러스, 세균, 진균 또는 기생충인 약학 조성물.

청구항 51

제 50 항에 있어서,
 항원이 HIV, 헤파티티스(hepatitis) A, 헤파티티스 B, 헤파티티스 C, 헤르페스(herpes) 바이러스, 아데노바이러스(adenovirus), 인플루엔자(influenza) 바이러스, 플라비바이러스(Flaviviruses), 에코바이러스(echovirus), 리노바이러스(rhinovirus), 콕스삭키(coxsackie) 바이러스, 코르노바이러스(cornovirus), 호흡기 신시티움 바이러스(respiratory syncytial virus), 멍프스(mumps) 바이러스, 로타바이러스(rotavirus), 메아슬레스(measles) 바이러스, 루벨라(rubella) 바이러스, 파르보바이러스(parvovirus), 백시니아(vaccinia) 바이러스, HTLV 바이러스, 덩그(dengue) 바이러스, 파필로마바이러스(papillomavirus), 몰루스컴(molluscum) 바이러스, 폴리오바이러스(poliovirus), 라비에스(rabies) 바이러스, JC 바이러스 및 아르보바이러스(arboviral encephalitis) 바이러스로 구성된 군으로부터 선택되는 바이러스로부터 유래되는 약학 조성물.

청구항 52

제 50 항에 있어서,
 항원이 클래마이디아(chlamydia), 리케치알 박테리아(rickettsial bacteria), 마이코박테리아(mycobacteria), 스태필로코카(staphylococci), 스트렙토코카(streptococci), 뉴모노코카(pneumonococci), 메ning코카(meningococci) 및 코노코카(conococci), 클렙시엘라(klebsiella), 프로테우스(proteus), 세라티아(serratia), 츠도모나스(pseudomonas), 레기오넬라(legionella), 디프테리아(diphtheria), 살모넬라(salmonella), 바실리(bacilli), 콜레라(cholera), 테타너스(tetanus), 보툴리즘(botulism), 안트락스(anthrax), 플라그(plague), 렙토스피로시스(leptospirosis) 및 라이메스(Lymes) 질환 세균으로 구성된 군으로부터 선택되는 세균으로부터 유래되는 약학 조성물.

청구항 53

제 50 항에 있어서,

항원이 칸디다(*Candida*), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 아스페질러스(*Aspergillus*), 제너스 뮤코랄스(*Genus Mucorales*), 스포로트릭스 센키(*Sporothrix schenckii*), 블라스토마이세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 파라코키디오아이데스 브라실리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 코키디오아이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*) 및 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 진균으로부터 유래되는 약학 조성물.

청구항 54

제 50 항에 있어서,

항원이 엔타모에바 히스토리아이티카(*Entamoeba histolytica*), 발란티디움 콜리(*Balantidium coli*), 나에글레리아 파울레리(*Naegleria fowleri*), 아칸타모에바(*Acanthamoeba*), 기아르디아 람비아(*Giardia lamblia*), 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*), 뉴모카이스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*), 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*), 바베시아 마이크로티(*Babesia microti*), 트립파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트립파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 레이시마니아 도노바니(*Leishmania donovani*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*) 및 니포스트롱길러스 브라실리엔시스(*Nippostrongylus brasiliensis*)로 구성된 군으로부터 선택되는 기생충으로부터 유래되는 약학 조성물.

청구항 55

제 48 항에 있어서,

항원이 종양 항원인 약학 조성물.

청구항 56

제 55 항에 있어서,

종양 항원이 전립선암, 흑색종 및 상피암으로 구성된 군으로부터 선택되는 종양으로부터 유래되는 약학 조성물.

청구항 57

제 55 항에 있어서,

항원이 gp100인 약학 조성물.

청구항 58

제 55 항에 있어서,

항원이 MAGE인 약학 조성물.

청구항 59

제 55 항에 있어서,

항원이 Trp-2인 약학 조성물.

청구항 60

제 55 항에 있어서,

항원이 텔로머라제인 약학 조성물.

청구항 61

제 55 항에 있어서,

항원이 열 충격 단백질(HSP)인 약학 조성물.

청구항 62

제 48 항에 있어서,

항원이 알츠하이머병(Alzheimer's disease)을 앓고 있는 환자의 아밀로이드로부터 유래하는 A β 웨타이드인 약학 조성물.

청구항 63

제 48 항에 있어서,

전체 세포 제제를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 64

제 63 항에 있어서,

전체 세포 제제는 전체 종양 세포의 제제인 약학 조성물.

청구항 65

제 63 항에 있어서,

전체 세포 제제의 세포는 GM-CSF를 발현하는 약학 조성물.

청구항 66

제 63 항에 있어서,

전체 세포 제제의 세포는 G-CSF를 발현하는 약학 조성물.

청구항 67

제 63 항에 있어서,

전체 세포 제제의 세포는 IL-2를 발현하는 약학 조성물.

청구항 68

제 63 항에 있어서,

전체 세포 제제의 세포는 IL-1을 발현하는 약학 조성물.

청구항 69

제 63 항에 있어서,

전체 세포 제제의 세포는 IL-6를 발현하는 약학 조성물.

청구항 70

제 63 항에 있어서,

항체가 10D1인 약학 조성물.

청구항 71

(a) 서열번호 27, 32 및 37에 나타낸 CDR 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열번호 24, 29 및 35에 나타낸 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 인간 CTLA-4에 결합할 수 있는 항체.

청구항 72

(a) 서열번호 27, 33 및 37에 나타낸 CDR 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열번호 25, 30 및 35에 나타낸 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 인간 CTLA-4에 결합할 수 있는 항체.

청구항 73

(a) 서열번호 28, 34 및 38에 나타낸 CDR 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열번호 26, 31 및 36에 나타낸 CDR 서열을 갖는 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 인간 CTLA-4에 결합할 수 있는 항체.

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[0018] 본 발명은 일반적으로 분자 면역학 및 인간 질환의 치료에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인간 CTLA-4에 대한 새로운 인간 서열 항체 및 이를 항체를 이용하여 인간의 질환 및 감염증을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0019] 본 출원은 본원에 그 전체가 참고로 인용된 미국 특허출원 제 60/150,452 호의 이점을 주장한다.

[0020] 척추동물의 면역 시스템은 최적의 면역 활성화를 달성하기 위해 다중 신호를 필요로 한다(예를 들면, 제인웨이(Janeway)의 문헌[Cold Spring Harbor Symp., Quant. Biol., 54: 1-14, 1989]; 문헌[Paul William E., ed. Raven Press, N.Y., *Fundamental Immunology*, 4th edition, particularly chapters 12 and 13, pages 411 to 478, 1998]을 참조하시오). T 림프구(T 세포)와 항원 제시 세포(antigen presenting cell, APC) 사이의 상호 작용은 면역 반응에 필수적이다. T 세포와 APC에서 발견되는 많은 응집성 분자들의 수준은 면역 반응시에 증가한다(스피링어(Springer) 등의 문헌[A. Rev. Immunol., 5: 223-252, 1987]; 쇼우와 시무즈(Shaw and Shimuzu)의 문헌[*Current Opinion in Immunology*, Eds. Kindt and Long, 1:92-97, 1988]; 및 험러(Hemler)의 문헌[*Immunology Today*, 9:109-113, 1988] 참조). 상기 분자들의 증가된 수준은 활성화된 APC가 휴지중인 APC보다 항원-특이적 T 세포 증식을 자극하는데 더 효과적인 이유를 해명하는데 도움이 될 수 있다(카이우치(Kaiuchi) 등의 문헌[J. Immunol., 131:109-114, 1983]; 크레이거(Kreiger) 등의 문헌[J. Immunol., 135: 2937-2945, 1985]; 맥肯지(McKenzie)의 문헌[J. Immunol., 141:2907-2911, 1988]; 및 하우렐로비츠와 우나누에(Hawrylowicz and Unanue)의 문헌[J. Immunol., 141:4083-4088, 1988] 참조).

[0021] T 세포 면역 반응은 특히 T 세포 및 APC와 같은 보조 세포간의 세포-세포 상호작용(스피링어(Springer) 등의 문헌[A. Rev. Immunol., 5:223-252, 1987]), 및 가용성 면역 매개체(사이토카인 또는 림포카인)의 생성(디나렐로(Dinarello)의 문헌[*New Engl. Jour. Med.*, 317:940-945, 1987]; 살루스토(Sallusto)의 문헌[J. Exp. Med., 179:1109-1118, 1997] 참조)을 포함하는 복잡한 과정이다. 상기 반응은 T-세포 수용체 복합체(웨이스(Weiss)의 문헌[Ann. Rev. Immunol., 4:593-619, 1986]) 및 다른 "보조" 표면 분자(앨리슨(Allison)의 문헌[Curr. Opin. Immunol., 6:414-419, 1994]; 상기 스피링어 등의 문헌(1987) 참조)를 포함하여 여러 T-세포 표면 수용체들에 의해 조절된다. 상기 보조 분자들의 대부분은 세포 표면상의 단일클론 항체의 반응성에 의해 규정되는 천연 세포 표면 분화(CD) 항원이다(문헌[McMichael, Ed., *Leukocyte Typing III*, Oxford Univ., Press, Oxford, N.Y., 1987] 참조).

[0022] 초기의 연구들은 B 림프구 활성화에 2개의 신호가 필요하다고 제시하였으며(브레처(Bretscher)의 문헌[*Science*, 169:1042-1049, 1970]), 현재는 모든 림프구가 그의 최적 활성화에 2개의 신호, 즉 항원 특이적 또는 클론성 신호 및 제 2의 항원 비-특이적 신호를 필요로 하는 것으로 생각된다(상기 제인웨이의 문헌 참조). 프리만(Freeman)(문헌[J. Immunol., 143:2714-2722, 1989])은 MAb B7(프리만의 문헌[J. Immunol., 138:3260, 1988]

7])에 의해 인지되는 B 세포 활성화 항원을 암호화하는 cDNA 클론을 분리하고 서열화하였다. 상기 cDNA로 형질감염된 COS 세포는 표지된 MAb B7 및 MAb BB-1 둘 다에 의해 염색되는 것으로 나타났다(클라크(Clark)의 문헌[*Human Immunol.*, 16:100-113, 1986]; 요코치(Yokochi)의 문헌[*J. Immunol.*, 128:823, 1981]; 상기 프리만 등의 문헌(1989); 상기 프리만 등의 문헌(1987) 참조). 또한, 상기 항원의 발현은 단핵구와 같은 다른 계통의 세포 상에서 검출되었다(프리만 등의 상기 문헌 참조).

[0023] T 헬퍼 세포(Th) 항원 반응은 APC에 의해 제공되는 신호를 필요로 한다. 첫 번째 신호는 T 세포 수용체 복합체(웨이스(Weiss)의 문헌[*J. Clin. Invest.*, 86:1015, 1990])와 APC 상의 II종 주조직적합성 복합체(MHC) 분자와 관련하여 제공된 항원과의 상호작용에 의해 개시된다(알렌(Allen)의 문헌[*Immunol. Today*, 8:270, 1987]). 상기 항원-특이적 신호는 완전한 반응을 발생하기에는 충분하지 않으며, 두 번째 신호의 부재하에서 실제로 클론 불활성화 또는 무반응상태(anergy)를 유발할 수 있다(슈와츠(Schwartz)의 문헌[*Science*, 248:1349, 1990]). MHC에 의해 제공된 두 번째 "동시자극(costimulatory)" 신호에 대한 필요조건은 많은 실험 시스템에서 입증되었다(상기 슈와츠의 문헌; 위버와 우나누에(Weaver and Unanue)의 문헌[*Immunol. Today*, 11:49, 1990] 참조). 상기 두 번째 신호의 분자 성질은 완전히 이해되지는 않았지만, 몇몇 경우에서 인터루킨(IL)-1(상기 위버와 우나누에의 문헌) 및 세포간 부착에 수반되는 막 수용체(스프링어의 문헌*Nature*, 346:425, 1990])와 같은 두 가용성 분자들이 모두 동시자극 신호를 제공할 수 있음을 명백하다.

[0024] 면역글로불린 상과의 단독이량체(homodimeric) 당단백질인 CD 28 항원(아루포와 시드(Aruffo and Seed)의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:8573-8577, 1987])은 대부분의 성숙한 인간 T 세포상에서 발견되는 보조 분자이다(담르(Damle) 등의 문헌[*J. Immunol.*, 131:2296-2300, 1983]). 현재의 증거는 상기 분자가 T-세포 수용체 복합체에 의해 개시된 것과는 다른 대안적인 T 세포 활성화 경로로 작용함을 시사한다(준(June) 등의 문헌[*Mol. Cell. Biol.*, 7:4472-4481, 1987]). CD 28 항원과 반응성인 단일클론 항체(MAb)는 다양한 다중클론성 자극에 의해 개시된 T 세포 반응을 증대시킬 수 있다(상기 준 등의 문헌에서 재고됨). 상기 자극 효과는 증가된 mRNA 안정화의 결과로서(린드스텐(Lindsten) 등의 문헌[*Science*, 244:339-343, 1989]) MAb-유도된 사이토카인 생성(톰슨(Thompson) 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:1333-1337, 1989]; 및 상기 린드스텐 등의 문헌 참조)으로부터 비롯될 수 있다. 항-CD28 MAb도 또한 억제 효과를 가질 수 있다, 즉, 이들은 자가 혼합 림프구 반응(담르 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:5096-6001, 1981]) 및 항원-특이적 T 세포 클론의 활성화(레스라우레(Lesslaure) 등의 문헌[*Eur. J. Immunol.*, 16:1289-1296, 1986])를 차단할 수 있다.

[0025] 몇몇 연구들은 CD28이 B 세포 활성화 항원, B7/BB-1에 대한 상대-수용체라고 지적하였다(린슬리(Linsley) 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:5031-5035, 1990]). B7/BB-1 항원은 이하에서 "B7 항원"으로 지칭한다. B7 리간드는 또한 면역글로불린 상과의 구성원이지만, CD28과는 대조적으로 그의 세포외 영역에 2개의 Ig 영역, 즉, N-말단 가변성(V)-유사 영역에 이어 불변성(C)-유사 영역을 갖는다.

[0026] T 세포에 비-특이적 동시자극 신호를 전달하는 것은 APC에서 발견된 적어도 2개의 상동 B7 부류의 구성원인, B7-1(B7, B7.1 또는 CD80으로도 지칭됨) 및 B7-2(B7.2 또는 CD86으로도 지칭됨)를 필요로 하는데, 이들은 둘 다 CD28을 통해 T 세포에 동시자극 신호를 전달할 수 있다. CD28을 통한 동시자극은 T 세포 활성화를 촉진한다.

[0027] B7 항원 및 CD28 수용체의 세포외 부분들과 면역글로불린(Ig) C. 감마.1(불변 영역 중쇄)의 유전학적 융합을 이용하여, CD28과 B7 항원간의 상호작용을 특성화하였다(린슬리 등의 문헌[*J. Exp. Med.*, 173:721-730, 1991]). 고정화된 B7Ig 융합 단백질과 더불어 B7 양성 CHO 세포는 T 세포 증식을 동시자극하는 것으로 나타났다.

[0028] B7 양성 CHO 세포에 의한 T 세포 자극은 또한 IL-2에 대한 증가된 수준의 전사체를 특이적으로 자극한다. 또 다른 연구는 항-CD28 MAb가 B 세포 백혈병 세포계와의 세포성 상호작용에 의해 특정 T 세포 백혈병 세포계에서 유도된 IL-2 생성을 억제하였음을 보여주었다(코노(Kohno) 등의 문헌[*Ceil Immunol.*, 131:1-10, 1990]).

[0029] CD28은 단일 세포외 가변 영역(V)-유사 영역을 갖는다(아루포와 시드의 상기 문헌 참조). 상동성 분자인 CTLA-4는 쥐의 세포용해성-T 세포 cDNA 라이브러리의 차등적 선별에 의해 확인되었다(브루넷(Brunet) 문헌[*Nature*, 328:267-270, 1987]).

[0030] CTLA-4는 원래 쥐의 세포용해성 T 세포 cDNA 라이브러리의 차등적 선별에 의해 확인된 T 세포 표면 분자이다(브루넷의 문헌[*Nature*, 328:267-270, 1987]). CTLA-4는 또한 면역글로불린(Ig) 상과의 일원이며; CTLA-4는 단일 세포외 Ig 영역을 포함한다. CTLA-4 전사체는 세포독성 활성을 갖는 T 세포 집단에서 발견되어 CTLA-4가 세포 용해 반응에서 작용할 수도 있음을 시사하였다(브루넷의 상기 문헌; 브루넷의 문헌[*Nature*, 328:267-270, 1987];

Brunet et al., *Immunol. Rev.*, **103**:21-36, 1988] 참조). 연구자들은 CTLA-4의 인간 대응체에 대한 유전자(다리아바크(Dariavach) 등의 문헌[Eur. J. Immunol., **18**:1901-1905, 1988])를 CD28과 동일한 염색체 영역(2q33-34)(라파지-포치탈로프(Lafage-Pochitaloff) 등의 문헌[*Immunogenetics*, **31**:198-201, 1990])에 클로닝하고 유전자 지도 작성하는 것을 보고하였다. 상기 인간 CTLA-4 DNA와 CD28 단백질을 암호화하는 DNA 사이의 서열 비교 결과 서열에 상당한 상동성이 나타났는데, 상동성 정도가 가장 큰 것은 막 부근(juxtamembrane)과 세포질 영역에서였다(상기 브루넷 등의 문헌(1988); 및 상기 다리아바크 등의 문헌(1988) 참조).

[0031] 일부 연구는 CTLA-4가 제 2의 동시자극제와 유사한 기능을 갖는다고 제시하였다(린슬리 등의 문헌[J. Exp. Med., **176**:1595-1604, 1992]; 우(Wu) 등의 문헌[J. Exp. Med., **185**:1327-1335, 1997]; 및 린드슬리(Lindsley, P.) 등의 미국 특허 제 5,977,318; 5,968,510; 5,885,796 및 5,885,579 호 참조). 그러나, 다른 연구는 CTLA-4가 T 세포 활성화의 완충제와 반대 역할을 하는 것으로 보고하였다(크럼멜(Krummel)의 문헌[J. Exp. Med., **182**:459-465, 1995]; 크럼멜 등의 문헌[Int'l Immunol., **8**:519-523, 1996]; 챔버스(Chambers) 등의 문헌[*Immunity*, **7**:885-895, 1997] 참조). CTLA-4 결핍 마우스는 대량 림프증식을 겪는 것으로 보고되었다(상기 챔버스 등의 문헌 참조). CTLA-4의 차단은 시험관내(왈루나스(Walunas) 등의 문헌[*Immunity*, **1**:405-413, 1994]) 및 생체내(키르니(Kearney)의 문헌[J. Immunol., **155**:1032-1036, 1995])에서 T 세포 반응을 증대시키며, 항종양 면역성을 증진시키고(리치(Leach)의 문헌[*Science*, **271**:1734-1736, 1996]), 유도된 자가면역 질환을 증대시키는(루더(Luhder)의 문헌[J. Exp. Med., **187**:427-432, 1998]) 것으로 보고되었다. 또한, CTLA-4는 T 세포 면역 반응의 초기 특성에 대안적인 또는 부가적인 영향을 갖는다고 보고되었다(챔버스(Chambers)의 문헌[Curr. Opin. Immunol., **9**:396-404, 1997]; 블루스톤(Bluestone)의 문헌[J. Immunol., **158**:1989-1993, 1997]; 톰슨(Thompson)의 문헌[*Immunity*, **7**:445-450, 1997] 참조). 이러한 사실은 일부 자가면역 환자가 CTLA-4에 대한 자가항체를 갖는다는 관찰과 일치한다. CTLA-4 차단 항체는 이러한 환자들에서 병원성 역할을 갖는 것이 가능하다(마쓰이(Matsui)의 문헌[J. Immunol., **162**:4328-4335, 1999]).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

[0032] 비-인간 CTLA-4 항체는 상기에서 논의한 다양한 연구들에 이용되었다. 그러나, 인간에서 항체에 대한 생체내 치료 및 진단 용도의 개발에 직면하는 주된 장애를 중 하나는 비-인간 면역글로불린의 고유한 면역원성이다. 예를 들면, 면역감응성 인간 환자에게 치료 투여량의 설치류 단일클론 항체를 투여하는 경우, 환자는 설치류의 면역글로불린 서열에 대한 항체를 생성하며; 이러한 인간 항-마우스 항체(HAMA)는 치료 항체를 중화시키고 급성 독성을 야기할 수 있다. 선행기술의 항체들에서의 상기 결함 및 기타 결함들은 본 발명에 의해 CTLA-4에 대한 인간 항체를 제공함으로써 극복된다.

발명의 구성 및 작용

[0033] 본 발명은 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 서열 항체, 및 실질적으로 비-면역글로불린 관련 인간 단백질을 갖지 않는 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0034] 관련된 태양으로, 본 발명은 또한 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 치료-효과적인 인간 서열 항체를 제공한다. 일부 태양에서, 치료-효과적인 인간 서열 항체는 정상적인 인간 T 세포의 세포 표면에서 CTLA-4와 결합한다. 다른 태양에서, CD 항원 CD4, CD8, CD25 및 CD69로 표지된 T 세포 아집단(subpopulation)은 치료-효과적인 인간 서열 항체의 투여 중에 및 투여 후에 안정하게 유지된다. 다른 태양으로, 치료-효과적인 인간 서열 항체는 정상적인 인간 T 세포의 세포 표면에서 CTLA-4에 결합한다. 또 다른 태양에서, 인간 서열 항체는 환자에서 잘 허용된다.

[0035] 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 다수의 인간 서열 항체를 포함하는 다중클론 항체의 조성물도 또한 제공된다. 다중클론 항체의 조성물은 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는, 약 2, 5, 10, 50, 100, 500 또는 1000개 이상의 상이한 인간 서열 항체들을 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하고 인간 B7에 대한 인간 CTLA-4의 결합을 차단하거나 또는 인간 B7에 대한 인간 CTLA-4의 결합을 차단하지 않는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0037] 본 발명은 또한 10^8 M^{-1} 이상의 평형 결합 상수(Ka)하에 인간 CTLA-4에 결합하는 인간 서열 항체를 제공한다. 또한, 10^9 M^{-1} 이상의 평형 결합 상수(Ka)하에 인간 CTLA-4에 결합하는 인간 서열 항체도 제공된다.

[0038] 본 발명은 인간 B7에 대한 인간 CTLA-4의 결합을 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,

99% 또는 100% 차단하는, 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 서열 항체를 또한 제공한다.

[0039] 본 발명은 또한 IgG 또는 IgM의 항체 중쇄를 갖는 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 서열 항체를 제공한다. IgG 항체 중쇄는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4일 수 있다. 본 발명은 또한 항체 경쇄가 카파 경쇄인 인간 서열 항체를 제공한다. 인간 서열 항체는 그의 가변 영역에 각각 서열번호: 2 내지 서열번호: 23에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열들을 포함하는 인간 IgG 중쇄 및 인간 카파 경쇄 핵산에 의해 암호화될 수 있다.

[0040] 본 발명은 인간 서열 항체가 그의 가변 영역에 서열번호: 16 및 서열번호: 6에 각각 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 IgG 중쇄 및 인간 카파 경쇄 핵산에 의해 암호화되는 인간 서열 항체를 또한 제공한다.

[0041] 본 발명은 또한 인간 서열 항체가 그의 가변 영역에 서열번호: 18 및 서열번호: 8에 각각 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 IgG 중쇄 및 인간 카파 경쇄 핵산에 의해 암호화되는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0042] 본 발명은 또한 인간 서열 항체가 그의 가변 영역에 서열번호: 22 및 서열번호: 12에 각각 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 인간 IgG 중쇄 및 인간 카파 경쇄 핵산에 의해 암호화되는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0043] 또한 본 발명은 인간 서열 항체가 서열번호: 17 및 서열번호: 7에 각각 나타낸 바와 같은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열에 의해 암호화되는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0044] 본 발명은 인간 서열 항체가 서열번호: 19 및 서열번호: 9에 각각 나타낸 바와 같은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열에 의해 암호화되는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0045] 본 발명은 또한 인간 서열 항체가 서열번호: 23 및 서열번호: 13에 각각 나타낸 바와 같은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열에 의해 암호화되는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0046] 본 발명은 인간 서열 항체가 V 유전자 단편 VH 3-30.3 및 VK A-27 각각으로부터의 가변성 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 인간 IgG 중쇄 및 인간 카파 경쇄 핵산에 의해 암호화되는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0047] 본 발명은 또한 인간 서열 항체가 V 유전자 단편 VH 3-33 및 VK L-15 각각으로부터의 가변성 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 인간 IgG 중쇄 및 인간 카파 경쇄 핵산에 의해 암호화되는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0048] 본 발명의 일부 인간 서열 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 SYTMH(서열번호: 27), FISYDGNKNKYADSVKG(서열번호: 32) 및 TGWLGPFDY(서열번호: 37), 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 RASQSVGSSYLA(서열번호: 24), GAFSRAT(서열번호: 29) 및 QQYGSSPWT(서열번호: 35)를 포함한다.

[0049] 본 발명의 일부 인간 서열 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 SYTMH(서열번호: 27), FISYDGSNKHYADSVKG(서열번호: 33) 및 TGWLGPFDY(서열번호: 37), 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 RASQSVSSFLA(서열번호: 25), GASSRAT(서열번호: 30) 및 QQYGSSPWT(서열번호: 35)를 포함한다.

[0050] 본 발명의 다른 인간 서열 항체는 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 SYGMH(서열번호: 28), VIWYDGSNKYYADSVKG(서열번호: 34) 및 APNYIGAFDV(서열번호: 38), 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 RASQGISSWLA(서열번호: 26), AASSLQS(서열번호: 31) 및 QQYNSYPPT(서열번호: 36)를 포함한다.

[0051] 본 발명은 또한 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는, 인간을 제외한 유전자변형 동물에 의해 생산된 인간 서열 항체를 제공한다. 인간을 제외한 유전자변형 동물은 마우스일 수 있다.

[0052] 또한 본 발명은 Fab 절편인 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 서열 항체를 제공한다.

[0053] 본 발명은 그 각각이 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 2개 이상의 인간 서열 항체를 포함하는 다가 복합체를 제공한다. 2개의 상이한 항체는 공유적으로 또는 비공유적으로 서로에 결합될 수 있다.

[0054] 본 발명은 인간 서열 항체의 중쇄를 암호화하는 핵산을 제공한다. 상기 핵산은 서열번호: 1에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명은 인간 서열 중쇄 변형유전자 및 인간 서열 경쇄 변형유전자를 포함하는 게놈을 갖는 인간을 제외한 유전자변형 동물을 제공하는데, 상기 동물은 인간 CTLA-4 또는 그의 절편 또는 유사체로 면역되었으며, 이로써 상기 동물은 인간 CTLA-4에 대한 인간 서열 항체를 발현시킨다. 인간을 제외한 유전자변형 동물은 유전자변형 마

우스일 수 있다. 유전자변형 마우스는 HCo7 또는 HCo12를 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명은 인간 서열 중쇄 변형유전자 및 인간 서열 경쇄 변형유전자를 포함하는 계놈을 갖는 인간을 제외한 유전자변형 동물로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마(hybridoma) 세포주를 제공하며, 이때 상기 하이브리도마는 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 서열 항체를 생성한다. 관련된 태양에서, 하이브리도마는 인간 CTLA-4 또는 그의 결합 절편에 특이적으로 결합하는, 다음으로 이루어진 그룹에서 선택된 인간 서열 항체를 분비한다: 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 SYTMH(서열번호: 27), FISYDGNNKYYADSVKG(서열번호: 32) 및 TGWLGPFDY(서열번호: 37), 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 RASQSVGSSYLA(서열번호: 24), GAFSRAT(서열번호: 29) 및 QQYGSSPWT(서열번호: 35), 및 서열번호: 17 및 서열번호: 7 각각에 나타낸 바와 같은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 인간 서열 항체; 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 SYTMH(서열번호: 27), FISYDGNSNKHYADSVKG(서열번호: 33) 및 TGWLGPFDY(서열번호: 37), 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 RASQSVSSSFLA(서열번호: 25), GASSRAT(서열번호: 30) 및 QQYGSSPWT(서열번호: 35), 및 서열번호: 19 및 서열번호: 9 각각에 나타낸 바와 같은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 인간 서열 항체; 및 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 SYGMH(서열번호: 28), VIWYDGNSNKYYADSVKG(서열번호: 34) 및 APNYIGAFDV(서열번호: 38), 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열, 즉 각각 RASQGIISSWLA(서열번호: 26), AASSLQS(서열번호: 31) 및 QQYNSYPPT(서열번호: 36), 및 서열번호: 23 및 서열번호: 13 각각에 나타낸 바와 같은 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 하기 청구의 범위의 제 1 항의 인간 서열 항체.

[0057] 본 발명은 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 서열 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 약학 조성물은 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하기에 효과적인 약제를 또한 포함할 수 있다. 화학요법제도 또한 제공된다. 게다가, 면역억제 분자에 대한 항체도 또한 제공된다.

[0058] 본 발명은 인간 B7에 대한 인간 CTLA-4의 결합을 차단하는, 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 서열 항체를 효과적 투여량으로 환자에게 투여함을 포함하는, 환자에서 항원에 대한 면역 반응을 유도하거나 증진시키거나 또는 연장시키는 방법을 제공한다. 상기 항원은 종양 항원이거나, 또는 항원은 병원체 항원일 수 있다. 종양 항원은 또한 텔로머라제(telomerase)일 수 있다. 병원체는 바이러스, 세균, 진균류 또는 기생충일 수 있다. 병원체는 또한 HIV일 수 있다. 상기 방법은 또한 환자에게 항원 또는 그의 절편 또는 유사체를 투여함으로써, 상기 항원이 인간 서열 항체와 함께 면역 반응을 유도하거나 증진하거나 연장시킬 수 있다. 항원은 종양 항원이거나 또는 알츠하이머병(Alzheimer's disease)을 앓고 있는 환자와 같은 환자에서 아밀로이드를 형성하는 한 성분일 수 있으며, 항원은 AB 웨타이드이다. 상기 방법은 또한 환자에게 사이토카인을 투여함을 포함할 수 있다.

[0059] 본 발명은 서로에 결합된, 인간 CTLA-4에 대한 인간 서열 항체를 2개 이상 포함하는 효과적 투여량의 다가 제제를 환자에게 투여함을 포함하는, 환자에서 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 인간 CTLA-4에 대한 인간 서열 항체를 2개 이상 포함하는 효과적 투여량의 다중클론 제제를 환자에게 투여함을 포함하는, 환자에서 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다.

[0060] 본 발명은 또한 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 분리되거나 재조합된 인간 서열 항체 및 인간 단일클론 항체, 및 상기 항체들 하나 또는 그의 혼합물을 함유하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 인간 서열 항체들 중 일부는 높은 친화도하에 인간 CTLA-4에 결합하고/하거나 인간 CTLA-4와 그의 리간드, 즉, 인간 B7-1 및 B7-2 분자와의 상호작용을 차단함을 특징으로 한다. 따라서, 본 발명의 인간 서열 항체 및 인간 단일클론 항체는 생체내 및 시험관내에서 진단제 또는 치료제로 사용될 수 있다.

[0061] 본 발명의 인간 서열 항체는 다양한 항체 동종형(isotype) 또는 그의 혼합물, 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD 및 IgE를 포함할 수 있다. 전형적으로, 이들은 IgG1(예를 들면, IgG1k) 및 IgM 동종형을 포함한다. 인간 서열 항체는 완전한 길이의 항체(예를 들면, IgG1 또는 IgG4 항체)일 수 있거나 또는 항원-결합 부분(예를 들면, Fab, F(ab')2, Fv 또는 단일 쇄 Fv 절편)만을 포함할 수 있다. 일부 인간 서열 항체는 재조합 인간 서열 항체일 수 있다. 일부 인간 서열 항체는 인간 중쇄 변형유전자 및 인간 경쇄 변형유전자를 포함하는 계놈을 갖는 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다. 하이브리도마는, 예를 들면, B 세포를 불멸화 세포에 융합시켜 제조할 수 있다. 본 발명의 일부 인간 서열 항체는 다음과 같이 지칭되는 하이브리도마에 의해 생성된다: 4C8, 4E10, 4E10.5, 5A8, 5C4, 5C4.1.3, 5D7, 5D7.1, 5E10, 5E10.12, 5G1, 5G1.4, 6A10, 6C9, 6C9.6, 6D9, 6D9.7, 6G4, 7E4, 7E4.4, 7E6, 7H8, 8E8, 8E8.4, 8F8, 8F8.19, 8H1, 9810, 9A10.1, 9B9, 9C1, 9G5, 105B, 10B5.8, 10B9, 10B9.2, 10D1, 10D1.3, 10E11, 10E4, 10E4.5, 11B4, 11D10, 11E4, 11E4.1, 11E8, 11F10,

11F11, 11F9, 11G1, 11G1.5, 1C7, 1H8.8, 2A7, 2A7.6, 2E2, 2E2.7, 2E7, 2E7.2, 2G1, 2G1.2, 3C12, 3E10, 3E10.5, 3E6, 3E6.0, 3F10, 4A1, 4B6 및 4B6.12. 소수점 다음에 몇붙인 수는 동일한 하이브리도마 세포주의 상이한 클론 분리체를 나타낸다.

[0062] 본 발명의 일부 인간 서열 항-CTLA-4 항체는 하기 특성을 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다: a) 인간 CTLA-4에 대한 특이성(인간 CTLA-4에 대한 특이적 결합); b) 적어도 약 10^7 M^{-1} , 또는 약 10^9 M^{-1} , 또는 약 10^{10} M^{-1} 내지 10^{11} M^{-1} 또는 그 이상의 평형 결합 상수(K_a)하의 인간 CTLA-4에 대한 결합 친화도; (c) 적어도 약 10^3 , 약 10^4 , 또는 약 $10^5 \text{ m}^{-1} \text{s}^{-1}$ 의 동적 결합 상수(k_a); 및/또는 (d) 적어도 약 10^3 , 약 10^4 , 또는 약 $10^5 \text{ m}^{-1} \text{s}^{-1}$ 의 동적 해리 상수(k_d).

[0063] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명의 인간 서열 항체 또는 항원-결합 부분을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 따라서, 본 발명의 항체-암호화 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터, 및 상기 벡터로 형질감염된 숙주 세포도 또한 본 발명에 포함되며, 상기 숙주 세포를 배양하여 본 발명의 항체를 제조하는 방법도 마찬가지이다.

[0064] 또 다른 태양에서, 본 발명은 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체들의 다양한 동종형(예를 들면, IgG, IgA 및/또는 IgM)을 발현시킬 수 있는 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스로부터 분리된 B-세포를 제공한다. 분리된 B 세포는 인간 CTLA-4 항원(또는 그의 항원성 절편) 및/또는 인간 CTLA-4를 발현하는 세포의 정제되거나 강화된 제제로 면역된 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스로부터 수득할 수 있다. 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스는 인간 종쇄 변형유전자 및 인간 경쇄 변형유전자를 포함하는 게놈을 가질 수 있다. 분리된 B-세포는 인간 CTLA-4에 대한 인간 단일클론 항체의 공급원(예를 들면, 하이브리도마)을 제공하기 위해 불멸화시킬 수 있다.

[0065] 따라서, 본 발명은 또한 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체를 생성할 수 있는 하이브리도마를 제공한다. 하이브리도마는 불멸화된 세포에 융합된 인간 종쇄 변형유전자 및 인간 경쇄 변형유전자를 포함하는 게놈을 갖는 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함할 수 있다. 인간을 제외한 유전자변형 동물은 인간 CTLA-4 항원 및/또는 인간 CTLA-4를 발현하는 세포의 정제되거나 강화된 제제로 면역되어 항체-생성 하이브리도마를 생성할 수 있다.

[0066] 또 다른 태양에서, 본 발명은 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체(본원에서는 "HuMAb-마우스(등록상표)"로도 또한 지칭함)를 발현시키는 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스를 제공한다. 인간을 제외한 유전자변형 동물은 인간 종쇄 변형유전자 및 인간 경쇄 변형유전자를 포함하는 게놈을 갖는 유전자변형 마우스일 수 있다. 인간을 제외한 유전자변형 동물은 CTLA-4 항원(또는 그의 항원 절편) 및/또는 인간 CTLA-4를 발현하는 세포의 정제되거나 강화된 제제로 면역시킬 수 있다. 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스는 V-D-J 재조합 및 동종형 전환을 행함으로써 인간 CTLA-4에 대한 인간 단일클론 항체의 다중 동종형(예를 들면, IgG, IgA 및/또는 IgM)을 생성할 수 있다. 동종형 전환은, 예를 들면, 전형적 또는 비-전형적 동종형 전환에 의해 일어날 수 있다.

[0067] 또 다른 태양에서, 본 발명은 인간 CTLA-4와 특이적으로 반응하는 인간 서열 항체 및 인간 서열 단일클론 항체를 생성하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일부 방법은 인간 종쇄 변형유전자 및 인간 경쇄 변형유전자를 포함하는 게놈을 갖는 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스를 인간 CTLA-4 항원 및/또는 인간 CTLA-4를 발현하는 세포의 정제되거나 강화된 제제로 면역시킴을 포함한다. 그런 다음, 상기 동물의 B-세포(예를 들면, 지라 B 세포)를 수득하고 골수종 세포와 융합시켜 인간 CTLA-4에 대한 인간 단일클론 항체를 분비하는 불멸의 하이브리도마 세포를 형성할 수 있다.

[0068] 본 발명의 항-인간 CTLA-4 인간 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분(예를 들면, Fab)은 유도체화하거나 또는 또 다른 작용성 분자, 예를 들면, 또 다른 웨بت아이드 또는 단백질(예를 들면, Fab' 절편)에 결합시킬 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 부분은 하나 이상의 다른 분자성 물질에 기능적으로 결합될 수 있다(예를 들면, 화학적 커플링, 유전학적 융합, 비공유적 결합 등에 의해). 예를 들면, 인간 서열 항-CTLA-4 항체 또는 그의 항원 결합 절편은 치료 잔기, 예를 들면, 세포독성 약물, 효소적으로 활성인 독소 또는 그의 절편, 방사성동위원소 또는 소분자 항암 약물에 결합될 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 세포독성 약제에 결합될 수 있다, 예를 들면, ^{131}I (예를 들면, 션(Shen)의 문헌[Cancer, 80(12 Suppl):2553-2557, 1997] 참조), 구리-67(예를 들면, 데스판드(Deshpande)의 문헌[J. Nuc. Med., 29:217-225, 1988] 참조)과 같은 세포독성제로 방사성표지되거나, 또는, 예를 들면, 리보좀 불활성화 단백질 젤로닌(예를 들면, 보일(Boyle)의 문헌 [J. of

Immunol., 18:221-230] 참조)에 결합될 수 있다.

[0069] 또 다른 태양으로, 본 발명은 약학적으로 허용되는 담체 및 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 본 발명의 인간 단일클론 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 조성물, 예를 들면, 약학 조성물 및 진단 조성물을 제공한다. 일부 조성물은, 바람직하게는 각각 상이한 에피토프에 결합하는 인간 서열 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 혼합물을 포함한다. 본 발명의 하나 이상의 인간 서열 항체 또는 하나 이상의 인간 단일클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분, 및 하나 이상의 본 발명의 이중특이성 또는 다중특이성 분자의 혼합물을 포함하는 조성물, 예를 들면, 약학 조성물도 또한 본 발명의 범위에 속한다.

[0070] 생체내 방법의 경우, 항체 또는 그의 항원-결합 부분(또는 본 발명의 이중특이성 또는 다중특이성 분자)을 T-세포 관련 질환, 또는 면역 반응을 증진시키거나 억제하거나 연장시킴으로써 개선되거나 방지될 수 있는 질환을 앓고 있는 인간 환자에게 투여할 수 있다.

[0071] 본 발명의 인간 서열 단일클론 항체 및 인간 서열 항체 조성물은 다른 공지된 치료법, 예를 들면, 항암 치료법과 함께 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 약학적 담체와 함께 인간 서열 항체의 약학 조성물을 치료 효과량으로 대상에게 투여함을 포함하는, 상기 대상에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법 중 일부는 백신을 포함한다. 상기 백신 일부는 종양 세포 백신, 과립구-대식세포 집락자극인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)-변형된 종양 세포 백신 또는 항원-부하된 수상돌기 세포 백신을 포함한다. 몇몇 상기 방법에서, 암은 전립선암, 흑색종 또는 상피암이다.

[0072] 인간 CTLA-4에 대한 인간 서열 항체는 면역 반응 또는 억제의 자극을 필요로 하는 치료 방법에 사용될 수 있다. 면역 반응의 자극을 필요로 하는 것은 인간 B7에 대한 인간 CTLA-4의 결합을 차단하는 항체를 이용하여 치료한다. 면역 반응의 자극, 증진 또는 연장에 의해 치료될 수 있는 질환으로는 전립선암, 신장암 또는 결장암을 포함한 암, 병원체 감염, 자가-항원과 관련된 질환, 예를 들면, 알츠하이머병을 포함한 아밀로이드생성 질환, 및 염증 또는 알러지 성분과 관련된 질환이 포함된다. 면역억제는 서로에 결합되는 인간 CTLA-4에 대한 2개 이상의 상이한 항체들을 포함하는 다가 제제를 이용하여 달성된다. 치료될 수 있는 질환으로는 이식편 대 숙주 질환, 숙주 대 이식편 질환, 자가면역 질환 및 염증이 포함된다.

[0073] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 샘플 중의 인간 CTLA-4 항원의 존재를 시험관내 또는 생체내에서 검출하는 방법, 예를 들면, 인간 CTLA-4 질환을 진단하는 방법을 제공한다. 일부 방법에서, 상기 검출은 항체와 인간 CTLA-4 사이에 복합체를 형성시키는 조건하에서, 시험할 샘플을 대조용 샘플과 함께 본 발명의 인간 서열 항체 또는 인간 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분(또는 이중특이성 또는 다중특이성 분자)과 접촉시킴으로써 이루어진다. 그 다음, 복합체 형성을 두 샘플 모두에서 검출(예를 들면, ELISA를 이용하여)하고, 샘플들 사이의 복합체 형성에 있어 통계적으로 의미있는 차이가 시험 샘플 중 인간 CTLA-4 항원의 존재를 나타내는 것이다.

[0074] 본 발명의 특성 및 이점들은 명세서의 나머지 부분, 도면 및 청구의 범위를 참조로 하여 더욱 이해될 수 있다.

[0075] 본원에 인용된 모든 출판물, 도면, 유전자은행(GenBank) 수탁 자료(서열), ATCC 기탁체, 특히 및 특허출원은 각각 개별적으로 나타내었을 지라도 모든 목적에 동일하게 참고로 인용된다.

[0076] 본 발명은 인간 CTLA-4 및/또는 관련 분자들의 발현, 특히 과발현 또는 활성화, 특히 과활성화를 특징으로 하는 질환을 치료하고 진단하기 위한 새로운 항체를 기초로 하는 치료법을 제공한다. 본 발명의 치료법은 인간 CTLA-4에 존재하는 에피토프에 결합하는 인간 서열 항체, 인간 서열 단일클론 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 이용한다. 이들 인간 서열 항-CTLA-4 항체는 작용성 길항물질(예를 들면, 신호를 세포에 전달하는 그 능력을 억제함으로써, 리간드에 결합하거나 세포를 활성화시키는 CTLA-4의 능력을 억제하는 길항물질) 또는 작용물질(예를 들면, 리간드의 효과를 자극하는 작용물질)로 작용할 수 있다.

[0077] 본 발명의 인간 서열 항체는, V-D-J 재조합 및 동종형 전환을 행함으로써 인간 CTLA-4에 대한 인간 (예를 들면, 단일클론 또는 다중클론) 항체의 다중 동종형(예를 들면, IgG, IgA 및/또는 IgE)을 생성할 수 있는 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스에서 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다양한 태양들은 항체 및 항체 결편, 및 그의 약학 조성물에 더불어, 인간을 제외한 유전자변형 동물, 및 상기 단일클론 항체를 제조하기 위한 B-세포 및 하이브리도마를 포함한다. 시험관내 또는 생체내에서, 인간 CTLA-4 또는 관련된 교차반응성 성장 인자 수용체를 발현하는 세포를 검출하거나, 또는 인간 CTLA-4를 발현하는 세포의 성장, 분화 및/또는 운동성을 억제하기 위해 본 발명의 항체를 이용하는 방법도 또한 본 발명에 포함된다.

[0078] 특별히 언급된 경우를 제외하고, "환자" 또는 "대상"이란 용어들은 교환적으로 사용되며, 인간 환자 및 인간을

제외한 영장류와 같은 포유동물, 및 토끼, 래트 및 마우스와 같은 실험 동물 및 기타 동물들을 말한다.

[0079] "치료"란 용어는 질환의 증상, 합병증 또는 생화학적 징후의 개시를 방지하거나 지연시키기 위해 본 발명의 화합물 또는 약제를 투여하거나, 증상을 완화시키거나 또는 질환, 증상 또는 장애(예를 들면, 자가면역 질환)의 더 이상의 진전을 중단 또는 억제시킴을 포함한다. 치료는 예방적(질환의 개시를 방지 또는 지연시키거나, 또는 그의 임상적 또는 준임상적 증상의 발현을 방지하기 위한)이거나 또는 질환의 증상발현 후에 증상을 치료적으로 억제 또는 완화시키는 것일 수 있다.

[0080] 일반적으로, "잘 허용되는(well tolerated)"이란 용어는 건강 상태에 있어 치료의 결과로 일어나며 치료 결정에 영향을 미치는 불리한 변화가 없음을 말한다.

[0081] 본원에 사용된 바와 같은 "림프구"란 용어는 당해 분야에서의 통상적인 의미를 가지며, 혈액, 림프 및 림프계 조직에서 발견되는 임의의 단핵, 비탄식성 백혈구, 즉, B 및 T 림프구를 말한다.

[0082] "T 림프구의 아집단" 또는 "T 세포 아형(들)"이란 어구는 특정 세포 표면 마커의 발현에 의해 규정되는 T 림프구 또는 T 세포를 말한다(예를 들면, 문헌 [Barclay, A.N. et al., (eds.), The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd. edition, Academic Press, London, United Kingdom, 1997]을 참조하시오). T 세포와 관련하여 "안정한"이란 용어는 T 세포 아형의 빈도 또는 비율이 약제 투여 과정 또는 기간에 걸쳐 변화하지 않는다는 사실을 말한다.

[0083] 용어 "세포독성 T 림프구-결합 항원-4", "CTLA-4", "CTLA4", "CTLA-4 항원" 및 "CD152"(예를 들면, 무라타(Murata)의 문헌[Am. J. Pathol., 155:453-460, 1999] 참조)는 교환적으로 사용되며, 인간 CTLA-4의 변이체, 이형체(isoform), 종 상동체, 및 CTLA-4와의 하나 이상의 공통 애피토프를 갖는 유사체(예를 들면, 발자노(Balzano)의 문헌[Int. J. Cancer Suppl., 7:28-32, 1992] 참조)를 포함한다.

[0084] 인간 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 유전자은행 접수 번호 L15006을 갖는다. 아미노산 1 내지 37번의 영역은 선도 펩타이드이고; 38 내지 161번 아민노산은 세포외 V-유사 영역이며; 162 내지 187번은 막투과 영역이고; 188 내지 223번은 세포질 영역이다. 49번 위치에서 G가 A로, 272번 위치에서 C가 T로 및 439번 위치에서 A가 G로 변이된 것을 포함한, 뉴클레오티드 서열의 변이체가 보고되었다. 마우스 CTLA-4의 완전한 DNA 서열은 EMBL 접수 번호 X05719를 갖는다(브루넷 등의 문헌[Nature, 328:267-270, 1987]). 1 내지 35번 아미노산의 영역이 선도 펩타이드이다.

[0085] 인간 B7-1(CD80)의 완전 DNA 서열은 유전자은행 접수 번호 X60958을 가지며; 마우스 서열에 대한 접수 번호는 X60958이고; 래트 서열에 대한 접수 번호는 U05593이다. 인간 B7-2(CD86)의 완전한 cDNA 서열은 유전자 접수 번호 L25259를 갖고; 마우스 서열에 대한 접수 번호는 L25606이다.

[0086] CD28을 암호화하는 유전자는 광범위하게 규정되었다. 닦의 mRNA 서열은 유전자은행 접수 번호 X67915를 갖는다. 래트의 mRNA 서열은 유전자은행 접수 번호 X55288을 갖는다. 인간 mRNA 서열은 유전자은행 접수 번호 J02988을 갖고. 마우스의 mRNA 서열은 유전자은행 접수 번호 M34536을 갖는다.

[0087] "애피토프(epitope)"란 용어는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정인자를 의미한다. 애피토프는 통상적으로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자들의 화학적 활성 표면 그룹들로 이루어지며, 통상적으로 특이적인 3차원 구조 특성, 및 특이적인 전하 특성을 갖는다. 입체형태적 애피토프 및 비입체형태적 애피토프는, 변성 용매의 존재하에서 입체형태적 애피토프에 대한 결합은 손실되지만 비입체형태적 애피토프에 대한 결합은 그렇지 않다는 점에서 구별된다.

[0088] 온전한 "항체"는 이황화 결합에 의해 상호연결된 2개 이상의 중쇄(H쇄) 및 2개의 경쇄(L쇄)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 영역, CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서는 LCVR 또는 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 영역, CL로 이루어진다. VH 및 VL 영역은 골격 영역(FR)으로 불리는, 보다 많이 보존되는 영역들이 산재되어 있는, 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR)으로 불리는 고도가변성 영역들로 더 세분될 수 있다. VH 및 VL은 각각 다음 순서로 아미노-말단에서 카복실-말단으로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄 영역의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 영역을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역 시스템의 다양한 세포(예를 들면, 작동 세포) 및 전형적인 상보체 시스템의 제 1 성분(C1q)을 포함하여, 숙주 조직 또는 인자들에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 항체란 용어는 CTLA-4에 결합하는 능력을 보유하는 온전한 항체의 항원-결합 부분을 포함한다. 결합의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 영역

으로 이루어지는 1가 절편인 Fab 절편; (ii) 헌지 영역에서 이황화 결합에 의해 결합된 2개의 Fab 절편을 포함하는 2가 절편인 F(ab')2 절편; (iii) VH 및 CH1 영역으로 이루어지는 Fd 절편; (iv) 항체의 단일 팔(arm)의 VL 및 VH 영역으로 이루어지는 Fv 절편; (v) VH 영역으로 이루어지는 dAb 절편(와드(Ward) 등의 문헌[Nature, 341:544-546, 1989]); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 더욱이, Fv 절편의 두 영역, VL 및 VH는 별도의 유전자들에 의해 암호화되지만, 이들은 재조합 방법을 이용하여, VL 및 VH 영역들이 쌍을 이루어 1가 분자(단일쇄 Fv(scFv)로 알려짐; 예를 들면, 베드(Bird) 등의 문헌[Science, 242:423-426, 1988]; 및 휴스턴(Huston) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988] 참조)를 형성하는 단일 단백질 쇄로 제조될 수 있게 하는 합성 링커에 의해 결합될 수 있다. 상기 단일쇄 항체는 참고로 "항체"란 용어에 포함된다. 절편들은 재조합 기술에 의해 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 분열에 의해 제조할 수 있다.

[0089]

이중특이성 항체는 2개의 상이한 결합 특이성을 갖는다(예를 들면, 미국 특허 제 5,922,845 및 5,837,243 호; 제일더(Zeilder)의 문헌[J. Immunol., 163:1246-1252, 1999]; 소마선다람(Somasundaram)의 문헌[Hum. Antibodies, 9: 47-54, 1999]; 켈러(Keler)의 문헌[Cancer Res., 57:4008-4014, 1997] 참조). 예를 들면, 본 발명은 인간 CTLA-4와 같은 세포 표면 항원에 대한 하나의 결합 부위, 및 작동 세포의 표면 상의 Fc 수용체에 대한 제 2의 결합 부위를 갖는 이중특이성 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 3개 이상의 결합 부위를 갖는 다중특이성 항체를 갖는다. "이중특이성 항체"란 용어는 또한 이중항체(diabody)를 포함한다. 이중항체란, VH 및 VL 영역이 단일 폴리펩타이드 쇄 상에서 발현되지만, 동일 쇄 상의 두 영역 사이에서 쌍을 이루기에는 너무 짧은 링커를 이용함으로써 영역들을 또 다른 쇄의 상보성 영역과 쌍을 이루게 하여 2개의 항원 결합 부위를 생성하는 2가의 이중특이성 항체이다(예를 들면, 홀리거(Holliger, P.) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448, 1993]; 폴작(Poljak, R.J.) 등의 문헌[Structure, 2:1121-1123, 1994] 참조).

[0090]

"인간 서열 항체"란 용어는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 영역 및 불변 영역(존재하는 경우)을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 인간 서열 항체는 인간 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기(예를 들면, 시험관내에서 무작위적 돌연변이유발 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 도입되거나 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같이, "인간 서열 항체"란 용어는 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종의 생식선으로부터 유도된 CDR 서열이 인간 골격 서열에 이식된 항체(즉, 인간화된 항체)는 포함하지 않는다.

[0091]

"단일클론 항체" 또는 "단일클론 항체 조성물"이란 용어는 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 말한다. 단일클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 따라서, "인간 단일클론 항체"는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 영역 및 불변 영역(존재하는 경우)을 갖는 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 말한다. 한 태양에서, 인간 단일클론 항체는, 불멸화된 세포에 융합된 인간 중쇄 변형유전자 및 경쇄 변형유전자를 포함하는 게놈을 갖는 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다.

[0092]

"이중클론 항체"란 용어는 인간 CTLA-4에 대한 2개 이상의 항체의 제제를 말한다. 전형적으로, 상이한 항체들은 상이한 에피토프에 결합한다.

[0093]

"올리고클론 항체"란 용어는 인간 CTLA-4에 대한 3 내지 100개의 상이한 항체들의 제제를 말한다. 전형적으로, 상기 제제 중의 항체들은 일련의 상이한 에피토프들에 결합한다.

[0094]

"다중클론 항체"란 용어는 인간 CTLA-4에 대한 1개보다 많은(둘 이상) 상이한 항체들의 제제를 말한다. 상기 제제는 일련의 상이한 에피토프에 결합하는 항체들을 포함한다.

[0095]

본 발명은 인간 CTLA-4 수용체에 의해 전달된 신호를 차단하거나 그에 길항작용하는 인간 CTLA-4에 대한 인간 서열 항체를 제공한다. 이들 항체중 일부는 CTLA-4가 인간 B7 상대 수용체와 상호작용하는 것을 억제하기 위해 인간 CTLA-4 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 인간 CTLA-4와 인간 B7과의 상호작용은 인간 CTLA-4 수용체를 갖는 T-세포의 불활성화를 야기하는 신호를 전달하기 때문에, 상호작용의 길항작용은 인간 CTLA-4 수용체를 갖는 T 세포의 활성화를 효과적으로 유도하거나 증진하거나 연장시킴으로써 면역 반응을 연장시키거나 증진시킨다. "차단 항체"란 항체 결합 부위 대 인간 CTLA-4 리간드 결합 부위의 비가 1:1보다 크고 항체의 농도가 10^{-8} M보다 큰 조건하에서, 세포-발현된 인간 B7 리간드에 대한 가용성 인간 CTLA-4의 결합을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% 또는 99.9% 감소시키는 항체를 말한다.

[0096]

때때로 다가 제제로 불리는 다른 항체 제제는 동일 세포 상에서 다중 인간 CTLA-4 수용체를 가교결합시키는 방식으로 인간 CTLA-4에 결합한다. 수용체의 가교결합은 인간 B7에 대한 인간 CTLA-4의 결합과 동일하거나 유사

한 효과를 갖는다. 따라서, 수용체들의 가교결합은 면역억제를 야기하는 인간 CTLA-4 반응을 효과적으로 촉진 한다.

[0097] 가교결합은 또한 상이한 에피토프 특이성을 갖는 가용성 2가 항체를 결합시켜 달성될 수 있다. 이러한 다중클론 항체 제제들은 면역억제 신호가 인간 CTLA-4 가교결합의 결과로서 전달될 수 있도록 인간 CTLA-4상의 상이한 에피토프에 결합하는 적어도 두쌍의 중쇄 및 경쇄를 포함한다.

[0098] "재조합 인간 항체"란 용어는 재조합 수단에 의해 제조되거나 발현되거나 생성되거나 분리된 본 발명의 모든 인간 서열 항체, 예를 들면, 인간 면역글로불린 유전자(하기의 섹션 I에서 더 설명함)에 대해 유전자변형된 동물(예를 들면, 마우스)로부터 분리된 항체; 숙주 세포에 형질감염된 재조합 발현 벡터를 이용하여 발현된 항체, 재조합된, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체, 또는 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 접합시킴을 포함하는 임의의 기타 수단에 의해 제조되거나 발현되거나 생성되거나 분리된 항체를 포함한다. 상기 재조합 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 영역 및 불변 영역(존재하는 경우)을 갖는다. 그러나, 상기 항체들은 시험관내 돌연변이유발(또는, 인간 Ig 서열에 대해 유전자변형된 동물을 이용하는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용될 수 있으므로, 재조합 항체들의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열들은, 인간 생식선 VH 및 VL 서열로부터 유도되고 그와 관련되긴 하지만 천연적으로는 생체내에서 인간 항체 생식선 래퍼토리 내에 존재하지 않을 수도 있는 서열들이다.

[0099] "이종 항체"는 상기 항체를 생성하는 인간을 제외한 유전자변형 유기체에 관하여 정의된다. 상기 용어는 인간을 제외한 유전자변형 동물로 이루어지지 않으며 일반적으로 인간을 제외한 유전자변형 동물이 아닌 종으로부터의 유기체에서 발견되는 서열과 상응하는 아미노산 서열 또는 암호화 핵산 서열을 갖는 항체를 말한다.

[0100] "이종하이브리드 항체"는 상이한 유기체에서 유래된 경쇄 및 중쇄를 갖는 항체를 말한다. 예를 들면, 쥐의 경쇄와 결합된 인간 중쇄를 갖는 항체가 이종하이브리드 항체이다. 이종하이브리드 항체의 예로는 상기에서 고찰한 키메라 항체 및 인간화된 항체가 포함된다.

[0101] "실질적으로 순수한" 또는 "분리된"이란 용어는 대상 종이 존재하는 주 종(즉, 몰 기준으로 조성물 중 임의의 다른 개별적 종보다 더 많은 종)이 되도록 대상 종(예를 들면, 본 발명의 항체)이 그 천연 환경의 한 성분으로부터 동정되어 분리되고/되거나 회수된 것을 의미하며; "실질적으로 순수한" 또는 "분리된" 조성물은 또한 대상 종이 존재하는 모든 거대분자 종의 약 50%(몰 기준으로) 이상을 차지함을 의미한다. 실질적으로 순수한 조성물 또는 분리된 조성물은 또한 조성물에 존재하는 모든 거대분자 종의 약 80 내지 90 중량%보다 많은 대상 종을 포함할 수 있다. 분리된 대상 종(예를 들면, 본 발명의 항체)은 또한 필수 균질도(통상적인 검출 방법에 의해서는 조성물 중에 오염 종이 검출될 수 없다)까지 정제될 수 있는데, 이때 조성물은 필수적으로 단일 거대분자 종의 유도체들로 이루어진다. 인간 CTLA-4에 대한 분리된 항체는 실질적으로 인간 CTLA-4에 대한 결합이 결여되고 상이한 항원에 결합하는 다른 항체들을 포함하지 않을 수 있다. 그러나, 인간 CTLA-4의 에피토프, 이형체 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는, 예를 들면, 다른 종으로부터의 다른 관련 항원(예를 들면, CTLA-4 종 동족체)에 대한 교차반응성을 가질 수 있다. 더욱이, 본 발명의 분리된 항체는 실질적으로 다른 세포 물질(예를 들면, 비-면역글로불린 관련 단백질) 및/또는 화학물질을 갖지 않아야 한다.

[0102] "특이적 결합"이란 예정된 항원에 대한 항체 결합을 말한다. 항체에 "특이적으로(또는 선택적으로) 결합한다"는 어구는 단백질 및 기타 생물학적 물질의 불균질 집단 중 단백질의 존재를 결정하는 결합 반응을 말한다. 전형적으로, 항체는 적어도 약 $1 \times 10^6 M^{-1}$ 또는 $10^7 M^{-1}$, 또는 약 $10^8 M^{-1}$ 내지 $10^9 M^{-1}$, 또는 약 $10^{10} M^{-1}$ 내지 $10^{11} M^{-1}$ 또는 그 이상의 결합 상수(K_a) 하에 결합하며, 예정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 다른 비-특이적 항원(예를 들면, BSA, 카세인)에 대한 결합에 대한 친화도보다 2배 이상 큰 친화도 하에 예정된 항원에 결합한다. "항원을 인지하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"란 어구는 본원에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"란 용어와 교환적으로 사용된다.

[0103] 웹타이드를 말할 때 "특이적으로 결합한다"라는 어구는 독점적으로 또는 주로 표적 분자에 대해 중간이나 높은 결합 친화도를 갖는 웹타이드 분자를 말한다. "-에 특이적으로 결합한다"라는 어구는 단백질 및 기타 생물학적 물질의 불균질 집단의 존재 중 표적 단백질의 존재를 결정하는 결합 반응을 말한다. 따라서, 명시된 분석 조건 하에서, 특정화된 결합 잔기는 특정 표적 분자에 우선적으로 결합하며 시험 샘플에 존재하는 상당량의 다른 성분들에는 결합하지 않는다. 상기 조건하에서 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 것은 특정 표적 항원에 대한 그의 특이성으로 인해 선택된 결합 잔기를 필요로 할 수 있다. 다양한 분석 포맷을 이용하여 특정 단백질과 특이적으로 반응하는 리간드를 선택할 수 있다. 예를 들면, 고체상 ELISA 면역분석법, 면역침전법, 비아코어

(Biacore) 및 웨스턴(Western) 블롯법을 이용하여 CTLA-4와 특이적으로 반응하는 웹타이드를 확인한다. 전형적으로, 특이적 또는 선택적 반응은 배경 신호 또는 잡음의 적어도 2배가 될 것이며, 보다 전형적으로는 배경의 10배보다 클 것이다.

[0104] IgG 항체에 대한 "높은 친화도"란 용어는 약 10^7 M^{-1} 이상, 약 10^8 M^{-1} 이상, 약 10^9 M^{-1} 이상, 약 10^{10} M^{-1} 이상, 약 10^{11} M^{-1} 이상, 또는 약 10^{12} M^{-1} 이상, 예를 들면, 10^{13} M^{-1} 또는 10^{14} M^{-1} 이상까지의 평형 결합 상수(K_a)를 말한다. 그러나, "높은 친화도" 결합은 다른 항체 동종형에 대해서는 변할 수 있다.

[0105] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " K_a "는 특정 항체-항원 상호작용의 평형 결합 상수를 말하는 것이다. 상기 상수는 $1/\text{M}$ 의 단위를 갖는다.

[0106] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " K_d "는 특정 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수를 말하는 것이다. 상기 상수는 M 의 단위를 갖는다.

[0107] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " k_a "는 특정 항체-항원 상호작용의 동적 결합 상수를 말하는 것이다. 상기 상수는 $1/\text{Ms}$ 의 단위를 갖는다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " k_d "는 특정 항체-항원 상호작용의 동적 해리 상수를 말하는 것이다. 상기 상수는 $1/\text{s}$ 의 단위를 갖는다.

[0109] "특정 항체-항원 상호작용"이란 평형 상수 및 동적 상수들을 측정하는 실험 조건을 말한다.

[0110] "동종형(isotype)"이란 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 암호화되는 항체 부류(예를 들면, IgM 또는 IgG1)를 말한다.

[0111] "동종형 전환"이란 항체의 부류 또는 동종형이 하나의 Ig 부류에서 다른 Ig 부류를 중 하나로 변화되는 현상을 말한다.

[0112] "비전환 동종형"이란 동종형 전환이 일어나지 않았을 때 생성되는 중쇄의 동종형 부류를 말하며; 비전환 동종형을 암호화하는 CH 유전자는 전형적으로 기능적으로 재배열된 VDJ 유전자의 바로 하류에 있는 첫 번째 CH 유전자이다. 동종형 전환은 전형적 또는 비전형적 동종형 전환으로 분류되어 왔다. 전형적 동종형 전환은 변형유전자 중 하나 이상의 전환 서열 영역을 포함시키는 재조합에 의해 일어난다. 비전형적 동종형 전환은, 예를 들면, 인간 σ_{μ} 및 인간 Σ_{μ} 사이의 상동성 재조합(δ -결합된 결실)에 의해 일어날 수 있다. 특히 변형유전자 간 및/또는 염색체간 재조합과 같은 대안적인 비전형적 전환 메카니즘이 일어날 수 있으며 동종형 전환을 수행 할 수 있다.

[0113] "전환 서열"이란 용어는 전환 재조합이 일어나는 DNA 서열을 말한다. "전환 공여체(switch donor)" 서열, 전형적으로 μ 전환 영역은 전환 재조합동안 결실될 구조체 영역의 5'(즉, 상류) 영역이다. "전환 수용체(switch acceptor)" 영역은 결실될 구조체 영역과 치환 구조체 영역(예를 들면, γ , ϵ 영역등) 사이에 존재한다. 재조합이 항상 일어나는 특이적 부위가 존재하지 않으므로, 최종 유전자 서열은 구조체로부터 전형적으로 예상가능한 것은 아니다.

[0114] "글리코실화 패턴"은 단백질, 보다 특히는 면역글로불린 단백질에 공유적으로 부착되는 탄수화물 단위들의 패턴으로 정의된다. 이종 항체의 글리코실화 패턴은, 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자가 이종 항체의 글리코실화 패턴을 변형유전자의 CH 유전자가 유도된 종에 대해서 보다 인간을 제외한 유전자변형 동물 종에서의 상기 글리코실화 패턴과 보다 유사한 것으로 인지하는 경우, 인간을 제외한 유전자변형 동물 종에 의해 생성된 항체에서 천연적으로 일어나는 글리코실화 패턴과 실질적으로 유사한 것으로 규정될 수 있다.

[0115] 한 대상에 적용될 때 "천연 생성"이란 용어는 대상이 천연에서 발견될 수 있다는 사실을 말한다. 예를 들면, 천연 공급원으로부터 분리할 수 있고 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체(바이러스 포함)에 존재하는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 천연적으로 생성된 것이다.

[0116] "재배열"이란 용어는 V 단편이 필수적으로 완전 VH 또는 VL 영역을 각각 암호화하는 형태로 D-J 또는 J 단편에 바로 인접하여 위치하는 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 좌위의 구조를 말한다. 재배열된 면역글로불린 유전자 좌위는 생식선 DNA와 비교함으로써 확인할 수 있으며; 재배열된 좌위는 하나 이상의 재조합 7량체(heptamer)/9량체(nonamer) 상동성 요소를 갖는다.

- [0117] V 단편에 관하여 "재배열되지 않은" 또는 "생식선 구조"란 용어는 V 단편이 D 또는 J 단편에 바로 인접하도록 재조합 되지 않은 구조를 말한다.
- [0118] "핵산"이란 용어는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함한다. 핵산은 단일-스트랜드 또는 이중-스트랜드로 될 수 있다.
- [0119] CTLA-4에 결합하는 항체 또는 항체 부분(예를 들면, VH, VL, CDR3)을 암호화하는 핵산에 관한 "분리된 핵산"이란 용어는 항체 또는 항체 부분을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 CTLA-4 이외의 다른 항원에 결합하는 항체 또는 항체 부분을 암호화하는 다른 뉴클레오티드 서열을 갖지 않는 핵산을 말하며, 상기 다른 서열은 천연적으로 인간 게놈 DNA에서 핵산에 인접할 수 있다. 서열번호: 4 내지 23은 본 발명의 10D1, 4B6 및 1E2 인간 항-CTLA-4 단일클론 항체의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 가변 영역을 포함하는 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 포함한다.
- [0120] 2개의 핵산 또는 폴리펩타이드와 관련하여, "실질적으로 동일한"이란 용어는 하기의 서열 비교 방법을 사용하고 /하거나 육안 검사에 의해 측정할 때, 최대 상응성에 대해 비교하고 정렬하는 경우, 적어도 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 동일성을 갖는 2개 이상의 서열 또는 부분서열을 말한다. 예를 들면, 본 발명은 서열번호: 1에 실질적으로 동일한 서열, 즉 서열번호: 2를 갖는 핵산을 제공한다. 상기 "실질적으로 동일한" 서열들은 전형적으로 상동성인 것으로 간주된다. "실질적인 동일성"은 길이가 적어도 약 50개 잔기인 서열 영역에 걸쳐 존재하거나, 적어도 약 100개 잔기의 영역, 또는 적어도 약 150개 잔기의 영역, 또는 비교될 두 서열의 전체 길이에 걸쳐 존재할 수 있다. 하기에서 설명하는 바와 같이, 임의의 두 항체 서열은 카밧(Kabat)의 번호매김 체계를 이용하여 한 방향으로 단지 정렬될 수 있다. 그러므로, 항체의 경우, 동일성 퍼센트는 유일하고 명확한 의미를 갖는다.
- [0121] 면역글로불린의 성숙한 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 아미노산은 각각 Hx 및 Lx로 표시하는데, 여기서, x는 카밧(Kabat)(문헌[*Sequences of Proteins of Immunological Interest*](미국 미들랜드주 베데스다 소재의 국립 건강 연구소(National Institute of Health), 1987 & 1991)의 체계에 따른 아미노산의 위치를 표시한 숫자이다. 카밧은 각각의 아그룹(subgroup)에 대해 항체에 대한 많은 아미노산 서열을 나열하고, 공통 서열을 생성하는 아그룹에서 각 잔가의 위치에 대한 가장 공통되는 아미노산을 나열한다. 카밧은 나열된 서열에서 각각의 아미노산에 잔기 번호를 지정하는 방법을 이용하며, 잔기 번호를 지정하는 상기 방법은 당해 분야에서 표준이 되어왔다. 카밧의 체계는 해당 항체를 유지된 아미노산을 참조로 하여 카밧의 공통 서열중 하나와 나란히 정렬시킴으로써 그의 개론에 포함되지 않는 다른 항체에도 적용가능하다. 카밧의 번호매김 체계를 이용하면 상이한 항체들에서 동등한 위치의 아미노산을 용이하게 확인한다. 예를 들면, 인간 항체의 L50 위치의 아미노산은 마우스 항체의 아미노산 위치 L50에 동등한 위치를 차지한다. 마찬가지로, 각각의 핵산에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 카밧 번호매김 규정에 따라 정렬시키는 경우, 항체 쇄를 암호화하는 핵산도 정렬된다.
- [0122] "선택적으로(또는 특이적으로) 하이브리드화되는"이란 어구는 서열이 복합 혼합물(예를 들면, 전체 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA)에 존재하는 경우, 염격한 하이브리드화 조건하에서 특정 뉴클레오티드 서열에 분자를 결합시키거나 이중화하거나 하이브리드화시키는 것을 말하는데, 이때 특정 뉴클레오티드 서열은 배경의 적어도 약 10배로 검출된다. 한 태양에서, 핵산은 다른 방법으로 본 발명의 범위에 속하는 것으로 결정된 핵산(예를 들면, 본원에 기술된 예시적인 서열)에 염격한 조건하에서 하이브리드화되는 그의 능력에 의해 본 발명의 범위에 속하는 것으로 결정될 수 있다(예를 들면, 실질적으로 서열번호: 1 또는 서열번호: 2와 동일하다).
- [0123] "엄격한 하이브리드화 조건"이란 어구는 프로브가 전형적으로 핵산의 복합 혼합물 중의 그의 표적 부분서열에는 하이브리드화되지만 다른 서열에는 의미있는 양(양성 신호(예를 들면, 본 발명 핵산의 확인))는 배경 하이브리드화의 약 10배이다)으로는 하이브리드화되지 않을 조건을 말한다. 염격한 조건은 서열 의존성이며 상이한 상황 하에서 상이할 것이다. 보다 긴 서열은 보다 고온에서 특이적으로 하이브리드화된다. 핵산의 하이브리드화에 대한 광범위한 지침은, 예를 들면, 문헌 [Sambrook, ed., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*(2nd ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997; *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes*, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed., Elsevier, N.Y., 1993]에 나와있다.
- [0124] 일반적으로, 염격한 조건은 한정된 이온 강도 pH에서 특이 서열에 대한 열 융점(T_m)보다 약 5 내지 10 °C 미만으로 선택된다. T_m 은 표적에 상보성인 프로브의 50%가 평형에서 표적 서열에 하이브리드화되는 온도(한정된 이

온 강도, pH 및 핵산 농도 하에서)이다(표적 서열은 T_m 에서 과량으로 존재하기 때문에, 프로브의 50%가 평형에서 점유된다). 염격한 조건은 염 농도가 7.0 내지 8.3의 pH에서 약 1.0 M 미만의 나트륨 이온, 전형적으로는 약 0.01 내지 1.0 M 나트륨 이온 농도(또는 다른 염들)이고 온도가 짧은 프로브(예를 들면, 10 내지 50개 뉴클레오티드)에 대해 약 30 °C 이상이고 긴 프로브(예를 들면, 50개 뉴클레오티드 이상)에 대해 약 60 °C 이상인 조건일 것이다. 염격한 조건은 또한 샘브룩(Sambrook)의 문헌(하기에 인용함)에 기술된 바와 같은 포름아미드와 같은 불안정화제의 첨가에 의해 달성될 수 있다. 매우 염격한 하이브리드화의 경우, 양성 신호는 배경의 2배 이상, 바람직하게는 배경 하이브리드화의 10배이다. 전형적인 고도의 염격성 또는 염격한 하이브리드화 조건은 65 °C에서 0.2 x SSC 및 0.1% SDS에서의 세척과 함께, 50% 포름아미드, 42 °C에서 배양된 5 x SSC 및 1% SDS 또는 65 °C에서 배양된 5 x SSC 및 1% SDS를 포함한다. 선택적 또는 특이적 하이브리드화의 경우, 양성 신호(예를 들면, 본 발명 핵산의 확인)는 배경 하이브리드화의 약 10배이다. 본 발명의 범위에 속하는 핵산을 확인하기 위해 사용되는 염격한 하이브리드화 조건은, 예를 들면, 65 °C에서 0.2 x SSC 및 0.1% SDS의 세척과 함께, 42 °C에서 50% 포름아미드, 5 x SSC 및 1% SDS를 포함하는 완충액에서의 하이브리드화, 또는 65 °C에서 5 x SSC 및 1% SDS를 포함하는 완충액에서의 하이브리드화를 포함한다. 본 발명에서, 본 발명의 핵산을 포함하는 게놈 DNA 또는 cDNA는 본원에 개시된 핵산 서열을 이용하여 염격한 조건하에서 표준 서던 블롯법(Southern blot)으로 확인할 수 있다. 상기(본 발명의 범위에 속하는 핵산을 확인하기 위한) 하이브리드화에 대한 또 다른 염격한 조건은 37 °C에서 40% 포름아미드, 1M NaCl, 1% SDS를 포함하는 완충액에서의 하이브리드화를 포함하는 조건들이다.

[0125] 그러나, 하이브리드화 포맷의 선택은 중요하지 않다, 핵산이 본 발명의 범위에 속하는지 여부를 결정하는 조건을 나타내는 것은 세척 조건의 염격성이다. 본 발명의 범위에 속하는 핵산을 확인하기 위해 사용되는 세척 조건은, 예를 들면, pH 7 및 적어도 약 50 °C 또는 약 55 내지 약 60 °C의 온도에서 약 0.02 M의 염 농도; 또는 72 °C에서 약 15 분간 약 0.15 M NaCl의 염 농도; 또는 적어도 약 50 °C 또는 약 55 내지 약 60 °C의 온도에서 약 15 내지 약 20 분간 약 0.2 x SSC의 염 농도; 또는 하이브리드화 복합체를 실온에서 0.1% SDS를 함유하는 약 2 x SSC의 염 농도를 갖는 용액으로 15 분간 2회 세척한 다음 68 °C에서 0.1% SDS를 함유하는 0.1 x SSC로 15 분간 2회 세척하는 조건; 또는 등가의 조건을 포함한다(SSC 완충액 및 등가의 조건의 설명에 대해서는 샘브룩(Sambrook), 티즈센(Tijssen) 및 아우서벨(Ausubel)의 문헌을 참조하시오).

[0126] 본 발명의 핵산은 전체 세포에, 세포 용해액에, 또는 부분 정제되거나 실질적으로 순수한 형태에 존재한다. 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩(banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로즈 겔 전기영동 및 당해 분야에 공지된 다른 기술들을 포함한 표준 기술에 의해 다른 세포 성분들 또는 다른 오염물질, 예를 들면, 다른 세포성 핵산 또는 단백질로부터 정제하는 경우 "분리"되거나 "실질적으로 순수하게 된다"(예를 들면, 샘브룩, 티즈센 및 아우서벨의 문헌 참조). 본 발명의 핵산 서열 및 본 발명을 실시하기 위해 사용되는 다른 핵산들은, RNA이든, cDNA이든, 게놈 DNA이든 또는 그의 하이브리드이든 모두 다양한 공급원으로부터 분리되고, 유전공학처리되고, 증폭되고/되거나 재조합에 의해 발현될 수 있다. 세균, 예를 들면, 효모 이외에 곤충 또는 포유동물 시스템을 포함한 임의의 재조합 발현 시스템을 사용할 수 있다. 또는, 상기 핵산들은 시험관내에서 화학적으로 합성될 수 있다. 예를 들면, 발현 벡터로의 서브클로닝, 표지 프로브, 서열분석 및 하이브리드화와 같은 핵산 조작 기술은 과학 문헌 및 특히 문헌에 잘 기술되어 있다(예를 들면, 샘브룩, 티즈센 및 아우서벨의 문헌 참조). 핵산은 당해 분야의 기술을 가진 자에게 공지된 많은 일반적 수단 중 임의 수단에 의해 분석하고 정량화할 수 있다. 이러한 기술로는, 예를 들면, 분석용 생화학 방법, 예를 들어, NMR, 분광법, 방사선사진법, 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC) 및 초확산 크로마토그래피; 다양한 면역학적 방법, 예를 들면, 유체 또는 겔 침강 반응, 면역확산법(단일 또는 이중), 면역전기영동, 방사성면역분석법(RIA), 효소-결합 면역흡착법(ELISA), 면역형광 분석법, 서던 분석법, 노던 분석법, 도트-블롯(dot-blot) 분석법, 겔 전기영동(예를 들면, SDS-PAGE), RT-PCR, 정량적 PCR, 기타 핵산 또는 표적 또는 신호 증폭 방법, 방사성표지법, 섬광 계수법 및 친화성 크로마토그래피가 포함된다.

[0127] 본 발명의 핵산 조성물은 종종 천연 서열(변형된 제한 부위 등은 제외하고)로 존재하지만, 유전자 서열을 제공하기 위해 표준 기술에 따라 cDNA, 게놈 또는 그의 혼합물로부터 돌연변이될 수 있다. 암호화 서열의 경우, 이러한 돌연변이는 목적하는 대로 아미노산 서열에 영향을 미칠 수 있다. 특히, 천연 V, D, J 서열, 불변 서열, 전환 서열 및 본원에 기술된 기타 상기 서열들에 실질적으로 상동성이거나 이들로부터 유도된 DNA 서열이 포함된다(여기서, "유도된"이란 서열이 또 다른 서열과 동일하거나 그로부터 변형됨을 나타낸다).

[0128] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작용적으로 결합된" 것이다. 예를 들면, 프로모터 또는 증강제는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 암호화 서열에 작용적으로 결합된다. 전사 조절 서열과 관련하여,

작용적으로 결합된다는 것은 결합되는 DNA 서열들이 접촉되어 있으며, 두 단백질 암호화 영역들을 연결시킬 필요가 있는 경우, 상기 서열들이 접촉되어 판독 틀에 존재함을 의미한다. 전환 서열의 경우, 작용적으로 결합된다는 것은 서열들이 전환 재조합을 수행할 수 있음을 나타낸다.

[0129] "벡터"란 용어는 결합된 또 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 말하는 것이다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"로, 이것은 추가의 DNA 단편이 접합될 수 있는 원형 이중 표준 DNA 루프를 말한다. 벡터의 또 다른 유형은 추가의 DNA 단편이 바이러스 계놈에 접합될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터들은 이들이 도입되는 숙주 세포에서 자율 복제될 수 있다(예를 들면, 세균성 복제 기점을 갖는 세균 벡터 및 에피좀 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들면, 비-에피좀 포유동물 벡터)도 숙주 세포에 도입될 때 숙주 세포의 계놈에 통합되어 숙주 계놈과 함께 복제될 수 있다. 또한, 특정 벡터들은 이들이 작용적으로 결합되는 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 그러한 벡터들은 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")로 지칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용성을 갖는 발현 벡터들은 종종 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 보편적으로 사용되는 벡터 형태이므로 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 등가의 기능을 제공하는, 바이러스 벡터(예를 들면, 복제 결손 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 발현 벡터의 상기 다른 형태를 포함한다.

[0130] "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")란 용어는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 말한다. 상기 용어는 특정 대상 세포뿐 아니라 상기 세포의 후대개체를 말하는 것으로 이해해야 한다. 세대를 이어가는데 돌연변이 또는 환경상의 영향으로 인해 특정 변형이 일어날 수 있으므로, 상기 후대개체는 사실상 모세포와 동일하지 않을 수도 있으나, 여전히 본원에 사용된 바와 같은 "숙주 세포"란 용어의 범위에 포함된다.

[0131] "소좌위 변형유전자(mini locus transgene)"란 용어는 천연 생식선 Ig 좌위에 비교하여 비-필수 DNA 부분(예를 들면, 삽입 서열; 인트론 또는 그의 부분)의 내부(즉, 부분의 말단에서가 아님) 결실을 하나 이상 갖는 계놈성 면역글로불린 좌위의 일부분을 포함하는 변형유전자를 말한다.

[0132] "표지"는 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 검출가능한 조성물이다. 예를 들면, 유용한 표지로는 ³²P, 형광 염료, 전자밀도가 높은 시약, 효소(예를 들면, ELISA에 통상적으로 사용되는 효소), 비오틴, 디고시게닌(digoxigenin) 또는 합텐, 및 그에 대한 항혈청 또는 단일클론 항체가 이용가능한 단백질이 포함된다(예를 들면, 본 발명의 폴리펩타이드는, 예를 들면, 웨타이드에 방사성표지를 혼입함으로써 검출가능하게 될 수 있으며, 웨타이드와 특이적으로 반응하는 항체를 검출하는데 이용될 수 있다).

[0133] 본원에 사용된 바와 같이, 세포와 관련하여 "선별(sorting)"이란 용어는, 예를 들면, 형광 활성화된 세포 선별 기를 이용하여 달성될 수 있는 바와 같은 세포의 물리적 선별, 및 세포 표면 마커의 발현을 기준으로 하는 세포 분석법, 예를 들면, 선별 부재하의 FACS 분석법 둘 다를 말하는 것이다.

[0134] "면역 세포 반응"이란 어구는 면역 세포 이동, 표적 세포의 치사, 탐식작용(phagocytosis), 항체 생성, 면역 반응의 기타 가용성 작동체 등을 야기하는 생화학적 변화를 면역 세포에서 유발하는 외부 또는 내부 자극(예를 들면, 항원, 사이토카인, 케모카인 및 기타 세포)에 대한 면역 시스템 세포의 반응을 말한다.

[0135] "T 림프구 반응" 및 "T 림프구 활성"이란 용어는 T 림프구에 의존하는 면역 반응(즉, T 림프구가 헬퍼, 세포독성 킬러 또는 억제제 T 림프구로 증식 및/또는 분화하는 것; 헬퍼 T 림프구에 의해 B 림프구에 항체 생성을 야기하거나 방해하는 신호가 제공되는 것; 세포독성 T 림프구에 의한 특정 표적 세포의 치사; 및 다른 면역 세포의 기능을 조절하는 사이토카인과 같은 가용성 인자들의 방출)의 성분을 말하기 위해 본원에서 교환적으로 사용된다.

[0136] "면역 반응"이란 용어는 침입 병원체, 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 암 세포, 또는 자가면역성 또는 병리학적 염증의 경우 정상 인간 세포 또는 조직에 선택적인 손상을 주거나 파괴하거나 인체로부터 이들을 제거하는, 상기 세포 또는 간에 의해 생성된 림프구, 항원 제시 세포, 탐식세포, 파립구 및 가용성 거대분자(항체, 사이토카인 및 상보체 포함)의 일치된 작용을 말한다.

[0137] 면역 반응의 성분들은 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 다양한 방법에 의해 시험관내에서 검출될 수 있다. 예를 들면, (1) 세포독성 T 림프구는 방사성으로 표지된 표적 세포와 함께 배양하고, 상기 표적 세포들의 용해는 방사능의 방출에 의해 검출할 수 있으며, (2) 헬퍼 T 림프구는 항원 및 항원 제시 세포와 함께 배양하고, 사이토카인의 합성 및 분비는 표준 방법(윈드하겐(Windhagen A) 등의 문헌[*Immunity*, 2(4):373-380, 1995])에 의해 측정할 수 있으며, (3) 항원 제시 세포는 전체 단백질 항원과 함께 배양하고, MHC 상의 항원의 제공은 T 림프구 활성화 분석 또는 생물물리학 방법(하딩(Harding) 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci.*,

86:4230-4234, 1989])에 의해 검출할 수 있으며, (4) 비만 세포는 그의 Fc-ε 수용체와 가교결합하는 시약과 함께 배양하고, 히스타민 방출은 효소 면역분석법(시라가니안(Siraganian) 등의 문헌[TIPS, 4:432-437, 1983])에 의해 측정할 수 있다.

[0138] 유사하게, 모델 유기체(예를 들면, 마우스) 또는 인간 환자에서 면역 반응의 산물은 또한 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 다양한 방법에 의해 검출할 수 있다. 예를 들면, (1) 백신 접종에 대한 항체의 생성은 임상 실험실에서 현재 사용되는 표준 방법, 예를 들면, ELISA에 의해 용이하게 검출할 수 있고; (2) 염증 부위로 면역 세포 이동하는 것은 피부 표면을 긁어 내어 멸균 용기에 담아 긁힌 부위 상에서 이동 세포를 포착 함으로써 검출할 수 있으며(피터스(Peters) 등의 문헌[Blood, 72:1310-1315, 1988]); (3) 미토겐 또는 혼합 림프구 반응에 대한 말초혈 단핵 세포의 증식은 ³H-티미딘을 사용하여 측정할 수 있고; (4) PBMC에서 과립구, 대식세포 및 기타 탐식세포의 탐식 능력은 PBMC를 표지된 입자들과 함께 웰에 놓음으로써 측정할 수 있고(상기 피터스 등의 문헌(1988) 참조); (5) 면역 시스템 세포의 분화는 CD4 및 CD8과 같은 CD 분자에 대한 항체로 PBMC를 표지하고 이를 마커를 발현하는 PBMC의 분획을 측정함으로써 측정할 수 있다.

[0139] 본원에 사용된 바와 같이, "신호 전달 경로" 또는 "신호 전달 사건"이란 어구는 세포와 자극 화합물 또는 자극 제와의 상호작용으로부터 야기되는 하나 이상의 생화학적 반응, 보다 일반적으로는 일련의 생화학 반응들을 말한다. 따라서, 자극 화합물과 세포와의 상호작용은 신호 전달 경로를 통해 전달되는 "신호"를 생성하여, 궁극적으로는 세포 반응, 예를 들면, 전술한 면역 반응을 야기한다.

[0140] 신호 전달 경로는 세포의 한 부분으로부터 세포의 또 다른 부분으로 신호를 전달하는데 한 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들간의 생화학적 관계를 말한다. 본 발명의 신호 전달 분자로는, 예를 들면, 본 발명의 MAb 147.1이 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이, "세포 표면 수용체"란 어구는 신호를 수용하고 상기 신호를 세포의 원형질막을 가로질러 전달할 수 있는 분자 및 분자의 복합체를 포함한다. 본 발명의 "세포 표면 수용체"의 한 예는 CTLA-4의 T 세포 수용체(TCR) 또는 B7 리간드이다.

[0141] 세포에서의 신호 전달 경로는 세포 내부 또는 외부의 자극제와 세포의 상호작용에 의해 개시될 수 있다. 외부(예를 들면, 세포의 외부) 자극제(예를 들면, 항원 제시 세포 상의 MHC-항원 복합체)가 세포 표면 수용체(예를 들면, T 세포 수용체)와 상호작용하는 경우, 신호 전달 경로는 세포막을 가로질러 세포의 세포질을 통해서 및 일부 경우에는 핵으로 신호를 전달할 수 있다. 내부(예를 들면, 세포의 내부) 자극제가 세포간 신호 전달 분자와 상호작용하는 경우, 신호 전달 경로는 세포의 세포질을 통해서 및 일부 경우에는 세포의 핵으로 신호를 전달할 수 있다.

[0142] 신호 전달은, 예를 들면, 분자의 포스포릴화; 비-공유 알로스테릭(allosteric) 상호작용; 분자들의 복합체화; 분자의 형태 변화; 칼슘 방출; 이노시톨 포스페이트 생성; 단백질분해성 분열; 환상 뉴클레오티드 생성 및 디아실글리세라이드 생성을 통해 일어날 수 있다. 전형적으로, 신호 전달은 신호 전달 분자를 포스포릴화시켜 일어난다.

[0143] "비특이적 T 세포 활성화"란 용어는 그의 항원 특이성과 무관한 T 세포의 자극을 말한다.

CTLA-4에 대한 인간 항체의 생성

[0145] 본 발명의 단일클론 항체(mAb) 및 인간 서열 항체는 통상적인 단일클론 항체 방법론, 예를 들면, 콜러 및 밀스테인(Kohler and Milstein)의 문헌[Nature, 256:495, 1975]의 표준 체세포 하이브리드화 기술을 포함한 다양한 기술에 의해 생성할 수 있다. 단일클론 항체를 생성하기 위한 임의의 기술, 예를 들면, B 텁프구의 바이러스 또는 종양유발성 형질전환을 이용할 수 있다. 하이브리도마를 제조하기 위한 한가지 동물 시스템은 쥐 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생성은 매우 잘 확립된 절차이다. 면역 프로토콜 및 융합을 위한 면역된 지라세포(splenocyte)의 분리 기술은 당해 분야에 공지되어 있다. 융합 상대(예를 들면, 쥐 골수종 세포) 및 융합 절차도 또한 공지되어 있다(예를 들면, 문헌 [Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, 1988] 참조).

[0146] 인간 CTLA-4에 대해 유도된 인간 단일클론 항체 및 인간 서열 항체는 마우스 시스템이 아닌 인간 면역 시스템을 갖는 유전자변형 마우스를 이용하여 생성할 수 있다. 본원에서 "HuMAb-마우스(등록상표)"로도 또한 지칭되는 상기 유전자변형 마우스는, 내인성 μ 및 κ 쇄 좌위를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께, 재배열되지 않은 인간 중쇄(μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열을 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자 소좌위를 함유한다(론버그(Lonberg, N.) 등의 문헌[Nature, 368(6474): 856-859, 1994]). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 나타내며, 면역을 위해 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 변형유전자는 부류 전환 및 체세포

돌연변이에 적용되어 고친화성 인간 IgG κ 단일클론을 생성한다(론버그 등의 문헌[Nature, 368(6474):856-859, 1994]; 론버그의 문헌[*Handbook of Experimental Pharmacology*, 113:49-101, 1994]; 론버그 및 허스자(Huszar, D.)의 문헌[*Intern. Rev. Immunol.*, Vol. 13:65-93, 1995]; 및 하딩 및 론버그의 문헌[*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 764:536-546, 1995] 참조). 유전자변형 마우스의 제조는 하기의 섹션 II 및 다음 문헌들에 상세히 기술되어 있다: 테일러(Taylor, L.) 등의 문헌[Nucleic Acids Research, 20:6287-6295, 1992]; 첸(Chen, J.) 등의 문헌[*International Immunology*, 5:647-565, 1993]; 투아일론(Tuallion) 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3720-3724, 1993]; 최(Choi) 등의 문헌[Nature Genetics, 4:117-123, 1993]; 첸 등의 문헌[*EMBO J.*, 12:821-830, 1993]; 투아일론 등의 문헌[J. Immunol., 152:2912-2920, 1994]; 론버그 등의 문헌[Nature, 368(6474):856-859, 1994]; 론버그의 문헌[*Handbook of Experimental Pharmacology*, 113:49-101, 1994]; 테일러 등의 문헌[*International Immunology*, 6:579-591, 1994]; 론버그와 허스자의 문헌[*Intern. Rev. Immunol.*, Vol. 13:65-93, 1995]; 하딩과 론버그의 문헌[*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 764:536-546, 1995]; 및 피시와일드(Fishwild, D.) 등의 문헌[Nature Biotechnology, 14:845-851, 1996] 참조). (또한, 론버그 및 케이(Kay), 및 젠팜 인터내셔널(GenPharm International)에 허여된 미국 특허 제 5,625,126 및 5,770,429 호; 수라니(Surani) 등의 미국 특허 제 5,545,807 호; 1998년 6월 11일 공개된 국제 공개공보 WO 98/24884 호; 1994년 11월 10일 공개된 WO 94/25585 호; 1993년 6월 24일 공개된 WO 93/1227 호; 1992년 12월 23일 공개된 WO 92/22645 호; 1992년 3월 19일 공개된 WO 92/03912 호 참조). 또는, 하기 실시예 1 및 2에 기술되어 있는 CMD 및 HCo12 변형유전자를 이용하여 인간 항-CTLA-4 항체를 생성할 수 있다.

[0147]

CTLA-4에 대한 완전 인간 단일클론 항체를 생성하기 위한 상세한 절차는 하기 실시예에 기술되어 있다. 다양한 항원에 의한 누적 실험은 유전자변형 마우스가 초기에 완전 프로인트 보조제 중의 항원으로 복강내(IP) 면역된 후 매주 불완전 프로인트 보조제 중의 항원으로 복강내(IP) 면역(총 6회까지)될 때 반응하는 것으로 나타났다. 그러나, 프로인트 보조제 이외의 다른 보조제도 또한 효과적인 것으로 나타난다. 또한, 보조제의 부재하에 전체 세포는 매우 면역원성인 것으로 나타난다. 면역 반응은 후안와(retroorbital) 출혈에 의해 수득되는 혈장 샘플을 이용한 면역 프로토콜의 과정에 걸쳐 관찰될 수 있다. 혈장은 ELISA(하기에 기술하는 바와 같음)에 의해 선별될 수 있으며, 충분한 역가의 항-CTLA-4 인간 면역글로불린을 갖는 마우스를 융합에 이용할 수 있다. 마우스는 죽여서 지라를 꺼내기 3일 전에 항원으로 정맥내에 증폭시킬 수 있다. 각각의 면역에 대해 2 내지 3회의 융합을 수행하는 것이 필요할 수 있다. 각 항원에 대해 전형적으로 6 내지 24마리의 마우스를 면역시킨다. 통상적으로 HCo7 및 HCo12 균주를 둘 다 사용한다. 또한, HCo7 및 HCo12 변형유전자를 둘 다 함께 2개의 상이한 인간 중쇄 변형유전자를 갖는 단일 마우스로 융종시킬 수 있다.

[0148]

인간 항-CTLA-4 항체를 정제하기 위해, 선별된 하이브리도마를 단일클론 항체 정제용의 2 ℓ 희전-플라스크에서 성장시킬 수 있다. 상등액을 여과시키고 농축한 후 단백질 A-세파로즈(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 파마시아(Pharmacia))로 친화성 크로마토그래피할 수 있다. 용출된 IgG를 웰 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피로 조사하여 순도를 보장할 수 있다. 완충액은 PBS로 교환할 수 있으며, 농도는 1.43 흡광 계수를 이용하여 OD280에 의해 측정할 수 있다. 단일클론 항체를 분취하여 -80 °C에서 저장할 수 있다.

[0149]

선택된 인간 항-CTLA-4 단일클론 항체가 단일 에피토프에 결합하는지를 측정하기 위해, 각 항체를 상업적으로 시판하는 시약(미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스(Pierce))을 사용하여 비오틴화시킬 수 있다. 비표지된 단일클론 항체 및 비오틴화 단일클론 항체를 이용하는 경쟁성 연구는 전술한 바와 같은 CTLA-4 코팅된 ELISA 플레이트를 이용하여 수행할 수 있다. 비오틴화 MAb 결합은 스트렙-아비딘-알칼리 포스파타제 프로브로 검출할 수 있다.

[0150]

정제한 항체의 동종형을 결정하기 위해, 동종형 ELISA를 수행할 수 있다. 마이크로 플레이트(microtiter plate)의 웰을 4 °C에서 밤새 1 µg/ml의 항-인간 IgG로 코팅할 수 있다. 1% BSA로 차단한 후에, 플레이트를 1 µg/ml 이하의 단일클론 항체 또는 정제된 동종형 대조용과 주위 온도에서 1 내지 2 시간동안 반응시킨다. 이어서, 웰을 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이적 알칼리 포스파타제-결합 프로브와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 전개시키고 전술한 바와 같이 분석한다.

[0151]

CTLA-4를 발현하는 살아있는 세포에 대한 단일클론 항체의 결합을 입증하기 위해, 유동세포측정법을 이용할 수 있다. 간략하게, CTLA-4를 발현하는 세포주(표준 성장 조건하에서 성장시킨)를 0.1% BSA 및 10% 테아 소 혈청을 함유하는 PBS 중의 다양한 농도의 단일클론 항체와 혼합하고 37 °C에서 1 시간동안 배양한다. 세척한 후에, 세포를 1차 항체 염색과 동일한 조건하에서 플루오레신(Fluorescein)-표지된 항-인간 IgG 항체와 반응시킨다. 샘플을 단일 세포 상의 게이트에 대한 광 산란성 및 측면 산란성을 이용하여 FACSscan 기기로 분석할 수 있다. (유동세포측정 분석법 이외에 또는 그 대신에) 형광 현미경을 이용하는 대안적인 분석법도 이용할 수 있다. 세

포를 전술한 바와 같이 정확하게 염색하고 형광 현미경으로 검사할 수 있다. 상기 방법은 개별적 세포들을 가시화할 수 있지만, 항원 밀도에 따라 감소되는 민감도를 가질 수 있다.

[0152] 항-CTLA-4 인간 IgG는 또한 웨스턴 블로팅(Western blotting)에 의해 CTLA-4 항원과의 반응성에 대해 시험될 수 있다. 간략하게, CTLA-4를 발현하는 세포로부터 세포 추출물을 제조하고 나트륨 도데실 살레이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 적용할 수 있다. 전기영동 후에, 분리한 항원을 니트로셀룰로즈 막으로 옮기고, 10% 소태아 혈청으로 차단하고, 시험할 단일클론 항체로 탐색한다. 인간 IgG 결합은 항-인간 IgG 알칼리 포스파타제를 이용하여 검출할 수 있으며 BCIP/NBT 기질 정제(미저리주 세인트 루이스 소재의 시그마 케미칼 캄파니(Sigma Chem. Co.))로 전개시킬 수 있다.

인간 단일클론 항-CTLA-4 항체를 생성하는 인간을 제외한 유전자변형 동물의 제작

[0153] 본 발명은 또한 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체를 발현시킬 수 있는 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스를 제공한다. 고친화성 인간 서열 항체도 또한 제공된다. 일부 인간을 제외한 유전자변형 동물, 예를 들면, 유전자변형 마우스는 인간 중쇄 변형유전자 및 경쇄 변형유전자를 포함하는 게놈을 갖는다. 일부 인간을 제외한 유전자변형 동물은 CTLA-4 항원 및/또는 CTLA-4를 발현하는 세포의 정제되거나 강화된 제제로 면역된다. 일부 인간을 제외한 유전자변형 동물은 V-D-J 재조합 및 동종형 전환에 적용됨으로서 CTLA-4에 대한 인간 단일클론 항체의 다중 동종형(예를 들면, IgG, IgA 및/또는 IgE)을 생성할 수 있다. 동종형 전환은, 예를 들면, 전형적 또는 비전형적 동종형 전환에 의해 일어날 수 있다.

[0154] [0155] 이종 항체 레퍼토리를 갖는 외래 항원 자극에 반응하는 인간을 제외한 유전자변형 동물의 설계는 유전자변형 동물 내에 함유된 이종 면역글로불린 변형유전자가 정확하게 B-세포 발생 경로 전체에 걸쳐 작용할 것을 요한다. 일부 마우스에서, 이종 중쇄 변형유전자의 정확한 기능은 동종형 전환을 포함한다. 따라서, 본 발명의 변형유전자는 동종형 전환 및 다음 중 하나 이상을 달성하도록 구성된다: (1) 높은 수준 및 세포-유형 특이적 발현, (2) 작용성 유전자의 재배열, (3) 대립유전자 배제 활성화 및 그에 대한 반응, (4) 충분한 1차 레퍼토리의 발현, (5) 신호 전달, (6) 체세포 과돌연변이, 및 (7) 면역 반응 동안의 유전자변형 항체 좌위의 우세함.

[0156] [0157] 상기 기준 모두가 충족될 필요는 없다. 예를 들면, 유전자변형 동물의 내인성 면역글로불린 좌위가 기능적으로 파괴된 유전자변형 동물에서, 변형유전자는 대립유전자 배제를 활성화시킬 필요가 없다. 또한, 변형유전자가 기능적으로 재배열된 중쇄 및/또는 경쇄 면역글로불린 유전자를 포함하는 유전자변형 동물에서, 작용성 유전자 재배열의 두 번째 기준은 적어도 이미 재배열된 변형유전자에 대해서는 불필요하다. 문자 면역학의 배경에 대해서는, 예를 들면, 문헌 [Fundamental Immunology, 4th edition, Paul, William E., ed., Lippencott-Raven Press, N.Y., 1998]을 참조하시오.

본 발명의 인간 단일클론 항체를 생성하기 위해 사용된 인간을 제외한 유전자변형 동물의 일부는 유전자변형 동물의 생식선에 재배열된 이종 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 변형유전자, 또는 재배열되지 않은 상기 변형유전자, 또는 재배열된 이종 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 변형유전자와 재배열되지 않은 상기 변형유전자의 혼합물을 함유한다. 중쇄 변형유전자는 각각 하나 이상의 CH 유전자를 포함한다. 또한, 중쇄 변형유전자는 유전자변형 동물의 B-세포에서 다중 CH 유전자를 암호화하는 이종 변형유전자의 동종형 전환을 지지할 수 있는 작용성 동종형 전환 서열을 함유할 수 있다. 상기 전환 서열은 유전자변형 CH 유전자의 공급원으로 작용하는 종으로부터의 생식선 면역글로불린 좌위에 친연적으로 존재하는 서열들일 수 있거나, 또는 상기 전환 서열은 유전자변형 구조체(유전자변형 동물)을 수용하기 위한 종에 존재하는 서열들로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, 유전자변형 마우스를 생성하기 위해 사용되는 인간 유전자변형 구조체는, 아마도 마우스 전환 서열은 마우스 전환 리콤비나제 효소 시스템에 의해 작용하도록 최적화되는 반면 인간 전환 서열은 그렇지 않기 때문에, 마우스 중쇄 좌위에 친연적으로 존재하는 서열과 유사한 전환 서열을 혼입하는 경우 보다 높은 빈도의 동종형 전환을 야기할 수 있다. 전환 서열은 통상적인 클로닝 방법에 의해 분리하고 클로닝할 수 있거나, 또는 면역글로불린 전환 영역 서열에 관한 공개된 서열 정보를 근거로 하여 설계된 중복 합성 올리고뉴클레오티드로부터 신생적으로 합성될 수 있다(밀스(Mills) 등의 문헌[Nucl. Acids Res., 15:7305-7316, 1991]; 사이드러스(Sideras) 등의 문헌[Intl. Immunol., 1:631-642, 1989]).

[0158] 전술한 유전자변형 동물 각각에 대해, 기능적으로 재배열된 이종 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 변형유전자는 유전자변형 동물의 B-세포의 상당한 분획(적어도 10%)에서 발견된다.

[0159] 본 발명의 유전자변형 동물을 생성하기 위해 사용된 변형유전자는 하나 이상의 가변성 유전자 단편, 하나의 다양성 유전자 단편, 하나의 연결 유전자 단편 및 하나 이상의 불변 영역 유전자 단편을 암호화하는 DNA를 포함하

는 중쇄 변형유전자를 포함한다. 면역글로불린 경쇄 변형유자는 하나 이상의 가변성 유전자 단편, 하나의 연결 유전자 단편 및 하나 이상의 불변 영역 유전자 단편을 암호화하는 DNA를 포함한다. 경쇄 및 중쇄 유전자 단편들을 암호화하는 유전자 단편들은, 이들이 인간을 제외한 유전자변형 동물로 이루어지지 않은 종으로부터의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자 단편을 암호화하는 DNA로부터 유도되거나 이에 상응하다는 점에서 인간을 제외한 유전자변형 동물과 이종이다. 본 발명의 한 태양에서, 변형유자는 개별적 유전자 단편들이 작용성 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄를 암호화하기 위해 비재배열되도록, 즉, 재배열되지 않도록 구성된다. 상기 재배열되지 않은 변형유자는 V, D 및 J 유전자 단편들의 재조합(작용성 재배열)을 지지하며, 바람직하게는 CTLA-4에 노출될 때 인간을 제외한 유전자변형 동물 내의 생성된 재배열된 면역글로불린 중쇄 중 D 영역 유전자 단편의 전부 또는 일부의 혼입을 지지한다.

[0160] 상기 변형유자들은 전형적으로 C, D 및 J 단편들의 충분한 부분 뿐 아니라 V 유전자 단편의 아형을 포함한다. 상기 유전자변형 구조체들에서, 다양한 조절 서열들, 예를 들면, 촉진제, 증강제, 부류 전환 영역, RNA 공정에 대한 접합-공여체 및 접합-수용체 서열, 재조합 신호 등은 외종 DNA로부터 유도된 상응하는 서열을 포함한다. 상기 조절 서열들은 본 발명에 사용된 인간을 제외한 동물 종과 동일하거나 관련된 종으로부터의 변형유전자 중에 혼입될 수 있다. 예를 들면, 인간 면역글로불린 유전자 단편은 변형유전자 중에서 유전자변형 마우스에 사용하기 위한 설치류 면역글로불린 증강제 서열과 결합될 수 있다. 또는, 합성 조절 서열을 변형유전자에 혼입할 수 있는데, 이때 상기 합성 조절 서열은 포유동물의 게놈에 천연적으로 존재하는 것으로 알려진 작용성 DNA 서열과 상동성이 아니다. 합성 조절 서열은, 예를 들면, 접합-수용체 부위 또는 촉진제/증강제 모티프의 허용되는 서열을 규정하는 규칙과 같은 일치하는 규칙에 따라 설계된다. 변형유자는 소좌위를 포함할 수 있다.

[0161] CTLA-4에 대한 인간 항체를 생성하기 위해 사용된 일부 유전자변형 동물은 미국 특허 제 5,770,429 호의 실시예 37에 기술된 변형유전자, 또는 하기의 실시예 2에 기술된 변형유전자(예를 들면, HCo12)의 복제물 하나 이상, 전형적으로는 2 내지 10개, 때때로 25 내지 50개 이상; 미국 특허 제 5,770,429 호의 실시예 38에 기술된 경쇄 변형유전자의 복제물 하나 이상; 하기 실시예 1에 기술된 Cmu 결실 복제물 2개; 및 미국 특허 제 5,770,429 호의 실시예 9에 기술된 J_k 결실 복제물 2개를 함유한다. 생성된 동물에는 항원을 주입하고 상기 항원들에 대한 인간 단일클론 항체를 생성하기 위해 이용한다.

[0162] 일부 유전자변형 동물들은 이상적으로는 천연 마우스와 실질적으로 유사한 상당한 레퍼토리를 갖는 면역글로불린 생성물을 나타낸다. 따라서, 예를 들면, 내인성 Ig 유전자가 불활성화된 동물에서, 전체 면역글로불린 수준은 혈청의 약 0.1 내지 약 10 mg/ml의 범위이다.

[0163] 유전자변형 마우스에 의해 발현된 면역글로불린은 전형적으로 매우 항원성인 단백질, 예를 들면, 스타필로코커스(staphylococcus) 단백질 A의 대략 절반 이상을 인지한다. 전형적으로, 면역글로불린은 미리 선별된 항원들에 대해 적어도 약 10^7 M⁻¹, 10^8 M⁻¹, 10^9 M⁻¹, 10^{10} M⁻¹, 10^{11} M⁻¹, 10^{12} M⁻¹, 10^{13} M⁻¹, 또는 그 이상의 결합 상수를 나타낸다.

[0164] 본 발명의 유전자변형 마우스는 앞에서 기술한 바와 같이 인간 CTLA-4 항원(또는 그의 항원성 절편) 및/또는 인간 CTLA-4를 발현하는 세포의 정제되거나 강화된 제제로 면역될 수 있다. 마우스는 변형유전자간 전환 재조합을 거쳐 부류-전환(시스-전환)되며 CTLA-4와 반응성인 면역글로불린을 발현시키는 B 세포를 생성한다. 면역글로불린은, 체세포 돌연변이 및 V 영역 재조합 접합에 의해 유도된 서열 및 생식선 암호화된 서열을 포함할 수 있는 인간 변형유전자 서열에 의해 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드가 암호화되는 인간 서열 항체일 수 있으며; 이들 인간 서열 면역글로불린은, 다른 비-생식선 서열이 체세포 돌연변이 및 분화성 V-J 및 V-D-J 재조합 접합의 결과로서 존재할 수 있을 지라도, 인간 VL 또는 VH 유전자 단편 및 인간 JL 또는 JH 단편에 의해 암호화된 폴리펩타이드 서열과 실질적으로 동일하다고 할 수 있다. 상기 인간 서열 항체와 관련하여, 각 쇄의 가변 영역들은 전형적으로 인간 생식선 V, J, 및 중쇄의 경우 D 유전자 단편들에 의해 80% 이상 암호화되며; 흔히 가변 영역들의 85% 이상이 변형유전자 상에 존재하는 인간 생식선 서열에 의해 암호화되며; 종종 가변 영역 서열의 90 또는 95% 이상이 변형유전자 상에 존재하는 인간 생식선 서열에 의해 암호화된다. 그러나, 체세포 돌연변이 및 VJ 및 VDJ 접합에 의해 비-생식선 서열이 도입되기 때문에, 인간 서열 항체들은 흔히 마우스의 생식선에서의 인간 변형유전자(들)에서 발견되는 바와 같은 인간 V, D 또는 J 유전자 단편들에 의해 암호화되지 않는 일부의 가변 영역 서열(및 덜 흔히는 불변 영역 서열)을 갖는다. 전형적으로, 상기 비-생식선 서열들(또는 개별적인 뉴클레오티드 위치)은 CDR에 또는 CDR 부근에, 또는 체세포 돌연변이가 밀집하는 것으로 알려진 영역에서 밀집한다.

[0165] 예정된 항원에 결합하는 인간 서열 항체들은 동종형 전환으로부터 생성되므로, 인간 서열 γ 쇄(예를 들면, γ 1, γ 2, γ 3 또는 γ 4) 및 인간 서열 경쇄(예를 들면, κ 또는 λ)를 포함하는 인간 항체가 생성된다. 상기 동

종형-전환된 인간 서열 항체들은 종종, 특히는 2차(또는 후속) 항원 자극에 이어 항원에 의한 B 세포의 친화성 돌연변이 및 선별의 결과로서 전형적으로는 가변 영역에 및 종종 CDR의 약 10개 잔기 중에 또는 잔기 내에, 하나 이상의 체세포 돌연변이(들)을 함유한다. 일부 고친화성 인간 서열 항체들은 적어도 약 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 또는 적어도 약 $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, 또는 약 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상, 또는 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 내지 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 또는 그 이상의 평형 결합 상수를 갖는다.

[0166] 본 발명의 또 다른 태양은 높은 친화도(예를 들면, 10^7 M^{-1} 보다 큰 결합 상수)하에 CTLA-4에 결합하는 인간 단일 클론 항체를 발현시키는 하이브리도마를 생성하기 위해 사용될 수 있는 마우스로부터 얻은 B 세포에 관한 것이다. 이들 하이브리도마는 CTLA-4에 결합하는데 10^7 M^{-1} 이상의 결합 상수(K_a)를 갖는 면역글로불린을 포함하는 조성물을 생성하기 위해 이용된다. 상기 면역글로불린은, 인간 V_K 또는 V_L 유전자 단편 및 인간 J_K 또는 J_L 단편에 의해 암호화된 폴리펩타이드 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 인간 C_K 또는 C_L 유전자 단편에 의해 암호화된 폴리펩타이드 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 경쇄 불변 영역으로 이루어진 인간 서열 경쇄를 함유한다. 상기 면역글로불린은 또한 인간 VH 유전자 단편, 임의로 D 영역 및 인간 JH 단편에 의해 암호화된 폴리펩타이드 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 인간 CH 유전자 단편에 의해 암호화된 폴리펩타이드 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 불변 영역으로 이루어진 인간 서열 중쇄를 함유한다.

[0167] 본 발명은 또한 유도체화되거나 또는 다른 작용성 분자, 예를 들면, 다중 결합 부위 또는 표적 에피토프에 결합하는 이중특이성 또는 다중특이성 분자를 생성하기 위한 또 다른 웨타이드 또는 단백질(예를 들면, 전술한 바와 같이, 사이토카인, 세포독성제, 면역 자극제 또는 억제제, Fab 절편 등)에 결합된 인간 CTLA-4에 대한 인간 단일클론 항체 및 인간 서열 항체를 제공한다. 예를 들면, 본 발명의 항체 도는 항원-결합 부분은 기능적으로 하나 이상의 다른 결합 분자, 예를 들면, 또 다른 항체, 항체 절편, 웨타이드 또는 결합 모방체에 결합될 수 있다(예를 들면, 화학적 커플링, 유전학적 융합, 비공유 결합 등에 의해).

[0168] 따라서, 본 발명은 인간 CTLA-4에 대한 제 1 결합 특이성 및 제 2 표적 에피토프에 대한 제 2 결합 특이성을 갖는 하나 이상의 인간 서열 항체 또는 항원 결합 절편을 포함하는 이중특이성 및 다중특이성 조성물을 포함한다. 제 2의 표적 에피토프는 Fc 수용체, 예를 들면, 인간 $Fc\gamma RI$ 또는 인간 $Rc\gamma$ 수용체일 수 있다. 그러므로, 본 발명은 $Fc\gamma R1$, $Fc\gamma R$ 또는 $Rc\gamma R$ 발현 작동체 세포(예를 들면, 단핵구, 대식세포 또는 다형핵 세포(PMN))에, 및 인간 CTLA-4를 발현하는 표적 세포에 둘 다 결합할 수 있는 이중특이성 및 다중특이성 분자를 포함한다. 이들 다중특이성(예를 들면, 이중특이성 또는 다중특이성) 분자들은 작동체 세포에 대해 인간 CTLA-4 발현 세포를 표적으로 하며, 인간 CTLA-4 발현 세포의 탐식작용, 항체 의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC), 사이토카인 방출 또는 초과산화물 음이온의 생성과 같은 Fc 수용체-매개된 작동체 세포 활성을 유발한다.

[0169] 본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자는, 하나 이상의 항체, 또는 예를 들면, Fab, Fab' , $F(ab')_2$, Fv 또는 단일쇄 Fv를 포함하여 그의 항체 절편에 대한 결합 특이성을 포함할 수 있다. 항체는 또한 경쇄 또는 중쇄 이량체, 또는 그의 임의의 최소 절편, 예를 들면, Fv 또는 라드너(Ladner) 등의 미국 특허 제 4,946,778 호에 기술된 바와 같은 단일쇄 구조체일 수 있다. 본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자는 $Fc\gamma R$ 또는 작동체 세포의 표면상에 존재하는 $Fc\gamma R$ 에 대한 결합 특이성, 및 표적 세포 항원, 예를 들면, 인간 CTLA-4에 대한 제 2 결합 특이성을 포함할 수 있다.

[0170] Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 그 결합이 인간 면역글로불린 G(IgG)에 의해 차단되지 않는 단일클론 항체에 의해 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, "IgG 수용체"란 용어는 염색체 1 상에 위치하는 8개의 γ -쇄 유전자들 중 임의 유전자를 말한다. 이들 유전자는 3개의 $Fc\gamma$ 수용체 부류: $FcRI(CD64)$, $Fc\gamma II(CD32)$ 및 $Fc\gamma RIII(CD16)$ 으로 분류되는 총 12개의 막투과 또는 가용성 수용체 이형체를 암호화한다. 예를 들면, $Fc\gamma$ 수용체는 고친화성 인간 $Fc\gamma RI$ 일 수 있다. 인간 $Fc\gamma RI$ 은 단량체성 IgG에 대해 높은 친화도(10^8 내지 10^9 M^{-1})를 나타내는 72 kDa의 분자이다.

[0171] 이들 바람직한 단일클론 항체의 생성 및 특성화는 팍거(Fanger) 등의 PCT 출원 WO 88/00052 호 및 미국 특허 제 4,954,617 호에 기술되어 있다. 이들 항체는 수용체의 $Fc\gamma$ 결합 부위와 다른 부위에서 $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ 또는 $Fc\gamma RIII$ 의 에피토프에 결합하므로, 그의 결합은 실질적으로 생리적 수준의 IgG에 의해 차단되지 않는다. 본 발명에 유용한 특이적 항- $Fc\gamma RI$ 항체는 MAb 22, MAb 32, MAb 44, MAb 62 및 MAb 197이다. MAb 32를 생성하는 하이브리도마는 미국 종균 협회(American Type Culture Collection)에서 ATCC 접수 번호 HB9469호로 입수 가능

하다. 항-Fc γ RI MAb 22 및 MAb 22의 F(ab')₂ 절편은 메다렉스, 인코포레이티드(Medarex, Inc.)(미국 뉴저지주 아난데일 소재)에서 수득할 수 있다. 다른 태양에서, 항-Fc γ 수용체 항체는 단일클론 항체 22(H22)로부터 인간화된다. H22 항체의 생성 및 특성화는 그라지아노(Graziano)의 문헌[J. Immunol., 155:4996-5002, 1995] 및 PCT/US93/10384 호에 기술되어 있다. H22 항체 생성 세포주는 1992년 11월 4일자로 미국 종균 협회에 HA022CL1의 명칭으로 기탁되었으며 CRL 11177의 접수 번호를 갖는다.

[0172] Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 또한 인간 IgA 수용체, 예를 들면, Fc- α 수용체(Fc α R(CD89))에 결합하는 항체에 의해 제공될 수 있다. 바람직하게는, 항체는 내인성 IgA에 의해 차단되지 않는 부위에서 인간 IgA 수용체에 결합한다. "IgA 수용체"란 용어는 염색체 19 상에 위치한 하나의 α -유전자(Fc α RI)의 유전자 생성물을 포함하는 것이다. 상기 유전자는 55 내지 110 kDa의 여러 대안적으로 접합된 막투과 이형체를 암호화하는 것으로 알려져 있다. Fc α RI(CD89)은 단핵구/대식세포, 호산성 및 호중성 과립구 상에서 구조적으로 발현되지만, 비-작동체 세포 집단 상에서는 발현되지 않는다. Fc α RI은 IgA1 및 IgA2 둘 다에 대해 중간 정도의 친화도(약 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)를 가지며, 상기 친화도는 G-CSF 또는 GM-CSF와 같은 사이토카인에 노출시 증가된다(모튼(Morton)의 문헌[Critical Reviews in Immunology, 16:423-440, 1996]). A3, A59, A62 및 A77로 동정된, IgA 리간드 결합 영역 외에서 Fc α RI과 결합하는 4개의 Fc α RI-특이적 단일클론 항체는, 예를 들면, 몬테이로(Monteiro)(문헌[J. Immunol., 148:1764, 1992])에 의해 기술되었다.

[0173] 본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자는 또한 표적 세포 항원, 예를 들면, 인간 CTLA-4를 인지하는, 예를 들면, 그에 결합하는 결합 특이성을 포함할 수 있다. 결합 특이성은 본 발명의 인간 서열 항체 또는 인간 단일클론 항체에 의해 제공된다.

[0174] 본원에 사용된 바와 같이 "작동체 세포 특이적 항체"란 작동체 세포의 Fc 수용체에 결합하는 항체 또는 작용성 항체 절편을 말한다. 본 발명에 사용하기에 바람직한 항체는 내인성 면역글로불린이 결합하지 않는 부위에서 작동체 세포의 Fc 수용체에 결합한다.

[0175] 본원에서 사용된 바와 같이, "작동체 세포"란 용어는 면역 반응의 인지 및 활성화 상에 대향될 때, 면역 반응의 작동체 상에 포함되는 면역 세포를 말한다. 전형적인 면역 세포로는 골수 또는 림프계로부터 유래된 세포, 예를 들면, 림프구(예를 들어, 세포용해성 T 세포(CTL)를 포함하는 B 세포 및 T 세포), 킬러 세포, 천연 킬러 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 호중구, 다형핵 세포, 과립구, 비만 세포 및 호염기구가 포함된다. 작동체 세포는 특이적 Fc 수용체를 발현시키며, 특이적 면역 작용을 수행한다. 작동체 세포는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC), 예를 들면, ADCC를 유도할 수 있는 호중구를 유도할 수 있다. 예를 들면, Fc α R을 발현시키는 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구 및 림프구가 표적 세포를 특이적으로 치사시키고 면역 시스템의 다른 성분들에 항원을 제공하거나, 또는 항원을 제공하는 세포에 결합하는데 수반된다. 작동체 세포는 또한 표적 항원, 표적 세포 또는 미생물을 탐식할 수 있다.

[0176] 작동체 세포 상에서의 특정 FcR의 발현은 사이토카인과 같은 체액성 인자에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, Fc γ RI의 발현은 인터페론 갑마(IFN- γ)에 의해 상향조절되는 것으로 밝혀졌다. 상기 증대된 발현은 표적 세포에 대한 Fc γ RI-함유 세포에 의한 세포독성 활성(예를 들면, 탐식작용 포함)을 증가시킨다.

[0177] "표적 세포"는 조성물(예를 들면, 본 발명의 인간 서열 항체 또는 인간 단일클론 항체, 본 발명의 이중특이성 또는 다중특이성 분자)에 의해 표적화될 수 있는 대상(예를 들면, 인간 또는 동물)에서의 임의의 바람직하지 않은 세포를 의미한다. 표적 세포는 인간 CTLA-4를 발현 또는 과발현시키는 세포일 수 있다. 인간 CTLA-4를 발현시키는 세포에는 종양 세포, 예를 들면, 림프종이 포함될 수 있다.

[0178] 본 발명의 인간 서열 항체 및 인간 단일클론 항체 이외에, 예를 들면, 쥐, 키메라성 및 인간화된 단일클론 항체를 포함하여, 다른 항체들도 또한 본 발명의 이중특이성 또는 다중특이성 분자에 사용할 수 있다.

[0179] 키메라성 마우스-인간 단일클론 항체(즉, 키메라성 항체)는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 생성할 수 있다. 예를 들면, 쥐(또는 기타 종) 단일클론 항체 분자의 Fc 불변 영역을 암호화하는 유전자는 제한 효소로 절단되어 쥐 Fc를 암호화하는 영역을 제거하고, 인간 Fc 불변 영역을 암호화하는 유전자의 등가의 부분을 치환시킨다(예를 들면, 로빈슨(Robinson) 등의 국제 특허 공개공보 PCT/US86/02269 호; 아키라(Akira) 등의 유럽 특허출원 제 184,187 호; 타니구치(Taniguchi, M.)의 유럽 특허출원 제 171,496 호; 모리슨(Morrison) 등의 유럽 특허출원 제 173,494 호; 뉴베르거(Neuberger) 등의 국제 출원 WO 86/01533 호; 카빌리(Cabilly) 등의 미국 특허 제 4,816,567 호; 카빌리 등의 유럽 특허출원 제 125,023 호; 베터(Better)의 문헌[Science, 240:1041-1043, 1988]; 리우(Liu) 등의 문헌[PNAS, 84:3439-3443, 1987]; 리우의 문헌[J. Immunol., 139:3521-3526,

1987]; 선(Sun)의 문헌[*PNAS*, **84**:214-218, 1987]; 니시무라(Nishimura)의 문헌[*Canc. Res.*, **47**:999-1005, 1987]; 우드(Wood)의 문헌[*Nature*, **314**:446-449, 1985]; 쇼(Shaw)의 문헌[*J. Natl. Cancer Inst.*, **80**:1553-1559, 1988]을 참조하시오).

[0180]

키메라성 항체는 또한 항원 결합에 직접 수반되지 않는 Fv 가변 영역의 서열을 인간 Fv 가변 영역으로부터의 등가의 서열로 치환시킴으로써 인간화시킬 수 있다. 인간화된 키메라성 항체에 대한 일반적인 고찰은 모리슨(Morrison)의 문헌[*Science*, **229**:1202-1207, 1985] 및 오이(Oi)의 문헌[*BioTechniques*, **4**:214, 1986]에 제공되어 있다. 상기 방법으로는 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄로부터 면역글로불린 Fv 가변 영역의 전부 또는 일부를 암호화하는 핵산 서열을 분리하고, 조작하고, 발현시킴을 포함한다. 상기 핵산의 공급원은 당해 분야에 숙련된 자에게 공지되어 있으며, 예를 들면, 7E3, 항-GPII_bIII_a 항체 생성 하이브리도마로부터 수득할 수 있다. 이어서, 키메라성 항체를 암호화하는 재조합 DNA 또는 그의 절편을 적절한 발현 벡터에 클로닝시킬 수 있다. 적합한 인간화된 항체는 대안적으로 CDR 치환에 의해 생성될 수 있다(미국 특허 제 5,229,539 호; 존스(Jones)의 문헌[*Nature*, **321**:552-525, 1986]; 베르흐얀(Verhoeven) 등의 문헌[*Science*, **239**:1534, 1988]; 및 베이들러(Beidler)의 문헌[*J. Immunol.*, **141**:4053-4060, 1988] 참조).

[0181]

특정 인간 항체의 CDR 전부를 비-인간 CDR의 적어도 일부분으로 치환시킬 수 있거나 또는 CDR의 일부만을 비-인간 CDR로 치환할 수 있다. 인간화된 항체를 Fc 수용체에 결합시키기 위해 필요한 수만큼의 CDR을 치환시킬 필요가 있다. 항체는 인간 항체의 CDR의 적어도 일부분을 비-인간 항체로부터 유도된 CDR로 치환시킬 수 있는 임의의 방법에 의해 인간화될 수 있다. 원터(Winter)는 본 발명의 인간화된 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있는 방법을 기술하였다(1987년 3월 26일자로 출원된 영국 특허출원 GB 2188638A 호를 참조하시오). 인간 CDR은, 예를 들면, WO 94/10332 호(발명의 명칭: Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytes)에 기술된 바와 같이 올리고뉴클레오티드 부위-유도된 돌연변이유발을 이용하여 비-인간 CDR로 치환될 수 있다.

[0182]

특정 아미노산이 치환되거나 결실되거나 부가된 키메라성 항체 및 인간화된 항체는 또한 본 발명의 범위에 속한다. 예를 들면, 인간화된 항체는 골격 영역에 아미노산 치환을 가진 항원에 대한 결합을 개선시킬 수 있다. 마우스 CDR을 갖는 인간화된 항체에서, 인간 골격 영역에 위치하는 아미노산들은 마우스 항체 중의 상응하는 위치에 위치하는 아미노산으로 치환될 수 있다. 상기 치환은 일부 경우에서 항원에 대한 인간화된 항체의 결합을 개선하는 것으로 알려져 있다. 아미노산이 부가되거나 결실되거나 치환된 항체는 본원에서 변형된 항체 또는 변이된 항체로 지칭한다.

[0183]

본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자들은 또한 항-Fc 결합 특이성 및 항-인간 CTLA-4 결합 특이성 이외에, 제 3의 결합 특이성을 포함할 수 있다. 제 3의 결합 특이성은 항-증강 인자(EP) 부분, 예를 들면, 세포독성 활성에 수반된 표면 단백질에 결합하여 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 분자일 수 있다. "항-증강 인자 부분"은 주어진 분자, 예를 들면, 항원 또는 수용체에 결합하여 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 대한 결합 결정인자의 효과를 증대시키는 항체, 작용성 항체 절편 또는 리간드일 수 있다. "항-증강 인자 부분"은 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 결합할 수 있다. 또는, 항-증강 인자 부분은 제 1 및 제 2 결합 특이성이 결합하는 것과 상이한 존재에 결합할 수 있다. 예를 들면, 항-증강 인자 부분은, 예를 들면, 표적 세포에 대한 증가된 면역 반응에 수반되는 CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 또는 기타 면역 세포 분자에 의해 세포독성 T-세포에 결합할 수 있다.

[0184]

본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자는 화학적 기술(예를 들면, 크란츠(Kranz)의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:5807, 1981] 참조), "폴리도마(polydoma)" 기술(예를 들면, 미국 특허 제 4,474,893 호 참조), 또는 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자는 또한 당해 분야에 공지되고 본원에 기술된 바와 같은 방법들을 이용하여, 구성성분 결합 특이성, 예를 들면, 항-FcR 및 항-인간 CTLA-4 결합 특이성을 결합시킴으로써 제조할 수 있다. 예를 들면, 이중특이성 및 다중특이성 분자의 각각의 결합 특이성은 별도로 생성된 다음 서로 결합될 수 있다. 결합 특이성이 단백질 또는 웨타이드인 경우, 다양한 커플링제 또는 가교결합제을 공유 결합에 사용할 수 있다. 가교결합제의 예로는 단백질 A, 카보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틴-티오아세테이트(SATA), N-숙신이미딜-3-(2-파리딜디티오)프로파오네이트(SPDP) 및 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-SMCC)가 포함된다(예를 들면, 카포브스키(Kapovsky)의 문헌[*J. Exp. Med.*, **160**: 1686, 1984]; 리우의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:8648, 1985] 참조). 다른 방법으로는 파울러스(Paulus)의 문헌[*Behring Ins. Mitt.*, No. 78, 118-132, 1985]; 브레난(Brennan)의 문헌[*Science*, **229**:81-83, 1985]; 글렌니(Glennie)의 문헌[*J. Immunol.*, **139**:2367-2375, 198

7]에 기술된 방법들이 포함된다. 다른 결합체는 SATA 및 설포-SMCC이며, 이들은 둘 다 미국 일리노이주 록포드 소재의 피어스 케미칼 컴파니(Pierce Chemical Co.)에서 시판한다.

[0185] 결합 특이성이 항체(예를 들면, 2개의 인간화된 항체)인 경우, 이들은 두 중쇄의 C-말단 헌지 영역의 설파이드 릴 결합에 의해 결합될 수 있다. 헌지 영역은 결합 전에 홀수의 설파이드릴 잔기, 예를 들면, 하나의 잔기를 함유하도록 변형될 수 있다.

[0186] 또는, 두 결합 특이성은 모두 동일한 백터에서 암호화되어 동일한 숙주 세포에서 발현 및 조립될 수 있다. 상기 방법은 이중특이성 및 다중특이성 분자가 MAb x MAb, MAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 또는 리간드 x Fab 융합 단백질인 경우에 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자, 예를 들어, 이중특이성 분자는 단일쇄 분자, 예를 들면, 단일쇄 이중특이성 항체, 하나의 단일쇄 항체 및 결합 결정인자를 포함하는 단일쇄 이중특이성 분자, 또는 2개의 결합 결정인자를 포함하는 단일쇄 이중특이성 분자일 수 있다. 이중특이성 및 다중특이성 분자는 또한 단일쇄 분자이거나 또는 2개 이상의 단일쇄 분자를 포함할 수 있다. 이중특이성 및 다중특이성 분자를 제조하는 방법은, 예를 들면, 미국 특허 제 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; 및 5,482,858 호에 기술되어 있다.

[0187] 그의 특이적 표적에 대한 이중특이성 및 다중특이성 분자의 결합은 효소-결합 면역흡착법(ELISA), 방사성면역분석법(RIA) 또는 웨스턴 블로트 분석법에 의해 확인할 수 있다. 이들 분석법은 각각 일반적으로 해당 복합체에 대해 특이적인 표지된 시약(예를 들면, 항체)을 이용하여 특별한 관심의 대상인 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들면, FcR-항체 복합체는, 예를 들면, 항체-FcR 복합체를 인지하고 그에 특이적으로 결합하는 효소-결합 항체 또는 항체 절편을 이용하여 검출할 수 있다. 또는, 복합체는 다양한 다른 면역분석법들 중 임의의 분석법을 이용하여 검출할 수 있다. 예를 들면, 항체는 방사성 표지되어 방사성면역분석법(RIA)에 이용될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 인용된 문헌 [Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986]을 참조하시오). 방사성 이소토프는 γ 계수기 또는 섬광 계수기의 이용과 같은 수단에 의해 또는 자가방사촬영법에 의해 검출할 수 있다.

[0188] 변형된 항체들도 또한 본 발명에 포함된다. "변형된 항체"란 용어는, 예를 들면, 항체의 결실, 부가 또는 치환 부분들에 의해 변형된 단일클론 항체, 키메라성 항체 및 인간화된 항체와 같은 항체를 포함한다. 예를 들면, 항체는 불변 영역을 결실시키고 상기 영역을 반감기, 예를 들면, 혈청 반감기, 항체의 안정성 또는 친화도를 증가시키기 위한 불변 영역으로 치환시킴으로서 변형될 수 있다.

[0189] 본 발명의 항체 결합체는 주어진 생물 반응을 변형시키거나 생물 반응(예를 들면, 작동체 세포를 보충하기 위한)을 발생시키는데 이용할 수 있다. 약물 잔기는 전형적인 화학 치료제로 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들면, 약물 잔기는 목적하는 생물 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 단백질에는, 예를 들면, 아브린, 리신 A, 슈도모나스(pseudomonas) 외독소 또는 디프테리아 독소와 같은 효소적으로 활성인 독소 또는 그의 활성 절편; 종양 괴사 인자 또는 인터페론-알파와 같은 단백질; 또는, 예를 들면, 림포카인, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF") 또는 기타 성장 인자와 같은 생물 반응 개질체가 포함될 수 있다.

[0190] 항체에 상기 치료 잔기를 결합시키는 기술은 공지되어 있다(예를 들면, 문헌 [Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al.(eds.), pp. 243-256(Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery(2nd Ed.), Robinson et al.(eds.), pp. 623-653(Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al.(eds.), pp. 475-506, 1985; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al.(eds.), pp. 303-316(Academic Press, 1985); and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immuno1. Rev.*, 62:119-158, 1982]을 참조하시오).

약학 조성물

[0192] 본 발명은 약학적으로 허용되는 탐체와 함께 배합된 인간 단일클론 항체 및/또는 인간 서열 항체(온전한 절편 또는 결합 절편) 하나 또는 그 조성물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 본 발명의 다중(예

를 들면, 둘 이상)의 분리된 인간 항체 및/또는 인간 서열 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 혼합물을 포함한다. 일부 조성물에서, 조성물의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 각각 인간 CTLA-4의 별개의 미리 선별된 에피토프에 결합하는 단일클론 항체 또는 인간 서열 항체이다.

A. 효과적 투여량

[0193] 투여량 요법은 최적의 목적 반응(예를 들면, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들면, 단일 거환을 투여하거나, 여러 분할 투여량을 시간에 따라 투여하거나, 또는 치료 상황의 긴박성으로 나타나는 바에 따라 투여량을 비례적으로 감소시키거나 증가시킬 수 있다. 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 비경구용 조성물을 단위 투여 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 바와 같이, 단위 투여 형태는 치료될 환자에 대한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위들을 말하며; 각각의 단위는 필요한 약학적 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 나타내도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 단위 투여 형태에 대한 설명은 (a) 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성될 특정 치료 효과, 및 (b) 개개인에서 민감도의 처리를 위해 상기 활성 화합물을 배합하는 분야에서의 원래의 한계에 의해 규정되며, 상기 변수에 따라 직접적으로 달라진다.

[0195] 약학적으로 허용되는 산화방지제의 예로는 다음이 포함된다: (1) 수용성 산화방지제, 예를 들면, 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 중황산 나트륨, 메타중황산 나트륨, 아황산 나트륨 등; (2) 유용성 산화방지제, 예를 들면, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 칼레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 칼레이트화제, 예를 들면, 시트르산, 에틸렌 디아민 테트라아세트산(EDTA), 솔비톨, 타르타르산, 인산 등.

[0196] 선택된 투여 경로에 관계없이, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물 및/또는 본 발명의 약학 조성물은 당해 분야의 기술을 가진 자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용되는 투여 형태로 제형화된다.

[0197] 본 발명의 약학 조성물 중의 활성 성분들의 실질적인 투여 수준은, 환자에게 독성이 없으면서 특정 환자에 대해 목적하는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 양의 활성 성분, 조성물 및 투여 방식을 수득하도록 변화될 수 있다. 선택되는 투여 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물의 활성을 포함하는 다양한 약물역학적 인자들 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 분비 속도, 치료 기간, 기타 약물, 사용되는 특정 조성물과 함께 사용되는 화합물 및/또는 물질, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적 건강 및 이전의 약제 약력 및 유사 요인들에 따라 달라진다.

[0198] 의사 또는 수의사는 약학 조성물에 사용된 본 발명의 화합물의 투여량을 목적하는 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 것보다 낮은 수준에서 출발하여 목적하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명 조성물의 적합한 1일 투여량은 치료 효과를 나타내기에 효과적인 최저 투여량인 화합물의 양이다. 상기 효과적 투여량은 일반적으로 전술한 요인들에 따라 달라진다. 투여는 정맥내, 근육내, 복강내 또는 피하로 하거나 또는 표적 부위에 인접하게 투여하는 것이 바람직하다. 경우에 따라, 치료 조성물의 효과적인 1일 투여량은 임의로 단위 투여 형태로 하루 전체에 걸쳐 적절한 간격으로 따로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 작은 투여량으로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 단독으로 투여될 수 있지만, 화합물을 약학적 제형(조성물)으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0199] 본원에 기술된 면역-관련 증상 및 질환의 치료를 위한 본 발명 조성물의 효과적인 투여량은, 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리적 상태(환자가 인간이든 또는 동물이든), 투여되는 다른 약물, 및 치료가 예방적인 것인지 또는 치료를 위한 것인지 여부를 포함하여 많은 상이한 요인들에 따라 달라진다. 치료 투여량은 안전성 및 효율을 최적화하도록 적정될 필요가 있다.

[0200] 항체를 투여하는 경우, 투여량은 숙주 체중의 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 보다 통상적으로는 0.01 내지 5 mg/kg의 범위이다. 예를 들면, 투여량은 1 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중이거나 또는 1 내지 10 mg/kg의 범위안에 들 수 있다. 전형적인 치료 요법은 2주당 1회 또는 1개월에 1회 또는 3 내지 6개월에 1회 투여함을 수반한다. 몇몇 방법에서는, 상이한 결합 특이성을 갖는 2개 이상의 단일클론 항체를 동시에 투여하며, 이 경우 투여된 각 항체의 투여량은 나타낸 범위 내에 속한다. 항체는 통상적으로 여러 회 투여한다. 단일 투여 사이의 간격은 주간, 월간 또는 년간일 수 있다. 상기 간격은 또한 환자에서 CTLA-4에 대한 항체의 혈중 수준을 측정하여 나타내는 바에 따라 불규칙할 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 1 내지 1000 μ g/ml의 혈장내 항체 농도 및 몇몇 방법에서는 25 내지 300 μ g/ml의 항체 농도를 달성하도록 조정된다. 또는, 항체는 서방형 제형으로 투여될 수

있으며, 이 경우 투여 회수가 적어질 수 있다. 투여량 및 회수는 환자에서 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간 항체가 가장 긴 반감기를 나타내며, 그 다음이 인간화된 항체, 키메라성 항체 및 비인간 항체의 순이다. 투여 용량 및 회수는 치료가 예방적인 것인지 치료를 위한 것인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적 용도에서는, 비교적 저투여량을 장기간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여한다. 일부 환자들은 그의 삶의 안정을 위해 계속 치료를 받는다. 치료적 용도에서는, 때때로 질환의 진행이 경감되거나 종료될 때까지, 바람직하게는 환자가 질환 증상의 부분적이거나 완전한 개선을 나타낼 때까지 비교적 짧은 간격으로 비교적 고투여량이 필요하다. 그런 후에, 환자는 예방 요법으로 투여받을 수 있다.

[0201] 면역원을 암호화하는 핵산에 대한 투여량은 환자 당 약 10 ng 내지 1 g, 100 ng 내지 100 mg 또는 30 내지 300 μ g DNA의 범위이다. 감염성 바이러스 벡터에 대한 투여량은 투여당 10 내지 100, 또는 그 이상의 비리온으로 달라진다.

[0202] 본 발명의 일부 인간 서열 항체 및 인간 단일클론 항체는 생체내에 적절히 분포되도록 제형화될 수 있다. 예를 들면, 혈뇌 장벽(BBB)은 매우 친수성인 많은 화합물을 차단한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB(경우에 따라)를 횡단하도록 하기 위해, 상기 화합물들은, 예를 들면, 리포좀 중에 배합될 수 있다. 리포좀을 제조하는 방법에 대해서는, 예를 들면, 미국 특허 제 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331 호를 참조하시오. 리포좀은 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 이동되는 하나 이상의 잔기를 포함하여, 표적화된 약물 전달을 증강시킬 수 있다 (예를 들면, 라네이드(V.V. Ranade)의 문헌[J. Clin. Pharmacol., 29:685, 1989] 참조). 전형적인 표적 잔기로는 폴레이트 또는 비오텐(예를 들면, 로우(Low) 등의 미국 특허 제 5,416,016 호 참조); 만노사이드(우메자와(Umezawa) 등의 문헌[Biochem. Biophys. Res. Commun., 153:1038, 1988]); 항체(블로만(P.G. Bloeman) 등의 문헌[FEBS Lett., 357:140, 1995]; 오와이스(M. Owais) 등의 문헌[Antimicrob. Agents Chemother., 39:180, 1995]); 계면활성제 단백질 A 수용체(브리스코(Briscoe) 등의 문헌[Am. J. Physiol., 1233:134, 1995])(이것의 상이한 종은 본 발명의 제형 뿐 아니라 본 발명 분자의 성분들도 포함할 수 있다); p120(슈레이어(Schreier) 등의 문헌[J. Biol. Chem., 269:9090, 1994])이 포함되며; 또한 케이나넨(K. Keinanen), 라우카넨(M.L. Laukkonen)의 문헌[FEBS Lett., 346:123, 1994]; 킬리온(J.J. Killion), 피들러(I.J. Fidler)의 문헌[Immunomethods, 4:273, 1994]을 참조하시오. 몇몇 방법에서, 본 발명의 치료 화합물은 리포좀 중에 배합되며; 보다 바람직한 태양에서, 리포좀은 표적 잔기를 포함한다. 일부 방법에서는, 리포좀 중의 치료 화합물은 종양 또는 감염에 인접한 부위에 거환을 주입함으로서 전달된다. 조성물은 주사하기 용이한 정도로 유동되어야 한다. 상기 조성물은 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 하며, 세균 및 진균류와 같은 미생물의 오염에 대해 보존되어야 한다.

[0203] 치료 용도에 있어, 약학 조성물은 질환, 그 증상 또는 생화학적 마커의 추가의 진행을 저지하거나 억제하거나, 역전시키거나 배제시키기에 충분한 양으로 만성 질환을 앓고 있는 환자에게 투여된다. 예방 용도에서는, 약학 조성물은 질환, 그 증상 및 생화학적 마커의 진행을 자연시키거나 억제하거나 방지하기에 충분한 양으로 질환에 걸리기 쉽거나 질환에 걸릴 위험이 있는 환자에게 투여된다. 이러한 목적을 달성하기에 적절한 양을 "치료적으로-" 또는 "예방적으로-효과적인 투여량"으로 정의한다. 투여량은 치료되는 질환, 환자의 크기, 환자 증상의 중증도 및 특정 조성물 또는 선택된 투여 경로에 따라 달라진다. 구체적으로, 종양의 치료에 있어, "치료적으로 효과적인 투여량"은 치료되지 않은 환자에 비해 약 20% 이상, 또는 약 40% 이상, 또는 약 60% 이상, 또는 약 80% 이상 종양 성장을 억제할 수 있다. 암을 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서 효율적인 것으로 예상되는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 또는, 조성물의 상기 특성은 시험관내에서 통상적인 분석법에 의해 화합물의 억제 능력을 시험함으로써 평가할 수 있다. 치료 효과량의 치료 화합물은 종양 크기를 감소시키거나 또는 그렇지 않으면 환자에서 증상을 개선할 수 있다.

[0204] 조성물은 멸균되어야 하며 조성물을 주사기로 전달할 수 있는 정도로 유동되어야 한다. 물 이외에, 담체는 등장성 완충 염수 용액, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅제를 이용하여, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써 및 계면활성제를 이용하여 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들면, 당, 만니톨 또는 슬비톨과 같은 폴리알콜, 및 염화 나트륨을 조성물 중에 포함하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 장기 흡수는 조성물에 흡수를 자연시키는 약제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴을 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0205] 전술한 바와 같이, 활성 화합물이 적절히 보호되는 경우, 화합물은, 예를 들면, 불활성 희석제 또는 소화가능한 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다.

B. 투여 경로

[0206] 본 발명의 약학 조성물은 또한 혼합 요법으로 투여될 수 있다, 즉, 다른 약제들과 함께 혼합될 수 있다. 예를 들면, 암의 치료에 있어, 혼합 요법은 하나 이상의 항종양제 또는 다른 통상적인 치료, 예를 들면, 방사선 치료와 함께 본 발명의 조성물을 포함할 수 있다.

[0207] 약학적으로 허용되는 담체로는 생리학적으로 상용가능한 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장성 약제 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 쳉추 또는 상피 투여(예를 들면, 주사 또는 주입에 의해)에 적합할 수 있다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉, 항체, 이중특이성 및 다중특이성 분자는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산 및 기타 천연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위한 물질로 코팅될 수 있다.

[0208] "약학적으로 허용되는 염"이란 모 화합물의 목적하는 생물 활성을 유지하고 어떤 바람직하지 않은 독물학적 효과도 미치지 않는 염을 말한다(예를 들면, 베지(Berge, S.M.) 등의 문헌[J. Pharm. Sci., 66:1-19, 1977]을 참조하시오). 상기 염의 예로는 산 부가염 및 염기 부가염이 포함된다. 산 부가염으로는 무독성 무기산, 예를 들면, 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산으로부터 유도된 염뿐 아니라, 무독성 유기산, 예를 들면, 지방족 모노- 및 디카복실산, 페닐-치환된 알카노산, 하이드록시 알카노산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 셀론산 등으로부터 유도된 염이 포함된다. 염기 부가염으로는 알칼리 토금속, 예를 들면, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등으로부터 유도된 염뿐 아니라, 무독성 유기 아민, 예를 들면, N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유도된 염이 포함된다.

[0209] 본 발명의 조성물은 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 달라진다. 활성 화합물은 임플란트, 경피용 패치 및 미세캡슐화 전달 시스템을 포함하여, 조절 방출 제형과 같이 급속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들면, 에틸렌 비닐 아세테이트, 다중무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 상기 제형을 제조하는 많은 방법이, 예를 들면, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]에 기술되어 있다. 약학 조성물은 GMP 조건하에서 제조되는 것이 바람직하다.

[0210] 특정 투여 경로에 의해 본 발명의 화합물을 투여하기 위해, 화합물을 그의 불활성화를 방지하기 위한 물질로 코팅하거나 또는 상기 물질과 함께 화합물을 동시투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 적절한 담체, 예를 들면, 리포좀 또는 희석제 중에서 환자에게 투여될 수 있다. 약학적으로 허용되는 희석제로는 염수 및 수성 완충액이 포함된다. 리포좀에는 수중 유적중 수적형(water-in-oil-in-water) CGF 유화액 및 통상적인 리포좀이 포함된다(스트레잔(Strejan) 등의 문헌[J. Neuroimmunol., 7:27, 1984]).

[0211] 약학적으로 허용되는 담체에는 멸균 주사액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 수성 분산액 및 멸균 분말이 포함된다. 약학적 활성 물질을 위한 상기 매질 및 약제를 사용하는 것은 당해 분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 약제가 활성 화합물과 비사용성인 경우를 제외하고는, 본 발명의 약학 조성물에 상기 매질 또는 약제를 사용하는 것이 포함된다. 보조 활성 화합물도 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0212] 치료 조성물은 전형적으로 멸균성이고 실질적으로 등장성이며 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 한다. 조성물은 용액, 미세유화액, 리포좀 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙적 구조로 제형화될 수 있다. 담체는, 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅제를 이용하여, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써 및 계면활성제를 이용하여 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들면, 당, 만니톨 또는 솔비톨과 같은 폴리알콜, 또는 염화 나트륨을 조성물 중에 포함하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 약제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0213] 멸균 주사액은 필요량의 활성 화합물을 필요에 따라 상기 열거한 성분들 중 하나 또는 그의 혼합물과 함께 적절한 용매중에 혼입한 다음 멸균 미량여과시켜 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 열거한 것 중에서 필요한 다른 성분들을 함유하는 멸균 비허를 중에 혼입시킴으로써 제조한다. 멸균 주사액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 미리 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 바람직한 추가 성분과 함께 활성 성분의 분말을 제공하는 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조)법이다. 치료 조성

물은 또한 당해 분야에 공지된 의약 장치를 사용하여 투여할 수 있다. 예를 들면, 바람직한 태양에서, 본 발명의 치료 조성물은, 예를 들면, 미국 특허 제 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 또는 4,596,556 호에 개시된 장치와 같은 무침(needleless) 피하 주사 장치를 사용하여 투여할 수 있다. 본 발명에 유용한 임플란트 및 모듈의 예로는 다음 특허들에 개시된 것들이 포함된다: 조절된 속도로 약물을 분산시키기 위한 이식가능한 미세주입 펌프를 개시하고 있는 미국 특허 제 4,487,603 호; 피부를 통해 약제를 투여하기 위한 치료 장치를 개시하고 있는 미국 특허 제 4,486,194 호; 정확한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시하고 있는 미국 특허 제 4,447,233 호; 연속적인 약물 전달을 위한 가변성 유동 이식성 주입 장치를 개시하고 있는 미국 특허 제 4,447,224 호; 다중-챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하고 있는 미국 특허 제 4,439,196 호; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하고 있는 미국 특허 제 4,475,196 호. 많은 다른 상기 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 공지되어 있다.

C. 제형

치료 조성물의 경우, 본 발명의 제형은 경구, 비강, 국소(구강 및 설하 포함) 직장내, 질내 및/또는 비경구 투여에 적합한 것들을 포함한다. 제형은 단위 투여 형태로 편리하게 제공될 수 있으며, 제약 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 함께 혼합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 환자 및 특정 투여 방식에 따라 달라진다. 단일 투여 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 혼합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 제공하는 조성물의 양이다. 일반적으로, 100% 중에서, 상기 양은 약 0.01 내지 약 99% 활성 성분, 또는 약 0.1 내지 약 70%, 또는 약 1 내지 약 30% 활성 성분의 범위이다.

질내 투여에 적합한 본 발명의 제형으로는 또한 당해 분야에서 적절한 것으로 공지된 바와 같은 담체를 함유하는 페서리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 포움 또는 스프레이 제형이 포함된다. 본 발명 조성물의 국소 또는 경피 투여용 투여 형태에는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제가 포함된다. 활성 화합물은 멸균 조건하에서 약학적으로 허용되는 담체, 및 필요할 수도 있는 임의의 방부제, 완충제 또는 추진제와 혼합될 수 있다.

"비경구 투여" 및 "비경구적으로 투여된"이란 어구는 소화관내 및 국소 투여 이외의, 통상적으로 주사에 의한 투여 방식을 의미하며, 제한 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 캡슐내, 안와내(intraorbital), 심장내, 피내, 복강내, 기관투과(transstracheal), 피하, 표피하, 관절내, 캡슐하, 거미막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

본 발명의 약학 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물, 올리브유와 같은 식물성유, 및 에틸 올리에이트와 같은 주입가능한 유기 에스테르가 포함된다. 적절한 유동성은, 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅 물질을 이용하여, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써 및 계면활성제를 이용하여 유지될 수 있다.

이들 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재를 방지하는 것은 상기 언급한 멸균 절차에 의해서 및 다양한 항균제 및 진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 솔브산 등의 혼입에 의해 보장될 수 있다. 당, 염화 나트륨 등과 같은 등장성 약제를 조성물에 포함하는 것도 또한 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 약학적 형태의 연장된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 약제의 혼입에 의해 달성될 수 있다.

본 발명의 화합물을 약품으로 인간 및 동물에게 투여하는 경우, 이들은 단독으로, 또는 약학적으로 허용되는 담체와 함께, 예를 들면, 0.01 내지 99.5%(또는 0.1 내지 90%)의 활성 성분을 함유하는 약학 조성물로서 제공될 수 있다.

약학 조성물은 일반적으로 멸균성의, 실질적으로 등장성으로 제형화되어야 하며, 미국 식품의약청(U.S. Food and Drug Administration)의 모든 GMP(Good Manufacturing Practice) 규정에 따른다.

본 발명의 방법 및 용도

A. 방법

본 발명의 조성물(예를 들면, 인간 CTLA-4에 대한 인간 서열 항체 및 인간 단일클론 항체 및 그의 유도체/결합체)은 시험관내 및 생체내 진단 및 치료 용도를 갖는다. 예를 들면, 이들 분자는 다양한 질병을 치료하거나 예

방하거나 진단하기 위해, 예를 들면, 시험관내 또는 생체외에서 배양물 중의 세포에 또는, 예를 들어, 생체내로 대상의 세포에 투여될 수 있다. "대상"이란 용어는 인간 및 인간을 제외한 동물을 포함한다. 인간을 제외한 동물로는 모든 척추동물, 예를 들면, 인간을 제외한 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 과충류와 같은 포유동물 및 비-포유동물이 포함된다. 상기 방법은 T-세포 매개 면역 반응을 증진시키거나 저하시킴으로써 치료될 수 있는 질병을 갖고 있는 인간 환자를 치료하기에 특히 적합하다.

[0226] CTLA-4에 대한 항체를 또 다른 약제와 함께 투여하는 경우, 상기 두 물질은 순서대로 또는 동시에 투여할 수 있다. 상기 방법은 흑색종, 결장암, 전립선암 및 신장암을 포함한 임의 종류의 암을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0227] 예를 들면, 항-CTLA-4로 코팅된 라텍스 미소구(항체 결합자를 증가시키기 위함)는 T 세포 중식 및 활성화를 억제할 수 있다. 동일한 항체 결합 부위를 갖는 약제는 Fab 또는 가용성 IgG로서 제공되는 경우 CTLA-4 길항물질로 작용할 수 있으며 고도로 가교결합된 경우에는 CTLA-4 작용물질로 작용할 수 있다. 따라서, 항-CTLA-4 항체의 다가 형태는 면역 반응을 하향-조절하기 위한 유용한 치료제이다.

[0228] 라텍스 미소구 또는 기타 불용성 입자에 결합되는 것 이외에, 항체들은 서로에 가교결합되거나 또는 유전 공학적으로 처리되어 다중체를 형성할 수 있다. 가교결합은 직접적인 화학 결합에 의해, 또는 항체-비오틴-아비딘 복합체와 같은 간접적 결합에 의해 이루어질 수 있다. 가교결합은 화학적 결합 그룹을 이용하는 경우 공유적일 수 있거나, 또는 단백질-단백질 또는 기타 단백질-리간드 상호작용을 이용하는 경우 비-공유적일 수 있다. 결합에 대한 유전 공학적 접근방법으로는, 예를 들면, IgM 발현 백터 중의 고친화성 IgG 항체의 가변 영역 또는 임의의 단백질 잔기(예를 들면, 폴리라이신 등)의 재발현이 포함된다. 고친화성 IgG 항체를 IgM 항체로 전환시키면 매우 높은 결합활성을 갖는 10가의 복합체가 생성될 수 있다. IgA₂ 발현 백터도 또한 다가 항체 복합체를 제조하는데 이용할 수 있다. IgA₂는 J쇄 및 분비성 물질과 함께 고분자를 형성할 수 있다. IgA₂는 호중구, 대식세포 및 단핵구 상에서 발현되는 IgA 수용체 CD89에 의해 추가로 가교결합될 수 있다는 부가적인 이점을 가질 수 있다.

[0229] 작용성(agonism)은 또한 CTLA-4 상의 2개 이상의 비중복 에피토프에 대한 항체들을 포함하는 CTLA-4에 대한 다중클론 항체의 제제를 사용하여 얻을 수 있다. 2개의 결합 부위를 함유하는 상기 제제 중의 하나의 항체는 2개의 CTLA-4 분자에 결합하여 소 군락을 형성할 수 있다. 이어서, 상이한 결합 부위를 갖는 제 2의 항체는 상기 소 군락을 결합(응집)시켜 거대 군락을 형성함으로써, CTLA-4를 갖는(발현하는) T-세포의 활성화를 억제하거나 감소시키거나 방지하도록 T 세포에 신호를 전달할 수 있는 CTLA-4의 복합체(세포 표면 상에) 형성할 수 있다. 따라서, 다중클론 항체의 일부 제제는 전술한 다가 제제에 유사한 작용성을 나타낸다.

[0230] 그러므로, 항 CTLA-4 항체의 다가 또는 다중클론 제제는 CTLA-4 수용체에 작용물질로 작용하여 CTLA-4 수용체를 갖는 T 세포에 의해 달리 매개된 면역 반응을 억제하는데 유용하다. 상기 항체들의 다가 또는 다중클론 제제를 이용하여 치료할 수 있는 질환의 몇몇 예로는 자가면역 질화, 이식체 거부 및 염증이 포함된다.

B. 용도

1. 면역 반응 활성화

a. 암

[0234] 일부 치료 방법은 환자의 암을 치료한다. 항체에 의한 CTLA-4의 차단은 환자에서 암 세포에 대한 면역 반응을 증대시킬 수 있다. 임의로, CTLA-4에 대한 항체는 면역원성 약제, 예를 들면, 암 세포, 정제된 종양 항원(제조합 단백질, 웨타이드 및 탄수화물 분자 포함), 세포, 및 면역 자극 사이토카인을 암호화하는 유전자로 형질감염된 세포 및 B7과 같은 세포 표면 항원과 혼합될 수 있다(예를 들면, 허위츠(Hurwitz, A.) 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:10067-10071, 1998] 참조).

[0235] 쥐 실험 시스템에서, 몇몇 종양의 이식에 이은 항-CTLA-4 항체의 투여는 종양의 거부를 야기할 수 있다. 몇몇 경우에서, 정착된 종양의 종양 거부가 일어나며; 다른 경우에는 항-CTLA-4 항체의 사용에 의해 종양의 성장이 느려진다. 일반적으로, CTLA-4 차단은 면역원성 종양에 대해 효과적이다. 임의로, 상기와 같은 종양을 종양 자체를 이용한 백신 접종이 종양 공격에 대한 면역성을 유도할 수 있는 종양으로 정의한다. 인간에 있어서, 일부 종양은 흑색종과 같이 면역원성인 것으로 나타났다. CTLA-4 차단에 의해 T 세포 활성화의 개시가 야기되어, 숙주에서 종양 반응을 활성화시킬 것을 기대할 수 있는 것으로 예상된다.

[0236] CTLA-4 차단은 백신 접종 프로토콜과 혼합될 때 가장 효과적이다. 종양에 대한 백신 접종에 대한 많은 실험 전략들이 고안되었다(예를 들면, 문헌 [Rosenberg, S., Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book,

Spring: 60-62, 2000; Logothesis, C., ASCO *Eduational Book*, Spring: 300-302, 2000; Khayat, D., ASCO *Eduational Book*, Spring: 414-428, 2000; Foon, K., ASCO *Eduational Book*, Spring: 730-738, 2000; Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita, V. et al.,(eds.), *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition, 1997]을 참조하시오). 이러한 전략 중 하나에서는, 자가 또는 동종 종양 세포를 사용하여 백신을 제조한다. 상기 세포성 백신들은 종양 세포가 GM-CSF를 발현하도록 형질도입될 때 가장 효과적인 것으로 나타났다. GM-CSF는 종양 백신 접종을 위한 항원 제공의 유효한 활성화제인 것으로 밝혀졌다(드라노프(Dranoff) 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(80):3539-3543, 1993]).

[0237] GMCSF-변형된 종양 세포 백신의 사용과 함께 항-CTLA-4 차단은 유방암종(허위츠 등의 상기 문헌(1998) 참조), 1차 전립선암(허위츠 등의 문헌[*Cancer Research*, 60(9):2444-2448, 2000]) 및 흑색종(van Elsas, A.) 등의 문헌[*J. Exp. Med.*, 190:355-366, 1999])과 같은 많은 실험 종양 모델에서 효과적인 것으로 나타났다. 상기 경우들에서, B16 흑색종과 같은 비-면역원성 종양은 면역 시스템에 의한 파괴에 민감하게 되었다. 종양 세포 백신은 또한 무엇보다 IL2와 같은 다른 면역 활성화제 및 동시자극성 분자를 발현하도록 변형될 수 있다.

[0238] 다양한 종양들에서 유전자 발현 및 대규모 유전자 발현 패턴에 대한 연구는 소위 종양 특이성 항원의 정의를 이끌어 내었다(로젠버그(Rosenberg, S.A.)의 문헌[*Immunity*, 10:281-287, 1999]). 많은 경우에서, 이들 종양 특이성 항원은 종양에서 및 그로부터 종양, 예를 들면, 멜라닌세포 항원 gp 100, MAGE 항원, Trp-2가 발생되는 세포에서 발현되는 분화 항원이다. 보다 중요하게, 이들 항원 중 대부분은 숙주에서 발견되는 종양 특이성 T 세포의 표적인 것으로 나타날 수 있다. CTLA-4 차단은 종양에서 발현되는 재조합 단백질 및/또는 웨타이드에 대한 면역 반응을 유발하기 위해 종양에서 발현되는 상기 단백질들의 수집물과 함께 이용될 수 있다. 상기 단백질들은 정상적으로는 면역 시스템에 의해 자기 항원으로 관찰되므로, 이들에 대해 내성이다. 종양 항원은 또한 염색체의 텔로미어 합성에 필요하며 85% 이상의 인간 암에서 및 단지 한정된 수의 체세포 조직에서 발현되는 단백질 텔로머라제를 포함할 수 있다(김(Kim, N.) 등의 문헌[*Science*, 266, 2011-2013, 1994]). (상기 체세포 조직은 다양한 수단에 의해 면역 공격으로부터 보호될 수 있다). 종양 항원은 또한 단백질 서열을 변형시키거나 또는 2개의 무관한 서열들(즉, 펠라텔피아 염색체 중의 bcr-ab1) 사이에 융합 단백질을 생성하는 체세포 돌연변이로 인해 암 세포에서 발현되는 "네오-항원"이거나, 또는 B 세포 종양의 유전자형일 수 있다. 다른 종양 백신은 인간 유두종 바이러스(Human Papilloma Viruses, HPV), 간염 바이러스(Hepatitis Viruses, HBV 및 HCV) 및 카포시 헤르페스 육종 바이러스(Kaposi's Herpes Sarcoma Virus, KHSV)와 같은 인간 암에 관련되는 바이러스로부터의 단백질을 포함할 수 있다. CTLA-4 차단과 함께 사용될 수 있는 종양 특이성 항원의 또 다른 형태는 종양 조직 자체로부터 분리된 정제된 열 충격 단백질(HSP)이다. 이들 열 충격 단백질은 종양 세포로부터의 단백질 절편을 함유하며, 상기 HSP는 종양 면역성을 도출하기 위한 항원 제시 세포로의 전달에 매우 효과적이다(슈오트(Suot, R) 및 스리바스타바(Srivastava, P.)의 문헌[*Science*, 269:1585-1588, 1995]; 타무라(Tamura, Y.) 등의 문헌[*Science*, 278:117-120, 1997]).

[0239] 수상돌기 세포(DC)는 항원-특이성 반응을 준비자극하는데 사용할 수 있는 유효한 항원 제시 세포이다. DC는 생체외로 생성될 수 있으며 다양한 단백질 및 웨타이드 항원 뿐 아니라 종양 세포 추출물과 함께 부하될 수 있다(네슬레(Nestle, F.) 등의 문헌[*Nature Medicine*, 4:328-332, 1998]). DC는 또한 상기 종양 항원을 발현시키기 위한 유전학적 수단에 의해 형질도입될 수 있다. DC는 또한 면역을 위해 종양 세포에 직접 융합되었다(커글러(Kugler, A.) 등의 문헌[*Nature Medicine*, 6:332-336, 2000]). 백신 접종의 한 방법으로, DC 면역은 보다 유효한 항-종양 반응을 활성화시키기 위해 CTLA-4 차단과 효과적으로 결합될 수 있다.

[0240] CTLA-4 차단은 또한 표준 암 치료와 결합될 수 있다. CTLA-4 차단은 화학치료 요법과 효과적으로 결합될 수 있다. 이러한 경우에, 투여되는 화학요법 시약의 투여량을 감소시키는 것이 가능할 수 있다(모키르(Mokyr, M.) 등의 문헌[*Cancer Research*, 58:5301-5304, 1998]). CTLA-4 차단과 화학요법의 혼합 사용 이면의 과학적 원리는 세포 치사, 즉, 대부분의 화학요법 화합물의 세포독성 작용의 결과가 항원 제공 경로에서 종양 항원의 수준을 증가시켜야 한다는 것이다. 세포 치사를 통한 CTLA-4 차단과의 상승효과를 가져올 수 있는 다른 혼합 요법은 방사선, 수술 및 호르몬 결핍이다(권(Kwon, E.) 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(26):15074-15079, 1999]). 상기 프로토콜들은 각각 숙주에서 종양 항원의 공급원을 생성한다. 혈관형성 억제제도 또한 CTLA-4 차단과 결합될 수 있다. 혈관형성을 억제하면 종양 세포 치사가 야기되며 이것은 숙주 항원 제공 경로에 종양 항원을 공급할 수 있다.

[0241] CTLA-4 차단 항체도 또한 종양 세포에 대한 Fc 알파 또는 Fc 감마 수용체-발현 작동체 세포를 표적화하는 이중 특이성 항체와 함께 사용할 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제 5,922,845 및 5,837,243 호 참조). 이중특이성 항체를 사용하여 2개의 별개의 항원들을 표적화할 수 있다. 예를 들면, 항-Fc 수용체/항 종양 항원(즉, Her-

2/neu) 이중특이성 항체를 사용하여 종양 부위에 대한 대식세포를 표적화하였다. 상기 표적화는 종양 특이성 반응을 보다 효과적으로 활성화시킬 수 있다. 상기 반응의 T 세포 팔은 CTLA-4 차단을 이용함으로써 증진될 것이다. 또는, 항원은 종양 항원 및 수상돌기 세포 특이성 세포 표면 마커에 결합하는 이중특이성 항체를 이용함으로써 DC에 직접 전달될 수 있다.

[0242] 종양은 매우 다양한 메카니즘에 의해 숙주의 면역 감시체계를 피한다. 상기 메카니즘들 중 대부분은 종양에 의해 발현되며 면역억제성인 단백질의 불활성화에 의해 극복될 수 있다. 상기 단백질들로는 무엇보다 Tgf β (케를(Kehr1, J.) 등의 문헌[J. Exp. Med., 163:1037-1050, 1986]), IL-10(하워드(Howard, M.) 및 오가라(O'Garra, A.)의 문헌[Immunology Today, 13:198-200, 1992]) 및 Fas 리간드(하네(Hahne, M.) 등의 문헌[Science, 274:1363-1365, 1996])가 포함된다. 이들 물질 각각에 대한 항체는 항-CTLA-4와 함께 사용하여 면역억제제의 효과를 방해하고 숙주에 의한 종양 면역 반응을 유리하게 할 수 있다.

[0243] 숙주 면역 반응성을 활성화시키기 위해 사용될 수 있는 다른 항체들을 항-CTLA-4와 함께 사용할 수 있다. 이들 항체는 DC 기능 및 항원 제공을 활성화시키는 수상돌기 세포 표면 상의 분자들을 포함한다. 항-CD40 항체는 T 세포 헬퍼 활성을 효과적으로 대체할 수 있으며(릿지(Ridge, J.) 등의 문헌[Nature, 393:474-478, 1998]), CTLA-4 항체와 함께 사용할 수 있다(이토(Ito, N.) 등의 문헌[Immunobiology, 201(5):527-540, 2000]). OX-40(웨인버그(Weinberg, A.) 등의 문헌[J. Immunol., 164:2160-2169, 2000]), 4-1BB(멜리로(Melero, I.) 등의 문헌[Nature Medicine, 3:682-685, 1997]) 및 ICOS(허트로프(Hutloff, A.) 등의 문헌[Nature, 397:262-266, 1999])와 같은 T 세포 동시자극 분자에 대한 항체를 활성화시키면 또한 증가된 수준의 T 세포 활성화가 제공될 수 있다.

[0244] 골수 이식은 현재 다양한 조혈성 근원을 갖는 종양을 치료하기 위해 사용되고 있다. 이식편 대 숙주 질환은 상기 치료의 결과이긴 하지만, 이식편 대 종양 반응에서 치료 이점을 얻을 수 있다. CTLA-4 차단을 이용하여 공여체 융합된 종양 특이성 T 세포의 효과를 증가시킬 수 있다(블라자(Blazar, B.) 등의 문헌[J. Immunol., 162:6368-6377, 1999]).

[0245] 항원 특이성 T 세포의 생체외 활성화 및 확장, 및 종양에 대한 항원-특이적 T 세포에 대해 제대로 수용체에 상기 세포들을 선택적으로 전달하는 것을 수반하는 여러 실험 치료 프로토콜이 또한 존재한다(그린버그(Greenberg, R.)와 리델(Riddell, S.)의 문헌[285:545-551, 1999]). 상기 방법들은 또한 CMV(하기 참조)와 같은 감염성 약제에 대한 T 세포 반응을 활성화시키기 위해 이용할 수 있다. 항-CTLA-4 항체의 존재하에 생체외 활성화시키면 선택적으로 전달된 T 세포의 회수 및 활성을 증가시킬 것으로 예상할 수 있다.

b. 감염성 질환

[0247] 본 발명의 다른 방법들은 특정 독소 또는 병원체에 노출된 환자를 치료하는데 이용된다. 전술한 바와 같은 종양에 대한 그의 용도와 유사하게, 항체 매개된 CTLA-4 차단은 단독으로 이용될 수 있거나, 또는 보조제로서 백신과 함께 병원체, 독소 및 자기-항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 이용될 수 있다. CTLA-4 차단은 니포스트론질러스 브라실리엔시스(Nippostrongylus brasiliensis)(맥코이(McCoy) 등의 문헌[186(2):183-187, 1997]) 및 레이시마니아 도노바니(Leishmania donovani)의 급성 감염에서 효과적인 것으로 밝혀졌다. 상기 치료적 접근방법이 특히 유용한 병원체의 예로는 현재 그에 대한 효과적인 백신이 없는 병원체 또는 그에 대한 통상적인 백신이 완전히 효과적이지 못한 병원체가 포함된다. 상기 병원체로는 HIV, 헤파티티스(Hepatitis A, B & C), 인플루엔자(Influenza), 헤르페스(Herpes), 기아르디아(Giardia), 말라리아(Malaria), 레이시마니아(Leishmania), 스타필로코커스 오레우스(Staphylococcus Aureus), 슈도모나스 에루기노사(Pseudomonas aeruginosa)가 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다. CTLA-4 차단은 감염 과정에 걸쳐 변형된 항원을 제공하는 HIV와 같은 작용체에 의한 만성 감염에 대해 특히 유용하다. 이러한 새로운 에피토프들은 항-인간 CTLA-4 투여 시에 외래물질로 인지되어, CTLA-4를 통한 음성 신호에 의해 완충되지 않는 강한 T 세포 반응을 유발한다.

[0248] 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 감염증을 유발하는 병원성 바이러스의 몇몇 예로는 헤파티티스(A, B 또는 C), 헤르페스 바이러스(예를 들면, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II 및 CMV, 엠스테인 바르(Epstein Barr) 바이러스), 아데노바이러스(adenovirus), 인플루엔자 바이러스, 플라비바이러스(flaviviruses), 에코바이러스(echovirus), 리노바이러스(rhinovirus), 콕스삭기(coxsackie) 바이러스, 코르노바이러스(cornovirus), 호흡기 신시티움 바이러스(respiratory syncytial virus), 멤프스(mumps) 바이러스, 로타바이러스(rotavirus), 메아슬레스(measles) 바이러스, 루벨라(rubella) 바이러스, 파르보바이러스(parvovirus), 백시니아(vaccinia) 바이러스, HTLV 바이러스, 덴그(dengue) 바이러스, 패필로마바이러스(papillomavirus), 몰루스컴(molluscum) 바이러스, 폴리오바이러스(poliovirus), 라비에스(rabies) 바이러스, JC 바이러스 및 아르보바이러스 엔세팔리티스

(*arboviral encephalitis*) 바이러스가 포함된다.

[0249] 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 감염증을 유발하는 병원성 세균의 몇몇 예로는 클레마이디아(*chlamydia*), 리케치알 박테리아(*rickettsial bacteria*), 마이코박테리아(*mycobacteria*), 스태필로코키(*staphylococci*), 스트렙토코키(*streptococci*), 뉴모노코키(*pneumonococci*), 메ning고코키(*meningococci*) 및 코노코키(*conococci*), 클렙시엘라(*klebsiella*), 프로테우스(*proteus*), 세라티아(*serratia*), 슈도모나스(*pseudomonas*), 레기오넬라(*legionella*), 디프테리아(*diphtheria*), 살모넬라(*salmonella*), 바실리(*bacilli*), 콜레라(*cholera*), 테타너스(*tetanus*), 보툴리즘(*botulism*), 안트락스(*anthrax*), 플라그(*plague*), 렙토스피로시스(*leptospirosis*) 및 라이메스(*Lymes*) 질환 세균이 포함된다.

[0250] 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 감염증을 야기하는 병원성 진균류의 몇몇 예로는 칸디다(*Candida*)(알비칸스(*albicans*), 크루세이(*krusei*), 글라브라타(*glabrata*), 트로피칼리스(*tropicalis*) 등), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 아스페질러스(*Aspergillus*)(푸미가터스(*fumigatus*), 니거(*niger*) 등), 제너스 뮤코랄스(*Genus Mucorales*)(뮤코(*Mucor*), 압시디아(*Absidia*), 리조퍼스(*Rhizophorus*)), 스포로트릭스 센키(*Sporothrix schenkii*), 블라스토마이세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 파라코키디오이데스 브라실리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 코키디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*) 및 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*)이 포함된다.

[0251] 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 감염증을 야기하는 병원성 기생충의 몇몇 예로는 엔타모에바 히스토라이티카(*Entamoeba histolytica*), 발란티디움 콜리(*Balantidium coli*), 나에글리아 파울레리(*Naegleria fowleri*), 아칸타모에바 속(*Acanthamoeba sp.*), 기아르디아 람비아(*Giardia lamblia*), 크립토스포리디움 속(*Cryptosporidium sp.*), 뉴모카이스티스 카리니(*Pneumocystis carinii*), 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*), 바세시아 마이크로티(*Babesia microti*), 트립파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트립파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 레이시마니아 도노바니(*Leishmania donovani*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 니포스트롱길러스 브라실리엔시스(*Nipponstrongylus brasiliensis*)가 포함된다.

[0252] 상기 방법들 모두에서, CTLA-4 차단은 사이토카인 처리(예를 들면, 인터페론, GM-CSF, GCSF, IL-2)와 같은 다른 형태의 면역요법, 또는 중양 항원의 제공을 증대시키는 이중특이성 항체 요법과 결합될 수 있다(예를 들면, 홀리거(Holliger)의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448, 1993]; 폴작(Poljak)의 문헌[*Structure*, 2:1121-1123, 1994] 참조).

c. 질환의 치료 및 치료적 간접을 위한 이로운 "자가면역" 반응의 촉진

[0254] 자가면역 반응을 유발하고 증폭시키는 항-CTLA-4 항체의 능력은 많은 실험 시스템(MS(페린(Perrin, P.) 등의 문헌[*J. Immunol.*, 157(4):1333-1336, 1996)]; 당뇨(루더(Luhder, F.) 등의 문헌[*J. Exp. Med.*, 187:427-432, 1998)])에 대한 쥐 모델인 EAE-실험 자가면역 뇌척수염(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis))에서 입증되었다. 사실상, 종양 세포 및 웨타이드 백신을 이용한 항-종양 반응의 유도 결과 많은 항-종양 반응이 항-자기 반응성(엘사스 등의 문헌[*J. Exp. Med.*, 190:355-366, 1999])에서의 항-CTLA-4+GM-CSF 변형된 B16 흑색종에서 관찰된 탈색; Trp-2 백신 접종 마우스에서의 탈색(오버위크(Overwijk, W.) 등의 문헌[*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:2982-2987, 1999]); TRAMP 종양 세포 백신에 의해 야기된 자가면역 전립선염(허위츠(Hurwitz A.) 등의 문헌[*Cancer Research*, 60(9):2444-2448, 2000]), 인간 임상 실험에서 관찰된 흑색종 웨타이드 항원 백신 접종 및 백반(로젠크그와 화이트(White, DE)의 문헌[*J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 19(1):81-84, 1996]))을 수반하는 것으로 나타났다.

[0255] 그러므로, 질환 치료를 위한 자기 단백질들에 대한 면역 반응을 효과적으로 생성하기 위한 백신 접종 프로토콜을 고안하기 위해 다양한 자기 단백질과 함께 항-CTLA-4 차단을 이용하는 것을 고려할 수 있다. 예를 들면, 알츠하이머병은 뇌에서의 아밀로이드 침착물 중에 A β 웨타이드의 부적절한 축적을 수반하며; 아밀로이드에 대한 항체 반응은 상기 아밀로이드 침착물을 제거할 수 있다(쉔크(Schenk) 등의 문헌[*Nature*, 400:173-177, 1999]).

[0256] 다른 자기 단백질들도 또한 알레르기 및 천식의 치료를 위한 IgE 및 류마티스성 관절염을 위한 TNF와 같은 표적으로 이용할 수 있다. 최종적으로, 다양한 호르몬에 대한 항체 반응이 항-CTLA-4 항체를 이용하여 유도될 수 있다. 생식 호르몬에 대한 중화 항체 반응을 피임에 이용할 수 있다. 특정 종양의 성장에 필요한 호르몬 및 기타 가용성 인자들에 대한 중화 항체 반응도 또한 가능한 백신 접종 표적으로 고려할 수 있다.

[0257] 항-CTLA-4 항체의 이용에 대해 전술한 바와 같은 유사한 방법들을, 알츠하이머병에서의 A β , TNF α 와 같은 사이토카인 및 IgE를 포함하여, 아밀로이드 침착물과 같은 다른 자기-항원의 부적절한 축적을 갖는 환자를 치료하기

위한 치료적 자가면역 반응의 유도에 이용할 수 있다.

2. 면역 반응의 불활성화

[0259] 면역 반응에 의해 야기된 질병을 과민성 질환이라 부른다. 자기-내성의 실패 및 이어지는 자기 항원 또는 자가 항원에 대한 면역 반응에 의해 야기되는 질환을 자가면역 질환이라 부른다. 과민성 질환은 또한 미생물과 같은 외래 항원에 대한 조절되지 않은 반응 또는 과잉 반응으로부터 야기될 수 있다.

[0260] 인간 CTLA-4에 대한 항체는 T 세포의 확장 및 활성화를 촉진하는 것으로 나타났지만(즉, CTLA-4 기능(예를 들면, 리간드에 대한 결합)이 억제되는 경우; 이러한 개요에서 항체들은 CTLA-4 기능에 길항작용을 한다), 상기 동일 항체의 결합가를 증가시키면 반대 효과가 산출된다(여기서는, 반대로, 항체가 면역 반응을 억제하는 CTLA-4의 작용물질로서 작용한다)(예를 들면, 크럼멜 및 앤리슨(Krummel and Allison)의 문헌[J. Exp. Med., 183:2533-2540, 1996] 참조). 병원성 자가반응성 T 세포의 표적이 되는 것과 같은 항원 특이성 T 세포 반응을 불활성화시키기 위해, 상기 T 세포에 특이적인 표적 항원(즉, 항원 및/또는 MHC/항원 복합체)은 항-CTLA-4 항체의 다가 형태와 함께 투여해야 한다.

a. 염증

[0262] 염증은 유체의 축적 및 과립구 및 단핵구와 같은 탐식성 백혈구의 이동에 따른 모세관 확장의 결과를 나타낸다. 염증은 다양한 감염증에 대해 숙주를 보호하는데 있어 중요하지만, 또한 과민성 쇼크, 관절염, 통풍 및 허혈성-재판류와 같은 염증성 질병에서 바람직하지 않은 결과를 가질 수 있다. 활성화된 T-세포는 염증에서 중요한 조절 역할을 하여, 인터페론 γ 및 콜로니 자극 인자를 방출하고, 이것은 차례로 병원성 백혈구를 활성화시킨다. 활성화된 병원성 백혈구는, 병원체를 표적 내피 세포에 부착시키는 작용을 하는, 회귀 수용체로 불리는 많은 특이성 세포 표면 분자를 발현시키도록 유도된다. 염증 반응은 본 발명의 치료제로 치료함으로써 감소되거나 배제될 수 있다. 예를 들면, CTLA-4에 대한 항체의 다가 제제는 활성화된 T-세포의 활성화를 차단함으로써, 이들 세포가 병원성 세포 유형의 활성화에 필요한 분자를 방출시키는 것을 방지한다.

b. 자가면역 질환

[0264] 면역 억제가 바람직한 또 다른 경우는 인슐린-의존성 당뇨병, 다발성 경화증, 근강直증후군, 류마티스성 관절염, 중증근무력증 및 홍반성낭창과 같은 자가면역 질환의 치료이다. 상기 질환들에서, 인체는 항원의 파괴, 및 잠재적으로 무능화 및/또는 치명적 결과를 유도하는 그 자체의 항원들 중 하나에 대해 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 발전시킨다. 활성화된 T-세포는 당뇨병과 같은 많은 자가면역 질환에서 주 역할을 하는 것으로 생각된다. 자가면역 질환은 T 세포의 활성화를 억제하는 본 발명의 치료제들 중 하나를 투여하여 치료한다. 임의로, 그에 대한 자가면역 질환을 표적으로 하는 자가항원 또는 그의 절편을 면역억제제 투여 직전에, 투여와 동시에 또는 투여 직후에 투여할 수 있다. 이러한 방식으로, 억제성 치료에 의해 자가항원에 대한 내성이 유도될 수 있게 되어, 지속적인 면역억제에 대한 필요성을 배제할 수 있다(예를 들면, 코볼드(Cobbold) 등의 WO 90/15152 호(1990) 참조).

c. 이식편 대 숙주 질환

[0266] 본 발명의 치료제에 대한 관련 용도는 "이식편 대 숙주" 질환(GVHD)에 수반되는 면역 반응의 조절이다. GVHD는 면역학적으로 수용성인 세포가 동종 수용체로 전이될 때 일어나는 잠재적으로 치명적인 질환이다. 이러한 상황에서, 공여체의 면역감응 세포는 수용체 중의 조직을 공격할 수 있다. 피부, 소화관 상피 및 간의 조직들은 흔히 표적이 되며 GVHD 과정 중에 파괴될 수 있다. 상기 질환은 골수 이식에서와 같이 면역 조직이 이식되는 경우에 특히 심각한 문제를 제공하지만; 심장 및 간 이식체를 포함한 다른 경우에서도 또한 덜 심각한 GVHD가 보고되었다. 본 발명의 치료제는 공여체 백혈구의 활성화를 억제함으로써, 숙주에서 표적 세포를 용해시키는 그의 능력을 억제하는데 사용된다.

d. 이식 거부

[0268] 최근 수년에 걸쳐, 피부, 신장, 간, 심장, 폐, 췌장 및 골수와 같은 조직 및 기관들을 이식하기 위한 수술 기법의 효율이 상당히 개선되었다. 아마도, 주된 두드러진 문제는 수용체에서 이식된 동종이식편 또는 기관에 대해 면역-내성을 유도하기 위한 만족스러운 약제가 없다는 것이다. 동종 세포 또는 기관을 숙주에 이식할 때(즉, 공여체 및 수령체는 동일한 종의 상이한 개체이다), 숙주의 면역 시스템은 이식체 중의 외래 항원에 대해 면역 반응을 개시하여(숙주-대-이식편 질환) 이식된 조직의 파괴를 유도하기 쉽다. $CD8^+$ 세포, $CD4^+$ 세포 및 단핵구가 모두 이식 조직의 거부반응에 포함된다. 본 발명의 치료제는 수령체에서 T-세포 매개된 동종항원-유도된 면

역 반응을 억제하여 상기 세포가 이식된 조직 또는 기관의 파괴에 관여하는 것을 방지하는데 유용하다.

[0269] B. 샘플 중 CTLA-4의 존재를 검출/측정하는 방법

본 발명은 또한, 항체 또는 그의 부분과 인간 CTLA-4 사이에 복합체를 형성하게 하는 조건하에서 인간 CTLA-4에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 샘플 및 대조용 샘플을 접촉시킴을 포함하는, 샘플 중의 인간 CTLA-4 항원의 존재를 검출하거나, 또는 인간 CTLA-4 항원의 양을 측정하는 방법을 제공한다. 그 다음, 복합체의 형성을 검출하는데, 이때 대조용 샘플과 비교해 샘플 사이의 상이한 복합체 형성은 샘플 중의 인간 CTLA-4 항원의 존재를 나타내는 것이다.

[0271] C. 키트

본 발명의 조성물(예를 들면, 인간 서열 항체, 인간 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자)을 포함하는 키트 및 사용을 위한 지침도 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 상기 키트는 또한 하나 이상의 추가의 시약, 또는 하나 이상의 추가의 본 발명의 인간 항체(예를 들면, 제 1 인간 항체와 상이한 CTLA-4 항원의 에피토프에 결합하는 상보적 활성을 갖는 인간 항체)를 함유할 수 있다. 키트는 전형적으로 키트 내용물의 의도한 용도를 나타내는 표지를 포함한다. 표지란 용어는 임의의 기록, 또는 키트 상에 또는 키트와 함께 공급된 기록된 물질, 또는 그 렇지 않으면 키트에 첨부된 것을 포함한다.

[0273] [실시예]

[0274] 실시예 1. Cmu 표적화된 마우스의 생성

[0275] CMD 표적화 벡터의 제작

플라스미드 pICEmu는 Balb/C 계놈성 람다 파아지 라이브러리로부터 수득한, mu 유전자에 걸쳐있는, 쥐 Ig 중쇄 좌위의 EcoRI/XhoI 절편을 함유한다(마르쿠(Marcu) 등의 문헌[*Cell*, **22**:187, 1980]). 상기 계놈 절편을 플라스미드 pICEM19H의 XhoI/EcoRI 부위에 서브클로닝하였다(마르쉬(Marsh) 등의 문헌[*Gene*, **32**:481-485, 1984]). pICEMu에 포함된 중쇄 서열은 mu 인트론 중강제의 3'에 위치한 EcoRI 부위의 하류에서 mu 유전자의 마지막 막투과 엑손의 대략 1 kb 하류에 위치한 XhoI 부위로 연장되어 있으나; mu 전환 반복 영역의 대부분이 *E. coli* (*E. coli*)에서의 계대접종에 의해 결실되었다.

표적화 벡터는 다음과 같이 제작하였다(도 1 참조). 1.3 kb의 HindIII/SmaI 절편을 pICEMu로부터 절제하여 HindIII/SmaI 절단된 pBluescript(미국 캘리포니아주 라 졸라 소재의 스트라타진(Stratagene))에 서브클로닝하였다. 상기 pICEMu 절편은 Cmu1의 대략 1 kb 5'에 위치한 HindIII 부위로부터 Cmu1 내에 위치한 SmaI 부위까지 연장되어 있다. 생성된 플라스미드를 SmaI/SpeI으로 절단하고, Cmu1 3'의 SmaI 부위에서 마지막 Cmu 엑손의 바로 하류에 위치한 XbaI 부위까지 연장되어 있는 pICEMu로부터의 대략 4 kb SmaI/XbaI 절편을 삽입하였다. 생성된 플라스미드 pTAR1을 SmaI 부위에서 선형화하고, 네오 발현 카세트를 삽입하였다. 상기 카세트는 마우스의 포스포글리세레이트 키나제(pgk) 프로모터(XbaI/TaqI 절편; 아드라(Adra) 등의 문헌[*Gene*, **60**:65-74, 1987])의 전사 조절하에 있으며 pgk 폴리아데닐화 부위(PvuII/HindIII 절편; 보어(Boer) 등의 문헌[Biochemical Genetics, **28**:299-308, 1990]를 함유하는 네오 유전자로 이루어진다. 상기 카세트는 플라스미드 pKJ1(티불레워츠(Tybulewicz) 등의 문헌[*Cell*, **65**:1153-1163, 1991]에 기술되어 있음)으로부터 수득하였는데, 상기 플라스미드는 그로부터 네오 카세트가 EcoRI/HindIII 절편으로 절제되어 EcoRI/HindIII 절단된 pGEM-7Zf(+)에 서브클로닝되어 pGEM-7(KJ1)을 생성한다. 네오 카세트를 pGEM-7(KJ1)로부터 EcoRI/SalII 절단에 의해 절제하고, 평활 말단화시키고, 계놈 Cmu 서열의 반대 배향으로 플라스미드 pTAR1의 SmaI 부위에 서브클로닝하였다. 생성된 플라스미드를 NotI으로 선형화하고 단순 포진 바이러스(herpes simplex virus) 티미딘 키나제(tk) 카세트를 삽입하여 맨서(Mansour) 등의 문헌[Nature, **336**:348-352, 1988]에 기술된 바와 같이, 상동성 재조합체를 갖는 ES кл론을 농축시켰다. 상기 카세트는 티불레워츠 등의 문헌[*Cell*, **65**:1153-1163, 1991]에 기술된 바와 같이, 마우스 pgk 프로모터에 의해 하나로 묶인 tk 유전자의 암호화 서열 및 폴리아데닐화 부위로 이루어진다. 생성된 CMD 표적화 벡터는 중쇄 좌위에 대해 대략 총 5.3 kb의 상동부분을 함유하며, 첫 번째 Cmu 엑손의 단일 SmaI 부위 중의 네오 발현 카세트가 삽입된 돌연변이 mu 유전자를 생성하도록 설계된다. 표적화 벡터는 ES 세포에 일렉트로포레이션되기 전에, 플라스미드 서열 내에서 절단하는 PvuI으로 선형화시켰다.

[0278] 표적화 ES 세포의 생성 및 분석

AB-1 세포(맥마흔(McMahon, A.P.) 및 브래들리(Bradley, A.)의 문헌[*Cell*, **62**:1073-1085, 1990])를 본질적으로 문헌 [Robertson, E.J., Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach(E.J. Robertson,

ed.) Oxford: IRL Press, p. 71-112, 1987]에 기술된 바와 같이 유사분열적으로 불활성인 SNL76/7 세포 공급기 층(동일 장소에) 위에서 성장시켰다. 선형화된 CMD 표적화 벡터를 헤이스티(Hasty, P.R.) 등의 문헌[Nature, 350:243-246, 1991]에 기술된 방법에 의해 AB-1 세포에 일렉트로포레이션시켰다. 일렉트로포레이션된 세포를 100 ml 접시에 1 내지 2×10^6 세포/접시의 밀도로 평판하였다. 24 시간후에, G418(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 활성 화합물) 및 FIAU(5×10^{-7} M)를 배지에 가하고, 약물-내성 클론을 8 내지 9일간 발육시켰다. 클론을 가려내고, 트립신화시 키고, 두 부분으로 나누고, 더 확대시켰다. 그 다음, 각각의 클론으로부터 유도된 세포의 절반 및 나머지 절반을 벡터와 표적 서열간의 상동성 재조합에 대해 분석하였다.

[0280]

DNA 분석은 서던 블롯 하이브리드화에 의해 수행하였다. 레어드(Laird, P.W.) 등의 문헌[Nucleic Acids Res., 19:4293, 1991]에 기술된 바와 같이 클론들로부터 DNA를 분리하였다. 분리된 게놈 DNA를 SpeI로 절단하고 915 bp의 SacI 절편, 프로브 A(도 1)로 탐색하였는데, 상기 프로브는 mu 인트론 증강제 및 mu 전환 영역 사이의 서열에 하이브리드화된다. 프로브 A는 야생형 좌위로부터 9.9 kb의 SpeI 절편과, CMD 표적화 세포와 상동적으로 재조합된 mu 좌위로부터의 진단용 7.6 kb 밴드를 검출한다(네오 발현 카세트는 SpeI 부위를 함유한다). 서던 블롯 분석에 의해 선별된 1132 G418 및 FIAU 내성 클론들 중에서, 3개 클론이 mu 좌위에서 상동성 재조합을 나타내는 7.6 kb의 SpeI 밴드를 나타내었다. 상기 3개의 클론을 효소 BglII, BstXI 또는 EcoRI으로 더 절단하여 벡터가 mu 유전자에 상동적으로 통합되었음을 확인하였다. 프로브 A로 하이브리드화한 경우, BglII, BstXI 또는 EcoRI으로 절단된 야생형 DNA의 서던 블롯 결과 각각 15.7, 7.3 및 12.5 kb의 절편이 확인된 한편, 표적화된 mu 대립유전자의 존재는 각각 7.7, 6.6 및 14.3 kb의 절편으로 확인되었다. SpeI 절단에 의해 검출된 3개의 양성 클론은 모두 예상된 BglII, BstXI 및 EcoRI 제한 절편을 나타내어 네오 카세트가 Cmu1 엑손에 삽입되었음을 나타내었다.

[0281]

돌연변이 mu 유전자를 갖는 마우스의 생성

[0282]

264, 272 및 408번으로 표시한, 3개의 표적화된 ES 클론을 해동하고 브래들리(Bradley, A.)의 문헌[Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach. (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 113-151]에 기술된 바와 같이 C57BL/6J 배반포에 주입하였다. 주입된 배반포를 가(假)임신한 암컷의 자궁으로 옮겨 유입 ES 세포 및 숙주 배반포로부터 유도된 세포의 혼합물을 나타내는 키메라성 마우스를 생성하였다. 키메라에 대한 ES 세포의 기여 정도는 흑색의 C57BL/6J 배경 상의, ES 세포주로부터 유도된 아코티 가죽의 착색량에 의해 시각적으로 평가할 수 있다. 272 및 408번 클론은 낫은 비율의 키메라(즉, 낫은 비율의 아고티 착색) 만을 생성하였으나, 264번 클론은 높은 비율의 수컷 키메라를 생성하였다. 이들 키메라를 C57BL/6J 암컷이 양육하고 아고티 새끼를 출산하여, ES 세포 게놈의 생식선 전달을 입증하였다. 표적화된 mu 유전자에 대한 선별은 꼬리 생체검사로부터 BglII 절단된 DNA의 서던 블롯 분석에 의해 수행하였다(ES 세포 DNA의 분석에 대해 상기에서 기술한 바와 같음). 대략 50%의 아고티 새끼가 15.7 kb의 야생형 밴드 이외에 7.7 kb의 하이브리드화 BglII 밴드를 나타내어, 표적화된 mu 유전자의 생식선 전달을 입증하였다.

[0283]

mu 유전자의 기능적 불활성화에 대한 유전자변형 마우스의 분석

[0284]

Cmu1에 네오 카세트를 삽입한 것이 Ig 중쇄 유전자를 불활성화시켰는지 여부를 측정하기 위해, 264번 클론의 키메라를, JH 유전자 단편의 결실의 결과로서 중쇄 발현을 불활성화시키는 JHD 돌연변이에 대한 동형접합성 마우스로 하여금 양육시켰다(첸(Chen) 등의 문헌[ImmunoI., 5:647-656, 1993]). 4마리의 아고티 새끼가 출산되었다. 이들 동물이 1개월 되었을 때 그로부터 혈청을 수득하여 ELISA에 의해 쥐 IgM의 존재에 대해 분석하였다. 4마리 새끼중 2마리가 IgM이 완전히 결여되었다(표 1). BglII 절단 및 프로브 A(도 1)와의 하이브리드화, 및 StuI 절단 및 475 bp EcoRI/StuI 절편과의 하이브리드화(같은 장소에)에 의해 꼬리 생체검사로부터 DNA의 서던 블롯 분석으로 4마리 동물들의 유전자형을 확인한 결과 혈청 IgM을 발현시키지 못한 동물들은 중쇄 좌위의 하나의 대립유전자가 JHD 돌연변이를 수행하고 다른 대립유전자는 Cmu1 돌연변이를 수행한 것임이 입증되었다. JHD 돌연변이에 대한 동형접합성 마우스는 야생형 수준의 혈청 Ig를 나타낸다. 상기 데이터는 Cmu1 돌연변이가 mu 유전자의 발현을 불활성화시킴을 입증한다.

표 1

[0285]

CMD 및 JHD 돌연변이 둘 다를 수행한 마우스(CMD/JHD), JHD 돌연변이에 대한 동형접합성 마우스(+/JHD), 야생형(129Sv x C57BL/6J)F1 마우스(+/+) 및 JHD 돌연변이에 대한 동형접합성의 B 세포 결핍 마우스(JHD/JHD)에 대해, ELISA로 검출한 혈청 IgM의 수준

마우스	혈청 IgM (μ g/ml)	Ig H쇄 유전자형
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6F1	153	+/+
JHD	<0.002	JHD/JHD

[0286] 실시예 2. HCo12 유전자변형 마우스의 생성

[0287] HCo12 인간 중쇄 변형유전자

[0288] pH2C(테일러(Taylor) 등의 문헌[*Int. Immunol.*, 6:579-591, 1994])의 80 kb 삽입물 및 pVx6의 25 kb 삽입물의 동시주입에 의해 HCo12 변형유전자를 생성하였다. 플라스미드 pVx6은 하기에 기술된 바와 같이 제작하였다.

[0289] 약 2.5 kb의 5' 측면 및 5 kb의 3' 측면 계놈 서열과 함께 생식선 인간 VH1-18(DP-14)을 포함하는 8.5 kb HindIII/Sal1DNA 절편을 플라스미드 벡터 pSP72(미국 위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가(Promega))에 서브클로닝하여 플라스미드 p343.7.16을 생성하였다. 약 5 kb의 5' 측면 및 1 kb의 3' 측면 계놈 서열과 함께 생식선 인간 VH5-51(DP-73) 유전자를 포함하는 7 kb BamHI/HindIII DNA 절편을 pBR322 기재 플라스미드 클로닝 벡터 pGP1f(테일러 등의 문헌[Nucleic Acids Res., 20:6287-6295, 1992])에 클로닝하여 플라스미드 p251f를 생성하였다. pGP1f, pGP1k로부터 유도된 새로운 클로닝 벡터(서열번호: 1)를 EcoRV/BamHI으로 절단하고, 약 4 kb의 5' 측면 및 5 kb의 3' 측면 계놈 서열과 함께 생식선 인간 VH3-23(DP47) 유전자를 포함하는 10 kb EcoRV/BamHI DNA 절편에 접합하였다. 생성된 플라스미드 p112.2RR.7을 BamHI/SalI으로 절단하고 p251f의 정제된 7 kb BamHI/SalI 삽입물과 접합하였다. 생성된 플라스미드 pVx4를 XhoI으로 절단하고 p343.7.16의 8.5 kb XhoI/SalI 삽입물과 접합하였다. 다른 2개의 V 유전자와 동일한 배향으로 VH1-18 유전자를 갖는 클론을 수득하였다. 이어서, pVx6로 지칭된 상기 클론을 NotI으로 절단하고, 호간(B. Hogan) 등의 문헌 [Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY, 1994]에 기술된 바와 같이, 정제된 26 kb 삽입물을 pH2C의 정제된 80 kb NotI 삽입물과 함께 1:1 률비로 12시간 된 (C57BL/6J x DBA/2J)F2 배의 전핵에 동시주입하였다. Vx6 및 HC2 둘 다로부터의 서열을 포함하는 무관한 3 계통의 유전자변형 마우스들을, 주입된 배로부터 전개된 마우스로부터 확립하였다. 상기 계통들은 (HCo12)14881, (HCo12)15083 및 (HCo12)15087로 지칭하였다. 이어서, 3 계통 각각을 실시예 1에서 기술한 CMD 돌연변이, JKD 돌연변이(챈 등의 문헌[EMBO J., 12:811-820]) 및 (KCo5)9272 변형유전자(파시와일드 등의 문헌 [Nature Biotechnology, 14:845-851, 1996])를 포함하는 마우스로 하여금 양육시켰다. 생성된 마우스는 내인성 마우스 중쇄 및 카파 경쇄 좌위의 파괴에 대한 동형접합성 배경에서 인간 중쇄 및 카파 경쇄 변형유전자를 발현시킨다.

[0290] 실시예 3. 인간 IgG 카파 항-인간 CTLA-4 단일클론 항체의 생성

[0291] 세포 기재 항원

[0292] 인간 CTLA-4 및 쥐 CD3제타 유전자로부터의 서열을 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 DNA 단편을 가교 합성 올리고뉴클레오티드와 함께 cDNA의 PCR 증폭에 의해 제작하였다. 암호화된 융합 단백질은 하기 서열들을 함유 한다: i) 1 내지 190번 아미노산을 암호화하는 인간 CTLA-4(단일 웨타이드, 인간 CTLA-4의 세포외 영역 및 인간 CTLA-4의 추정 막투과 서열 전체 함유), 및 ii) 52번 아미노산으로부터 카복시 말단까지의 쥐 CD3제타(웨이스만 (Weissman) 등의 문헌[Science, 239:1018-1021, 1988]). 증폭된 PCR 생성물을 플라스미드 벡터에 클로닝하고 DNA 서열을 결정하였다. 이어서, 클로닝된 삽입물을 벡터 pBABE(퓨로마이신 내성을 암호화하는 유전자 함유(모간스턴(Morganstern, JP) 및 랜드(Land, H.)의 문헌[Nucleic Acids Res., 18:3587-3596, 1990])에 서브클로닝하여 pBABE-huCTLA-4/CD3z를 생성하였다. pBABE-huCTLA-4/CD3z를 레트로바이러스 패키징 계통, Psi-2에 형질감염시키고, 퓨로마이신 내성을 세포의 풀을 선별하였다. 이들 세포를 쥐 T 세포 하이브리도마 BW5147(ATCC #TIB-47)과 함께 공(共)배양하였다. 공배양 2일 후에, 비-부착성 BW5147 세포를 제거하고 퓨로마이신에 대한 내성에 대해 선별하였다. 퓨로마이신 내성 세포 풀을 제한 회석법으로 서브클로닝하고 FACS에 의해 인간 CTLA-4의 표면 발현에 대해 시험하였다. 세포 표면에서 높은 수준의 인간 CTLA-4를 발현하는 클론을 선택하였다.

[0293] 가용성 항원

[0294] 인간 CTLA-4의 세포외 영역을 포함하는 재조합 CTLA-4 융합 단백질을 R&D 시스템(Cat. #325-CT-300)으로부터 구입하였다. CTLA-4 세포외 영역의 C-말단 다음에 위치한 인자 Xa 프로테아제 분열 부위에서 CTLA-4 융합 단백질의 단백질분해성 분열에 의해 세포외 CTLA-4 절편을 제조하였다. 융합 단백질을 50:1의 융합 단백질 대 인자 Xa의 비로 인자 Xa로 처리하고, 단백질 G-세파로즈 및 모노 Q HPLC 상에 통과시켜 CTLA-4 절편을 분리하였다. 분획들을 SDS-PAGE에 의해서 및 마우스 B7 분자를 발현하는 세포(LtkmB7.1: 마우스 B7.1 cDNA 클론 발현 벡터로 형질감염된 마우스 Ltk(-) 세포)에 결합시킴으로써 인간 CTLA-4 이량체의 존재에 대해 시험하였다. 양성 분획을 모아서 PBS 완충액으로 투석하였다.

유전자변형 마우스

[0295] 2개의 상이한 계통의 마우스를 이용하여 CTLA-4 반응성 단일클론 항체를 생성하였다. 계통 ((CMD)++ ; (JKD)++ ; (HCo7)11952++ ; (KCo5)9272++), 및 계통 ((CMD)++ ; (JKD)++ ; (HCo12)15087++ ; (KCo5)9272++). 상기 계통은 각각 내인성 중쇄(CMD) 및 카파 경쇄(JKD) 좌위의 파괴에 대해 동형접합성이다. 두 계통은 모두 또한 인간 카파 경쇄 변형유전자(KCo5)를 포함하는데, 개개의 동물들은 삽입 #11952에 대해 반접합성 또는 동형접합성이다. 두 계통은 사용된 인간 중쇄 변형유전자가 상이하다. 마우스들은 HCo7 또는 HCo12 변형유전자에 대해 반접합성 또는 동형접합성이었다. CMD 돌연변이는 상기 실시예 1에서 기술하였다. (HCo12)15087 마우스의 생성은 실시예 2에 기술되어 있다. JKD 돌연변이(챈 등의 문헌[*EMBO J.*, **12**:811-820, 1993]) 및 (KCo5)9272(피시와일드 등의 문헌[*Nature Biotechnology*, **14**:845-851, 1996]) 및 (HCo7)11952 마우스는 미국 특허 제 5,770,429 호(론버그 및 케이(Lonberg & Kay), 1998. 6. 23)에 기술되어 있다.

면역

[0298] 변형유전자 마우스를 초기에 PBS 중의 1 내지 3×10^7 세포, 또는 보조제(완전 프로인트 보조제 또는 리비(Ribi) 보조제) 중의 10 내지 50 μg 가용성 융합 단백질로 복강내로 면역시켰다. 면역된 마우스를 연속하여 2 내지 4 주마다 PBS 중의 1 내지 3×10^7 세포로 복강내로 증폭시켰다. 동물들을 프로토콜 상에 2 내지 5 개월간 유지시켰다. 융합전에, 동물들을 -3일 및 -2일째에 약 10^6 세포, 또는 10 내지 20 μg 의 가용성 항원(융합 단백질 또는 융합 단백질 및 세포외 절편)으로 정맥내로 증폭시켰다. 일부 동물들에는 또한 -4일째에 융합 단백질을 정맥내로 공급하였다. 세포 단독으로 면역, 가용성 항원 단독으로 면역, 및 세포 면역 후 융합전에 정맥내로 가용성 항원으로 면역시킴을 포함하여, 다양한 상이한 프로토콜에 의해 면역된 마우스로부터 CTLA-4 반응성 IgG 카파 단일클론 항체를 생성하는 성공적인 융합체를 수득하였다.

융합

[0300] 저라 세포를 표준 절차[Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, 1988; Kennett et al., *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis*, Plenum, New York, 1980; Oi and Hertzenberg, *Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines*, in *Selected Methods In Cellular Immunology*, ed. Mishell and Shiigi, pp. 357-372, Freeman, San Francisco, 1980; Halk, *Methods in Enzymology: Plant Molecular Biology*, ed. Weissbach and Weissbach, pp. 766-780, Academic Press, Orlando, FL, 1984]에 의해 마우스 글수종 세포(세포주 P3 X63 Ag8.6.53, ATCC CRL 1580, 또는 SP2/0-Ag14, ATCC CRL 1581)에 융합시켰다. DMEM, 10% FBS, OPI(시그마(Sigma) 0-5003), BME(깁코(Gibco) 21985-023), 3% 오리겐 하이브리도마 클로닝 인자(Origen Hybridoma Cloning Factor; 아이젠(Igen) IG50-0615) 및 5% P388d1(ATCC TIB 63) 조정된 배지에서 세포를 배양하였다. HAT 또는 HT 보충 배지를 초기 성장 및 선별 중에 배지에 가하였다.

하이브리도마 선별

[0302] 인간 IgG 카파 항체를 분비하는 하이브리도마를 동정하기 위해, ELISA 플레이트(년크 맥시소프(Nunc MaxiSorp))를 4 °C에서 PBS 중 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 100 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 염소 항-인간 Fc γ 특이적 항체(잭슨 임무노 리서치(Jackson Immuno Research #109-006-098)로 밤새 코팅하였다. 플레이트를 세척하고 1% BSA를 함유하는 100 $\mu\text{l}/\text{웰}$ PBS-트윈(Tween)으로 봉쇄하였다. 50 μl 의 세포 배양 상등액을 가한 다음 1 내지 2 시간동안 배양하였다. 플레이트를 세척한 후, 알칼리 포스파타제 또는 양고추냉이 페옥시다제(시그마 #A-3813 또는 #A-7164)에 결합된 100 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 염소 항-카파 경쇄와 함께 1 시간동안 배양하였다. 플레이트를 각 단계 사이에 PBS-트윈으로 3회 세척하였다. 유사한 분석법을 이용하여 인간 CTLA-4와 반응성인 인간 항체를 분비하는 하이브리도마를 동정하였다. 상기 분석은 ELISA 플레이트를 염소 항-인간 Fc γ 항체 대신 재조합 CTLA-4 융합 단백질로 코팅하는 것을 제외

하고 동일하였다.

단일클론 항체의 특성화

[0303] ELISA에 의해 인간 CTLA-4에 카파 결합하는 인간 IgG를 분비하는 것으로 나타난 72개의 하이브리도마를 서브클로닝하였다. 상기 서브클론 중 47개를 시험하여 분비된 인간 항체가 CTLA-4 발현 세포에 결합하는지, 및 항체가 가용성 CTLA-4가 B7을 발현하는 세포에 결합하는 것을 억제하는지를 측정하였다. 결합은 유동세포측정법으로 측정하였다. 저해율을 측정하기 위해, 50 μ l의 각각의 상등액을 10^5 LtkmB7.1 세포 및 25 ng의 재조합 CTLA-4 융합 단백질과 함께 배양하였다. 이어서, 유동세포측정법에 의해 평균 채널 형광성을 측정하였다. 도 2a 및 2b는 B7.1을 발현하는 세포에 대한 가용성 CTLA-4 결합의 억제를 나타낸다. 재조합 인간 CTLA-4 융합 단백질로 염색된 LtkmB7.1 세포의 평균 채널 형광성(MCF)은 하이브리도마 상등액의 존재하에서 측정하였다. 차단 항체를 분비하는 하이브리도마는 더 낮은 MCF 값을 나타내었다. BNI3.1(Cat. #34580D, 캘리포니아주 샌디에고 소재의 파르밍엔(Pharmingen))을 CTLA-4/B7 결합을 차단하는 양성 대조용 마우스 단일클론 항체로 사용하였다.

[0305] 약 40%의 하이브리도마가 B7 리간드에 대한 CTLA-4의 결합을 강하게 억제하는 것으로 보인다.

[0306] 이어서, 클론 10D1.3, 4B6.12 및 11E8로부터의 항체를 비아코어(BIAcore; 스웨덴 업살라 소재의 비아코어(Biacore) AB)에 의해 분석하여 결합 역학을 측정하였다. 정제된 재조합 CTLA-4 세포의 절편을 1200 RU에서 CM5 센서 침에 커플링시켰다. 결합은 5 μ l/분의 유량으로 0.25, 0.5, 1, 2.5 및 5 μ g/ml의 농도로 항체를 가하여 측정하였다. 결합 곡선은 비아 평가(BIAevaluation) 소프트웨어(스웨덴 업살라 소재의 비아코어 AB)를 이용한 랑그무어(Langmuir) 결합 모델에 들어맞았다. 항체를 단백질-A 세파로즈 크로마토그래피로 정제하였다. 측정된 온 앤드 오프(on and off) 속도를 표 2에 나타내었다.

표 2

표면상에 고정화된 재조합 CTLA-4에 대한 인간 IgG 카파 항체의 결합 역학			
하이브리도마	ka(1/Ms)	kd(1/s)	Ka(1/M)
10D1.3	4.1×10^5	1.0×10^{-4}	4×10^9
4B6.12	5.1×10^5	1.3×10^{-4}	4×10^9
11E8	4.3×10^5	1.8×10^{-4}	2×10^9

[0307] 10개의 상이한 인간 IgG 카파 항-인간 CTLA-4 단일클론 항체(3A4, 9A5, 2E2, 2E7, 4B6, 4E10, 5C4, 5G1, 11E8 및 11G1)의 단계적 희석물을 재조합 CTLA-4 융합 단백질로 코팅된 마이크로타이터 웰에 가하였다. 2 시간 배양한 후, 비오틴화 항체 11E8을 0.1 μ g/ml의 농도로 각 웰에 가하였다. 샘플을 30 분간 배양하고, 세척하고, 알칼리 포스파타제/스트렙타비딘 결합체로 검출된 항체를 결합시켰다. 역가측정 결과 도 3에 나타내었다. 항체 11E8 결합은 그 자체 및 7개의 다른 인간 항체들에 의해 차단되었다. 그러나, 3A4 또는 9A5에 의해서는 결합이 차단되지 않았다. 역 결합 실험 결과 11E8 결합은 CTLA-4에 대한 3A4 또는 9A5의 결합을 차단하지 않는 것으로 나타났다.

DNA 서열

[0309] 각각의 서브클로닝된 하이브리도마 세포주의 약 2×10^6 세포로부터 RNA를 추출하고, 인비트로겐의 시약과 프로토콜(마이크로-페스트트랙(Micro-FastTrack) 및 cDNA 사이클: Cat. #1310-01, 및 #K1520-02, 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로겐(Invitrogen))을 사용하여 cDNA를 합성하는데 이용하였다. 인간 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 V 영역 절편을 pfu 폴리머라제(캘리포니아주 라 졸라 소재의 스트라타진)를 이용한 PCR에 의해 증폭시키고, FR1 프라이머 및 유일한 불변 영역 프라이머를 변성시켰다. 생성된 PCR 절편을 pCR-Blunt 벡터(캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로겐)에 클로닝하고, 삽입물의 서열을 결정하였다. 하이브리도마 10D1.3의 중쇄 및 경쇄 절편에 대한 예비 서열을 도 4a 및 4b에 나타내었다. 하이브리도마 10D1.3의 중쇄 및 경쇄 절편에 대한 결정된 서열은 도 5a 내지 도 8b에 나타내었다.

표 3

[0311] MAb 10D1, 4B6 및 1E2에 대한 경쇄 및 중쇄의 CDR 서열

쇄	Hu MAb	CDR1	서열번호	CDR2	서열번호	CDR3	서열번호
경쇄	10D1	RASQSVGSSYLA	24	GAFSRAT	29	QQYGSSPWT	35
	4B6	RASQSVSSSFLA	25	GASSRAT	30	QQYGSSPWT	35
	1E2	RASQGISSWLA	26	AASSLQS	31	QQYNSYPPT	36
중쇄	10D1	SYTMH	27	FISYDGNNKYYADSV KG	32	TGWLGPFDY	37
	4B6	SYTMH	27	FISYDGDSNKHYADSV KG	33	TGWLGPFDY	37
	1E2	SYGMH	28	VIWYDGDSNKYYADSV KG	34	APNYIGAFDV	38

[0312] 실시예 4. 온전한 항체를 발현시키기 위한 부분 항체 서열의 이용

[0313] 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDR)에 위치한 아미노산 잔기를 통해 표적 항원들과 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 CDR 외부의 서열보다 개개 항체들 사이에서 더 상이하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호작용을 유발하기 때문에, 상이한 성질을 갖는 상이한 항체로부터 골격 서열 위에 이식된 특이적 천연 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 제작함으로써 특이적 천연 항체의 성질과 유사한 성질을 갖는 재조합 항체를 발현할 수 있다(존스(Jones) 등의 문헌[Nature, 321:522-525, 1986]). 상기 골격 서열은 생식선 항체 유전자 서열을 포함하는 공용 DNA 데이터베이스로부터 수득할 수 있다. 이들 생식선 서열은 B 세포의 성숙 중에 V(D)J 결합에 의해 형성되는 완전히 구성된 가변 유전자를 포함하지 않을 것이기 때문에 상기 서열은 성숙한 항체 유전자 서열과는 상이할 것이다. 생식선 유전자 서열은 또한 체세포 돌연변이로 인해 개개 뉴클레오티드에서의 고친화성 2차 래퍼토리 항체의 서열과 상이할 것이다. 그러나, 체세포 돌연변이는 가변 영역에 걸쳐 고르게 분포하지 않는다. 예를 들면, 체세포 돌연변이는 골격 영역 1의 아미노-말단 부분 및 골격 영역 4의 카복시-말단 부분에는 비교적 드물다. 또한, 많은 체세포 돌연변이는 항체의 결합성을 현저히 변화시키지는 않는다. 이러한 이유로, 원래의 항체와 유사한 결합성을 갖는 온전한 재조합 항체를 재현하기 위해 특정 항체의 전체 DNA 서열을 구할 필요는 없다(본원에 참고로 인용된, 1999년 3월 12일자로 출원된 PCT/US99/05535 호 참조). CDR 영역에 걸쳐 있는 특정 부분 중쇄 및 경쇄 서열이 전형적으로 상기 목적에 충분하다. 부분 서열을 이용하여 어떤 생식선 가변성 및 결합 유전자 단편이 재조합 항체 가변 유전자에 기여하는지를 측정할 수 있다. 그런 다음, 생식선 서열을 이용하여 가변 영역의 소실 부분을 채운다. 중쇄 및 경쇄 선도 서열은 단백질 성숙 중에 분열되며 최종 항체의 성질에는 관여하지 않는다. 이러한 이유로, 발현 구조체에 상응하는 생식선 선도 서열을 사용할 필요가 없다. 소실 서열을 부가하기 위해, 클로닝된 cDNA 서열을 접합 또는 PCR 증폭에 의해 합성 올리고뉴클레오티드와 결합시킬 수 있다. 또는, 전체 가변 영역을 한 세트의 짧고 중복되는 올리고뉴클레오티드로서 합성하고 PCR 증폭에 의해 결합시켜 전체 합성 가변 영역 클론을 생성할 수 있다. 상기 공정은 특정 제한효소 부위의 배제 또는 혼입, 또는 특정 코돈의 최적화와 같은 특정한 이점들을 갖는다.

[0314] 하이브리도마로부터 전사된 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오티드 서열을 이용하여 천연 서열과 동일한 아미노산 암호화 능력을 갖는 합성 V 서열을 생성하기 위한 합성 올리고뉴클레오티드의 중복되는 세트를 설계한다. 합성 중쇄 및 카파 경쇄 서열은 다음 3가지 방법으로 천연 서열과 상이할 수 있다: 반복되는 뉴클레오티드 염기의 열을 차단시켜 올리고뉴클레오티드 합성 및 PCR 증폭을 용이하게 하고; 최적 변역 개시 부위를 코작(Kozak) 규칙에 따라 삽입하고(코작의 문헌[J. Biol. Chem., 266:19867-19870, 1991]); HindIII 부위를 변역 개시 부위의 상류에 형성한다.

[0315] 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 다에 대해, 암호화 스타랜드 서열에 대한 뉴클레오티드들 사이의 파괴가 대략 상응하는 비-암호화 올리고뉴클레오티드의 중앙에서 일어나도록, 최적화된 암호화 및 상응하는 비-암호화 스타랜드 서열을 30 내지 50개 뉴클레오티드 단편으로 설계한다. 따라서, 각각의 쇄에 대해, 올리고뉴클레오티드를 목적하는 서열에 완전히 걸치는 중복되는 이중 스타랜드 세트로 조립될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 150 내지 400개 뉴클레오티드의 단편들에 이르는 풀로 모은다. 이어서, 상기 풀을 주형으로 사용하여 150 내지 400개 뉴클레오티드의 PCR 증폭 생성물을 생성한다. 전형적으로, 단일 가변 영역 올리고뉴클레오티드 세트는 2개의 풀로 파괴하고, 이들을 따로따로 증폭시켜 2개의 중복되는 PCR 생성물을 생성할 것이다. 그 다음, 상기 중

복되는 생성물을 PCR 증폭에 의해 결합시켜 완전한 가변 영역을 형성한다. PCR 증폭에 중쇄 또는 경쇄 불변 영역(카파 경쇄의 BbsI 부위 또는 감마 중쇄의 AgeI 부위 포함)의 중복되는 절편을 포함시켜 발현 벡터 구조체에 용이하게 클로닝될 수 있는 절편을 생성하는 것도 또한 바람직할 수 있다.

[0316] 이어서, 재구성된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 클로닝된 프로모터 서열, 번역 개시 서열, 불변 영역 서열, 3' 미 번역 서열, 폴리아데닐화 서열 및 전사 종료 서열과 결합시켜 발현 벡터 구조체를 생성한다. 중쇄 및 경쇄 발현 구조체는 단일 벡터에 결합되거나, 숙주 세포에 동시에 형질감염되거나, 순차적으로 형질감염되거나 또는 따로 따로 형질감염된 다음, 융합되어 두 쇄를 모두 발현하는 숙주 세포를 생성할 수 있다.

[0317] 인간 IgGk에 대한 발현 벡터의 제작에 사용하기 위한 플라스미드를 하기에서 설명한다. PCR 증폭된 V 중쇄 및 V 카파 경쇄 cDNA 서열을 이용하여 완전한 중쇄 및 경쇄 미니유전자(minigene)를 재구성할 수 있도록 플라스미드를 제작하였다. 이들 플라스미드를 이용하여 인간 또는 키메라성 IgG1k 또는 IgG4k 항체를 완전히 발현시킬 수 있다. 플라스미드를 다른 중쇄 동종형의 발현을 위해, 또는 람다 경쇄를 포함하는 항체의 발현을 위해 유사한 플라스미드를 제작할 수 있다.

[0318] 카파 경쇄 플라스미드 pCK7-96(서열번호: 39)은 카파 불변 영역 및 폴리아데닐화 부위를 포함하여, 개시제 메티오닌의 상류에 HindIII 부위를 포함하는 5' 프라이머를 사용하여 증폭된 카파 서열을 HindIII 및 BbsI으로 절단하고 HindIII 및 BbsI으로 절단된 pCK7-96에 클로닝하여 폴리아데닐화 부위와 함께 완전한 경쇄 암호화 서열을 재구성할 수 있다. 상기 카세트는 HindIII/NotI 절편으로 분리하고 전사 프로모터 서열에 접합하여 세포에 형질감염시키기 위한 기능성 미니유전자를 생성할 수 있다.

[0319] 감마1 중쇄 플라스미드 pCG7-96(서열번호: 40)은 인간 감마1 불변 영역 및 폴리아데닐화 부위를 포함하여, 개시제 메티오닌의 상류에 HindIII 부위를 포함하는 5' 프라이머를 사용하여 증폭된 감마 서열을 HindIII 및 AgeI으로 절단하고 HindIII 및 AgeI으로 절단된 pCG7-96에 클로닝하여 폴리아데닐화 부위와 함께 완전한 감마1 중쇄 암호화 서열을 재구성할 수 있다. 상기 카세트는 HindIII/SalI 절편으로 분리하고 전사 프로모터 서열에 접합하여 세포에 형질감염시키기 위한 기능성 미니유전자를 생성할 수 있다.

[0320] 감마4 중쇄 플라스미드 pG4HE(서열번호: 41)는 인간 감마4 불변 영역 및 폴리아데닐화 부위를 포함하여, 개시제 메티오닌의 상류에 HindIII 부위를 포함하는 5' 프라이머를 사용하여 증폭된 감마 서열을 HindIII 및 AgeI으로 절단하고 HindIII 및 AgeI으로 절단된 pG4HE에 클로닝하여 폴리아데닐화 부위와 함께 완전한 감마4 중쇄 암호화 서열을 재구성할 수 있다. 상기 카세트는 HindIII/EcoRI 절편으로 분리하고 전사 프로모터 서열에 접합하여 세포에 형질감염시키기 위한 기능성 미니유전자를 생성할 수 있다.

[0321] 많은 상이한 프로모터(CMV, 유비퀴틴, SR알파 및 베타-액틴 포함)를 이용하여 중쇄 및 경쇄 유전자를 재구성할 수 있다. 예를 들면, 벡터 pCDNA3.1+(캘리포니아 칼스베드 소재의 인비트로겐)은, 전술한 카파, 감마1 또는 감마4 카세트와 접합되어 포유동물 세포에 직접 형질감염될 수 있는 발현 벡터를 형성하기 위해 HindIII 및 NotI, XhoI 또는 EcoRI에 의해 분열될 수 있다.

실시예 5. CTLA-4에 대한 10D.1의 결합

A. 정제된 재조합 인간 CTLA-4에 대한 10D1의 결합

[0324] 정제된 재조합 인간 CTLA-4에 대한 10D1의 결합을 표준 방법 및 프로토콜을 이용하여 ELISA에 의해 확인하였다 (도 9 및 도 10). 정제된 CTLA-4로 코팅된 마이크로 플레이트를 다양한 농도의 10D1과 함께 배양한 후 알칼리 포스파타제에 결합된 염소 항-인간 IgGF(ab')₂로 전개시켰다. 데이터는 4-파라미터 곡선(상관 계수가 -1.0임)에 잘 들어맞는 10D1의 투여량-의존성 결합을 입증한다. 15 ng/ml에서의 반-최대 결합은 CTLA-4에 대한 10D1의 높은 결합 능력을 나타낸다. 결합의 포화상태는 약 0.1 μ g/ml에서 관찰하였다.

B. T-세포의 원형질막 상에서 발현된 CTLA-4에 대한 10D.1 결합

[0326] T-세포의 원형질막 상에서 발현된 CTLA-4에 대한 10D1의 결합을 입증하기 위해, 유동세포측정 분석법에서 얻은 결과를 도 10에 나타내었다. 유동세포측정 분석법은 높은 수준의 인간 CTLA-4를 발현하도록 형질감염된 T-세포 주(58 α β CTLA-4/CD3재타 세포로 지칭됨)와 함께 이용하였다. 세포 결합된 형광성을 유동세포측정법으로 측정하였다. 정제된 CTLA-4의 경우에서 보이듯이, 10D1은 4-파라미터 방정식(상관 계수가 -0.999임)에 잘 들어맞는 투여량-의존성 방식으로 CTLA-4 발현 세포에 결합하였다. 반-최대 결합은 190 ng/ml이었으며, 포화는 2 μ g/ml에서 이루어졌다. 10D1은 SKBR-3, BT474 및 MCF10A 유방 상피 종양 및 L540 호즈킨(Hodgkin) 종양 세포를 포함하여 시험된 임의의 CTLA4-음성 세포주에는 결합하지 않았으며, 쥐 CTLA-4를 발현하는 세포에도 결합하지 않

았다. 이러한 데이터는 인간 CTLA에 대한 10D1의 특이성을 나타낸다. 그러나, 10D1은 짧은 꼬리 원숭이 CTLA-4와 교차 반응하는 것으로 나타났다(하기 참조).

[0327] **C. 정상 인간 조직과 10D1의 교차 반응성**

[0328] 본 연구에서는, 플루오레신화된(fluoresceinated) 형태의 시험 제품(10D1-FITC)을 사용하여 결합을 평가하였다. 상기 연구의 목적은 정상 인간 조직의 동결절편(cryosection)과의 10D1-FITC의 잠재적인 교차 반응성을 평가하는 것이었다. 예상치 못한 교차 반응성은 관찰되지 않았다.

[0329] 본 연구는 식품의약청의 GLP 법규(the Food and Drug Administration's Good Manufacturing Practice(GLP) Regulations)(2.1 CFR 파트 58)에 따라 수행하였다. 인간 조직 패널은 [Annex II of the EC CPMP Guideline III/5271/94, "Production and quality control of monoclonal antibodies"]의 "교차 반응성의 면역조직화학적 조사를 위해 사용될 인간 조직의 제안된 목록(suggested list of human tissues to be used for immunohistochemical investigations of cross reactivity)"에 있는 모든 조직 및 [1997 US FDA/CBER "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use"]에 추천된 모든 조직을 포함하였다.

[0330] 간접적 면역페옥시다제 방법을 이용하여, 10D1-FITC는 양성 대조용의, 인간 CTLA-4를 발현하는 58 α β CTLA4CD3 제타 세포, 및 양성 대조용의 인간 편도선 림프구를 특이적으로 염색시켰다. 10D1-FITC 반응성은 중간 내지 강한 정도였고, 두 농도의 항체를 시험하였다($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 및 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$). 양성 대조용 58 α β CTLA4CD3제타 및 양성 대조용 인간 편도선 림프구 둘 다에서, 10D1-FITC는 막에서 및 막 바로 밑의 세포질에서 등근 이산 과립들을 특이적으로 염색시켰다. 임시 여포, 여포내 및 상피하 림프구와의 반응성이 관찰되었다. 모든 편도선 림프구의 1 내지 2% 미만이 10D1-FITC와 반응성이었다.

[0331] 10D1-FITC는 음성 대조용 인간 뇌(소뇌)와는 반응하지 않았다. 동종형에 필적하는 음성 대조용 항체(HuIgG1-k-FITC)는 양성 대조용 인간 CTLA4-발현 58 α β CTLA4CD3제타 또는 인간 편도선에 특이적으로 결합하지 않았으며; 음성 대조용 인간 뇌(소뇌)에도 특이적으로 결합하지 않았다.

[0332] 교차 반응성을 측정하기 위해, 10D1-FITC를 두 농도($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 및 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)의 정상 인간 조직 패널에 적용하였다. 특이적 10D1-FITC 반응성은 편도선 림프구(3/3 공여체), 결장 내의 점막하 림프절(위장관-결장[1/3 공여체]) 및 혈액 도말표본(2/3 공여체)에서 관찰되었다.

[0333] 면역반응성 세포는 전형적인 형태학(높은 핵:세포질 비 및 빈약한 세포질, 수상 둘기의 결여, 10 내지 $15 \mu\text{m}$ 의 직경을 갖는 등근 분자 세포) 및 조직 내의 위치(예를 들면, 림프 조직내의 전형적인 위치)를 근거로 림프구로 확인되었다. 모든 세 개의 공여체(시험 조직)로부터 편도선 림프구에서, 10D1-FITC는 막에서 및 막 바로 밑의 세포질에서 등근 이산 과립들을 특이적으로 염색시켰다. 임시 여포, 여포내 및 상피하 림프구와의 반응성이 관찰되었다. 모든 편도선 림프구의 1 내지 2% 미만이 10D1-FITC와 반응성이었다.

[0334] 시험된 1/3 공여체에서, 10D1-FITC는 또한 결장 내의 점막하 림프절(위장관-결장[대장])에 위치한 임시 여포 및 여포내 림프구 중의 이산 과립들을 특이적으로 염색시켰다. 또한, 이산 막 과립들이 염색되었다.

[0335] 시험된 세 공여체 중 두 공여체로부터의 말초혈 도말표본에서는, 10D1-FITC는 희귀 림프구의 막과 결합된 약 $1 \mu\text{m}$ 직경의 이산 과립들을 특이적으로 염색시켰다. 과립은 고리 모양 또는 굴곡 패턴으로 배열되었다. 모든 말초혈 림프구의 1 내지 2% 미만이 10D1-FITC와 반응성이었다.

표 4a

정상 인간 조직과의 MAb 10D1의 교차 반응성						
조직	시험 제품		음성 대조용 항체		분석 대조그룹*	β_2 -마이크로글로불린
	10D1-FITC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.5 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.5 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
양성 대조용 58a β CTLA4CD3체타 세포	3-4 ⁺	2-4 ⁺	음성	음성	음성	양성
양성 대조용 인간 편도선 립프구	2-3 ⁺	2-3 ⁺	음성	음성	음성	양성
음성 대조용 인간 뇌(소뇌)	음성	음성	음성	음성	음성	양성
부신	음성	음성	음성	음성	음성	양성
혈액						양성
호중구	음성	음성	음성	음성	음성	양성
립프구 (희소성)	2 ⁺	음성	음성	음성	음성	양성
호산구	음성	음성	음성	음성	음성	양성
단핵구	음성	음성	음성	음성	음성	양성
혈소판	음성	음성	음성	음성	음성	양성
모든 조직에서 시험된 혈관(내피)	각각의 조직에 대해서 상세히 나타냄					
골수	음성	음성	음성	음성	음성	양성
뇌 - 소뇌	음성	음성	음성	음성	음성	양성
뇌 - 대뇌(피질)	음성	음성	음성	음성	음성	양성
유방(유선)	음성	음성	음성	음성	음성	양성
눈	음성	음성	음성	음성	음성	양성

* 시험 항체 생략

표 4b

정상 인간 조직과의 MAb 10D1의 교차 반응성						
조직	시험 제품		음성 대조용 항체		분석 대조그룹*	β_2 -마이크로글로불린
	10D1-FITC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.5 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.5 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
위장관 - 결장(대장) 접막하 립프절(임시 여포 및 여포내 립프 구)	2-3 ⁺	2-3 ⁺	음성	음성	음성	양성
위장관 - 결장(대장) 기타 요소	음성	음성	음성	음성	음성	양성
위장관 - 씩도	음성	음성	음성	음성	음성	양성
위장관 - 소장	음성	음성	음성	음성	음성	양성
위장관 - 위	음성	음성	음성	음성	음성	양성
심장	음성	음성	음성	음성	음성	양성
신장(사구체, 세뇨관)	음성	음성	음성	음성	음성	양성
간	음성	음성	음성	음성	음성	양성
폐	음성	음성	음성	음성	음성	양성
립프절	음성	음성	음성	음성	음성	양성
난소	음성	음성	음성	음성	음성	양성
나팔관(수란관)	음성	음성	음성	음성	음성	양성
췌장	음성	음성	음성	음성	음성	양성
부갑상선	음성	음성	음성	음성	음성	양성
말초 신경	음성	음성	음성	음성	음성	양성
뇌하수체	음성	음성	음성	음성	음성	양성

* 시험 항체 생략

표 4c

[0338]

정상 인간 조직과의 MAb 10D1의 교차 반응성						
	시험 제품 10D1-FITC	음성 대조용 항체 HuIgG1-k-FITC				
조직	10 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	10 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	분석 대조그룹*	β_2 -마이크로글로불린
태반	음성	음성	음성	음성	음성	양성
전립선	음성	음성	음성	음성	음성	양성
침샘	음성	음성	음성	음성	음성	양성
피부	음성	음성	음성	음성	음성	양성
척수	음성	음성	음성	음성	음성	양성
지라	음성	음성	음성	음성	음성	양성
횡문(골격)근	음성	음성	음성	음성	음성	양성
고환	음성	음성	음성	음성	음성	양성
흉선	음성	음성	음성	음성	음성	양성
갑상선	음성	음성	음성	음성	음성	양성
편도선 림프구(임시 여포, 여포내 및 상피 하 림프구)	2 ⁺	1-2 ⁺	음성	음성	음성	양성
편도선(기타 요소)	음성	음성	음성	음성	음성	양성
수뇨관	음성	음성	음성	음성	음성	양성
방광	음성	음성	음성	음성	음성	양성
자궁 - 몸체(자궁내막)	음성	음성	음성	음성	음성	양성
자궁 - 경부	음성	음성	음성	음성	음성	양성
* 시험 항체 생략						

[0339]

D. 짧은 꼬리 원숭이 CTLA-4와 10D.1의 특이적 반응성

[0340]

짧은 꼬리 원숭이 CTLA-4와의 특이적 반응성을 짧은 꼬리 원숭이 CTLA-4를 높은 수준으로 발현하도록 형질감염된 T-세포를 이용하여 측정하였다(표 5). 상기 데이터는 10D1에 대한 CTLA-4 에피토프가 짧은 꼬리 원숭이와 인간 사이에서 보존됨을 시사하므로, 짧은 꼬리 원숭이는 항-CTLA4 HuMAb 10D1의 생체내 안전성을 평가하기에 우수한 모델이다.

표 5

[0341]

종	동종형 대조그룹의 반응성(MFI)	10D1의 반응성(MFI)
인간 CTLA4	3	662
짧은 꼬리 원숭이 CTLA4	4	606
쥐 CTLA4 (음성 대조그룹)	5	5

[0342]

MAb 10D1($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)을 다양한 종으로부터의 재조합 CTLA-4를 발현하는 세포주와 함께 배양하고, FITC-항 인간 IgG에 의해 검출하였다. 세포-결합 형광성을 FACScan으로 측정하고 평균 형광 강도(MFI)로 기록하였다. 이들 데이터는 MAb 10D1이 짧은 꼬리 원숭이 및 인간 CTLA-4와는 잘 반응하지만 쥐 CTLA-4와는 그렇지 않음을 보여준다.

[0343]

실시예 6. B7 리간드에 대한 CTLA-4의 10D1 차단

[0344]

CTLA-4에 대한 10D1의 결합은 CTLA-4와 CTLA-4 리간드, B7.1 및 B7.2와의 상호작용을 차단함을 보여주기 위해, 유동세포측정법에 의해 경쟁적 분석을 수행하였다(도 11 및 도 12). 도 11에서 볼 수 있듯이, FITC-표지된 인간 B7.2-Ig 융합 단백질을 58 α β CTLA4 T-세포 및 다양한 농도의 10D1 MAb와 함께 배양하였다. 도 12에서는, FITC-표지된 CTLA4-Ig 융합 단백질을 쥐 B7.1 형질감염된 세포 및 다양한 농도의 10D1 MAb와 함께 배양하였다.

[0345]

경쟁적 분석은 저농도(1 내지 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$)에서 CTLA4-B7 상호작용을 효과적으로 억제하는 10D1의 능력을

입증한다. 효과적인 농도는 훨씬 더 낮은 농도의 CTLA-4 및 B7 분자를 갖는 생리적 조건하에서 훨씬 더 낮을 것이다. ELISA 분석에서 비오틴화 시약을 이용하여 유사한 데이터를 수득하였다.

[0346] 이러한 시험관내 연구들은 MAb 10D1이 높은 친화도 및 특이도 하에 인간 CTLA-4에 결합하며 10D1의 결합은 B7 동시자극 분자 및 CTLA-4 사이의 상호작용을 차단함을 입증한다. 10D1에 대한 상기 데이터는 쥐 종양 모델에서 입증된 효과를 갖는 항-쥐 CTLA-4 항체에 대한 시험관내 활성 프로필과 일치한다.

실시예 6. 10D.1의 애피토프 지도작성

[0348] 비오틴 표지된 항체 및 표지되지 않은 항체를 사용하여 경쟁적 ELISA를 수행하여 CTLA-4 애피토프 특이성을 측정하였다. 4개의 항-CTLA-4 애피토프 결합 그룹이 인간 항체들 중에서 확인되었으며, 추가의 2개 애피토프는 시판하는 쥐 단일클론 항체 BNI3(캘리포니아주 샌디에고 소재의 파르밍엔) 및 8H5(미네소타주 베이포트 소재의 앤셀 코포레이션(Ancell Corp.))에 의해 정의되었다. 도 3 및 13A 내지 13G는 CTLA-4에 결합하기 위한 항체들 중에서 차별적 경쟁을 입증하는 경쟁적 결합 분석의 결과를 나타낸 것이다.

[0349] 항-CTLA-4 애피토프 결합 그룹 4a 및 4b는 유사한 결합 특성을 가지며, 또한 세포 표면 발현된 B7.1에 대한 CTLA-4-Ig 결합의 강력한 차단제이다(표 6). 예를 들면, 도 3은 비오틴 표지된 11E8 항체 및 10개의 표지되지 않은 항체들(3A4, 9A5, 2E2, 2E7, 4B6, 4E10, 5C4, 5G1, 11E8 및 11G1)에 의한 결과를 나타낸다. 항체 11E8 결합은 그 자체에 의해서 및 애피토프 그룹 4a 및 4b 중 나머지 인간 항체들 중의 7개 항체에 의해 차단되었다. 그러나, 11E8의 결합은 항체 3A4 또는 9A5(애피토프 그룹 1 및 2)에 의해서는 차단되지 않았다. 역 결합 실험은 11E8 결합이 CTLA-4에 대한 9A5 또는 3A4의 결합은 차단하지 않음을 보여주었다(도 13a 및 13b). 애피토프 그룹 4a 항체 10D1 및 쥐 항체 147(도 13d 및 13f)에 대해서도 유사한 결과를 나타내었다. 애피토프 그룹 4b (도 13e)의 항체들은 애피토프 4b 항체가 역 결합 실험(도 13b)에서 애피토프 그룹 2의 항체와 경쟁적임을 제외하고, 그룹 4a 항체들과 유사하다. 애피토프 그룹 3, 4a 및 4b에 속하는 인간 항체들은 CTLA-4/B7.1 결합의 효과적인 차단제들이다(도 3 및 표 6).

표 6

CTLA-4 MAb: 에피토프 및 CTLA-4/B7.1 차단			
성질	단일 클론 항체	CTLA-4 결합에 대한 경쟁성	LtkmB7.1상의 B7.1에 대한 CTLA-4 결합 차단
1	9A5	그룹 3, 4a, 4b, 5 및 6의 항체와는 경쟁 없음 그룹 2의 항체와는 약한 경쟁	차단 안함
2	3A4	그룹 1, 4b, 5 및 6의 항체와는 일방 경쟁 그룹 4a의 항체와는 경쟁 없음	차단 안함
	1E2	그룹 3의 항체와 약한 경쟁 그룹 4a의 항체와는 경쟁 없음 그룹 3의 항체와 약한 경쟁	차단함
3	5A8	그룹 4a 및 4b의 항체와 경쟁. 일부는 그룹 2의 항체와 경쟁. 그룹 1 및 5의 항체와는 경쟁 없음	차단함
4a	10D1	그룹 4b의 모든 항체와 교차 경쟁	
	147*	그룹 6의 항체와 경쟁(비가역적)	
	11E8	그룹 1, 2 및 5의 항체와는 경쟁 없음	
	11G1	그룹 3의 항체와 약한 경쟁	
	4E10		
	5C4		
	3F10		
4b	4B6	그룹 4a의 모든 항체와 교차 경쟁	차단함
	4A1	그룹 2와 경쟁	
	2E2	그룹 3과 약한 경쟁	
	2E7	그룹 1 및 5와는 경쟁 없음	
	2G1	그룹 6과 경쟁(비가역적)	
5	BNI3**	그룹 6과 경쟁, 그룹 1 내지 4와는 경쟁 없음	차단함
6	8H5***	그룹 5와 경쟁, 그룹 1 내지 4와는 경쟁 없음, 그룹 3과의 경쟁은 시험하지 않음	차단함

* 쥐 단일클론 항체
** 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 파르밍엔(Pharmingen)에서 시판함. BNI3 카탈로그 #34580 D
*** 미국 미네소타주 베이포트 소재의 앤셀 코포레이션(Ancell Corp.)에서 시판함, ANC 152.2/8H5 카탈로그 #359-020

[0350]

실시예 7. 10D1은 활성화된 인간 T 세포에 결합함

[0351]

정상 인간 T 세포에 의해 발현된 CTLA-4에 결합하는 10D1 항체의 능력을 허지 T 세포와 활성화된 T 세포의 유동 세포측정 분석에 의해 조사하였다(도 14a 및 14b). 새로 분리한 인간 말초혈 단핵 세포 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 를 $2 \mu\text{g/ml}$ 의 T-세포 미토겐, 피토헤마글루터닌(PHA)의 존재 또는 부재하에서 배양하였다. 4 일간 배양한 후에, 세포를 세척하고 다음 항체들로 염색하였다: 1) 항체 없음; 2) HuIgG1-FITC, 인간 IgG1 항 EGF 수용체 항체; 3) 10D1-FITC, 인간 IgG1 항 CTLA-4 항체; 및 4) 147-FITC 마우스 항-인간 CTLA-4 항체. 1 시간동안 배양한 후, 세포를 세척하고 토끼 항-FITC IgG로 염색한 다음 염소 항-토끼-PE로 염색한다. 분석은 전방 대 측면 산란에 의해 게이트된 립프구 상에서 수행하였다. 도 14a 및 14b에서 보여지듯이, 생성 립프구는 10D1 항체에 결합하지 않은 반면, PHA-활성화된 T 세포는 세포 표면에서 낮은 수준의 CTLA-4를 발현한다.

[0352]

실시예 8. 10D1은 활성화된 T-세포의 상보체-의존성 또는 항체-의존성 용해를 매개하지 않는다.

[0353]

CTLA-4 발현 세포의 상보체-의존성 세포독성(CDCC) 또는 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 매개하는 MAb 10D1의 능력을 조사하였다.

[0354]

CDCC 실험에 있어, CDCC에 대한 최적 조건을 제공하기 위해 토끼 혈청을 상보체 공급원으로 사용하였다. 토끼의 상보체는 인간 상보체보다 인간 IgG1에 의한 CDCC를 매개하는데 더 효과적인 것으로 나타났다(쥬리안츠, 마스락(Jurianz, Maslak) 등, 1999). PHA-자극된 T-세포를 ^{51}Cr 로 표지하고 상보체 공급원으로서 토끼 혈청의 존

재 또는 부재하에 다양한 농도의 항-CTLA1 MAb 10D1 또는 항-CD3 MAb와 함께 배양하였다. 1시간 배양한 후에, 세포를 죽여서 방출된 ^{51}Cr 을 감마 계수기를 사용하여 측정하였다. 2% SDS와 함께 배양한 표적 세포를 100% 용해 대조그룹으로 이용하였다. 항-CTLA-4 MAb 10D1은 활성화된 T-세포의 CDCC를 막개하지 않았다(도 15). 동일한 조건하에서, 쥐 IgG2_a 항-CD3 MAb는 현저한 CDCC를 야기하였다. 쥐 IgG2_a 및 인간 IgG₁은 둘 다 토끼 상보체를 효과적으로 고정시키므로; 상기 차이는 활성화된 T-세포 상의 CD3에 의해 CTLA-4의 매우 감소된 발현을 가장 반영할 것이다.

[0356] 유사하게, 작동체 세포로서 자가 단핵 세포를 사용한 MAb 10D1에 대해서는 ADCC가 관찰되지 않았다(도 16). PHA-자극된 T-세포를 ^{51}Cr 로 표지하고 다양한 농도의 항-CTLA4 MAb 10Da 또는 항-CD3 MAb 및 새로운 자가 단핵 세포와 함께 배양하였다. 작동체 대 표적 세포 비는 100:1이었다. 4시간 배양한 후에, 세포를 죽여서 방출된 ^{51}Cr 을 감마 계수기를 사용하여 측정하였다. 2% SDS와 함께 배양한 표적 세포를 100% 용해 대조그룹으로 이용하였다. 항-CD3 MAb는 인간 작동체 세포 하에 효과적인 ADCC를 막개할 수 있는 쥐 IgG2_a이지만, 단지 낮은 수준의 ADCC 만이 관찰되었다. 이러한 데이터는 효과적인 ADCC를 위해 표적 세포의 표면상의 높은 수준의 항원 발현의 필요조건과 일치한다. MAb 10D1은 일반적으로 CDCC 및 ADCC를 막개할 수 있는 동종형인 인간 IgG₁이므로, 상기 활성의 결여는 활성화된 T-세포 상의 CTLA-4의 매우 낮은 발현에 기인하는 것 같다. 또한, 영장류 독물학 연구에서 증가된 수의 활성화된 T-세포의 관찰(하기 참조)은 생체내에서 MAb 10D1에 의한 활성화된 T-세포의 ADCC 및 CDCC 활성의 결여와 일치한다.

실시예 9. 게잡이 원숭이에서의 10D1 임상전 독성 연구

[0358] 10D1 항체 및 짧은 꼬리 원숭이의 두 무관한 독물학 연구를 수행하였다. 총 8마리 원숭이를 분석하였다. 두드러진 임상적, 면역독물학적 또는 조직병리학적 소견없이, 4마리 원숭이(수컷 2마리 및 암컷 2마리)는 3 mg/kg 인간 항-CTLA4의 투여량으로 3개의 거환을 정맥내 수용하고, 4마리 원숭이(수컷 2마리 및 암컷 2마리)는 10 mg/kg 인간 항-CTLA4의 투여량으로 3개의 거환을 정맥내 수용하였다.

A. 10D1 영장류 독물학 연구(3.0 mg/kg)

[0360] 생체내 10D1의 효과를 조사하기 위해, 2마리의 짧은 꼬리 원숭이를 사용하여 영장류 독물학 연구를 수행하였다. MAb 10D1의 다중 투여량 독성 연구에서, 상기 항체는 짧은 꼬리 원숭이의 정맥내 주사에 의해 투여하였다. 상기 연구의 목적은 쥐 종양 퇴행 모델에서의 효율적인 치료와 양립되는 투여량 및 스케줄 및 인간 임상 연구에서 제시된 투여량으로 주어진 두 마리 원숭이에서 MAb 10D1의 허용성을 측정하는 것이었다. 두 마리 암컷 게잡이 원숭이(Macaca fascicularis)를 제 1일, 4일 및 7일째에 3.0 mg/kg 10D1의 세 정맥내 거환 투여량으로 처리하여 이를 동물에서 안전성 및 T-세포 활성화를 평가하였다. 동물들을 첫 번째 투여량의 투여후 14일까지의 임의의 불리한 반응, 중량 손실/증체량, 및 질병률 및 사망률에 대해 관찰하였다. 마지막 투여량 투여 7일 후에, 동물들을 죽이고 검시하여 그 기관들을 개별적으로 검사하였다. 각각의 투여 전에 및 T-세포 집단의 검사 및 유동세포측정법에 의한 활성화 마커의 발현율 대한 검사 이전에 혈액 샘플을 수거하였다. 혈액 샘플로부터 혈장을 또한 수거하여 ELISA에 의해 10D1 항체 수준 및 항-10D1 항체 반응을 측정하였다.

[0361] 동물들은 치료 과정 동안 어떤 임상적 증상도 없이 항체 10D1의 세 투여량을 허용하였다. 이들 동물들의 중량은 별로 변하지 않았다. 어떤 동물에 대해서도 검시에서 조사된 47개 기관/조직 상에 어떤 심각한 소견도 보이지 않았다.

[0362] 조직병리학 연구는 아칸소주 레드필드 소재의 레드필드(Reedfield) 연구실에서 수행하였다. 상기 연구의 결과는 다중 투여량의 MAb 10D1은 시험한 기관 및 조직 중 어디에서도 급성 독성을 야기하지 않았음을 나타내었다.

[0363] 약물역학적 분석 결과 두 원숭이 모두의 혈장에서 상당한 수준(97.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지)의 10D1 MAb의 존재를 확인하였다. 10D1의 혈장내 수준은 유동세포측정법 및 58 $\alpha\beta$ CTLA-4 T-세포를 이용하여 FITC-10D1을 가지고 경쟁적 분석에 의해 측정하였다.

표 7

10D1 혈장내 수준		
시점	원숭이 #1($\mu\text{g}/\text{ml}$ 혈장)	원숭이 #2($\mu\text{g}/\text{ml}$ 혈장)
예비-1회 투여	0.0	0.0

예비-2회 투여(4 일째)	17.4	43.6
예비-3회 투여(7 일째)	83.6	97.3
14 일째	90.2	70.9

[0365] 항-10D1-항체 반응의 평가는 ELISA에 의해 수행하였다. 연구 과정 동안 어떤 동물에서도 두드러진 항-10D1 반응이 관찰되지 않았다(도 17a 내지 17d). 마이크로 플레이트를 10D1 MAb(IgM 분석의 경우) 또는 10D1 F(ab')₂(IgG 분석의 경우)로 코팅하였다. 여러 시점에서의 혈장 샘플들의 희석물을 플레이트를 이용하여 배양하고, 항-10D1 항체를 항-IgM 또는 IgG Fc-특이적 알칼리 포스파타제 시약으로 검출하였다. IgM 항-10D1 항체는 14 일째에 발현되는 것으로 보이지만, 역가는 매우 낮다. 상기 데이터는 원숭이가 항체의 3회 투여후에 항-10D1 항체 반응을 전개시키지 않음을 입증한다.

[0366] 상기 데이터는 동물들이 상기 연구 과정 동안 MAb 10D1에 대한 두드러진 항체 반응을 전개시키지 않았음을 입증한다.

[0367] 연구 과정동안 림프구 집단의 유동세포측정 분석에 의해 면역독물학을 조사하였다. 시험된 림프구 아형은 전체 T-세포에 대한 마커로서 CD3 및 전체 B-세포에 대한 마커로서 CD20을 포함하였다. T-세포는 CD4(헬퍼 T-세포 마커) 및 CD8(세포독성 T-세포 마커) 뿐 아니라, 활성화 마커 CD25, CD29, CD69 및 HLA-DR의 발현을 위해 더 세분하였다. T-세포 집단 또는 활성화 마커의 발현에 있어 어떤 현저한 변화도 주목되지 않았다. 결과는 하기 표 8에 요약되어 있다.

표 8

림프구 집단의 유동세포측정 분석		
시점	원숭이 #1	원숭이 #2
예비-1회 투여	%CD3=61, %CD20=16 %CD4=43, %CD8=50 %CD25≤1, %CD29=41 %CD69≤1, %HLA-DR=4	%CD3=54, %CD20=22 %CD4=59, %CD8=26 %CD25≤1, %CD29=29 %CD69≤1, %HLA-DR=1
예비-2회 투여 (4일째)	%CD3=58, %CD20=13 %CD4=38, %CD8=52 %CD25≤1, %CD29=52 %CD69≤1, %HLA-DR=2	%CD3=56, %CD20=16 %CD4=62, %CD8=37 %CD25≤1, %CD29=36 %CD69≤1, %HLA-DR≤1
예비-3회 투여 (7일째)	%CD3=59, %CD20=15 %CD4=47, %CD8=59 %CD25=2, %CD29=44 %CD69=1, %HLA-DR=4	%CD3=51, %CD20=17 %CD4=51, %CD8=39 %CD25=1, %CD29=39 %CD69=1, %HLA-DR=2
14일째	%CD3=64, %CD20=14 %CD4=49, %CD8=44 %CD25=1, %CD29=44 %CD69≤1, %HLA-DR=15	%CD3=59, %CD20=20 %CD4=60, %CD8=35 %CD25≤1, %CD29=34 %CD69≤1, %HLA-DR=1

[0369] 혈액 샘플을 FITC- 또는 PE-표지된 항-림프구 시약을 이용하여 유동세포측정법으로 새로 분석하였다. %CD3 및 %CD20이 림프구 계이트를 기준으로 한다. 또 다른 T-세포 마커 및 활성화 마커는 모두 CD3-양성 세포를 기준으로 한다. 상기 데이터는 다중 투여량의 MAb 10D1이 B- 및 T-세포 집단 또는 T-세포 활성화 마커에 두드러진 효과를 갖지 않음을 보여준다.

B. 10D1 영장류 독물학 연구(3.0 및 10.0 mg/kg)

[0370] 실험적으로 비-자연적이고 연구 착수시에 2.4 내지 3.8 kg으로 계량된 6마리의 게잡이 원숭이(4마리 수컷 및 2마리 암컷)를 하기 표 9에 나타낸 바와 같은 처리 그룹으로 할당하였다.

표 9

그룹 번호	수컷/암컷의 수	투여 수준 (mg/kg)	투여 부피 (mL/kg)	투여 용액 농도 (mg/mL)
1	2/0	3	0.6	5.0
2	2/2	10	2.0	5.0

[0373] 각각의 동물들은 1 주일동안 3 일마다(즉, 1일, 4일 및 7일째에) 정맥내 주사(즉, "서서히-밀어넣는(slow-push)" 거환 주사)에 의해 인간 항-CTLA4(5 mg/mL 농도)를 투여받았다. 적어도 하루에 2회씩 상세한 임상 관찰을 수행하였으며("케이지사이드(cageside) 관찰"), 연구 전에 및 12 일째에 각 동물에 대해 철저한 물리적 검사를 수행하였다. 혈청 화학, 혈액학 및 응고 파라미터의 평가를 위한 혈액 샘플을 연구전 및 14 일째에 모든 동물들로부터 수거하였다. 선택된 혈액학 파라미터(전체 백혈구 및 백혈구 백분율)를 위한 추가 샘플을 각각의 투여일(1일, 4일 및 7일)에 투여하기 전에 수거하였다. 투여 전에 및 13 일째에 특별히 설계된 케이지-팬(cage-pan)으로부터의 배뇨에 의해 표준 소변검사용 높 샘플을 수득하였다. 메다렉스에 의해 수행된 다양한 분석을 위해 각각의 투여(1일, 4일 및 7일) 전에 및 종료(14일) 전에 혈액 샘플도 또한 수거하였다. 상기 분석에는 시험 제품 농도의 분석(약물역학), 시험 제품에 대한 항체의 존재 측정 및 유동세포측정 분석이 포함된다. 모든 동물을 14일째에 안락사시키고, 이때 완전한 전체적인 검시를 수행하고, 주요 기관들을 계량하고, 표준의 완전한 세트의 조직들을 각 동물로부터 수거하여 광학 현미경으로 검사하기 위해 처리하였다.

[0374] 총 3회 투여동안 3일마다 주어진 3 mg/kg 및 10 mg/kg의 투여량 수준으로 인간 항-CTLA4를 정맥내 투여한 것은 계집이 원숭이에 의해 매우 잘 수용되었다. 케이지사이드 관찰 및 물리적 검사로부터는 독성의 어떤 임상적인 징후도 없었으며, 체중, 시각적인 검사 소견, 임상 병리학적 파라미터, 전체적인 검시 소견, 기관 중량 또는 조직의 조직형태학에 대한 어떤 영향도 없었다.

[0375] 혈청 샘플 중 시험 제품 농도를 분석한 결과(즉, 4일 및 7일째에 투여하기 전 및 14일째에 검시하기 전에 수득된 샘플에서 측정된 통과 수준), 시험 제품에 대한 투여량-의존성 노출을 나타내었다. 7일째에, 예비투여량 평균 농도는 3 및 10 mg/kg 투여량 그룹에 대해 각각 약 84 및 240 µg/mL이었다.

[0376] 원숭이에서 3일마다 투여하는 스케줄 하에 혈청 중 시험 제품의 측정 가능성은 4일 및 7일째 통과 수준 사이의 차이(즉, 7일째의 평균 농도는 4일째보다 대략 2배 높았다)로부터 뿐 아니라, 7일째 통과 수준에 유사한 14일째(마지막 투여한 지 일주일 후)의 높은 잔류 수준으로부터도 명백하였다. 시험 제품에 대한 항체 생성의 흔적은 6마리의 연구 동물 중 2마리(그룹 1의 한 마리와 그룹 2의 다른 한 마리)에서 검출되었다. 전자의 경우에, 항체 반응이 순환으로부터 시험 제품의 제거율에 영향을 미칠 수 있는 것으로 나타났다. 림프구 아형의 유동세포 측정 분석 결과 1일째와 14일째 사이에 총 CD3-양성 세포가 적절히 증가한 것으로 나타났으며, 상기 증가는 CD3/CD4-양성 세포의 증가, 및 CD3/CD8-양성 세포에서의 각각의 감소(그룹 2의 경우만)와 관련되었다. CD29 및 HLA-DR을 발현하는 CD3 세포의 비율은 연구 과정에 걸쳐 적절히 증가하였으며, 이것은 항-CTLA4 항체가 항원-특이성 T세포를 증대시킬 수 있다는 이전의 발견과 일치한다.

[0377] 결론적으로, 림프구 아집단을 순환시키는데 있어서의 작은 변화와는 별개로, 상기 연구에서 시험된 최고 투여량 수준(즉, 3일 간격으로 주어진 10 mg/kg의 3회 투여량)은 계집이 원숭이에서 절대적인 효과가 없는 투여량 수준이었다.

0378] 실시예 10. 전립선암(MDXCTLA4-01) 및 흑색종(MDXCTLA4-02)에서의 MAb 10D1의 단계 I 인간 임상 실험

[0379] MDXCTLA4-01은 진행성, 전이성, 호르몬-내성 전립선암을 앓고 있는 환자들에서 항-세포독성 T-림프구-결합 항원-4(항-CTLA-4) 단일클론 항체 10D1(MAb 10D1)의 개방된-표지 연구이다. 치료는 3.0 mg/kg의 투여량의 주입물로 정맥내 투여되는 MAb 10D1의 단일 투여이다.

[0380] 상기 실험의 목적은 (i) MAb 10D1의 투여가 비특이적 T-세포 활성화를 야기하는지를 측정하고, (ii) 상기 환자들에서 MAb 10D1에 대한 안전성/허용성 프로필을 작성하고, (iii) MAb 10D1의 약물역학적 프로필을 측정하고 MAb 10D1에 대한 숙주 면역 반응의 전개를 평가하는 것이다. 또한, 상기 연구는 효능의 예비 증거를 확인하고자 할 것이다. 상기 연구는 14명의 대상에서 MAb 10D1의 단일 투여의 다중심, 개방-표지 연구이다. 본 연구는 4 단계로 이루어진다: 선별, 주입, 주입후 및 추적 조사(하기 표 10 참조).

표 10

단계	선별	주입	주입후												추적 조사
			시간	-14 내지 0일	-30 내지 130분	145분	160분	190분	250분	370분	24 시간	48 시간	72 시간	7일	14일

[0382] 전립선의 원발성 선암종, 및 안드로겐 결손 및 하나 이상의 전신성 비-호르몬 처리 후 전립선의 진행성 전이성 암종의 조직학적 진단을 받은 환자를 본 연구에 참여를 위해 선별한다. 대상들은 측정가능한 진행성 질환, 진행성 PSA, 5 ng/ml를 초과하는 PSA, 50 ng/dl 미만의 테스토스테론, 1차 생식선 안드로겐 공급, 12 주를 초과하는 남은 수명 및 60% 이상의 카몹스키 활동도(Kamofsky Performance Status)를 가져야 한다.

[0383] 대상들은 물리적 검사, ECG, 흉부 방사선사진술, 진단 영상, 및 혈액학적, 생화학적 및 면역 기능 평가를 위한 혈액 채취를 받고, 생체 정후를 관찰하였다. 매달 전화 문답을 이용하여 치료 후 6개월까지, 질환의 진행 후의 자가면역 부작용을 포함하여 일련의 부작용들에 대한 정보를 수집하고 기록하였다. PSA(쇠퇴, 쇠퇴 기간, 진행, 진행 시간) 및 질환의 반응(완전, 부분, 안정성, 진행성)을 관찰하였다. MAb 10D1의 혈장내 농도는 주입 직전, 주입중 및 주입 후 2개월까지 평가한다.

[0384] 치료받은 4명의 전립선암 환자들로부터 얻은 데이터를 표 11에 나타내었다. 부작용은 기록되지 않았다. 치료된 대상들 모두에 있어, MAb 10D1은 잘 수용되는 것으로 보인다.

[0385] 실험에서 환자의 면역 상태를 관찰하는 중요성 및 항-CTLA-4 항체에 의한 T 세포 활성화에 대한 일반화된 영향을 관찰하는 특정한 목적으로 인해, 상기 연구에서의 초기 기준은 각각 500개 세포/ml 이상의 CD4 및 CD8 T 세포의 최소 수준을 포함하였다. 그러나, 상기 연구에서 초기 증가동안 전립선암 환자는 CD4 및 CD5 T 세포가 분명히 존재하긴 하지만 현저히 감소된 T 세포 수를 갖는 것으로 관찰되었다. 많은 환자들이 상기 초기 기준을 기준으로 초기에 배제되었다(표 11 참조). 관찰된 명백한 감소된 T 세포 수는, 이들 환자에서 암 백신 접종을 수반하는 치료에 관련될 수 있는 전립선암 환자들에서 이전에 보고된 바 없는 관찰들이다. 이러한 관찰에 이어, 초기 기준을 각각 300개 세포/ml 이상의 CD4 및 200개 세포/ml 이상의 CD8을 갖는 환자를 포함시키도록 조정하였다.

표 11

연구 번호 MDXG011A4-01																				
신별 번호	개체 번호	비단크기	보정#	온수	날짜	FSA	혈소판	WBC	호중구	림프구	단핵구	호신구	CD4	CD8	ESR	Hb	Hct			
				pmi	$\times 10^3/\mu\text{L}$	%	$\times 10^3/\mu\text{L}$	%	$\times 10^3/\mu\text{L}$	%	$\times 10^3/\mu\text{L}$	μL	μL	mmHg	g/dL	%				
02001		001	JGR	신별시	144.50	263	6.12	73.00	5.90	19.00	1.47	5.60	0.46	1.60	0.15	670	367	7.1	10.4	30
02001		001	JGR	신별시	185.20	267	5.74	68.00	3.79	22.00	1.32	6.50	0.38	3.10	0.18	704	376	10.6	32	
02001		001	JGR	신별시	259	6.31	69.00	4.38	20.00	1.29	8.70	0.35	0.90	0.06	A	A	9.5	30		
02001		001	JGR	신별시	240	6.59	70.00	4.66	19.00	1.31	6.70	0.34	1.80	0.12	556	303	9.5	28		
02001		001	JGR	신별시	3	270	6.53	71.00	4.63	21.00	1.36	5.50	0.36	2.20	0.14	608	254	9.3	28	
02001		001	JGR	신별시	7	257.40	299	6.70	68.00	4.56	23.00	1.53	6.00	0.40	2.50	0.17	A	A	9.5	28
02001		001	JGR	신별시	14	332.30	308	6.87	71.90	2.94	21.20	1.39	5.21	0.36	1.90	0.13	A	A	8.8	25
02001		001	JGR	신별시	21	266	9.72	74.00	7.20	19.70	1.91	4.80	0.46	1.00	0.10	A	A	9.1	20	
02001		001	JGR	신별시	28	35.00	304	5.39	63.00	3.40	5.80	0.31	2.90	0.16	5.7	25				
01002		JWF	신별시	28.30	271	11.50	75.40	8.75	13.60	1.58	5.70	0.36	4.60	0.53	399	189	41	13.9	37	
01003		MZB	신별시	178	5.49	69.00	3.79	19.60	1.08	6.30	0.35	2.70	0.24	325	168	19	12.7	36		
01004		TEQ	신별시	145.00	264	6.26	75.10	4.60	14.40	0.90	7.70	0.48	2.40	0.15	365	129	61	12.8	36	
01005		WMN	신별시	192.40	212	6.85	73.70	5.05	17.40	1.20	6.20	0.43	2.20	0.15	483	217				
01006		MRS	신별시	450.00	140	7.55	76.70	15.90	1.70	6.20	0.47	0.80	0.06	3.35	319	363	83			
01007		TAB	신별시	139.00	205	5.78	73.00	4.24	13.00	0.76	6.50	0.37	6.00	0.05	376	127	14.1	43		
01008		CHB	신별시	207.70	467	54.00	4.56	32.00	1.52	8.30	0.39	3.40	0.16	461	499	15.6	45			
01009		CHB	신별시	238.60	144	3.70	78.00	2.98	14.00	5.40	0.20	1.20	0.04	211	162	43	9.8	30		
01009		CHB	신별시	0	356.90	123	3.92	68.00	2.67	21.00	0.13	8.70	0.34	1.50	0.06	374	186	10.9	31	
01009		CHB	신별시	1	122	3.35	71.00	3.38	22.00	0.14	4.00	0.14	1.80	0.06	307	192	11.3	32		
01009		CHB	신별시	2	108	4.05	74.00	2.99	19.00	0.17	4.80	0.20	1.20	0.05	328	220	11.3	33		
01009		CHB	신별시	114	3.79	70.00	2.67	21.00	0.31	6.20	0.23	1.30	0.05	313	265	10.9	31			
01009		CHB	신별시	249.30	69	3.36	75.00	2.54	17.00	0.30	6.10	0.19	0.70	0.02	244	161	10.4	30		
01009		CHB	신별시	101	3.68	68.00	2.54	21.20	0.16	8.50	0.31	1.00	0.04	308	173	8.6	26			
01009		CHB	신별시	21	48.2	78.00	3.76	13.20	0.94	7.70	0.37	0.60	0.03	218	195	7.4	20			
01012		CHB	신별시	112.90	172	5.85	64.00	3.74	28.00	1.89	5.60	0.33	1.00	0.06	246	451	10	13.2	40	
01012		CHB	신별시	1	55.00	28.00	3.74	28.00	1.89	5.60	0.33	1.00	0.06	642	475	12.2	36			
01012		CHB	신별시	2	150	4.82	67.70	3.26	26.40	1.38	4.60	0.22	1.10	0.05	552	390				
01012		CHB	신별시	3	147	4.36	63.70	2.78	29.30	1.28	5.10	0.22	1.30	0.06	544	441	13.1	37		
01012		CHB	신별시	7	190.00	159	4.95	58.60	2.90	32.70	1.31	5.90	0.28	2.50	0.12	842	505	12.6	35	
01012		CHB	신별시	14	207.60	199	5.64	63.10	3.35	29.30	1.35	5.70	0.32	1.60	0.09	13.5	38			
01013		KLF	신별시	49.10	228	8.53	65.00	5.82	26.00	2.23	5.30	0.46	2.30	0.20	1213	398	13.4	37		
02014		L-S	신별시	56.5	53.00	3.01	34.00	1.82	7.40	0.42	3.90	0.22	2.21	0.19	136	40				
02014		L-S	신별시	21.70	5.68	57.00	3.36	32.00	1.98	6.80	0.50	1.50	0.09	676	389	13.5	38			
02014		L-S	신별시	21.50	5.74	55.00	3.19	35.00	2.04	7.00	0.49	1.40	0.08	632	405	13.6	38			
02014		L-S	신별시	2	223	5.59	52.00	3.09	32.00	1.84	9.80	0.55	1.40	0.08	590	339	13.5	39		
02014		L-S	신별시	3	219	4.89	54.00	2.66	34.00	1.68	7.50	0.37	2.20	0.13	529	358	13.2	37		
01016		부적 개체	신별시	485.00	106	7.31	68.00	6.29	19.00	1.90	1.14	52.6	2.7	10.3	0.31					
01016		부적 개체	신별시	3	3.80	40.50	1.95	15.40	0.80	4.90	0.12	404	220							
01016		부적 개체	신별시	7.00	150	3.80	40.50	1.95	15.40	0.80	4.90	0.12	404	220						
01016		부적 개체	신별시	7.00	107.0	75.00	7.23	46.50	3.00	10.00	0.92	6.80	0.57	1612	1128	30				

표 12

3.0 mg/kg MAb 10D1으로 처리된 전립선암 환자에서 T 세포 활성화 마커의 유동세포측정 분석			
환자 번호	시점	CD(4+25+69)%	CD(8+25+69)%
3	선별시	1.7	0.8
3	-30분(주입전)	2.6	0.8
3	40분	2.5	0.7

3	130분	1.9	0.9
3	145분	1.7	0.5
3	160분	1.7	1
3	190분	1.5	1.5
3	250분	2.1	1.2
3	370분	1.3	0.9
3	24시간	1.6	1.6
3	48시간	2.7	3
3	72시간	0.9	0.5
3	7일	0.9	0.1
3	14일	0.4	0.5
3	21일	2.3	1.9
4	선별시	1.4	0.8
4	-30분(주입전)	0.5	0.3
4	40분	0.3	0.1
4	130분	0.3	0.1
4	145분	0.4	0.2
4	160분	0.2	0.2
4	190분	0.8	0.3
4	250분	0.1	0
4	370분	0.3	0.1
4	24시간	0.2	0.3
4	48시간	0.4	0.6
4	72시간	0.8	0.3
4	7일	1	0.7
4	14일	1.1	0.8

[0389] IV 단계 악성 흑색종을 앓는 환자에서 MAb 10D1을 이용한 두 번째 임상 실험(MDXCTLA4-02)도 또한 개시하였다. 단일 투여량의 MAb 10D1을 3.0 mg/kg의 투여량으로 주입물로서 정맥내 투여할 것이다. 이 연구도 또한 상기 표 9에서 기술한 바와 같이 4 단계(선별, 주입, 주입후 및 추적 조사)로 이루어진다.

[0390] 상기 연구의 목적은 전립선암에서 전술한 연구에 관한 것과 같을 뿐 아니라, IV 단계 악성 흑색종을 앓는 환자에서 MAb 10D1에 대한 안전성/허용성 프로필을 구체적으로 확립하는 것이다. 1명의 환자를 상기 연구에서 치료하였다(표 13 참조). 전립선암 연구에서와 같이, MAb 10D1은 잘 수용되는 것으로 보인다. 전립선 종양 실험에 대해 수행된 바와 유사한, 상기 대상에서의 T 세포 활성화 마커의 유동세포측정 분석은 또한 비-특이적 T 세포 활성화의 증거를 나타내지 않았다.

五 13

방법의 핵심

보 반면에 따로 이가 셔영 환경은 이가 CTI A-1에 틀어져 으로 결합한다.

도면의 가단한 설명

도 1은 μ 1 엑손의 SmaI 부위에 네오 카세트를 표적화하여 삽입하는 것을 예시하는 도식을 나타낸 것이다. 도 1A)는 μ 좌위의 게놈(genome) 구조의 개략적인 다이어그램이다. 색칠된 박스는 μ 엑손을 나타낸다; 도 1B)는 CmD 표적 벡터의 개략적인 다이어그램이다. 점선은 구조체에 포함된 게놈성 μ 서열을 나타낸다. 플라스미드 서열은 도시되지 않았다; 도 1C)는 네오 카세트가 μ 1에 삽입된 표적화된 μ 좌위의 개략적인 다이어그램이다. 우측 하단의 박스는 표적 구조체와 μ 좌위 사이의 상동성 재조합의 RFLP 진단결과를 나타낸 것이다. RFLP는 프로브 A를 이용한 서던 블롯(Southern blot) 하이브리드화에 의해 검출되었으며, 915 bp의 SacI 절편이 도 1C)에 도시되어 있다.

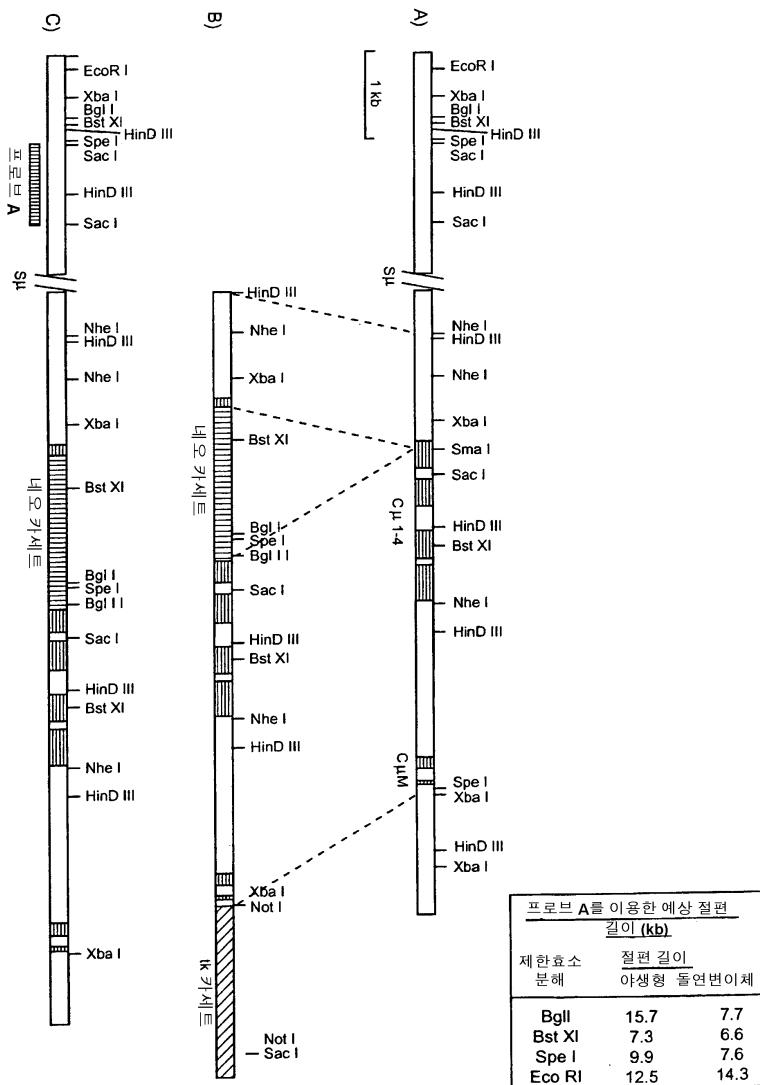
도 2a 및 2b는 하기에서 상세히 설명하는 바와 같이, 인간 CTLA-4에 대한 가용성 인간 서열 항체가 마우스 B7.1을 발현시키는 세포에 대한 재조합 가용성 인간 CTLA-4의 결합을 억제함을 입증하는 실험의 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 하기에서 상세히 설명하는 바와 같이, 인간 CTLA-4 상의 비-중복 에피토프를 인지하는 본 발명의 인간 서열 핵체를 확인하기 위한 경쟁적 결합 분석의 결과를 나타낸 것이다.

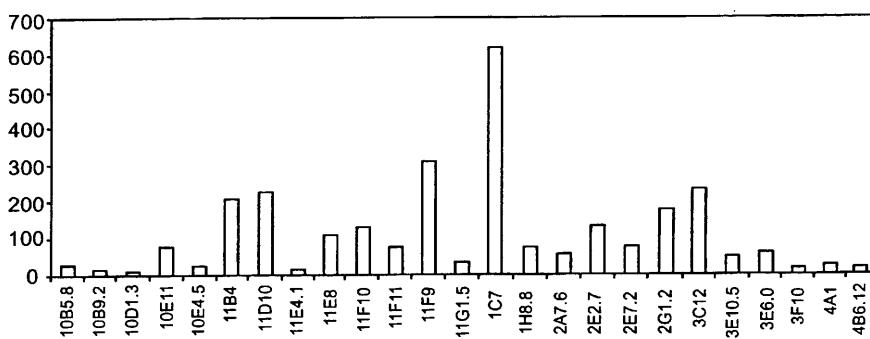
- [0004] 도 4a 및 4b는 항-CTLA-4 항체 10D1.3의 중쇄 및 경쇄 절편에 대한 예비 뉴클레오티드 서열 데이터를 나타낸 것이다.
- [0005] 도 5a 및 5b는 항-인간 CTLA-4 항체의 경쇄 가변 영역(V_K)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 것이다. V_K A-27 생식선 서열(서열번호: 4)로부터 유도된 항-CTLA-4 항체 10D1(서열번호: 6) 및 4B6(서열번호: 8)이 도면 상단에 도시되어 있다. V_K L-15 생식선 서열(서열번호: 10)로부터 유도된 항-CTLA-4 항체 1E2(서열번호: 12)가 도면의 하단에 도시되어 있다. 세개의 항-CTLA-4 항체의 V_K 서열은 그의 생식선 암호화 V_K 유전자 서열과 나란히 나타내었다. 상보성 결정 잔기(CDR)도 표시되어 있다. 대시(-)는 서열 동일성을 나타낸다.
- [0006] 도 6a 및 6b는 항-인간 CTLA-4 항체의 경쇄 가변 영역(V_H)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 것이다. V_H 3-30.3 생식선 서열(서열번호: 14)로부터 유도된 항-CTLA-4 항체 10D1(서열번호: 16) 및 4B6(서열번호: 18)이 도면 상단에 도시되어 있다. V_H 3-33 생식선 서열(서열번호: 20)로부터 유도된 항-CTLA-4 항체 1E2(서열번호: 22)가 도면의 하단에 도시되어 있다. 세개의 항-CTLA-4 항체의 V_H 서열을 그의 생식선 암호화 서열과 나란히 나타내었다. 상보성 결정 잔기(CDR)도 표시되어 있다. 대시(-)는 서열 동일성을 나타낸다.
- [0007] 도 7a 및 7b는 항-인간 CTLA-4 항체의 경쇄 가변 영역의 예상된 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 도 5a 및 5b에서 기술된 항-CTLA-4 항체의 예상된 아미노산 V_K 서열을 나타내었다. V_K A-27 생식선 서열(서열번호: 5)로부터 유도된 항-CTLA-4 항체 10D1(서열번호: 7) 및 4B6(서열번호: 9)이 도면 상단에 도시되어 있다. V_K L-15 생식선 서열(서열번호: 11)로부터 유도된 항-CTLA-4 항체 1E2(서열번호: 13)가 도면의 하단에 도시되어 있다.
- [0008] 도 8a 및 8b는 항-인간 CTLA-4 항체의 중쇄 가변 영역의 예상된 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 도 6a 및 6b에서 기술된 항-CTLA-4 항체의 예상된 아미노산 V_H 서열을 나타내었다. V_H 3-30.3 생식선 서열(서열번호: 15)로부터 유도된 항-CTLA-4 항체 10D1(서열번호: 17) 및 4B6(서열번호: 19)이 도면 상단에 도시되어 있다. V_H 3-33 생식선 서열(서열번호: 21)로부터 유도된 항-CTLA-4 항체 1E2(서열번호: 23)가 도면의 하단에 도시되어 있다.
- [0009] 도 9는 ELISA에 의한 재조합 인간 CTLA-4에 대한 MAb 10D1의 결합 실험 결과를 나타낸 것이다. MAb 10D1은 투여량-의존성 및 포화 역학 하에 정제된 재조합 CTLA-4에 결합한다.
- [0010] 도 10은 CTLA-4-발현 T-세포주에 대한 10D1의 결합을 나타낸다. 이들 데이터는 MAb 10D1이 투여량-의존성 및 포화 역학 하에 CTLA-4를 발현하는 세포에 결합함을 나타낸다.
- [0011] 도 11은 CTLA-4-발현 T-세포에 대한 인간 B7.2 Ig의 결합의 억제를 나타낸 것이다. 이들 데이터는 MAb 10D1이 대조용 인간 MAb에 비해 CTLA-4에 대한 B7.2 결합을 효과적으로 차단할 수 있음을 보여준다.
- [0012] 도 12는 쥐의 B7.1-발현 세포에 대한 CTLA4-FITC 결합을 차단하는 결과를 나타낸 것이다. 이들 데이터는 MAb 10D1이 대조용 인간 MAb에 비해 B7.1에 대한 CTLA-4 결합을 효과적으로 차단할 수 있음을 보여준다.
- [0013] 도 13a 내지 13g는 에피토프의 그룹 분류화를 나타내는 항-CTLA-4 인간 MAb의 경쟁적 ELISA를 나타낸 것이다.
- [0014] 도 14a 및 14b는 PHA-자극된 T-세포 상에서의 CTLA-4 발현을 나타낸 것이다. 활성화된 비-휴지 T 세포는 세포 표면에서 낮지만 검출 가능한 수준의 CTLA-4를 발현시킨다.
- [0015] 도 15는 활성화된 T 세포의 상보체 의존성 세포용해(Complement Dependant Lysis)시의 MAb 10D1의 결과를 나타낸 것이다. PHA-활성화된 T 세포의 용해는 관찰되지 않았다.
- [0016] 도 16은 활성화된 T 세포의 항체-의존성 세포용해시의 MAb 10D1의 결과를 나타낸 것이다. 10D1 및 단핵 세포의 경우에 PHA-활성화된 T 세포의 용해는 관찰되지 않았다.
- [0017] 도 17a 내지 17d는 10D1 항체를 주입한 게잡이 원숭이에서의 항-10D1 IgM 및 IgG 반응을 나타낸 것이다. 10D1에 대한 의미있는 항체 반응은 관찰되지 않았다.

도면

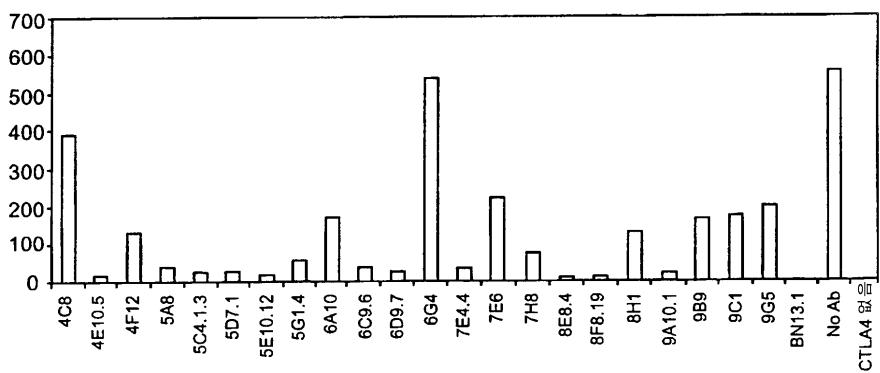
도면1



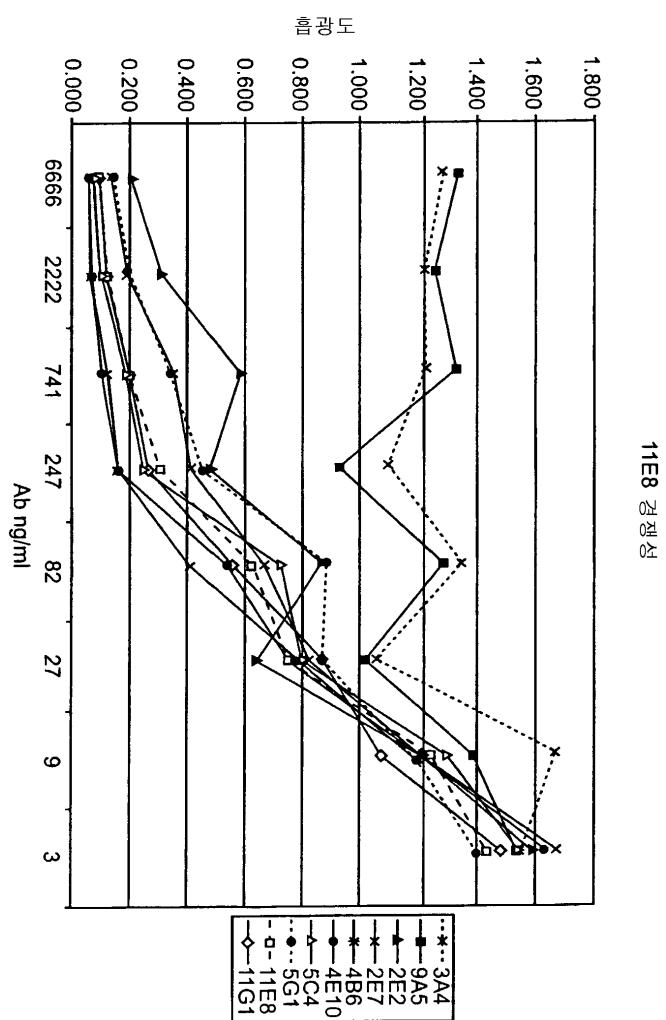
도면2a



도면2b



도면3



도면4a

10D1.3 VH (서열번호: 2)

TGGGGGAGGC	GTGGTCCAGC	CTGGGAGGTC	CCTGAGACTC	TCCTGTGCAG	50
CCTCTGGATT	CACCTTCAGT	AGCTATACTA	TGCACTGGGT	CCGCCAGGCT	100
CCAGGCAAGG	GGCTGGAGTG	GGTGACATTT	ATATCATATG	ATGGAAACAA	150
TAAATACTAC	GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	ATTCACCATC	TCCAGAGACA	200
ATTCCAAGAA	CACGCTGTAT	CTGCAAATGA	ACAGCCTGAG	AGCTGAGGAC	250
ACGGCTATAT	ATTACTGTGC	GAGGACCGGC	TGGCTGGGGC	CCTTTGACTA	300
CTGGGGCCAG	GGAACCCTGG	TCACCGTCTC	CTCAGCCTCC	ACCAAGGGC	349

도면4b

10D1.3 VK (서열번호: 3)

CTCCAGGCCAC	CCTGTCTTTG	TCTCCAGGGG	AAAGAGCCAC	CCTCTCCTGC	50
AGGGCCAGTC	AGAGTGTTGG	CAGCAGCTAC	TTAGCCTGGT	ACCAGCAGAA	100
ACCTGGCCAG	GCTCCCAGGC	TCCTCATCTA	TGGTGCATTC	AGCAGGGCCA	150
CTGGCATCCC	AGACAGGTTC	AGTGGCAGTG	GGTCTGGGAC	AGACTTCACT	200
CTCACCATCA	GCAGACTGGA	GCCTGAAGAT	TTTGCAGTGT	ATTACTGTCA	250
GCAGTATGGT	AGCTCACCGT	GGACGTTCGG	CCAAGGGACC	AAGGTGGAAA	300
TCAAACGAAC	TGTGGCTGCA	C			321

도면5a

서열번호: 4, 6 및 8 (각각[†])

VK A-27	GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TGT TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC
생식선:	---
10D1:	---
4B6:	---
VK A-27:	AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG
10D1:	---
4B6:	---
VK A-27:	CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG
10D1:	---
4B6:	---
VK A-27:	ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT
10D1:	---
4B6:	---
CDR3	
VK A-27:	CAG CAG TAT GGT AGC TCA CC J _{k1}
10D1:	---
4B6:	---

도면5b

VK L-15		서울번호: 10 월 12(수)
생식선: 1E2:		GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT
VK L-15: 1E2:		CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TPA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC
VK L-15: 1E2:		CTG ATC TAT GCT GCA TGC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA
VK L-15: 1E2:		GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG TAT ATAT
VK L-15: 1E2:		AGT TAC CCT CC J _{k1} --- --- --- -G ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C/

도면6a

서열번호: 14, 16 및 18 (각각)

도면6b

서열번호: 20 및 22 (각각)

VH 3-33	CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG
상식선:	---
1E2:	---
VH 3-33:	TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT CDR1 GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG
1E2:	---
VH 3-33:	GCA GTT ATA TGG TAT GAT GGA AGT CDR2 AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
1E2:	---
VH 3-33:	GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT
1E2:	---
	CDR3 J _H 3b
VH 3-33:	GCG AGA GA
1E2:	--- --- -CT CCC AAT TAT ATT GGT GCT TTT GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA G/

도면7a

서열번호: 5, 7 및 9 (각각)

VK A-27: 생식선: 10D1: 4B6:	<u>CDR1</u>		<u>CDR2</u>	
	EIVLITQSPGTLSLSPGERATLSC ----- ----- -----	RASQSVSSYLA ----- ----- -----	WYQQKPGQAPRLLIY ----- ----- -----	GASSRAT ----- ----- -----
VK A-27: 10D1: 4B6:	<u>CDR3</u>			
	GIPDRFSGSGSGTDFLTISRLPEPEDFAVYVC ----- ----- -----	QOYGS ----- -----	PWT ----- -----	FGQGTTKEIK

도면7b

서열번호: 11 및 13 (각각)

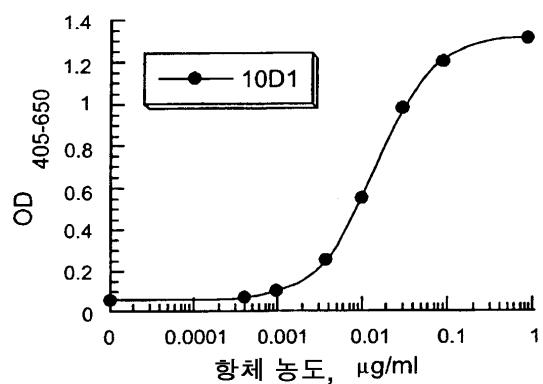
VK L-15 생식선 1E2:	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	_____ CDR1 _____	_____ CDR2 _____
		RASQIGISSMIA	WYQQKPEAKPSLIY
VK L-15: 1E2:	GVPSRFSGSGSGDFLTISILOPEDFATYYC	_____ CDR3 _____	_____ PPT _____
		QQYNSY	FGQGTKEIK

도면8a

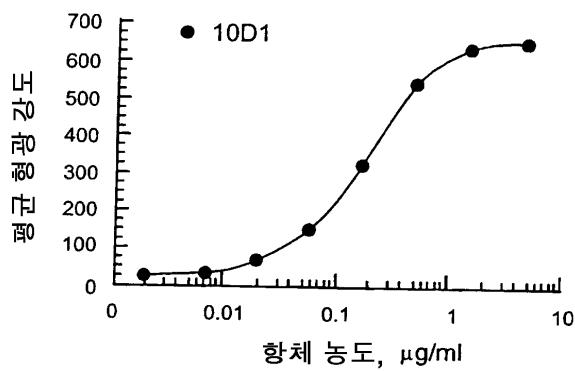
도면8b

서일번호: 21 및 23 (각각)
 VH 3-33: QVQLVESGGVVQPGRSIRLSCAASGFTES
 VH 3-33: RFTISRDNKNLTYLQMNSLRAEDTAVYVCA
 VH 3-33: APNYIGAFDV
 VH 3-33: WQQGTMVTVSS
 VH 3-33: SYGMH
 VH 3-33: WVRQAPGKGLEWVA
 VH 3-33: VIWYQGSNKKYADSVKG
 VH 3-33: CDR1
 VH 3-33: CDR2
 VH 3-33: CDR3
 VH 3-33: F
 VH 3-33: 1E2: 1E2:

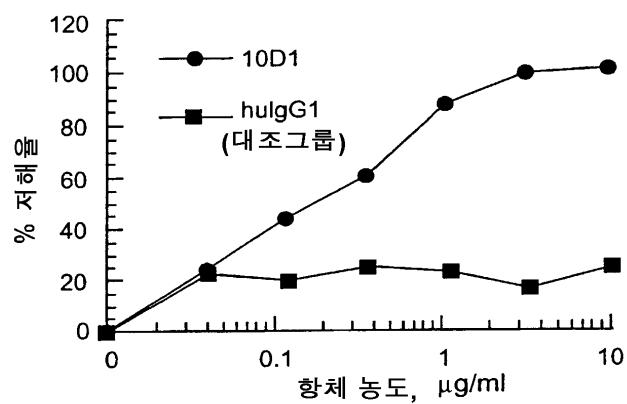
도면9



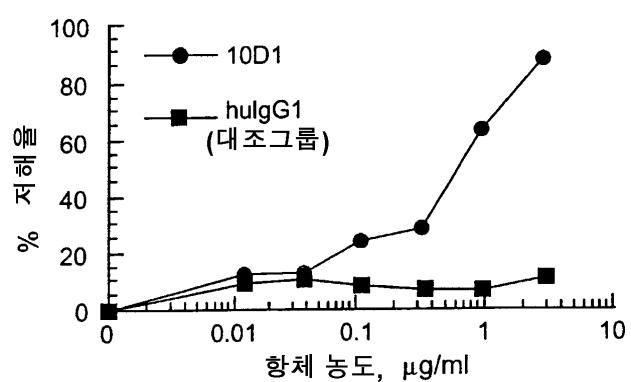
도면10



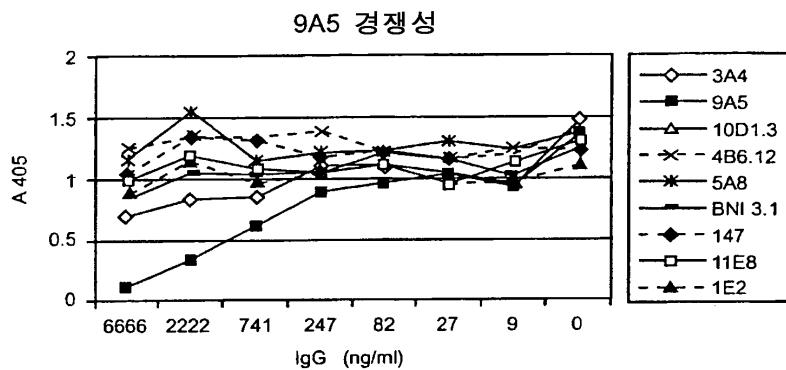
도면11



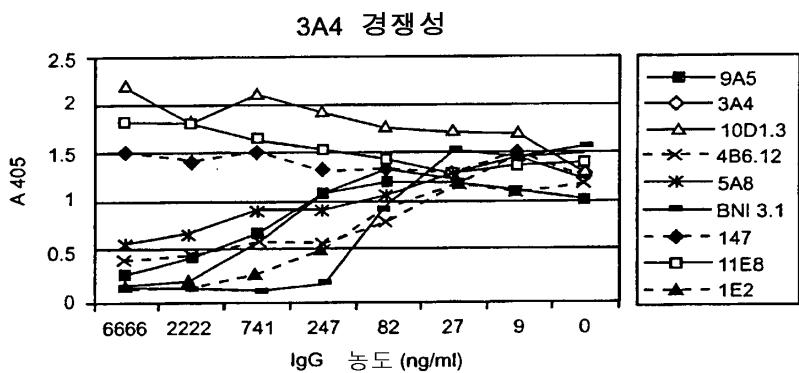
도면12



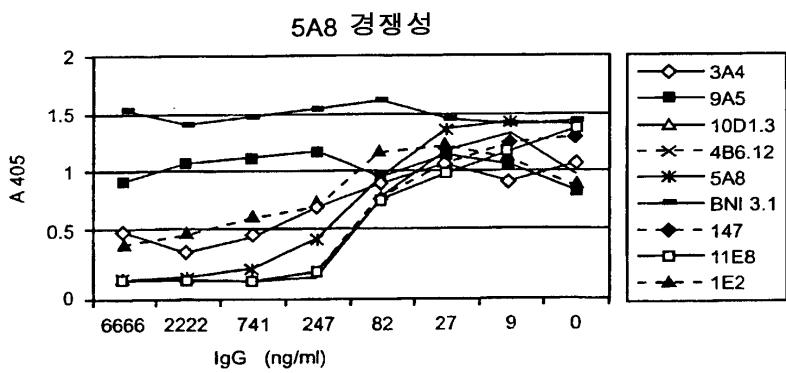
도면13a



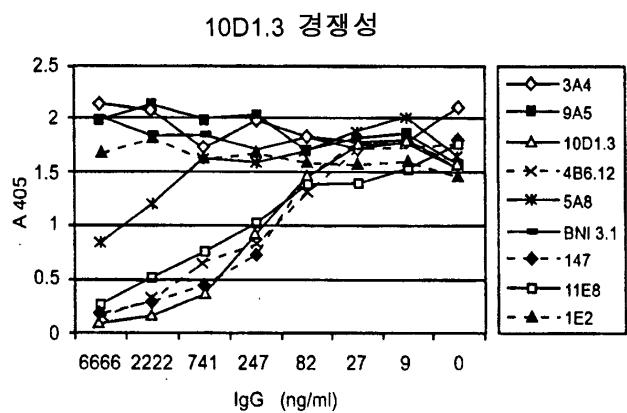
도면13b



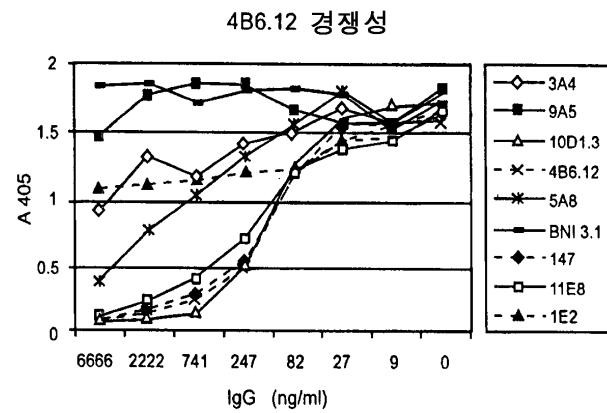
도면13c



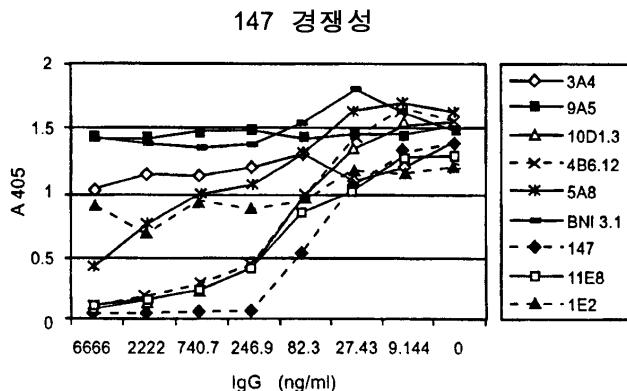
도면13d



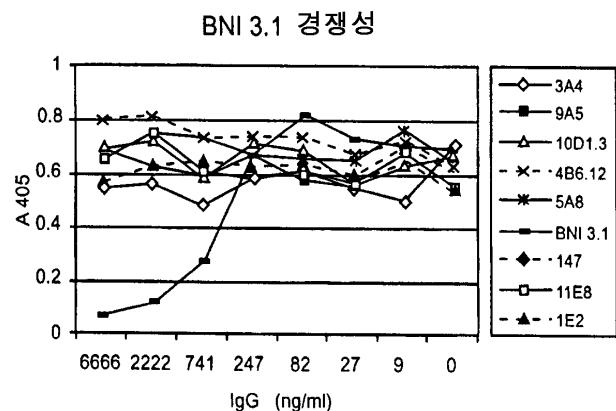
도면13e



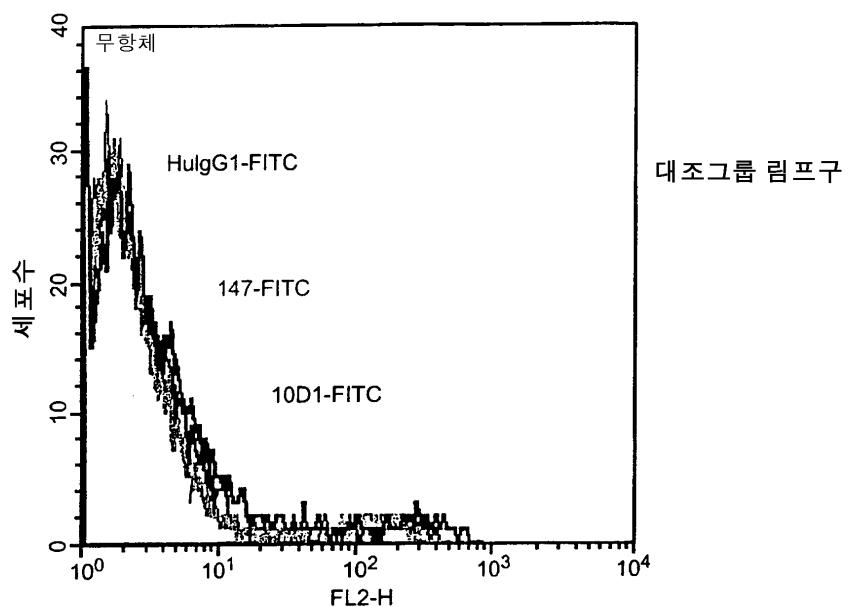
도면13f



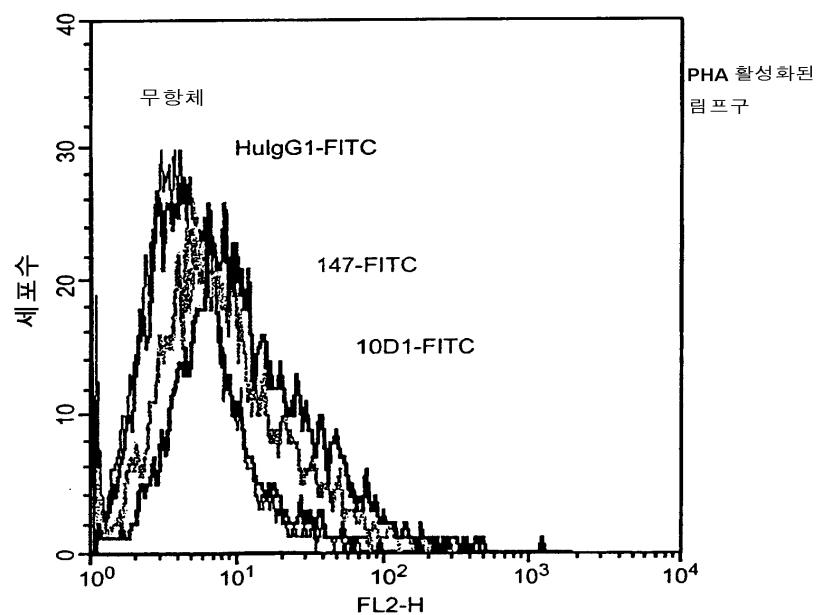
도면13g



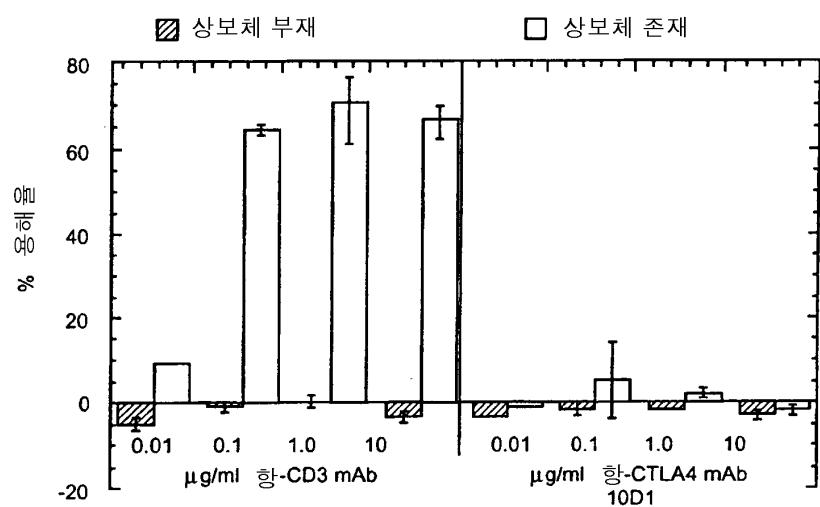
도면14a



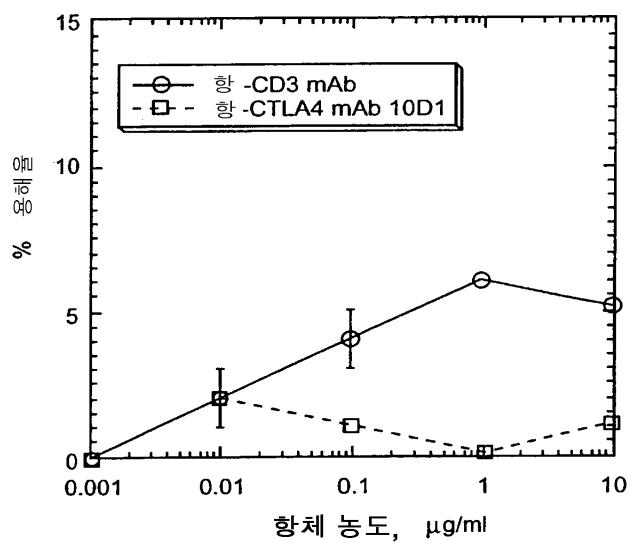
도면14b



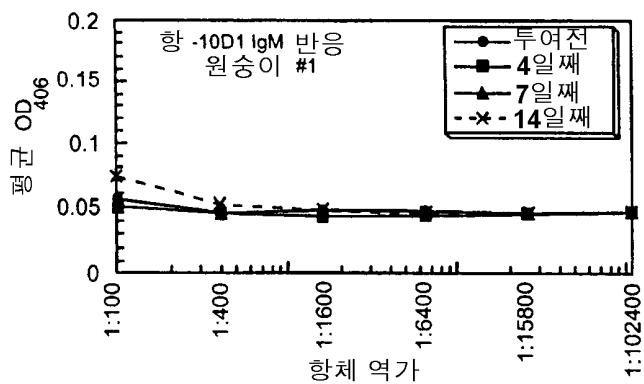
도면15



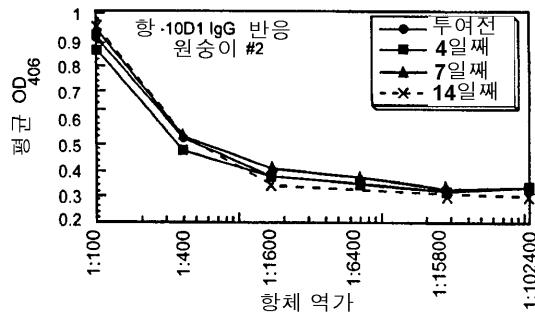
도면16



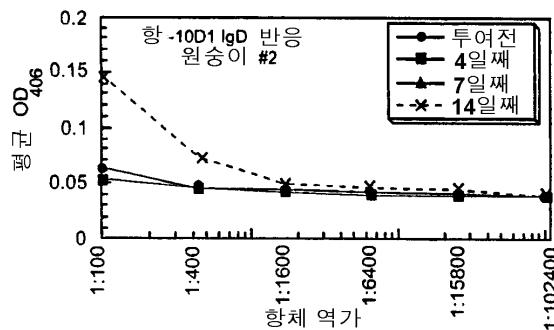
도면17a



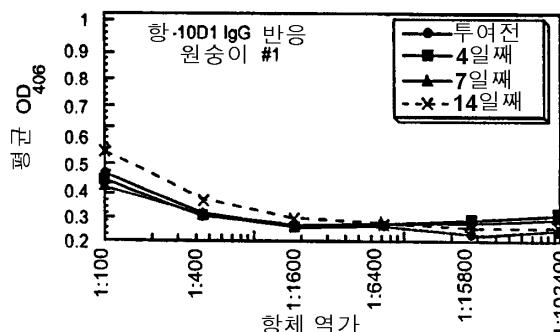
도면17b



도면17c



도면17d



서 열 목 록

<110> Medarex, Inc.
 <120> Human CTLA-4 Antibodies and Their Uses

<130> 6

<150> US 60/150,452
 <151> 1999-08-24

<160> 41

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 3159
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> cloning vector pGP1k

<400>	1					
aattagccgc	cgcgtcgac	aagcttcgaa	ttcagtatcg	atgtgggta	cctactgtcc	60
cgggattgcg	gatccgcgt	gatatcggt	atccctcgagt	gcggccgcag	tatgcaaaaa	120
aaagcccgct	cattaggcgg	gctcttggca	gaacatatcc	atcgctccg	ccatctccag	180
cagccgcacg	cggcgcatct	cggcagcgt	tgggtcctgg	ccacgggtgc	gcatgatcgt	240
gctcctgtcg	ttgaggaccc	ggctaggctg	gcggggttgc	cttactggtt	agcagaatga	300
atcaccgata	cgcgagcga	cgtgaagcga	ctgctgctgc	aaaacgtctg	cgacctgagc	360
aacaacatga	atggtcttcg	gtttccgtgt	ttcgtaaagt	ctggaaacgc	ggaagtca	420
gccctgcacc	attatgttcc	ggatctgcat	cgcaggatgc	tgctggctac	cctgtggAAC	480
acctacatct	gtattAACGA	agcgctggca	ttgaccctga	gtgattttc	tctggtccc	540
ccgcatccat	accGCCAGTT	gtttaccctc	acaacgttcc	agtaaccggg	cattttcatc	600
atcagtaacc	cgtatcgta	gcattctctc	tcgtttcatc	ggtatcatta	ccccatgaa	660
cagaaattcc	cccttacacg	gaggcatcaa	gtgaccaaac	aggaaaaaac	cgcccttaac	720
atggccgct	ttatcagaag	ccagacatta	acgcttcgg	agaaactcaa	cgagctggac	780
gcggatgaac	aggcagacat	ctgtgaatcg	cttcacgacc	acgctgatga	gctttaccgc	840
agctgcctcg	cgcgttcgg	tgtacgggt	gaaaacctct	gacacatgca	gctccggag	900
acggtcacag	tttgtctgta	acggatgcc	gggagcagac	aagccgtca	ggcgctca	960
gcgggttgt	gcgggtgtcg	gggcgcagcc	atgacccagt	cacgtacgca	tagcggagt	1020
tatactggct	taactatgcg	gcatcagagc	agattgtact	gagagtgcac	catatgcgt	1080

gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttc	1140
cgctcactga ctcgctgcgc tcggcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa	1200
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc agaaagaac atgtgagcaa	1260
aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgtt ttccatagc	1320
tccgcccccc tgacgagcat cacaataatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgaa	1380
caggactata aagataccag gcgttcccc ctggaaagctc cctcgtgcgc tctcgtttc	1440
cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc ttggaaagc gtggcgctt	1500
ctcatagctc acgctgttagg tatctcagtt cggtgttaggt cgttcgctcc aagctggct	1560
gtgtgcacga acccccggtt cagcccgacc gctgcgcctt atccgtaac tatgtcttg	1620
agtccaaacc ggtaaagacac gacttatcgc cactggcagc agccaggcgc gccttggcct	1680
aagaggccac tgtaaacagg attagcagag cgaggtatgt aggccgtgct acagagtct	1740
tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtata tcgcctctgc	1800
tgaagccagt taccccgga aaaagagtgg tagctcttg atccggaaa caaaccaccc	1860
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcggc agcagattac ggcggaaaaaa aaaggatctc	1920
aagaagatcc tttagatcttt tctacgggt ctgacgctca gtggaaacgaa aactcacgtt	1980
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaaa ggatcttac ctagatcctt ttaaattaaa	2040
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatata atgagtaaac ttggctgac agttaccaat	2100
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct	2160
gactcccggt cgtgtagata actacgatac gggaggcgtt accatctggc cccagtgctg	2220
caatgataacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag	2280

ccggaaggc cgagcgcaga agtgtcccg caacttatac cgccctccatc cagttatata	2340
attgttgtccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagttgcgc aacgttttt	2400
ccattgtgc aggcacgtg gtgtcacgt cgtcgttgg tatggcttca ttcagctccg	2460
gttcccaacg atcaaggcga gttacatgtat ccccatgtt gtgaaaaaaa gcggttagct	2520
ccttcggtcc tccgatcggtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta	2580
tggcagcact gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgtttt tctgtgactg	2640
gtgagttactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctttgcc	2700
cggcgtcaac acggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtgtt ctcattttttt	2760
gaaaaacgttc ttccggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga	2820
tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatctt tactttcacc agcgtttctg	2880
ggtagcaaa aacaggaagg caaatgcgg caaaaaagg aataaggcgc acacggaaat	2940
gttgaataact catacttttc cttttcaat attattgaag catttatcag gtttattgtc	3000
tcatgagcgg atacatattt gaatgttattt agaaaaataa acaaataagg gttccgcga	3060
cattccccg aaaagtgcga cctgacgtct aagaaaccat tattatcatg acattaaacct	3120
ataaaaatag gcgtatcacg aggcctttc gtctcaag	3159

<210> 2
 <211> 349
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens, preliminary sequence for heavy chain fragment 10D1.3 VH

<400> 2
 tgggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt

cacccctcgt agctatacta tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagt	120
ggtgacattt atatcatatg atggaaacaa taaatactac gcagactccg tgaagggccg	180
attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag	240
agctgaggac acggctatat attactgtgc gaggaccggc tggctgggc ccttgacta	300
ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc accaagggc	349
<210> 3	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens, preliminary sequence for light chain fragment 10D1.3 VK	
<400> 3	
ctccaggcac cctgtcttg tctccagggg aaagagccac cctctcctgc agggccagtc	60
agagtgttgg cagcagctac ttagccttgtt accagcagaa acctggccag gctcccagc	120
tcctcatcta tggtgcatc agcaggccca ctggcatccc agacaggttc agtggcagt	180
ggtcgtggac agacttcact ctcaccatca gcagactgga gcctgaagat tttgcagtgt	240
attactgtca gcagtatggt agtcaccgt ggacgttcgg ccaaggacc aaggtggaaa	300
tcaaacgaac tggctgca c	321
<210> 4	
<211> 287	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens, VK A-27 germline sequence	
<400> 4	
gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgtt ctccagggga aagagccacc	60
ctctccctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca	180

gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcg cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtt tactgttag cagtaggtt gtcacc 287

<210> 5

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens, light chain variable region predicted sequence for VK A-27 germline

<400> 5

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
85 90 95

<210> 6

<211> 325

<212> DNA

<213> Homo sapiens, light chain variable region (VK), 10D1 from VK A-27

<400> 6

gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtttgt ctccaggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtggtggc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gctctggaca gacttcactc tcaccatcgag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgttag cagtaggtt gctcaccgtt gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaac 325

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens, light chain variable region predicted sequence for 10D1 from VK A-27

<400> 7

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 Gly 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 Phe 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

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

<210> 8

<211> 325

<212> DNA

<213> Homo sapiens, light chain variable region (VK) 4B6 from VK A-27

<400> 8

gaaatttggt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtttgt ctccaggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagttct tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcg cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgttag cagtaggtt gtcaccgtt gacgttcggc	300
caagggacca aggtggaaat caaac	325

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens, light chain variable region predicted sequence for 4B6 from VK A-27

<400> 9
 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

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

<210> 10
 <211> 287
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens, VK L-15 germline sequence

<400> 10		
gacatccaga tgaccaggc tccatctca ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc	60	
atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggatca gcagaaacca	120	
gagaaaagccc ctaagtcct gatctatgtc gcatccagg tgcaaagtgg ggtccatca	180	
aggttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240	
gaagattttcaacttattatgcacaaacag tataatagtt accctcc	287	

<210> 11		
<211> 94		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens, light chain variable region predicted sequence for VK L-15 germline		

<400> 11				
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
1	5	10	15	

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp			
20	25	30	

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro				
65	70	75	80	

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr		
85	90	

<210> 12		
<211> 322		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens, light chain variable region VK 1E2 from VK L-15		

<400> 12		
gacatccaga tgaccagtc tccatctca ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc	60	
atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggatca gcagaaacca	120	
gagaaaagccc ctaagtcct gatctatgtc gcatccagg tgcaaagtgg ggtccatca	180	
aggttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240	
gaagatttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctccgac gttcggcaa	300	
gggaccaagg tggaaatcaa ac	322	

<210> 13		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens, light chain variable region predicted sequence for 1E2 from VK L-15		

<400> 13		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1 5 10 15		

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp		
20 25 30		

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50 55 60		

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65 70 75 80		

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro		
85 90 95		

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

<210> 14
<211> 294
<212> DNA
<213> Homo sapiens, VH 3-30.3 germline sequence

<400> 14
caggtgcagc tggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc 60

tcctgtcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180

gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagccttag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaga 294

<210> 15
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens, heavy chain variable region predicted sequence for VH 3-30.3 germline

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 16
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens, heavy chain variable region VH 10D1 from VH 3-30.3

<400> 16
 caggtgcagc tgggggagtc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatacta tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacattt atatcatatg atgaaacaa taaatactac 180
 gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctataat attactgtgc gaggaccggc 300
 tggctgggc ccttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 17
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens, heavy chain variable region predicted sequence for 10D1 from VH 3-30.3

<400> 17
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18
 <211> 355
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens, heavy chain variable region VH 4B6 from VH 3-30.3

<400> 18
 caggtgcagc tggtgagtc tgggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatacta tgcactgggt ccgcaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacattt atatcatatg atggaagcaa taaacactac 180

gcagactccg tgaaggccg attcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgcgtat 240

ctgcaaatga acagccttag agctgaggac acggctatat attactgtgc gaggaccggc 300

tggctgggc ccttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

<210> 19
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens, heavy chain variable region predicted sequence for 4B6 from VH 3-30.3

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

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

20	25	30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys	Gly Leu Glu Trp Val	
35	40	45
Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His	Tyr Ala Asp Ser Val	
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser	Lys Asn Thr Leu Tyr	
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Ile Tyr Tyr Cys	
85	90	95
Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr	Trp Gly Gln Gly Thr	
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		

<210> 20
 <211> 296
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens, VH 3-33 germline sequence

20		
caggtgcagc tggtgagtc tggggaggc gtggccagc ctggaggtc cctgagactc		60
tcctgtcagc cgtctggatt cacttcagt agctatggca tgcactgggt ccgcaggct		120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtagt atggaagtaa taaatactat		180
gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat		240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgtt attactgtgc gagaga		296

<210> 21
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens, heavy chain variable region predicted sequence for VH 3-33 germline

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 22

<211> 358

<212> DNA

<213> Homo sapiens, heavy chain variable region VH 1E2 from VH 3-33

<400> 22

caggtgcagc tggtgagtc tgggggaggc gtggccagc ctggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgcaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggatg atgaaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt tttactgtgc gagagctccc 300

aattatattg gtgttttga tgtctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttcag 358

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens, heavy chain variable region predicted sequence for 1E2 from VH 3-33

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95Ala Arg Ala Pro Asn Tyr Ile Gly Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens, light chain CDR1 (HuMab 10D1)

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens, light chain CDR1 (HuMab 4B6)

<400> 25
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens, light chain CDR1 (HuMab 1E2)

<400> 26
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens, heavy chain CDR1 (HuMab 10D1, 4B6)

<400> 27
 Ser Tyr Thr Met His
 1 5

<210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens, heavy chain CDR1 (HuMab 1E2)

<400> 28
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens, light chain CDR2 (HuMab 10D1)

<400> 29
 Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens, light chain CDR2 (HuMab 4B6)

<400> 30

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens, light chain CDR2 (HuMab 1E2)

<400> 31

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens, heavy chain CDR2 (HuMab 10D1)

<400> 32

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens, heavy chain CDR2 (HuMab 4B6)

<400> 33

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens, heavy chain CDR2 (HuMab 1E2)

<400> 34

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens, light chain CDR3 (HuMab 10D1, 4B6)

<400> 35

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens, light chain CDR3 (HuMab 1E2)

<400> 36

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens, heavy chain CDR3 (HuMab 10D1, 4B6)

<400> 37

Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens, heavy chain CDR3 (MuMab 1E2)

<400> 38
 Ala Pro Asn Tyr Ile Gly Ala Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 39
 <211> 506
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> kappa light chain plasmid pCK7-96 (nucleotide residues 3376-3881)

<400> 39
 aggagaatga ataaataaaag tgaatcttg cacctgtggt ttctctctt cctcaattta 60
 ataattatta tctgtgttt accaactact caatttctct tataaggac taaatatgta 120
 gtcatcctaa ggcgcataac catttataaa aatcatcctt cattctattt taccctatca 180
 tcctctgcaa gacagtcctc cctcaaacc acaagcctc tgcctcaca gtccctggg 240
 ccatggatcc tcacatccca atccgcggcc gcaattcgta atcatggtca tagctgttc 300
 ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 360
 gtaaagcctg ggggcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc 420
 ccgccttcca gtcggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgccc 480
 ggagaggcgg ttgcgtatt gggcgc 506

<210> 40
 <211> 4723
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> gammal heavy chain plasmid pCG7-96

<400> 40

gaactcgagc agctgaagct ttctgggc a gccaggcct gacccggct ttggggcagg	60
gagggggcta aggtgaggca ggtggcgcca gccagggtgca cacccaatgc ccatgagccc	120
agacactgga cgctgaacct cgccggacagt taagaaccca gggccctctg cgcctggc	180
ccagctctgt cccacaccgc ggtcacatgg caccacctct cttgcagcct ccaccaaggg	240
cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctggggca cagggccct	300
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcggtga actcaggcg	360
cctgaccaggc ggcgtgcaca cttcccgcc tgcctacag tcctcaggac tctactccct	420
cagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cttggcacc cagacctaca tctgcaacgt	480
gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt ggtgagaggc cagcacaggg	540
agggagggtg tctgctggaa gccaggctca ggcgtctgc ctggacgcat cccggctatg	600
cagccccagt ccagggcagc aaggcaggcc cggctcgct cttcacccgg aggccctgc	660
ccgccccact catgctcagg gagagggtct tctggcttt tccccaggct ctggcaggc	720
acaggctagg tgcccctaac ccaggccctg cacacaagg ggcagggtct gggctcagac	780
ctgccaagag ccatatccgg gaggaccctg cccctgacact aagcccaccc caaaggccaa	840
actctccact ccctcagctc ggacaccttc tctcctccca gattccagta actccaaatc	900
ttctctctgc agagccaaa tcttgtaca aaactcacac atgcccaccc tgcccaggta	960
agccagccca ggcctgccc tccagctaa ggcgggacag gtgcctaga gtgcctgca	1020
tccagggaca ggcggcagcc gggtgctgac acgtccacct ccatctttc ctcagcacct	1080
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg	1140
atctcccgga cccctgagggt cacatgcgtg gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag	1200

gtcaagtca actggtagt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg	1260
gaggaggagt acaacagcac gtaccgttg gtcagcgat tcaccgtct gcaccaggac	1320
tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag gtctccaaca aagccctccc agccccatc	1380
gagaaaacca tctccaaagc caaagggtggg acccggtggg tgcgaggggcc acatggacag	1440
aggccggctc ggcccacccct ctgcctgag agtgaccgct gtaccaacct ctgtccctac	1500
agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccggtat agctgaccaa	1560
gaaccaggta agcctgaccc gcctggtaa aggctctat cccagcgaca tcgcccgtgga	1620
gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc	1680
cgacggctcc ttttccctt acagcaagct caccgtggac aagagcagg ggcagcaggg	1740
gaacgtttc tcatgctccg ttagtgcata ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag	1800
cctccctg tctccggta aatgagtgcg acggccggca agccccgct ccccggtctc	1860
tcgcggtcgc acgaggatgc ttggcacgta cccctgtac atacttcccg ggcgccccagc	1920
atggaaataa agcacccagc gtcgcctgg gcccctgcga gactgtgatg gttcttcca	1980
cgggtcaggc cgagtctgag gcctgagtgg catgagggag gcagagcggg tcccaactgtc	2040
cccacactgg cccaggctgt gcaggtgtgc ctggggcccc taggggtggg ctcagccagg	2100
ggctgcctc ggcagggtgg gggatttgcc agcgtggccc tccctccagc agcacctgcc	2160
ctggcgtgg ccacgggaag ccctaggagc ccctggggac agacacacag cccctgcctc	2220
tgttaggagac tgtctgttc tgtgagcgcc cctgtctcc cgacctccat gcccactcg	2280
gggcatgcct gcaggtcgac tctagaggat ccccggtac cgagctcgaa ttcatcgatg	2340

atatcagatc tgccggtctc cctatagtga gtcgtattaa ttgcataag ccaggtaac	2400
ctgcattaaat gaatcgccca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg ggcgtttcc	2460
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgcctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct	2520
cactcaaagg cgtaatacgt gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg	2580
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc	2640
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	2700
aacccgacag gactataaag ataccaggcg ttcccccgt gaagctccct cgtgcgtct	2760
cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg	2820
gcgcgttctc aatgctcacg ctgttaggtat ctcagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag	2880
ctgggctgtg tgacacgaacc ccccggtcag cccgaccgct gcgccttatac cgtaactat	2940
cgttttgcgtt ccaacccggta aagacacgac ttatgccac tggcagcagc cactggtaac	3000
aggatttagca gagcgaggtt ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagtgt gtggcctaacc	3060
tacggctaca ctagaaggac agtattttgtt atctggcgtc tgcgtaaagcc agttaccitc	3120
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt	3180
tttggtttgcgtt agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgtatc	3240
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaaggat tttggtcatg	3300
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttaaatt aaaaatgaag tttaaatca	3360
atctaaagta tataatggat aacttggtct gacagttacc aatgcttaat cagtggggca	3420
cctatctcag cgtatgtctt atttcggtca tccatagttt cctgactccc cgtcggttag	3480
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgtat accgcgagac	3540

ccacgctcac cggtccaga ttatcagca ataaaccagc cagccgaaag ggccgagcgc	3600
agaagtggtc ctgcaactt atccgcctcc atccagtcata ttaattgttgc cggttgcgt	3660
agagtaagta gttgccagt taatagtttgc cgcaacgttgc ttgcattgc tacaggcatc	3720
gtgggtcac gtcgtcggtt tggtatggct tcattcagctt ccgttccca acgtcaagg	3780
cgagttacat gatccccat gttgtcaaa aaagcggttgc gtccttcgg tcctccgatc	3840
gttgtcagaa gtaagttggc cgcaagatgc tcactcatgg ttatggcagc actgcataat	3900
tctttaactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgatc ctcaaccaag	3960
tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg agttgtctt gcccggcgtc aatacggat	4020
aataccgcgc cacatagcag aactttaaaatgtgtcatca ttggaaaacgttctcggg	4080
cgaaaactctt caaggatctt accgctgttgc agatccagttt cgtatgtacc cactcgtgca	4140
cccaactgat cttagcattc ttttactttc accagcggtt ctgggtgagc aaaaacagga	4200
aggcaaaatg ccgcaaaaaaa gggataagg ggcacacggaaatgttgaat actcataactc	4260
ttcccttttc aatattatttgc aagcattttc cagggttattt gtctcatgag cgatcataata	4320
tttgaatgtat ttttagaaaaaa taaacaaata ggggtccgc gcacatttcc ccgaaaagtgc	4380
ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaaa taggcgtatc	4440
acgaggccctt tcgtctcgccggtt gatgacgggtt aaaaacctgtt acacatgcag	4500
ctcccgaga cggtcacagc ttgtctgttgc gggatgcggggcagaca agcccgatc	4560
ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgttgcggggcgttactatgcggc atcagagcag	4620
attgtactga gagtgcacca tatggacata ttgtcgtag aacgcggcta caattaatac	4680

ataaccttat gtatcataca catacgattt aggtgacact ata 4723

<210> 41
<211> 4694
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gamma4 heavy chain plasmid pG4HE

<400> 41
gaactcgagc agctgaagct ttctgggca ggccgggcct gactttggct gggggcaggg 60

agggggctaa ggtgacgcag gtggcgccag ccaggtgcac acccaatgcc catgagccca 120

gacactggac cctgcatgga ccatcgccga tagacaagaa ccgaggggccc tctgcgcct 180

ggcccccagct ctgtcccaca ccgcggcac atggcaccac ctctcttgca gcttccacca 240

aggccccatc cgtttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag agcacagccg 300

ccctgggctg cctggtaaag gactacttcc ccgaaccggc gacgggtgtcg tggaactcag 360

gcgcctgac cagcggcgtg cacaccccttcc cggctgtcct acagtccctca ggactctact 420

ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacgaagacc tacacctgca 480

acgttagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag aggccagcac 540

agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctcagccctc ctgcctggac gcacccggc 600

tgtcagcccc cagccccagg cagcaaggca tgccccatct gtctccctac ccggaggcct 660

ctgaccaccc cactcatgct cagggagagg gtcttctgga tttttccacc aggctccggg 720

cagccacagg ctggatgccc ctacccagg ccctgcgcac acagggcag gtgcgtgcgt 780

cagacctgcc aagagccata tccgggagga ccctgcctt gacctaagcc cacccaaag 840

gccaaactct ccactccctc agtcagaca cttctctcc tccagatct gagtaactcc	900
caatcttctc tctgcagagt ccaaataatgg tccccatgc ccatcatgcc caggttaagcc	960
aaccaggcc tcgcctcca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag cctgcattca	1020
gggacaggcc ccagccgggt gctgacgcat ccacccat ctcttcctca gcacctgagt	1080
tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct	1140
cccgaccccc tgggttacg tgcgttgtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgagggtcc	1200
agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaag ccgcgggagg	1260
agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc	1320
tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctt ccaacaagg cctccgtcc tccatcgaga	1380
aaaccatctc caaagccaaa ggtgggaccc acggggtgcg agggccacat ggacagaggt	1440
cagctggcc caccctctgc cctgggagtg accgctgtgc caacctctgt ccctacaggg	1500
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac	1560
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaaggc ttctaccac ggcacatcgc cgtggagtgg	1620
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctccgtgct ggactccgac	1680
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggagggaat	1740
gtcttctcat gtcgggtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc	1800
tccctgtctc tggtaaatg agtgccaggc cggcaagcc cccgctcccc gggctctcg	1860
ggtcgcgcga ggtgtttgg cacgtacccc gtctacatac ttcccaggca cccagcatgg	1920
aaataaagca cccaccactg ccctggccc ctgtgagact gtgtatggttc ttccacggg	1980
tcaggccgag tctgaggcct gagtgacatg agggaggcag agcgggtccc actgtcccc	2040

cactggcca ggctgtgcag gtgtgcctgg gccacctagg gtgggctca gccagggct	2100
gccctcgca ggggggggat tttcccgacg tggccccc tccagcagca gctgccctgg	2160
gctggccac gggaaaggccct aggagccctt ggggacagac acacagcccc tgcctctgt	2220
ggagactgtc ctgtcctgtg agcgccctgt cctccgaccc cccatgccca ctcgggggaa	2280
tccccggta ccgagctcgaa attcatcgat gatatcgat ctgccgtct ccctatagtg	2340
agtcttattt atttcgatggccaggatggtaa cctgcattaa tgaatcgcc aacgcgcggg	2400
gagaggcggt ttgcgtattt ggccgtcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgtc	2460
ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcggc tcactcaaa gcgtaataac gtttatccac	2520
agaatcagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	2580
cgtaaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca	2640
caaaaatcgaa cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	2700
gtttccccc ggaagctccc tcgtgcgtc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata	2760
cctgtccgcc ttctccctt cggaaagcgt ggccgtttct caatgctcac gctgttaggt	2820
tctcagttcg gtgttaggtcg ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca	2880
ccccgaccgc tgccgcctt cggtaacta tcgttttagt tccaacccgg taagacacga	2940
cttatacgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg	3000
tgctacagat ttcttgaagt ggtggctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg	3060
tatctgcgt ctgtgtggc cagttaccc tggaaaaaaa gttggtagct cttgtatccgg	3120
caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgggtc aagcagcaga ttacgcgcag	3180

aaaaaaagga tctcaagaag atccttgat ctttctacg gggctgacg ctcagtgaa	3240
cgaaaactca cgtaaggga tttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat	3300
cctttaat taaaatgaa gtttaatc aatctaaatc aatatgagt aaacttggtc	3360
tgacagttac caatgctta tcaatgaggc acctatctca gcatctgtc tattcggtc	3420
atccatagtt gcctgactcc ccgtcgta gataactacg atacggagg gcttaccatc	3480
tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca cggctccag atttatcagc	3540
aataaaccag ccagccgaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc	3600
catccagtct attaattgtt gccggaaagc tagagtaatg agttcgccag ttaatagttt	3660
gcgcaacgtt gttgccattt ctacaggcat cgtgggtca cgctcgctgt ttggatggc	3720
ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tggatccccca tggatggcaa	3780
aaaagcggtt agtccttcg gtcctccat cgtgtcaga agtaagttgg ccgcgtgtt	3840
atcaactcatg gttatggcag cactgcataa ttctttact gtcatgccat ccgtaaatgt	3900
ctttctgtc aciggtgagt actcaacca gtcattctga gaatagtgtt tgcggcgacc	3960
gagttgtct tggccggcgt caatacgggaa taataccgcg ccacatagca gaactttaaa	4020
agtgcatac attggaaaac gttttcggtt gcgaaaactc tcaaggatct taccgtgtt	4080
gagatccagt tcgatgtaac ccactcggtt acccaactga ttttcagcat ctttacttt	4140
caccagcggtt tctgggttag caaaaacagg aaggcaaat gcccggaaaa aggaaataag	4200
ggcgacacgg aaatgttcaa tactcataact cttccctttt caatattattt gaagcattta	4260
tcagggttat tgtctcatga gcgatcatat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat	4320
agggttccg cgacatttc cccgaaaatg gcccacgtac gtctaaagaa ccattttat	4380

catgacat	ta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc tttcg	tctcg cgcgtt	cgg 4440
tgtatgacggt	gaaaacctct gacacatgca gctccggag acggtcacag	cttgc	tgt 4500
agcggatgcc	gggagcagac aagccgtca gggcggtca gcgggttgc	ggtcg 4560	
gggctggctt	aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc	atatggacat 4620	
attgtcgta	gaacgcggct acaattaata cataacctta tgtatcatac	acatacgatt 4680	
taggtgacac	tata 4694		