(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[6]
A61K 39/00

(45) 공고일자 2005년12월30일
(11) 등록번호 10-0468330
(24) 등록일자 2005년01월18일

(21) 출원번호	10-1996-0705968	(65) 공개번호	10-1997-0702068
(22) 출원일자	1996년10월24일	(43) 공개일자	1997년05월13일
번역문 제출일자	1996년10월24일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/004832	(87) 국제공개번호	WO 1995/28957
국제출원일자	1995년04월25일	국제공개일자	1995년11월02일

(81) 지정국

국내특허 : 오스트레일리아, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 체코, 그루지야, 헝가리, 일본, 북한, 대한민국, 스리랑카, 리투아니아, 라트비아, 마다가스카르, 몽고, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 루마니아, 슬로베니아, 슬로바키아, 트리니아드토바고, 우크라이나,

AP ARIPO특허 : 케냐, 말라위, 수단,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 영국, 포르투칼, 스웨덴,

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

(30) 우선권주장 08/234987 1994년04월25일 미국(US)

(73) 특허권자

유니버시티 오브 매사추세츠 메디칼 센터
미국 01655 매사추세츠주 우스터 레이크 애비뉴 노쓰 55

트러스티스 오브 다트마우스 칼리지
미합중국 뉴 햄프셔 (우편번호 03755) 하노버

(72) 발명자

노엘, 란돌프, 제이.
미국 03745 뉴햄프셔주 코니쉬 박스 257 루랄 루트 3

듀리에, 피오나, 에이취.
미국 98107 워싱톤주 시애틀 엔. 더블유. 58번 #101 1731

파커, 데이비드, 씨.
미국 97214 오레곤주 포틀랜드 에스. 이. 20번 애비뉴 1953

에펠, 마이클, 씨.
미국 80401 콜로라도주 골든 푸트힐즈 드라이브 사우스 2204

필립스, 낸시, 이.

미국 01545 매사츄세츠주 쉬류스버리 오클랜드 애비뉴22

모르데스, 존, 피.
미국 02168 매사츄세츠주 뉴톤 데본쉬어 로드 80

그레니얼, 데일, 엘.
미국 01452 매사츄세츠주 후바르드스톤 윌리암스빌 템펠톤 로드 39

로시니, 알도, 에이.
미국 01776 매사츄세츠주 수드버리 램블링 로드 62

(74) 대리인 주성민

심사관 : 임혜준

(54) 조직또는기관이식편에대한T세포내성을유도하는방법

요약

본 발명은 수용자의 공여 조직 또는 기관에서 그 조직 또는 기관에 대한 T 세포 내성을 유도하는 방법에 관한 것이다. 1) 하나 이상의 공여 항원을 발현하고, 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 수용자 T 세포 표면 상의 수용체와 작용하는 리간드를 세포 표면 상에 갖는 동종 또는 이종 세포, 및 2) 수용체와 리간드 간의 작용을 억제하는 T 세포 표면 상의 수용체 길항질을 수용자에게 투여하는 것으로 이루어진 수용자의 공여 조직 또는 기관에서 그 조직 또는 기관에 대한 T 세포 내성 유도 방법에 관한것이다. 바람직한 실시 태양에서, 동종 또는 이종 세포는 B 세포이고, 바람직하게는 휴지 B 세포 이고, 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 T 세포의 표면 상의 분자는 gp39이다. 바람직한 gp39 길항질은 항-gp39 항체이다. 동종 또는 이종 세포 및 길항질은 통상적으로 수용 피검체에 조직 또는 기관을 이식하기 전에 투여된다. 본 발명의 방법은 예를 들어 이식된 조직 또는 기관, 예를 들어 간, 신장, 심장, 폐, 피부, 근육, 신경 조직, 위 및 장에 대한 T 세포 내성을 유도하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 공여 항원을 발현하는 동종 또는 이종 세포, gp39 길항질 및 공여체 췌장섬을 치료를 요하는 피검체에 투여 하는 것으로 이루어진 당뇨병 치료 방법을 제공한다.

명세서

발명의 배경

항원 특이적 T 세포 활성화 및 클론 팽창을 유도하기 위해서는 항원 공급 세포 (ACPs)에 의해 발생되는 두개의 신호가 휴지 T 임파구의 표면에 전달되어야 한다 (Jenkins, M. and Schwartz, R. (1987) J. Exp. Med. 165, 302-319; Mueller, D.L. 등(1990) J. Immunol., 144, 3701-3709; Williams, I.R. and Unanue, E.R. (1990) J. Immunol, 145, 85-93). 면역 반응에 대한 특이성을 부여하는 제1 신호는 주요 조직 적합 복합체 (MHC)와 관련하여 제공되는 외부 항원 펩티드를 인지한 후, T 세포 수용체 (TCR)를 통해 매개된다. 공자극 (costimulation)이라 불리우는 제2 신호는 T 세포가 증식하고, 기능을 하도록 유도한다 (Schwartz, R.H. (1990) Science 248, 1340-1356). 공자극은 항원 특이적이지도, MHC 제한적이지도 않고, APC에 의해 발현되는 하나 이상의 특징적 세포 표면 분자들에 의해 제공되는 것으로 간주된다 (Jekins, M.K. 등 (1988) J. Immunol. 140, 3324-3330; Linsley, P.S. (1991) J. Exp. Med. 173, 721-730; Gimmi, C.D. 등 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 6575-6579; Young, J.W. 등 (1992) J. Clin. Invest. 90, 229-237; Koulova, L. 등 (1991) J. Exp. Med. 173, 759-762; Reiser, H. 등 (1992) Proc, Natl. Acad. Sci. USA. 89, 271-275; van-Seventer, G.A. 등 (1990) J. Immunol. 144, 4579-4586; LaSalle, J.M. 등 (1991) J. Immunol. 147, 774-80; Dustin, M.I. 등 (1989) J. Exp. Med. 169, 503; Armitage, R.J. 등 (1992) Nature 357, 80-82; Liu, Y. (1992) J. Exp. Med. 175, 437-445). T 세포 활성화에 참여하는 하나의 공자극 경로는 T 세포 표면 상의 분자 CD28과 관련있다. 이 분자는 B 세포 또는 다른 APCs 상의 리간드에 의해 전달되는 공자극 신호를 수용할 수 있다. CD28를 위한 리간드는 B7-1 및(또는) B7-2와 같은 B림프구 활성화 항원의 B7군의 일원을 포함한다 (Freedman, A.S. 등 (1987) J. Immunol. 137, 3260-3267; Freeman, G.J. 등 (1989) J. Immunol. 143, 2714-2722; Freeman, G.J. 등 (1991) J. Exp. Med. 74, 625-631; Freeman, G.J. 등 (1993)

Science 262, 909-911; Azuma, M. 등 (1993) Nature 366, 76-79; Freeman, G.J. (1993) J. Exp. Med. 178, 2185-2192). 또한, B7-1 및(또는) B7-2는 활성화된 T 세포 표면 상에 존재하는 다른 분자 CTLA4를 위한 리간드이나, 공자극에서 CTLA4의 역할은 불분명하다.

항원 특이적 신호와 함께 공자극 신호의 T 세포로의 전달은 T 세포 활성화를 초래하여 T 세포 증식 및 시토킨 분비를 유도할 수 있다. 대조적으로 공자극 신호가 없는 항원 특이적 신호의 T 세포로의 전달은 T 세포에서 무반응 또는 아네르기 상태를 유도하여 T 세포에서 항원 특이적 내성(tolerance)을 유도하는 것으로 간주된다.

T 세포 및 B 세포간의 작용은 면역 반응에서 중추적인 역할을 한다. 흉선 의존적 항원에 대한 체액성 면역 유도는 T 헬퍼(이하에서는 Th로 나타냄) 세포에 의해 제공되는 "헬프"를 요구한다. B 림프구에 제공된 특정 헬프가 Th 세포에 의해 방출된 가용성 분자 (예를 들어, IL-4 및 IN-5와 같은 림포킨)에 의해 매개되는 반면, B 세포의 활성화는 또한 B 세포와 Th 세포간의 접촉 의존성 작용을 요구한다. Hirohata 등, J. Immunol. 140, 376-3744 (1988); Bartlett등, J. Immunol. 143, 1745-1754 (1989). 이는 B 세포 활성화가 B 세포와 Th 세포 상의 세포 표면 분자간의 필수적 작용을 수반함을 나타낸다. 그러므로, T 세포 상의 분자는 T 세포의 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개한다. B 세포와 T 세포 상의 분자간의 접촉 의존성 작용은 활성화된 T 세포의 단리된 원형질 막이 B 세포 활성화에 요구되는 헬퍼 기능을 제공할 수 있다는 관찰에 의해 지지된다. Brian, Proc. Natl. Acd. Sci. USA 85, 564-568 (1988); Hodkin 등, J. Immunol. 145, 2025-2034 (1990); Noelle 등, J. Immunol. 146, 1118-1124 (1991).

항체에 의해 가교될 때 B 세포 증식을 유도하는 미성숙 및 성숙 B 림프구의 표면 상에서 CD40 분자가 동정되었다. Valle 등, Eur. J. Immunol., 19, 1463-1467 (1989); Gordon 등, J. Immunol., 140, 1425-1430 (1988); Gruber, J. Immnunol., 142, 4144-4152 (1989). CD40은 분자적으로 클로닝되고, 특징 규명이 되어 왔다. Stamenkovic 등, EMBO J. 18, 1403-1410 (1989). CD40을 위한 리간드인 gp39(또한 CD40 리간드 또는 CD40L로 불림)은 분자적으로 클로닝되고 규명되어 왔다(Armitage, Nature, 357, 80-82 (1992); Lederman 등, J. Exp. Med., 175, 1091-1101(1992); Hollenbaugh, EMBO J., 11, 43313-4319 (1992)). gp39 단백질은 휴지 상태가 아니라 활성 상태의 $CD4^+$ Th 세포에서 발현된다. Spriggs 등, J. Exp. Med., 176, 1543-1550 (1992); Lane 등, Eur. J. Immunol. 22, 2573-2578 (1992); Roy 등, J. Immunol., 151, 1-14 (1993). gp39 유전자로 형질 감염되고, 그 표면에서 gp39 단백질을 발현하는 세포는 B 세포 증식을 개시할 수 있고, 다른 자극 신호와 함께 항체 생산을 유도할 수 있다. Armitage 등, Nature, 357, 80-82 (1992); Hollenbaugh, EMBO J., 11, 4313-4319 (1992).

발명의 요약

T 세포의 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 세포 표면 분자는 T 세포 헬프를 요구하는 면역 반응 유도에 중요하다. 예를 들어, T 세포 상의 gp39와 B 세포 상의 CD40간의 작용은 항원에 대한 B 세포 반응을 활성화하는데 중심적인 역할을 한다. 본 발명은 적어도 부분적으로는, T 세포의 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 세포 표면 분자가 또한 동종항원에 대한 T 세포 반응에서 결정적인 역할을 한다는 발견에 기반을 두고 있다. 특히, 적절한 조건 하에서 T 세포에 대한 동종항원을 제공하는 동종(allogeneic) 세포 상의 리간드와 gp39 간의 작용에 대한 간섭은 T 세포에서 내성을 유도할 수 있다는 것이 발견되었다. 바람직하게는, T 세포를 활성화하는데 요구되는 신호를 제공할 수 있기 위해서는, T 세포에 대한 동종 항원(alloantigen)을 제공하는 동종 세포는 그 세포 상의 gp39 리간드와 T 세포 상의 gp39간의 작용을 필요로 한다. 동종 세포 상의 gp39 리간드와 T 세포 상의 gp39의 작용의 억제는 T 세포 활성화를 막고, 동종항원 특이적 T 세포 내성을 유도한다. 기술된 바와 같이 동종항원에 대한 T 세포 내성의 유도는 조직 또는 기관 이식용 예비 요법으로 사용될 수 있다.

따라서, 본 발명의 방법은 특히 조직 또는 기관의 수용자에서 공여체의 조직 또는 기관에 대한 T 세포 내성을 유도하는데 유용하다. 상기 방법은 1) 하나 이상의 공여 항원을 발현하고, 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 수용자 T 세포의 표면 상의 수용체와 작용하는, 세포 표면 상의 리간드를 갖는 동종 또는 이종(xenogeneic) 세포 및, 2) 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 수용자 T 세포의 표면상의 분자의 길항질을 이식 수용자에게 투여하는 것을 포함한다. 길항질은 T 세포 상의 분자와 동종 또는 이종 세포 상의 그의 리간드간의 작용을 억제한다.

바람직한 실시 태양에서, 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 수용자 T 세포의 표면 상의 수용체는 gp39이다. 이 실시 태양에서, 길항질은 T 세포 상의 gp39와 동종 또는 이종 세포 상의 gp39 리간드간의 작용을 억제하는 분자이다. 특히 바람직한 gp39 길항질은 항-gp39 항체이다. 다른 실시 태양에서, gp39 길항질은 gp39 리간드의 가용성 형태이고, 예를 들어 가용성 CD40이다. 수용자에게 투여될 동종 또는 이종 세포는 바람직하게는 림프계 세포, 예를 들어 B 세포이다. 또

한, 동종 또는 이종 세포는 작은 휴지 B 세포이다. 동종 또는 이종 세포 및 길항질(예를 들어, 항-gp39 항체)는 통상적으로 수용자에게 조직 또는 기관을 이식하기 전에 투여된다. 예를 들어, 수용자에게 조직 또는 기관을 이식하기 전에 조직 또는 기관의 공여체로부터의 림프계 세포 (예를 들어, B 세포)를 길항질과 함께 수용자에게 투여한다.

본 발명의 방법은 예를 들어 이식된 조직 또는 기관, 예를 들어 간, 신장, 심장, 폐, 피부, 근육, 신경 조직, 위 및 장에 대한 T 세포 내성을 유도하는데 사용될 수 있다. 다른 실시 태양에서, 이식된 조직은 췌장섬으로 이루어진다. 따라서, 본 발명은 1) 공여 항원을 발현하는 동종 또는 이종 세포, 2) 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 수용자의 T 세포 표면 상의 수용체의 길항질, 예를 들어 gp39 길항질 (예를 들어, 항-gp39 항체) 및, 3) 공여체 췌장섬을 치료를 요하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 당뇨병 치료 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도1은 항-gp39 항체로만 예비처리되거나 또는 비분획화되거나 또는 분획화된 동종 비장 세포로만 예비 처리된 화학적으로 당뇨병인 생쥐에서 이식된 췌장섬 동종이식편의 생존율을 나타낸 그래프이다.

도2A 및 2B는 1회 투여량의 분획화된 동종 비장 세포로 예비처리되고 2주(패널 A) 또는 7주 (패널 B) 동안 항-gp39 항체 (MR1) 처리된 화학적으로 당뇨병인 생쥐에서 (혈장 글루코스 농도의 감소에 의해 측정됨) 이식된 췌장섬 동종이식편의 생존율을 나타낸 그래프이다. 각 곡선은 각각의 생쥐로부터 얻은 자료를 나타낸다. 흰색 표시는 췌장섬 동종이식편이 자발적으로 실패한 수용자를 나타낸 것이다. 검정 표시는 췌장섬 동종이식편이 실험 종결시에 기능을 하는 생쥐를 나타낸다.

도3A, B 및 C는 6 시간 활성화된 인간 말초 혈액 림프구를 CD40Ig(패널 A), mAb 4D9-8 (패널 B) 또는 mAb 4D9-9 (패널 C)로 염색한 것을 나타낸 유동 혈구 계산 프로파일이다.

도4A, B 및 C는 시클로포린 A의 존재 하에 배양된 6 시간 활성화된 인간 말초 혈액 림프구를 mAb 4D9-8 (패널 A), mAb 4D9-9 (패널 B), 또는 CD40Ig(패널 C)로 염색한 것을 나타낸 유동 혈구 계산 프로파일이다.

도5A 및 B는 비표지된 mAb 4D9-8 (패널 A) 또는 비표지된 mAb 4D9-9(패널 B)의 존재 하에 6 시간 활성화된 인간 말초 혈액 림프구를 CD40Ig로 염색한 것을 나타낸 유동 혈구 계산 프로파일이다.

도6은 세포가 항-인간 gp39 mAb 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 또는 89-79의 존재하에 배양될 때, 가용성 gp39 및 IL-4에 의해 유도된 인간 B 세포 증식의 억제를 나타낸 그래프이다.

도7은 세포가 항-인간 gp39 mAb 24-31 또는 89-79의 존재 하에 배양될 때, 동종 특이적 혼합 림프구 반응의 억제를 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 생체내에서 이식 수용자에게서 공여체 조직 또는 기관 이식에 대한 T 세포 내성을 유도하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 1) 공여 항원들을 발현하고, 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 수용자 T 세포의 표면 상의 수용체와 작용하는 리간드를 세포 표면 상에 갖는 동종 또는 이종 세포 및, 2) 리간드와 수용체의 작용을 억제하는, T 세포의 표면 상의 수용체의 길항질을 이식 수용자에게 투여하는 것을 포함한다. 여기서 사용된 용어 "수용자"란 이식될 조직 또는 기관 이식편이 이식되는 중이거나 또는 이식될 대상을 의미한다. 여기서 사용된 용어 "동종" 세포는 수용자와 동일한 종의 상이한 개체로부터 얻고, 수용자의 세포에 의해 발현되는 항원과는 상이한 "동종항원" 세포를 발현한다. "이종"세포는 수용자와 상이한 종으로부터 얻고, 수용자 세포에 의해 발현된 항원과 상이한 "이종항원(xenoantigen)"을 발현한다. 여기서 사용된 용어 "공여 항원"은 수용자에게 이식될 공여체의 조직 또는 기관 이식편에 의해 발현되는 항원을 말한다. 공여 항원은 동종항원이거나 이종항원일 수 있고, 이식편 공급원에 의존한다. 내성화 요법의 일부로서 수용자에게 투여될 동종 또는 이종 세포는 공여 항원을 발현한다. 즉, 이식될 공여체의 조직 또는 기관에 존재하는 동일 항원의 일부 또는 모두를 발현한다. 동종 또는 이종 세포는 조직 또는 기관 이식편의 공여체로부터 얻는 것이 바람직하지만, 공여체와 공통적인 항원 결정기를 갖는 하나 이상의 공급원으로부터 얻을 수 있다.

동종 또는 이종 세포 외에, 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 T 세포 상의 분자의 길항질을 수용자에게 내성화 요법의 일부로서 투여한다. 기술된 바대로, 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 분자 또는 수용체는 Th 세포 상에 발현되는 것이고, 에펙터 세포 (예를 들어, B 세포) 상의 리간드와 상호작용하고, 여기서 분자와 그의 리간드와의 상호 작용은 에펙터 세포 반응 (예를 들어, B 세포 활성화)를 유발하는데 요구된다. 에펙터 세포 반응에 관여하는 것 외에, 상기 분자

또는 수용체가 항원에 대한 T 세포 반응에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 바람직하게는 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 T 세포 상의 분자는 gp39이다. 따라서, 바람직한 실시 태양에서, 본 발명의 방법은 이식 수용자에게 동종 또는 이종 세포 및 gp39 길항질을 투여하는 것을 포함한다. 동종 또는 이종 세포에 의한 수용자 T 세포의 활성화는 수용자 T 세포 상의 gp39와 동종 또는 이종 세포 상의 gp39 리간드 간의 상호작용을 필요로 한다. 상기 gp39 리간드와의 상호작용을 억제함으로써, 수용자의 T 세포는 동종 또는 이종 세포에 의해 발현된 공여 항원에 의해 활성화되지 않고, 공여 항원에 대해 내성화된다. 따라서, 수용자에게서 공여 항원에 대한 내성 유도는 공여체 이식편의 면역 매개 거부없이 공여체의 조직 또는 기관의 성공적인 이식을 가능하게 한다.

본 발명의 다양한 측면은 하기에 상세히 설명된다.

I. gp39 길항질

본 발명의 방법에 따라, gp39 길항질을 수용자에게 투여하여 수용자 T 세포상의 gp39와 수용자에게 투여될 동종 또는 이종 세포, 예를 들어 B 세포 상의 gp39 리간드의 상호작용에 방해한다. gp39 길항질은 이 상호작용을 방해하는 분자로 정의된다. gp39 길항질은 gp39에 대한 항체일 수 있고(예를 들어, gp39에 대한 단일 클론 항체), gp39에 대한 항체의 단편 또는 유도체 (예를 들어, Fab 또는 $F(ab)'_2$ 단편, 키메릭 항체 또는 인간화된 항체), 가용성 형태의 gp39 리간드 (예를 들어, 가용성 CD40), gp39 리간드의 융합 단백질의 가용성 형태 (예를 들어, 가용성 CD40Ig), 또는 gp39-CD40 상호작용을 파괴하거나 또는 방해하는 제약일 수 있다.

A. 항체

포유 동물(예를 들어, 생쥐, 헴스터, 또는 토끼)는 포유동물에서 항체 반응을 일으키는 gp39 단백질 또는 단백질 단편 (예를 들어, 펩티드 단편)의 면역 유발 형태로 면역될 수 있다. 그의 표면 상에서 gp39를 발현하는 세포는 또한 이뮤노겐으로 사용될 수 있다. 또 다른 이뮤노겐은 정제된 gp39 단백질 또는 단백질 단편을 포함한다. gp39는 표준 정제 기술에 의한 gp39 발현 세포로부터 정제될 수 있다. 또한, gp39 cDNA (Armitage, Nature, 357, 80-82 (1992); Lederman 등, J. Exp. Med., 175, 1091-1101 (1992); Hollenbaugh, EMBO J., 11, 4313-4319 (1992))는 숙주 세포, 예를 들어 세균 또는 포유류 세포주에서 발현될 수 있고, gp39 단백질은 표준기술에 의해 세포 배양액으로부터 정제될 수 있다. 또한, gp39 펩티드는 공지된 기술 (예를 들어, F-moc 또는 T-boc 화학 합성)을 사용하여 gp39의 아미노산 서열을 기초로 하여 합성될 수 있다(Armitage, Nature, 357, 80-82 (1992); Lederman 등, J. Exp. Med., 175, 1091-1101 (1992); Hollenbaugh, EMBO J., 11, 4313-4319 (1992)). 단백질에 대해 면역원성을 부여하기 위한 기술은 담체와의 접합 또는 당업계에 공지된 다른 기술을 포함한다. 예를 들어, 단백질은 보조제의 존재 하에 투여될 수 있다. 면역화 과정은 혈장 또는 혈청에서 항체 역가의 검출에 의해 모니터될 수 있다. 표준 ELISA또는 다른 면역분석법은 항원으로서 이뮤노겐 사용하여 항체 농도를 측정할 수 있다.

면역화 후, 항혈청을 얻을 수 있고, 원한다면, 다클론 항체를 혈청으로부터 단리할 수 있다. 단일클론 항체를 생산하기 위하여, 항체 생산 세포(림프구)를 면역화된 동물로부터 회수하고, 표준 체세포 융합 방법으로 골수종 세포와 융합하여, 이 세포를 영구화하여 히브리도마 세포를 얻을 수 있다. 이러한 기술은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 히브리도마 기술은 Kohler Milstein (Nature (1975) 256, 495-497)에 의해 개발되었고, 또한 다른 기술, 예를 들어 인간 B 세포 히브리도마 기술 (Kozbar 등, Immunol. Today(1983) 4, 72), 인간 단일클론 항체를 생성하기 위한 EBV-히브리도마 기술 (Cole 등, Monoclonal Amtibodies in Cancer Therapy (1985), Allen R. Bliss, Inc., 77-96), 및 조합적 항체 라이브러리의 선별 (Huse 등, Science (1989) 246. 1275)이 있다. 히브리도마 세포는 단백질 또는 펩티드와 특이적으로 반응하는 항체 생산에 대해 면역화학적으로 선별될 수 있고, 단일 클론 항체를 단리할 수 있다.

여기서 사용된 용어 항체는 gp39 단백질 또는 그의 펩티드 또는 gp39 융합 단백질에 특이적으로 반응하는 그의 단편을 포함한다. 항체는 통상적인 방법을 사용하여 단편화될 수 있고, 단편들은 완전 항체에 관해 상기한 바와 동일한 방법으로 그 유용성에 대해 선별될 수 있다. 예를 들어, $F(ab')_2$ 단편은 펩신으로 항체를 처리함으로써 생성될 수 있다. 생성된 $F(ab')_2$ 단편을 처리하여 이황화 결합을 감소시켜 Fab' 단편을 형성할 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 항-gp39 부분을 갖는 이중 특이성 및 키메릭 분자를 포함한다.

인간이 아닌 대상에서 생산된 항체가 인간 치료에 사용될 때, 이들은 상이한 정도로 이물질로서 인지되고, 환자에서 면역 반응이 유발될 수 있다. 이 문제를 최소화 또는 제거하기 위한, 일반적인 면역 억제보다 선호되는 방법은 키메릭 항체 유도체 즉, 인간이 아닌 동물의 가변 영역 및 인간의 불변 영역을 결합한 항체 분자를 생산하는 것이다. 키메릭 항체 분자는 예를 들어, 인간의 불변 영역과 생쥐, 쥐 또는 다른 종의 항체로부터의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 키메릭 항체를 제

조하는 다양한 방법은 문헌에 개시되어 있고, gp39를 인지하는 이뮤노글로불린의 가변 영역을 함유하는 키메릭 항체를 제조하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 81, 6851 (1985), Takeda 등, Nature 314, 452 (1985); Cabilly등, 미국 특허 제4,816,567호, Boss등의 미국 특허 제4,816,397호; Tanaguchi 등, 유럽 특허 공개 제171496호; 유럽 특허 공개 제0173494호; 영국 특허 공고 제2177096호 참조). 이러한 키메릭 항체는 인간 투여 대상에서 대응하는 비키메릭 항체보다 면역원성이 낮을 것으로 예상된다.

인간의 치료를 목적으로 gp39 단백질 또는 펩티드와 특이적으로 반응성인 단일 클론 또는 키메릭 항체는 가변 영역의 일부, 특히 항원 결합 도메인의 프레임 워크 보존 영역이 인간에서 유래하이고, 초가변 영역만이 비인간에서 유래한 인간의 가변 영역 키메라를 생산함으로써 추가로 인간화될 수 있다. 이러한 변형 이뮤노글로불린 분자는 당업계에 공지된 몇가지 기술에 의해 제조될 수 있고 (Teng, Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 80, 7308-7312 (1983); Kozbor, Immunol Today, 4, 7279(1983); Olsson, Meth. Enzymol., 92, 3-16 (1982)), 바람직하게는 PCT 공개 제WO92/06193호 또는 유럽 특허 제0239400호에 따른 방법으로 제조될 수 있다. 인간화된 항체는 상업적으로 예를 들어, 영국 미들섹스 트위켄함 홀리 로드 2 소재의 Scotgen Limited에 의해 생산될 수 있다.

gp39 단백질 또는 펩티드에 반응하는 특이 항체 또는 항체 단편을 생산하기 위한 다른 방법은 gp39 단백질 또는 펩티드를 사용하여 세균에서 발현되는 이뮤노글로불린 유전자 또는 그의 단편을 암호화하는 발현 라이브러리를 선별하는 것이다. 예를 들어, 완전 Fab 단편, VH 영역 및 FV 영역은 파아지 발현 라이브러리를 사용하여 세균에서 발현될 수 있다 (예를 들면, Ward, Nature, 341, 544-546(1989); Huse 등, Science, 246, 1275-1281 (1989) 및; McCafferty, Nature, 348, 552-554 (1990) 참조). 예를 들어 gp39 펩티드를 사용한 상기 라이브러리의 선별은 gp39와 반응성인 이뮤노글로불린 단편을 동정할 수 있다. 또한, SCID-hu 생쥐(겐팜 (Genpharm)에서 구입)가 항체 또는 그의 단편을 생산하는데 사용될 수 있다.

인간 gp39 및 쥐 gp39를 포함하여 gp39에 대한 단일 클론 항체 및 본 발명의 방법에 사용하기에 적절한 단일 클론 항체를 생산하기 위한 방법이 실시예 2에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 항-인간 gp39 단일클론 항체는 바람직하게는 항원 특이적 T 세포 내성을 유도하는데 사용된다. 바람직한 항체는 단일 클론 항체 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 및 89-79를 포함하며, 실시예 2에 기재되어 있다. 특히 바람직한 항체는 단일 클론 항체 89-76 및 24-31이다. 89-76 및 24-31 항체를 생성하는 89-76 및 24-31 히브리도마는 각각 부다페스트 조약의 규정 하에 1994년 9월 2일에 American Type Culture Collection(미국 메릴랜드주 록크빌 파크론 드라이브 소재)에 기탁하였다. 89-76 히브리도마에는 ATCC 기탁 번호 HB11713이, 24-31 히브리도마에는 ATCC 기탁 번호 HB11712가 부여되었다. 24-31 및 89-76 항체는 IgGI 이소타입이다.

다른 실시 태양에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 항-인간 gp39 mAb는 3E4, 2H5, 2H8, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 및 89-79로 이루어진 군으로부터 선택된 단일 클론 항체에 의해 인지되는 에피토프에 결합한다. 더욱 바람직하게는 항-인간 gp39 mAb는 단일 클론 항체 24-31 또는 단일 클론 항체 89-76에 의해 인지되는 에피토프에 결합한다. 상기 항체에 의해 인지되는 에피토프에 결합하는 mAb의 능력은 표준 교차 경쟁 (cross-competition) 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, mAb 24-31에 의해 인지되는 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 활성화된 T 세포에 결합하기 위해 표지된 24-31과 경쟁할 것이며, 반면에 mAb 24-31에 의해 인지되는 것과 상이한 에피토프에 결합하는 항체는 활성화된 T 세포에 결합하기 위해 표지된 24-31과 경쟁하지 않을 것이다.

B. gp39를 위한 가용성 리간드

T 세포 내성을 유도하기 위하여 투여되는 다른 gp39 길항질은 gp39 리간드의 가용성 형태를 포함한다. gp39의 1가 가용성 리간드, 예를 들어 가용성 CD40은 gp39에 결합할 수 있고, 따라서 gp39와 B 세포 상의 CD40간의 상호작용을 억제할 수 있다. 용어 "가용성"은 리간드가 세포막에 영구적으로 결합되지 않는 것을 의미한다. 가용성 gp39 리간드는 화학 합성, 바람직하게는 재조합 DNA 기술에 의해, 예를 들어 리간드의 세포외 도메인(트렌스멤브레인 도메인 및 세포질 도메인 미포함)만을 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 바람직한 가용성 gp39 리간드는 가용성 CD40이다. 또한 가용성 gp39 리간드는 융합 단백질의 형태일 수 있다. 이러한 융합 단백질은 제2 분자에 결합된 gp39 리간드의 적어도 일부를 포함한다. 예를 들어, CD40은 이뮤노글로불린과 융합 단백질로서 발현될 수 있다(즉, CD40Ig 융합 단백질), 한 실시 태양에서, 이뮤노글로불린 중쇄, 예를 들어 Cγ1의 힌지, CH2 및 CH3 영역에 대응하는 서열의 아미노산 잔기와 결합되어 CD40Ig 융합 단백질을 형성하는 CD40의 세포외 도메인 부분의 아미노산 잔기를 포함하는 융합 단백질이 제조된다(Linsley 등 (1991) J. Exp. Med. 1783, 721-730; Capon 등 (1989) Nature 337, 525-531 및 미국 특허 제5,116,964호). 융합 단백질은 화학 합성, 또는 바람직하게는 CD40의 cDNA를 기초로 한 재조합 DNA 기술로 생성될 수 있다(Stamenkovic 등, EMBO J. 8, 1403-1410 (1989)).

Ⅱ. 항원 특이적 내성 유도를 위한 세포

본 발명은 gp39 길항질의 존재 하에 T 세포에 대한 동종항원을 동종 세포에 의해 제공하면 동종항원에 대한 T 세포 내성을 초래한다는 발견에 기초한 것이다. 이 메카니즘에 의해 내성을 유도할 수 있는 세포는 항원을 제공하고, gp39와의 상호작용에 의해 T 세포를 활성화하는 것을 포함한다 (즉, T 세포 상의 gp39와 항원 제공 세포 상의 gp39 리간드간의 상호작용은 T 세포 활성화를 위한 적절한 신호를 T 세포에 전달하는데 요구됨). 동종 또는 이종 세포 상의 리간드와 수용자 T 세포 상의 gp39의 상호작용의 억제는 동종 또는 이종항원에 의한 T 세포 활성화를 방지하고, 항원에 대한 T 세포 내성을 유도한다. gp39를 통한 T 세포 활성화 억제는 동종 또는 이종 세포 상의 공자극 분자(예를 들어, B 세포 상의 B7군 분자)의 유도를 방지할 수 있고, 세포가 공자극 신호의 부재 하에서 항원 신호만을 T 세포에 전달하기 때문에 내성을 유발한다.

따라서, 본 발명의 방법에서 동종 또는 이종 세포가 수용자에게 투여된다. 동종 또는 이종 세포는 수용자의 T 세포에 대한 항원을 제공할 수 있고, 예를 들어, "전문적인" 항원 제공 세포인 B 림프구 (예를 들어, 단핵구, 수지상 세포, 랑게르한 세포) 또는 면역 세포에 대해 항원을 제공하는 다른 세포 (예를 들어, 각질세포, 내피 세포, 성상 세포, 섬유아세포, 핍돌기교세포)이다. 더욱이, 동종 또는 이종 세포는 수용자 T 세포에서 공자극 신호를 자극하는 능력이 저하된 것이 바람직하다. 예를 들어, 동종 또는 이종 세포는 공자극 분자, 예를 들어 B7군 단백질(예를 들어, B7-1 및 B7-2)의 발현이 결여되거나 또는 저수준으로만 발현할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 효과적인 동종 또는 이종 세포 상의 공자극 분자의 발현은 표준 기술, 예를 들면 공자극 분자에 대한 항체를 사용하는 유동 혈구 계산으로 측정될 수 있다.

T 세포 내성 유도에 바람직한 동종 또는 이종 세포는 림프계 세포, 예를 들어 말초 혈액 림프구 또는 비장 세포이다. T 세포 내성 유도에 바람직한 림프계 세포는 B 세포이다. B 세포는 혼합 세포 (예를 들어, 말초 혈액 또는 비장의 다른 세포 형태)로부터 표준 세포 분리 기술에 의해 정제될 수 있다. 예를 들면, 결합된 세포는 비장 세포를 플라스틱 접시에 배양하고, 비결합 세포들을 회수함으로써 제거될 수 있다. T 세포는 항-T 세포 항체(즉, 항-Thy1.1 및(또는) 항-Thy1.2) 및 보체로 처리함으로써 세포 혼합물로부터 제거될 수 있다. 하나의 실시 태양에서, 휴지 림프계 세포, 바람직하게는 휴지 B 세포가 항원 제공 세포로 사용된다. 휴지 림프계 세포, 예를 들어 휴지 B 세포는 당업계에 공지된 기술, 예를 들어 작은 크기 및 밀도에 근거하여 단리될 수 있다. 휴지 림프계 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같은 역유동 원심분리 용출에 의해 단리될 수 있다. 역유동 원심분리 용출을 사용하여, T 세포 반응을 활성화시킬 수 있는 세포가 고갈된 작은 휴지 림프계 세포는 14-19 ml/분, 바람직하게는 19 ml/분(3,200 rpm)에서 분획을 수집함으로써 얻을 수 있다. 또한 작은 휴지 림프구(예를 들어, B 세포)는 예를 들어 피콜 (Ficoll) 또는 페르콜 (Percoll) 구배를 사용하여 불연속 밀도 구배 원심분리에 의하여 단리할 수 있고, 작은 휴지 림프구를 함유하는 층을 원심분리 후 얻을 수 있다. 또한, 작은 휴지 B 세포는 활성화된 B 세포의 표면 상의 공자극 분자, 예를 들어 B7-1 및(또는) B7-2의 발현을 표준 기술(예를 들어, 면역형광법)에 의해 분석함으로써 활성화된 B 세포와 구별될 수 있다.

수용자에 투여되는 동종 또는 이종 세포는 적어도 부분적으로 공여 항원을 수용자 T 세포에 제공한다. 따라서, 세포는 또한 공여체 조직 또는 기관에 의해서도 발현되는 항원을 발현한다. 통상적으로 이는 조직 또는 기관 이식편 공여체로부터 얻은 동종 또는 이종 세포를 사용하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 조직 또는 기관 공여체로부터 말초 림프계 세포, B 세포 또는 비장 세포를 단리하여 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 또한, 세포가 조직 또는 기관 공여체와 공통적인 항원 결정기를 갖는 한, 동종 또는 이종 세포는 조직 또는 기관 공여체 이외의 다른 제공 대상에서 얻을 수 있다. 예를 들어, 공여체의 조직 또는 기관과 동일한 주요 조직적합 복합체 항원을 대부분 또는 모두 발현하는 동종 또는 이종 세포를 사용할 수 있다. 따라서, 조직 또는 기관 공여체와 일치되는 MHC 하플로타입인 제공 대상(예를 들어, 이식편 공여체의 가까운 친척)으로부터 얻은 동종 또는 이종 세포를 사용할 수 있다.

Ⅲ. 세포 및 gp39 길항질의 투여

기관 또는 조직 이식편에 대한 T 세포 내성은 본 발명의 방법에 따라 공여 항원을 발현하고, gp39를 통해 수용자 T 세포와 작용하는 동종 또는 이종 세포와 함께 gp39 길항질을 이식 수용자에게 투여함으로써 유도될 수 있다. 바람직한 실시 태양에서, 동종 또는 이종 세포 및 gp39 길항질을 수용자에게 동시에 투여할 수 있다. 별법으로, 예를 들어, 길항질이 긴 반감기를 갖는 항체인 경우, gp39 길항질을 동종 또는 이종 세포는 투여하기 전에 투여할 수 있다. 바람직한 실시 태양에서, 길항질 및 동종 또는 이종 세포를 수용자에게 기관 또는 조직을 이식하기 전에 투여된다 (즉, 수용자를 길항질 및 세포로 예비처리한다). 예를 들어, 동종 또는 이종 세포 및 길항질의 투여는 기관 또는 조직 이식 수일 (5 내지 8일) 전에 수행될 수 있다.

1회 투여량의 동종 세포 (길항질과 혼합하여) 투여가 공여체의 조직 또는 기관에 대한 T 세포 내성을 유도하기에 충분한 것으로 밝혀졌다 (실시예 1 참조). 투여되는 세포 수는 사용되는 세포의 종류, 조직 또는 기관 이식편의 종류, 수용자의 체

중, 수용자의 일반적인 상태 및 당업계의 숙련가에게 공지된 다른 변수들에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 방법에 사용하기 적절한 세포 수는 통상적인 방법으로 당업계의 숙련가에 의해 측정될 수 있다 (실시예 1 참조). 세포는 수용자에게서 T 세포 내성을 유도하기에 적절한 형태와 경로로 투여된다. 세포는 생리적으로 허용 가능한 용액, 예를 들어 완충 염수 용액 또는 유사한 비히클 내에 포함된 형태로 투여될 수 있다. 세포는 바람직하게는 정맥내 투여된다.

본 발명의 길항질은 T 세포 내성을 유도하기 위한 생체내 제약 투여에 적절한 생물학적 상용 형태로 투여 대상에 투여된다. "생체내에 투여하기 적절한 생물학적 상용 형태"란 화합물의 치료 효과가 독성 효과보다 큰 투여되는 길항질의 형태를 의미한다. 용어 "투여 대상"은 면역 반응을 일으킬 수 있는 생물체, 예를 들어 포유류를 포함한다. 투여 대상의 예는 인간, 개, 고양이, 생쥐, 쥐 및 그의 유전자 도입(transgenic) 종을 포함한다. gp39 길항질은 임의로 제약적으로 허용가능한 담체와 함께 제약 형태로 투여될 수 있다. 치료 활성량의 길항질 투여는 목적하는 결과(T 세포 내성)을 얻기에 필요한 일정 시간 동안 효과적인 투여량으로 정의된다. 예를 들어, gp39의 치료 활성량은 질환의 상태, 연령, 성별 및 개체의 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 일으키는 길항질의 능력과 같은 요소들에 따라 변화될 수 있다. 투여 요법은 최적 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 투여량을 하루에 몇회로 나누어 투여할 수 있거나 또는 치료 상태의 위급함에 비례하여 감소될 수 있다. 실시예 1에 기재된 바에 따라 항-gp39 항체로 치료하기 위해, 효과적인 치료 요법은 조직 또는 기관 이식 이전에(이식하기 5 내지 8일 전) 항체 투여를 개시하고, 이어서 이식 후에 몇주 동안 (예를 들어 2 내지 7주) 항체를 재투여(2일 마다)하는 것을 포함할 수 있다.

활성 화합물 (예를 들어, 항체와 같은 길항질)를 피하, 정맥 내 등의 주사, 경구 투여, 흡입, 경피 투여, 또는 직장 투여 등과 같은 편리한 방법으로 투여할 수 있다. 투여 경로에 따라 화합물을 불활성화할 수 있는 효소, 산 및 다른 천연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호할 수 있는 물질로 활성 화합물을 코팅할 수 있다. 바람직한 투여 경로는 정맥내 주사이다.

비경구 투여 이외의 방법으로 길항질 gp39를 투약하기 위하여, 길항질의 불활성화를 억제하기 위한 물질로 길항질을 코팅하거나, 또는 길항질을 상기 물질과 동시 투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 길항질은 적절한 담체, 예를 들어 리포좀 또는 희석제 중의 형태로 투여되거나 또는 효소 억제제와 동시 투여될 수 있다. 제약적으로 허용가능한 희석제는 염수 및 완충 수용액을 포함한다. 효소 억제제는 췌장 트립신 억제제, 디이소프로필플루오로포스페이트 (DEP) 및 트라실올 등을 포함한다. 리포좀은 유중수 또는 수중유 에멀젼 및 통상적인 리포좀을 포함한다 (Strejan (1984) J. Neuroimmunol 7, 27).

활성 화합물은 또한 비경구적으로 또는 복막내로 투여될 수 있다. 또한, 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물 및 오일 중에서 제조될 수 있다. 통상의 저장 및 사용 조건 하에 이 제제들은 미생물의 증식을 방지하는 보존제를 함유할 수 있다.

주사하기에 적합한 제약 조성물은 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉시 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 멸균되어야 하고, 쉽게 주사기에서 유출될 정도로 유동적이어야한다. 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야하고, 세균 및 진균과 같은 오염 미생물의 작용에 영향받지 않도록 보관되어야한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 다가알코올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적절한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산액의 경우 목적하는 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용으로 유지될 수 있다. 미생물 작용은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아소르브산, 티메로살 등에 의해 방지될 수 있다. 많은 경우에, 바람직하게는 등장제, 예를 들어 당, 다가알코올, 예를 들어 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨 등을 조성물에 포함할 것이다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수 지연제, 예를 들어 알루미늄모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 얻을 수 있다.

멸균 주사 용액은 활성 화합물 (예를 들어, gp39의 길항질)을 목적한 양으로 적절한 용매에, 상기한 성분의 하나 또는 성분들의 혼합물과 함께 혼입하고, 필요한 경우 여과 멸균함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산매 및 상기한 요구되는 다른 성분들은 함유하는 멸균 비히클에 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조하여 미리 멸균 여과시킨 용액으로부터 활성 성분 (예를 들어, 길항질) 및 다른 목적 성분의 분말을 얻는 것이다.

상기한 바와 같이 활성 화합물을 적절히 보호할 때, 단백질은 예를 들어 불활성 희석제 또는 동화될 수 있는 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 여기서 사용된 "제약적으로 허용가능한 담체"는 모든 용매, 분산매, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 물질의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 활성 화합물과 비상용성인 통상의 매질 또는 물질을 제외하고, 치료 조성물에 매질 또는 물질을 사용할 수 있다. 또한 보충적 활성 화합물이 조성물에 혼입될 수 있다.

용이한 투여 및 균일한 투여량을 위해 단위 투여 형태로 비경구 조성물을 제조하는 것이 특히 유리하다. 여기서 사용된 단위 투여 형태는 치료될 포유 동물에 단위 투여량으로서 적절한 물리적으로 분리된 단위를 의미한다 (각 단위는 목적하는 제약 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 물질을 함유함). 본 발명의 단위 투여 형태에 대한 설명은 (a) 활성 화합물의 고유한 특성 및 얻어지는 특정 치료 효과, 및 (b) 각 개인의 감수성을 처리하기 위한 활성 화합물의 배합 분야의 제한에 의해 규정되고 직접 의존한다.

상기한 바와 같이, 내성화 요법 후에 또는 이와 동시에, 공여체 조직 또는 기관을 통상적인 기술로 이식 수용자에게 이식한다.

Ⅳ. 본 발명의 방법의 사용

본 발명의 방법은 다양한 조직 및 기관 이식 상황에 적용된다. 이 방법은 조직 또는 기관, 예를 들어 췌장섬, 간, 신장, 심장, 폐, 피부, 근육, 신경 조직, 위 및 장을 이식한 수용자에게서 T 세포 내성을 유도하기 위하여 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 조직 또는 기관 이식(예를 들어, 고콜레스테롤혈증 치료를 위한 간 이식, 근 위축증 치료를 위한 근육 세포의 이식, 헌팅톤씨 질병 또는 파킨슨씨 질병을 치료하기 위한 신경 조직의 이식)에 수반되는 질병 또는 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 바람직한 실시 태양에서, 이식된 조직은 췌장섬을 포함한다. 따라서, 본 발명은 췌장섬 세포 이식에 의한 당뇨병 치료 방법을 포함한다. 그 방법은 치료를 요하는 대상에 1) 공여 항원을 발현하는 동종 또는 이종 세포, 2) 접촉 의존성 헬퍼 에펙터 기능을 매개하는 수용자 T 세포 상에서 발현된 분자의 길항질 예를 들어 gp39 길항질 (예를 들어, 항-gp39 항체) 및 3) 공여 췌장섬 세포를 투여하는 것으로 이루어진다. 바람직하게는 동종 또는 이종 세포 및 길항질은 췌장섬 투여 전에 수용자에게 투여된다.

본 발명은 하기 실시예에 의해 제한되는 것이 아니라 추가 설명된다. 본 출원에 인용된 모든 문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 참고 자료로 본 명세서에 기재된다.

실시예 1: 동종 세포 및 항-gp39를 사용한 수용자 처리에 의한 췌장섬 동종이식편에 대한 내성 유도

현재의 동종이식 연구는 비특이적으로 면역 에펙터 기능을 제거하는 일반적인 면역 억제에 의존한다. 그러나, 면역 억제제는 심각한 부작용을 일으킬 수 있다. 또한, 당뇨병 치료를 위한 랑게르한스섬의 동종이식이 상기 방법에 다루기 힘든 것으로 입증되었다 (Robertson, R.P (1992) N. Engl., J. Med. 327, 1861), T 세포에 대한 항체를 사용한 치료는 설치류에서 성공적인 췌장섬 동종이식을 가능하게 하였으나, 이 방법 역시 일반적인 면역 억제 결과를 일관되게 보였다 (Carpenter, C.B. (1990) N. Engl., J. Med. 322, 1224; Roark, J.H. (1992) Transplantation 54, 1098; Kahn, B.D. (1992) Curr. Opin. Immnunol. 4, 553). 본 실시예에서, T 세포에 대한 동종항원 제공을 조작하여 그의 활성화를 방지함으로써 췌장섬 동종이식편에 대한 내성을 이식 수용자에게서 유도하였다. 화학적 당뇨병 C57BL/6($H-2^b$) 생쥐에서 췌장섬 동종이식편의 생존율을 하기 방법을 사용하여 조사하였다.

당뇨병의 유도

수컷 C57BL/6J($H-2^b$) 생쥐에 스트렙토조토신 140 mg/kg을 정맥내 투여하여 당뇨병을 유도하였다. 영구 당뇨병은 1주 동안 3회에 걸쳐 혈장 글루코스 농도가 400 mg/dl 이상임을 통하여 확인되었다.

동종 비장 세포 분획화

이식 수용자의 예비 처리를 위한 공여체 동종 세포를 이식편 대 숙주 질병을 방지하기 위하여 (C57 x BALB/c)($H-2^{b/d}$)F_1 히브리드 동물로부터 얻었다. 작은 림프구를 단리하기 위하여, 8주된 (C57×BALB/c)F_1 암컷 생쥐의 비장 세포 현탁액으로부터 적혈구를 제거하고, 이어서 상기 토니 등의 문헌[Tony, H.P. (1985) J.Exp.Med. 161, 223; Gosselin E.J. (1988) J. Immunol. 140, 1408]에 기재된 바대로 용출에 의해 크기 분획화하였다. 즉, 예를 들어 모델 J-6B 원심분리기 (베크만사, Palo Alto, CA)를 사용하여 작은 림프구를 역유동 원심분리 용출에 의해 단리하였다. 8 ml 배양액 또는 1.5%의 태아 소 혈청을 지닌 균형있는 염용액 중의 약 $1-5\times10^8$ 세포를 데옥시리보누클레아제로 처리하고, 4℃에서 3,200 rpm의 일정 속도로 회전하고 13.5 분/ ml의 역류 유속으로 시작하여 용출 챔버로 적재시켰다. 큰 세포로 거의 오염되지 않은 작은 세포 분획을 통상적으로 14-19 ml/분으로 용출하였으나, 정확한 유속은 세포가 현탁되는 매질에 따라 상이할 수 있다. 여기서 기재된 실험에서, 작은 세포 분획을 19 ml/분(3200 rpm)에서 수집하였다. 토끼 IgG 및 $H2^d$ (CDC35) 특이적이거나

$H2^b$(D10.G4)에 대해 동종 반응성인 T 세포주로 분석할 때, 상기 분획을 내방사성 (3000 rads) 부가적 세포 기능이 완전히 고갈되었다. 동종이식편 수용자에게 후부 정맥 주사하기 전에 혈청을 제거한 매질로 작은 세포 및 비분획화된 세포를 두번 세척하였다. 약 $40-100\times10^6$ (C57xBALB/c)F_1($H-2^{b/d}$) 비분획화된 비장 세포 또는 $40-100\times10^6$ (C57xBALB/c)F_1($H-2^{b/d}$) 용출된 작은 비장 세포를 사용하였다.

이식 수용자의 예비 처리

이식 수용자를 비분획화 (C57×BALB/c)F_1($H-2^{b/d}$) 동종 비장 세포, APC 활성이 고갈된(상기한 바와 같이 단리됨) 용출된 "분획 19" 작은 직경 비장 세포, 항-gp39 단일 클론 항체 (MR1, 실시예 2의 실험 3 참조) 또는 동종 세포와 항-gp39 항체의 혼합물로 예비 처리하였다. 분획 19 세포를 두개의 상이한 투여량 범위, $40-44\times10^6$ 세포의 낮은 투여량 또는 $77-88\times10^6$ 세포의 높은 투여량에서 시험하였다. 대조군 동물에는 동종 세포나 항체 처리를 하지 않았다. 췌장섬 동종이식편의 이식 5 내지 8일 전에 동종 세포를 후미 정맥 주사에 의해 이식 수용자에게 투여하였다. 췌장섬 이식 7일 전에 시작하여 2-7주 동안 또는 이식이 실패할 때까지 MR1 항체를 250 ㎍/생쥐의 투여량으로 1주일에 두번 처리하였다. 제1 항체 주사는 동종 비장 세포의 제1 주사와 동일한 날 수행하였다.

췌장섬 동종이식편의 이식

동종 BALB/c($H-2^d$) 섬을 변형된 콜라겐아제 소화 방법에 의해 단리하였다(Gottlieb, P.A.(1990) Diabetes 39, 643). 섬을 단리한 직후 30 섬/체중 g의 투여량으로 수용자 C57B1/6J($H-2^b$) 생쥐의 신장하부 피낭에 이식하였다. 이식편 생존율을 혈장 글루코스 농도가 200 mg/dl 이하로 유지하는 것으로 정의하였다.

결과

첫번째 연속 실험에서, 췌장섬 동종이식편 수용자를 동종 비장 세포만 또는 항-gp39 항체만으로 예비 처리하였다. 도 1에 도시된 바대로, 비장 세포를 예비 처리하지 않은 경우, 모든 췌장섬 동종이식편이 이식한지 13일 내에 거부되었다(9±2d; 범위 5-13 d; N=23). 불량한 췌장섬의 생존율은 또한 정상 APC 활성을 함유하는 비분획 비장 세포만으로(6±3d; 범위 4-12 d; N=7) 또는 APC 활성이 고갈된 비장 세포 분획 19의 낮은 투여량 ($40-44\times10^6$ 세포)으로(7±3d; 범위 3-14 d; N=16) 처리된 동물에서도 관찰되었다. 이와 대조적으로, APC가 고갈된 작은 비장 세포 분획 19의 높은 투여량 ($75-88\times10^6$ 세포)의 주사는 동종이식편 생존율을 연장시켰다(19±10d; 범위 7-40 d; N=16). 이식편 생존율의 기간에 대한 이러한 영향은 통계적으로 중요하나(아무처리도 되지 않거나, 전체 비장 공급, 또는 분획 19의 비장 세포의 낮은 투여량으로 처리한 군과 비교할 때, $F_{3.58}$=17.3, $p<0.001$), 영구적이지는 않았다. APC가 고갈된 분획 19의 작은 세포의 당뇨병 수용자에게서 동종 섬의 연장되지만 한정된 생존율은 이 세포들이 단독으로는 동종이식편 생존율을 유지할 수 없다는 것을 제시하였다. 추가의 이식 수용자를 $77-88\times10^6$개의 분획 20 세포로 처리하였다. 또한 이 분획은 대부분 작은 림프구로 이루어지나, 측정가능한 APC 기능을 갖는다는 점에서 분획 19 세포들과 상이하다. 이 세포들의 수용자 (N=6)는 이식편을 빠르게 (평균=8.5d, 범위 6-12) 모두 거부하였다. 다른 군의 이식편 수용자는 항-gp39 단일 클론 항체, MR1 만으로 처리하였다. 도 1은 췌장섬 동종이식편이 항-gp39 mAb로만 처리된 7/11 생쥐에서 15일 내에 실패한 것을 나타내있다. 나머지 4마리의 생쥐에서는 실험한지 48일째에 이식편이 기능을 보였다. 이 결과는 수용자에게 MR1 항-gp39 항체만을 수용자에게 투여하면 췌장섬 동종이식편 생존율이 연장될 수 있음을 입증한다(평균 20=19d, 범위 9 부정확: N=5). 연장 정도는 분획 19의 비장 세포를 단독으로 높은 투여량을 사용하여 달성한 결과와 통계적으로 유사하였고, 다른 3개의 군보다 상당히 크게 연장되었다($p<0.05$).

상기한 일련의 실험은 높은 투여량의 APC가 고갈된 비장 세포의 분획 19 또는 항-gp39 mAb 단독 처리는 비처리시와 비교할 때 췌장섬 동종이식편 생존율을 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다. 그러나, 상기 단독 처리는 수용자에게서 췌장섬 동종이식편에 대한 장기간의 내성을 유도하는데 효과적이지 않았다. 다음의 일련의 실험에서, 동종 비장 세포 처리를 수용자의 항-gp39 처리와 함께 사용하였다. 동종 비장 세포 및 항-gp39의 혼합 투여는 어느 하나의 단독 투여보다 더 효과적인 것으로 밝혀졌다. 그 결과는 도 2에 도시하였고, 각 곡선은 개개의 생쥐로부터 얻은 자료를 나타낸다. 흰색 표시는 수용자에게서 동종이식편이 자발적으로 실패한 것을 나타낸다. 검정 표시는 췌장섬 이식이 실험의 종료시에 기능하는 생쥐를 나타낸다. 도 2 (패널 B)는 무한 이식편 생존율은 7주 동안 항-gp39 mAb 및 APC 고갈된 분획 19의 비장 세포로 처리된 모든 동물(N=6)에서 얻었다. 항-gp39 처리 기간을 감소시켜 상기 방법을 변화시킨 결과, 이식편 생존율에 대한 바람직한

영향을 약화시켰으나, 없애지는 않았다. 항-gp39 mAb를 분획 19 비장 세포와 함께 2주 동안만 투여할 때, 무한 이식편 생존율은 6/8 수용자에게서 관찰되었다(도 2, 패널 A). 또한, 무한 이식편 생존율은 비분획화 동종 비장 세포의 1회 주사와 함께 2주 또는 7주 동안 항-gp39로 처리한 수용자에게서 관찰되었다.

췌장섬 이식편 기능 및 스트렙토조토신 처리에 의해 파괴되지 않은 나머지 천연 섬에 의한 인슐린 분비의 부재를 확인하기 위하여, 신장 하부 이식편을 함유하는 신장을 제거하였다. 모든 경우에, 일측성 신장 절제시에 3일 내에 고혈당증 (300 mg/dl 초과)이 재발하였다.

이식이 실패하거나 또는 실험의 종료시에, 췌장섬 동종이식편 및 천연 췌장을 모든 동물에서 조직학적으로 연구하였다. 분획화된 동종 소형 림프구 및 연속적인(7주) MR1 mAb로 처리한 수용자의 신장에서 췌장섬 동종 이식편의 조직학적 절편은 단핵 침윤이 없고 잘 과립화된 인슐린 및 글루카곤 양성 세포를 함유하는 신장 피낭 아래에 가시적으로 풍부한 완전한 섬을 보였다. 이와 대조적으로, 항-gp39 mAb로 단독 처리된 수용자의 신장에서 췌장섬 동종 이식편의 조직학적 절편은 강한 단핵 세포 염증 및 췌장섬 세포 파괴를 보였다. 모든 숙주 췌장에서 섬의 형태는 스트렙토조토신 당뇨병과 일관되게 일치하였다.

실시예 2: 항-gp39 항체의 생산 및 특성 규명

실험 1-인간 gp39에 대한 항체

인간 대상에서 항원 특이적 T 세포 내성을 유도하기 위하여, 인간 gp39에 대한 항체를 투여하는 것이 바람직하다. 하기 방법을 사용하여 생쥐의 항-인간 gp39 단일 클론 항체를 생성하였다. Balb/c 생쥐를 CFA(Complete Freund's Adjuvant) 중의 가용성 gp39 융합 단백질인 gp39-CD8로 면역화하였다. 이어서 6주 후 생쥐를 IFA(Incomplete Freund's Adjuvant) 중의 가용성 gp39-CD8로 챌린징(challenging)시켰다. 가용성 gp39-CD8은 제2 면역처리 4주 후에 가용성 형태로 투여하였다. 이어서 2주 후 생쥐를 활성화된 인간 말초 혈액 림프구로 부스팅(boosting)하고, 추가로 2주 후에 가용성 gp39-CD8로 최후 부스팅하였다. 비장 세포를 표준 방법으로 최종 면역 처리 4일 후에 NS-1 융합 파트너와 융합시켰다.

항-인간 gp39 항체를 생성하는 클론을 다중 선별 방법을 기초로 하여 선택하였다. gp39-CD8을 사용하여 플레이트 결합 분석법에 의해 클론을 초기에 선별하였다. 이어서 대조 CD8 융합 단백질인 CD72-CD8에 대한 양성 클론을 선별하였다. CD8-CD72 플레이트 결합 분석법 상에서 양성인 클론을 제거하였다. 이어서 잔류 클론을 휴지 상태 및 6시간 활성화된 인간 말초 혈액 림프구(PBL)에 대해 유동 혈구 분석법에 의해 선별하였다. 휴지가 아닌 활성화된 PBL을 염색시킨 히브리도마는 양성인 것으로 간주되었다. 마지막으로, 잔류 클론을 플레이트에 결합된 gp39에 대한 CD40Ig의 결합을 차단하는 능력에 대해 시험하였다.

gp39-CD8 및 CD72-CD8에 대한 약 300개의 클론을 플레이트 결합 분석에서 초기에 선별하였다. 이들 클론 중 30개는 CD8이 아니라 플레이트 결합 gp39를 검출하는 것으로 밝혀졌다. 이어서 이 클론들을 활성화된 인간 PBL 상의 gp39 검출에 대하여 선별하였다. 약 15개의 클론은 휴지 세포가 아닌 활성화된 PBL 상의 분자를 검출하였다. 플레이트에 결합된 gp39를 CD40Ig이 검출하는 것을 차단하는 클론의 능력을 측정함으로써 특이성을 추가로 확인하였다. 시험된 10개의 클론 중 3개는 상기 분석에서 CD40Ig 결합을 차단하였다. 이 클론들은 3E4, 2H5 및 2H8이었다. 이러한 클론을 본 발명의 방법에 사용하는 것이 바람직하다. 휴지 세포가 아닌 활성화된 PBL에 대해 양성으로 시험된 클론을 또한 활성화된 쥐의 T 세포 클론인 POMC8과의 반응성에 대해 선별하였다. 클론 2H8은 쥐의 T 세포주와 교차 반응성을 보였다.

실험 2-인간 gp39에 대한 항체

실시예 1에 기재된 바와 유사한 면역 방법을 인간 gp39에 대한 추가의 항체를 생성하는데 사용하였다. Balb/c 생쥐를 CFA 중의 가용성 gp39-CD8로 면역화하고, 이어서 4주 후 생쥐를 6시간 활성화된 인간 말초 혈액 림프구로 챌린징시켰다. 이어서, 생쥐를 가용성 gp39-CD8로 부스팅하고, 4일 후에 비장 세포를 표준 방법으로 NS-1 융합 파트너와 융합시켰다. 6시간 활성화된 인간 PBL의 유동 혈구 염색에 의해 히브리도마 클론을 선별하였다. 휴지가 아닌 활성화된 인간 PBL을 염색시킨 클론을 선별하였다. 6개의 클론 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 및 89-79를 추가의 분석용으로 선별하였다.

선택된 항체의 특이성은 몇가지 분석법에 의해 확인하였다. 먼저, 유동 혈구 분석법은 모든 6개의 mAb가 휴지 세포가 아닌 활성화된 염색 말초 혈액 T 세포(도 3B 및 3C는 대표예로서 각각 4D9-8 및 4D9-9를 사용한 활성화된 T 세포의 염색을 나타냄)를 염색시켰음을 나타내었다. 6개 각각의 항체에 의해 인지되는 분자의 발현은 활성화된지 4시간 내에 검출되

고, 활성화 6-8 시간 후 최고에 달하였고, 활성화 24시간 후에는 검출되지 않았다. 모든 6개의 mAb는 주로 $CD4^+$의 표현형이지만 $CD8^+$T 세포의 일부에서도 발현되는 활성화된 $CD3^+$ PBL 상에서 발현되는 분자를 인지하였다. 6개의 mAb에 의해 인지되는 분자의 발현은 gp39의 발현에서와 같이 시클로스포린 A의 존재하에 배양액에서 억제되었다(도 4A 및 4B는 대표예로서 각각 4D9-8, 4D9-9를 사용한, 시클로스포린 처리된 T 세포의 염색을 나타냄). 이 mAb에 의해 인지되는 분자 발현의 운동학 및 분포는 인간 CD40Ig의 융합 단백질에 의해 검출된 gp39의 것과 동일하였다. 또한, 모든 6개의 mAb은 CD40Ig에 의한 gp39의 염색을 차단하였다 (도 5A 및 5B는 대표예로서 각각 4D9-8 및 4D9-9의 존재하에 CD40Ig에 의한 gp39 염색의 억제를 나타냄). ELISA 분석법에서, 모든 6개의 mAb는 gp39 분자의 가용성 융합 형태인 gp39-CD8을 인지하였다. 더욱이, 모든 6개의 mAb은 ^{35}S-메티오닌 표지된 활성화된 인간 PBLs로부터 약 36 kd의 분자를 면역 침전화시켰다. 면역 침전된 분자는 인간 CD40Ig 융합 단백질에 의해 침전된 것과 동일하였다.

선택된 6개의 mAb(4D9-8, 4D9-9, 24-32, 24-43, 89-76 및 89-79)의 기능 활성을 하기와 같이 분석하였다. 먼저, IL-4 및 가용성 gp39와 함께 배양된 정제된 인간 B 세포의 증식을 억제하는 mAb의 능력을 측정하였다. 정제된 인간 B 세포를 0 내지 12.5 ㎍/ml의 투여량에서 정제된 단일 클론 항체 또는 CD40Ig의 존재 또는 부재하에 gp39 및 IL-4와 함께 배양하였다. 티미딘을 가함으로써 배양 3일 후 B 세포 증식을 측정하였다. 그 결과(도 6에 도시됨)는 모든 6개의 mAb가 gp39 및 IL-4에 의해 유도되는 B 세포 증식을 억제할 수 잇는 것으로 나타났다. mAb 89-76 및 24-31이 유도된 B 세포 증식을 억제하는데 가장 효과적이었다.

다음으로, 항-CD3 활성화된 T 세포 및 IL-2에 의해 유도된 Ig 생산에 의해 측정되는, B 세포 분화를 억제하는 mAb의 능력을 조사하였다. 정제된 IgD^+ 인간 B 세포를 FACS를 사용한 양성 선택에 의해 제조한 후, 항-CD3 활성화된 인간 T 세포(미토마이신 C 처리됨) 및 IL-2와 함께 6일 동안 투여량 0 내지 10 ㎍/ml의 정제된 항-gp39 단일클론 항체의 존재 또는 부재 하에 배양하였다. IgM, IgG 및 IgA 생산을 6일째에 ELISA에 의해 측정하였다. 결과는 IgM, IgG 및 IgA 생산에 의해 측정된 바대로 모든 6개의 항체가 T 세포 의존적 B 세포 분화를 억제할 수 있는 것으로 나타났다(표 1).

표 1

		이뮤노글로불린의 생산		
mAb	㎍/ml	IgM	IgG	IgA
없음		17500	6710	4471
4D9-8	0.1	4813	2130	2819
	1.0	4394	2558	1519
	10.0	1081	389	396
4D9-9	0.1	3594	919	1731
	1.0	2659	1233	1606
	10.0	374	448	266
24-31	0.1	3863	981	344
	1.0	1287	314	165
	10.0	1120	596	23
24-43	0.1	6227	4132	432
	1.0	3193	2130	192
	10.0	7021	1232	1081
89-76	0.1	3783	1069	344
	1.0	2180	352	171
	10.0	818	551	19
89-79	0.1	9763	1924	3021
	1.0	2314	460	156
	10.0	183	135	434

T 세포 반응에 대한 항-gp39 mAb의 작용을 조사하기 위하여, mAb를 표준혼합 림프구 반응 (MLR)에 포함시켰다. 300,000개의 인간 말초 혈액 림프구 (반응자= R)를 항-gp39 mAbs (10 ㎍/ml)의 존재 또는 부재 하에 100,000개의 방사선 조사된 동종 말초 혈액 림프구 (자극자=S)와 함께 배양하였다. 4, 5 또는 6일째에 배양액에 3H-티미딘을 가하고, 18시간 후에 회수하였다. 모든 6개의 항-인간 gp39 mAbs는 MLR에 의해 측정된 바와 같이 동종-특이적 반응을 억제하였다 (도7 참조. R 및 S를 24-31 또는 89-76의 존재 하에 배양할 때, 동종 특이적 반응을 억제하고; CTLA4-이뮤노글로불린 융합 단백질 및 항-CD28 mAb를 양성 대고준으로 사용하였다).

6개의 mAb가 인간 gp39 분자 상의 특징적인 에피토프를 인지하는지를 조사하기 위해, 교차차단 실험을 수행하였다. 활성화된 인간 PBLs를 먼저 6개의 mAb(비접합된 항체 25 ㎍/ml) 각각으로 차단하였다. 세포를 세척한 후, 비오틴 접합 항체 10 ㎍/ml로 염색하고, 식물에리트린 접합 아비딘(PE-Av)와 반응시켰다. PE-Av를 사용한 세포 염색을 FACS로 분석하였다. 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

차단	염색 항체					
Ab	4D9-8	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
없음	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	ND	-	++++	++++	+++	+++
4D9-9	+++	ND	+++	++++	+++	+++
24-31	+	+	ND	+++	++	++
24-43	+	+	+++	ND	++	+
89-76	+	+	+++	+++	ND	+++
89-79	+	++	+++	+++	+++	ND

염색 강도 및 양성 세포의 백분율은 + 기호 (++++=MI 〉 200; +++=MI 〉 125; ++=MI 〉 50; +=MI 〉 25; -=배경이 염색되지 않음)로 나타낸다, ND는 측정되지 않음을 나타낸다.

모든 항체는 활성화된 인간 PBLs에 CD40Ig의 결합을 차단하였다. 그러나, 표 2에 기재된 자료는 특정 항체가 활성화된 인간 PBL에 대한 다른 항체의 결합을 차단하지 못함을 명확히 보이고 있고, 이것은 이들 항체가 인간 gp39 분자 상의 특징적인 에피토프를 인지한다는 것을 제시한다.

89-76 및 24-31 항체를 생성하는 89-76 및 24-31 히브리도마는 각각 부다페스트 조약의 규정 하에 1994년 9월 2일에 American Type Culture Collection에 기탁하였다. 89-76 히브리도마는 ATCC 기탁 번호 HB11713로, 24-31 히브리도마는 ATCC 기탁 번호 HB11712로 기탁되었다.

실험 3-인간 gp39에 대한 항체

본 발명의 하나의 실시 태양에서 gp39 길항질은 항-생쥐 gp39 단일 클론 항체인 MR1이다. 하기 방법을 사용하여 MR1 단일 클론 항체를 생성하고, gp39에 직접 대한 다른 항체를 생성하는데 사용할 수 있다.

햄스터를 5-10^6 활성화된 T_h1 세포 (dl.6)를 사용하여 6주 동안 1주 간격으로 복강 내로 면역화하였다. 유린 T_h1에 대한 혈청 역가가 약 1:10,000보다 클 때, 면역 햄스터 비장 세포 및 NS-1을 사용한 세포 융합을 폴리에틸렌 글리콜로 수행하였다. 증식하는 히브리도마를 함유하는 웰로부터 상등액을 휴지 및 활성화된 7_h1에 대한 유동 혈구 계산법에 의해 선별하였다. 활성화된 Th를 선택적으로 인지하는 Mab을 생성하는 하나의 특정 히브리도마를 추가 시험하고, MR1을 유도하기 위해 서브클로닝하였다. MR1은 복수에서 생성되고, 이를 이온 교환 HPLC로 정제하였다. 히브리도마 MR1는 American Type Culture Collection에 ATCC 기탁 번호 HB11048로 기탁되었다.

균등물

당업계의 숙련가들은 통상적인 실험을 통하여 본 발명의 특정 실시 태양에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물을 하기 청구항에 포함된다. 본 명세서를 통해 인용된 모든 참고 문헌의 내용 및 공개된 특허 출원은 본 명세서에 참고로 포함되었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

a) 하나 이상의 공여 항원을 발현하고, gp39 리간드를 세포 표면 상에 갖는 동종(allogeneic) 또는 이종(xenogeneic) 세포, 및 b) gp39 길항질을 포함하는, 췌장섬, 간, 신장, 심장, 폐, 피부, 근육, 신경조직, 위 및 장을 포함하는 군으로부터 선택되는 조직 또는 기관 수용자에서 공여 조직 또는 기관에 대한 T 세포 내성을 유도하여 상기 조직 또는 기관 이식에 수반되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, gp39 길항질이 항-gp39 항체, 상기 항체의 gp39-결합 단편, 또는 가용성 형태의 gp39 리간드인 제약 조성물.

청구항 3.

제2항에 있어서, 항-gp39 항체가 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 4.

제2항에 있어서, 항-gp39 항체가 항-인간 sp39 항체인 제약 조성물.

청구항 5.

제3항에 있어서, 단일클론 항체가 MR1 (ATCC 기탁번호 HB11048), 24-31 (ATCC 기탁번호 HB11712) 및 89-76 (ATCC 기탁번호 HB11713)으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 6.

제3항에 있어서, 단일클론 항체가 키메릭 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 7.

제3항에 있어서, 단일클론 항체가 인간화된 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 8.

제1항에 있어서, 동종 또는 이종 세포가 림프계 세포인 제약 조성물.

청구항 9.

제8항에 있어서, 림프계 세포가 B 세포인 제약 조성물.

청구항 10.

제9항에 있어서, B 세포가 휴지 B 세포인 제약 조성물.

청구항 11.

제1항에 있어서, 동종 또는 이종 세포 및 길항질이 상기 조직 또는 기관 이식 전에 수용자에게 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 12.

제1항에 있어서, 상기 조직 또는 기관이 췌장 섬인 제약 조성물.

청구항 13.

제1항에 있어서, 상기 조직 또는 기관이 간, 신장, 심장, 폐, 피부, 근육, 신경 조직, 위 및 장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 14.

제2항에 있어서, gp39 길항질이 가용성 형태의 gp39 리간드인 제약 조성물.

청구항 15.

제14항에 있어서, 가용성 형태의 gp39 리간드가 가용성 CD40 및 CD40 융합 단백질로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 16.

a) 하나 이상의 공여 항원을 발현하고 그 표면에 gp39 리간드를 갖는 동종 또는 이종 세포, b) gp39 길항질 및 c) 공여 췌장섬 세포를 포함하는 당뇨병 치료용 제약 조성물.

청구항 17.

제16항에 있어서, gp39 길항질이 항-gp39 항체, 상기 항체의 gp39-결합 단편, 또는 가용성 형태의 gp39 리간드인 제약 조성물.

청구항 18.

제17항에 있어서, 항-gp39 항체가 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 19.

제17항에 있어서, 항-gp39항체가 항-인간 gp39항체인 제약 조성물.

청구항 20.

제18항에 있어서, 단일클론 항체가 MR1 (ATCC 기탁번호 HB11048), 24-31 (ATCC 기탁번호 HB11712) 및 89-76 (ATCC 기탁번호 HB11713)으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 21.

제18항에 있어서, 단일클론 항체가 키메릭 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 22.

제18항에 있어서, 단일클론 항체가 인간화된 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 23.

제17항에 있어서, gp39 길항질이 가용성 형태의 gp39 리간드인 제약 조성물.

청구항 24.

제23항에 있어서, 가용성 형태의 gp39 리간드가 가용성 CD40 및 CD40 융합 단백질로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 25.

제16항에 있어서, 동종 또는 이종 세포가 림프계 세포인 제약 조성물.

청구항 26.

제25항에 있어서, 림프계 세포가 B 세포인 제약 조성물.

청구항 27.

제26항에 있어서, B 세포가 휴지 B 세포인 제약 조성물.

청구항 28.

제16항에 있어서, 동종 또는 이종 세포 및 gp39 길항질이 췌장섬 세포 이식 전에 수용자에게 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 29.

a) 하나 이상의 공여 항원을 발현하고, gp39 리간드를 세포 표면상에 갖는 공여 동종 세포 및 b) 항-gp39 항체, 상기 항체의 gp39-결합 단편, 또는 가용성 형태의 gp39 리간드를 포함하는, 조직 또는 기관 수용자에서 공여 조직 또는 기관에 대한 T 세포 내성을 유도하기 위한 제약 조성물.

청구항 30.

제29항에 있어서, 항-gp39항체가 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 31.

제29항에 있어서, 항-gp39 항체가 항-인간 gp39항체인 제약 조성물.

청구항 32.

제30항에 있어서, 단일클론 항체가 MR1 (ATCC 기탁번호 HB11048), 24-31 (ATCC 기탁번호 HB11712) 및 89-76 (ATCC 기탁번호 HB11713)으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 33.

제31항에 있어서, 단일클론 항체가 키메릭 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 34.

제31항에 있어서, 단일클론 항체가 인간화된 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 35.

제29항에 있어서, 공여 동종 세포가 림프계 세포인 제약 조성물.

청구항 36.

제35항에 있어서, 림프계 세포가 B 세포인 제약 조성물.

청구항 37.

제36항에 있어서, B 세포가 휴지 B 세포인 제약 조성물.

청구항 38.

gp39 길항질 (단, 단일클론항체 24-31 (ATCC 기탁번호 HB11712) 또는 상기 항체의 gp39-결합 단편을 제외함)을 포함하는, 췌장섬, 간, 신장, 심장, 폐, 피부, 근육, 신경조직, 위 및 장을 포함하는 군으로부터 선택되는 조직 또는 기관을 이식받아 항원에 노출된 투여 대상에서 항원 특이적 T 세포 내성을 유도하여 상기 조직 또는 기관 이식에 수반되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 39.

제38항에 있어서, 상기 항원이 이식된 조직 또는 기관에 의해 발현되는 것인 제약 조성물.

청구항 40.

제39항에 있어서, 상기 항원이 이종 또는 동종 항원인 제약 조성물.

청구항 41.

제38항에 있어서, gp39 길항질이 항-gp39 항체, 상기 항체의 gp39-결합 단편, 가용성 CD40 또는 가용성 CD40융합 단백질인 제약 조성물.

청구항 42.

제41항에 있어서, 항-gp39 항체가 항-인간 gp39 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 43.

제42항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 인간화된 또는 키메릭 단일클론 항체인 제약 조성물.

청구항 44.

제38항에 있어서, 항원이 CD40 발현 세포에 의해 발현되는 것인 제약 조성물.

청구항 45.

제44항에 있어서, 상기 세포가 림프계 세포, 단핵구, 수지상 세포 및 랑게르한 세포와 같은 전문적인 항원 제공 세포, 및 각질세포, 내피 세포, 성상 세포, 섬유아세포 및 핍돌기교 세포를 포함하는 면역 세포에 항원을 제공하는 다른 세포를 포함하는 제약 조성물.

청구항 46.

제38항에 있어서, 항원이 자기항원 또는 알레르겐인 제약 조성물.

청구항 47.

제2항에 있어서, gp39 길항질이 항-gp39 항체의 gp39-결합 단편인 제약 조성물.

청구항 48.

제47항에 있어서, gp39-결합 단편이 Fab, F(ab')2, 및 Fv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 49.

제17항에 있어서, gp39 길항질이 항-gp39 항체의 gp39-결합 단편인 제약 조성물.

청구항 50.

제49항에 있어서, gp39-결합 단편이 Fab, F(ab')2, 및 Fv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 51.

제29항에 있어서, gp39 길항질이 가용성 형태의 gp39 리간드인 제약 조성물.

청구항 52.

제51항에 있어서, 가용성 형태의 gp39 리간드가 가용성 CD40 및 CD40 융합 단백질로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 53.

제29항에 있어서, gp39의 길항질이 항-gp39 항체의 gp39-결합 단편인 제약 조성물.

청구항 54.

제53항에 있어서, gp39 결합 단편이 Fab, F(ab')2, 및 Fv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 55.

제41항에 있어서, sp39 길항질이 MR1 (ATCC 기탁번호 HB11048) 및 89-76 (ATCC 기탁번호 HB11713)으로부터 선택되는 제약 조성물.

청구항 56.

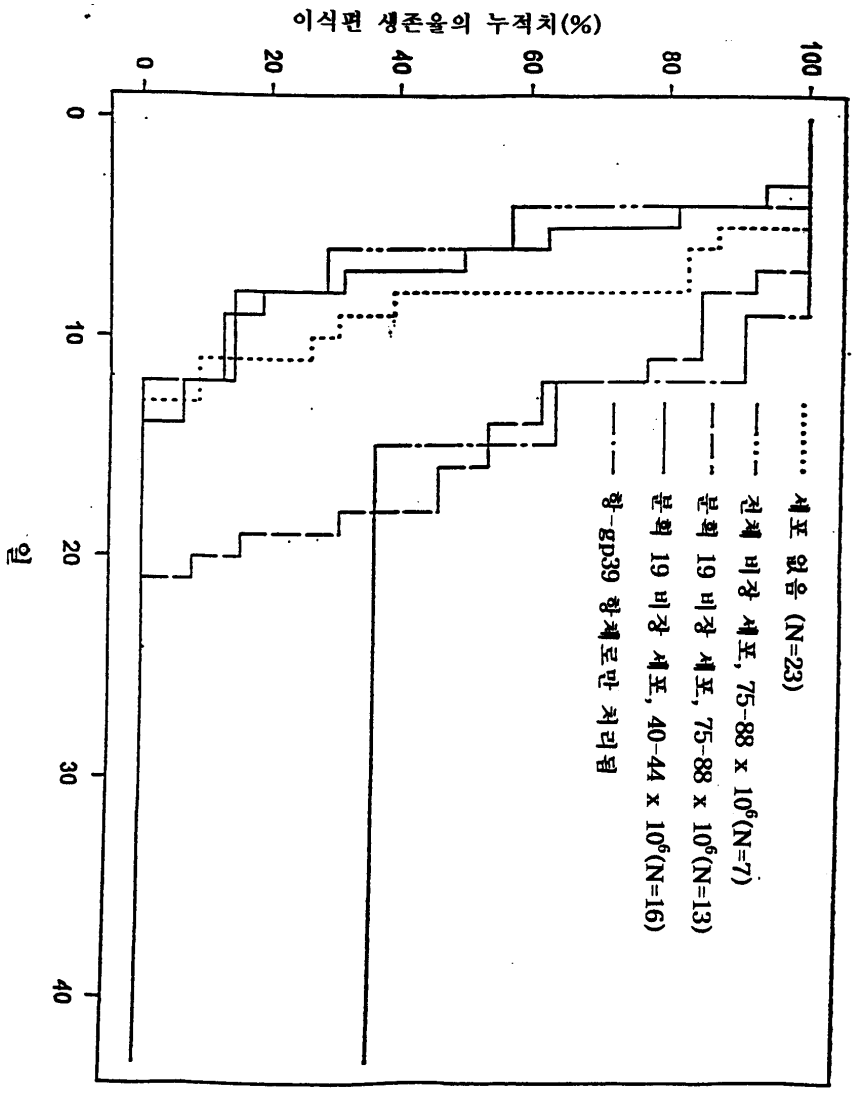
제41항에 있어서, gp39 길항질이 항-gp39 항체의 gp39 결합 단편인 제약 조성물.

청구항 57.

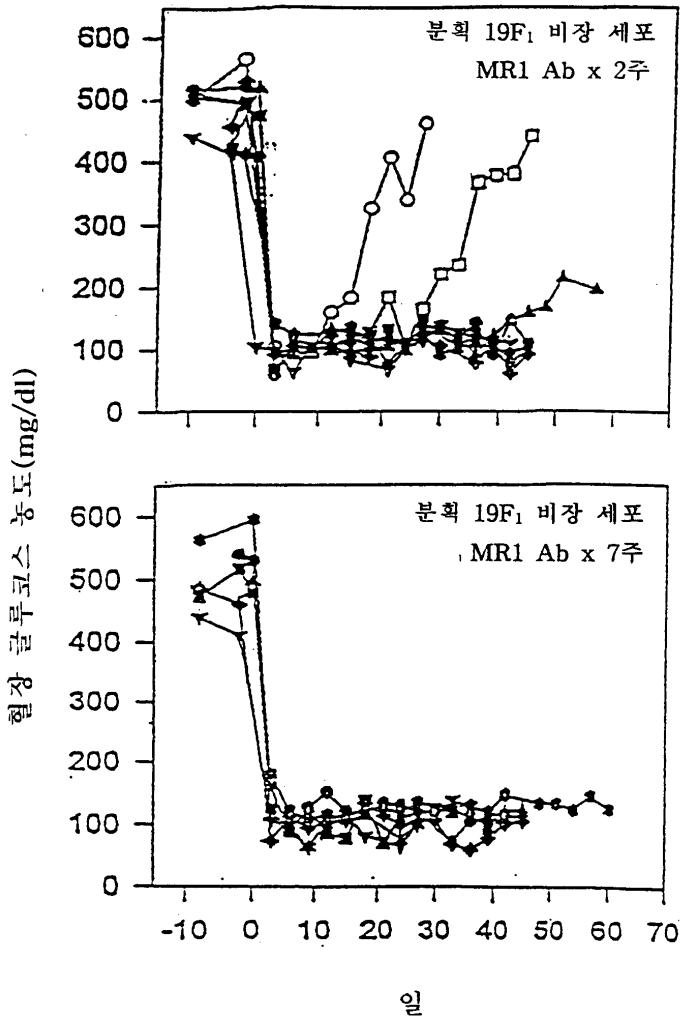
제56항에 있어서, gp39 결합 단편이 Fab, F(ab')2, 및 Fv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 제약 조성물.

도면

도면1



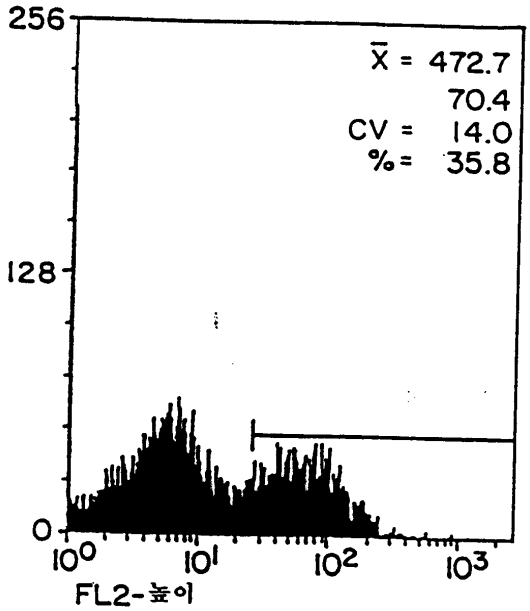
도면2



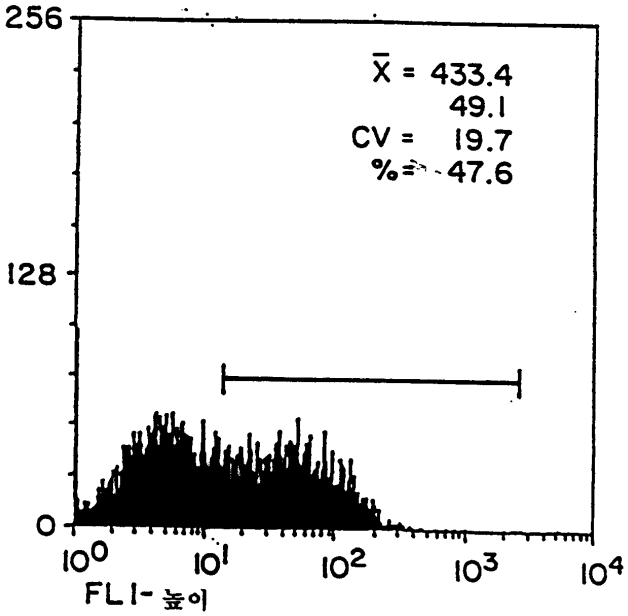
도 2A

도 2B

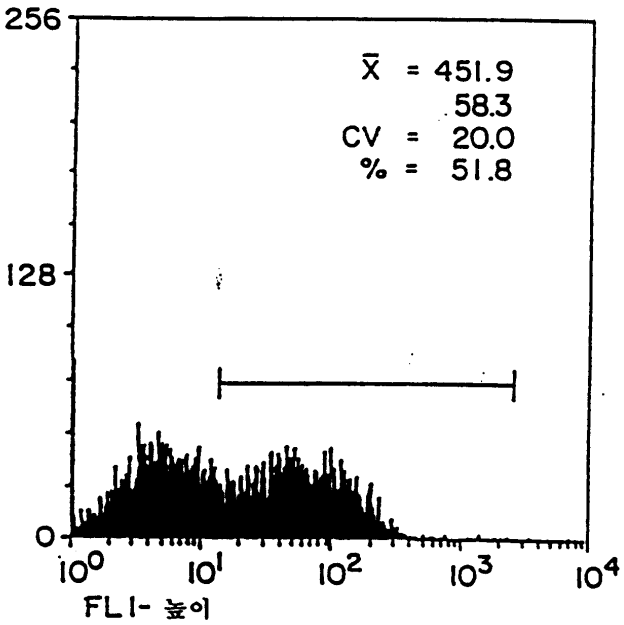
도면3a



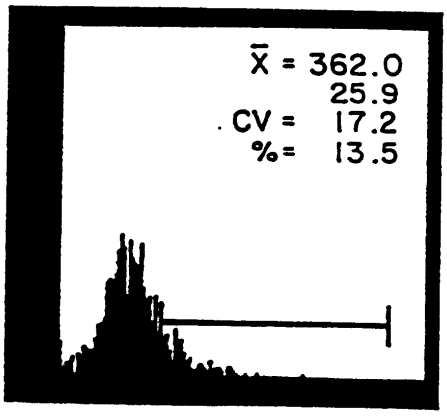
도면3b


256
128
0
X̄ = 433.4
49.1
CV = 19.7
% = 47.6
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1- 높이

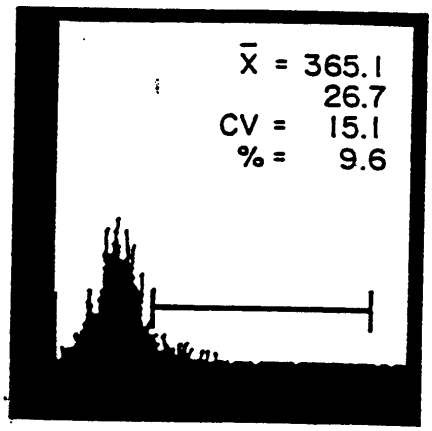
도면3c


256
128
0
X̄ = 451.9
58.3
CV = 20.0
% = 51.8
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1- 높이

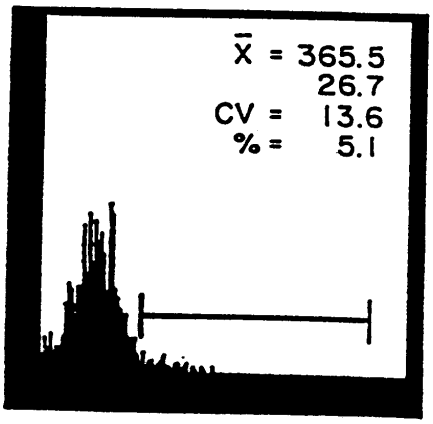
도면4a



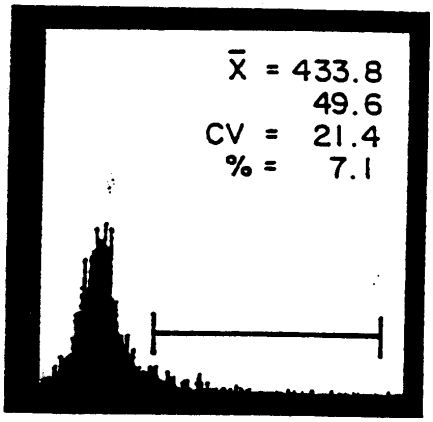
도면4b



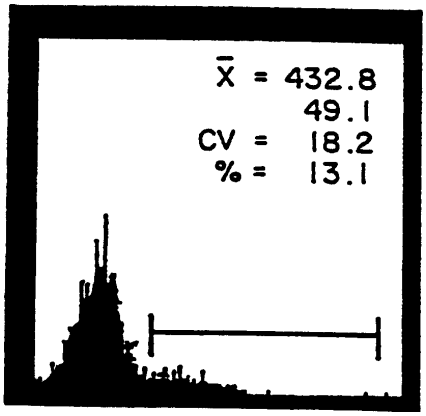
도면4c



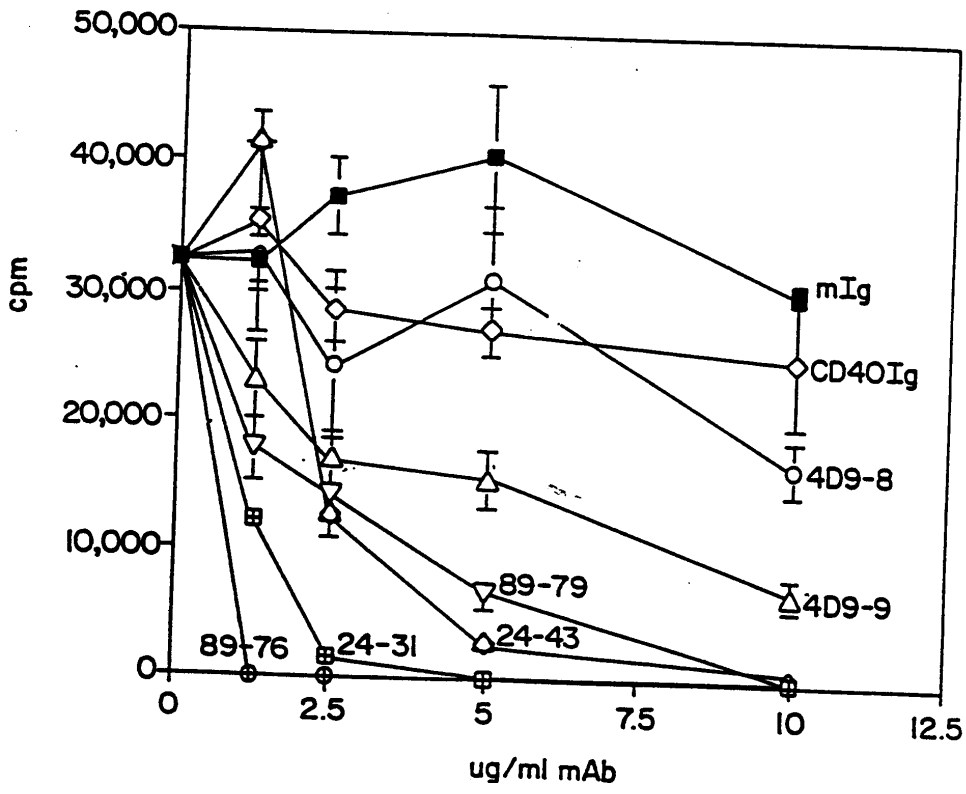
도면5a



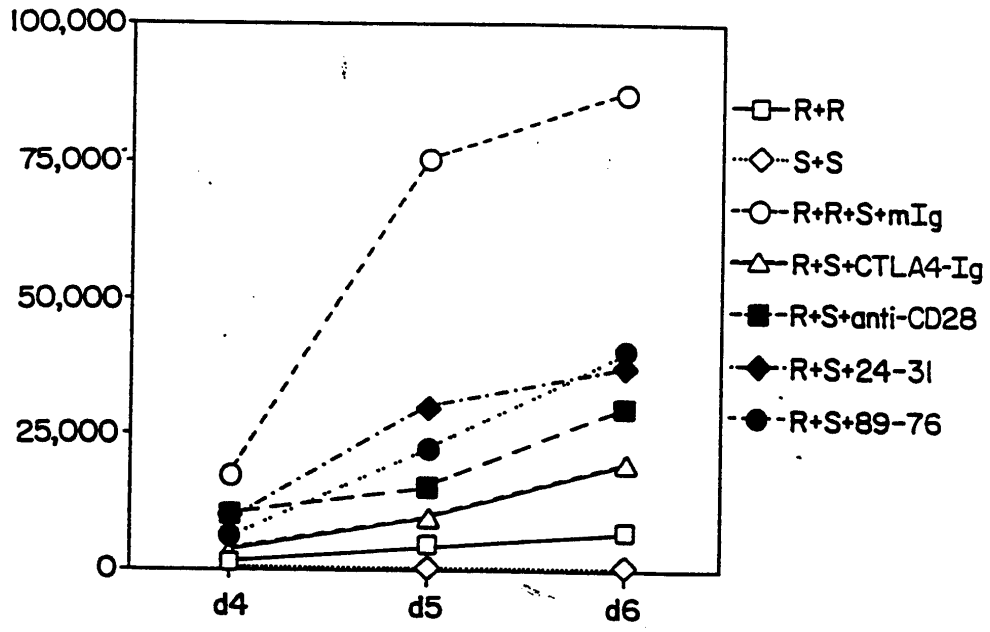
도면5b



도면6



도면7


100,000
75,000
50,000
25,000
0
d4
d5
d6
R+R
S+S
R+R+S+mIg
R+S+CTLA4-Ig
R+S+anti-CD28
R+S+24-31
R+S+89-76