



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0051272
(43) 공개일자 2014년04월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7002210
- (22) 출원일자(국제) 2012년06월29일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년01월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/045142
- (87) 국제공개번호 WO 2013/006505
국제공개일자 2013년01월10일
- (30) 우선권주장
61/504,127 2011년07월01일 미국(US)
JP-P-2011-285585 2011년12월27일 일본(JP)

- (71) 출원인
제넨테크, 임크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
디엘, 로리
미국 94080-4990 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
베이츠, 제니퍼
미국 94080-4990 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
사이, 타오
미국 94080-4990 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (74) 대리인
위혜숙, 양영준

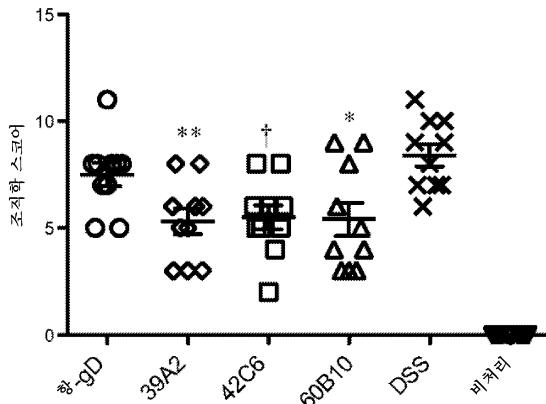
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 자가면역 질환을 치료하기 위한 항-CD83 효능제 항체의 용도

(57) 요약

본 발명은 항-CD83 효능제 항체를 포함하는 조성물 및 항-CD83 효능제 항체를 사용하여 자가면역 장애 (예컨대, 염증성 장 질환)를 치료하는 방법 뿐만 아니라 항-CD83 효능제 항체를 포함하는 제조품에 관한 것이다.

대 표 도 - 도20



특허청구의 범위

청구항 1

개체에게 유효량의 항-CD83 효능제 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 자가면역 질환을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 자가면역 질환이 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 루푸스 신염, 케양성 결장염, 베게너병, 염증성 장 질환, 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반증 (TTP), 자가면역 혈소판감소증, 다발성 경화증, 건선, IgA 신병증, IgM 다발신경병증, 중증 근무력증, 혈관염, 당뇨병, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군 및 사구체신염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 개체가 골수 세포 활성화와 연관된 자가면역 질환을 갖는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 개체가 크론병을 갖는 것인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 개체가 케양성 결장염을 갖는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 인간인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 성숙 수지상 세포로부터 염증유발 시토카인의 방출을 억제하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 염증유발 시토카인 MCP-1 및/또는 IL-12p40의 방출이 억제되는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 성숙 수지상 세포로부터 항염증 시토카인의 방출을 유발하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 항염증 시토카인 IL-1ra의 방출이 유발되는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 성숙 수지상 세포 상에서의 CD83 및/또는 HLA-DR의 세포 표면 발현의 감소를 유발하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 성숙 수지상 세포에서 MAPK 및/또는 mTOR 신호전달의 활성화를 억제하는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, MAPK 신호전달의 활성화의 억제가 성숙 수지상 세포에서 p38 및 CREB 단백질의 인산화의 감소에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, mTOR 신호전달의 활성화의 억제가 성숙 수지상 세포에서 mTOR 단백질의 인산화의 감소에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 인간화 항체 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및 (a) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (b) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 서열 30의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/ 또는 서열 36의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 인간 항체인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD83 효능제 항체가 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로 또는 비강내로 투여되는 것인 방법.

청구항 22

항-CD83 효능제 항체, 및 개체에서 자가면역 질환을 치료하거나 예방하기 위해 항-CD83 효능제 항체를 사용하는 것에 대한 지침서를 포함하는 포장 삽입물을 포함하는 제조품.

청구항 23

- (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2;
- (f) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함하는 단리된 항-CD83 항체.

청구항 24

- (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2;
- (f) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

의 6개의 HVR 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 단리된 항-CD83 항체.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항체.

청구항 26

제25항에 있어서, (a) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함하는 항체.

청구항 27

제23항 또는 제24항에 있어서, (a) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항체 또는 인간화 항체인 항체.

청구항 29

서열 30의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열 36의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 단리된 항-CD83 항체.

청구항 30

제19항에 있어서, 키메라 항체인 항체.

청구항 31

제23항 내지 제30항 중 어느 한 항의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 32

제23항 내지 제30항 중 어느 한 항의 항-CD83 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 33

제32항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 34

제33항에 있어서, 발현 벡터인 벡터.

청구항 35

제33항 또는 제34항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 36

제34항에 있어서, 원핵세포 또는 진핵세포인 숙주 세포.

청구항 37

항-CD83 항체를 코딩하는 핵산의 발현에 적합한 조건 하에 제35항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항-CD83 항체를 제조하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 숙주 세포에 의해 생산된 항-CD83 항체를 회수하는 것을 추가로 포함하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2011년 7월 1일에 출원된 미국 특허 출원 일련 번호 61/504,127, 및 2011년 12월 27일에 출원된 일본 특허 출원 번호 2011-285585 및 2011년 12월 27일에 출원된 2011-285595를 우선권 주장하며, 이들은 각각 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 항-CD83 효능제 항체, 및 자가면역 질환, 예컨대 염증성 장 질환을 치료하기 위해 항-CD83 효능제 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 염증성 장 질환 (IBD), 예컨대 궤양성 결장염 및 크론병은 장의 만성 및 재발성 염증을 특징으로 한다. 최근의 증거는 IBD가 점막 면역계가 병원체와 공생 유기체 사이를 구별할 수 없는 공생 장내 균총에 대한 저항성의 상실로 인한 것임을 나타낸다. 따라서, IBD 환자는 위장 염증 반응을 일으키는 정상 균총에 대한 면역 인식이 발생한다. 정상 균총에 대한 혈청활성이 발생하는 정도는 대략적으로 질환 지속기간 및 질환 중증도와 연관된다 (문헌 [Lodes *et al.*, *J Clin Invest.*, 113:1296-1306, 2004]). 궤양성 결장염과 크론병 유전자 사이에서 중첩되는 25개 초과의 대립유전자가 확인되었다 (문헌 [Umeno *et al.*, *Inflamm Bowel Dis.* In press, 2011]). 이러한 IBD 유전자는 하기를 발생시키는 여러 공통 경로 상에 집중된다: 1) 상피 완전성의 결함, 2) 골수성 미생물 반응 및 염증유발 시토카인의 생산의 결함, 및 3) 상승된 T-헬퍼 17 세포 및 T-헬퍼 1 세포 반응. 연구는 대부분의 IBD 환자가 이들이 상당한 빈도로 임상적 완화를 달성하지만 연장된 기간 동안 완화가 지속되지는 않는 자발적인 재발 및 완화 주기를 갖는다는 것을 보여준다. 이러한 관찰은 IBD 완화 단계를 유도 할 수 있는 아직 정의되지 않은 점막 항상성 메카니즘의 존재를 나타낸다 (문헌 [Schirbel *et al.*, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.*, 5(1):33-41, 2011]). 따라서, 점막 항상성의 유지에 관여하는 분자 및 메카니즘의 확인은 IBD 완화의 유발 뿐만 아니라 유지에 유익할 것이다.

[0006] CD83은 수지상 세포 및 흉선 상피 세포의 표면 상에서 우세하게 발현되는 고도로 보존된 45 킬로달톤 막횡단 당 단백질이다. 추가로, CD83은 면역계의 다른 활성화 세포의 표면 상에서 일시적으로 발현되고, 또한 가용성 형태로 발견될 수 있다. CD83의 예측된 아미노산 서열의 구조적 분석은 이것이 면역계에서 소정의 역할을 나타내는 이뮤노글로불린 슈퍼 패밀리의 구성원이라는 것을 입증한다. 문헌 보고는 HCMV-감염된 성숙 수지상 세포에 의해 방출된 가용성 CD83 (sCD83)이 T 세포 증식을 억제하고 (문헌 [Senechal *et al.*, *Blood.*, 103(11):4207-4215, 2004]), sCD83이 수지상 세포 세포골격 상에 형태적 영향을 미친다는 (문헌 [Kotzor *et al.*, *Immunobiology.*, 209(1-2):129-140, 2004])는 관찰로부터 sCD83이 면역조절 역할을 수행할 수 있다는 것을 시사한다. 그러나, CD83에 대한 리간드는 확인되지 않았고, CD83의 기능은 잘 이해되지 않은 상태로 남아있다. 흥미롭게도, CD83 유전자 발현은 인간 크론병에서 점막 표면에서 하향조절되었고 (문헌 [Silva *et al.*, *Dig. Dis. Sci.*, 53(7):1917-1928, 2008]), 이는 CD83이 점막 항상성의 유지에 관여할 수 있고, 이에 따라 IBD에서 면역계를 조절하기 위한 치료 표적일 수 있다는 것을 시사한다.

[0007] 특히 출원 및 공개를 비롯하여 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0008] 개체에게 유효량의 항-CD83 효능제 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 자가면역 질환을 치료하거나 예방하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0009] 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 루푸스 신염, 케양성 결장염, 베게너병, 염증성 장 질환, 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반증 (TTP), 자가면역 혈소판감소증, 다발성 경화증, 건선, IgA 신병증, IgM 다발신경병증, 중증 근무력증, 혈관염, 당뇨병, 레이노 증후군, 쇼그伦 증후군 및 사구체신염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 골수 세포 활성화 (수지상 세포 및 대식세포), 예컨대 다발성 경화증 및 염증성 장 질환과 연관된다.

[0010] 일부 실시양태에서, 개체는 자가면역 질환을 앓고 있거나 또는 이로 진단된다. 일부 실시양태에서, 개체는 염증성 장 질환 (예컨대, 크론병, 케양성 결장염 및 불확정 결장염)을 앓고 있거나 또는 이로 진단된다.

[0011] 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 성숙 수지상 세포로부터의 염증유발 시토카인의 방출을 억제한다 (예를 들어, 염증유발 시토카인 MCP-1 및/또는 IL-12p40의 방출이 억제됨). 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 성숙 수지상 세포로부터의 항염증 시토카인의 방출을 유발한다 (예를 들어, 항염증 시토카인 IL-1ra의 방출이 유발됨). 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 성숙 수지상 세포 상의 CD83 및/또는 HLA-DR의 세포 표면 발현의 감소를 유발한다. 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 성숙 수지상 세포에서 MAPK 및/또는 mTOR 신호전달의 활성화를 억제한다. 일부 실시양태에서, MAPK 신호전달의 활성화의 억제는 성숙 수지상 세포에서 p38 및/또는 CREB 단백질의 인산화의 감소에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, mTOR 신호전달의 활성화의 억제는 성숙 수지상 세포에서 mTOR 단백질의 인산화의 감소에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 성숙 수지상 세포에서 상처 치유 유전자 (예를 들어, *vcan*, *spock2*, 및 *fnl2*)의 발현을 상향조절한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 항원-결합 단편, 예를 들어 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인; 및/또는 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 서열 30의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열 36의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 항-CD83 효능제 항체는 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로, 또는 비강내로 투여된다.

[0014] 항-CD83 효능제 항체를 포함하는 제조품 또는 키트가 또한 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 제조품 또는 키트는 개체에서 자가면역 질환을 치료하거나 예방하기 위해 항-CD83 효능제 항체를 사용하기 위한 지침서를 포함하는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다.

[0015] 또한, (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; (f) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함하는 단리된 항-CD83 항체가 본원에 제공된다. 또한, (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; (f) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3의 6개의 HVR 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 단리된 항-CD83 항체가 본원에 제공된다.

- [0016] 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 추가로 포함한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체 또는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 30의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및/또는 서열 36의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0019] 본원에 기재된 항-CD83 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 또한 본원에 제공된다.
- [0020] 본원에 기재된 항-CD83 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산이 또한 본원에 제공된다. 핵산을 포함하는 벡터가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터이다. 벡터를 포함하는 숙주 세포가 또한 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵세포 또는 진핵세포이다.
- [0021] 본원에 기재된 항-CD83 항체를 코딩하는 핵산의 발현에 적합한 조건 하에 본원에 기재된 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항-CD83 항체를 제조하는 방법이 또한 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포에 의해 생산된 항-CD83 항체를 회수하는 것을 추가로 포함한다.
- [0022] 본원에 기재된 다양한 실시양태의 특성 중 하나, 일부 또는 전부가 조합되어 본 발명의 다른 실시양태를 형성 할 수 있다는 것이 이해된다. 본 발명의 이들 측면 및 다른 측면은 당업자에게 명백하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 CD83이 CD83을 발현하는 세포의 표면에서 동형 결합에 관여한다는 것을 보여준다. (a) 안정하게 형질감염된 CHO-hCD83 세포 상에서 발현된 CD83을 유동 세포측정법에 의해 정량화하였다. (b) MUTZ-3 유래 성숙 DC 상에서 발현된 CD83의 발현을 유동 세포측정법에 의해 정량화하였다. (c 및 d) CD83.fc는 CHO-hCD83 및 성숙 DC에 결합하였다.
- 도 2는 CD83이 CD83.fc의 결합에 필요하다는 것을 보여준다. (a) CD83.fc는 CHO-hCD83 세포에 결합하였으나, 결합은 유동 세포측정법에 의해 정량화시에 항-CD83 항체에 의해 차단되었다. (b) 18S에 대해 정규화된 전체 RNA의 택맨(taqman) 분석에 의해 도시된 바와 같은 MUTZ-3 성숙 DC에서 CD83에 대해 특이적인 siRNA (siCD83)의 효능. (c) CD83은 비-표적화 대조군 siRNA (siNTC)로 처리된 성숙 DC의 표면 상에서 발현되었으나, siCD83으로 처리된 성숙 DC 상에서는 발현되지 않았다. (d) CD83.fc는 mDC에 결합하였으나, 결합은 siCD83 처리에 의해 폐지되었다. (e) CD83의 녹 다운은 성숙 DC에서 MHCII의 표면 발현을 감소시켰다. (f) CD83의 녹 다운은 성숙 DC에서 CD86의 표면 발현을 변경시키지 않았다.
- 도 3은 CD83 발현이 혼탁액 배양에서 세포 응집을 일으킨다는 것을 보여주는 10X의 현미경검사 영상을 제공한다. (a) 대조군 CHO 세포는 응집되지 않았다. (b) CD83을 발현하는 세포는 혼탁액 배양 동안 클러스터를 형성하였다. (c) CHO-hCD83 세포의 CD83.fc 단백질로의 예비-처리는 응집을 차단하였다. (d) CHO-hCD83 세포의 Ig 대조군 단백질로의 예비-처리는 응집을 차단하지 않았다.
- 도 4는 성숙 DC에서 CD83.fc 또는 HB15e 항체로의 CD83 처리가 표면 활성화 마커 CD83 및 HLA-DR의 발현을 감소시켰다는 것을 보여준다.
- 도 5 ELISA 데이터는 CD83 처리된 인간 단핵구 유래 DC에서 변경된 시토카인 방출을 보여주었다. (a 및 c) 염증유발 시토카인 IL12-p40 및 MCP-1이 CD83.fc 또는 HB15e 항체 처리시에 감소하였다. (b) 항염증 시토카인 IL-1ra가 CD83 처리된 DC에서 유의하게 증가하였다. (d) IL-8은 CD83 처리된 또는 대조군 처리된 DC 사이에 차이가 없다는 것을 보여주었다. *는 값이 유의한 차이가 있다는 것을 나타낸다; * p<0.01, ** p<0.001. 적어도 4개의 상이한 공여자를 대표하는 그래프.
- 도 6 ELISA 데이터는 CD83 처리된 MUTZ-3 유래 DC에서 변경된 시토카인 방출을 보여주었다. (a 및 c) 염증유발 시토카인 IL12-p40 및 MCP-1은 CD83.fc 또는 HB15e 항체 처리시에 감소하였다. (b) 항염증 시토카인 IL-1ra가 CD83 처리된 DC에서 유의하게 증가하였다. (d) IL-8은 CD83 처리된 또는 대조군 처리된 DC 사이에서 어떠한 차이도 나타내지 않았다. 각각의 웰로부터의 상청액에 대해 3회 시행하였다.

도 7은 DC에서 CD83.fc 또는 HB15e 항체로의 CD83 처리가 *gapdh*에 대해 정규화된 *vcan*, *spock2*, 및 *fbn2*의 택맨 qPCR 분석에 의해 제공된 바와 같이 상처 치유에 관련된 유전자의 상향조절을 발생시켰다는 것을 보여준다. 평균 상대 발현 ($2^{\Delta\Delta CT}$) + SEM.

도 8은 DC에서 항염증 반응을 매개하기 위해 트랜스 CD83 동형 상호작용이 일어날 수 있다는 것을 입증한다. (a 및 b) 시토카인 생산의 ELISA 측정은 CD83을 과다발현하는 CHO 세포와 mDC의 공동-배양이 염증유발 시토카인 IL12-p40 및 MCP-1의 방출을 억제하였다는 것을 보여주었다. (c) CD83 녹-아웃 (CD83KO) 및 야생형 (WT) 한배자손으로부터 생성된 성숙 마우스 골수-유래 DC (BMDC) (회색 막대)는 LPS 자극 24시간 후에 유사한 수준의 IL-12p40을 생산하였다. (d) WT 성숙 BMDC와 배양된 미성숙 BMDC는 CD83 결핍된 성숙 BMDC와 배양된 것보다 유의하게 낮은 IL-12p40을 생산하였다 ($p=0.0372$).

도 9는 CD83 동형 상호작용이 DC에서 항염증 반응을 매개하였다는 것을 입증한다. (a) CD83의 siRNA 농다운은 MCP-1의 ELISA에 의해 입증된 바와 같이 CD83.fc 또는 HB15e 항체에 대한 반응을 폐지하였다. (b) 전장 CD83 및 세포질 말단절단된 CD83에 대한 CD83 렌티바이러스 발현 구축물의 다이어그램. (c) MCP-1 생산의 ELISA는 세포질 말단절단된 CD83의 발현이 CD83.fc 단백질의 억제 효과를 차단하였다는 것을 보여주었다.

도 10은 항체 가교가 DC에서 CD83 세포질 도메인을 통해 항염증 반응을 유발하기에 충분하였다는 것을 입증한다. (a) CD83 막횡단 및 전장 또는 말단절단된 세포질 도메인에 융합된 CD79a의 세포외 도메인을 도시하는 CD83 키메라 렌티바이러스 발현 구축물의 다이어그램. (b) IL12-p40 생산의 ELISA는 말단절단된 키메라의 과다발현이 항-CD79a 항체에 대한 DC 반응을 억제하였다는 것을 보여주었다.

도 11은 CD83이 항염증 반응을 매개하는 C-말단에 부류 III PDZ 리간드 모티프를 함유한다는 것을 보여준다. (a) CD83 세포질 도메인의 마지막 15개 아미노산의 아미노산 정렬 다이어그램은 보존된 부류 III PDZ 리간드 모티프를 보여주었다. (b) C-말단 PDZ 리간드 모티프 V205A 돌연변이체의 CD83 렌티바이러스 발현 구축물의 다이어그램. (c) MCP-1 생산의 ELISA는 V205A PDZ 리간드 모티프 돌연변이체의 발현이 CD83.fc 단백질의 억제 효과를 차단하였다는 것을 보여주었다.

도 12는 CD83 동형 상호작용의 면역 억제 효과가 p38 MAPK 및 mTOR 신호전달 경로에 의해 매개되었다는 것을 보여준다. (a-c)는 HB15e 항체 치료가 mTOR, p38 및 CREB의 인산화의 유의한 감소를 발생시켰다는 것을 보여주었다. (d) HB15e 항체 치료는 TNF 경로에 의해 활성화된 STAT3의 인산화를 억제하지 않았다. (e) 웨스턴 블롯 분석은 HB15e 항체 치료시에 p38 인산화의 감소를 확인하였다. (f) HB15e 항체 치료시에 STAT3의 인산화에서 어떠한 유의한 차이도 나타나지 않았다. 전체 p38 및 STAT3을 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 13은 결장에서의 CD83 과다발현이 고유판에서 DC 상의 표면 활성화 마커의 하향조절을 발생시켰다는 것을 보여준다. (a) CD83 트랜스제닉 마우스를 생성하기 위해 사용된 트랜스제닉 구축물의 다이어그램. (b) 면역조직화학 염색은 결장 상피에서 트랜스진의 발현을 보여주었다. (c 및 e) CD83 트랜스제닉 마우스의 결장 및 비장으로부터 단리된 DC 상의 표면 마커의 발현은 FACS에 의해 정량화하고, 평균 형광 강도 (MFI)로서 측정하였다. (d 및 f) T 세포 표면 활성화 마커의 어떠한 유의차도 CD83 트랜스제닉 마우스의 결장 또는 비장에서 발견되지 않았다. (g) 택맨 qPCR 분석은 CD83 트랜스제닉 마우스로부터 단리된 DC에서 상승된 상처 치유 유전자 발현을 보여주었다.

도 14는 CD83 트랜스제닉 마우스로부터 단리된 DC 하위세트를 분석하기 위한 FACS 게이팅 전략을 도시하며, 이는 CD83 트랜스진이 DC 하위세트 생산에 영향을 미치지 않았다는 것을 입증하였다. (a 및 b) MHCII+ 및 CD11c 고발현에 의해 게이팅된 DC. (c) T-세포의 게이팅. (d 및 e) 결장 및 비장으로부터 단리된 DC 하위세트의 유동 세포측정법 분석.

도 15는 CD83 과다발현이 마우스를 렉스트란 황산나트륨 (DSS) 유발 결장염으로부터 보호하였다는 것을 보여준다. (a) DSS로 처리시에 야생형 마우스와 비교하여 CD83 트랜스제닉 마우스에서의 보다 적은 체중 감소를 도시한다. (b) DSS 유발 결장염을 앓고 있는 마우스의 결장 절편의 혜마톡실린 및 에오신 염색. (c) 야생형 및 CD83 트랜스제닉 마우스의 조직학 스코어. (d) 야생형 한배자손과 비교하여 DSS로 처리된 CD83 트랜스제닉 마우스에서의 혈청 시토카인 수준의 ELISA. (e) 야생형 한배 새끼와 비교하여 DSS로 처리된 CD83Tg 마우스로부터의 결장 고유판 DC에서의 IL-12p40 유전자 발현에 대한 qPCR.

도 16은 DC에서의 CD83의 녹-아웃이 결장염을 악화시켰다는 것을 보여준다. (a) CD83 조건부 녹-아웃 전략의 다이어그램. (b) 비장에서 TCRb+ 립프구 상에 게이팅된 FACS 플롯. $CD83^{fl/fl} CD11c-Cre$ 마우스는 비장에서

48.6% CD4 양성 T 세포를 가졌고, $CD83^{wt/wt}$ $CD11c$ -Cre 마우스는 48.1% CD4 양성 T 세포를 가졌다. (c) $CD83^{wt/wt}$ $CD11c$ -Cre (흑색선) 및 $CD83^{fl/fl}$ $CD11c$ -Cre (회색선) 마우스의 비장 DC 상에서의 CD83의 상대 발현을 보여주는 히스토그램. (d) $CD83^{fl/fl}$ $CD11c$ -Cre 및 $CD83^{wt/wt}$ $CD11c$ -Cre 마우스에서의 DSS 결장염 생존. 조건부 녹-아웃 동물은 생존이 유의하게 감소하였다 (로그 순위 검정, $p=0.0186$). (e) 제8일에서의 체중은 $CD83^{wt/wt}$ $CD11c$ -Cre 한배자손과 비교하여 $CD83^{fl/fl}$ $CD11c$ -Cre 마우스에서 유의하게 더 낮았다. (f) 동물의 항문 주위의 현성 출혈의 발생. $CD83^{fl/fl}$ $CD11c$ -Cre 마우스의 100%가 제7일에 명백한 잠재 출혈을 나타내었다. 현성 출혈은 $CD83^{wt/wt}$ $CD11c$ -Cre 한배자손에서는 관찰되지 않았다.

도 17은 항-인간 CD83 항체가 CD83을 발현하는 세포에 결합하였다는 것을 보여준다. 유동 세포측정법에 의한 정량화는 항-CD83 항체 (a) 35G10, (b) 40A11, (c) 54AD1, (d) 59G10, (e) 75A1 및 (f) 7C7가 인간 CD83을 발현하는 CHO 세포 (흑색선)에 특이적으로 결합하지만, 마우스 CD83을 발현하는 세포 (파선)에는 결합하지 않는다는 것을 입증하였다. (g) 항-CD83 항체 60B10은 인간 CD83을 발현하는 CHO 세포에 결합하였으나, 또한 마우스 CD83을 발현하는 CHO 세포와 교차-반응성을 나타내었다. 모 CHO 세포주 (충전된 회색 히스토그램) 상에서는 어떠한 결합도 나타나지 않았다.

도 18은 항-마우스 CD83 항체가 마우스 CD83을 발현하는 CHO 세포에 결합하였다는 것을 보여준다. 유동 세포측정법에 의한 정량화는 항-CD83 항체 (a) 42C6 및 (b) 39A2가 마우스 CD83을 발현하는 CHO 세포 (파선)에 특이적으로 결합하지만, 인간 CD83을 발현하는 CHO 세포 (흑색선) 또는 모 CHO 세포주 (충전된 회색 히스토그램)에는 결합하지 않는다는 것을 입증하였다.

도 19는 항-CD83 항체가 염증유발 시토카인의 생산을 유의하게 감소시켰다는 것을 보여준다. (a) ELISA 데이터 분석은 항-CD83 항체 60B10, 35G10, 40A11 또는 7C7이 이소형 대조군 항체 (ISO)의 사용과 비교하여 mDC로부터의 MCP-1의 생산을 유의하게 감소시켰다는 것을 입증하였다; *는 이소형 대조군 처리된 것과 유의한 차이가 있는 값을 나타낸다: 각각 $p=0.0303$, $p=0.0309$, $p=0.0369$, $p=0.0247$. 54D1, 59G10 또는 75A1 항체를 투여한 세포에서는 어떠한 유의한 차이도 나타나지 않았다. (b) 마우스 골수-유래 DC (BMDC)에서의 IL-12p40 발현의 정량적 PCR 분석은 항-CD83 항체 39A2 또는 42C6이 이소형 대조군 항체의 사용과 비교하여 LPS-유발 CD83 발현을 유의하게 감소시켰다는 것을 입증하였다. IL-12p40 발현을 β -액틴에 대해 정규화하였다. 각각의 기호는 독립적인 마우스로부터의 세포를 나타낸다. *, $p=0.0372$; †, $p=0.0438$.

도 20은 항-CD83 항체가 DSS 유발 결장염에 대해 마우스를 보호하였다는 것을 보여준다. 항-CD83 항체를 투여한 마우스는 항-gD 대조군 항체 또는 DSS를 단독으로 투여한 마우스와 비교하여 조직학 스코어를 현저하게 감소시켰다: 39A2, 평균 5.3, **는 $p=0.0011$ 을 나타냄; 42C6, 평균=5.5, †는 $p=0.0015$ 를 나타냄; 60B10, 평균=5.4, *는 $p=0.0059$ 를 나타냄.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

I. 일반적 기술

[0025]

본원에 기재되거나 언급되는 기술 및 절차는 당업자가 일반적으로 널리 이해하고 있고, 종래의 방법, 예컨대 예를 들어 하기 문헌에 기재된 광범위하게 사용되는 방법을 이용하여 통상적으로 이용된다: 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); 시리즈 *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short*

Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 및 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)].

[0026] II. 정의

용어 "자가면역"은 면역계 성분, 예컨대 항체 또는 립프구가 이들을 생산하는 유기체의 분자, 세포 또는 조직을 공격하거나 해치는 과정을 지칭한다. "자가면역 장애"는 손상, 예컨대 조직 손상, 또는 별병기전이 적어도 부분적으로 자가면역 과정의 결과인 질환을 지칭한다. 예로서, "자가면역 질환"은 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 루푸스 신염, 궤양성 결장염, 베게너병, 염증성 장 질환, 특발성 혈소판 감소성 자반증 (ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반증 (TTP), 자가면역 혈소판감소증, 다발성 경화증, 건선, IgA 신병증, IgM 다발신경병증, 중증 근무력증, 혈관염, 당뇨병, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군 및 사구체신염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가면역 장애는 골수 세포 활성화 (수지상 세포 및 대식세포), 예컨대 다발성 경화증 및 염증성 장 질환과 연관된다.

"염증성 장 질환" 또는 "IBD"는 장 염증을 유발하고, 일반적으로 복부 경련 및 통증, 설사, 체중 감소 및 장 출혈을 비롯한 증상이 나타나는 장애의 군을 지칭한다. IBD는 궤양성 결장염 (UC), 크론병 및 불확정 결장염을 포함한다.

"궤양성 결장염" 또는 "UC"는 혈성 설사를 특징으로 하는 대장 및 직장의 만성, 에피소드성, 염증성 질환이다. 궤양성 결장염은 결장 점막에서의 만성 염증을 특징으로 하고, 위치에 따라 분류될 수 있다: "직장염"은 오직 직장을 포함하고; "직장구불결장염"은 직장 및 구불 결장에 영향을 미치고; "좌측 결장염"은 대장의 전체 좌측을 포함하고; "전결장염"은 전체 결장에 염증을 발생시킨다.

또한 "국한성 장염"으로도 불리는 "크론병"은 위장관의 임의의 부분에 영향을 미칠 수 있는 만성 자가면역 질환이나, 대부분은 통상적으로 회장 (소장 및 대장이 만나는 부위)에서 발생한다. 궤양성 결장염과는 대조적으로, 크론병은 장벽의 모든 층을 통해 확장되고 장간막 뿐만 아니라 부위 림프절을 포함하는 만성 염증을 특징으로 한다. 소장 또는 결장이 포함되는 아니든 기본적 병리 과정은 동일하다.

궤양성 결장염 및 크론병은 사례 중 90% 초과에서 임상적으로, 내시경적으로, 병리학적으로 및 혈청학적으로 서로 구별될 수 있고; 나머지는 불확정 IBD (문헌 [Harrison's Principles of Internal medicine, 12th edition, p. 1271 (1991)])로 간주된다.

"불확정 결장염"은 궤양성 결장염 및 크론병의 중복되는 특징을 갖는 염증성 장 질환 상태를 지칭한다. 조직학이 결장에 제한된 구조적 변경을 갖는 급성 및 만성 염증을 나타내지만 개체가 크론병을 갖는지 또는 궤양성 결장염을 갖는지 여부를 명백하게 나타내지 않은 경우에 이러한 진단이 내려진다.

본원에 사용된 용어 "치료"는 임상 병리상태의 과정 동안 치료될 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키도록 설계된 임상적 개입을 지칭한다. 바람직한 치료 효과는 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함한다. 예를 들어, 자가면역 질환 (예컨대, 염증성 장 질환)과 연관된 하나 이상의 증상이 완화되거나 제거된다면 개체는 성공적으로 "치료된다".

본원에 사용된 용어 "예방"은 개체에서 질환의 발생 또는 재발과 관련하여 예방을 제공하는 것을 포함한다. 그러나, 자가면역 질환에 걸리기 쉽거나, 발생할 가능성이 높거나 또는 자가면역 질환이 발생할 위험이 있을 수 있는 개체는 아직 이 질환을 갖는 것으로 진단되지는 않았다.

본원에 사용된 자가면역 질환이 발생할 "위험이 있는" 개체는 검출가능한 질환 또는 질환의 증상을 갖거나 갖지 않을 수 있고, 본원에 기재된 치료 방법 이전에 검출가능한 질환 또는 질환의 증상을 나타내거나 나타내지 않았을 수 있다. "위험이 있는"은 개체가 당업계에 공지된 바와 같은 자가면역 질환의 발생과 연관된 측정가능한 파라미터인 하나 이상의 위험 요인을 갖는다는 것을 나타낸다. 이러한 위험 요인 중 하나 이상을 갖는 개체는 이러한 위험 요인이 없는 개체보다 질환이 발생할 확률이 더 높다.

"유효량"은 적어도 원하는 치료 또는 예방 결과 달성을 필요한 투여량에서 이러한 기간 동안 유효한 양을 지칭

한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다.

[0037] "치료 유효량"은 적어도 특정한 장애 (예를 들어, 자가면역 질환)의 측정가능한 개선이 일어나는데 요구되는 최소 농도이다. 치료 유효량은 본원에서 환자의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 도출하는 항-CD83 효능제 항체의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료 유효량은 치료상 유익한 효과가 항-CD83 효능제 항체의 임의의 독성 또는 유해한 영향을 능가하는 양이다. "예방 유효량"은 원하는 예방 결과 달성을 필요한 투여량 및 이러한 기간 동안 유효한 양을 지칭한다. 반드시 그런 것은 아니지만 전형적으로, 예방 용량은 질환이 발생하기 전에 또는 질환의 초기 단계에서 대상체에게 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량보다 적을 수 있다.

[0038] "만성" 투여는 초기 치료 효과 (활성)가 장기간 동안 유지되도록, 단기 방식과 대조적으로 연속적 방식으로 의약(들)을 투여하는 것을 지칭한다. "간헐적" 투여는 중단 없이 연속적으로 수행되지는 않지만, 오히려 특성상 주기적인 치료를 지칭한다.

[0039] 본원에 사용된 또 다른 화합물 또는 조성물과의 "조합" 투여는 동시 투여 및/또는 상이한 시간에서의 투여를 포함한다. 조합 투여는 또한 다양한 투여 빈도 또는 간격에서 동일한 경로의 투여 또는 다양한 경로의 투여를 사용하는 것을 비롯하여 공동-제제로서의 투여 또는 개별 조성물로서의 투여를 포함한다.

[0040] 치료 또는 예방 목적을 위한 "개체"는 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 토끼, 소, 돼지, 햄스터, 저빌, 마우스, 페럿, 래트, 고양이 등을 포함하는, 포유동물로 분류된 임의의 동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0041] 본원에 사용된 용어 "시토카인"은 일반적으로 세포간 매개자로서 또 다른 세포 상에 작용하거나 단백질을 생산하는 세포에 대해 자가분비 효과를 갖는 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질을 지칭한다. 이러한 시토카인의 예는 림포카인, 모노카인; 인터류킨 ("IL"), 예컨대 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A-F, IL-18 내지 IL-29 (예컨대, IL-23), IL-31, 예를 들어 프로류킨(PROLEUKIN)® rIL-2; 종양-괴사 인자, 예컨대 TNF- α 또는 TNF- β , TGF- β 1-3; 및 다른 폴리펩티드 요인, 예를 들어 백혈병 억제 인자 ("LIF"), 섬모 신경영양 인자 ("CNTF"), CNTF-유사 시토카인 ("CLC"), 카디오트로핀 ("CT") 및 키트 리간드 ("KL")를 포함한다.

[0042] 본원에 사용된 용어 "CD83"은 천연 서열 CD83 및 CD83의 자연 발생 변이체를 포함한다. CD83은 다양한 공급원, 예컨대 포유동물 (인간 포함) 조직 유형 또는 또 다른 공급원으로부터 단리될 수도 있거나, 또는 재조합 및/또는 합성 방법에 의해 제조될 수도 있다.

[0043] 본원에 사용된 용어 "항-CD83 효능제 항체"는 세포 표면 상에서 발현된 CD83에 결합하고, 세포 표면 상에서 발현된 CD83에 대한 결합 후에 CD83의 신호 전달을 활성화시키는 항체를 지칭한다.

[0044] 용어 "이뮤노글로불린" (Ig)은 본원에서 "항체"와 교환가능하게 사용된다. 본원에서 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체) 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다.

[0045] 기본 4-쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 이종사량체 당단백질이다. V_H 및 V_L의 쌍형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 부류의 항체의 구조 및 특성에 대해, 예를 들어 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994 (페이지 71 및 챕터 6)]을 참조한다.

[0046] 임의의 척추동물 종으로부터의 L 쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 카파 ("κ") 및 람다 ("λ")로 지칭되는 명백하게 구별되는 2가지 유형 중 하나로 배정될 수 있다. 이뮤노글로불린은 중쇄의 불변 도메인 (CH)의 아미노산 서열에 따라 상이한 부류 또는 이소형으로 배정될 수 있다. 5가지 부류의 이뮤노글로불린이 존재한다: 각각 알파 ("α"), 엘타 ("δ"), 엡실론 ("ε"), 감마 ("γ") 및 뮤 ("μ")로 지정된 중쇄를 갖는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM. γ 및 α 부류는 CH 서열 및 기능에 있어 상대적으로 작은 차이에 기초하여 하위 부류 (이소형)로 추가로 분류되며, 예를 들어 인간은 하기 하위부류: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 널리 공지되어 있고, 일반적으로 예를 들어 문헌 [Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders Co., 2000)]에 기재되어 있다.

[0047] "천연 항체"는 통상적으로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 약 150,000 달톤의 이종

사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 공유 디슬피드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 한편, 디슬피드 연결의 수는 상이한 이谬노글로불린 이소형의 중쇄마다 달라진다. 또한, 각각의 중쇄 및 경쇄는 일정하게 이격된 쇄내 디슬피드 가교를 갖는다. 각각의 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V_H)을 갖고, 그 뒤에는 수많은 불변 도메인이 존재한다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V_L)을 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성한다고 여겨진다.

[0048] "단리된" 항체는 그의 생산 환경 (예를 들어, 자연적 또는 재조합 방식으로)의 성분으로부터 확인, 분리 및/또는 회수된 것이다. 바람직하게는, 단리된 폴리펩티드는 그의 생산 환경으로부터의 다른 모든 성분과 회합되지 않는다. 그의 생산 환경의 오염 성분, 예컨대 재조합 형질감염된 세포로부터 생성되는 것은 전형적으로 항체에 대한 연구, 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 (1) 예를 들어 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정시에 항체의 95 중량% 초과, 및 일부 실시양태에서 99 중량% 초과로, (2) 스피닝 컵 서열분석기의 이용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열 중 적어도 15개 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는, 바람직하게는 은 염색을 사용하여 비-환원 또는 환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 T-세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 1회의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0049] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 " V_H " 및 " V_L "로 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 항체의 최대 가변 부분이고 (동일한 부류의 다른 항체에 비해), 항원 결합 부위를 함유한다.

[0050] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 절편의 서열이 항체마다 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 그의 특정한 항원에 대한 특정한 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 전체 범위에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 대신에, 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 초가변 영역 (HVR)으로 불리는 3개의 절편에 집중된다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)이라 지칭된다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 주로 베타-시트 입체형태를 취하고 3개의 HVR에 의해 연결된 4개의 FR 영역을 포함하며, 이는 베타-시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는 상기 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각각의 쇄 내의 HVR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇄의 HVR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성-세포독성에서 항체의 참여를 나타낸다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종 항체들의 집단으로부터 수득한 항체를 지칭하고, 즉 이러한 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 번역후 변형 (예를 들어, 이성질체화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되며 고도로 특이적이다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 작용하는 상이한 항체를 포함하는 폴리를 로날 항체 제제와 대조적으로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 작용한다. 이러한 특이성 뿐만 아니라, 모노클로날 항체는 하이브리도마 배양에 의해 합성되고, 다른 이谬노글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징이 실질적으로 동종 항체들의 집단으로부터 수득된 것을 나타내며, 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생산이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 예를 들어 하기로 비롯한 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다: 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2d ed. 1988); Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]], 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지-디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 101(34):12467-472 (2004); 및 Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)] 참조), 및 인간 이谬노글로불린 유전자좌 또는 인간 이谬노글

로불린 서열을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; [Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)] 참조).

[0052] 용어 "네이키드 항체"는 세포독성 모이어티 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체를 지칭한다.

[0053] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 항체 단편과 대조적으로 그의 실질적으로 무손상 형태의 항체를 지칭하도록 교환가능하게 사용된다. 구체적으로, 전체 항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 것을 포함한다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 가질 수 있다.

[0054] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 및/또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 (미국 특허 5,641,870, 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)] 참조); 단일-쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0055] 항체를 파파인 소화시키면 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (이 명칭은 용이하게 결정되는 능력을 반영함)을 생산한다. Fab 단편은 H 쇄의 가변 영역 도메인 (V_H) 및 1개 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_{H1})과 함께 전체 L 쇄로 이루어진다. 각각의 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이고, 즉 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 항체를 펩신 처리하면 상이한 항원-결합 활성을 갖는 2개의 디슬피드 연결된 Fab 단편에 대략 상응하는 단일의 큰 F(ab')₂ 단편을 생성하고, 이는 여전히 항원에 가교결합할 수 있다. Fab' 단편은 항체 헌지 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 C_{H1} 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개의 잔기가 추가된 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 그 사이에 헌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생산된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0056] Fc 단편은 디슬피드에 의해 함께 결합되어 있는 H 쇄 둘 다의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역 내의 서열에 의해 결정되고, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식된다.

[0057] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비공유 회합된 이량체로 이루어진다. 이를 2개 도메인이 풀딩되어 6개의 초가변 루프 (H 및 L 쇄로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 이는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮긴 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0058] "단일-쇄 Fv" ("sFv" 또는 "scFv"로도 약칭됨)는 단일 폴리펩티드 쇄 내로 연결된 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 하는, V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv의 검토를 위해 문헌 [Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0059] 본 발명의 항체의 "기능적 단편"은 무손상 항체의 일부, 일반적으로 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역, 또는 변경된 FcR 결합 능력을 보유하거나 갖는 항체의 F 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0060] 용어 "디아바디"는 V_H 및 V_L 도메인 사이의 짧은 링커 (약 5-10개 잔기)로 sFv 단편 (이전 단락 참조)을 구축함으로써 V 도메인의 쇄내 쌍형성이 아닌 쇄간 쌍형성을 달성하여 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성하여 제조된 소형 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 V_H 및 V_L 도메인이 상이

한 폴리펩티드 쇄에 존재하는 2개의 "가교" sFv 단편으로 이루어진 이종이량체이다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0061] 본원의 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린), 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6851-55 (1984)]). 본원의 관심 키메라 항체는 프리마티즈드(PRIMATIZED)® 항체를 포함하고, 여기서 항체의 항원-결합 영역은 예를 들어 마카크 원숭이를 관심 항원으로 면역화시킴으로써 생산된 항체로부터 유래한다. 본원에 사용된 "인간화 항체"는 "키메라 항체"의 하위세트로 사용된다.

[0062] 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 수여자의 HVR로부터의 잔기가 비인간종 (공여자 항체), 예를 들어 원하는 특이성, 친화도 및/또는 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 HVR로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 FR 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체한다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능, 예컨대 결합 친화도를 개선하기 위해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개의, 일반적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린 서열의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이지만, FR 영역은 항체 성능, 예를 들어 결합 친화도, 이성질체화, 면역원성 등을 개선하는 1개 이상의 개별 FR 잔기 치환을 포함할 수 있다. FR 중 이들 아미노산 치환의 수는 전형적으로 H 쇄에서 6개 이하, L 쇄에서는 3개 이하이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세한 설명에 대해, 예를 들어 문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌 [Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)]; 및 미국 특허 번호 6,982,321 및 7,087,409를 참조한다.

[0063] "인간 항체"는 인간에 의해 생산되고/되거나 본원에 개시되는 임의의 인간 항체 제조 기술을 사용하여 생산된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 배제된다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 비롯한 당업계에 공지된 각종 기술을 이용하여 생성할 수 있다. 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. 또한, 문헌 [Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법도 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용가능하다. 또한 문헌 [van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001)]을 참고한다. 인간 항체는 항원 시험접종에 반응하여 이러한 항체를 생산하도록 변형되었으나 내인성 유전자좌는 무력화시킨 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역화된 제노마우스에게 항원을 투여하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)™ 기술에 관한 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 참조). 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 대해 예를 들어 문헌 [Li et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)]을 참조한다.

[0064] 본원에 사용시에 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 서열 내에서 초가변적이고/거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체-가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; VH 내에 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중에서 가장 높은 다양성을 나타내고, 특히 H3은 항체에 정밀한 특이성을 부여하는데 특유의 역할을 수행한다고 여겨진다. 예를 들어, 문헌 [Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)])을 참조한다. 실제로, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 낙타류 항체는 경쇄의 부재 하에 기능적이고 안정하다. 예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993) 및 Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)]을 참조한다.

[0065] 다수의 HVR 설명이 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성-결정 영역 (CDR)인 HVR은 서열 변동성에 기

초하고, 가장 흔히 사용된다 (문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]). 대신, 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 지칭한다 (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM HVR은 카바트 CDR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체-모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합체 결정 구조의 분석을 기반으로 한다. 각각의 이를 HVR로부터의 잔기는 하기에 나타내어진다.

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0066]

[0067] HVR은 다음과 같이 "확장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2), 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (바람직한 실시양태) (H2), 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변-도메인 잔기는 각각의 이러한 연장된-HVR 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0068]

"프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 HVR 잔기 이외의 다른 가변-도메인 잔기이다.

[0069]

어구 "카바트에서와 같은 가변-도메인 잔기-넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산-위치 넘버링" 및 그의 변형은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서의 항체의 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 이것으로의 삽입에 상응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 주어진 항체에 대해, 항체 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬하여 결정할 수 있다.

[0070]

카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)을 지칭하는 경우에 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 일반적으로 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역의 잔기를 지칭하는 경우에 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 보고된 EU 인덱스). "카바트에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다 (예를 들어, 미국 가출원 번호 60/640,323에서 EU 넘버링에 대한 도면 참조).

[0071]

본원에 사용된 "수용자 인간 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 "수용자 인간 프레임워크"는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 기존의 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 기존의 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 기존의 아미노산 변화가 VH에 존재하는 경우에, 바람직하게는 이를 변화가 위치 71H, 73H 및 78H 중 단지 3개, 2개 또는 1개에서만 일어나는 경우에, 예를 들어 이를 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A일 수 있다. 한 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열 측면에서 동일하다.

[0072]

"인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔히 발생하

는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서와 같은 하위군이다. 예는 VL의 경우에 하위군이 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I, 카파 II, 카파 III 또는 카파 IV일 수 있는 것을 포함한다. 추가로, VH의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 I, 하위군 II, 또는 하위군 III일 수 있다.

- [0073] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다.
- [0074] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다.
- [0075] 지시된 위치, 예를 들어 Fc 영역의 지시된 위치에서의 "아미노산 변형"은 지시된 잔기의 치환 또는 결실, 또는 지시된 잔기에 인접한 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입을 지칭한다. 지시된 잔기에 "인접한" 삽입은 그의 1 내지 2개 잔기 내에서의 삽입을 의미한다. 삽입은 지시된 잔기에 대해 N-말단 또는 C-말단일 수 있다. 본원에서 바람직한 아미노산 변형은 치환이다.
- [0076] "친화도-성숙" 항체는 변경(들)을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여 항원에 대한 항체의 친화도의 개선을 발생시키는, 그의 하나 이상의 HVR에서 하나 이상의 변경을 갖는 것이다. 한 실시양태에서, 친화도-성숙 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 퍼코몰의 친화도를 갖는다. 친화도-성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 생성된다. 예를 들어, 문헌 [Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)]은 VH- 및 VL-도메인 셔플링에 의한 친화도 성숙을 기재하고 있다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발은, 예를 들어 문헌 [Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); 및 Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "~에 특이적으로 결합한다" 또는 "~에 특이적인"은 생물학적 분자를 포함하는 이종 분자 집단의 존재 하에 표적의 존재를 결정할 수 있는 것으로, 측정가능하고 재생가능한 상호작용, 예컨대 표적 및 항체 사이의 결합을 지칭한다. 예를 들어, 표적 (에피토프일 수 있음)에 특이적으로 결합하는 항체는 다른 표적에 결합하는 것에 비해 이 표적에 더 높은 친화도, 결합력, 더 큰 용이성, 및/또는 더 긴 기간 동안 결합하는 항체이다. 한 실시양태에서, 비관련 표적에 항체가 결합하는 정도는, 예를 들어 방사선면역검정 (RIA)으로 측정시, 표적에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 해리 상수 (K_d)는 $\leq 1 \mu M$, $\leq 100 nM$, $\leq 10 nM$, $\leq 1 nM$ 또는 $\leq 0.1 nM$ 이다. 특정 실시양태에서, 항체는 상이한 종으로부터의 단백질 사이에 보존된 단백질 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 특이적 결합에는 배타적인 결합이 포함될 수 있지만, 배타적인 결합이 요구되는 것은 아니다.
- [0078] 용어 "Fc 영역"은 본원에서 천연-서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는, 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226 또는 Pro230의 아미노산 잔기로부터 이것의 카르복실-말단까지의 스트레이치인 것으로 정의된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어 항체의 생성 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 조작으로 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않는 항체 집단, 및 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체들의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 본 발명의 항체에 사용하기에 적합한 천연-서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다.
- [0079] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 이들의 자연 발생 변이체를 포함한다.
- [0080] "변이체 Fc 영역"은 적어도 1개의 아미노산 변형, 바람직하게는 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 통해 천연 서열 Fc 영역과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 1개 이상의 아미노산 치환을 갖고, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서의 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역

과의 약 80% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 그와의 약 90% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 그와의 약 95% 이상의 상동성을 보유할 것이다.

[0081] "결합 친화도"는 일반적으로, 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비-공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 ("Kd," 하기 참조)로 나타내어질 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원에 서서히 결합하고 용이하게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원에 보다 신속하게 결합하고 보다 길게 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 목적상, 이를 중 임의의 방법이 이용될 수 있다. 결합 친화도 측정을 위한 구체적인 예시적 및 대표적 실시양태를 하기 기재한다.

[0082] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 하기 검정에 기재되는 바와 같이 원하는 항체의 Fab 형태 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원-결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액-결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 (^{125}I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화 시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정한다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터 플레이트 (디넥스 테크놀로지스, 인크.(DYNEX Technologies, Inc.), 베지니아주 찬틸리)를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs), 펜실베니아주 코크란빌)로 밤새 코팅한 후에 PBS 중 2% (w/v) 소 혈청 일부분으로 2시간 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단한다. 비-흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620, 날제 눈크 인터내셔널(Nalge Nunc International), 뉴욕주 로체스터)에서는 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만; 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션 할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션 한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중 0.1% 트윈(TWEEN)-20™ 계면활성제로 8회 세척한다. 플레이트가 건조되면, 150 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 섬광제 (마이크로신트(MICROSCINT)-20™; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)™ 감마 계수기 (팩커드)에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다.

[0083] 또 다른 실시양태에 따라, Kd는 25°C에서 ~10 반응 단위 (RU)의 고정화된 항원 CM5 칩으로 비아코어(BIACORE)®-2000 또는 비아코어®-3000 기기 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용한 표면-플라즈몬 공명 검정으로 측정한다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (~0.2 μM)로 희석한 후에 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 주사한다. 항원의 주사 후에, 1 M 에탄올아민을 주사하여 미반응 기를 차단한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석 물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈 20™ 계면활성제를 함유하는 PBS (PBST) 중에 주사한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 회합 및 해리 센소그램을 동시에 피팅시켜 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 상기 표면-플라즈몬 공명 검정에 의한 온-레이트가 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하는 경우에, 온-레이트는 분광 측정계, 예컨대 정지 유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼츠(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(AMINCO)™ 분광광도계 (써모스펙트로닉스(ThermoSpectronic), 위스콘신주 매디슨)에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 통과 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 "온-레이트", "회합의 비율", "회합률" 또는 " k_{on} "은 또한 비아코어®-2000 또는 비아코어®-3000 시스템 (비아코어, 인크., 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하여 상기 기재된 바와 같이 결정할 수 있다.

[0085]

본원의 항체를 코딩하는 "단리된" 핵산 분자는 그것이 생산되는 환경에서 그와 통상적으로 회합되는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 바람직하게는, 단리된 핵산은 생산 환경과 관련된 모든 성분과 회합되지 않는다. 본원에서 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 설정 이외의 형태이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 세포에서 자연적으로 존재하는 본원의 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 핵산과 구별된다.

[0086]

본원에 사용된 용어 "벡터"는 그가 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하도록 의도된다. 한 유형의 벡터는 추가의 DNA 절편이 라이게이션될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA를 지칭하는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 과지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 추가의 DNA 절편이 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 그것이 도입된 숙주 세포 내에서 자율 복제가 가능하다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 벡터가 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 시시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터", 또는 간단히 "발현 벡터"라 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 교환가능하게 사용될 수 있는데, 이는 플라스미드가 가장 흔하게 사용되는 형태의 벡터이기 때문이다.

[0087]

"폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 본원에서 교환가능하게 사용되며, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기 및/또는 그의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 흔입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 존재하는 경우에 중합체의 어셈블리 이전 또는 이후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에 비-뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 합성 후에 생성된 변형(들), 예를 들어 표지와의 접합을 포함할 수 있다. 다른 종류의 변형은 예를 들어 1종 이상의 천연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 "캡" 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예를 들어 하전되지 않은 연결기 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미레이트, 카르바메이트 등)로 및 하전된 연결기 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형, 매달린 모이어티, 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 웨პ티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 인터칼레이터 (예를 들어, 아크리딘, 솔라렌 등)을 갖는 것, 칠레이트화제 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 봉소, 산화금속 등)을 함유하는 것, 알킬화제를 함유하는 것, 변형된 연결 (예를 들어, 알파 아노머 핵산 등)을 갖는 것 뿐만 아니라 폴리뉴클레오티드(들)의 비변형 형태를 포함한다. 추가로, 당 내에 통상적으로 존재하는 임의의 히드록실 기가 예를 들어 포스포네이트 기, 포스페이트 기로 대체되거나, 표준 보호기로 보호되거나, 추가의 뉴클레오티드에 대한 추가의 연결이 만들어지도록 활성화되거나, 또는 고체 또는 반-고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH가 인산화되거나 또는 아민 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑 기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 또한 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 예를 들어 2'-0-메틸-, 2'-0-알릴, 2'-풀루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, α-아노머 당, 에피머당, 예컨대 아라비노스, 크실로스 또는 틱소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헵톨로스, 비-시클릭 유사체 및 무염기성 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어 메틸 리보시드를 포함하여, 일반적으로 당업계에 공지되어 있는 유사한 형태의 리보스 또는 데옥시리보스 당을 함유할 수 있다. 1개 이상의 포스포디에스테르 연결이 대안적 연결기로 대체될 수 있다. 이를 대안적 연결 기는 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미레이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H 또는 임의로 에테르 (-O-) 연결을 함유하는 치환 또는 비치환 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알딜임)로 교체되는 실시양태를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연결이 동일할 필요는 없다. 상기 기재는 RNA 및 DNA를 비롯하여 본원에 언급된 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[0088]

본원에 사용된 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로, 그러나 반드시는 아니지만, 일반적으로 길이가 약 200개 뉴클레오티드 미만인 짧은, 일반적으로 단일-가닥의, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오티드에 대한 상기 기재는 올리고뉴클레오티드에 동일하고 완전하게 적용가능하다.

[0089]

본원에 사용된 "담체"는 사용되는 투여량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유동물에 비독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학상 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생

리학상 허용되는 담체의 예는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기 산; 아스코르브산을 비롯한 항산화제; 저분자량 (잔기 약 10개 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트란을 비롯한 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물; 퀼레이트화제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈™, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 플루로닉스(PLURONICS)™를 포함한다.

[0090] 용어 "포장 삽입물"은 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기사항, 포장 제품과 함께 조합되는 다른 의약 및/또는 상기 의약의 사용에 대한 경고 등에 대한 정보를 함유하는, 의약의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 지침서를 지칭한다.

[0091] "제약상 허용되는 산"은 제제화되는 농도 및 방식에서 비 독성인 무기 및 유기 산을 포함한다. 예를 들어, 적합한 무기 산은 염산, 과염소산, 브로민화수소산, 아이오딘화수소산, 질산, 황산, 술폰산, 술핀산, 술파닐산, 인산, 탄산 등을 포함한다. 적합한 유기 산은 직쇄형 및 분지쇄 알킬, 방향족, 시클릭, 시클로지방족, 아릴지방족, 헤테로시클릭, 포화, 불포화, 모노, 디- 및 트리-카르복실산, 예를 들어 포름산, 아세트산, 2-히드록시아세트산, 트리플루오로아세트산, 페닐아세트산, 트리메틸아세트산, t-부틸 아세트산, 안트라닐산, 프로판산, 2-히드록시프로판산, 2-옥소프로판산, 프로판디오산, 시클로펜탄프로피온산, 시클로펜탄프로페온산, 시클로펜탄프로피온산, 3-페닐프로피온산, 부탄산, 부탄디오산, 벤조산, 3-(4-히드록시벤조일)벤조산, 2-아세톡시-벤조산, 아스코르브산, 신남산, 라우릴 황산, 스테아르산, 뮤콘산, 만델산, 숙신산, 엠본산, 푸마르산, 말산, 말레산, 히드록시말레산, 말론산, 락트산, 시트르산, 타르타르산, 글리콜산, 글리콘산, 글루콘산, 피루브산, 글리옥살산, 옥살산, 메실산, 숙신산, 살리실산, 프탈산, 팔모산, 팔메산, 티오시안산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 1,2-에탄디술폰산, 2-히드록시에탄술폰산, 벤젠술폰산, 4-클로로벤젠술폰산, 나프탈렌-2-술폰산, p-톨루엔술폰산, 캄포르술폰산, 4-메틸비시클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵تون산, 4,4'-메틸렌비스-3-(히드록시-2-엔-1-카르복실산), 히드록시나프토산을 포함한다.

[0092] "제약상 허용되는 염기"는 이들이 제제화되는 농도 및 방식에서 비-독성인 무기 및 유기 염기를 포함한다. 예를 들어, 적합한 염기는 무기 염기 형성 금속, 예컨대 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 암모늄, 철, 아연, 구리, 망가니즈, 알루미늄, N-메틸글루카민, 모르폴린, 피페리딘, 및 유기 비독성 염기, 예를 들어 1급, 2급 및 3급 아민, 치환된 아민, 시클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지 [예를 들어, $N(R')_4^+$ (여기서, R'는 독립적으로 H 또는 C_{1-4} 알킬, 예를 들어 암모늄, 트리스(Tris)임)], 예를 들어 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 에탄올아민, 2-디에틸아미노에탄올, 트리메타민, 디시클로헥실아민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 히드라바민, 콜린, 베타인, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브로민, 퓨린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘, 폴리아민 수지 등으로부터 형성된 것을 포함한다. 특히 바람직한 유기 비-독성 염기는 이소프로필아민, 디에틸아민, 에탄올아민, 트리메타민, 디시클로헥실아민, 콜린 및 카페인이다.

[0093] 본 발명에 사용할 수 있는 추가의 제약상 허용되는 산 및 염기는 아미노산, 예를 들어 히스티딘, 글리신, 페닐알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 리신 및 아스파라긴으로부터 유래된 것을 포함한다.

[0094] "제약상 허용되는" 완충제 및 염은 상기 지시된 산 및 염기의 산 및 염기 부가 염 둘 다로부터 유래된 것을 포함한다. 구체적인 완충제 및/또는 염은 히스티딘, 숙시네이트 및 아세테이트를 포함한다.

[0095] "제약상 허용되는 당"은 관심 단백질과 조합되는 경우에 저장시에 단백질의 화학적 및/또는 물리적 불안정성을 유의하게 방지하거나 감소시키는 분자이다. 제제가 동결건조 후에 재구성되도록 의도되는 경우에, "제약상 허용되는 당"은 또한 "동결건조보호제"로 알려질 수 있다. 예시적인 당 및 그의 상응하는 당 알콜은 아미노산, 예컨대 일나트륨 글루타메이트 또는 히스티딘; 메틸아민, 예컨대 베타인; 친액성 염, 예컨대 황산마그네슘; 폴리올, 예컨대 3가 또는 보다 높은 분자량의 당 알콜, 예를 들어 글리세린, 텍스트란, 에리트리톨, 글리세롤, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨; 프로필렌 글리콜; 폴리에틸렌 글리콜; 플루로닉스®; 및 그의 조합을 포함한다. 추가의 예시적 동결건조보호제는 글리세린 및 젤라틴, 및 당 멜리비오스, 멜레지토스, 라피노스, 만노트리오스 및 스타키오스를 포함한다. 환원당의 예는 글루코스, 말토스, 락토스, 말툴로스, 이소-말툴로스 및 락툴로스를 포함한다. 비-환원당의 예는 당 알콜 및 다른 직쇄 폴리알콜로부터 선택된 폴리히드록시 화합물의 비-환원 글리코시드를 포함한다. 바람직한 당 알콜은 모노글리코시드, 특히 디사카라이드, 예컨대 락토스, 말토스, 락툴로스 및 말툴로스의 환원에 의해 수득된 화합물이다. 글리코시드 측기는 글루코시드 또는 갈락토시

드일 수 있다. 당 알콜의 추가의 예는 글루시톨, 말티톨, 락토톨 및 이소-말톨로스이다. 바람직한 제약상 허용되는 당은 비-환원당 트레할로스 또는 수크로스이다. 제약상 허용되는 당은 단백질이 저장 동안 (예를 들어, 재구성 및 저장 후) 본질적으로 그의 물리적 및 화학적 안정성 및 완전성을 유지하는 양을 의미하는 "보호량"으로 (예를 들어, 동결건조 전에) 제제에 첨가된다.

[0096] 본원에서 관심 "희석제"는 제약상 허용되고 (인간에 대한 투여에 안전하고 비-독성임), 액체 제제, 예컨대 동결건조 후에 재구성된 제제의 제조에 유용한 것이다. 예시적인 희석제는 멜균수, 주사용 정균수 (BWF1), pH 완충용액 (예를 들어, 포스페이트-완충 염수), 멜균 염수 용액, 링거액 또는 텍스트로스 용액을 포함한다. 대안적 실시양태에서, 희석제는 염 및/또는 완충제의 수용액을 포함할 수 있다.

[0097] "보존제"는 박테리아 활성을 감소시키기 위해 본원에서 제제에 첨가될 수 있는 화합물이다. 보존제의 첨가는 예를 들어, 다용도 (다용량) 제제의 생산을 용이하게 할 수 있다. 가능한 보존제의 예는 옥타데실디메틸벤질암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드 (알킬 기가 장쇄 화합물인 알킬벤질디메틸암모늄 클로라이드의 혼합물) 및 벤제토늄 클로라이드를 포함한다. 다른 유형의 보존제는 방향족 알콜, 예컨대 폐놀, 부틸 및 벤질 알콜, 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 시클로헥산올, 3-펜탄올 및 *m*-크레졸을 포함한다. 본원에서 가장 바람직한 보존제는 벤질 알콜이다.

[0098] 용어 "제약 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과를 보이도록 하는 형태이고 제제가 투여되는 대상에게 허용되지 않은 독성을 보이는 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 의미한다. 이러한 제제는 멜균된다.

[0099] "멜균" 제제는 무균이거나 또는 모든 살아있는 미생물 및 그의 포자가 없다.

[0100] 본원에 사용된 용어 "약"은 이러한 기술 분야의 당업자에게 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 일반적인 오차 범위를 지칭한다. 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 대한 실시양태를 포함(하고 이를 기재)한다.

[0101] 본원 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형은 문맥상 명백하게 다르게 표시하지 않는 한 복수형의 언급을 포함한다. 예를 들어, "항체"에 대한 언급은 하나 내지 다수의 항체 (예컨대, 몰 양)에 대한 언급이고, 당업자에게 공지된 그의 등가물 등을 포함한다.

[0102] 본원에 기재된 본 발명의 측면 및 실시양태는 측면 및 실시양태를 "포함하는 것", 이들로 "이루어진 것", 및 이들로 "본질적으로 이루어진 것"을 포함하는 것으로 이해된다.

III. 본 발명의 조성물 및 방법

[0104] 본 발명은 개체에게 유효량의 본원에 기재된 항-CD83 효능제 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 자가면역 질환 (예컨대, 염증성 장 질환)을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 유효량의 항-CD83 효능제 항체는 개체에서 궤양성 결장염을 치료하거나 예방하기 위해 개체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 유효량의 항-CD83 효능제 항체는 개체에서 크론병을 치료하거나 예방하기 위해 개체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 유효량의 항-CD83 효능제 항체는 개체에서 불확정 결장염을 치료하거나 예방하기 위해 개체에게 투여된다.

[0105] 본원에 기재된 모든 방법과 관련하여, 항-CD83 효능제 항체에 대한 언급은 또한 하나 이상의 이러한 작용제를 포함하는 조성물을 포함한다. 이러한 조성물은 적합한 부형제, 예컨대 제약상 허용되는 부형제 (담체), 예를 들어 완충제, 산, 염기, 당, 희석제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 이들은 당업계에 널리 공지되어 있고, 본원에 기재되어 있다. 본 발명의 방법은 단독으로 또는 다른 통상의 치료 방법과 조합하여 이용될 수 있다.

A. 항-CD83 효능제 항체

[0107] 본 발명의 방법은 항-CD83 효능제 항체를 사용하고, 이 용어는 세포 표면 상에 발현된 CD83에 결합하고, 세포 표면 상에 발현된 CD83 (예컨대, 성숙 수지상 세포의 세포 표면 상에 발현된 CD83)에 대한 결합 후에 CD83에 의해 매개되는 신호 전달을 활성화시키는 항-CD83 항체를 지칭한다. 본원에 기재된 항-CD83 효능제 항체는 하나 이상의 하기 특성을 가질 수 있다: (a) 성숙 수지상 세포에서 MAPK 신호전달의 활성화를 억제함 (예컨대, 성숙 수지상 세포에서 p38 및 CREB 단백질의 인산화의 감소를 유발함); (b) 성숙 수지상 세포에서 mTOR 신호전달의 활성화를 억제함 (예컨대, 성숙 수지상 세포에서 mTOR 단백질의 인산화의 감소를 유발함); (c) 성숙 수지상 세포로부터 하나 이상의 염증유발 시토카인 (예컨대, MCP-1, IL-12p40)의 방출을 억제함; (d) 성숙 수지상 세포로부터 하나 이상의 항염증 시토카인 (예컨대, IL-1ra)의 방출을 억제함; (e) 성숙 수지상 세포 활성화 마커 (예

컨대, CD83, HLA-DR)의 세포 표면 발현의 감소를 유발함; (f) 성숙 수지상 세포에서 하나 이상의 상처 치유 유전자 (예컨대, *vcan*, *spock2*, 및 *fn2*)의 발현을 상향조절함; 및 (g) 자가면역 질환 (예컨대, IBD)을 치료하고/거나 예방함. 항-CD83 효능제 항체의 활성은 시험판내에서 및/또는 생체내에서 측정될 수 있다.

[0108] 항-CD83 항체는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 생성될 수 있고, 본원에 기재된 하나 이상의 효능제 활성에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 실시예 9에 기재된 방법을 참조한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 항-CD83 항체는 인간 CD83의 세포외 영역에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 인간 CD83은 DFSKAGMERAFPLPVTPNPKHLGLVTPHKTELV (서열 1) 서열을 포함한다.

MSRGLQLLLSCAYSLAPATPPEVKVACSEDVDLPCAPWDPQVPYTVSWVKLLEGG
EERMETPQEDHLRGQHYHQKGQNGSFADPNERPYSLKIRNTTSCNSGTYRCTLQDPP
GQRNLSGKVILRVTCGCPAQRKEETFKKYRAEIVLLLALVIFYLTLIIFTCKFARLQSIFP

로부터의 성숙 아미노산

[0110] 일부 실시양태에서, 항-CD83 항체는 QRKEETFKK (서열 2) 의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 특이적으로 결합한다.

[0111] 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 단리된 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항체 단편, 예컨대 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 또는 (Fab')₂이다.

[0112] 일부 실시양태에서, 항-CD83 항체는 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함한다.

[0113] 일부 실시양태에서, 항-CD83 항체는 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 6개의 HVR을 포함한다.

[0114] 일부 실시양태에서, 항-CD83 항체는 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 VH HVR 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 항-CD83 항체는 (a) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 항-CD83 항체는 (a) (i) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열 33으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) (i) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (c) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1개, 적어도 2개, 또는 모든 3개의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

- [0117] 일부 실시양태에서, 항-CD83 항체는 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0118] 일부 실시양태에서, 항-CD83 항체는 인간화 항체이다. 한 실시양태에서, 항-CD83 항체는 임의의 상기 실시양태에서와 같은 HVR을 포함하고, 수용자 인간 프레임워크, 예를 들어 인간 이谬노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크를 추가로 포함한다.
- [0119] 일부 실시양태에서, 서열 30의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함하는 항-CD83 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열과 관련하여 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이 서열을 포함하는 항-CD83 항체는 CD83에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 서열 30에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 발생한다. 임의로, 항-CD83 항체는 서열 30의 VH 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 32의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.
- [0120] 일부 실시양태에서, 서열 36의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항-CD83 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이 서열을 포함하는 항-CD83 항체는 CD83에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 서열 36에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부의 영역에서 (즉, FR에서) 발생한다. 임의로, 항-CD83 항체는 서열 36의 VL 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 38의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 39의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항-CD83 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 30 및 서열 36의 VH 및 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함). 한 실시양태에서, 항체는 서열 29에 나타낸 중쇄 아미노산 서열 및 서열 35에 나타낸 경쇄 아미노산 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함).
- [0122] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 중 어느 하나와 경쟁적으로 인간 CD83에 결합하는 항-CD83 항체가 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 경쟁적 결합은 ELISA 검정을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 서열 30의 VH 서열 및 서열 36의 VL 서열을 포함하는 항-CD83 항체와 경쟁적으로 인간 CD83에 결합하는 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 서열 29에 나타낸 중쇄 아미노산 서열 및 서열 35에 나타낸 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-CD83 항체와 경쟁적으로 인간 CD83에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0123] 항체는 표적 항원 CD83에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체의 Kd는 약 0.05 내지 약 100 nM이다. 예를 들어, 항체의 Kd는 약 100 nM, 약 50 nM, 약 10 nM, 약 1 nM, 약 500 pM, 약 100 pM 또는 약 50 pM 중 임의의 것 내지 약 2 pM, 약 5 pM, 약 10 pM, 약 15 pM, 약 20 pM 또는 약 40 pM 중 임의의 것이다.
- [0124] **B. 항-CD83 효능제 항체의 제조합 제조**
- [0125] 본 발명은 또한 재조합 기술을 이용하는 항-CD83 효능제 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 폴리펩티드는 이러한 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 단리된 핵산, 이러한 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주-세포를 이용하여 제조될 수 있다. 일반적으로 섹션 B 하에 기재된 방법이 항체의 생산에 대해 언급할지라도, 이러한 방법은 또한 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드를 생산하는데 사용될 수 있다.
- [0126] 항체 또는 그의 단편의 재조합 생산을 위해, 원하는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산이 단리되고, 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터에 삽입된다. 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드 프로브로) 용이하게 단리되고, 종래의 절차를 이용하여 서열분석된다. 다수의 클로닝 및/또는 발현 벡터는 상업

적으로 입수 가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 하기: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 다중 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 함유하는 다중 클로닝 부위, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0127] (1) 신호 서열 성분

항체 또는 그의 단편은 직접적으로 뿐만 아니라, 항체가 이종 폴리펩티드, 바람직하게는 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드에 융합된 융합 단백질로서 재조합적으로 생산될 수 있다. 바람직하게 선택된 이종 신호 서열은 진핵 숙주-세포에 의해 인식 및 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 천연 포유동물 신호 서열을 인식하여 프로세싱하지 않는 원핵 숙주-세포의 경우에, 진핵 (예를 들어, 포유동물) 신호 서열은 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, 1pp, 또는 열-안정성 장독소 II 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 원핵 신호 서열에 의해 대체된다. 효모 분비의 경우에, 천연 신호 서열은 예를 들어 효모 인베타제 리더, 인자 리더 (사카로미세스(*Saccharomyces*) 및 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*) 인자 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더, 씨. 알비칸스(*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더, 또는 WO 90/13646에 기재된 신호로 치환될 수 있다. 포유동물 세포 발현시에, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스성 분비 리더, 예를 들어 단순 헤르페스 gD 신호가 이용 가능하다.

[0129] 이러한 전구체 영역에 대한 DNA는 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 DNA에 리딩 프레임으로 라이게이션된다.

[0130] (2) 복제 기점

발현 및 클로닝 벡터는 둘 다 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주-세포 내에서 복제될 수 있게 하는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서 상기 서열이 숙주 염색체 DNA와 무관하게 벡터를 복제할 수 있는 것이고, 복제 기점 또는 자율 복제 서열을 포함한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 널리 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하고, 2 μ 플라스미드 기점은 효모에 적합하며, 다양한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, 수포성 구내염 바이러스 ("VSV") 또는 소 유두종 바이러스 ("BPV"))은 포유동물 세포에서의 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에서는 필요하지 않다 (전형적으로, SV40 기점은 단지 초기 프로모터를 함유하기 때문에 사용될 수 있음).

[0132] (3) 선택 유전자 성분

발현 및 클로닝 벡터는 또한 선택 가능한 마커라고도 알려진 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용할 수 없는 중요 영양분을 공급하는 단백질을 코딩하고, 예를 들어 바실루스의 경우에는 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.

[0134] 선택 계획의 한 예는 숙주-세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이종 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선택 요법에서 생존한다. 이러한 우성 선택 전략의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 사용한다.

[0135] 포유동물 세포에 적합한 선택 가능한 마커의 또 다른 예는 항체- 또는 항체 단편-코딩 핵산을 취하는 세포 성분의 확인을 가능하게 하는 것, 예컨대 디히드로폴레이트 리덕타제 ("DHFR"), 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.

[0136] 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포는 우선 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토트렉세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인한다. 야생형 DHFR에 사용되는 예시적인 숙주-세포 균주는 DHFR 활성이 결핍된 차이니즈 햄스터 난소 ("CHO") 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.

[0137] 포유동물 세포에 적합한 선택 가능한 마커의 또 다른 예는 항체- 또는 항체 단편-코딩 핵산을 취하는 세포 성분의 확인을 가능하게 하는 것, 예컨대 디히드로폴레이트 리덕타제 ("DHFR"), 글루타민 신테타제 (GS), 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.

[0138] 대안적으로, GS (글루타민 신테타제) 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 GS의 억제제인 L-메티오닌 슬록시민 (Msx)을 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이를 조건 하에서, GS 유전자를 임의의 다른 공동-형질전환시킨 핵산과 함께 증폭시킨다. GS 선택/증폭 시스템을 상기 기재된 DHFR 선택/증폭 시스템과 조

합하여 이용할 수 있다.

[0139] 대안적으로, 항-CD83 효능제 항체 또는 그의 단편, 아생형 DHFR 단백질, 및 또 다른 선택가능한 마커, 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스페라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질감염되거나 공동-형질감염된 숙주-세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는, 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418과 같은 적절한 선택가능한 마커에 대한 선택체를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택될 수 있다. 미국 특히 번호 4,965,199를 참조한다.

[0140] 효모에 사용하기 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 *trp1* 유전자이다 (문헌 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979)]). *trp1* 유전자는 트립토판을 함유하는 배지에서 성장하는 능력이 결핍된 효모의 돌연변이체 균주 (예를 들어, ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1)에 대한 선택가능한 마커를 제공한다. 문헌 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)]. 이어서, 효모 숙주-세포 계놈 내의 *trp1* 병변의 존재는 트립토판의 부재 하의 성장에 의해 형질전환을 검출하기에 유효한 환경을 제공한다. 유사하게, Leu2-결핍 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 *Leu2* 유전자를 보유하는 공지된 플라스미드에 의해 보완된다.

[0141] 또한, 1.6 μ m 원형 플라스미드 pKD1로부터 유래된 벡터는 클루이베로미세스 효모의 형질전환에 사용될 수 있다. 대안적으로, 재조합 송아지 키모신의 대규모 생산을 위한 발현 시스템이 케이. 락티스(*K. lactis*)에 대해 보고되어 있다. 문헌 [Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)]. 클루이베로미세스의 산업적 균주에 의한 성숙 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안정한 다중-카페 발현 벡터가 또한 개시되어 있다. 문헌 [Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)].

(4) 프로모터 성분

[0143] 발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 숙주 유기체에 의해 인지되고 항-CD83 효능제 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 원핵 숙주와 함께 사용하기 적합한 프로모터는 *phoA* 프로모터, 락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스파타제 프로모터, 트립토판 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 *tac* 프로모터를 포함하나, 다른 공지된 박테리아 프로모터도 또한 적합하다. 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노(Shine-Dalgarno; S.D.) 서열을 함유할 것이다.

[0144] 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에서 발견되는 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 출발점으로부터 70 내지 80개 염기 상류에 존재하는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 대부분의 진핵 유전자의 3' 말단에는 코딩 서열의 3' 말단에 대한 폴리A 꼬리의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 이러한 모든 서열이 진핵 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[0145] 효모 숙주와 사용하기에 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소, 예를 들어 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포-프룩토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제, 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.

[0146] 효모의 유도성 프로모터는 성장 조건에 의해 제어된 전사를 허용하는 추가의 이점을 갖는다. 예시적인 유도성 프로모터는 알콜 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 연관된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소에 대한 프로모터 영역을 포함한다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다. 또한, 효모 인해서는 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용된다.

[0147] 포유동물 숙주-세포에서 벡터로부터의 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산의 전사는 예를 들어 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 계놈으로부터 수득한 프로모터, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 열-쇼크 유전자 프로모터에 의해 제어될 수 있으며, 단 이러한 프로모터는 원하는 숙주-세포 시스템과 상용성이다.

[0148] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득된다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 시스템이 미국 특히 번호

4,419,446에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형이 미국 특허 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 또한, 단순 헤르페스 바이러스로부터 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포에서 인간 인터페론 cDNA를 발현하는 방법과 관련하여 문헌 [Reyes et al., *Nature* 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복부를 프로모터로 사용할 수 있다.

[0149] (5) 인핸서 요소 성분

고등 진핵생물에 의해 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 DNA를 전사하는 것은 종종, 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 다수의 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α-태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로 당업자는 진핵 바이러스로부터 인핸서를 사용할 것이다. 그 예는 복제 기점의 후측 (bp 100-270)의 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 후측의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인핸서 요소에 대해 문헌 [Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 항체- 또는 항체-단편 코딩 서열에 대한 5' 또는 3' 위치에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터의 5' 부위에 위치 한다.

[0150] (6) 전사 종결 성분

진핵 숙주-세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에 사용되는 발현 벡터는 또한 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 영역은 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 mRNA의 비번역 부분 내의 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 유용한 전사 종결 성분 중 하나는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO94/11026 및 여기에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0151] (7) 숙주-세포의 선택 및 형질전환

본원에 기재된 벡터에서 항-CD83 효능제 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적합한 숙주-세포는 상기 기재된 원핵, 효모 또는 고등 진핵 세포를 포함한다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 유박테리아(eubacteria), 예컨대 그램-음성 또는 그램-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아(Enterobacteriaceae), 예컨대 에스케리키아(Escherichia), 예를 들어 이. 콜라이(*E. coli*), 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라(*Shigella*) 뿐만 아니라 바실루스, 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*) 및 스트렙토미세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 한 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주, 예컨대 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 또한 적합하다. 이들 예는 제한적이기보다는 예시적이다.

전장 항체, 항체 단편 및 항체 융합 단백질은 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않은 경우에, 예컨대 치료 항체가 세포독성제 (예를 들어, 독소)에 접합된 경우에 박테리아에서 생산될 수 있다. 전장 항체는 순환 반감기가 더 길다. 이. 콜라이에서의 생산은 보다 신속하고 보다 비용 효율적이다. 박테리아에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해, 예를 들어 U.S. 5,648,237 (Carter et al.), U.S. 5,789,199 (Joly et al.), 및 U.S. 5,840,523 (Simmons et al.) (발현 및 분비 최적화를 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열을 기재함)을 참조한다. 발현 후에, 항체 또는 항체 단편을 가용성 분획 중 이. 콜라이 세포 페이스트로부터 단리하고, 예를 들어 이소형에 따라 단백질 A 또는 G 칼럼을 통해 정제할 수 있다. 최종 정제는 예를 들어, CHO 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편을 정제하는데 사용된 동일한 과정에 의해 수행할 수 있다.

원핵생물 뿐만 아니라, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모가 또한 항체 또는 항체-단편 코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상적인 제빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 흔하게 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종 및 균주, 예컨대 쉬조사카로미세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로미세스 종, 예컨대 예를 들어 케이. 락티스, 케이. 프라길리스(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178), 케이. 월티이(*K. waItii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(*K.*

drosophilae) (ATCC 36,906), 케이. 씨모톨레란스(*K. thermotolerans*) 및 케이. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 레에시아(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈와니오미세스(*Schwanniomyces*), 예컨대 슈와니오미세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 진균, 예컨대 예를 들어 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*) 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 속주, 예컨대 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 에이. 니거(*A. niger*)가 통상적으로 이용가능하고 본원에서 유용하다. 치료 단백질을 생산하기 위해 효모 및 사상 진균을 사용하는 것에 관한 논의를 검토하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004)]을 참조한다.

[0157] 글리코실화 경로가 "인간화"됨으로써 부분적 또는 완전 인간 글리코실화 경로를 갖는 항체를 생산하는 특정 진균 및 효모 균주가 선택될 수도 있다. 예를 들어 문헌 [Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)] (피키아 파스토리스에서의 글리코실화 경로의 인간화 기재); 및 문헌 [Gerngross et al., 상기 문헌]을 참조한다.

[0158] 글리코실화 항체 또는 항체 단편의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충-세포를 포함한다. 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에데스 아에깁티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (과실파리) 및 봄박스 모리(*Bombyx mori*) (나방)와 같은 숙주로부터의 다수의 바콜로바이러스 균주 및 변이체 및, 및 상응하는 허용 곤충 숙주-세포가 확인되어 있다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주가 공개적으로 이용가능하고, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄박스 모리 NPV의 Bm-5 균주이다. 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해, 본 발명에 따라 본원의 바이러스로서 사용될 수 있다.

[0159] 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물-세포 배양물이 또한 숙주로서 사용될 수 있다.

[0160] 그러나, 척추동물 세포가 가장 흥미롭고, 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식은 상용 절차가 되어 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양 하에 성장하도록 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌 [Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)]; 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)이다.

다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 DHFR⁻ CHO 세포 (문헌 [Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]); 및 콜수종 세포주, 예컨대 NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268]을 참조한다.

[0161] 숙주-세포는 상기 기재된 항체 또는 항체 단편 생산을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시킨 다음, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 종래의 영양 배지에서 배양된다.

[0162] (8) 숙주-세포 배양

[0163] 본원에 기재된 항-CD83 효능제 항체 또는 항체 단편을 생산하는데 사용된 숙주-세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 ((MEM), 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 변형 이글 배지 ((DMEM), 시그마)가 숙주-세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)], 미국 특히 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WIPO 공개 번호 WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특히 Re. 30,985에 기재된 배지들 중 임의의 것을 숙주-세포에 대한 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이를 배지에는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오티드

(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대, 젠타마이신(GENTAMYCIN)™ 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원이 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주-세포와 함께 이전에 이용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0164] (9) 항체의 정제

재조합 기술을 이용하는 경우에, 항-CD83 효능제 항체 또는 항체 단편은 세포내에서 생산되거나, 주변세포질 공간 내에서 생산되거나, 또는 배지 중으로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생산되는 경우에, 제1 단계로서 숙주-세포 또는 용해된 단편으로부터의 미립자 잔해물을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 문헌 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]에는 이. 콜라이의 주변세포질 공간에 분비되는 항체를 단리하는 절차가 기재되어 있다. 간략하게, 약 30분에 걸쳐 나트륨 아세테이트 (pH 3.5), EDTA 및 폐널 메틸суլ포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 세포 페이스트를 해동시킨다. 세포 잔해물은 원심분리로 제거할 수 있다. 항체가 배지 중으로 분비되는 경우에, 일반적으로 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 상업적으로 입수 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 먼저 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

이러한 세포로부터 제조된 항체 또는 항체 단편 조성물은, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 인간 1, 2 또는 4 중쇄를 기초로 한 항체 또는 항체 단편을 정제하기 위해 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 3개의 중쇄 항체 또는 항체 단편에 대해 추천된다 (문헌 [Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용 가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를 들어 제어된 기공 유리 또는 폴리(스티렌-디비닐)벤젠이 아가로스를 사용하여 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유동 속도와 더 짧은 가공 시간을 허용한다. 항체 또는 항체 단편이 C_h3 도메인을 포함하는 경우에, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수할 항체 또는 항체 단편에 따라, 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼 상 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카, 헤파린, 세파로스(SEPHAROSE)™ 또는 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대, 폴리아스파르트산 칼럼) 상 크로마토그래피 뿐만 아니라 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 또한 이용될 수 있다.

임의의 예비 정제 단계 또는 단계들 후에, 관심 항체 또는 항체 단편 및 오염물을 포함하는 혼합물은 pH가 약 2.5-4.5인 용리 완충제를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25 M 염)에서 수행되는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용될 수 있다.

일반적으로, 조사, 시험 및 임상 적용에 사용하기 위한 항체를 제조하는 다양한 방법론이 당업계에 널리 확립되고 있고, 이는 상기-기재된 방법론과 일치하고/거나 관심 대상의 특정한 항체에 대해 당업자에게 인지되는 바와 같다.

C. 항체 제조

본 발명에 유용한 항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 항체 단편 (예를 들어, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 및 F(ab')₂), 키메라 항체, 이중특이적 항체, 다가 항체, 이중접합체 항체, 항체 일부를 포함하는 융합 단백질, 인간화 항체, 및 필요한 특이성의 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 또 다른 변형된 형태의 이뮤노글로불린 분자 (항체의 글리코실화 변이체, 항체의 아미노산 서열 변이체, 및 공유 변형된 항체 포함)를 포함할 수 있다. 항체는 뮤린, 래트, 인간, 또는 임의의 다른 기원일 수 있다 (키메라 또는 인간화 항체 포함).

[0171] (1) 폴리클로날 항체

폴리클로날 항체는 일반적으로 관련 항원 및 아주반트의 다수회의 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 생성시킬 수 있다. 2관능성 작용제 또는 유도체화제, 예를 들어 말레이미도벤조일 슬포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통합), 글루타르알테히드, 숙신산 무수물, SOCl₂, 또는 R¹N=C=NR (여기서, R 및 R¹은 독립적으로 저급 알킬 기임)을 사용하여, 면역화되는 종에 면역원

성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원 (예를 들어, 정제된 또는 재조합 CD83)을 접합시키는 것이 유용할 수 있다. 사용될 수 있는 아주 반트의 예는 프로인트(Freund) 완전 아주반트 및 MPL-TDM 아주반트 (모노포스포릴 지질 A, 합성 트레할로스 디코리노미콜레이트)를 포함한다. 면역화 프로토콜은 과도한 실험 없이 당업자가 선택할 수 있다.

[0173] 예를 들어, 단백질 또는 접합체 100 µg (토끼의 경우) 또는 5 µg (마우스의 경우)을 3 부피의 프로인트 완전 아주반트와 합하고, 상기 용액을 다중 부위에 피내 주사함으로써, 동물을 원하는 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화시킨다. 1개월 후, 프로인트 완전 아주반트에 포함된 웨티드 또는 접합체의 최초 양의 1/5 내지 1/10을 다중 부위에 피하 주사함으로써 상기 동물을 부스팅한다. 7일 내지 14일 후에, 동물에서 채혈하여 혈청의 항체 역가를 분석한다. 역가가 정체기에 도달할 때까지 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 재조합-세포 배양에서 단백질 융합물로서 제조될 수 있다. 또한, 응집체, 예컨대 명반이 면역 반응을 증진시키는데 적합하다.

(2) 모노클로날 항체

[0175] 모노클로날 항체는 실질적으로 동종 항체 집단으로부터 수득한다. 즉, 이러한 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 변역후 변형 (예를 들어, 이성질체화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 개별 항체들의 혼합물이 아닌 것으로서의 항체의 특징을 나타낸다.

[0176] 예를 들어, 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수도 있고, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)으로 제조할 수도 있다.

[0177] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터는 면역화에 사용된 단백질 (예를 들어, 정제된 또는 재조합 CD83)에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 립프구를 도출하기 위해 상기 기재된 바와 같이 면역화된다. 대안적으로, 립프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 적합한 융제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 립프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0178] 면역화제는 전형적으로 항원 단백질 (예를 들어, 정제된 또는 재조합 CD83) 또는 그의 융합 변이체를 포함한다. 일반적으로, 인간 기원의 세포가 요망될 경우에 말초 혈액 립프구 ("PBL")가 사용되거나, 또는 비-인간 포유동물원 공급원이 요망될 경우에 비장 또는 립프절 세포가 사용된다. 이어서, 립프구는 적합한 융제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 불멸화 세포주와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한다. 문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103].

[0179] 불멸화 세포주는 통상적으로, 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 또는 인간 기원의 골수종 세포이다. 통상적으로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 이와 같이 제조된 하이브리도마 세포를, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 시딩하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우에, 하이브리도마의 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이고, 이를 물질은 HGPRT-결핍-세포의 성장을 억제한다.

[0180] 바람직한 불멸화 골수종 세포는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 생산을 지지하고, 배지, 예를 들어 HAT 배지에 민감한 세포이다. 이 중에서, MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 (솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)로부터 입수가능함) 뿐만 아니라 SP-2 세포 및 그의 유도체 (예를 들어, X63-Ag8-653) (아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 (American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 마나사스 소재)으로부터 입수가능함)와 같은 뮤린 골수종 세포주가 바람직하다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 또한 인간 모노클로날 항체 생산과 관련하여 기재되어 있다 (문헌 [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

[0181] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원 (예를 들어, CD83)에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사성면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해

결정한다.

- [0182] 하이브리도마 세포를 배양하는 배양 배지는 원하는 항원 (예를 들어, CD83)에 대해 지시된 모노클로날 항체의 존재에 대해 검정될 수 있다. 바람직하게는, 모노클로날 항체의 결합 친화도 및 특이성은 면역침전 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사성면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정할 수 있다. 상기 기술 및 검정은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 결합 친화도는 문헌 [Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 결정할 수 있다.
- [0183] 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 클론은 제한 회석 절차에 의해 서브클로닝하고 표준 방법 (문헌 [Goding, 상기 문헌])에 의해 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 포유동물에서 종양으로서 생체 내에서 성장시킬 수 있다.
- [0184] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 종래의 이뮤노글로불린 정제 절차, 예컨대 예를 들어, 단백질 A-세파로스 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화성 크로마토그래피 및 상기 기재된 다른 방법에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.
- [0185] 모노클로날 항체가 또한 재조합 DNA 방법, 예컨대 미국 특허 번호 4,816,567에 개시된 방법, 및 상기에 기재한 것과 같은 방법에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 종래의 절차 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드 프로브 사용)를 이용하여 용이하게 단리 및 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 제공된다. 일단 단리되면 DNA는 발현 벡터에 넣을 수 있고, 이는 이어서 재조합 숙주-세포에서 모노클로날 항체를 합성하기 위해 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주-세포, 예컨대 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포에 형질감염시킨다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 종설 문헌은 문헌 [Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) 및 Plueckthun, *Immunol. Rev.* 130:151-188 (1992)]을 포함한다.
- [0186] 특정 실시양태에서, 항체는 문헌 [McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]은 파지 라이브러리로부터의 각각 뮤린 및 인간 항체의 단리를 기재하고 있다. 이후의 간행물은 쇄 셔플링에 의한 고친화도 (나노몰 ("nM") 범위) 인간 항체의 생산 (문헌 [Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]) 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합 감염 및 생체내 재조합 (문헌 [Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)])을 기재하고 있다. 따라서, 이러한 기술은 원하는 특이성의 모노클로날 항체 (예를 들어, CD83에 결합하는 것)의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실용적 대안이다.
- [0187] 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 DNA는 또한 예를 들어 상동성 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환시키거나 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]), 또는 이뮤노글로불린 코딩 서열을 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드의 코딩 서열의 전부 또는 일부와 공유 연결시킴으로써 변형시킬 수 있다. 전형적으로, 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인에 대해 치환되거나 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인에 대해 치환되어, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성한다.
- [0188] 본원에 기재된 모노클로날 항체 (예를 들어, 항-CD83 효능제 항체 또는 그의 단편)는 1가일 수 있으며, 그의 제조법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 한 방법은 이뮤노글로불린 경쇄 및 변형 중쇄의 재조합 발현을 수반한다. 중쇄는 중쇄 가교를 방지하도록 일반적으로 Fc 영역 내의 임의의 지점에서 절단된다. 대안적으로, 관련 시스테인 잔기는 또 다른 아미노산 잔기로 대체되거나 결실되어 가교를 방지한다. 1가 항체를 제조하기 위해 시험관내 방법도 적합하다. 그의 단편, 특히 Fab 단편을 생산하기 위한 항체의 소화는 당업계에 공지된 상용 기술을 이용하여 달성될 수 있다.
- [0189] 또한, 키메라 또는 하이브리드 항체는 가교체의 사용을 포함하는 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 이용하여 시험관내 제조될 수도 있다. 예를 들어, 면역독소는 디슬퍼드-교환 반응을 사용하여 또는 티오에테르 결합을 형성하여 제조할 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르아미데 이트를 포함한다.

[0190] (3) 인간화 항체

[0191] 본 발명의 항체 (예컨대, 항-CD83 효능제 항체) 또는 항체 단편은 인간화 또는 인간 항체를 추가로 포함할 수 있다. 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 인간화 형태는 비-인간 이뮤노글로불린에서 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린 쇄 또는 그의 단편 (예컨대, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 종 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트, 햄스터 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)을 포함한다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열 어느 것에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 것이다. 또한, 인간화 항체는 적어도 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 일부를 최적으로 포함할 것이다. 문헌 [Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988) 및 Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)].

[0192] 비-인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 도입된 1개 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이를 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 본질적으로 원터 (Winter) 및 동료의 방법 (문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)])을 따라 또는 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 대체함으로써 수행할 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 서열이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 전형적으로 인간화 항체는 일부 CDR 잔기 및 아마도 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0193] 인간화 항체의 제조에 사용될 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적-적합" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지의 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 설치류와 가장 근접한 인간 서열은 이어서 인간화 항체의 인간 프레임워크 (FR)로서 허용된다. 문헌 [Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)]. 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정한 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정한 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 여러 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다. 문헌 [Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)].

[0194] 또한, 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 항체를 인간화하는 것이 중요하다. 이 목적을 달성하기 위해서, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3-차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3-차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기가 수용자 및 유입 서열로부터 선택 및 조합되어 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원 또는 항원들 (예를 들어, CD83)에 대한 증가된 친화도가 달성될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기가 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로, 및 가장 실질적으로 관련된다.

[0195] 인간화 항체의 다양한 형태가 고려된다. 예를 들어, 인간화 항체는 면역접합체를 생성시키기 위해서 하나 이상의 세포독성제(들)과 임의로 접합된 항체 단편, 예컨대 Fab일 수 있다. 대안적으로, 인간화 항체는 무손상 항체, 예컨대 무손상 IgG1 항체일 수 있다.

[0196] (4) 인간 항체

[0197] 대안적으로, 인간 항체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 면역화시, 내인성 이뮤노글로불린 생산의 부재 하에 인

간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 키메라 및 배선 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체 생산이 완전히 억제된다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이러한 배선 돌연변이체 마우스에게 전달하면, 항원 접종시에 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,591,669 및 WO 97/17852를 참조한다.

[0198] 대안적으로, 파지 디스플레이 기술을 이용하여 면역화되지 않은 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험판내 생산할 수 있다. 문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991)]. 이러한 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자를 필라멘트형 박테리오파지, 예컨대 M13 또는 fd의 주요 또는 소수의 코트 단백질 유전자로 인-프레임으로 클로닝하고, 파지 입자의 표면 상에 기능적 항체 단편으로서 디스플레이한다. 필라멘트형 입자는 파지 계놈의 단일-가닥 DNA 카페를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성을 기반으로 한 선택에 의해 이러한 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자도 선택된다. 따라서, 파지는 B-세포의 특성의 일부를 모방한다. 파지 디스플레이의 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Curr. Opin Struct. Biol.* 3:564-571 (1993)]에서 검토된 다양한 포맷으로 수행할 수 있다. V-유전자 절편의 여러 공급원이 파지 디스플레이에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 소형 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이가 단리되었다. 본질적으로 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), 또는 Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라, 면역화되지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리가 구축될 수 있고, 다양한 어레이의 항원 (자기-항원 포함)에 대한 항체가 단리될 수 있다. 또한 미국 특허 번호 5,565,332 및 5,573,905를 참조한다.

[0199] 콜(Cole) 등 및 브르너(Boerner) 등의 기술은 또한 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용될 수 있다 (문헌 [Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 및 Boerner et al., *J. Immunol.* 147(1): 86-95 (1991)]). 유사하게, 인간 항체는 트랜스제닉 동물, 예를 들어 내인성 이뮤노글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스에 인간 이뮤노글로불린 유전자좌를 도입하여 제조할 수 있다. 시험 접종 시에, 인간 항체 생산이 관찰되고, 이것은 유전자 재배열, 어셈블리 및 항체 레퍼토리를 포함하여 모든 면에서 인간에서 관찰되는 것과 매우 유사하다. 이러한 접근법은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806, 5,569,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016 및 하기 과학 간행물: 문헌 [Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994), Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996), Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996) 및 Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)]에 기재되어 있다.

[0200] 최종적으로, 인간 항체는 또한 시험판 내에서 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다 (미국 특허 번호 5,567,610 및 5,229,275 참조).

[0201] (5) 항체 단편

[0202] 특정 상황에서는, 전체 항체보다 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 보다 작은 단편 크기는 신속한 제거를 가능하게, 고형 종양에 대한 접근성을 개선시킬 수 있다.

[0203] 항체 단편 생산을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해 소화를 통해 유래된다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Method.* 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 이제 예를 들어 상기 논의된 바와 같이 CD83에 대한 항체를 코딩하는 핵산을 사용하여 재조합 숙주-세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 scFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되어 이로부터 분비될 수 있고, 이에 따라 이들 단편들을 다양으로 간단하게 생산할 수 있다. 이러한 항체 단편은 또한 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따라, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주-세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 $F(ab')_2$ 항체 단편의 생산은 미국 특허 번호 5,869,046에 기재되어 있다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일 쇄 Fv 단

편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894 및 미국 특허 번호 5,587,458을 참조한다. 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 번호 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0204] (6) 이중특이적 및 다중특이적 항체

[0205] 이중특이적 항체 (BsAb)는 동일한 또는 또 다른 단백질 (예를 들어, CD83) 상의 에피토프를 포함하는 적어도 2 개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체이다. 이러한 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, $F(ab')_2$ 이중특이적 항체)으로부터 유래될 수 있다.

[0206] 이중특이적 항체의 제조 방법이 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 제조는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄/경쇄 쌍의 공발현에 기초하고, 여기서 2개의 쇄는 상이한 특이성을 갖는다. 문헌 [Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)]. 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이를 하이브리드 마 (쿼드로마)는 10가지 상이한 항체 분자들의 잠재적 혼합물을 생산하며, 이 중에서 오직 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 이루어지는 올바른 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0207] 다른 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인이 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게는, 융합은 헌지의 적어도 일부, C_H2, 및 C_H3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인에 의한다. 융합체 중 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (C_H1)을 갖는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 원하는 경우에 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 개별 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쇄의 동일하지 않은 비가 최적의 수율을 제공하는 실시양태에서 상기 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비를 조절하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비의 적어도 2종의 폴리펩티드 쇄의 발현으로 높은 수율이 수득되는 경우에, 또는 비가 특별한 유의성을 갖지 않는 경우에, 2종 또는 모든 3종의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0208] 이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치 않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생성하는 것에 관한 추가의 상세한 내용에 대해, 예를 들어 문헌 [Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986)]을 참조한다.

[0209] WO 96/27011 또는 미국 특허 번호 5,731,168에 기재된 또 다른 접근법에 따라, 한쌍의 항체 분자 사이의 계면은 재조합-세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 백분율을 최대화하도록 공학적으로 처리될 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 영역의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "캐비티"가 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종-생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

[0210] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기술은 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질 분해로 절단하여 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이러한 단편을 디티올 작화제인 아비산나트륨의 존재 하에 환원시켜, 이웃자리 디티올을 안정화시키고 분자간 디슬피드 형성을 방지한다. 이어서 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 이어서 Fab'-TNB 유도체 중 하나는 Fab'-TNB 유도체로 재전환되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체를 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

[0211] Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수하고, 화학적으로 커플링시켜 이중특이적 항체를 형성할 수 있다. 문헌 [Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992)]은 완전히 인간화된 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의

생산을 기재한다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내 유도 화학 커플링 반응을 실시한다. 이와 같이 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상 인간 T-세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 릴프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0212] 2가 항체 단편을 재조합-세포 배양물로부터 직접 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되어 있다. 예를 들어, 2가 이중이량체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다. 문헌 [Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 웨티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합체에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 헌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후에 재산화되어 항체 이중이량체가 형성되었다. 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적/2가 항체 단편 제조를 위한 대안적 메카니즘을 제공하였다. 상기 단편은 동일 쇄 상의 2개의 도메인 사이의 쌍 형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 V_L 및 V_H 도메인과 쌍을 이루게 되어, 2개의 항원-결합 부위가 형성된다. 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용한 이중특이적/2가 항체 단편의 다른 제조 전략도 보고된 바 있다. 문헌 [Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0213] 2가 초과의 원자가를 갖는 항체가 또한 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tutt et al., *J. Immunol.*, 147:60 (1991)]. 예시적인 이중특이적 항체는 제시된 분자 (예를 들어, CD83) 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0214] (7) 다가 항체

[0215] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 신속하게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 발명의 항-CD83 항체 또는 항체 단편은 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 (예를 들어, 4가 항체) 다가 항체 (IgM 부류 이외의 것)일 수 있고, 이는 항체의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 용이하게 생산될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 헌지 영역을 포함한다. 이러한 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역의 아미노 말단에 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본원에서 바람직한 다가 항체는 3 내지 약 8개, 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다. 다가 항체는 적어도 1개의 폴리펩티드 쇄 (바람직하게는 2개의 폴리펩티드 쇄)를 포함하고, 여기서 상기 폴리펩티드 쇄 또는 쇄들은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어 폴리펩티드 쇄 또는 쇄들은 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ (여기서, $VD1$ 은 제1 가변 도메인이고, $VD2$ 는 제2 가변 도메인이고, Fc 는 Fc 영역의 1개의 폴리펩티드 쇄이고, $X1$ 및 $X2$ 는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n 은 0 또는 1임)를 포함할 수 있다. 유사하게, 폴리펩티드 쇄 또는 쇄들은 V_H-C_H1 -가요성 링커- V_H-C_H1-Fc 영역 쇄; 또는 $V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc$ 영역 쇄를 포함할 수 있다. 본원에서 다가 항체는 바람직하게는 적어도 2개 (바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 본원에서 다가 항체는 예를 들어 약 2 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 추가로 포함한다.

[0216] (8) 이중접합체 항체

[0217] 이중접합체 항체도 또한 본 발명의 범위에 속한다. 이중접합체 항체는 2개의 공유 연결된 항체로 구성된다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오텐에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키기 위해 제안되었고 (미국 특허 번호 4,676,980), HIV 감염을 치료하기 위해 사용되었다. 국제 공개 번호 WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 0308936. 항체는 가교제를 사용하는 것을 포함하는, 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 이용하여 시험관내 제조될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 디슬피드 교환 반응을 이용하거나 티오에테르 결합을 형성하여 면역독소를 구축할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르아미데이트, 및 예를 들어 미국 특허 번호 4,676,980에 개시된 것을 포함한다. 이중접합체 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제가 당업계에 널리 공지되어 있고, 수많은 가교 기술과 함께 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0218] (9) 이펙터 기능 조작

- [0219] 이펙터 기능을 변형하고/거나 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 본 발명의 항체를 변형하는 것이 바람직할 수도 있다. 예를 들어, 특정 Fc 수용체, 예컨대 Fc γ RI, Fc γ RII 및/또는 Fc γ RIII에 대한 결합 친화도를 제거하거나 감소시키기 위해, 불변 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위를 변형시키거나 돌연변이시킬 수도 있다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능은 항체의 Fc 영역 (예를 들어, IgG의 CH₂ 도메인에서)의 N-글리코실화를 제거함으로써 손상된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능은 PCT WO 99/58572 및 문헌 [Armour et al., *Molecular Immunology* 40: 585-593 (2003); Reddy et al., *J. Immunology* 164:1925-1933 (2000)]에 기재된 바와 같이 인간 IgG의 233-236, 297 및/또는 327-331과 같은 영역을 변형시킴으로써 손상된다.
- [0220] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 5,739,277에 기재된 바와 같이 샐비지 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편)에 혼입시킬 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "샐비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자 (예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)의 생체내 혈청 반감기 증가를 담당하는 상기 IgG 분자의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.
- [0221] (10) 다른 아미노산 서열 변형
- [0222] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형이 고려된다. 예를 들어, 항체 또는 항체 단편의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체 또는 항체 단편의 아미노산 서열 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산 내에 도입함으로써, 또는 웨티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성 (즉, CD83에 결합하거나 또는 이와 물리적으로 상호작용하는 능력)을 갖는다는 조건 하에 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어져 최종 구축물에 도달된다. 아미노산 변화는 또한 항체의 번역후 프로세싱을 변경시킬 수 있으며, 예컨대 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시킬 수 있다.
- [0223] 돌연변이유발의 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells in Science, 244:1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"이다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기의 군이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가장 바람직하게는, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 아미노산과 표적 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 이어서, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치가 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써 개선된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 항체 변이체를 원하는 활성에 대해 스크리닝한다.
- [0224] 아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리웨티드에 이르는 아미노- ("N") 및/또는 카르복시- ("C") 말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기가 있는 항체 또는 세포독성 폴리웨티드에 융합된 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리웨티드가 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것을 포함한다.
- [0225] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체에서는 항체 분자 내의 1개 이상의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된다. 치환 돌연변이유발에 가장 흥미로운 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변경 또한 고려된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제 하에 표 A에 나타낸다. 이러한 치환으로 생물학적 활성이 변하게 되면, 표 A에서 "예시적인 치환"으로 명명된 또는 아미노산 부류와 관련하여 하기에 추가로 기재되는 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물을 스크리닝하게 된다.

[0226]

[표 A]

아미노산 치환

본래의 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 노르류신	leu
Leu (L)	노르류신 ; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	leu

[0227]

[0228]

항체의 생물학적 특성에 있어서의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형태로서, 치환 영역 내의 폴리펩티드 백본의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 기반으로 하기 군으로 분류될 수 있다:

[0229]

(1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0230]

(2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0231]

(3) 산성: asp, glu;

[0232]

(4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0233]

(5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0234]

(6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0235]

비-보존적 치환은 상기 부류의 하나의 구성원을 다른 부류와 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0236]

또한, 항체의 적절한 입체형태 유지에 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기가 일반적으로 세린으로 치환되어 분자의 안정성을 개선시키고 비정상적인 가교를 방지할 수 있다. 반대로 시스테인 결합(들)이 항체에 부가되어 그의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).

[0237]

특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반하였다. 일반적으로, 추가의 개발용으로 선택된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성되는 모 항체에 비해 생물학적 특성이 개선될 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화도 성숙이다. 간략하게, 여러 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6-7개 부위)를 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환이 생성되도록 돌연변이시킨다. 이로써 생성된 항체 변이체를 필라멘트형 파지 입자로

부터 각 입자 내에 패키지된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 응합체로서 1가 방식으로 디스플레이시킨다. 이어서, 과자-디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 이들의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체 및 항원 CD83 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본원에서 상기 기재된 기술에 따른 치환을 위한 후보이다. 일단 이러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 검정에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가의 개발을 위해 선택할 수 있다.

[0238] 항체의 아미노산 변이체의 또 다른 유형은 항체의 원래의 글리코실화 패턴을 변경시킨다. 변경은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키는 것 및/또는 항체에 존재하지 않는 1개 이상의 글리코실화 부위를 부가하는 것을 의미한다.

[0239] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 나타낸다. 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)이 아스파라긴 측쇄로 탄수화물 모이어티를 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중 어느 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시시리신 또한 사용될 수 있다.

[0240] 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 1개 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결 글리코실화 부위의 경우). 변경은 원래의 항체의 서열에 대한 1개 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 또한 달성될 수 있다 (O-연결 글리코실화 부위의 경우).

[0241] 항-IgE 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 제조된다. 이러한 방법은 천연 공급원으로부터의 단리 (자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 항체 또는 항체 단편의 이전에 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0242] (10) 다른 항체 변형

[0243] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 당업계에 공지되고 용이하게 입수 가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적절한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜 및 그의 혼합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착되어 있는 중합체의 수는 달라질 수 있고, 하나 초과의 중합체가 부착되어 있는 경우에, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건 하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고려사항을 기반으로 결정될 수 있다. 상기 기술 및 다른 적합한 제제는 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)]에 개시되어 있다.

[0244] D. 제약 조성물 및 제제

[0245] 본원에 기재된 항-CD83 효능제 항체의 치료 조성물 및 제제는 원하는 정도의 순도를 갖는 활성 성분을 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., (Gennaro, A.R., ed., Lippincott Williams & Wilkins, Publishers, Philadelphia, PA 2000)])와 혼합함으로써 제조될 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E, 메타중아황산나트륨; 보존제, 등장화

제, 안정화제, 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 킬레이트화제, 예컨대 EDTA 및/또는 비-이온성 계면활성제 등을 포함한다.

[0246] 완충제를 이용하여, 특히 안정성이 pH 의존성이 경우에 치료 유효성을 최적화하는 범위로 pH를 제어한다. 완충제는 바람직하게는 약 50 mM 내지 약 250 mM 범위의 농도로 존재한다. 본 발명의 용도에 적합한 완충제는 유기 및 무기 산 둘 다 및 그의 염, 예컨대 시트레이트, 포스페이트, 속시네이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 옥살레이트, 락테이트, 아세테이트를 포함한다. 추가로, 완충제는 히스티딘 및 트리메틸아민 염, 예컨대 트리스를 포함할 수 있다.

[0247] 보존제는 미생물 성장을 저연시키기 위하여 첨가되고, 전형적으로 0.2% - 1.0% (w/v) 범위로 존재한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 보존제는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 할라이드 (예를 들어, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드), 벤제토늄 클로라이드; 티메로살, 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올, 3-펜탄올 및 m-크레졸을 포함한다.

[0248] 때때로 "안정화제"로 공지된 등장화제는 조성물 중 액체의 등장성을 조정하거나 유지하기 위해 존재한다. 큰 하전된 생체분자, 예컨대 단백질 및 항체를 사용하는 경우에, 이들은 아미노산 측쇄의 하전된 기와 상호작용하여 분자간 및 분자내 상호작용의 가능성을 줄일 수 있기 때문에 종종 "안정화제"로 지칭된다. 등장화제는 다른 성분의 상대량을 고려하여, 0.1중량% 내지 25중량%, 보다 바람직하게는 1중량% 내지 5중량%의 임의의 양으로 존재할 수 있다. 바람직한 등장화제는 다가 당 알콜, 바람직하게는 3가 이상의 당 알콜, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다.

[0249] 추가의 부형제는 하기 중 하나 이상의 역할을 할 수 있는 작용제를 포함한다: (1) 벌킹제, (2) 용해도 증진제, (3) 안정화제 및 (4) 변성 또는 용기 벽으로의 부착을 방지하는 작용제. 이러한 부형제는 하기를 포함한다: 다가 당 알콜 (상기 열거됨); 아미노산, 예컨대 알라닌, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 오르니틴, 류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알콜, 예컨대 수크로스, 락토스, 락티톨, 트레할로스, 스타키오스, 만노스, 소르보스, 크실로스, 리보스, 리비톨, 미오이니시토스, 미오이니시톨, 갈락토스, 갈락티톨, 글리세롤, 시클리톨 (예를 들어, 이노시톨), 폴리에틸렌 글리콜; 황 함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타티온, 티옥트산, 나트륨 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 나트륨 티오 술페이트; 저분자량 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 다른 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 모노사카라이드 (예를 들어, 크실로스, 만노스, 프룩토스, 글루코스; 디사카라이드 (예를 들어, 락토스, 말토스, 수크로스); 트리사카라이드, 예컨대 라피노스; 및 폴리사카라이드, 예컨대 텍스트린 또는 텍스트란.

[0250] 비-이온성 계면활성제 또는 세제 (또한 "습윤제"로 공지됨)는 치료제의 가용화를 도울 뿐만 아니라 치료 단백질을 교반-유발 응집에 대해 보호하기 위해 존재한다 (이는 또한 활성 치료 단백질 또는 항체의 변성을 유발하지 않으면서 제제가 전단 표면 스트레스에 노출되는 것을 허용함). 비이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 바람직하게는 약 0.07 mg/ml 내지 약 0.2 mg/ml의 범위로 존재한다.

[0251] 적합한 비-이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 (20, 40, 60, 65, 80 등), 폴리옥사머 (184, 188 등), 폴루로닉® 폴리올, 트리톤(TRITON)®, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르 (트윈®-20, 트윈®-80 등), 라우로마크로콜 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자 오일 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 사용될 수 있는 음이온성 세제는 나트륨 라우릴 술페이트, 디옥틸 나트륨 술포숙시네이트 및 디옥틸 나트륨 술포네이트를 포함한다. 양이온성 세제는 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드를 포함한다.

[0252] 항-CD83 효능제 항체를 포함하는 제약 제제를 생체내 투여용으로 사용하기 위해, 이들은 멸균되어야 한다. 제제는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다. 본원에서 치료 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알에 넣는다.

[0253] 투여 경로는 공지되고 허용되는 방법에 따르고, 예컨대 단일 또는 다중 볼루스 또는 장시간에 걸친 주입에 의해 적합한 방식, 예를 들어 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 병변내 또는 관절내 경로에 의한 주사 또는 주입, 국소 투여, 흡입에 의한 방식 또는 지속 방출 또는 연장-방출 방식이다.

[0254] 본원의 항-CD83 효능제 항체 조성물 및 제제는 또한 치료할 특정한 적응증에 필요한, 바람직하게는 서로 유해 효과를 내지 않는 보완적 활성을 갖는, 하나 초과의 활성 화합물을 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로,

조성물은 세포독성제, 시토카인 또는 성장 억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0255] 또한, 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 일부민 마이크로구체, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 마크로에멀젼 중에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences* 20th Edition, 상기 문헌]에 개시되어 있다.

[0256] 본원에 기재된 단백질 및 항체의 안정성은 비-독성 "수용성 다가 금속 염"의 사용을 통해 증진될 수 있다. 예는 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} 및 Al^{3+} 를 포함한다. 상기 다가 금속 양이온과 수용성 염을 형성할 수 있는 예시적인 음이온은 무기 산 및/또는 유기 산으로부터 형성된 것을 포함한다. 이러한 수용성 염은 물 (20°C) 중에서 적어도 약 20 mg/ml , 대안적으로 적어도 약 100 mg/ml , 대안적으로 적어도 약 200 mg/ml 의 용해도를 갖는다.

[0257] "수용성 다가 금속 염"을 형성하는데 사용될 수 있는 적합한 무기 산은 염산, 아세트산, 황산, 질산, 티오시안산 및 인산을 포함한다. 사용될 수 있는 적합한 유기 산은 지방족 카르복실산 및 방향족 산을 포함한다. 이러한 정의 내의 지방족 산은 포화 또는 불포화 C_{2-9} 카르복실산 (예를 들어, 지방족 모노-, 디- 및 트리-카르복실산)으로 정의될 수 있다. 예를 들어, 이러한 정의 내의 예시적인 모노카르복실산은 포화 C_{2-9} 모노카르복실산 아세트산, 프로프리온산, 부티르산, 발레르산, 카프로산, 에난트산, 카프릴산, 펠라르곤산 및 카프리온산, 및 불포화 C_{2-9} 모노카르복실산 아크릴산, 프로프리올산, 메타크릴산, 크로톤산 및 이소크로톤산을 포함한다. 예시적인 디카르복실산은 포화 C_{2-9} 디카르복실산 말론산, 숙신산, 글루타르산, 아디프산 및 피멘산을 포함하고, 불포화 C_{2-9} 디카르복실산은 말레산, 푸마르산, 시트라콘산 및 메사콘산을 포함한다. 예시적인 트리카르복실산은 포화 C_{2-9} 트리카르복실산 트리카르발릴산 및 1,2,3-부탄트리카르복실산을 포함한다. 추가로, 이러한 정의의 카르복실산은 또한 1 또는 2개의 히드록실기를 포함하여 히드록시 카르복실산을 형성할 수 있다. 예시적인 히드록시 카르복실산은 글리콜산, 락트산, 글리세르산, 타르트론산, 말산, 타르타르산 및 시트르산을 포함한다. 이러한 정의 내의 방향족 산은 벤조산 및 살리실산을 포함한다.

[0258] 본 발명의 캡슐화된 폴리펩티드를 안정화하는 것을 돋기 위해 사용될 수 있는, 통상적으로 이용되는 수용성 다가 금속 염은 예를 들어 하기를 포함한다: (1) 할라이드 (예를 들어, 염화아연, 염화칼슘), 술페이트, 니트레이트, 포스페이트 및 티오시아네이트의 무기 산 금속 염; (2) 지방족 카르복실산 금속 염 (예를 들어, 칼슘 아세테이트, 아연 아세테이트, 칼슘 프로프리오네이트, 아연 글리콜레이트, 락트산칼슘, 아연 락테이트 및 아연 타르트레이트); 및 (3) 벤조에이트 (예를 들어, 아연 벤조에이트) 및 살리실레이트의 방향족 카르복실산 금속 염.

[0259] 항-CD83 효능제 항체를 즉시 방출하거나 ("즉시-방출" 제제), 연장된 기간에 걸쳐 항체를 점진적으로 방출하거나 ("지속-방출", "제어-방출" 또는 "연장-방출" 제제) 또는 대안적 방출 프로파일을 갖는 항-CD83 효능제 항체의 제약 제제가 설계될 수 있다. 제약 제제를 제조하는데 사용된 추가의 물질은 제제의 치료 형태에 따라 (예를 들어, 시스템이 즉시-방출을 위해 설계되는지 또는 지속-, 제어- 또는 연장-방출을 위해 설계되는지 여부) 달라질 수 있다. 특정 변화에서, 지속-방출 제제는 약물 전달 후에 초회 용량을 빠르게 전달하는 즉시-방출 성분을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 지속-방출 제제는 즉시-방출 제제와 조합되어 시스템으로의 약물의 빠른 "속출" 뿐만 아니라 보다 길고 점진적인 방출을 제공할 수 있다. 예를 들어, 코어 지속-방출 제제는 약물을 혼입시키는 고도의 가용성 층으로 코팅될 수 있다. 대안적으로, 지속-방출 제제 및 즉시-방출 제제는 정제의 대안적 층으로 또는 캡슐의 개별 과립 유형으로 포함될 수 있다. 약물 제제의 다양한 유형의 다른 조합이 바람직한 치료 혈장 프로파일을 달성하는데 사용될 수 있다.

[0260] 예시적인 지속-방출 투여량 제제 (문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences* 20th Edition, 상기 문헌]에 논의됨)는 하기를 사용하는 것을 포함하여, 광범위하게 다양한 약물 전달 시스템을 포함할 수 있다: (a) 약물이 중합체성 막에 캡슐화되어, 물이 막을 통해 확산되어 약물이 용해되도록 한 후에 장치 외부로 확산시키는 저장소 시스템; (b) 약물이 중합체성 매트릭스에 혼탁되어 매트릭스 용해물 또는 분해물로서 외부로 확산되는 매트릭스 시스템 (구배 또는 모놀리식); (c) 다양한 방출 특성 (예를 들어, pH-의존성 또는 비-pH-의존성 중합체, 다양한 정도의 수용해도를 갖는 화합물 등)을 갖는 중합체로 코팅된 입자가 단일 캡슐에 함께 전달되는 실시양태를 포함하여, 직경이 1 마이크로미터 (" μm "; 10^{-6} m) 만큼 작은 약물의 입자 (또는 약물 또는 중합체의 입

자)가 중합체성 막에 코팅된 마이크로-캡슐화 또는 코팅된 과립 시스템; (d) 하기를 포함하는, 용매-활성화 시스템: (i) 삼투성 작용제 및 약물이 반-투과성 막에 캡슐화되어 삼투성 구배가 장치 안으로 물을 당기고 상승된 압력이 막의 기공을 통해 약물을 장치 외부로 전달하도록 하는, 삼투압 제어된 장치 (예를 들어, 오로스(OROS)®, 알자 코포레이션(Alza Corp.), 캘리포니아주 마운틴 뷰); (ii) 약물이 중합체에 분산되고/거나 중합체가 약물의 입자 상에 코팅되며, 여기서 중합체는 물과의 접촉시에 팽윤되어 (특정 실시양태에서, 팽윤은 pH-의존성, pH-비의존성 또는 다른 물리적 또는 화학적 특성에 의존성일 수 있음) 약물의 장치 외부로의 확산을 허용하는 히드로겔 팽윤 시스템; (iii) 약물이 물과의 접촉시에 용해되는 성분을 갖는 막에 캡슐화되어 (특정 실시양태에서, 팽윤은 pH-의존성, pH-비의존성 또는 다른 물리적 또는 화학적 특성에 의존성일 수 있음) 약물이 확산되는 막의 기공을 생성하는 미세다공성 막 시스템; (iv) 약물 및 추가의 가용성 성분이 왁스에 분산되어, 물이 가용성 성분을 용해시키는 경우에 시스템으로부터의 약물의 확산이 허용되도록 하는 왁스 매트릭스 시스템; 및 (e) 하기를 포함하는, 중합체성 분해 시스템: (i) 약물이 중합체성 매트릭스로 분산되고, 분해가 무작위 방식으로 중합체 구조 전반에 걸쳐 일어나 약물 방출을 허용하는, 벌크 분해; 및 (ii) 약물이 중합체성 매트릭스에 분산되어 중합체의 표면이 부식됨에 따라 전달되는 표면 부식.

E. 치료 방법

[0261] 본 발명은 개체에게 유효량의 본원에 기재된 항-CD83 효능제 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 자가면역 질환 (예컨대, 염증성 장 질환 (IBD))을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 루푸스 신염, 궤양성 결장염, 베게너병, 염증성 장 질환, 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반증 (TTP), 자가면역 혈소판감소증, 다발성 경화증, 건선, IgA 신병증, IgM 다발신경병증, 중증 근무력증, 혈관염, 당뇨병, 레이노 증후군, 쇼그렌 증후군 및 사구체신염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 개체는 질환 발병기전에서 골수 세포 활성화 (수지상 세포 및 대식세포)와 연관된 자가면역 질환이 발생할 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 개체는 IBD를 앓고 있거나 IBD가 발생할 위험이 있다.

[0262] IBD는 궤양성 결장염 (UC), 크론병 또는 불확정 결장염일 수 있다. 일부 실시양태에서, IBD를 앓고 있는 개체는 IBD의 하나 이상의 징후, 증상 또는 다른 적응증을 경험하고 있거나 경험한 적이 있는 개체 또는 IBD로 진단된 개체이다. IBD를 앓고 있는 개체는 스테로이드-불용성 및/또는 스테로이드 의존성 IBD, 스테로이드-불용성 및/또는 스테로이드 의존성 UC 또는 스테로이드-불용성 및/또는 스테로이드 의존성 크론병을 앓고 있을 수 있다. "스테로이드-불용성" IBD는 스테로이드가 IBD를 앓고 있는 대상체에게 투여되고 있음에도 불구하고 진행되거나 악화된 IBD이다. "스테로이드-의존성" IBD를 앓고 있는 개체는 스테로이드 사용에 의존하고, 임상적 증상의 급성 악화 없이 스테로이드 투여를 점감하거나 중단할 수 없다.

[0263] 항-CD83 항체의 투여는 임상 반응 및/또는 질환 완화를 발생시킬 수 있다. 본원에 사용된 "임상 반응"은 질환의 증상의 개선을 지칭한다. "질환 완화"는 실질적으로 질환의 증상의 증거가 없다는 것을 나타낸다. 임상 반응 또는 질환 완화는 특정 시간 프레임 내에, 길항체로의 치료의 시작으로부터 또는 길항체의 초기 투여로부터 약 8주 내에 또는 약 8주에 달성될 수 있다. 임상 반응은 또한 소정의 기간; 예컨대 ≥ 24 주, 또는 ≥ 48 주 동안 지속될 수 있다. 일부 실시양태에서, IBD와 연관된 체중 감소는 항-CD83 효능제 항체로의 치료에 의해 감소되고/거나 제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-CD83 효능제 항체로의 치료는 점막 손상을 예방하고/거나 IBD를 앓고 있는 개체에서 위장 조직의 상피 복구를 돋는다.

[0264] IBD와 연관된 증상은 복부 통증, 구토, 설사, 혈변 (대변 내의 밝은 적색 혈액) 및 체중 감소를 포함한다. 추가의 시험은 IBD의 진단을 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, 완전 혈액 세포 카운트, 전해질 패널, 간 기능 검사 (LFT), 대변 잠재 출혈 시험, X선 (바륨 관장 및 상부 위장관 조영술 포함), 구불결장경검사, 결장경검사 및 상부 내시경검사가 이용될 수 있다. 당업계에 공지된 다양한 스코어링 시스템이 질환의 중증도를 정량적으로 평가하는데 이용될 수 있다.

[0265] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 활성제 (즉, 항-CD83 효능제 항체)의 적절한 투여량은 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 작용제가 예방적 목적을 위해 투여되는지 또는 치료적 목적을 위해 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 작용제에 대한 반응, 담당의의 판단에 따라 달라질 것이다. 특정한 투여 요법 즉 용량, 시기 및 반복 횟수는 의사에 의해 평가시에 특정한 개체 및 그 개체의 병력에 따라 달라질 것이다. 전형적으로 임상의는 원하는 결과를 달성한 투여량에 도달할 때까지 항-CD83 효능제 항체를 투여할 것이다.

[0266] 본 발명의 방법은 개체에서의 자가면역 질환 (예컨대, IBD)의 증상의 치료, 개선 또는 완화, 또는 자가면역 질환을 앓고 있는 개체의 예후의 개선에 유용하다. 항-CD83 효능제 항체로의 치료 후에 질환을 앓고 있는 개체에

서 삶의 질이 개선될 수 있고, 증상은 감소되거나 제거될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 질환이 발생할 위험이 있는 개체에서 자가면역 질환 (예컨대, IBD)의 발생을 지연시키거나 또는 이를 예방하는데 유용하다. 본원에 기재된 임의의 항-CD83 효능제 항체는 개체에게 투여될 수 있다.

F. 조합 요법

[0268] 본 발명의 방법은 또한 조합된 또는 추가의 치료 단계로서 또는 치료 제제의 추가의 성분으로서, 자가면역 질환 (예컨대, IBD)을 위한 치료의 공지된 방법과 조합될 수 있다. 대안적으로, 상이한 항-CD83 효능제 항체가 조합되어 투여될 수 있다. 선택된 조합 요법의 유형은 질환의 임상 정후에 따라 달라질 것이다.

[0269] 예를 들어, IBD (예컨대, 궤양성 결장염, 크론병 질환 또는 불확정 결장염)는 IBD에 대한 제2 의약과 조합된 항-CD83 효능제 항체의 투여를 포함하는 조합 요법으로 처리될 수 있다. 이러한 제2 의약의 유형은 IBD의 유형, IBD의 중증도, 대상체의 상태 및 연령, 사용되는 제1 의약의 유형 및 용량 등을 비롯한 다양한 요인에 따라 달라진다. 일부 실시양태에서, 제2 의약은 아미노살리실레이트, 코르티코스테로이드, 및 면역억제제 중 하나 이상이다. 일부 실시양태에서, 아미노살리실레이트는 술파살라진, 올살라진, 메살라민, 발살라지드, 및 아사콜 중 하나이다. 일부 실시양태에서, 다중 아미노살리실레이트, 예를 들어 술파살라진 및 올살라진의 조합물이 공-투여된다. 일부 실시양태에서, 코르티코스테로이드는 부데소니드, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 6-메카토피린 (6-MP), 아자티오프린, 메토트렉세이트, 및 시클로스포린일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 의약은 항생제, 예를 들어 시프로플록사신 및/또는 메트로니다졸; 또는 항체-기제 작용제, 예를 들어 인플릭시맙 (레미케이드(Remicade)®)일 수 있다.

[0270] 이들 제2 의약 모두는 서로 조합하여 사용할 수 있거나 또는 그 자체를 제1 의약과 조합하여 사용할 수 있기 때문에, 본원에서 사용된 바와 같은 표현 "제2 의약"은 이것이 각각 제1 의약 이외의 유일한 약물이라는 것을 의미하지 않는다. 따라서, 제2 의약이 1종의 의약일 필요는 없고, 1종 초과의 이러한 약물로 이루어지거나 이것을 포함할 수 있다.

[0271] 본원에 기재된 바와 같은 이들 제2 의약은 일반적으로 이전에 사용되던 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나 또는 지금까지 사용되던 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다. 적어도 이러한 제2 의약을 임의로 사용하는 경우에, 이는 유발되는 부작용을 없애거나 저하시키기 위해, 특히 제1 의약을 이용한 초기 용량을 벗어난 후속 용량에 제1 의약이 존재하지 않았을 경우에 보다 적은 양으로 사용된다.

[0272] 본원에서의 조합 투여는 개별 제제 또는 단일 제약 제제를 이용한 공-투여, 및 어느 한 순서로의 연속 투여 (바람직하게는, 둘 다의 (또는 모든) 활성제가 그의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 데에는 일정 시간 간격이 있음)를 포함한다.

G. 제약 투여량

[0273] 본 발명의 제약 조성물의 투여량 및 바람직한 약물 농도는 고려되는 특정한 용도에 따라 달라질 수 있다. 적절한 투여량 및 투여 경로의 결정은 당업자의 기술 범위 내에 있다. 동물 실험은 인간 요법에 대한 유효 용량의 결정을 위한 신뢰할 수 있는 지침을 제공한다. 유효 용량에 대한 종간 스케일링은 문헌 [Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46]에 제시된 원칙에 따라 수행될 수 있다.

[0274] 본원에 기재된 폴리펩ти드 또는 항체의 생체내 투여의 경우에, 통상적인 투여량은 투여 경로에 따라 1일에 개체의 체중을 기준으로 약 10 ng/kg 내지 약 100 mg/kg 또는 그 초과, 바람직하게는 약 1 mg/kg/일 내지 10 mg/kg/일로 달라질 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우에, 치료될 질환 또는 장애의 중증도에 따라, 원하는 증상 억제가 달성될 때까지 치료가 지속된다.

[0275] 예시적인 투여 요법은 항-CD83 효능제 항체 약 2 mg/kg의 초기 용량을 투여한 다음, 격주로 약 1 mg/kg의 주간 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 의사가 달성하고자 하는 약동학적 봉괴의 패턴에 따라 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 예를 들어, 1주에 1 내지 21회의 개체의 투여가 본원에서 고려된다. 특정 실시양태, 약 3 μg/kg 내지 약 2 mg/kg (예컨대, 약 3 μg/kg, 약 10 μg/kg, 약 30 μg/kg, 약 100 μg/kg, 약 300 μg/kg, 약 1 mg/kg, 및 약 2/mg/kg)의 투여 범위가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여 빈도는 1일에 3회, 1일에 2회, 1일에 1회, 2일에 1회, 1주에 1회, 2주에 1회, 4주에 1회, 5주에 1회, 6주에 1회, 7주에 1회, 8주에 1회, 9주에 1회, 10주에 1회, 또는 1개월에 1회, 2개월에 1회, 3개월에 또는 보다 긴 기간에 1회이다. 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다. 항-CD83 효능제 항체의 투여를 포함하는 투여 요법은

사용되는 용량과는 독립적으로 시간 경과에 따라 달라질 수 있다.

[0278] 특정한 항-CD83 효능제 항체에 대한 투여량은 항-CD83 효능제 항체의 하나 이상의 투여를 받은 개체에서 경험적으로 결정될 수 있다. 개체는 항-CD83 효능제 항체의 증가하는 용량을 제공받는다. 항-CD83 효능제 항체의 효능을 평가하기 위해, 자가면역 질환 (예컨대, IBD)의 임상적 증상이 모니터링될 수 있다.

[0279] 본 발명의 방법에 따른 항-CD83 효능제 항체의 투여는, 예를 들어 수용자의 생리학적 상태, 투여의 목적이 치료 또는 예방인지의 여부, 및 숙련된 진료의에게 공지된 다른 요인에 따라, 연속적 또는 간헐적일 수 있다. 항-CD83 효능제 항체는 예를 들어 자가면역 질환 (예컨대, 궤양성 결장염 및 크론병)의 발생 동안 또는 그 후에 미리 선택된 기간에 걸쳐 본질적으로 연속적일 수 있거나 또는 일련의 이격된 용량일 수 있다.

[0280] 특정한 투여량 및 전달 방법에 관한 지침은 문헌에 제공되어 있고; 예를 들어 미국 특허 번호 4,657,760; 5,206,344; 또는 5,225,212를 참조한다. 상이한 제제가 상이한 치료법 및 상이한 장애에 효과적일 수 있으며, 특정 기관 또는 조직을 치료하기 위한 투여가 다른 기관 또는 조직에 대한 것과 상이한 방식으로의 전달을 필요로 할 수 있다는 것은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 또한, 투여량은 1회 이상의 개별 투여에 의해, 또는 연속 주입에 의해 투여될 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우에, 상태에 따라 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 치료를 지속한다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

H. 제제의 투여

[0282] 재구성된 제제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 본 발명의 제제 (예를 들어, 항-CD83 효능제 항체의 제제)는 항-CD83 효능제 항체로의 치료를 필요로 하는 개체, 바람직하게는 인간에게, 공지된 방법에 따라, 예를 들어 볼루스와 같은 정맥내 투여, 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척수강내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 투여된다.

[0283] 바람직한 실시양태에서, 상기 제제는 개체에게 피하 (즉, 피부 아래) 투여에 의해 투여된다. 이러한 목적을 위해, 제제는 시린지를 이용하여 주사될 수 있다. 그러나, 주사 장치 (예를 들어, 인젝트-이즈(INJECT-EASE)TM 및 젠젝트(GENJECT)TM 장치); 주사기 펜 (예를 들어, 젠펜(GENPEN)TM); 자동-주사기 장치, 무바늘 장치 (예를 들어, 메디젝터(MEDIJECTOR)TM 및 바이오젝터(BIOJECTOR)TM) 및 피하 패치 전달 시스템과 같은 상기 제제의 투여를 위한 다른 장치를 이용할 수 있다.

[0284] 항-CD83 효능제 항체의 적절한 투여량 ("유효량")은, 예를 들어 치료되는 상태, 상태의 중증도 및 경과, 항-CD83 효능제 항체가 치료 또는 예방 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항-CD83 효능제 항체에 대한 반응, 사용되는 항-CD83 효능제 항체의 유형, 및 담당의의 판단에 따라 달라질 것이다. 항-CD83 효능제 항체는 적합하게는 환자에게 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 투여되고, 환자에게 진단 이후 임의의 시점에 투여될 수 있다. 항-CD83 효능제 항체는 단독 치료로서 또는 자가면역 질환 (예컨대, IBD)을 치료하는데 유용한 다른 약물 또는 요법과 조합된 조합 요법의 일부로서 투여될 수 있다.

[0285] 항-CD83 효능제 항체의 경우에, 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg이 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의해서든 아니든 개체에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0286] 항-CD83 효능제 항체 제제의 용도는 자가면역 질환 (예컨대, IBD)의 치료 또는 예방을 포함한다. 치료될 질환의 중증도에 따라, 치료 유효량 (예를 들어, 약 1 mg/kg 내지 약 15 mg/kg)의 항-CD83 효능제 항체가 개체에게 투여된다.

I. 제조품 및 키트

[0288] 또 다른 측면에서, 항-CD83 효능제 항체 제제를 함유하며 바람직하게는 본 발명의 방법에서 그의 사용을 위한 지침을 제공하는 제조품 또는 키트가 제공된다. 따라서, 특정 실시양태에서, 제조품 또는 키트는 개체에게 유효량의 항-CD83 효능제 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 자가면역 질환, 예컨대 IBD (궤양성 결장염 및 크론병 포함)를 치료하거나 예방하는 방법에서 항-CD83 효능제 항체의 사용에 대한 지침을 포함한다. 특정 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0289] 제조품 또는 키트는 추가로 용기를 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알 (예를 들어, 이중 챔버 바이알), 시린지 (예를 들어, 단일 또는 이중 챔버 시린지) 및 시험 튜브를 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 제제를 보유한다. 제조품 또는 키트는 라벨 또는 포

장 삽입물을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 용기 상에 있어나 이와 연관되고, 재구성을 위한 안내 및/또는 제제의 사용을 나타낼 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 제제가 개체에서 자가면역 질환 (예컨대, IBD)을 치료하거나 예방하기 위한 피하 또는 다른 방식의 투여에 적합하거나 이를 의도한다는 것을 추가로 나타낼 수 있다. 제제를 보유하는 용기는 단일-사용 바이알 또는 재구성 제제의 반복 투여 (예를 들어, 2-6회 투여)를 가능하게 하는 다중-사용 바이알일 수 있다. 제조품 또는 키트는 적합한 희석제 (예를 들어, BWFI)를 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 희석제 및 동결건조된 제제의 혼합시에, 재구성된 제제에서의 최종 단백질, 폴리펩티드 또는 수분자 농도는 일반적으로 적어도 50 mg/ml일 것이다. 제조품 또는 키트는 상업적, 치료적 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지, 및 사용 지침서가 있는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다.

[0290] 본원의 제조품 또는 키트는 제2 의약을 포함하는 용기를 추가로 포함하고, 여기서 항-CD83 효능제 항체가 제1 의약이며, 상기 제조품은 환자를 유효량의 제2 의약으로 치료하기 위한 포장 삽입물 상의 지침서를 추가로 포함한다. 제2 의약은 임의의 상기 기재된 것일 수 있으며, 예시적인 제2 의약은 항-CD83 항체가 IBD를 치료하기 위해 사용되는 경우에 아미노살리실레이트, 경구 코르티코스테로이드, 6-메르캅토퓨린 (6-MP) 및 아자티오프린이다.

[0291] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 자동-주사기 장치로 투여하기 위한 본원에 기재된 제제를 포함하는 제조품 또는 키트를 제공한다. 자동-주사기는 활성화시에 환자 또는 투여자로부터 추가로 필요한 작용없이 그의 내용물을 전달할 수 있는 주사 장치로 설명될 수 있다. 이들은 특히, 전달 속도가 일정하여야 하고 전달 시간이 수분보다 긴 경우에 치료 제제의 자기-투여에 적합하다.

[0292] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 보다 자세하게 이해될 것이다. 그러나 이들 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본 명세서 전반에서 모든 인용문헌은 명백하게 본원에 참고로 포함된다.

[0293] 실시예

[0294] CD83은 성숙 수지상 세포 (DC)의 표면 상에서 주로 발견되는 Ig 슈퍼페밀리의 잘-보존된 유형-1 막 단백질이다. 가용성 CD83은 면역억제 활성을 나타내지만, DC 및 그의 추정 리간드에 대한 CD83의 기능은 알려지지 않은 상태로 남아있다. 본 발명자들은 DC에 대한 항염증 효과를 도출하는 CD83 동형 상호작용을 확인하였다. DC 성숙 동안 가용성 CD83 또는 항-CD83 항체로의 처리는 표면 활성화 마커의 감소된 발현 및 염증유발 시토카인, 예컨대 IL-12p40의 분비를 유발하였다. 표면 CD83 발현의 녹다운, 또는 세포질 영역의 말단절단은 CD83 처리에 대한 반응을 폐지하였으며, 이는 CD83 동형 상호작용이 염증의 억제를 매개한다는 것을 입증한다. CD83 처리에 따른 이러한 억제의 하류 MAPK 및 mTOR 신호전달 기능은 표면 활성화 마커 발현 및 IL-12p40 생산에 필요한 mTOR 및 p38 α 의 인산화를 억제한다. 점막 표면에서 CD83을 과다발현하는 마우스가 결장염에 대해 보다 저항성이어서 체중 유지 및 감소된 혈청 시토카인 수준이 나타나는 바와 같이, CD83 면역억제가 내병성과 면역성 사이의 균형을 유지하는데 중요하다. 따라서, CD83 동형 상호작용은 DC 면역 반응을 조절하여 부적절한 염증을 방지하고 내병성을 촉진한다.

[0295] 실시예 1. CD83은 세포 표면에서의 동형 결합에 관여한다

[0296] 가용성 CD83이 세포 표면 상에서 발현된 CD83에 결합하는지를 결정하기 위해, 아미노산 서열:

```
TPEVKVACSEDVDLPCATPWDPQVPTYVS WVKLLEGGEERMETPQEDHLRGQHYH  
QKGQNGSFDAPNERPYSLKIRNTTSCNSGTYRCTLQDPDGQRNLSGKVILRVTCGPA  
QRKEETFKKYGRAQVTDKAAHYTLCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열 3)
```

을 포함하는 CD83.fc를 생산하고,

[0297] CHO 세포 상에서 안정하게 발현된 인간 CD83 (CHO-hCD83) 또는 MUTZ-3 유래 성숙 수지상 세포 (mDC) 상에서 발현된 내인성 CD83에 결합하는 그의 능력에 대해 검정하였다. 안정한 CHO-hCD83 세포주의 생산을 위한 발현 벡터를 생성하기 위해, N-말단 HIS-태그 부착된 인간 CD83 (hCD83)을 코딩하는 DNA 단편을 네오마이신-내성 플라스미드, pRKneo (문헌 [Crowley et al., Proc Natl Acad Sci USA., 90(11):5021-5025, 1993])에 XbaI 및 XhoI 부위에서 클로닝하여 hCD83.pRKneo를 생산하였다. CHO 세포를 퓨진(Fugene) (로슈(Roche))을 사용하여 hCD83.pRKneo로 형질감염시키고, 상위 10%의 CD83 양성 세포를 FACS에 의해 분류한 후에 G418 (400 ug/ml; 킵

코(GIBCO)로 선택하여 안정한 CHO-hCD83 세포주를 생성하였다. MUTZ-3 세포로부터 미성숙 DC (iDC)를 발생시키기 위해, 세포를 150 ng/ml rhGM-CSF 및 50 ng/ml rhIL-4를 함유하는 MEM α + 글루타맥스/20% 열-불활성화 FBS에서 6일 동안 배양하였다. DC를 CD83의 표면 발현을 위해 25 ng/ml rhIL-1β, 100 ng/ml rhIL-6, 50 ng/ml rhTNF α 및 1 μg/ml PGE-2를 함유하는 시토카인 칵테일로 성숙시켰다.

[0298] CHO-hCD83 세포 및 MUTZ-3 유래 mDC 상에서의 CD83 발현은, CD83에 형광색소 접합된 항체로 세포를 염색하고 팩스디바(FACSDiva) 소프트웨어 (벤톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하는 LSR II 유동 세포측정법 상에서 유동 세포측정법에 의해 세포를 분석하여 확인하였다. 표지된 동위원소-매치 항체를 사용하여 비-특이적 염색의 수준을 결정하였다. 플로우조(FlowJo) v.8.4.5를 이용하여 총 결합을 보여주는 데이터 분석 및 히스토그램의 구축은 CD83이 안정하게 형질감염된 CHO-hCD83 세포 (흑색선)의 표면 상에서 발현되었으나 대조군 CHO 세포 (파선) 상에서는 발현되지 않았다는 것을 입증하였다 (도 1a). CD83이 MUTZ-3 유래 mDC (흑색선) 상에서 발현되었으나, iDC (회색선) 상에서는 매우 낮은 수준이었다 (도 1b). 충전된 히스토그램은 이소형 대조군을 나타낸다. 세포 표면 CD83 발현의 확인 후에, CHO 세포 및 CHO-hCD83 세포를 4% PFA에서 5분 동안 고정한 다음 냉각시킨 1XPBS로 세척하였다. 세포를 PBS/2%BSA/2mM EDTA를 함유하는 FACS 완충제에 재현탁시키고, 1 μg PE-표지된 CD83.Fc 또는 표지된 IgG.Fc 대조군 단백질과 얼음 상에서 30분 동안 암실에서 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 완충제로 세척하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. iDC 및 mDC의 경우에, 세포를 10 μg/ml PE-표지된 CD83.Fc 또는 표지된 IgG.Fc 대조군 단백질로 표지한 후에 고정 및 유동 세포측정법을 수행하였다. 데이터 분석은 CD83.fc가 CHO-hCD83 (흑색선)에 결합하였으나, 대조군 CHO 세포 (파선)에는 결합하지 않았다는 것을 입증하였다 (도 1c). 또한, CD83.fc는 성숙 DC (흑색선)에 결합하였으나 미성숙 DC (회색선)에는 결합하지 않았다 (도 1d). 이러한 결과는 가용성 CD83.fc가 세포 표면 상에서 CD83을 발현하는 세포에 특이적으로 결합한다는 것을 입증한다.

[0299] 세포 표면 CD83이 CD83.fc 결합에 필요한지 확인하기 위해, CHO-hCD83 세포를 1 μg/ml 항-CD83 항체 (HB15e; 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology))와 인큐베이션하여 이것이 CD83.fc 결합을 차단하는지 결정하였다. 데이터 분석은 CD83.fc가 CHO-hCD83 세포 (흑색선)에 결합하지만, 이 결합이 HB15e (파선)에 의해 차단되며 이소형 대조군 (회색선)에 의해서는 차단되지 않는다는 것을 입증하였다 (도 2a). CD83.fc 결합을 위한 CD83 발현에 대한 필요를 CD83을 발현하는 MUTZ-3 유래 DC에서 추가로 검증하였다. MUTZ-3 iDC를 150 ng/ml rhGM-CSF 및 50 ng/ml rhIL-4를 함유하는 MEM α + 글루타맥스/20% 열-불활성화 FBS에서 배양한 후에 액셀(Accell) siRNA 표적화 CD83 (카탈로그 번호 E-012680; 다마콘(Dharmacon)) 또는 비-표적화 대조군 (카탈로그 번호 D-001910; 다마콘)으로 4일 동안 형질감염시켰다. MUTZ-3 iDC를 10 uM siRNA를 함유하고 3% 열-불활성화 FBS, 150 ng/ml GM-CSF 및 50 ng/ml IL-4가 보충된 액셀 전달 배지 (카탈로그 번호 B-005000; 다마콘)에서 72시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 인큐베이션하였다. 제7일에, DC를 상기 기재된 바와 같이 성숙 자극으로 처리하여 mDC를 생산하였다. CD83 RNA의 siRNA 매개 녹다운 및 단백질 발현의 효능을 각각 택팬 qPCR 뿐만 아니라 전세포 용해물의 웨스턴 블로트에 의해 평가하였다. 18S에 대해 정규화된 비-표적화 대조군 siRNA (siNTC) 또는 CD83에 특이적인 siRNA (siCD83)로 처리된 MUTZ-3 mDC로부터의 전체 RNA의 분석은 CD83 siRNA로 형질감염된 DC가 CD83 RNA 수준의 유의한 하향조절을 나타내었다는 것을 입증하였다 (도 2b). MUTZ-3 mDC에서 CD83의 녹다운은 CD83에 형광색소 접합된 항체로 세포를 염색하고 유동 세포측정법에 의해 세포를 분석하여 확인하였다. 전체 결합을 보여주는 데이터 분석 및 히스토그램의 구축은 CD83이 siNTC로 처리된 mDC (흑색선)의 표면 상에서 발현되었으나, iDC (회색선) 또는 siCD83으로 처리된 성숙 DC (파선) 상에서는 발현되지 않았다는 것을 입증하였다 (도 2c). 충전된 히스토그램은 이소형 대조군을 나타낸다. CD83 발현의 녹다운을 확인한 후에, iDC, siNTC mDC 및 siCD83 mDC를 상기 기재된 바와 같이 PE-표지된 CD83.Fc 또는 표지된 IgG.Fc 대조군 단백질과 인큐베이션하고, 유동 세포측정법에 적용하였다. 데이터 분석은 CD83.fc가 siNTC mDC에 결합하였으나 iDC 또는 siCD83 mDC에는 결합하지 않았다는 것을 입증하였고, 이는 성숙 DC에 대한 CD83.fc 결합이 CD83 발현에 필요하다는 것을 의미한다 (도 2d). CD83의 녹다운은 또한 MHCII의 감소된 발현을 발생시켰으나, CD86과 같은 다른 활성화 마커는 변화가 없었다 (도 2e 및 f).

[0300] CD83이 동형 결합을 통해 세포 대 세포 부착을 매개하는지 결정하기 위해, 세포 응집을 hCD83을 발현하는 CHO 세포에서 검증하였다. CHO 세포 및 CHO-hCD83 세포를 2mM EDTA로 플라스크로부터 분리하고, 세척하고, 2% FBS/10mM EDTA를 함유하지만 Ca²⁺ 또는 Mg²⁺는 결핍된 HBSS 배지에 재현탁시켰다. 이후에 세포를 10⁶ 개/ml로 재현탁시키고, 70 μm 필터를 통해 통과시켜 저부착성 10 cm 배양 디ッシュ 상의 플레이팅을 위한 단일 세포 혼탁액을 수득하였다. 오비탈 플랫폼 진탕기에서 90분 동안 37°C에서 인큐베이션 후에, 세포를 4% PFA로 고정하여 세포 응집을 평가하였다. 세포의 혼미경검사 영상화는 CD83 발현이 결핍된 대조군 CHO 세포는 응집되지 않지만,

hCD83을 발현하는 CHO-hCD83 세포는 혼탁액 배양 동안 클러스터를 형성하였다는 것을 입증하였다 (도 3a 및 b). CHO-hCD83 세포의 1 μ g CD83.fc 단백질로의 예비-처리는 응집을 차단한 반면, Ig 대조군으로의 처리는 차단하지 않았다 (도 3c 및 d). 이러한 결과는 CD83의 표면 발현이 세포 대 세포 부착에 충분하고, 이러한 상호작용이 가용성 CD83의 첨가에 의한 동형 결합에 대한 경쟁으로 인해 차단될 수 있다는 것을 입증한다.

[0301] 실시예 2. DC의 가용성 CD83 처리는 DC 성숙 및 염증유발 시토카인 방출을 억제함으로써 항염증 표현형을 발생시킨다.

[0302] 가용성 CD83 처리에 의해 DC에서 유발된 면역 반응을 특성화하기 위해, mDC 표면 활성화 마커에 대한 CD83 처리의 효과를 평가하였다. MUTZ-3 세포로부터 iDC를 발생시키기 위해, 세포를 150 ng/ml rhGM-CSF 및 50 ng/ml rhIL-4를 함유하는 MEM α + 글루타맥스/20% 열-불활성화 FBS에서 6일 동안 배양하였다. iDC를 25 ng/ml rhIL-1 β , 100 ng/ml rhIL-6, 50 ng/ml rhTNF α 및 1 μ g/ml PGE-2를 함유하는 성숙 자극 시토카인 칙테일로 처리하였다. 10 μ g/ml CD83.fc, 1 μ g/ml HB15e, 또는 대조군 IgG.fc로의 mDC의 처리를 성숙 자극과 동시에 수행하였다. MUTZ-3 유래 mDC 상에서의 세포 표면 활성화 마커, CD83 및 HLA-DR (MHCII)의 발현을 CD83 또는 MHCII에 형광색소 접합된 항체로 세포를 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 세포를 분석하여 조사하였다. 표지된 이 소형-매치 항체를 사용하여 비-특이적 염색의 수준을 결정하였다. 전체 결합을 보여주는 데이터 분석 및 히스토그램의 구축은 CD83 및 MHCII가 MUTZ-3 유래 mDC (흑색선) 상에서 발현되었으나, iDC (줄 표시된 충전된 히스토그램) 상에서는 매우 낮은 수준이었다는 것을 입증하였다 (도 4). 줄 표시되지 않은 충전된 히스토그램은 이 소형 대조군을 나타낸다. CD83 및 MHCII 둘 다의 발현이 CD83.fc (회색선) 또는 HB15e (파선) 처리에서 감소되었으며, 이는 CD83 처리가 mDC에서 표면 활성화 마커의 발현을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0303] DC가 시토카인의 생산을 통해 면역 반응을 조절하는 것으로 알려져 있으므로, DC에 대한 가용성 CD83 처리의 효과를 처리된 인간 단핵구-유래 DC (MDDC)로부터의 시토카인 분비의 검출에 의해 평가하였다. MDDC를 다중 공여자의 전혈로부터 단리하고, 시토카인으로 자극하여 CD83.Fc 또는 HB15e의 부재 또는 존재 하에 성숙을 유도하였다. 단리 및 처리를 위해, 인간 전혈을 PBS로 희석하고, 피콜 히스토파크(Ficoll histopaque) (지이 헬스케어 (GE healthcare)) 상에 적층하고, 1500 rpm에서 30분 동안 회전시켰다. 백혈구 층을 분리하고, PBS로 세척하였다. 단핵구를 인간 단핵구 단리 키트 II (밀테니(Miltenyi))로 단리하고, 6일 동안 125 ng/ml rhIL-4 및 50 ng/ml rhGM-CSF (R&D 시스템즈(R&D systems))를 함유하는 RPMI/10% FBS/1X 페닐실린/스트렙타비딘에서 배양하였다. 배지를 격일로 교환하여 미성숙 DC를 유도하였다. 10 μ g/ml CD83.Fc 또는 1 μ g/ml 항-CD83 항체 (HB15e; 산타 크루즈)로의 모든 처리는 성숙 자극과 동시에 수행하였다. 세포 배양 상청액을 DC의 성숙 48시간 후에 수집하고, 분비된 시토카인을 표준 제조업체 지침에 따라 MCP-1, IL-12p40 및 IL-8 (인비트로젠 (Invitrogen)) 뿐만 아니라 IL-1ra (셀 사이언시스(Cell Sciences)) 검출을 위한 키트를 사용하여 ELISA에 의해 분석하였다. DC에 의해 분비된 시토카인의 분석은 CD83.Fc로의 처리가 성숙 자극과 함께 IL-1 수용체에 결합하여 하류 염증성 신호전달을 차단하는 인터류킨-1 수용체 길항제 (IL-1Ra)를 증가시키고 (도 5b), 염증유발 시토카인 단핵구 화학주성 단백질-1 (MCP-1) 및 인터류킨-12의 서브유닛 베타 (IL-12p40)의 생산을 감소시킴으로써 (도 5a 및 c) DC 시토카인 분비를 변경시켰다는 것을 입증하였다. CD83.Fc 또는 HB15e로의 처리는 염증성 시토카인 IL-8의 생산에 영향을 미치지 않았다 (도 5d).

[0304] 가용성 CD83 처리에 의해 DC에서 유발된 면역 반응을 추가로 특성화하기 위해, mDC에 의한 염증유발 시토카인 분비에 대한 CD83 처리의 효과를 평가하였다. MUTZ-3 세포로부터 미성숙 DC를 발생시키기 위해, 세포를 150 ng/ml rhGM-CSF 및 50 ng/ml rhIL-4를 함유하는 MEM α + 글루타맥스/20% 열-불활성화 FBS에서 6일 동안 배양하였다. DC를 CD83의 표면 발현을 위해 25 ng/ml rhIL-1 β , 100 ng/ml rhIL-6, 50 ng/ml rhTNF α 및 1 μ g/ml PGE-2를 함유하는 시토카인 칙테일로 성숙시켰다. 10 μ g/ml CD83.fc, 1 μ g/ml HB15e, 또는 대조군 IgG.fc로의 mDC의 처리를 성숙 자극과 동시에 수행하였다. 세포 배양 상청액을 DC의 성숙 48시간 후에 수집하고, 분비된 시토카인을 표준 제조업체 지침에 따라 MCP-1, IL-12p40 및 IL-8 키트 (인비트로젠) 뿐만 아니라 IL-1ra (셀 사이언시스)를 사용하여 ELISA에 의해 분석하였다. DC에 의해 분비된 시토카인의 분석은 염증유발 시토카인 MCP-1 (도 6a) 및 IL-12p40 (도 6c)이 CD83.fc 또는 HB15e 처리시에 mDC에서 감소하였다는 것을 입증하였다. 대조적으로, 항염증 시토카인 IL-1ra는 CD83 처리된 mDC에서 유의하게 증가하였다 (도 6b). 방출된 IL-8의 수준은 CD83 처리된 또는 대조군 처리된 mDC 사이에 차이가 없다는 것을 입증하였다 (도 6d). 각각의 웰로부터의 상청액에 대해 3회 수행하였고, *는 값이 유의한 차이가 있다는 것을 나타낸다 (*p<0.01, **p<0.001). 각각의 점은 개별 웰의 평균을 나타낸다. 그래프는 적어도 3회의 독립적인 실험을 대표한다.

[0305] CD83.fc 또는 HB15e로 처리된 DC의 항염증 표현형의 발현을 추가로 특성화하기 위해, 마이크로어레이 분석을 처리 후에 DC로부터 단리된 RNA 상에서 수행하였다. 마이크로어레이의 통계적 분석을 R 프로젝트 (<http://r-project.org>)

project.org) 및 바이오컨덕터(Bioconductor) 프로젝트 (<http://bioconductor.org>)로부터의 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. 배경 차감된 마이크로어레이 데이터를 어레이 내에서 LOESS 정규화하고, 어레이 사이에서 사분위수 정규화하였다. 이어서 정규화된 데이터를 log2-변환시키고, 프로브를 바이오컨덕터 '유전자필터' 패키지를 이용하여 여과하여 엔트레즈(Entrez) 유전자에 맵핑된 프로브만 남아있도록 하였다. 이어서, 50% 최소 가변 프로브를 제거하는 비-특이적 필터를 적용하였다 (문헌 [Bourgon *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107(21):9546-51, 2010]). 차별적으로 발현된 유전자를 확인하기 위해, 림마(limma) 패키지를 사용하여 (문헌 [Smyth., *Stat Appl Genet Mol Biol.*, 3:Article 3, 2004]), 감쇄된 t-통계값을 계산하였다. 선형 모델을 미성숙 및 성숙 DC 사이의 차별적 발현 뿐만 아니라 CD83-라이게이션된 샘플 (CD83fc- 및 HB15e-처리된 성숙 DC) 및 대조군 샘플 (IgG- 및 비처리된 성숙 DC) 사이의 차이에 대해 시험하였다. 오류 발견율 (FDR)을 벤자미니-호크버그(Benjamini-Hochberg) 방법을 이용하여 계산하였다. 유전자가 0.01 미만의 FDR을 갖는다면 이들을 차별적으로 발현되는 것으로 간주하였다. 5가지 상이한 공여자로부터의 DC의 모든 유전자 발현 변화의 분석은 CD83.fc 및 HB15e 처리가 항염증 표현형을 발생시킨다는 것을 나타내었다. 전반적으로, CD83.fc 또는 HB15e 처리시에 DC 시토카인 방출 및 유전자 발현의 측정은 가용성 CD83 처리가 염증유발 시토카인의 분비를 억제하고 항염증 반응을 유발한다는 것을 입증한다.

[0306] 실시예 3. 가용성 CD83 처리는 상처 치유에 관련된 유전자의 상향조절을 발생시킨다.

CD83.fc 또는 HB15e로 처리된 DC에서 유발된 유전자 발현의 변경을 추가로 특성화하기 위해, 처리 후에 DC로부터 단리된 RNA 상에서 마이크로어레이 분석을 수행하였다. 마이크로어레이의 통계적 분석은 R 프로젝트 (<http://r-project.org>) 및 바이오컨덕터 프로젝트 (<http://bioconductor.org>)로부터의 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. 배경 차감된 마이크로어레이 데이터를 어레이 내에서 LOESS 정규화하고, 어레이 사이에서 사분위수 정규화하였다. 이어서 정규화된 데이터를 log2-변환시키고, 프로브를 바이오컨덕터 '유전자필터' 패키지를 이용하여 여과하여 엔트레즈 유전자에 맵핑된 프로브만 남아있도록 하였다. 이어서, 50% 최소 가변 프로브를 제거하는 비-특이적 필터를 적용하였다 (문헌 [Bourgon *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107(21):9546-51, 2010]). 차별적으로 발현된 유전자를 확인하기 위해, 림마 패키지를 사용하여 (문헌 [Smyth., *Stat Appl Genet Mol Biol.*, 3:Article 3, 2004]), 감쇄된 t-통계값을 계산하였다. 선형 모델을 미성숙 및 성숙 DC 사이의 차별적 발현 뿐만 아니라 CD83-라이게이션된 샘플 (CD83fc- 및 HB15e-처리된 성숙 DC) 및 대조군 샘플 (IgG- 및 비처리된 성숙 DC) 사이의 차이에 대해 시험하였다. 오류 발견율 (FDR)을 벤자미니-호크버그 방법을 이용하여 계산하였다. 유전자가 0.01 미만의 FDR을 갖는다면 이들을 차별적으로 발현되는 것으로 간주하였다. 5가지 상이한 공여자로부터의 DC의 분석은 CD83.fc 및 HB15e 처리된 세포가 비처리된 mDC 뿐만 아니라 iDC와 독립적으로 구분되어 집단을 형성한다는 것을 보여주었고, 처리가 상처 치유에 관련된 유전자의 상향조절을 발생시킨다는 것을 나타내었다. 마이크로어레이 데이터를 CD83.fc 또는 HB15e로 처리된 mDC로부터 단리된 전체 RNA의 택맨 qPCR 분석에 의해 확인하였다 (도 7). *gapdh*에 대한 정규화 후에 유전자 발현 분석은 상처 치유에 관련된 유전자, *vcan*, *spock2*, 및 *fbn2*가 상향조절되었다는 것을 입증하였다. 지시된 평균 상대 발현은 $2^{\Delta\Delta CT}$ + 평균의 표준 오차 (SEM)이다. 이러한 시험관내 발견은 가용성 CD83 처리가 염증성 질환에 의해 유발된 조직 손상의 치유를 위해 생체내에서 건강한 세포 증식 및 이동을 촉진할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0308] 실시예 4. CD83 동형 상호작용은 항염증 반응을 매개한다.

항염증 반응을 매개하는 CD83 상호작용을 추가로 특성화하기 위해, hCD83을 과다발현하는 CHO 세포와 공동-배양 시에 DC를 항염증 반응에 대해 모니터링하였다. MUTZ-3 세포로부터 iDC를 발생시키기 위해, 세포를 150 ng/ml rhGM-CSF 및 50 ng/ml rhIL-4를 함유하는 MEM α + 글루타맥스/20% 열-불활성화 FBS에서 6일 동안 배양하였다. 생성된 iDC를 대조군 CHO 세포주 또는 인간 CD83을 안정하게 발현하는 CHO 세포와 공동-배양하였다. 혼합된 세포의 배양물을 이후에 비처리하거나 또는 25 ng/ml rhIL-1 β , 100 ng/ml rhIL-6, 50 ng/ml rhTNF α 및 1 μ g/ml PGE-2를 함유하는 시토카인 칵테일로 처리하여 mDC를 생산하였다. 세포 배양 상청액을 DC의 성숙 48시간 후에 수집하고, 분비된 시토카인 IL12-p40 및 MCP-1을 표준 제조업체의 지침에 따라 ELISA (인비트로젠)에 의해 분석하였다. 분비된 IL12-p40 및 MCP-1 수준의 분석은 염증유발 시토카인의 방출이 CD83 발현이 결핍된 CHO 세포와 비교하여 hCD83을 발현하는 CHO 세포와 공동-배양된 mDC에서 유의하게 감소되었다는 것을 보여주었다 (도 8a 및 b). 이러한 데이터는 CD83이 트랜스 동형 상호작용에 참여하여 항염증 반응을 매개할 수 있다는 것을 입증한다. 이러한 결과는 다중 공여자의 전혈로부터 단리된 인간 단핵구 유래 DC (MDDC)를 사용하여 확인되었다. 자극 후에, CHO-hCD83 세포와 배양된 DC는 CD83 발현이 결핍된 CHO 세포와 배양된 것보다 유의하게 적은 IL-12p40을 생산하였다.

[0310] 미성숙 BMDC와 야생형 또는 CD83 결핍 동물로부터의 성숙 BMDC의 공동-배양물을 연구하고, IL-12p40 생산에 대

해 검정하였다. 본원에 참고로 포함된 문헌 [Fujimoto, Y. et al., *CeII* 108, 755-767, 2002]에 기재된 것과 유사하게 CD83의 이뮤노글로불린 도메인 및 막횡단 및 세포질 도메인의 절반을 누락시키는 상동 재조합 전략을 이용하여 CD83 녹아웃 마우스 ($CD83^{-/-}$)를 생성하였다. $CD83^{-/-}$ 마우스는 소수의 CD4 T 세포를 가졌으나, 달리 번식되면 예상되는 맨델 빈도(Mendelian frequencies)로 생산되었을 뿐만 아니라 그의 야생형 한배자손이 재생되었다. LPS로의 자극시에, $CD83^{-/-}$ 마우스로부터 생성된 BMDC는 표면 성숙 마커 CD86을 상향조절하고, 시토카인을 야생형 한배자손으로부터 생성된 것과 유사한 수준으로 생산할 수 있었다 (도 8c). MHCII의 상향조절이 또한 LPS로의 자극시에 나타났으나, $CD83^{-/-}$ 마우스로부터의 BMDC는 야생형 마우스로부터 생성된 것보다 낮은 MHCII를 발현하였다. 다음에 새로운 미성숙 BMDC를 LPS 자극과 동시에 야생형 또는 $CD83^{-/-}$ 동물로부터의 성숙 세포와 공동-배양하였다. 24시간 후에, 배양 상청액을 수집하고, ELISA에 의해 IL-12p40 생산에 대해 평가하였다. 높은 수준의 CD83을 발현하는 성숙 DC와 공동-배양된 미성숙 DC는 CD83 결핍된 성숙 DC와 배양한 것보다 유의하게 낮은 IL-12p40을 생산하였다 (도 8d).

[0311]

CD83 처리에 의해 매개되는 항염증 반응이 세포 표면 CD83과의 상호작용을 필요로 한다는 것을 검증하기 위해, 처리를 CD83을 발현하지 않는 DC에서 검정하였다. MUTZ-3 iDC를 150 ng/ml rhGM-CSF 및 50 ng/ml rhIL-4를 함유하는 MEM α + 글루타맥스/20% 열-불활성화 FBS에서 배양한 후에 CD83을 표적화하는 액셀 siRNA (카탈로그 번호 E-012680; 다마콘) 또는 비-표적화 대조군 (카탈로그 번호 D-001910; 다마콘)으로 4일 동안 형질감염시켰다. MUTZ-3 iDC를 10 uM siRNA를 함유하고 3% 열-불활성화 FBS, 150 ng/ml GM-CSF 및 50 ng/ml IL-4가 보충된 액셀 전달 배지 (카탈로그 번호 B-005000; 다마콘)에서 5% CO₂, 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 제7일에, iDC를 25 ng/ml rhIL-1β, 100 ng/ml rhIL-6, 50 ng/ml rhTNF α 및 1 μg/ml PGE-2를 함유하는 시토카인 캐테일로 처리하여 mDC를 생산하였다. mDC의 10 μg/ml CD83.fc, 1 μg/ml HB15e, 또는 대조군 IgG.fc로의 처리는 성숙 자극과 동시에 수행하였다. 세포 배양 상청액을 DC의 성숙 48시간 후에 수집하고, 분비된 시토카인을 표준 제조업체의 지침에 따라 MCP-1 키트 (인비트로젠)를 이용하여 ELISA에 의해 분석하였다. mDC에 의해 방출된 MCP-1의 분석은 CD83의 siRNA 녹다운 (siCD83)이 CD83.fc 및 HB15e 항체에 대한 반응을 폐지한다는 것을 입증한다 (도 9a). 따라서, 이러한 데이터는 CD83이 CD83 처리에 의한 항염증 반응을 매개하기 위해 세포 표면 상에서 요구된다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 분비된 IL-12p40의 검출에 의해 확인되었다. mDC에 의해 방출된 IL-12p40의 분석은 CD83의 siRNA 녹다운 (siCD83)이 CD83.fc 및 HB15e 항체에 대한 반응을 폐지하였다는 것을 나타내었다.

[0312]

CD83 처리 동안 항염증 반응이 동형 결합 및 세포 표면 CD83을 통한 하류 신호전달을 필요로 하는지 결정하기 위해, 처리를 세포질 말단절단된 CD83 구축물을 발현하는 DC에서 검정하였다. CD83 렌티바이러스 발현 구축물은 pGCMV.IRES.eGFP로부터 유래되고 (pGIPZ 유도체; 오픈바이오시스템즈(Openbiosystems)), 전장 hCD83 유전자 (CD83FL)의 PCR 증폭 또는 세포질 영역이 말단절단된 hCD83 유전자 절편의 증폭 (Δ172-205) 및 이러한 단편의 XhoI/EcoRI 클로닝 부위로의 삽입에 의해 제조하였다 (도 9b). DC의 감염을 위한 렌티바이러스를 생성하기 위해, 293T 세포를 젤라틴화 10 cm 배양 디쉬 상에 1X10⁷개로 시딩하고, ~20시간 동안 성장시켜 80-90% 전면성장을 도달하였다. 배지를 5 ml DMEM, 10% FBS, 2mM L-글루타민으로 재보충하고, 세포를 5 μg 발현 플라스미드, 멘타 8.9 및 VSVG를 1:2.3:0.2의 몰비로 함유하는 DNA 믹스로 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 (인비트로젠)을 이용하여 6시간 동안 37°C에서 형질감염시켰다. 형질감염 배지를 6 ml 정상 성장 배지로 재보충하고, 세포를 추가의 40시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 상청액을 수확하고, 0.45 μm 튜브 상부 필터 (코닝(Corning))를 통해 여과하여 정화하고, 제조업체의 지침에 따라 렌티-X-농축기 (클론테크(Clonetech))를 이용하여 농축시켰다. MUTZ-3 세포를 MEM α + 글루타맥스를 함유하는 유지 배지/20% 열-활성화 FBS/15% HTB-9 조건화 배지 중에 24-웰 배양 플레이트에서 0.5 x 10⁶개/ml로 시팅하였다. 폴리브렌 및 농축된 렌티바이러스 상청액을 세포에 각각 4 μg/ml 및 10의 MOI의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 알레그라(Alegra) X-12R 테이블탑 원심 분리기에서 1800 rpm으로 30분 동안 실온에서 회전시킨 후에 밤새 37°C에서 인큐베이션하였다. 렌티바이러스를 함유하는 배지를 제거하고, 새로운 유지 배지로 교체하였다. 2-3일 배양 후에, 상위 10%의 GFP 양성 세포를 분류하고, 150 ng/ml rhGM-CSF 및 50 ng/ml rhIL-4가 보충된 MEM α + 글루타맥스/20% 열-불활성화 FBS에서 6일 동안 배양하고, iDC로 사용하였다. 세포를 성숙 자극으로 처리하였을 뿐만 아니라 CD83.Fc, HB15e 또는 이소형 대조군으로 48시간 동안 처리하였다. 이후에 상청액을 수집하고, MCP-1 방출을 ELISA에 의해 분석하였다. 분비된 MCP-1의 분석은 전장 CD83의 렌티바이러스 과다발현이 CD83.fc 또는 HB15e에 대한 mDC 반응을 억제하지 않았으나, 세포질 말단절단된 CD83의 발현이 CD83 처리의 항염증 효과를 차단하였다는 것을 입증하였다 (도 9c). 이러한 결과는 분비된 IL-12p40의 검출에 의해 확인되었다. 분비된 IL-12p40의 분석은 전장 CD83의 렌티바이러

스 과다발현이 CD83.Fc 또는 HB15e에 대한 mDC 반응을 억제하지 않았으나, 세포질 말단절단된 CD83의 발현이 CD83 처리의 항염증 효과를 차단하였다는 것을 입증하였다.

[0313] 가교가 단독으로 CD83 세포질 도메인을 통한 항염증 반응을 유발하기에 충분한지 결정하기 위해, CD83 막횡단 및 전장 또는 말단절단된 세포질 도메인에 융합된 CD79a의 세포외 영역을 함유하는 CD83 키메라 렌티바이러스 발현 구축물을 생성하였다 (도 10a). iDC를 상기 기재된 바와 같이 지시된 렌티바이러스 구축물로 감염시키고, 이후에 성숙 자극 및 1 μ g CD79a 항체 (산타 크루즈) 또는 이소형 대조군으로 48시간 처리하였다. 상청액을 수집하고, IL12-p40 방출을 ELISA에 의해 분석하였다. 분비된 IL12-p40의 분석은 전장 CD83 키메라의 렌티바이러스 과다발현이 항-CD79a 항체에 대한 mDC 반응을 억제하지 않았으나, 세포질 말단절단된 CD83 키메라의 발현이 항-CD79a로의 처리의 항염증 효과를 차단하였다는 것을 입증하였다 (도 10b). 전반적으로, 이러한 결과는 CD83 동형 상호작용이 CD83 처리로 인한 항염증 효과를 매개한다는 새로운 발견을 입증한다.

[0314] 실시예 5. CD83 동형 상호작용은 MAPK 및 mTOR 신호전달 경로의 억제를 통해 염증을 억제한다.

[0315] CD83 동형 상호작용이 DC에서 항염증 효과를 도출한다는 새로운 발견으로 인해, CD83 세포질 도메인에 의해 조절되는 하류 신호전달 경로를 연구하였다. CD83 세포질 도메인의 마지막 15개 아미노산의 정렬은 C-말단 부류 III PDZ 리간드 모티프가 CD83에서 보존된다는 것을 나타낸다 (도 11a). 이 모티프가 CD83 처리 동안 항염증 반응을 매개하는지 결정하기 위해, 부류 III PDZ 리간드 모티프를 폐지하기 위한 위치 205에서의 발린 → 알라닌 돌연변이 (V205A)를 갖는 전장 CD83을 함유하는 CD83 렌티바이러스 발현 구축물을 생성하였다 (도 11b). iDC를 상기 기재된 바와 같은 지시된 렌티바이러스 구축물로 감염시켰다. 세포를 성숙 자극으로 처리하였을 뿐만 아니라 48시간 동안 CD83.Fc, HB15e 또는 이소형 대조군으로 처리하였다. 이후에 상청액을 수집하고, IL12-p40 방출을 ELISA에 의해 분석하였다. 분비된 IL12-p40의 분석은 전장 CD83의 렌티바이러스 과다발현이 CD83.Fc 또는 HB15e에 대한 mDC 반응을 억제하지 않았으나, CD83 V205A 돌연변이체의 발현이 CD83 처리의 항염증 효과를 차단하였다는 것을 입증하였다 (도 11c). 이러한 결과는 CD83 세포질 도메인 상의 부류 III PDZ 리간드 모티프가 항염증 반응을 매개하는 단백질과 상호작용한다는 것을 시사한다.

[0316] CD83 동형 상호작용의 면역억제 효과가 추가의 신호전달 경로에 의해 매개되는지 결정하기 위해, 포스포-키나제 어레이를 5분 동안 CD83.Fc 또는 HB15e로 처리된 mDC로부터의 세포 용해물 상에서 수행하였다. 인간 포스포-키나제 어레이 (R&D 시스템즈)를 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 간략하게, MUTZ-3 DC를 냉각시킨 PBS로 세척하고, 용해 완충제 6에 용해시키고, 4°C에서 30분 동안 혼들었다. 용해물을 14,000 X g에서 5분 동안 원심 분리하고, 상청액을 브래드포드(Bradford) (바이오-라드(Bio-Rad))에 의한 전체 단백질의 분석을 위해 새로운 튜브로 옮겼다. 2회 점적된 46개의 항체를 함유하는 어레이 막을 1시간 동안 실온에서 차단한 후에 회색된 세포-용해물과 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 막을 세척하고, 이어서 검출 항체와 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 세척 후에, 막을 스트렙타비딘-HRP에서 30분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 다시 세척한 후에 ECL 플러스(ECL Plus) 시약 (아머샴(Amersham))으로 검출하였다. 막을 후지 필름(FUJI FILM) 영상 판독기 LAS-3000 상에 노출시키고, 평균 강도를 멀티 게이지(Multi Gauge) v3.1 (후지 필름)에 의해 분석하였다. HB15e 처리는 mTOR ($p=0.046$) (도 12a), p38 ($p=0.008$) (도 12b) 뿐만 아니라 CREB ($p=0.0104$) (도 12c)의 인산화의 유의한 감소를 발생시켰다. 대조적으로, HB15e 항체 처리는 성숙 자극의 성분인 TNF α 의 TNF 수용체 결합에 의해 활성화된 STAT3의 인산화를 억제하지 않았다 (도 12d). CD83.Fc 또는 α CD83 (HB15e)으로 처리된 인간 단핵구-유래 DC (MDDC)로부터의 전체 세포 용해물의 웨스턴 블롯 분석은 포스포-p38 MAPK의 감소 (도 12e)와 함께 STAT3 인산화에 대해 유의한 효과가 없다는 것 (도 12f)을 확인하였다. 이러한 새로운 발견은 CD83 동형 상호작용의 항염증 효과가 p38 MAPK 뿐만 아니라 mTOR 단백질 신호전달에 의해 매개된다는 것을 나타낸다.

[0317] 실시예 6. CD83 과다발현은 결장 고유판 DC의 표면 활성화 마커의 감소된 발현을 발생시킨다

[0318] 시험관내에서 CD83 동형 상호작용이 DC에서 항염증 효과를 도출한다는 신규한 발견은 이것이 생체내에서 유사한 효과를 도출할 수 있음을 시사한다. 생체내에서 CD83-매개 면역억제의 효과를 연구하기 위해, 점막 표면에서 CD83을 과다발현하는 트랜스제닉 마우스 계통 (CD83Tg)을 생성하였다. FABP.CD83 표적화 벡터를 생성하기 위해, 피코맥스(Picomax) PCR 시스템을 이용하여 결장 조직으로부터의 전장 마우스 CD83 (mCD83)을 증폭시켰으며, 이를 SpeI/SacII 부위를 이용하여 FABP.sup.LacZ 벡터로 클로닝하는데 사용하였다 (도 13a). PCR에 사용된 프라이머는 CD83SPE-정방향 프라이머: 5'-GATCAAACTAGTCCACCATGTCGCAAGGCCTCCAGCTCCT-3' 및 CD83SACII-역방향 프라이머: 5'-CATCATCCCGGGTCATACCGTTCTGTCTTAGGAAG-3'이다. 미세주사 후에, 72마리 원조 마우스를 결장에서의 높은 발현 및 신장에서의 낮은 발현에 대해 스크리닝하였다. 1마리 마우스가 이러한 기준을 만족시켰으며, 이를 사용하여 FVB 마우스 (잭슨 랩스(Jackson Labs))에 역교배함으로써 트랜스제닉 계통을 생성하였다.

마우스를 특정 병원체-무함유 장벽 시설에서 사용하였다. 모든 절차는 제넨테크(Genentech) 동물 실험 윤리 위원회의 승인을 받았다.

[0319]

CD83에 대한 결장의 면역조직화학 염색은 야생형 동물에서의 CD83의 발현이 소화관-연관 림프성 조직으로 제한되었으나, CD83Tg는 결장 상피에서 CD83을 과다발현한다는 것을 보여주었다 (도 13b). CD83 과다발현이 DC 하위세트, T 세포 집단 및 표면 마커에 대해 영향을 미치는지 결정하기 위해, 결장을 수화하고, 냉각된 HBSS/2% FBS/10 mM HEPES로 풀러싱하였다. 결장과 연관된 지방 및 다른 조직을 제거하고, 결장을 HBSS/2% FBS로 세정하였다. 결장을 가위를 사용하여 세로로 자르고, 얼음 상의 30-40ml HBSS/2% FBS가 포함된 50-ml 원추형 튜브로 옮겼다. 이어서, 결장 조각을 10-15 ml 예열된 HBSS/2%FBS/10 mM HEPES/1 mM EDTA가 포함된 멸균 배풀 플라스크 (코닝)로 옮겼다. 플라스크를 200 rpm에서 45분 동안 37°C에서 진탕시켰다. 배지를 봇고, 결장을 새로운 HBSS/2% FBS/10 mM HEPES에서 세척하고, 남아있는 상피를 블레이드로 벗겨냈다. 결장을 10% FCS, 20 mM HEPES, 0.5 mg/ml 콜라게나제/디스파제, 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI 중에서 1-2-mm 조각으로 자르고, 이어서 200 rpm에서 진탕시키면서 45-90분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 혼탁액을 4-5회 피펫팅하고, 100 μm 필터를 통해 여과한 후에, 10분 동안 4°C에서 1800 rpm 회전시켰다. 세포를 5%FBS, 20 mM HEPES, 및 0.1 mg/ml DNase를 함유하는 RPMI으로 세척하고, 70 μm 필터를 통해 여과하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충제로 세척하고, 면역 세포의 분석 뿐만 아니라 RNA 단리 및 qPCR을 위한 DC의 분류를 위해 항체로 염색하였다.

[0320]

CD83Tg 마우스의 결장 고유판 또는 비장으로부터 단리된 DC를 MHCII 및 CD11c 고발현에 대해 유동 세포측정법에 의해 분류하였다 (도 14a 및 b). DC 하위세트의 분석은 결장 (도 14d) 또는 비장 (도 14e)으로부터 단리된 혈장세포 (CD11b-/B220+), 골수 (CD11b+), 또는 림프구 (CD11b-/B220-/CD8a+) DC의 수 또는 백분율에 유의한 차이가 없다는 것을 나타내며, 이는 CD83 과다발현이 CD83Tg 마우스 내의 DC 하위세트에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. DC 표면 활성화 마커 CD83, CD86, 및 MHCII (I-A/E)의 분석은 이들이 결장으로부터 단리된 DC의 표면 상에서 유의하게 감소되는 반면 (*p<0.05, **p<0.01) (도 13c), 비장으로부터의 것은 유의한 차이를 나타내지 않는다 (도 13e)는 것을 입증하였다. 각각의 점은 3가지 동물로부터 모은 세포를 나타낸다. 또한, CD83Tg 마우스의 결장 고유판 또는 비장으로부터 단리 및 분류된 T 세포의 분석 (도 14c)은, 결장 (도 13d) 또는 비장 (도 13f)으로부터 단리된 경우에 모두에 T 세포 활성화를 나타내는 CD44 표면 마커의 발현에 유의한 차이가 없다는 것을 나타내었다. 흥미롭게도, CD83Tg DC로부터 단리된 전체 RNA의 택맨 qPCR 분석은 결장에서 증가된 상처 치유 유전자 발현을 보여주었으나, 야생형 마우스의 결장에서는 검출가능하지 않았다 (ND) (도 13g). 데이터는 3회 독립적 실험 (각각의 군에서, n=6)의 대표값이다. 전반적으로, 이러한 생체내 결과는 DC의 CD83.fc 또는 HB15e 처리에서 관찰된 시험관내 결과에 의해 지지된다.

[0321]

실시예 7. CD83 면역억제는 마우스를 DSS 유발 결장염으로부터 보호한다

[0322]

염증성 장 질환의 마우스 모델에서 CD83 과다발현의 영향을 평가하기 위해, 결장염을 텍스트란 황산나트륨 (DSS)으로의 처리에 의해 이전에 실시예에서 생성되고 특성화된 CD83Tg 마우스에서 유발시켰다. 8-10주령의 CD83Tg 마우스에게 7일 동안 음용수 중 6% DSS 임의량을 제공하고, 제7일에 정상 음용수로 바꾸어 제12일에 실험을 중단할 때까지 제공하였다. 마우스의 체중을 제0일 및 제4일로부터 앞으로 매일 측정하고, 잠재 출혈, 설사 및 임의의 다른 비정상적인 징후를 확인하였다. 체중 감소가 제0일에 20% 초기 체중을 초과하면 마우스를 안락사시켰다. 제12일에 마우스를 마취 하에 안와 채혈하여 150-200 μl 혈액을 수집하였고, ~150 μl 혈청을 생성하였다. 혈청 시토카인을 제조업체의 지침에 따라 바이오-플렉스 프로 마우스 23-플렉스(Bio-Plex Pro Mouse 23-Plex) 검정 (카탈로그 번호 M60-009RDPD; 바이오-라드)을 이용하여 평가하였다. 이어서, 마우스를 안락사시키고, 소장 및 대장을 절단하고, 조직학 분석을 위해 H&E로 염색하였다. 절편을 무작위로 분류하고, 이 중-맹검 스코어링하였다. 6% DSS로 처리된 야생형 마우스는 ~20% 체중 감소가 나타난 반면, CD83Tg 마우스는 제12일에 ~89% 초기 체중을 유지하였다 (도 15a). 야생형 마우스는 결장 구조의 손상 및 증가된 염증성 침윤물에 의해 나타내어진 바와 같이 CD83Tg 마우스에 비해 중증의 결장염을 나타내었다 (도 15b). 야생형 및 CD83Tg 마우스로부터의 결장 절편의 H&E 염색의 조직학 스코어는 야생형 마우스가 8.2의 평균 조직학 스코어를 갖는 반면, CD83Tg 마우스의 조직학 스코어가 5.3으로 유의하게 더 낮다는 것을 입증한다 (**, P=0.0094) (도 15b 및 c). 추가로, 염증유발 시토카인의 혈청 수준을 ELISA에 의해 측정하였으며, 야생형 한배자순과 비교하여 6% DSS로 처리된 CD83Tg 마우스에서 유의하게 감소하는 것으로 밝혀졌다 (*, P<0.05) (도 15d). 이러한 결과는 점막 표면에서 CD83을 과다발현하는 마우스가 결장염에 대해 보다 큰 저항성을 나타내어 체중이 유지되고 혈청 시토카인 수준이 감소한다는 것을 입증한다. 따라서, CD83 동형 상호작용은 DC-매개 면역 반응을 조절하여 부적절한 염증을 예방하고 내병성을 증진시킨다.

- [0323] CD83을 과다발현하는 마우스에서 DSS 결장염 동안 발생한 보호작용이 근본적 고유관 DC에 대한 CD83의 영향 때문인지 결정하기 위해, IL-12p40 발현을 DSS 결장염을 앓고 있는 CD83Tg 및 WT 마우스로부터의 고유관 DC에서 검정하였다. 7일 동안 DSS 처리한 후에, 체중 감소가 CD83Tg 및 WT 동기들 사이에서 유의한 차이가 있는 경우에 마우스를 제9일에 안락사시켰다. 이어서, DC를 단리된 고유관 면역 세포로부터 분류하여 qPCR에 의해 염증 유발 시토카인의 발현을 평가하였다. DSS는 CD83Tg 및 WT 마우스 둘 다에서 염증성 시토카인의 발현을 유발하였다. 그러나, CD83Tg 마우스로부터 단리된 DC는 야생형 한배자손과 비교하여 유의하게 감소된 IL-12p40 발현을 나타내었으며 (*, p=0.0315) (도 15e), 이는 증가된 점막 CD83 수준이 DC 면역 반응을 조정하여 결장염 동안 보호작용을 한다는 것을 나타낸다.
- [0324] 실시예 8: 수지상 세포에서 CD83의 손실은 결장염을 악화시킨다
- [0325] DC에서 CD83의 손실이 결장염을 악화시키는지 결정하기 위해, DC에서 CD83 발현이 특이적으로 결핍된 마우스를 생성하여 검정하였다. $CD83^{fl/fl}$ 마우스를 상동 재조합에 의해 생성하였다. 우선 CD83 게놈 단편을 하기 특유의 제한 부위를 갖는 합성 CD83 검색 벡터를 사용하여 BAC (카탈로그 번호 RPCI23.C, 인비트로젠)로부터 검색하였다:
- ```
GCGGCCGCGAGCAACTGATATTATATGCCTTGAACATGAAACCAGGGCAGG
CTGTGGAATATTCAGGCACGCTGCTCGAGGCACAGTAGATCCTAACCCAAAG
TGGATAAGAGATGACAATAGCTTCCAAGAGAGACAGTTATGAGGGACC (블루
해론)
```
- [0326] 정제한 검색된 단편을 *loxP* 플랭킹 카나마이신 선택 카세트를 검색된 게놈 단편에 삽입한 하기 제1 표적화 카세트와 공동-형질전환시켰다:
- ```
ACAGGTCTCCAGCCAGTGTTCTCTCACCCCTGCAGGGTAAGGCTGTGTTGGT  
TCCTGGTGCATAACATCACAGCATTGAGTCTTATCTGTTCAAATAACTCGTA  
TAATGTATGCTATACGAAGTTATCTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATC  
GGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACAAACCCCTCGTGTACGGT  
ATCGCCGCTCCGATTCGAGCGCATCGCCTCTATCGCCTCTGACGGAGTTCTT  
CTGAATAACTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCAAACACAGTCTCAAG  
AGTTTTATAGATTCTCTTCTCCCTGGAATCCTCATTACAGGGATAGGGGG  
TGGGGGAGCACCCTGCTTGCTTAAA (블루 해론)
```
- [0327] 이어서, 정제한 표적화된 플라스미드를 아라비노스-유도 및 전기적격 SW106 세포로 형질전환시켜 선택 카세트의 Cre-매개 팝-아웃이 단일 *loxP* 부위 뒤에 남도록 하였다. 이어서, 정제된 단편을 2개의 *Frt* 부위 및 단일 *loxP* 부위에 의해 플랭킹된 PGK-em7-Neo-pA 내성 유전자의 삽입을 위한 하기 합성 제2 표적화 카세트로 공동-형질전환시켜 조건부 표적화 벡터를 생성하였다:
- ```
CTCAGTGACACATTACACACTTGTGGTCAATGTATGGATTACCTGAATACCCAC
CTTCCCCAGGGAGCAAGCATTCTCGTTGTGCTTCTTCAGTGAAGTTCCCTAT
TCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCGCTGAAGAGGGAGTTACGTCCAGCCAAGCT
AGCTTGGCTGCAGGTCGTCGAAATTCTACCGGGTAGGGGGCTATGGCTCTGA
GGCGGAAAGAACAGCTGGGCTCGACTAGAGCTTGCAGGAACCGAAGTTCTA
TTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCATCAGTCAGGTACATATATACTTCGTATAA
TGTATGCTATACGAAGTTATGCACAGTAGATCCTAACCCAAAGTGGATAAGAGAT
GACAATAGCTTCCAAGAGAGACAGTTATGAGGGACCACGCAGAAATGAACAAA
GCACAGTTGGT (블루 해론)
```
- [0328] 선택 카세트는 ES 세포에서 양성 선택을 위한 조건부 표적화 벡터에 남아있었고, 이후에 ES 세포에서 *Flp*를 코딩하는 cDNA의 일시적인 형질감염에 의해 제거하여 조건부  $CD83^{fl}$  대립유전자를 생성하였다 (도 16a). 이어서,  $CD83^{fl}$  대립유전자를 보유하는 ES 세포를 마우스 배반포에 주사하여 키메라 마우스를 생성하고, 이어서 이를 사용하여 동형접합  $CD83^{fl/fl}$  마우스를 생성하였다. CD83 녹아웃 마우스를 본원에 참고로 포함된 문헌 [Fujimoto,

*Y. et al., Cell 108, 755-767, 2002]*에 사용된 것과 유사한 전략을 이용하여 생성하였다.  $CD83^{f/f}$  마우스를  $CD11c$  프로모터의 제어 하에 Cre 레콤비나제의 트랜스제닉 발현을 갖는 마우스로 변식시켜 특히 DC에서  $CD83$  결핍된 마우스 ( $CD83^{f/f} CD11c\text{-Cre}$ )를 생성하였다.  $CD83^{f/f} CD11c\text{-Cre}$  마우스는 중대한 형태적 이상을 나타내지 않았고, 전체적인  $CD83$  농아웃 마우스와 달리,  $CD83^{wt/wt} CD11c\text{-Cre}$  한배자손과 비교시에 비장에서 정상적인 수의 CD4 T 세포를 가졌는데, 이는 아마도 흡선 상피 세포 상의  $CD83$  발현이 이들 마우스에서 영향을 받지 않았기 때문일 것이다 (도 16b). 비장 및 결장에서의 DC 수가 또한 비슷하지만,  $CD83$ 의 발현은  $CD83^{f/f} CD11c\text{-Cre}$  마우스의 대부분의 DC 상에서 손실되었다 (도 16c). DC에서  $CD83$  발현의 손실은 DSS 결장염의 생존 감소를 일으킨다 (도 16d).  $CD83^{f/f} CD11c\text{-Cre}$  DSS 처리된 마우스는 심각한 체중 감소를 나타내었으며, 제8일에  $CD83^{wt/wt} CD11c\text{-Cre}$  한배자손 (84.9%)에 비해 이들의 초기 체중보다 유의하게 낮은 체중 (77.7%)을 유지하였다 (도 16e). 또한, DSS 처리시에 제8일에  $CD83^{f/f} CD11c\text{-Cre}$  마우스의 100%에서 항문 주위 및 대변에서 현성 출혈이 관찰되었으며 ( $CD83^{wt/wt} CD11c\text{-Cre}$  한배자손에서는 관찰되지 않음) (도 16f), 이에 따라 인도적인 이유로 안락사가 요구되었다. 이러한 결과는 DC  $CD83$  발현이 DSS 유발 결장염에 저항하는데 필요하다는 것을 나타낸다.

#### [0332] 실시예 9. 효능제 항- $CD83$ 항체의 생성 및 특성화

인간  $CD83$ 의 세포외 영역 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 효능제 항체를 항체 라이브러리, 예컨대 과자 디스플레이 라이브러리의 스크리닝에 의해 생성하였다. 라이브러리의 항체는 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다. 라이브러리의 항체는 또한 단일 쇄 항체 또는 단일 도메인 항체일 수 있다. 대안적으로, 인간  $CD83$ 의 세포외 영역으로부터의 웨티드가 마우스의 면역화를 위해 사용될 수 있고, 항- $CD83$  항체는 하기 지시된 바와 같이  $CD83$  효능제 활성에 대해 확인된다.

#### [0334] 효능제 항- $CD83$ 항체에 의한 세포 표면 $CD83$ 의 결합:

수지상 세포 상의 세포 표면  $CD83$ 에 결합하는 항체를 확인하기 위해, 생성된 항체의 결합 능력을 유동 세포측정법 분석에 의해 스크리닝하였다. 간략하게, 미성숙 수지상 세포 (iDC)를 시토카인 칵테일로 처리하여 DC 성숙 및  $CD83$ 의 표면 발현을 유발하였다. mDC를 DC 성숙 자극과 동시에 생성된 항체로 처리한 후에 고정 및 유동 세포측정법을 수행하였다. mDC의 표면 상에 발현된  $CD83$ 에 특이적으로 결합하는 항체를 유동 세포측정법 데이터의 분석에 의해 확인하였다. 대안적으로, 생성된 항- $CD83$  항체를 세포 응집 검정을 이용하여 스크리닝하였다. 간략하게, hCD83을 발현하는 CHO 세포 (CHO-hCD83)를 2mM EDTA로 플라스크로부터 분리하고, 세척하고, 2% FBS/10mM EDTA를 함유하지만  $Ca^{2+}$  또는  $Mg^{2+}$ 는 결핍된 HBSS 배지에 재현탁시켰다. 이후에 세포를  $10^6$  개/ml로 재현탁시키고, 70  $\mu$ m 필터를 통과시켜 저부착성 10 cm 배양 디쉬 상의 플레이팅을 위한 단세포 혼탁액을 수득하였다. 이후에 CHO-hCD83 세포를 생성된 항체로 처리하고, 오비탈 플랫폼 진탕기에서 90분 동안 37°C에서 인큐베이션한 후에 4% PFA로 고정하였다.  $CD83$  동형 결합에 대한 경쟁으로 인한 CHO-hCD83 세포의 세포 응집을 차단하는 항체를 세포의 현미경검사 영상화에 의해 확인하였다. 이러한 항체는 인간  $CD83$ 에 대한 그의 결합 및 효능제 활성에 대해 추가로 특성화될 수 있다.

#### [0336] 효능제 항- $CD83$ 항체 치료로의 mDC로부터의 시토카인 방출의 변화:

$CD83$  효능제 활성을 갖는 항- $CD83$  항체를 확인하기 위해, mDC에 의한 염증유발 및 항염증 시토카인 분비에 대한  $CD83$  처리의 효과를 평가하였다. 간략하게, iDC를 시토카인 칵테일로 처리하여 DC 성숙 및  $CD83$ 의 표면 발현을 유발하였다. 생성된 항체로의 mDC의 처리를 DC 성숙 자극과 동시에 수행하였다. 세포 배양 상청액을 DC의 성숙 48시간 후에 수집하고, 염증유발 시토카인 MCP-1 및 IL-12p40 뿐만 아니라 항염증 시토카인 IL-1ra의 분비를 ELISA에 의해 분석하였다. 염증유발 시토카인 MCP-1 및 IL-12p40의 방출을 억제하고/거나 항염증 시토카인 IL-1ra의 방출을 유발하는 항- $CD83$  항체가 효능제 활성을 갖는 항체로 확인된다.

#### [0338] 효능제 항- $CD83$ 항체 치료로의 mDC 세포 표면 활성화 마커의 감소된 발현:

mDC의 활성화를 억제하는 효능제 항- $CD83$  항체를 확인하기 위해, 생성된 항체를 세포 표면 활성화 마커의 발현을 감소시키는 능력에 대해 스크리닝하였다. 간략하게, 미성숙 수지상 세포 (iDC)를 시토카인 칵테일로 처리하여 DC 성숙을 유발하였다. mDC를 DC 성숙 자극과 동시에 생성된 항체로 처리하였다. mDC 상의 세포 표면 활성화 마커,  $CD83$  및 HLA-DR (MHCII)의 발현은,  $CD83$  또는 MHCII에 대한 형광색소 접합된 항체로 세포를 염색하고

유동 세포측정법에 의해 세포를 분석함으로써 조사하였다. mDC 상의 CD83 및/또는 HLA-DR의 세포 표면 발현을 감소시키는 항-CD83 항체가 효능제 활성을 갖는 항체로 확인된다.

[0340] **효능제 항-CD83 항체 치료로의 MAPK 및 mTOR 신호전달 경로의 억제:**

mDC에서 MAPK 및 mTOR (라파마이신의 포유동물 표적) 신호전달의 활성화를 억제하는 효능제 항-CD83 항체를 확인하기 위해, 생성된 항체를 하류 신호전달 단백질의 인산화를 억제하는 능력에 대해 스크리닝하였다. 간략하게, 미성숙 수지상 세포 (iDC)를 시토카인 카테일로 처리하여 DC 성숙을 유발하였다. mDC를 DC 성숙 자극과 동시에 생성된 항체로 처리하였다. 처리된 mDC로부터의 세포 용해물을 SDS-PAGE에 이어 특이적 포스포-항체를 사용하는 웨스턴 블로트 분석에 적용하였다. mDC에서 p38 및 CREB 단백질의 감소된 인산화에 의해 MAPK 신호전달 경로를 억제하고/거나 mTOR 단백질의 감소된 인산화에 의해 mTOR 신호전달 경로를 억제하는 항-CD83 항체가 효능제 활성을 갖는 항체로 확인된다.

[0342] 상기 개략된 항체 스크리닝 방법으로부터 확인된 후보 효능제 항-CD83 항체를 다양한 투여량으로 사용하여 동물 모델, 예컨대 결장염에 대한 IL-10 녹아웃 마우스 모델 (문헌 [Scheinin *et al.*, *Clin Exp Immunol.*, 133:38-43, 2003]) 및 다발성 경화증에 대한 실험적 자가면역 뇌척수염 마우스 모델 (문헌 [Miller *et al.*, *Curr Protoc Immunol.*, Chapter 15:Unit 15.1, 2007])에서 자가면역 질환을 치료하였다.

**실시예 10. 항-CD83 항체의 생성**

[0344] **물질 및 방법**

[0345] **배지 및 항체**

[0346] 클로나셀(ClonaCell)-HY 배지 B (카탈로그# 03802), 배지 C (카탈로그# 03803), 배지 D (카탈로그# 03804) 및 배지 E (카탈로그# 03805)는 스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies)로부터의 것이다. 전기융합에 사용되는 시토퓨전(Cytofusion) 배지 C (카탈로그# LCM-C)는 시토 펠스 사이언시스(Cyto Pulse Sciences)로부터의 것이다. 염소 항-햄스터 IgG (H+L)-HRP 접합된 항체 (카탈로그# 127-035-160)는 잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)로부터의 것이다. TMB 1-성분 HRP 마이크로웰 기관 (카탈로그# TMBW-1000-01) 및 TMB 정지 시약 (카탈로그# BSTP-1000-01)은 BioFx 래보러토리즈로부터의 것이다.

[0347] **생체내 면역화**

[0348] 아르메니아 햄스터를 햄스터 1마리에 주사당 2  $\mu$ g의 재조합 뮤린 및 인간 CD83 (모노포스포릴 지질 A/트레할로스 디코리노미콜레이트 아주반트에 재현탁시킴)으로 3 내지 4일 간격의 복강내 주사에 의해 총 18회 부스트하여 면역화시켰다. 최종 융합전 부스트 3일 후에, 면역화된 햄스터 비장으로부터의 림프구를 수확하였다.

[0349] **하이브리도마 생성 및 항체 스크리닝**

[0350] 단리된 햄스터 비장 세포를 시토 펠스 CEEF-50 장치 (시토 펠스 사이언시스)를 이용하여 PU-1 골수종 세포 (아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션)와 융합시켰다. 간략하게, 시토퓨전 배지 C로 2회 세척한 후에, 단리된 비장 세포 및 PU-1 세포를 1:1 비로 혼합한 후에 시토퓨전 배지 C 중에 ml당 천만개 세포로 재현탁시켰다. 전기융합을 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 융합된 세포를 클로나셀-HY 배지 C 중에서 밤새 37°C의 7% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 다음날, 융합된 세포를 원심분리하고, 이어서 10 ml 클로나셀-HY 배지 C에 재현탁시킨 후에 HAT 성분을 함유하는 90 ml 메틸셀룰로스-기재 클로나셀-HY 배지 D와 부드럽게 혼합하였다. 세포를 100 mm 페트리 디쉬 (카탈로그#351029, 베톤 디킨슨)에 플레이팅하고, 37°C의 7% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 성장시켰다. 10일 인큐베이션 후에, 단일 하이브리도마 클론을 클론픽스(ClonePix) (제네틱스(Genetix), 영국)에 의해 피킹하고, 웰당 200  $\mu$ L의 클로날셀-HY 배지 E를 함유하는 96-웰 세포 배양 플레이트 (#353075, 베톤 디킨슨)로 옮겼다. 하이브리도마 배양 배지를 ELISA 스크리닝 전에 교체하였다. 배지 교체 3일 후에, 하이브리도마 상청액을 ELISA 양성 클론의 확인을 위해 인간 CD83 또는 마우스 CD83에 대한 ELISA에 의해 스크리닝하였다.

[0351] **햄스터 Ab 정제**

[0352] 하이브리도마 상청액을 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의해 정제한 후에 멸균 여과하고 (0.2  $\mu$ m 기공 크기, 날제 눈크 인터내셔널, 미국 뉴욕주), PBS 중에 4°C에서 저장하였다. 정제된 mAb를 ELISA에 이어 기능적 검정을 이용하는 추가의 시험에 의해 확인하였다.

[0353] **ELISA 검정**

[0354] ELISA 검정을 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. ELISA 96-웰 마이크로타이터 플레이트 (그라이너(Greiner), 독일)를 웰당 100  $\mu\text{L}$ 의 인간 또는 마우스 CD83으로 0.05 M 카르보네이트 완충제 (pH 9.6) 중 ml당 2  $\mu\text{g}$ 의 농도로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 웰을 세척 완충제 (PBS 중 0.05% 트윈 20, 시그마)로 3회 세척한 후에, 플레이트를 BSA로의 100  $\mu\text{L}$  ELISA 검정 희석물로 차단하였다. 약 100  $\mu\text{L}$ 의 배양된 상청액 또는 희석시킨 정제된 mAb를 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 3회 세척하고, HRP 접합된 염소 항-햄스터 IgG (H+L)와 1시간 동안 인큐베이션하였다. 웰을 3회 세척한 후에, 결합된 HRP 접합된 항체를 웰당 100  $\mu\text{L}$ 의 TMB 기질 (BioFX 래보리토리즈(BioFX Laboratories), 미국 메릴랜드주)의 첨가에 의해 검출하고, 플레이트를 5분 동안 인큐베이션하였다. 반응을 웰당 100  $\mu\text{L}$ 의 정지 시약 (BioFX 래보리토리즈, 미국 메릴랜드주)의 첨가에 의해 중지시키고, 색을  $A_{630\text{ nm}}$ 에서 검출하여 인간 또는 마우스 CD83에 결합된 항체를 식별 및 확인하였다.

#### [0355] FACS 결합 검정

[0356] 생성된 항체를 이들이 CHO 세포 상에서 발현된 인간 CD83 또는 마우스 CD83에 결합하는 능력에 대해 검정하였다. 안정한 세포주의 생산을 위한 발현 벡터를 생성하기 위해, N-말단 HIS-태그 부착된 인간 CD83 (hCD83) 또는 N-말단 HIS-태그 부착된 마우스 CD83 (mCD83)을 코딩하는 DNA 단편을 네오마이신-내성 플라스미드, pRKneo (문헌 [Crowley *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 90(11):5021-5025, 1993])에 XbaI 및 XhoI 부위에서 클로닝하여 각각 hCD83.pRKneo 또는 mCD83.pRKneo를 생산하였다. CHO 세포를 퓨진 (로슈)을 사용하여 hCD83.pRKneo 또는 mCD83.pRKneo로 형질감염시키고, 상위 10%의 CD83 양성 세포를 FACS에 의해 분류한 후에 G418 (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 킁코)로 선택하여 각각 안정한 CHO-hCD83 또는 CHO-mCD83 세포주를 생성하였다. CHO-hCD83 및 CHO-mCD83 세포를 PBS/2%BSA/2mM EDTA를 함유하는 FACS 완충제에 재현탁시키고, 항-인간 CD83 항체 또는 항-마우스 CD83 항체와 열음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 완충제로 세척한 후에 형광색소 접합된 항-햄스터 IgG 2차 항체와 열음 상에서 30분 동안 암실에서 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 완충제로 세척하고, 팩스디바 소프트웨어 (벳톤 디킨슨)를 이용하여 LSR II 유동 세포측정기 상에서 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 데이터 분석 및 다이어그램의 구축을 플로우조 v.9.4.11을 이용하여 수행하였다.

#### [0357] 서브클로닝

[0358] 마우스 또는 인간 CD83에 결합할 수 있는 항체를 생산하는 하이브리도마 클론을 햄스터 가변 영역과 함께 야생형 마우스 IgG2a 불변 영역을 함유하는 키메라 항체의 생산을 위한 적어도 1 라운드의 단일 세포 서브클로닝에 적용하였다. 이후에 항체를 서열분석하였다.

#### [0359] 결과

[0360] FACS 결합 검정의 데이터 분석은 CD83에 결합하는 능력을 갖는 항체를 생산하는 9개의 하이브리도마 클론을 확인하였다. 항-CD83 항체 35G10, 40A11, 54D11, 59G10, 75A1 및 7C7은 인간 CD83을 발현하는 CHO 세포 (흑색선)에 결합하였으나, 마우스 CD83을 발현하는 세포 (파선) 또는 CD83 발현이 결핍된 모 CHO 세포 (충전된 히스토그램)에는 결합하지 않았다 (도 17a-f). 항-CD83 항체 60B10은 인간 CD83을 발현하는 CHO 세포에 결합하였으나, 또한 마우스 CD83을 발현하는 CHO 세포와 교차-반응성을 나타내었다 (도 17g). 항-CD83 항체, 42C6 및 39A2는 마우스 CD83을 발현하는 CHO 세포 (파선)에 특이적으로 결합하였으나, 인간 CD83을 발현하는 CHO 세포 (흑색선) 또는 CD83 발현이 결핍된 모 CHO 세포주에는 결합하지 않았다 (도 18a 및 b).

[0361] 하이브리도마 클론으로부터 단리된 항체의 서열분석으로 하기 서열이 밝혀졌다 (가변 영역은 밑줄 표시되고, HVR은 볼드체 표시됨):

[0362]

39A2 항-마우스 CD83 중쇄 DNA 서열

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTAGTGAAGCCCTCACAGTCATG  
TCCCTCACTTGCTCTGTCAATGGTTCTCCATCACAGTCGTTACTGGTGGACCTG  
GATCAGGCAGTCCCAGGGAAGAACCTGGAGTGGATGGGTACATAAGTTATAG  
TGGTGGCACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGCCGCATCTCCATACCCGAGAC  
ACATCCAAGAACAGTTCTCCTGCACCTGAACCTGTGACCACTGCTGACACAG  
CCACATATTACTGTGCAAGAGATCTACGGTACCTACTTGATTACTGGGCCA  
AGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTATCCA  
CTGGCTCCTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGG  
TCAAGGGTTATTCCTGAGCCAGTGAACCTTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTC  
CAGTGGTGTGACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTACACCCCTCAGC  
AGCTCAGTGAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATG  
TGGCCCACCCGGCAAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGA  
CCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTTGGGTG  
GACCATCCGTCTCATCTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTG  
AGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTC  
CAGATCAGCTGGTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACC  
CATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTACCGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGC  
ACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAATGCAAGGTCAACAACAAAGACC  
TCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTC  
CACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCA  
CTCTGACCTGCATGGTCACAGACTCATGCCTGAAGACATTACGTGGAGTGGAC  
CAACAACGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCACTGGACTC  
TGATGGTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAAACTGGGT  
GGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTAGTGGCCACGAGGGCTGCACAATCACCA  
CACGACTAAGAGCTCTCCGGACTCCGGTAAA (서열 4)

[0363]

39A2 항-마우스 CD83 중쇄 아미노산 서열

QVOLKESGPGLVKPSOSMSLTCSVNGFSITSRYWWTWIQFPGNLEWMGYISYSG  
GTSYNPSLKSRSISITRDTSKNQFFLHLNSVTTADTATYYCARDLYGTYFDYWGQGTL  
VTVSSASTKGPSVYPLAPVCVGDTTGSVTLGCLVKGYFPEPVTLWNSGSLSSGVHTF  
PAVLQSDLYTLS  
SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKC  
PAPNLLGGPSVIFPPKIKDVL  
MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHTAQ  
TQTHREDYNSTLRV  
VSVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRA  
PQVYVLPP  
EEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGTELNYKNTEPVLDSD  
GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNH  
TTKSFRTPGK (서열 5)

[0365]

39A2 항-마우스 CD83 중쇄 가변 영역 아미노산 서열

QVOLKESGPGLVKPSOSMSLTCSVNGFSITSRYWWTWIQFPGNLEWMGYISYSG  
GTSYNPSLKSRSISITRDTSKNQFFLHLNSVTTADTATYYCARDLYGTYFDYWGQGTL  
VTVSS (서열 6)

[0368]

39A2 HVR-H1 아미노산 서열

GFSITSRYWWT (서열 7)

[0369]

39A2 HVR-H2 아미노산 서열

GYISYSGGTSYNPSLKS (서열 8)

[0372] 39A2 HVR-H3 아미노산 서열

[0373] **ARDLYGTYFDY** (서열 9)

[0374] 39A2 항-마우스 CD83 경체 DNA 서열

CAGTATGAGCTAATTCAGCAAAGTCTGTCAAGTCAGACTCTAGGGAGAACAGTC  
ACCACATCTCCTGCAAACGCAGCAGTGCAACATTGAAATAACTATGTACACTGGT  
ACCAACAGCACTTGGAAGCTACCCAAAACTGTGATCTATGATGACAATAAAA  
GACCATCTGGGTTCCTAGGTTCTGGCTCATTGACAGCTCCTCAAACTC  
AGCTTCCCTGACTATCACTGATCTGCAGATTGAAGATGAAGCTGAATAACTACTGT  
CAATCTGCTTGGGTGTTCGGTCAGGCACCAAAAGTGACTGTACCGCCTGATG  
CTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGG  
TGCCTCAGTCGTGTGCTTCTGAACAACTTCTACCCAAAGACATCAATGTCAAG  
TGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAATGGCGTCCTGAACAGTTGACTGAT  
CAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAG  
GACGAGTATGAACGACATAACAGCTATAACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCA  
ACTCACCCATTGTCAAGAGCTCAACAGGAATGAGTGT (서열 10)

[0375] 39A2 항-마우스 CD83 경체 아미노산 서열

**QYELIQPKSVSESLGRTVTISCKRSSGNIGNNYVHWYQQHFGSSPKTVIYDDNKRPS**  
GVPHRFSGSIDSSNSASLTITDLOIEDEAEYYCQSAWVFGSGTKVTVLRADAAPTWSI  
FPPSSEQLTSGGASVVCFNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS  
MSSTLTLLTKEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열 11)

[0376] 39A2 항-마우스 CD83 경체 가변 영역 아미노산 서열

**QYELIQPKSVSESLGRTVTISCKRSSGNIGNNYVHWYQQHFGSSPKTVIYDDNKRPS**  
GVPHRFSGSIDSSNSASLTITDLOIEDEAEYYCQSAWVFGSGTKVTVL (서열 12)

[0377] 39A2 HVR-L1 아미노산 서열

**KRSSGNIGNNYVH** (서열 13)

[0378] 39A2 HVR-L2 아미노산 서열

**DDNKRPS** (서열 14)

[0379] 39A2 HVR-L3 아미노산 서열

**QSAWV** (서열 15)

[0386]

42C6 항-마우스 CD83 중쇄 DNA 서열

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTAGTGAAGCCCTCACAGTCATG  
TCCCTCACTTGCTCTGTCAATGGTTCTCCATCACCACTCGTTACTGGTGGACCTG  
GATCAGGCAGTCCCCAGGGAAGAACCTGGAGTGGATGGGTTACATAAGTTATAG  
TGGTGGCACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGCCGCATCTCCATACCCGAGAC  
ACATCCAAGAACCAAGAGTTCTCCTGCACCTGAACCTGTGACCACTGCTGACACAG  
CCACATATTACTGTGCAAGAGATCTACGGTACCTACTTGATTACTGGGCCA  
AGGAACCATGGTCACCGTCTCCTAGCCTCCACCAAGGGCCCATGGTCTATCCA  
CTGGCTCCTGTGTGGAGATACAACACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGG  
TCAAGGGTTATTCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGAACTCTGGATCCCTGTC  
CAGTGGTGTGCACACCTCCCAGCTGCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCCTCAGC  
AGCTCAGTGAACCTCGAGCACCTGGCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATG  
TGGCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGA  
CCCACAATCAAGCCCTGCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTGGGTG  
GACCATCGTCTTCATCTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTG  
AGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTC  
CAGATCAGCTGGTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGTCAGACACAAACC  
CATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTACCGCGTGGTCAGTGCCTCCCCATCCAGC  
ACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGITCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACC  
TCCCGCGCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTC  
CACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAAGAAGAGATGACTAAGAACAGGTCA  
CTCTGACCTGCATGGTCACAGACTCATGCCTGAAGACATTACGTGGAGTGGAC  
CAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTC  
TGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGT  
GGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTAGTGGCCACGAGGTCTGCACAATCACCA  
CACGACTAAGAGCTTCTCCGGACTCCGGTAAA (서열16)

[0387]

[0388]

42C6 항-마우스 CD83 중쇄 아미노산 서열

QVQLKESGPGLVKPSQMSLTCNVNGFSITSRYWWTWIRQFPKNLEWMGYISYSG  
GTSYNPSLKSRSISITRDTSKNQFFLHLNSVTADTATYYCARDLYGTYFDYWQQGT  
MVTVSSASTKGPSVYPLAPVCVDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVLTWNSGSLSSGVH  
TFPAVLQSDLYTLSSSVTVSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCK  
CPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHTA  
QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLAPIERTISKPKGSVR  
APQVYVLPPPEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWERNSYCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (서열17)

[0389]

[0390]

42C6 항-마우스 CD83 중쇄 가변 영역 아미노산 서열

QVQLKESGPGLVKPSQMSLTCNVNGFSITSRYWWTWIRQFPKNLEWMGYISYSG  
GTSYNPSLKSRSISITRDTSKNQFFLHLNSVTADTATYYCARDLYGTYFDYWQQGT  
MVTVSS (서열18)

[0391]

42C6 HVR-H1 아미노산 서열

[0393]

GFSITSRYWWT (서열19)

[0394]

42C6 HVR-H2 아미노산 서열

[0395]

GYISYSGGTSYNPSLKS (서열20)

[0396] 42C6 HVR-H3 아미노산 서열

[0397] **ARDLYGTYFDY** (서열 21)

[0398] 42C6 항-마우스 CD83 경체 DNA 서열

CAGTATGAGCTAATTCAAGCCAAAGTCTGTCAAGAGTCTCTAGGGAGAACAGTC  
ACCATCTCCTGCAAACGCAGCAGTGGCAACATTGAAATAACTATGTACACTGGT  
ACCAACAGCACTTGGAAGCTACCCAAAACGTGATCTATGATGACAATAAAA  
GACCATCTGGGGTTCCATAGGTTCTGGCTCCATTGACAGCTCCTCAAACTC  
AGCTTCCCTGACTATCACTGATCTGAGATTGAAGATGAAGCTGAATACTACTGT  
CAAATCTGCTTGGGTGTTCGGTCAGGCACCAAAGTGACTGCTACCGCGCTGATG  
CTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGG  
TGCCTCAGTCGTGCTTCTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAG  
TGGAAGATTGATGGCAGTGAAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGACTGAT  
CAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAG  
GACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCCACTCACAAGACATCA  
ACTTCACCCATTGTCAAGAGCTAACAGGAATGAGTGT (서열 22)

[0399]

[0400] 42C6 항-마우스 CD83 경체 아미노산 서열

**QYELIQPKSVSESLGRTVTISCKRSSGNIGNNNYVHWYQQHFGSSPKTVIYDDNKRPS**  
**GVPHRFSGSIDSSNSASLTITDLQIEDEAEYYCOSAWVFGSGTKVTVLRADAAPTVSI**  
**FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTQDSKDSTYS**

[0401] MSSTLTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (서열 23)

[0402] 42C6 항-마우스 CD83 경체 가변 영역 아미노산 서열

**QYELIQPKSVSESLGRTVTISCKRSSGNIGNNNYVHWYQQHFGSSPKTVIYDDNKRPS**  
**GVPHRFSGSIDSSNSASLTITDLQIEDEAEYYCOSAWVFGSGTKVTVL** (서열 24)

[0404] 42C6 HVR-L1 아미노산 서열

[0405] **KRSSGNIGNNNYVH** (서열 25)

[0406] 42C6 HVR-L2 아미노산 서열

[0407] **DDNKRPS** (서열 26)

[0408] 42C6 HVR-L3 아미노산 서열

[0409] **QSAWV** (서열 27)

[0410]

60B10 항-인간 CD83 중쇄 DNA 서열

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTAAGCCCTCACAGTCACTG  
TCCCTCACTTGCTCTGTCAGTGGTTCTCCATCACCAACCGTGGTACTGGTGGAC  
CTGGATCAGGCAGTTCCCAGGGCAGAAGCTGGAGTGGATGGGTACATATTTAG  
TAGTGGTAACACCAACTACAACCCATCCATCAAGAGCCGCATCTCCATAACCAG  
AGACACATCCAAGAACCAAGCTTCTCCTGCAGCTGAACACTGTGACTACTGAGGGG  
GACACAGCCAGATATTATTGTCAAGGGCCTACGGTAAGCTAGGCTTGATTACT  
GGGGCCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCACCAAGGGCCCATCGG  
TCTATCCACTGGCTCCTGTGTGGAGATACAACACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGG  
ATGCCCTGGTCAAGGGTTATTCCTGAGCCAGTGACCTGACCTGAACTCTGGA  
TCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTCCCAGCTGCTGCAGTCTGACCTCTACAC  
CCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACC  
TGCAATGTGGCCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCC  
AGAGGACCCACAATCAAGCCCTGCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCT  
TGGGTGGACCATCCGTCATCTTCCCTCAAAGATCAAGGATGTACTCATGAT  
CTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCA  
GATGTCCAGATCAGCTGGTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACA  
CAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTACGCGTGGTCAGTGCCCTCCCCA  
TCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTCAAATGCAAGGTCAACAACA  
AAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCAAAGGGTCAGTAA  
GAGCTCCACAGGTATATGCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAC  
AGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTACGTGGA  
GTGGACCAACAACGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCT  
GGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAA  
CTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAAT  
CACACACGACTAAGAGCTCTCCCGACTCCGGTAAA (서열 28)

[0411]

[0412] 60B10 항-인간 CD83 중쇄 아미노산 서열

QVOLKESGPGLVKPSQLSLTCVTGFSITTGGYWWTWIROFPGOKLEWMGYIFSS  
GNTNYNPSIKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEGDTARYYCARAYGKLGFDYWGQ  
GTLVTVSSASTKGPSVYPLAPVCGDGTGSSVTLGLCKGYFPEPVLTWNSGSLSSGV  
HTFPAPVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC  
KCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNEVHT  
AQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV  
RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLCTMVTDFMPEDIYVEWTNNNGKTELNYKNTEPVLD  
SDGSYFMYSKLRVEKKNNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (서열 29)

[0413]

[0414] 60B10 항-인간 CD83 중쇄 가변 영역 아미노산 서열

QVOLKESGPGLVKPSQLSLTCVTGFSITTGGYWWTWIROFPGOKLEWMGYIFSS  
GNTNYNPSIKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEGDTARYYCARAYGKLGFDYWGQ

[0415] GTLVTVSS (서열 30)

[0416] 60B10 HVR-H1 아미노산 서열

[0417] GFSITTGGYWWT (서열 31)

[0418] 60B10 HVR-H2 아미노산 서열

[0419] GYIFSSGNTNYNPSIKS (서열 32)

[0420] 60B10 HVR-H3 아미노산 서열

[0421] **CARAYGKLGFDY** (서열 33)

[0422] 60B10 항-인간 CD83 경체 DNA 서열

CAACCTGTGCTGACTCAGTCACCCCTGCCTCTGCCTCCCTGGAAACTCAGTCA  
AAATCACCTGTACCCCTGAGTAGTCAGCACAGCACCTATACCATTGGTTGGTACCA  
GCAACATCCAGACAAGGCTCTAAGTATGTGATGTATGTTAATAGTGATGGAAGC  
CACAGCAAGGGGGATGGATCCCTGATCGCTCTGGCTCCAGCTGGGGCTC  
ATCGTTACTTAAGCATCTAACATTCAAGCTGAAGATGAAGCTGACTATTTCTG  
TGGTTCTTCTGATAGCAGTGGGTATGTTTGGCAGCGGAACCCAGCTCACCGTC  
CTACGCGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTCCCACCATCCAGTGAGCAGT  
TAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGCTTGAACAACTTCTACCCAAAGA  
CATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAA  
CAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCC  
CACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTACCTGTGAGGCCAC  
TCACAAGACATCAACTCACCCATTGTCAGAGCTAACAGGAATGAGTGT

(서열 34)

[0424] 60B10 항-인간 CD83 경체 아미노산 서열

QPVLQSPSASASLGNSVKITCTLSSQHSTYTIGWYQQHPDKAPKYVVMYVNSDGSH  
SKGDGIPDRFSGSSSGAHRYLSISNIQPEDEADYFCGSSDSSGYVFGSGTQLTVLRAD  
AAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTDQDS  
KDSTYSMSSTLTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRLNEC (서열 35)

[0426] 60B10 항-인간 CD83 경체 가변 영역 아미노산 서열

QPVLQSPSASASLGNSVKITCTLSSQHSTYTIGWYQQHPDKAPKYVVMYVNSDGSH  
SKGDGIPDRFSGSSSGAHRYLSISNIQPEDEADYFCGSSDSSGYVFGSGTQLTVL (서열  
36)

[0428] 60B10 HVR-L1 아미노산 서열

[0429] **TLSSQHSTYTIG** (서열 37)

[0430] 60B10 HVR-L2 아미노산 서열

[0431] **VNSDGSHSKGD** (서열 38)

[0432] 60B10 HVR-L3 아미노산 서열

[0433] **GSSDSSGYV** (서열 39)

[0434] 실시예 11. 항-CD83 항체는 mDC로부터 염증유발 시토카인의 방출을 감소시켰다.

[0435] 수지상 세포 (DC)를 항-CD83 항체 60B10, 35G10, 40A11, 54D1, 59G10, 75A1 또는 7C7로 처리시에 항염증 반응에 대해 모니터링하였다. 검정을 위해, 단핵구-유래 수지상 세포를 미성숙 DC (iDC)로 두거나 또는 25 ng/ml rhIL-1 $\beta$ , 100 ng/ml rhIL-6, 50 ng/ml rhTNF  $\alpha$  및 1  $\mu$ g/ml PGE-2를 함유하는 시토카인 칵테일로 처리하여 성숙 DC (mDC)를 생산하였다. 성숙 DC를 10  $\mu$ g/ml의 지시된 항-CD83 항체로 처리하고, 48시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후에, 세포 배양 상청액을 수집하고, 분비된 염증유발 시토카인을 표준 제조업체의 지침에 따라 ELISA (인비트로젠)에 의해 분석하였다. 분비된 시토카인 수준의 분석은 염증유발 시토카인 MCP-1의 방출이 항-CD83 항체 60B10, 35G10, 40A11 또는 7C7로 처리된 mDC에서 유의하게 감소되었다는 것을 보여주었다 (도 19a). 항-CD83 항체 54D1, 59G10 또는 75A1로의 처리는 mDC로부터의 MCP-1의 생산을 유의하게 감소시키지 않았다 (도 19a).

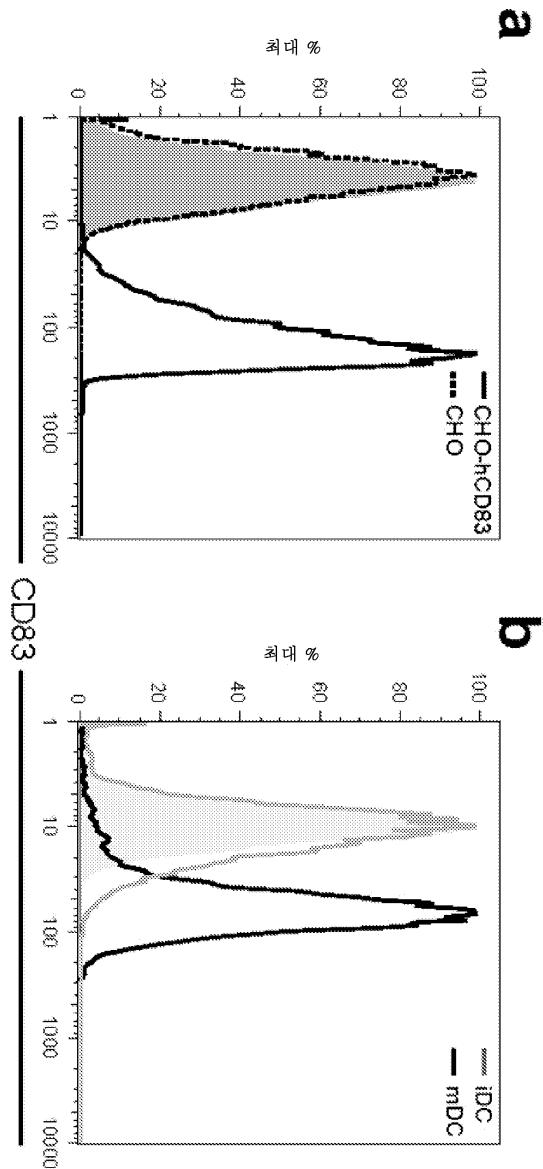
[0436] DC를 항-마우스 CD83 항체 39A2 또는 42C6으로의 처리시에 항염증 반응에 대해 모니터링하였다. 검정을 위해, 마우스 골수-유래 DC (BMDC)를 미성숙 DC (iDC)로 두거나 또는 LPS로 성숙시켰다. 성숙된 DC를 39A2, 42C6 또는 가용성 마우스 CD83.Fc 단백질로 처리하고, 이후에 RNA의 단리를 위해 수화하여 염증유발 시토카인 IL-12p40의 발현을 결정하였다. IL-12p40 RNA 수준의 정량적 PCR 분석은 LPS 자극과 함께 항-마우스 CD83 항체 39A2 또는 42C6로의 DC의 처리가 IL-12p40 발현을 가용성 마우스 CD83.Fc 단백질로 처리된 DC에서 관찰된 것과 유사한 수준으로 유의하게 감소시켰다는 것을 보여주었다 (도 19b).

[0437] 실시예 12. 항-CD83 항체의 사용은 마우스를 DSS 유발 결장염으로부터 보호한다

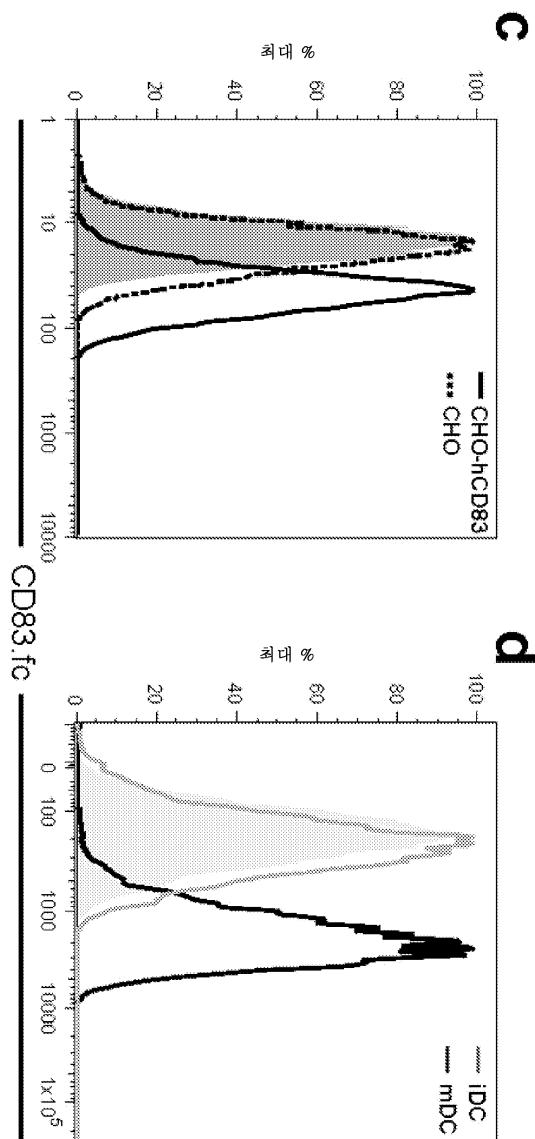
[0438] 염증성 장 질환의 마우스 모델에서 항-CD83 항체 치료의 효과를 평가하기 위해, 텍스트란 황산나트륨 (DSS)으로의 처리에 의해 마우스에서 결장염을 유발하였다. 8-10주령의 FVB 마우스에게 200  $\mu$ g의 항-CD83 항체 39A2, 42C6, 또는 60B10, 또는 대조군 항-gD 항체를 연구의 제-1일, 제1일, 제3일 및 제5일에 1일에 1회 복강내 주사에 의해 제공하였다. 마우스에게 연구의 제0일에 시작하여 7일 동안 음용수 중 6% DSS를 제공하였다. 마우스에게 제7일에 정상 음용수로 바꾸어 제12일에 실험을 중단할 때까지 제공하였다. 이어서, 마우스를 안락사시키고, 소장 및 대장을 절개하고, 조직학적 분석을 위해 H&E로 염색하였다. 절편을 무작위화하고 이중-맹검 스코어링하였다. DSS 단독으로 처리된 마우스로부터의 결장 절편은 8.4의 평균 조직학 스코어를 가졌다 (도 20). 이에 비해, 항-CD83 항체를 제공받은 마우스는 조직학 스코어를 유의하게 감소시켰다. 39A2, 42C6 또는 60B10 항체의 사용은 각각 5.3, 5.5 또는 5.4의 평균 조직학 스코어를 생성하였다.

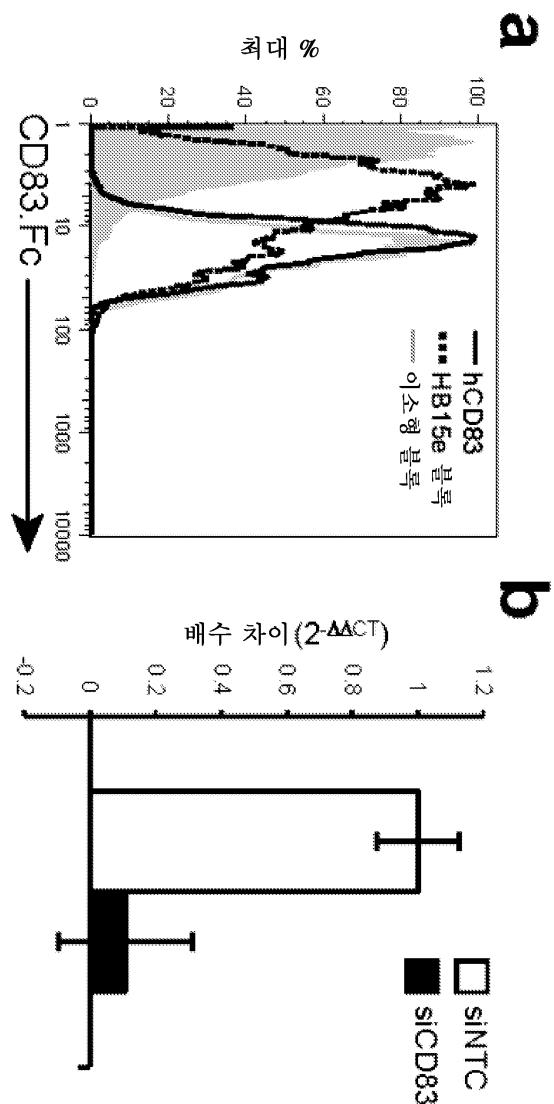
도면

도면*1i*

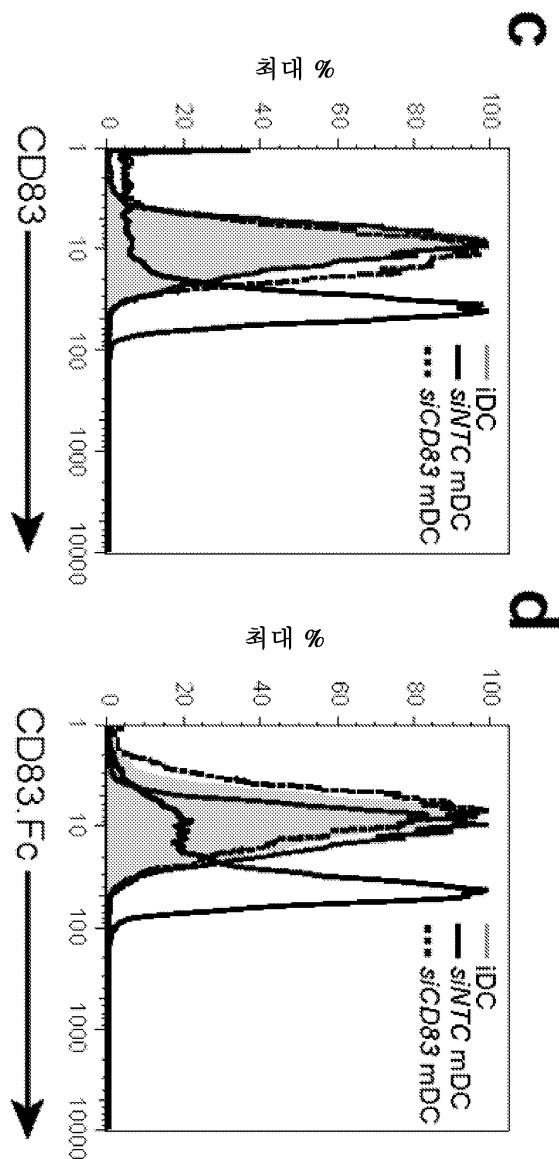


도면1ii

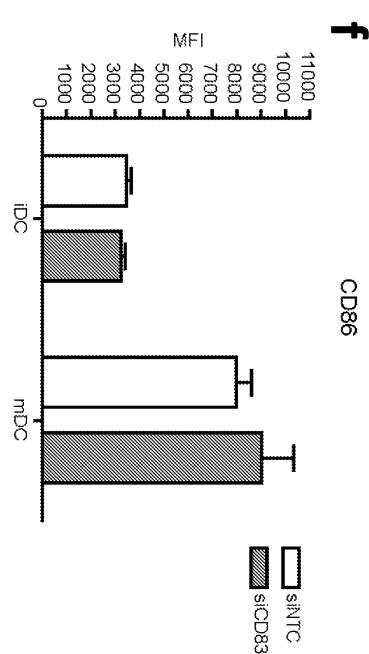
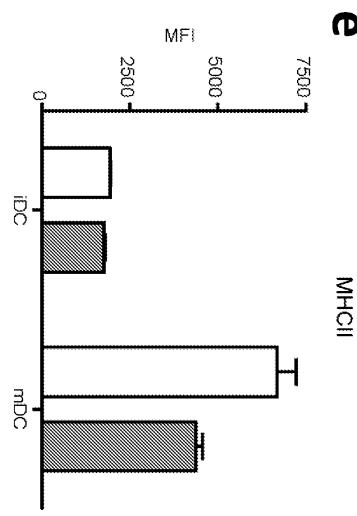


도면2*i*

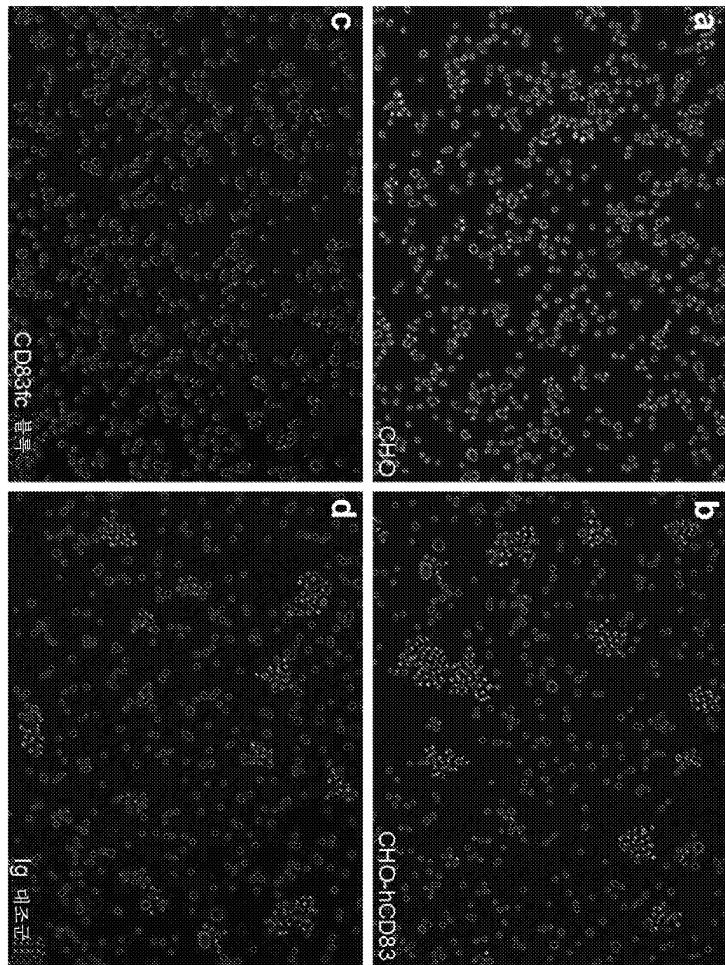
도면2ii



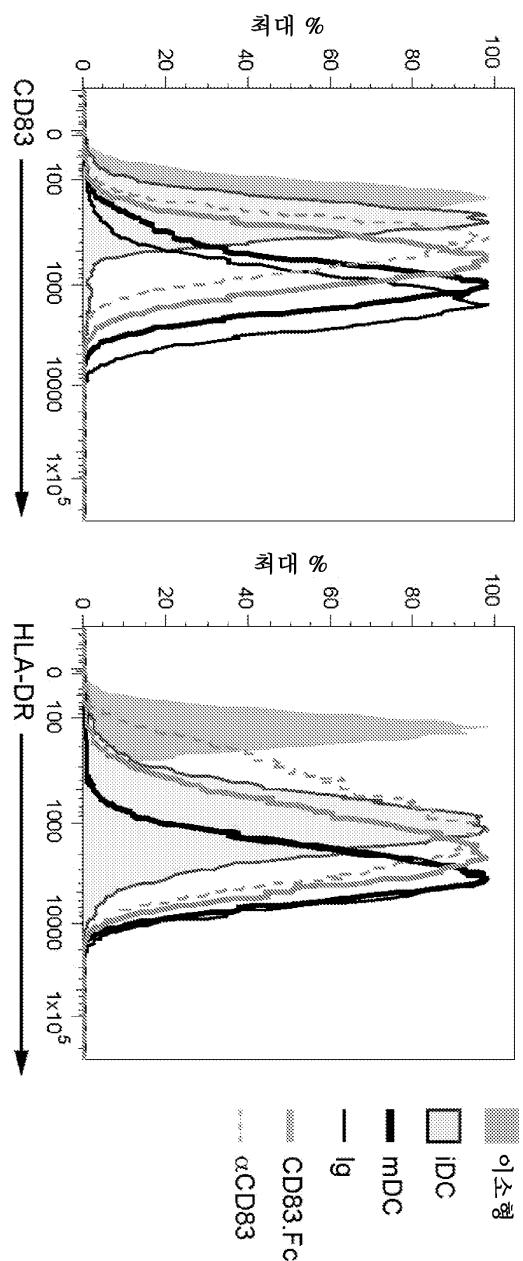
도면2iii



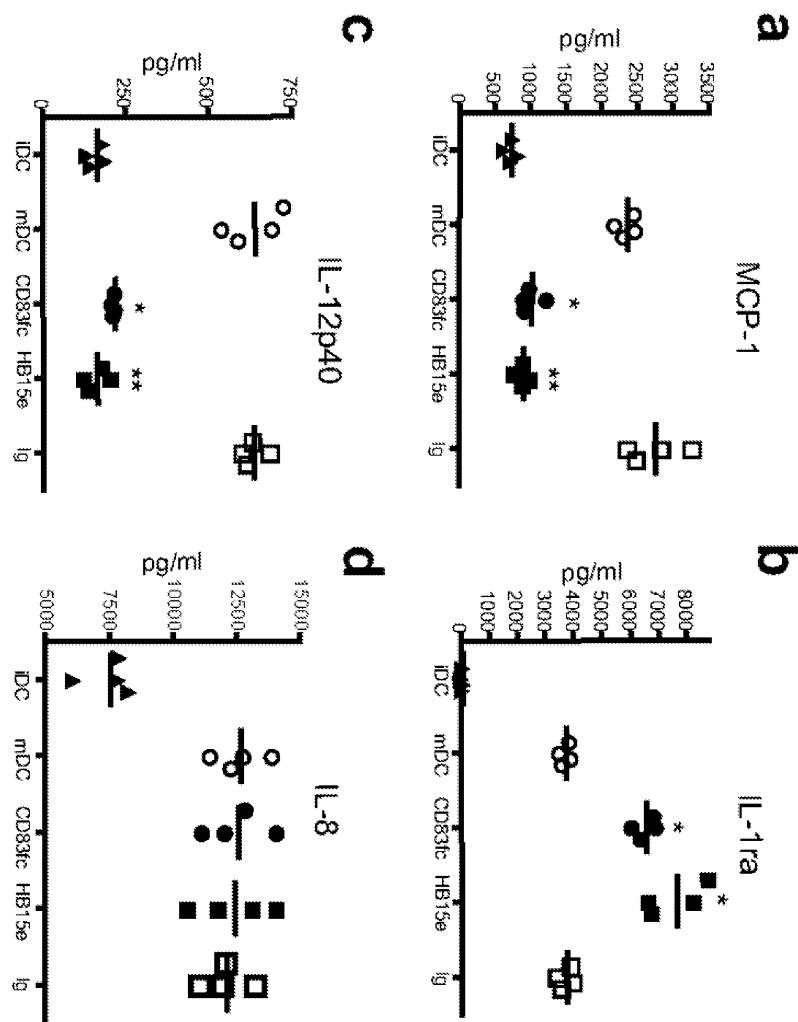
도면3



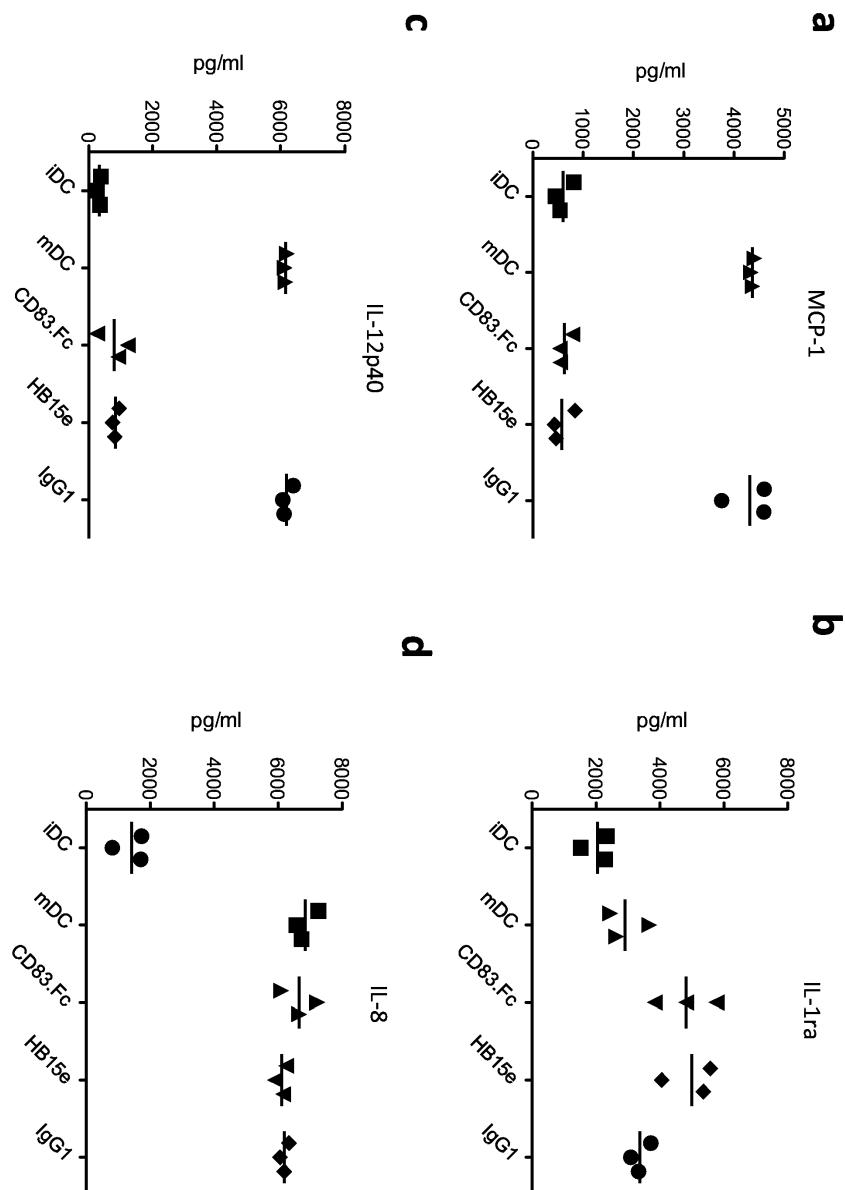
도면4



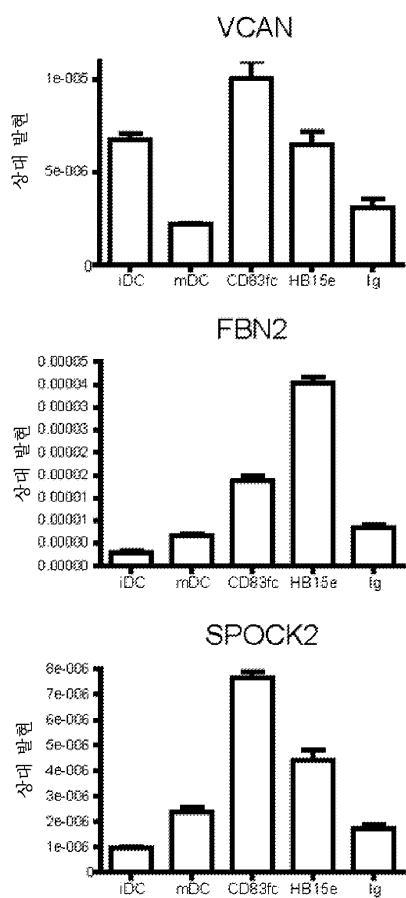
도면5



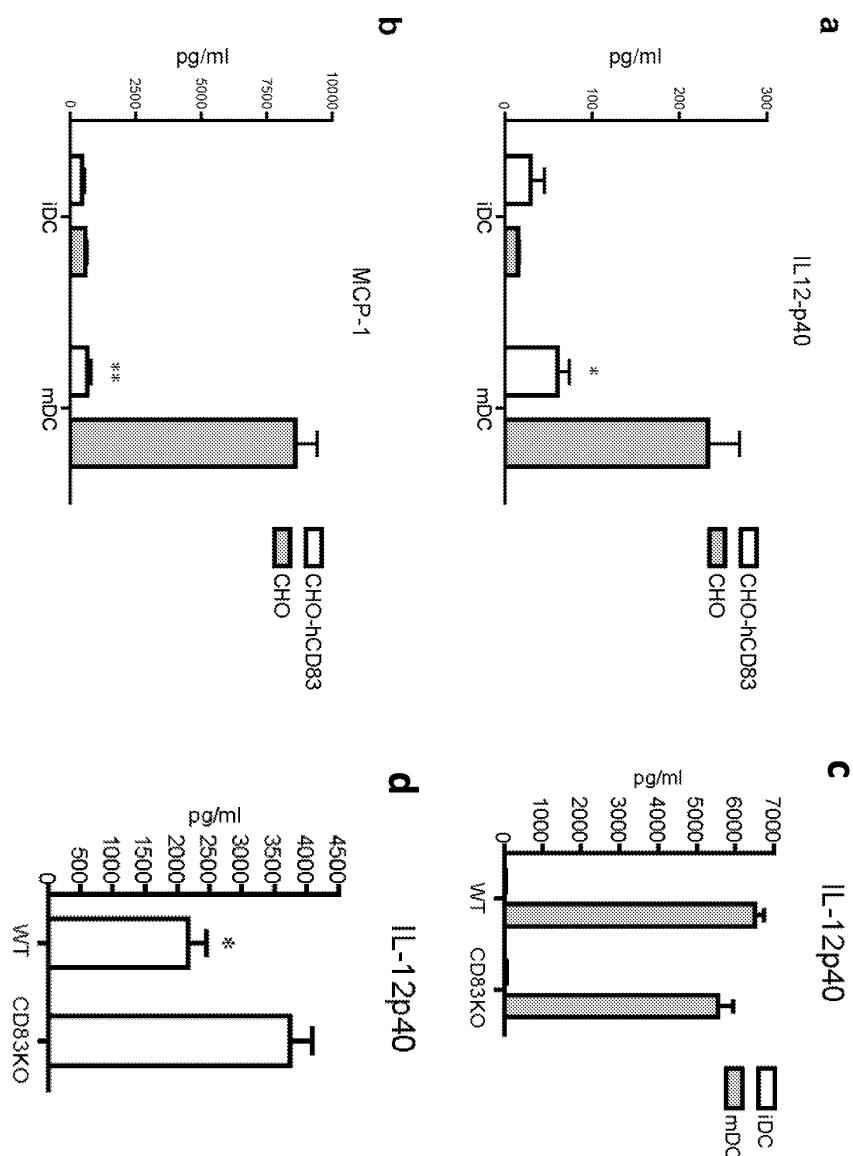
도면6



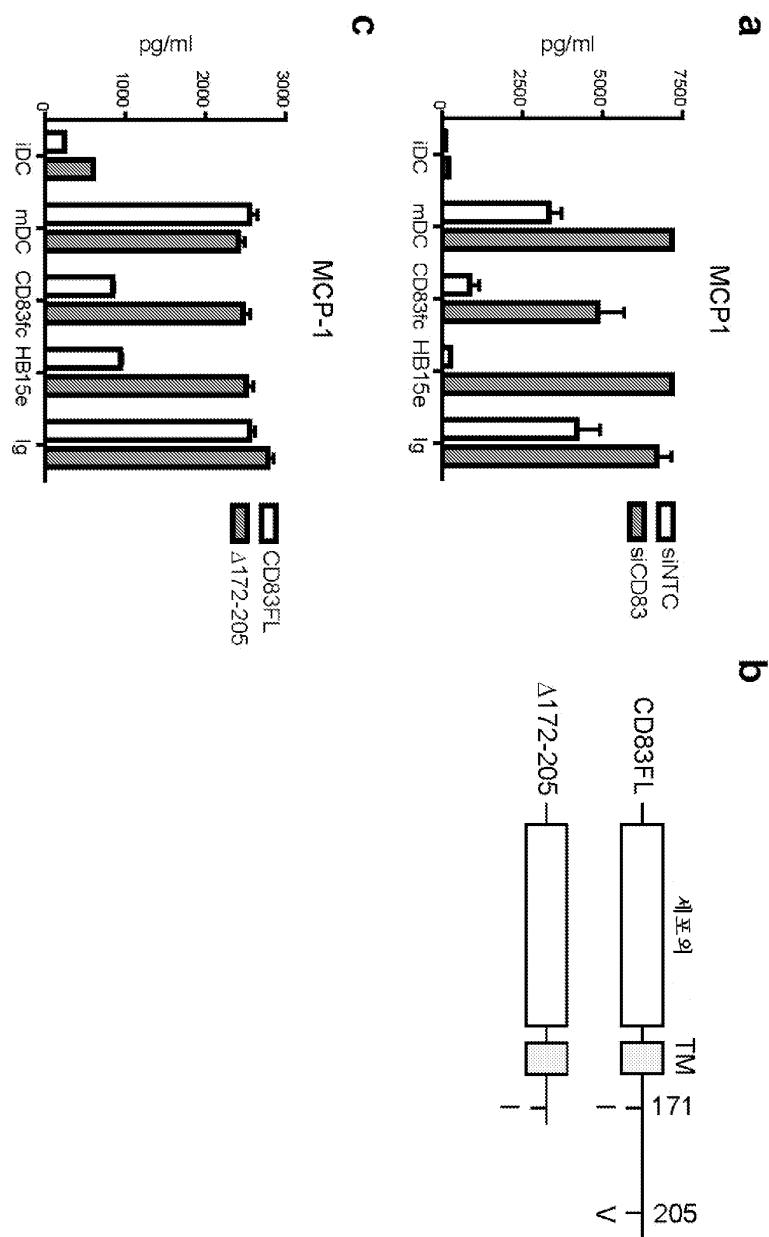
## 도면7



도면8



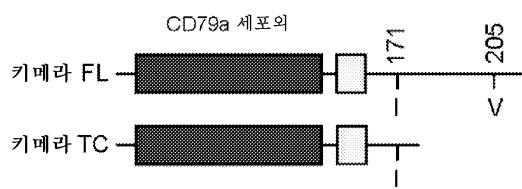
도면9



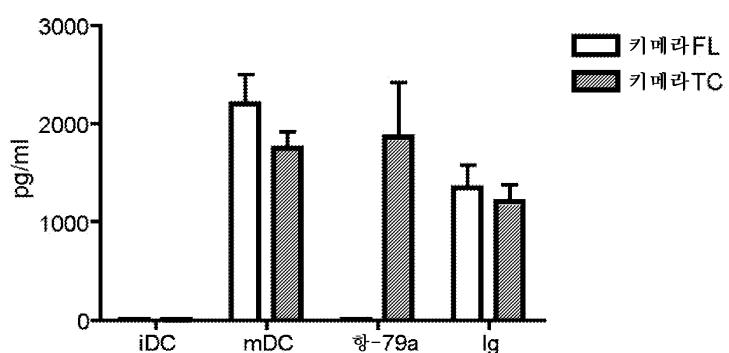
## 도면10

**a**

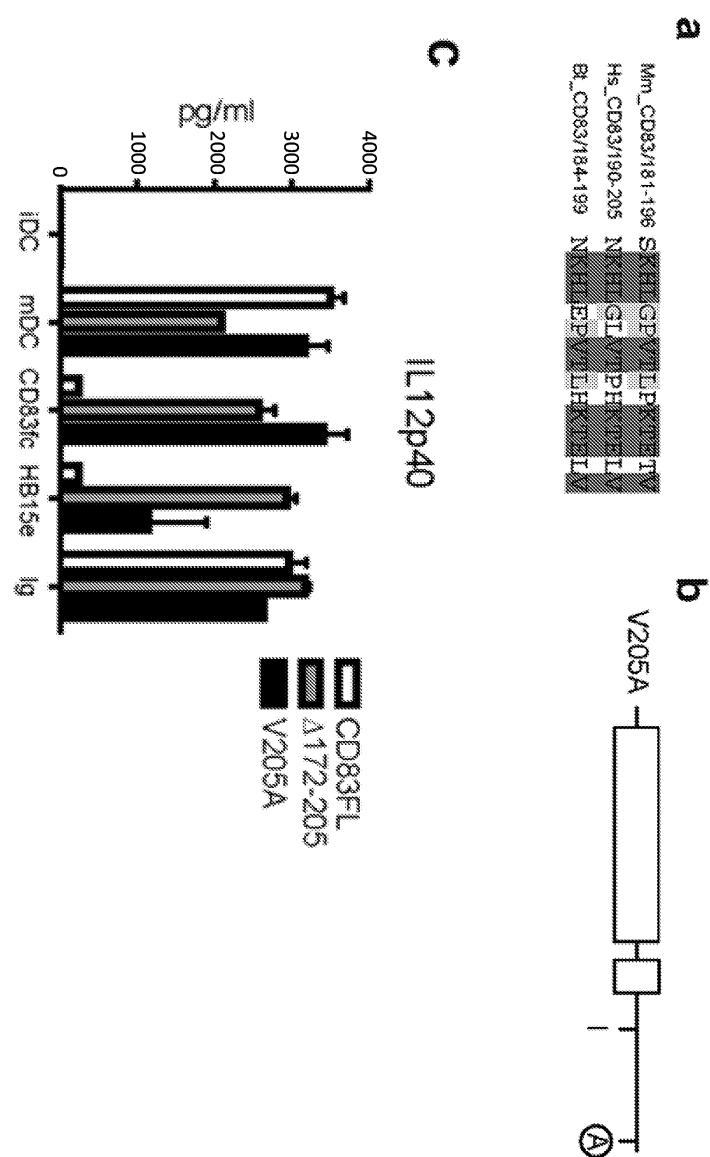
CD83 TM &amp; 세포질

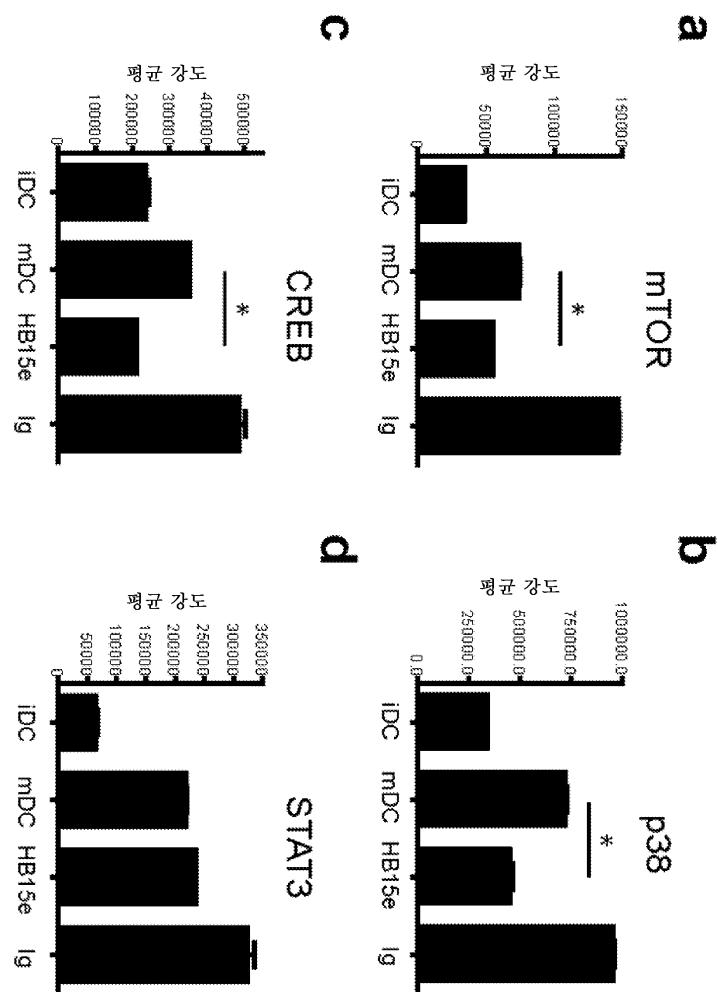
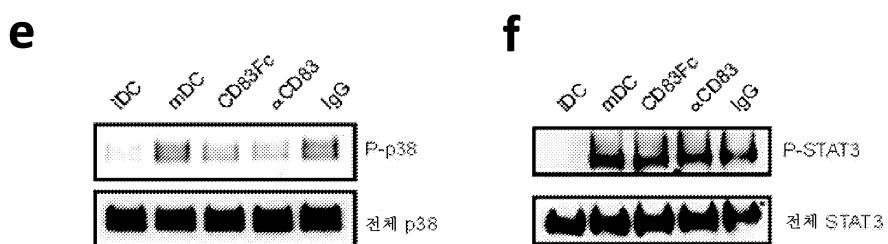
**b**

IL12p40

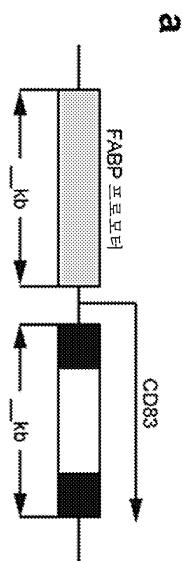
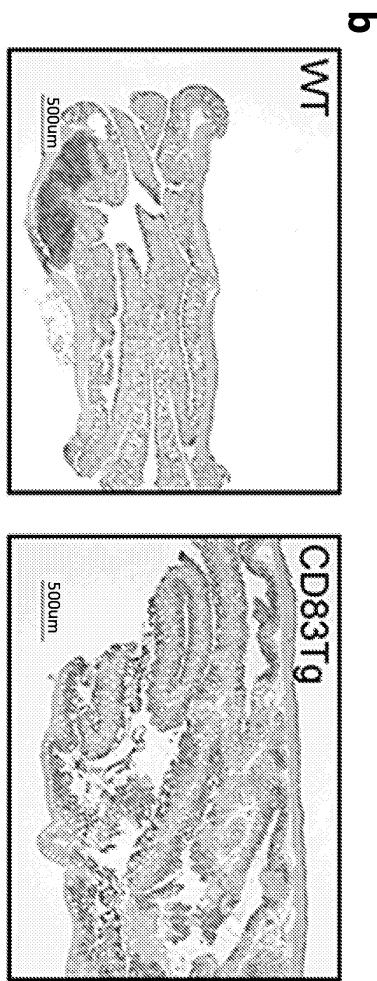


도면11

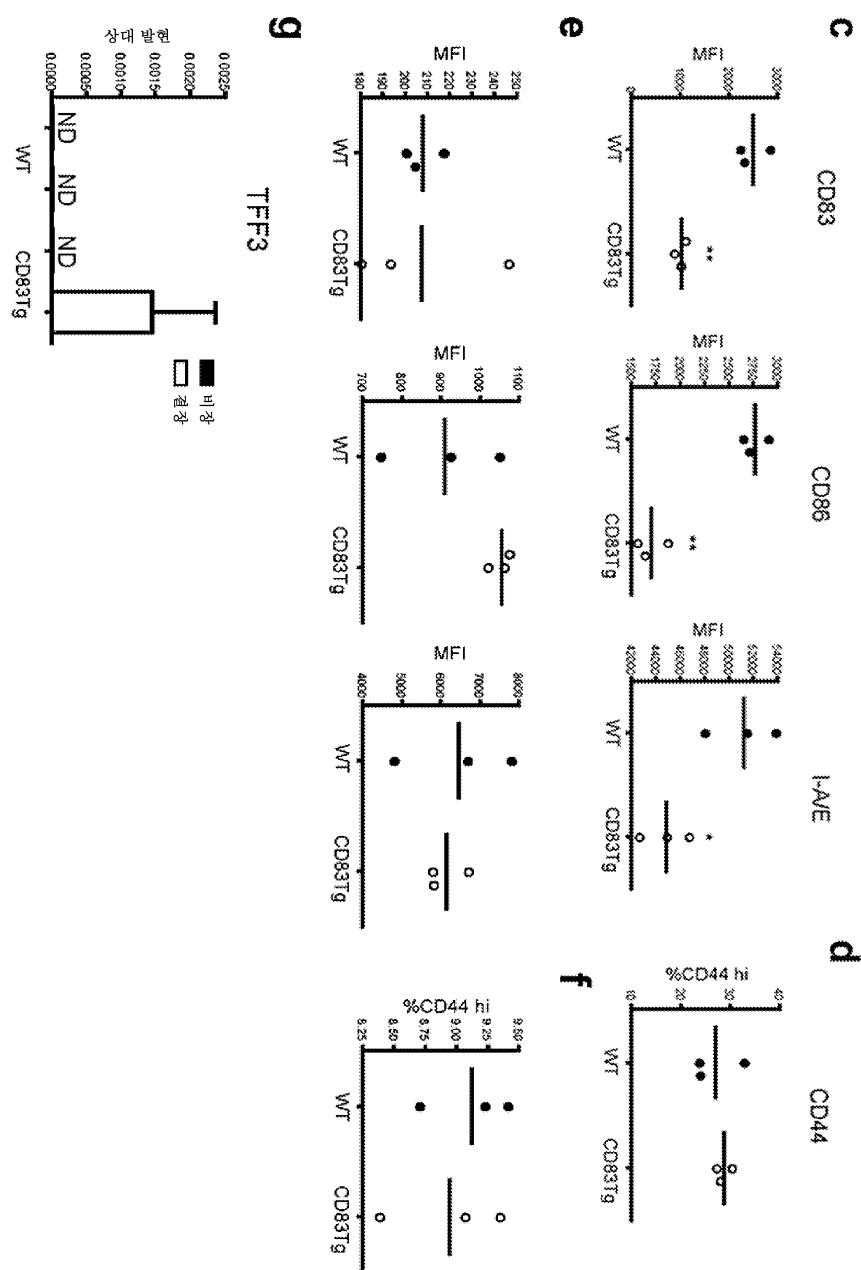


도면12*i*도면12*ii*

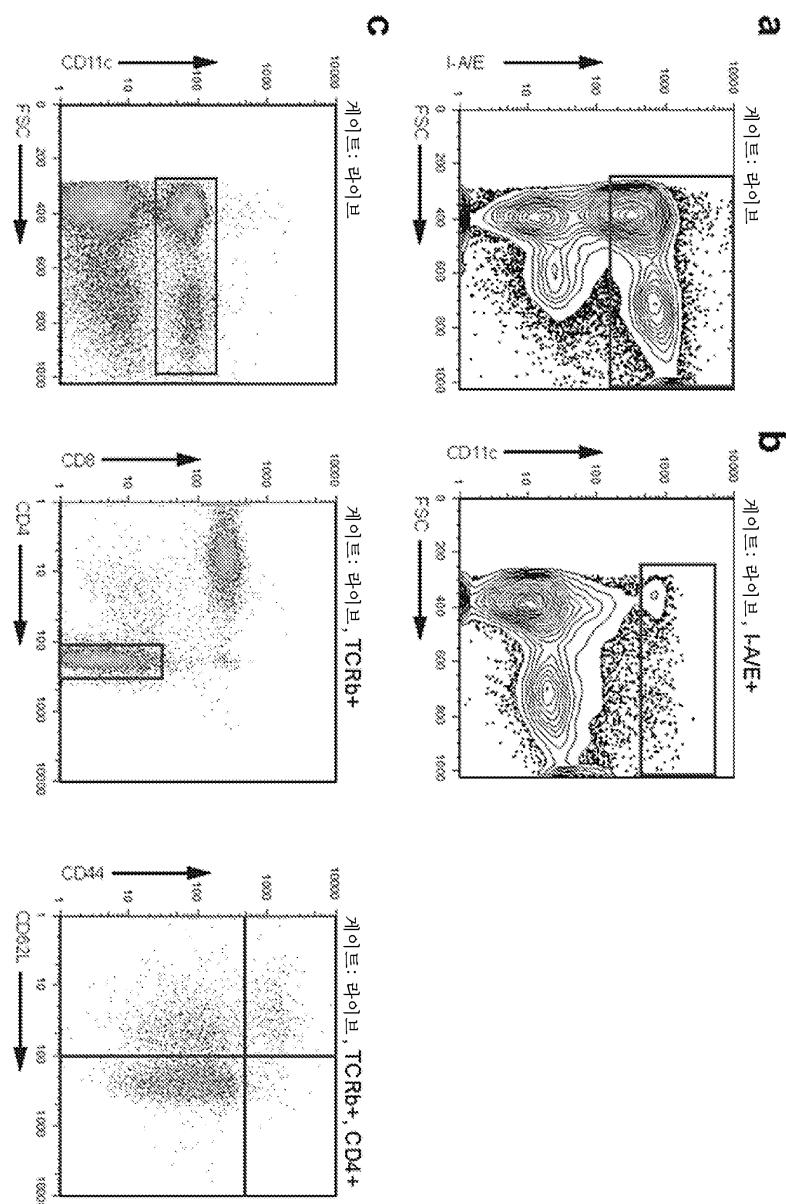
도면13*i*



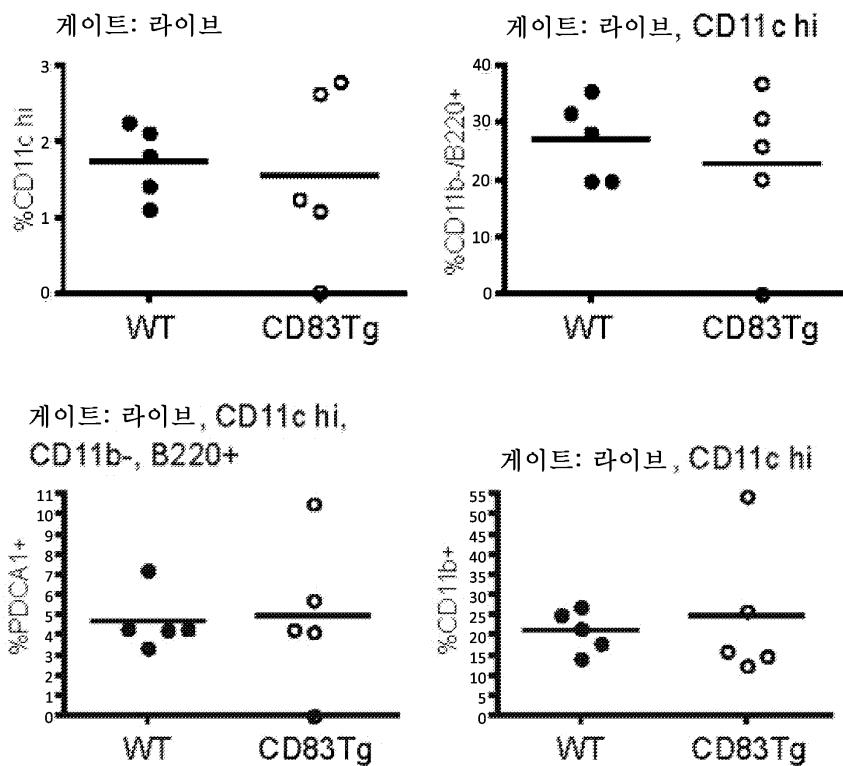
도면13ii



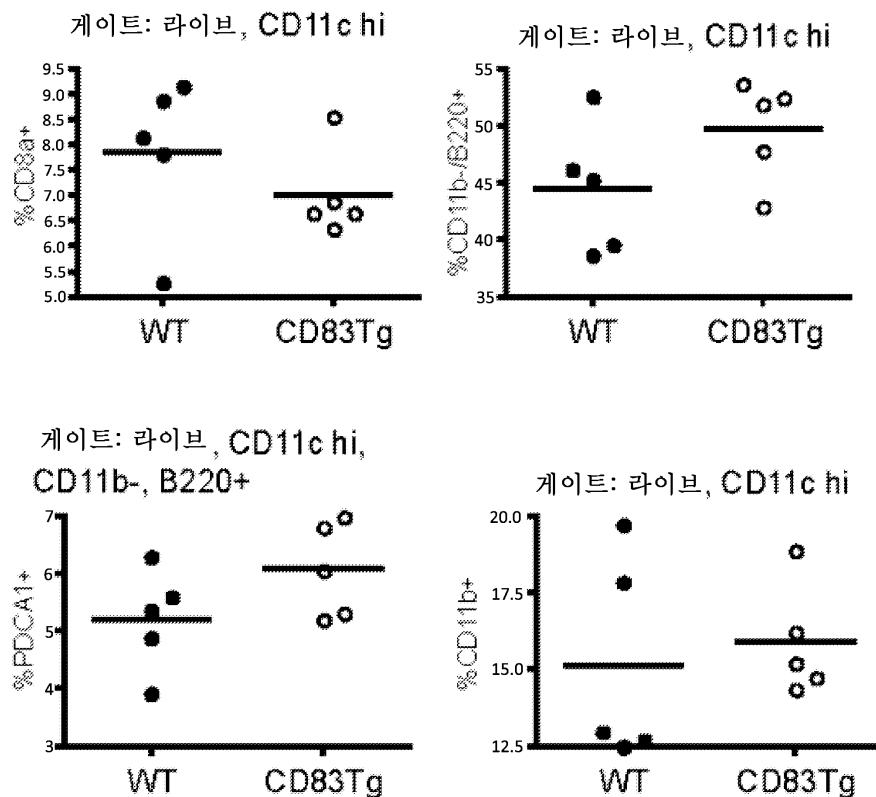
## 도면14i

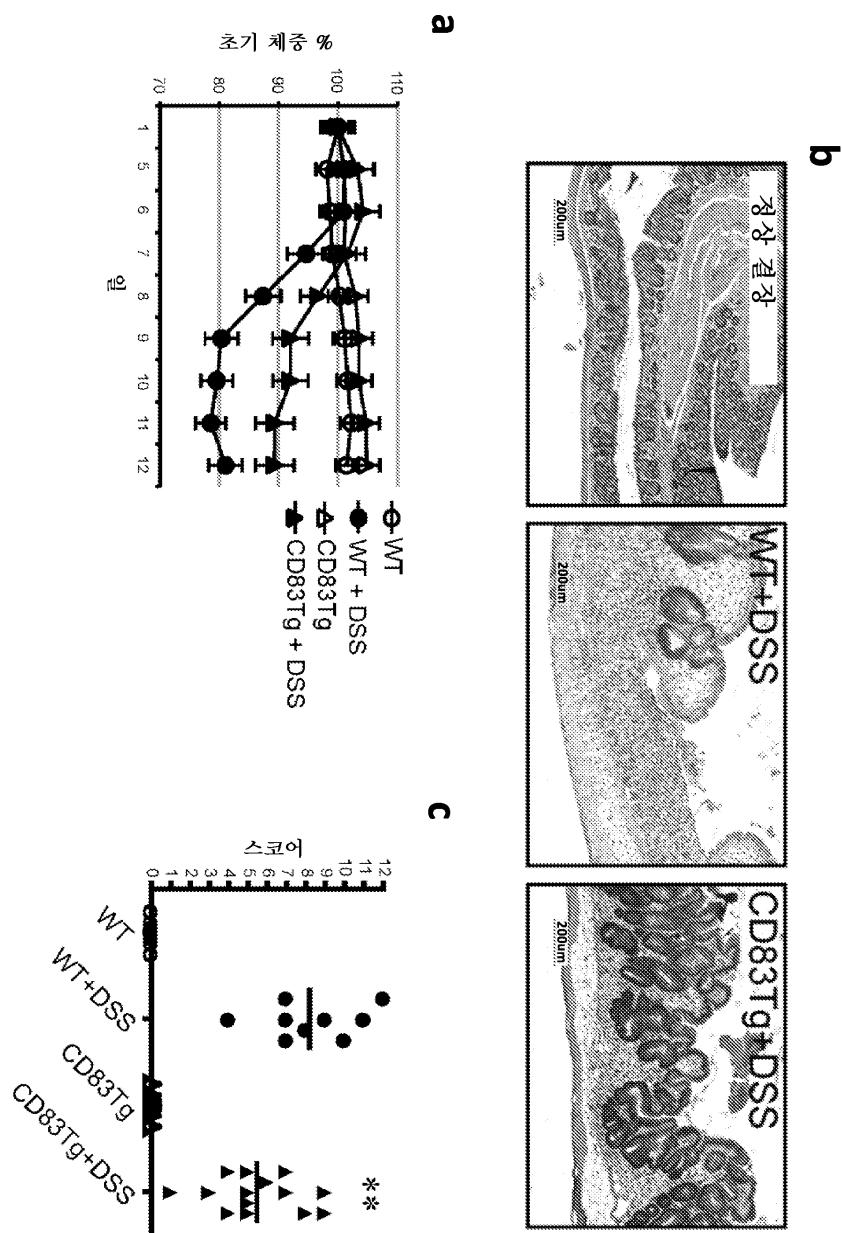


## 도면14ii

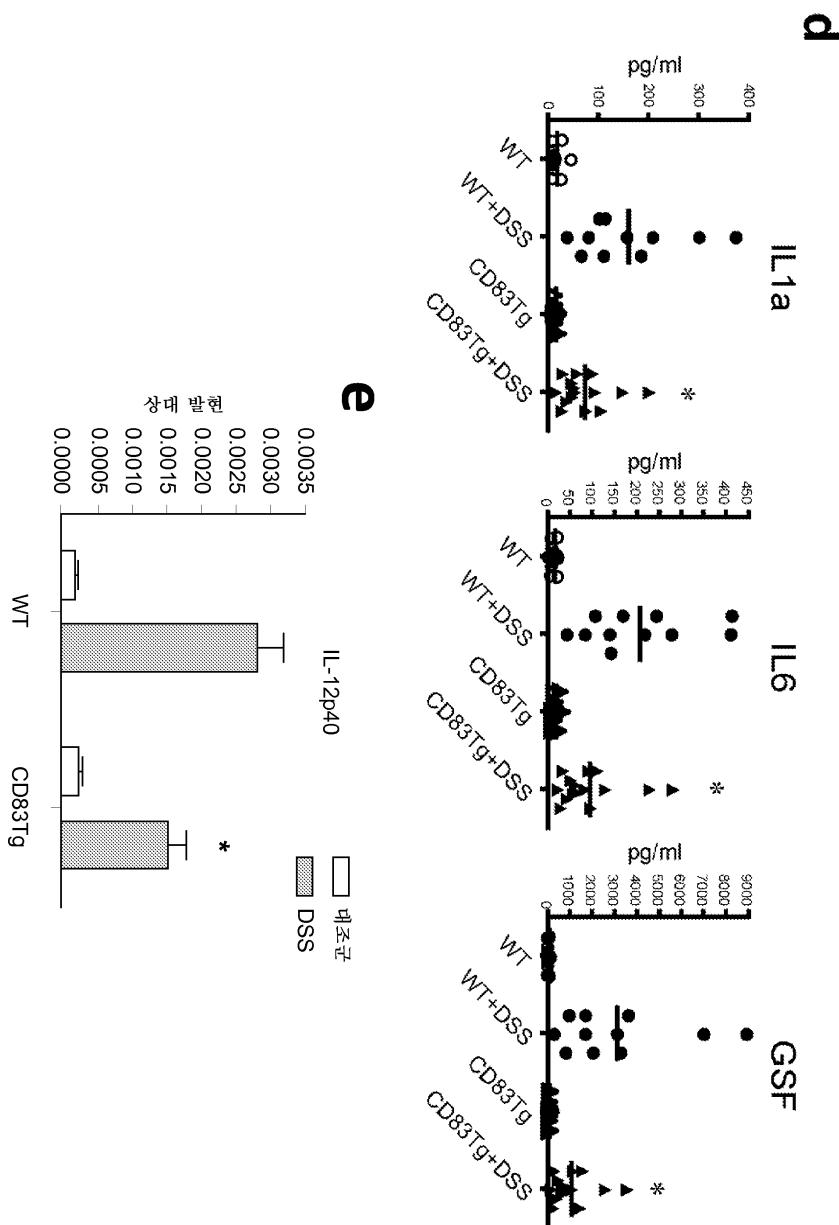
**d**

도면14iii

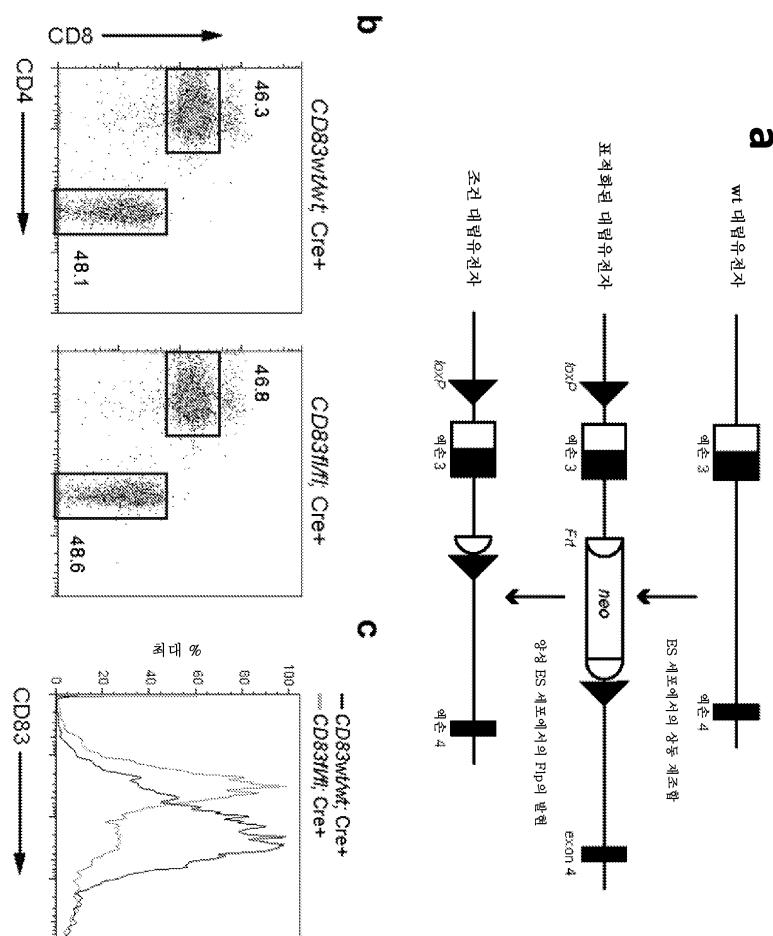
**e**

도면15*i*

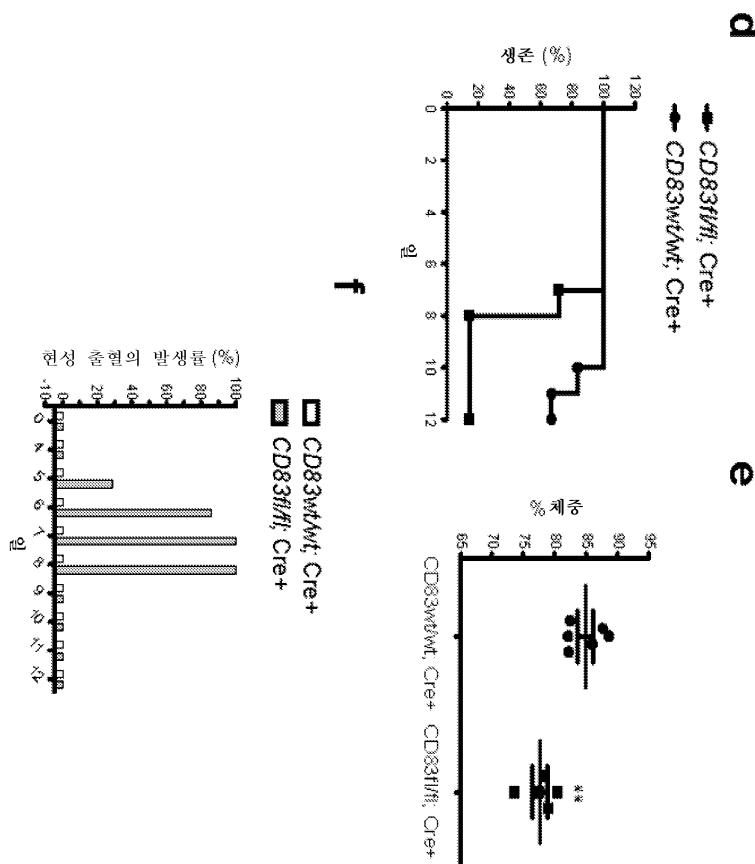
## 도면15ii



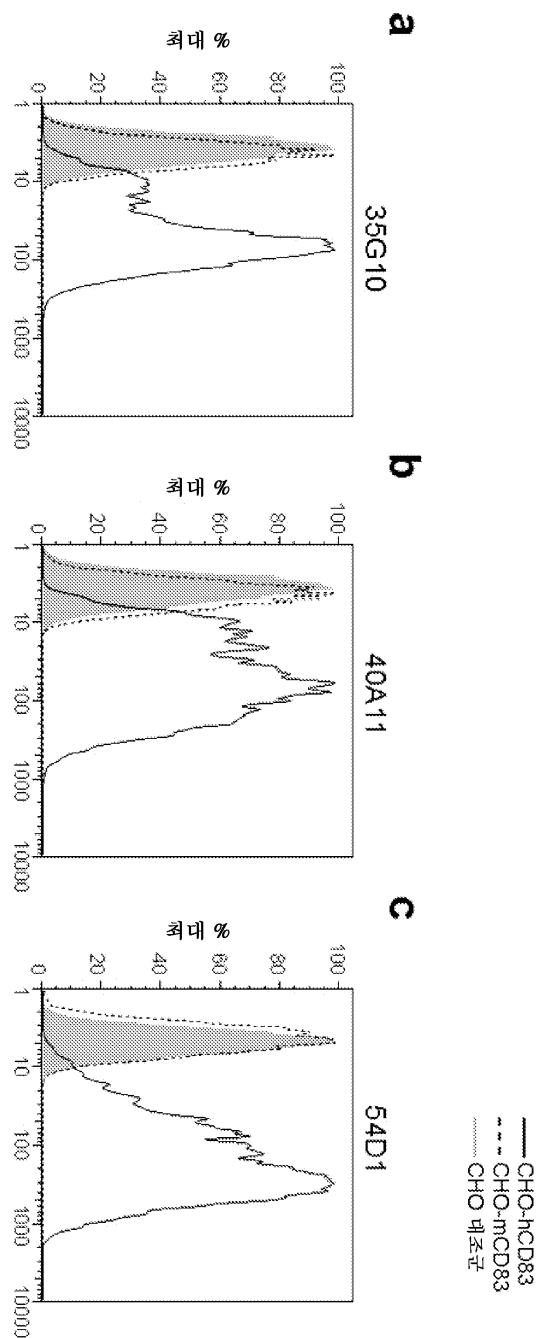
도면16i



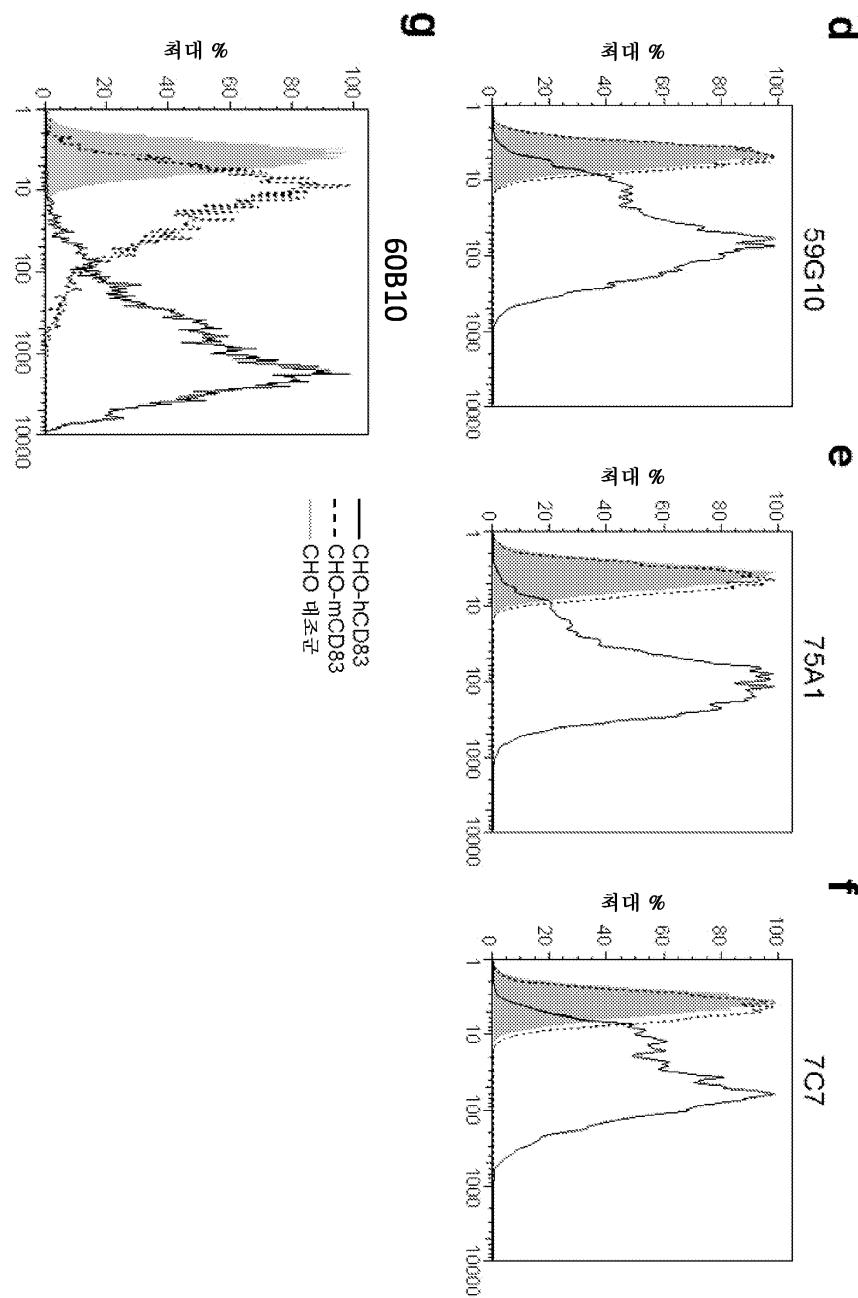
## 도면16ii



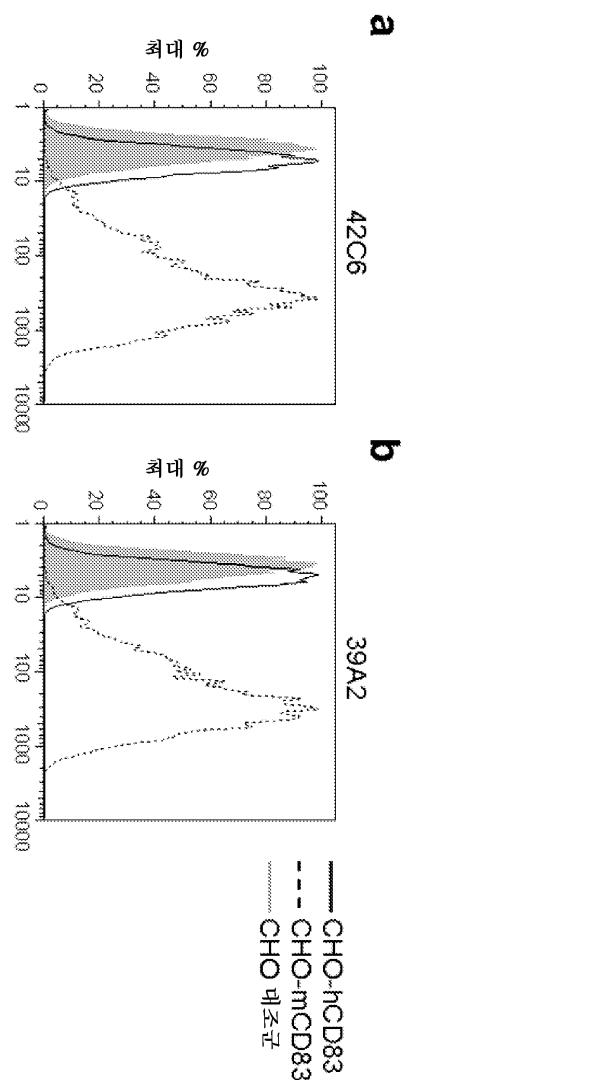
도면17i



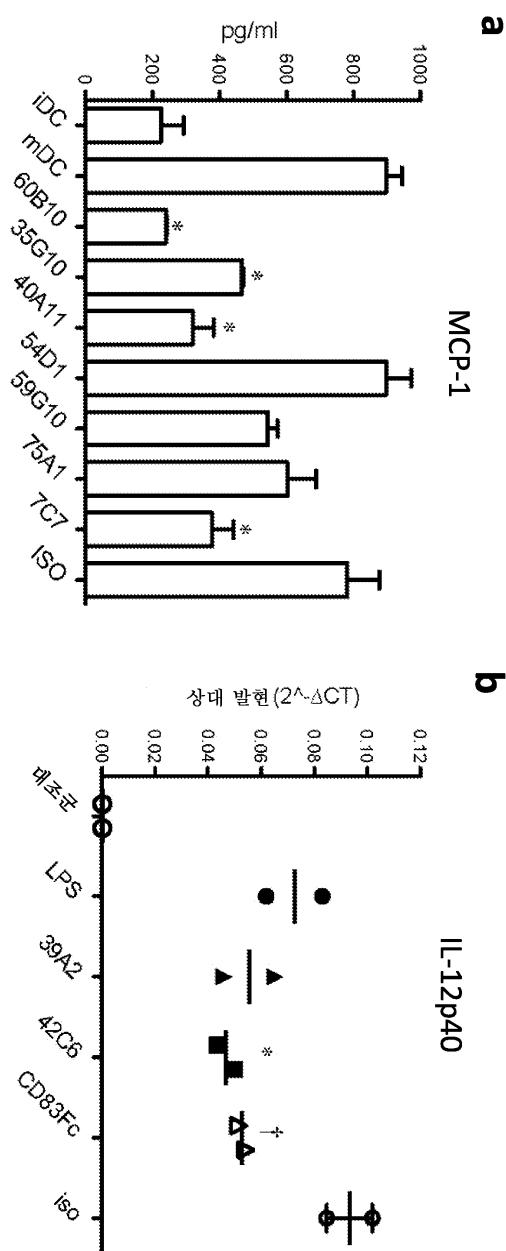
도면17ii



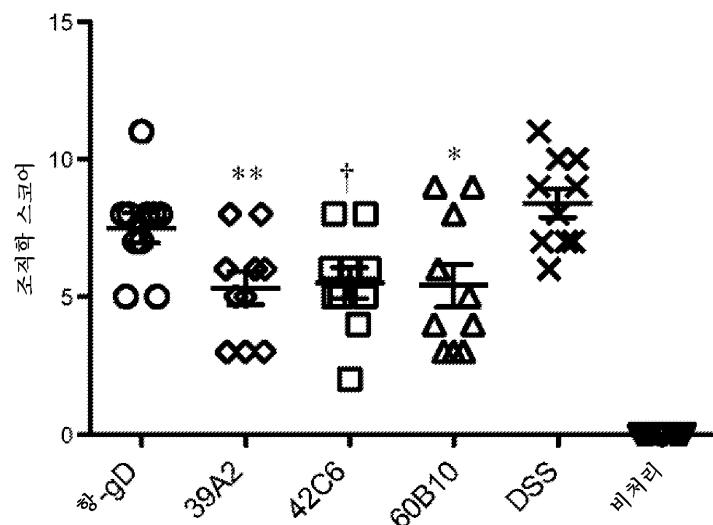
도면18



도면19



## 도면20



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; GENENTECH, INC.

DIEHL, Lauri

BATES, Jennifer

SAI, Tao

&lt;120&gt; USE OF ANTI-CD83 AGONIST ANTIBODIES FOR

TREATING AUTOIMMUNE DISEASES

&lt;130&gt; 14639-2009942

&lt;140&gt; PCT/US2012/45142

&lt;141&gt; 2012-06-29

&lt;150&gt; US 61/504,127

&lt;151&gt; 2011-07-01

&lt;150&gt; JP 2011-285585

&lt;151&gt; 2011-12-27

&lt;160&gt; 44

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 205

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Ser Arg Gly Leu Gln Leu Leu Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Ala Pro Ala Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp

20 25 30

Leu Pro Cys Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser

35 40 45

Trp Val Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln

50 55 60

Glu Asp His Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly

65 70 75 80

Ser Phe Asp Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn

85 90 95

Thr Thr Ser Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro

100 105 110

Asp Gly Gln Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly

115 120 125

Cys Pro Ala Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys Tyr Arg Ala Glu

130 135 140

Ile Val Leu Leu Ala Leu Val Ile Phe Tyr Leu Thr Leu Ile Ile

145 150 155 160

Phe Thr Cys Lys Phe Ala Arg Leu Gln Ser Ile Phe Pro Asp Phe Ser

165 170 175

Lys Ala Gly Met Glu Arg Ala Phe Leu Pro Val Thr Ser Pro Asn Lys

180 185 190

His Leu Gly Leu Val Thr Pro His Lys Thr Glu Leu Val

195 200 205

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

50 55 60

Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser

65 70 75 80

Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln

85 90 95

Arg Asn Leu Ser Gly Lys Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala

100 105 110

Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Lys

115 120

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 358

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 3

Thr Pro Glu Val Lys Val Ala Cys Ser Glu Asp Val Asp Leu Pro Cys

1 5 10 15

Thr Ala Pro Trp Asp Pro Gln Val Pro Tyr Thr Val Ser Trp Val Lys

20 25 30

Leu Leu Glu Gly Gly Glu Arg Met Glu Thr Pro Gln Glu Asp His

35 40 45

Leu Arg Gly Gln His Tyr His Gln Lys Gly Gln Asn Gly Ser Phe Asp

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Ala Pro Asn Glu Arg Pro Tyr Ser Leu Lys Ile Arg Asn Thr Thr Ser |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Cys Asn Ser Gly Thr Tyr Arg Cys Thr Leu Gln Asp Pro Asp Gly Gln |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Arg Asn Leu Ser Gly Val Ile Leu Arg Val Thr Gly Cys Pro Ala     |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Gln Arg Lys Glu Glu Thr Phe Lys Tyr Gly Arg Ala Gln Val Thr     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Asp Lys Ala Ala His Tyr Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr |     |     |
|                                                                 |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 305                    310                    315                    320  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 325                    330                    335  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 340                    345                    350  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 355

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1344

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 4

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctatgtaaagc cttcacatgc aatgtccctc 60  
 acttgctctg tcaatggttt ctccatcacc agtcgttact ggtggacactg gatcaggcag 120  
 ttcccaggga agaacctgga gtggatgggt tacataagtt atagtggtgg caccagctac 180  
 aaccctcccc tcaagagccg catctccatc acccgagaca catccaagaa ccagttttc 240  
 ctgcacctga actctgtgac cactgctgac acagccacat attactgtgc aagagatctc 300  
 tacgttacct actttgatta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360

accaagggcc catcggtcta tccactggct cctgtgtgtg gagatacaac tggctccctcg 420  
 gtgactctag gatgcctggta caagggttat ttccctgagc cagtgcacattt gacctggAAC 480  
 tctggatccc tgtccagtgg tgtgcacacc ttccctgactt cttgcacatc tgacctctac 540  
 accctcagca gtcagtgac tggtaacctcg agcacctggc ccagccagtc catcacctgc 600  
 aatgtggccc acccggcaag cagcaccaag gtggacaaga aaattgagcc cagaggaccc 660  
 acaatcaagc cctgtccctcc atgcaaattgc ccagcaccta acctcttggg tggaccatcc 720  
 gtcttcatct tccctccaaa gatcaaggat gtactcatga tctccctgag ccccatagtc 780  
 acatgtgtgg tggatgtt gaggcaggat gacccagatg tccagatcag ctggtttgt 840

aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca caaaccata gagaggatta caacagtact 900  
 ctacgcgtgg tcagtgccct ccccatccag caccaggact ggatgagtgg caaggagttc 960  
 aaatgcaagg tcaacaacaa agacccatca ggcgcacatcg agagaaccat ctcaaaaccc 1020

aaagggtcag taagagctcc acaggtatat gtcttgcc tc caccagaaga agagatgact 1080  
aagaacagg tcaactgac ctgcattggc acagacttca tgcctgaaga cattacgtg 1140  
gagtggacca aacaacggaa aacagagcta aactacaaga acactgaacc agtccctggac 1200  
tctgaatggtt cttaacttcat gtacagcaag ctgagatgg aaaagaagaa ctgggtggaa 1260  
agaaatagct actcctgttc agtggtccac gagggtctgc acaatcacca cacgactaag 1320

agtttctccc ggactccggg taaa 1344

<210> 5

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Ser Met Ser Leu Thr Cys Ser Val Asn Gly Phe Ser Ile Thr Ser Arg

|    |    |    |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

Tyr Trp Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp

|    |    |    |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

|    |    |    |
|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
|----|----|----|

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

|    |    |    |    |
|----|----|----|----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
|----|----|----|----|

Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

|    |    |    |
|----|----|----|
| 85 | 90 | 95 |
|----|----|----|

Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
|-----|-----|-----|

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Tyr Pro

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 |
|-----|-----|-----|

Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
|-----|-----|-----|

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Glu Phe     |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr |     |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |     |
| Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu |     |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |     |
| Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |     |
| Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn |     |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |     |
| Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys

405 410 415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly

420 425 430

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Met Ser Leu Thr Cys Ser Val Asn Gly Phe Ser Ile Thr Ser Arg

20 25 30

Tyr Trp Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65 70 75 80

Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

Gly Phe Ser Ile Thr Ser Arg Tyr Trp Trp Thr

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Ser

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 9

Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 10

<211> 639

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

cagtatgagc taattcagcc aaagtctgtg tcagagtctc tagggagaac agtaccatc 60

tcctgcaaac gcagcagtgg caacatttga aataactatg tacactggta ccaacagcac 120

tttggaaagct cacccaaaac tgtgatctat gatgacaata aaagaccatc tgggttcct 180  
 cataggttct ctggctccat tgacagctcc tcaaactcag cttccctgac tatcaactgat 240  
 ctgcagattg aagatgaagc tgaatactac tgtcaatctg cttgggtgtt cggttcaggc 300  
 accaaagtga ctgtcctacg cgctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 360  
 agtgagcgt taacatctgg aggtgcctca gtcgtgtgct tcttgaacaa cttctacccc 420  
 aaagacatca atgtcaagtg gaagattgat ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac 480  
 agttggactg atcaggacag caaagacagc acctacagca tgagcagcac cctcacgtt 540  
 accaaggacg agtatgaacg acataacagc tatacctgtg aggccactca caagacatca 600

acttcaccca ttgtcaagag cttcaacagg aatgagtgt 639

<210> 11

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

Gln Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Lys Ser Val Ser Glu Ser Leu Gly Arg

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Thr Val Thr Ile Ser Cys Lys Arg Ser Ser Gly Asn Ile Gly Asn Asn

|    |    |    |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln His Phe Gly Ser Ser Pro Lys Thr Val

|    |    |    |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

Ile Tyr Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro His Arg Phe Ser

|    |    |    |
|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
|----|----|----|

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Asp

|    |    |    |    |
|----|----|----|----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
|----|----|----|----|

Leu Gln Ile Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Trp Val

|    |    |    |
|----|----|----|
| 85 | 90 | 95 |
|----|----|----|

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Ala Asp Ala Ala Pro

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
|-----|-----|-----|

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn

130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn

145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr

180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

Gln Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Lys Ser Val Ser Glu Ser Leu Gly Arg

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Lys Arg Ser Ser Gly Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln His Phe Gly Ser Ser Pro Lys Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro His Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Asp

65 70 75 80

Leu Gln Ile Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Trp Val

|    |    |    |
|----|----|----|
| 85 | 90 | 95 |
|----|----|----|

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

|     |     |  |
|-----|-----|--|
| 100 | 105 |  |
|-----|-----|--|

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

Lys Arg Ser Ser Gly Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val His

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser

|   |   |  |
|---|---|--|
| 1 | 5 |  |
|---|---|--|

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

Gln Ser Ala Trp Val

|   |   |  |
|---|---|--|
| 1 | 5 |  |
|---|---|--|

<210> 16

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 16

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctagtgaagc cttcacatgc aatgtccctc 60  
 acttgctctg tcaatggttt ctccatcacc agtcgttact ggtggacctg gatcaggcag 120

ttcccaggga agaacctgga gtggatgggt tacataagtt atagtggtg caccagctac 180  
 aaccctccc tcaagagccg catctccatc acccgagaca catccaagaa ccagttttc 240  
 ctgcacctga actctgtgac cactgctgac acagccacat attactgtgc aagagatctc 300  
 tacggtaacct acittgatta ctggggccaa ggaaccatgg tcaccgtctc ctcaagctcc 360  
 accaagggcc catcggtcta tccactggct cctgtgtgtg gagatacaac tggctctcg 420  
 gtgactctag gatgcctggt caagggttat ttccctgagc cagtgacctt gacgtggaa 480  
 tctggatccc tgtccagtgg tgtgcacacc ttcccaagctg tcctgcagtc tgacctctac 540  
 accctcagca gctcagtgc tgcataacctcg agcacctggc ccagccagtc catcacctgc 600

aatgtggccc accccgcaag cagcaccaag gtggacaaga aaattgagcc cagaggaccc 660  
 acaatcaagc cctgtccctcc atgcaaatgc ccagcaccta acctcttggg tggaccatcc 720  
 gtcttcatct tccctccaaa gatcaaggat gtactcatga tctccctgag ccccatagtc 780  
 acatgtgtgg tggtgatgt gaggcgaggat gacccagatg tccagatcag ctggtttg 840  
 aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca caaaccata gagaggatta caacagtact 900  
 ctacgcgtgg tcagtgccct ccccatccag caccaggact ggatgagtg caaggagttc 960  
 aaatgcaagg tcaacaacaa agacctccca ggcgcacatcg agagaaccat ctcaaaaccc 1020  
 aaagggtcag taagagctcc acaggtatat gtcttgccctc caccagaaga agagatgact 1080

aagaaacagg tcactctgac ctgcatggtc acagacttca tgcctgaaga catttacgt 1140  
 gagttggacca acaacggaa aacagagctt aactacaaga acactgaacc agtccctggac 1200  
 tctgtatggtt ctacttcat gtacagcaag ctgagatgg aaaagaagaa ctgggtggaa 1260  
 agaaaatagct actctgttc agtggtccac gagggtctgc acaatcacca cacgactaag 1320  
 agtttctccc ggactccggg taaa 1344

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 17

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

|                                                                     |     |     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 1                                                                   | 5   | 10  | 15  |
| Ser Met Ser Leu Thr Cys Ser Val Asn Gly Phe Ser Ile Thr Ser Arg     |     |     |     |
| 20                                                                  | 25  | 30  |     |
| Tyr Trp Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp     |     |     |     |
| 35                                                                  | 40  | 45  |     |
| Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu     |     |     |     |
| 50                                                                  | 55  | 60  |     |
| Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe     |     |     |     |
| <br>                                                                |     |     |     |
| 65                                                                  | 70  | 75  | 80  |
| Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys     |     |     |     |
| 85                                                                  | 90  | 95  |     |
| Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr     |     |     |     |
| 100                                                                 | 105 | 110 |     |
| Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Tyr Pro     |     |     |     |
| 115                                                                 | 120 | 125 |     |
| Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly     |     |     |     |
| <br>                                                                |     |     |     |
| 130                                                                 | 135 | 140 |     |
| Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn     |     |     |     |
| 145                                                                 | 150 | 155 | 160 |
| Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln     |     |     |     |
| 165                                                                 | 170 | 175 |     |
| Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr     |     |     |     |
| 180                                                                 | 185 | 190 |     |
| Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser     |     |     |     |
| <br>                                                                |     |     |     |
| 195                                                                 | 200 | 205 |     |
| Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro     |     |     |     |
| 210                                                                 | 215 | 220 |     |
| Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Val Leu Leu Gly Gly Pro Ser |     |     |     |
| 225                                                                 | 230 | 235 | 240 |

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu

245 250 255

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro

260 265 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala

275 280 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val

290 295 300

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr

325 330 335

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu

340 345 350

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys

355 360 365

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn

370 375 380

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys

405 410 415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly

420 425 430

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 18

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

|   |   |    |    |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|----|----|

Ser Met Ser Leu Thr Cys Ser Val Asn Gly Phe Ser Ile Thr Ser Arg

|    |    |    |
|----|----|----|
| 20 | 25 | 30 |
|----|----|----|

Tyr Trp Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp

|    |    |    |
|----|----|----|
| 35 | 40 | 45 |
|----|----|----|

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

|    |    |    |
|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
|----|----|----|

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

|    |    |    |    |
|----|----|----|----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
|----|----|----|----|

Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

|    |    |    |
|----|----|----|
| 85 | 90 | 95 |
|----|----|----|

Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 |
|-----|-----|-----|

Met Val Thr Val Ser Ser

|     |
|-----|
| 115 |
|-----|

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

Gly Phe Ser Ile Thr Ser Arg Tyr Trp Trp Thr

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

&lt;400&gt; 20

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Ser

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 21

Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Thr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 639

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 22

cagtatgagc taattcagcc aaagtctgtg tcagagtctc tagggagaac agtcaccatc 60

tcctgcaaac gcagcagtgg caacatttggaa aataactatg tacactggta ccaacagcac 120

tttggaaagct cacccaaaac tgtgatctat gatgacaata aaagaccatc tggggttcct 180

cataggttct ctggctccat tgacagctcc tcaaactcag ctccctgac tatcactgat 240

ctgcagattg aagatgaagc tgaatactac tgtcaatctg cttgggtgtt cggttcaggc 300

acccaaagtga ctgtcctacg cgctgatgtc gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 360

agtgagcagt taacatctgg aggtgcctca gtcgtgtgt tcttgaacaa cttctacccc 420

aaagacatca atgtcaagtg gaagattgat ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac 480

agttggactg atcaggacag caaagacagc acctacagca tgagcagcac cctcacgttg 540

accaaggacg agtatgaacg acataacagc tatacctgtg aggccactca caagacatca 600

acttcaccca ttgtcaagag cttcaacagg aatgagtgt 639

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 213

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 23

Gln Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Lys Ser Val Ser Glu Ser Leu Gly Arg

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Lys Arg Ser Ser Gly Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln His Phe Gly Ser Ser Pro Lys Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro His Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Asp

65 70 75 80

Leu Gln Ile Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Trp Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Arg Ala Asp Ala Ala Pro

100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn

130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn

145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr

180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 24

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

Gln Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Lys Ser Val Ser Glu Ser Leu Gly Arg

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Lys Arg Ser Ser Gly Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln His Phe Gly Ser Ser Pro Lys Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro His Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Asp

65 70 75 80

Leu Gln Ile Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Trp Val

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

Lys Arg Ser Ser Gly Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val His

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 27

Gln Ser Ala Trp Val

1 5

<210> 28

<211> 1350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctctgtgaagc cttcacatgc actgtccctc 60

acttgctctg tcactggttt ctccatcacc accgggtggtt actgggtggac ctggatcagg 120

cagttcccg ggcagaagct ggagtggatg gggtacatat tttagtagtgg taacaccaac 180

tacaacccat ccatcaagag ccgcatactcc ataaccagag acacatccaa gaaccaggta 240

ttccctgcagc tgaactctgt gactactgag ggggacacag ccagatatta ttgtgcaagg 300

gcctacggta agttaggctt tgattactgg ggccaaggaa ccctggcac cgtctccta 360

gcctccacca agggccatc ggtctatcca ctggctccctg tgtgtggaga tacaactggc 420

tcctcggtga ctctaggatg cctggtaag gtttatttcc ctgagccagt gacccgtacc 480  
 tggactctg gatccctgtc cagtggtgtg cacacccccc cagctgtcct gcagtctgac 540  
 ctctacaccc tcagcagctc agtgactgtaa acctcgagca cctggccccc ccagtccatc 600  
 acctgcaatg tgccccaccc ggcaagcagc accaagggtgg acaagaaaat tgagcccaaga 660  
 ggaccacaa tcaagccctg tcctccatgc aaatgccca gacctaacct cttgggtgga 720

ccatccgtct tcatcttccc tccaaagatc aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc 780  
 atagtcacat gtgtgggtggt ggatgtgagc gaggatgacc cagatgtcca gatcagctgg 840  
 tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa cccatagaga ggattacaac 900  
 agtactctac gctgttgtcag tgccctcccc atccagcacc aggactggat gatggcaag 960  
 gagttcaaata gcaaggtaa caacaaagac ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca 1020  
 aaacccaaag ggtcagtaag agtccacag gtatatgtct tgctccacc agaagaagag 1080  
 atgactaaga aacaggtcac tctgacctgc atggcacag acttcatgcc tgaagacatt 1140  
 tacgtggagt ggaccaacaa cggaaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc 1200

ctggactctg atggttctta cttcatgtac agcaagctga gagtgaaaaaa gaagaactgg 1260  
 gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg 1320  
 actaagagct tctccggac tccggtaaa 1350

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 29

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Thr Gly

20 25 30

Gly Tyr Trp Trp Trp Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Gln Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Met Gly Tyr Ile Phe Ser Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Ile Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Gly Asp Thr Ala Arg Tyr |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Gly Lys Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |
| Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |     |
| Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile |     |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |     |
| Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp |     |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |     |
| Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His |     |     |     |
|                                                                 |     |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |     |
| Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg |     |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |     |
| Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |

Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu

355 360 365

Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp

370 375 380

Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val

385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu

405 410 415

Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His

420 425 430

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 30

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Thr Gly

20 25 30

Gly Tyr Trp Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Gln Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Met Gly Tyr Ile Phe Ser Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser

|                                                                 |     |     |    |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|----|
| 50                                                              | 55  | 60  |    |
| Ile Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe |     |     |    |
|                                                                 |     |     |    |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80 |
| Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Gly Asp Thr Ala Arg Tyr |     |     |    |
|                                                                 |     |     |    |
| 85                                                              | 90  | 95  |    |
| Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Gly Lys Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln |     |     |    |
|                                                                 |     |     |    |
| 100                                                             | 105 | 110 |    |
| Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser                                 |     |     |    |
|                                                                 |     |     |    |
| 115                                                             | 120 |     |    |
| <210> 31                                                        |     |     |    |
| <211> 12                                                        |     |     |    |
| <212> PRT                                                       |     |     |    |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |    |
| <220>                                                           |     |     |    |
| <223> Synthetic Construct                                       |     |     |    |
| <400> 31                                                        |     |     |    |
| Gly Phe Ser Ile Thr Thr Gly Gly Tyr Trp Trp Thr                 |     |     |    |
|                                                                 |     |     |    |
| 1                                                               | 5   | 10  |    |
| <210> 32                                                        |     |     |    |
| <211> 17                                                        |     |     |    |
| <212> PRT                                                       |     |     |    |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |    |
| <220>                                                           |     |     |    |
| <223> Synthetic Construct                                       |     |     |    |
| <400> 32                                                        |     |     |    |
| Gly Tyr Ile Phe Ser Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Ile Lys |     |     |    |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15 |
| Ser                                                             |     |     |    |
|                                                                 |     |     |    |
| <210> 33                                                        |     |     |    |
| <211> 12                                                        |     |     |    |
| <212> PRT                                                       |     |     |    |
| <213> Artificial Sequence                                       |     |     |    |

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 33

Cys Ala Arg Ala Tyr Gly Lys Leu Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 654

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 34

```

caacctgtgc tgactcagtc accctctgcc tctgcctccc tggaaactc agtcaaaaatc 60
acctgtaccc ttagtagtca gcacagcacc tataccatg gttggtagcca gcaacatcca 120
gacaaggctc ctaagtatgt gatgtatgtt aatagtgtatg gaagccacag caagggggat 180
gggatccctg atcgcttctc tggctccagc tctggggctc atcgttactt aagcatctcc 240
aacattcagc ctgaagatga agctgactat ttcttggtt cttctgatag cagtggtagt 300
gttttggca gcgaaaccca gtcaccgtc ctacgcgtc atgctgcacc aactgtatcc 360

```

```

atctcccac catccagtga gcagtttaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgccttttgc 420
aacaaccttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaaga ttgatggcag tgaacgacaa 480
aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 540
agcaccctca cgttgaccaa ggacgagttt gAACGACATA ACAGCTATAC CTGTGAGGCC 600
actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagttca acaggaatga gtgt 654

```

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 35

Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Asn

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
 20 25 30  
 Ile Gly Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys Tyr Val Met  
 35 40 45  
 Tyr Val Asn Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala His Arg Tyr Leu Ser Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gly Ser Ser Asp  
 85 90 95  
 Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Arg  
 100 105 110  
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln  
 115 120 125  
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr  
 130 135 140  
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln  
 145 150 155 160  
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 165 170 175  
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg  
 180 185 190  
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro  
 195 200 205  
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215  
 <210> 36  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic Construct

&lt;400&gt; 36

Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr  
 20 25 30

Ile Gly Trp Tyr Gln Gln His Pro Asp Lys Ala Pro Lys Tyr Val Met  
 35 40 45  
 Tyr Val Asn Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala His Arg Tyr Leu Ser Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gly Ser Ser Asp  
 85 90 95

Ser Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 37

Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Gly

1 5 10

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 38

Val Asn Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp

1                    5                    10

<210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 39  
Gly Ser Ser Asp Ser Ser Gly Tyr Val

1                    5

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

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 40  
gatcaaacta gtccaccatg tcgcaaggcc tccagctcct                    40

<210> 41  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400>

> 41

catcatccgc ggtcataccg tttctgtctt aggaag

                                                                                  36

<210> 42  
<211> 158  
<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 42

gcggccgcga gcaactgata ttatatatgc cttgaacatg aaaccagggg caggctgtgg 60

aatatttcca ggcacgctgt ctgcaggcac agtagatcct caacccaagt ggataagaga 120

|                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----|
| tgacaatgc ttccaagag agacagttat gagggacc                                        | 158 |
| <210> 43                                                                       |     |
| <211> 415                                                                      |     |
| <212> DNA                                                                      |     |
| <213> Artificial Sequence                                                      |     |
| <220>                                                                          |     |
| <223> Synthetic Construct                                                      |     |
| <400> 43                                                                       |     |
| acaggtctcc cagccagtgt ttctctcacc cctgcagggt gaaggctgtg ttggttcctg 60           |     |
| <br>                                                                           |     |
| tgctacaat cacagcattg cagtcttatac ttgtttcaaa ataacttcgt ataatgtatg 120          |     |
| ctatacgaag ttatctgttgc acaattaatc atcggcatag tataatcgca tagtataata 180         |     |
| cgacaagggtg aggaactaaa cccttcctcg tgcttacgg tatacgccgtccc 240                  |     |
| agcgcatacgcc ttcttatcgc ctttttgacg agttttctg aataacttcg tataatgtat 300         |     |
| gctatacgaat gttatgcaaa cacagtctca agagttttta tagattctct tcttctcccc 360         |     |
| tggaaatcctc attacaggg atagggggtg ggggagcacc ctgtcttgct ttaaa 415               |     |
| <210> 44                                                                       |     |
| <211> 450                                                                      |     |
| <212> DNA                                                                      |     |
| <213> Artificial Sequence                                                      |     |
| <220>                                                                          |     |
| <223> Synthetic Construct                                                      |     |
| <br>                                                                           |     |
| <400> 44                                                                       |     |
| ctcagtgaca cattacacac ttgtgggtca atgtatggat tacctgaata cccaccttcc 60           |     |
| ccagggagca agcatttctc cgaaaaatgc ttttttgcgttgc ttttttgcgttgc ttttttgcgttgc 120 |     |
| agtataggaa ctccgtctg aagaggagtt tacgtccagc caagcttagt tggctgcagg 180           |     |
| tcgtcgaaat tctaccgggtt agggggctct atggcttctg aggcggaaag aaccagctgg 240         |     |
| ggctcgacta gagtttgcgg aacccgaagt tcctattctc tagaaagtat aggaacttca 300          |     |
| tcagtcaggt acatataataa cttcgtataa tgtatgtat acgaagttat gcacagtaga 360          |     |
| tcctcaaccc aagtggataa gagatgacaa tagcttcca agagagacag ttatgaggga 420           |     |
| <br>                                                                           |     |
| ccacgcagaa atgaacaaag cacagttgg 450                                            |     |