



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월12일
 (11) 등록번호 10-1335079
 (24) 등록일자 2013년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2007-7001467
 (22) 출원일자(국제) 2005년06월20일
 심사청구일자 2010년05월31일
 (85) 번역문제출일자 2007년01월19일
 (65) 공개번호 10-2007-0047286
 (43) 공개일자 2007년05월04일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2005/021951
 (87) 국제공개번호 WO 2006/002177
 국제공개일자 2006년01월05일
 (30) 우선권주장
 60/581,747 2004년06월21일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 US06713609 B1*
 WO2004094473 A2
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메다렉스, 엘.엘.시.
 미국, 08540 뉴저지, 프린스턴, 루트 206 앤드 프
 로빈스 라인 로드
 (72) 발명자
카아다렐리, 조세핀, 엠
 미국, 94070 캘리포니아, 산 카를로스, 레슬리 드
 라이브 126
위트, 엘리슨
 미국, 95066 캘리포니아, 스크츠 밸리, 빈 크리크
 로드 3505
스리니바산, 모한
 미국, 95129 캘리포니아, 산 호세, 알링톤 레인
 1044
 (74) 대리인
조용식

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **인터페론 알파 수용체 1 항체 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 IFNAR-1에 결합하고 타입 I 인터페론의 생물학적 활성을 억제하는 분리된 인간 모노클론 항체를 제공한다. 본 발명의 항체를 포함하는 면역 접합체, 이중 특이성 분자 및 제약 조성물도 제공된다. 본 발명은 본 발명의 항체를 사용하여 자가면역 질병, 이식 거부, 또는 이식편대숙주반응을 치료하는 방법을 포함하는 바, 본 발명의 항체를 사용하는 타입 I 인터페론-매개 질병을 억제하는 방법을 또한 제공한다.

대표도 - 도1A

항-IFNAR 3F11 VH

V 단편 : 4-34
 D 단편 : 불경화되지않음
 J 단편 : JH5b

```

1  Q V Q L I Q Q M G A G L L K F S E T L
   C M G G T S G N G C T A G A G G T G G G C A G A G T G T T S A G C C T F C T G A G A C C C T G
-----CDR1-----
55  E L T C A V Y G G S F S G V E W S W
   T C C T C A C C T G C G T G T T A T G T T G G T C C T T C A G T G G T A T T T C T G G A G T G G
-----CDR2-----
109 I R Q P P G K G L E W E D K E I D H S
   A T C C D C G A G C C C C A G G A A G G G C T G G A G T G G A T T G G G C A A A T C G A T C A C A G T
-----CDR3-----
163 G R C T R Y N P S L R S R V T I S V D
   G G A A A G A D C A A C T A C A A T C C G T C C C A A G A G T C G A G T T A C C A T A T C A G T A G A C
217 F S F S I Q V E L R L E S S V T A A S T
   A G S T C C A A G A A C G A G G T C C C T G A A G C T S A G C T C T G T S A C C G C C G C G A C A G S
-----CDR3-----
271 A V Y Y C A R E S S K Y Y F G L D W M
   G C T G T G T A T T A C T G T G C A G A G A A A G A A G T A C T A C T T C G G T S T S G A C G T C T G S
325 G Q G T F V V V T S
   G G C C A A G G G A G C A G S G T C A C C G T C A C C T C A
    
```

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

인간 인터페론 알파 수용체 1(IFNAR-1)에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체는,

- (a) SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- (b) SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- (c) SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- (d) SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- (e) SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- (f) SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함하는;

분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 11

인간 인터페론 알파 수용체 1(IFNAR-1)에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체는,

- (a) SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- (b) SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;

- (c) SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- (d) SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- (e) SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- (f) SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함하는;
분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 12

인간 인터페론 알파 수용체 1(IFNAR-1)에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체는,

- (a) SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- (b) SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- (c) SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- (d) SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- (e) SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- (f) SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함하는;
분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 13

삭제

청구항 14

인간 인터페론 알파 수용체 1(IFNAR-1)에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체는,

- (a) SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- (b) SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역;을 포함하는;
분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 15

인간 인터페론 알파 수용체 1(IFNAR-1)에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체는,

- (a) SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- (b) SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역;을 포함하는;
분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 16

인간 인터페론 알파 수용체 1(IFNAR-1)에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체는,

- (a) SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- (b) SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역;을 포함하는;
분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

(a) (i) SEQ ID NO: 1의 CDR1 서열, SEQ ID NO: 5의 CDR2 서열, 및 SEQ ID NO: 9의 CDR3 서열을 포함하는 중

사슬 가변 지역 항체 서열; 또는 (ii) SEQ ID NO: 13의 CDR1 서열, SEQ ID NO: 17의 CDR2 서열, 및 SEQ ID NO: 21의 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 항체 서열을 제공하고; 그리고

(b) 항체 서열을 단백질로 발현시키는 것을 포함하는:

항-IFNAR-1 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제조하는 방법.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

인간 인터페론 알파 수용체 1(IFNAR-1)에 특이적으로 결합하는 분리된 인간 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하고, 그리고:

(a) 중 사슬 가변 지역 CDR3 서열은 SEQ ID NO:9, 10 및 11의 아미노산 서열로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

(b) 경 사슬 가변 지역 CDR3 서열은 SEQ ID NO:21, 22 및 23의 아미노산 서열로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

(c) 항체는 적어도 1×10^{-8} M 이상의 결합 친화도로 인간 인터페론 알파 수용체 1과 특이적으로 결합하고; 그리고

(d) 항체는 적어도 하나의 타입 1 인터페론의 생물학적 활성을 억제하는,

분리된 인간 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 42

삭제

청구항 43

제 10항 내지 제 12항, 제 14항 내지 제 16항 또는 제 41항 중 어느 한 항의 분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 다우디 세포증식 분석(Daudi cell proliferation assay)에서 IFN 오메가의 활성을 억제하는,

분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 44

제 10항 내지 제 12항, 제 14항 내지 제 16항 또는 제 41항 중 어느 한 항의 분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 다중 타입 1 인터페론의 생물학적 활성을 억제하는,

분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 45

제 10항 내지 제 12항, 제 14항 내지 제 16항 또는 제 41항 중 어느 한 항의 분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 다우디 세포증식 분석에서 IFN α 2b의 활성을 억제하는,

분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 46

제 10항 내지 제 12항, 제 14항 내지 제 16항 또는 제 41항 중 어느 한 항의 분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 IFN α 2b에 의해 유도된 말초 혈액 모노클론 세포에 의해 IP-10 분비를 억제하는,

분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 47

제 10항 내지 제 12항, 제 14항 내지 제 16항 또는 제 41항 중 어느 한 항의 분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 IFN 오메가에 의해 유도된 말초 혈액 모노클론 세포에 의해 IP-10 분비를 억제하는,

분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 48

제 10항 내지 제 12항, 제 14항 내지 제 16항 또는 제 41항 중 어느 한 항의 분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분으로, 상기 항체, 또는 그의 항원-결합 부분은 전신 홍반성 낭창 플라즈마에 의해 조정된 수지상 세포 전개를 억제하는,

분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 49

인터페론 알파 수용체 1을 발현하는 세포 상에서 타입 1 인터페론의 생물학적 활성을 억제하는데 사용하기 위한,

제 10항 내지 제 12항, 제 14항 내지 제 16항 또는 제 41항 중 어느 한 항의 분리된 모노클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분.

청구항 50

제 41항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는,

전신 홍반성 낭창, 인슐린 의존성 당뇨, 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 건선, 자가면역 갑상선염, 류마치스 관절염, 사구체신염, HIV 감염, AIDS, 이식거부 및 이식편대숙주반응으로 구성된 군으로부터 선택되는 질병을 치료하기 위한 조성물.

청구항 51

치료제에 결합된,

제 41항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 면역접합체.

청구항 52

하기의 항체, 또는 그의 항원-결합부분과 다른 결합 특이성을 갖는 제 2의 기능성 성분에 결합된, 제 41항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 이중특이성 분자.

청구항 53

제 41항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 54

귀가 제 41항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 발현하는, 인간 면역글로불린 중 및 경 사슬 이식유전자를 포함하는 유전자 이식 쥐.

청구항 55

타입 1 인터페론의 생물학적 활성이 억제되도록, 제 41항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분과 세포를 접촉시키는 것을 포함하는,

인터페론 알파 수용체 1을 발현하는 세포 상에서 타입 1 인터페론의 생체 외에서의 생물학적 활성을 억제하는 방법.

청구항 56

제 41항의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는,

대상물에 전신 홍반성 낭창, 인슐린 의존성 당뇨병, 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 건선, 자가면역 갑상선염, 류마치스 관절염, 사구체신염, HIV 감염, AIDS, 이식거부 및 이식편대숙주반응으로 구성된 군으로부터 선택되는 타입-1 인터페론-매개 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 57

(a) (i) SEQ ID NO: 2의 CDR1 서열, SEQ ID NO: 6의 CDR2 서열, 및 SEQ ID NO: 10의 CDR3 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 항체 서열; 또는 (ii) SEQ ID NO: 14의 CDR1 서열, SEQ ID NO: 18의 CDR2 서열, 및 SEQ ID NO: 22의 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 항체 서열을 제공하고; 그리고

(b) 항체 서열을 단백질로 발현시키는 것을 포함하는:

항-IFNAR-1 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제조하는 방법.

청구항 58

(a) (i) SEQ ID NO: 3의 CDR1 서열, SEQ ID NO: 7의 CDR2 서열, 및 SEQ ID NO: 11의 CDR3 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 항체 서열; 또는 (ii) SEQ ID NO: 15의 CDR1 서열, SEQ ID NO: 19의 CDR2 서열, 및 SEQ ID NO: 23의 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 항체 서열을 제공하고; 그리고

(b) 항체 서열을 단백질로 발현시키는 것을 포함하는:

항-IFNAR-1 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 제조하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 특허출원은 2004년 6월 21일 출원된 미국 임시 특허출원 일련번호 60/581,747의 우선권을 주장하며, 그 내용은 참고로 여기에 전부 포함시킨다.

배경기술

[0002] 타입 I 인터페론(IFN)(IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- τ)은 항바이러스, 항종양 및 면역조절 효과를 갖는 구조적으로 연관된 시토킨의 집단이다.(하디 등. (2001) Blood 97:473; 커트론 및 랭거(2001) J. Biol. Chem.

276:17140). 인간 IFN α 위치는 두개의 부집단을 갖는다. 첫 번째 부집단은 14개의 비대립 유전자 및 적어도 80%의 동일성을 갖는 4개의 허위유전자를 갖는다. 두 번째 부집단, α II 또는 오메가(ω)는 IFN α 유전자와 70%의 동일성을 나타내는 1개의 기능 유전자와 5개의 허위유전자를 갖는다(와이즈만 및 웨버(1986) Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol, 33:251-300). IFN α 의 서브타입들은 서로 다른 특유의 활성들을 갖지만 동일한 생물학적 스펙트럼을 보이(스트로우리 등 (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2848) 동일한 세포 수용체를 갖는다(아그넷 M 등 "인터페론 5" Ed. I. Gresser p. 1-22, Academic Press, 런던 1983).

- [0003] 인터페론 β (IFN β)은 IFN α 유전자와 거의 50%의 동일성을 갖는 단일 유전자에 의해 암호화된다.
- [0004] 활성화된 림프구에 의해 생성되는 감마 인터페론은 알파/베타 인터페론과 동일성을 갖지 않으며 그들의 수용체와 반응하지 않는다.
- [0005] 모든 인간 타입 I 인터페론은 두 개의 전이막 단백질, IFNAR-1 및 IFNAR-2로 구성된 세포 표면 수용체(IFN 알파 수용체, IFNAR)에 결합한다(우체 등 (1990) Cell 60:225; 노비크 등 (1994) Cell 77:391). IFNAR-1은 IFNAR 복합체의 높은 친화성 결합과 상이한 특이성에 필수적이다(커트론(2001) 위와 같음). 타입 I IFN 서브타입 각각의 기능의 차이가 밝혀지지 않았으나 각각은 잠재적으로 다양한 신호표시로 이끄는 IFNAR 수용체 성분과 서로 다른 작용을 보이는 것으로 생각된다(쿡 등 (1996) J. Biol. Chem. 271:13448). 특히 IFNAR-1 및 IFNAR-2의 변이형을 사용하는 연구에서 알파 및 베타 인터페론이 각각의 사슬과 차등있게 반응함으로써 수용체를 통해 다르게 신호를 나타내는 것이 제안되었다(루위렌즈 등 (1998) J. Mol. Biol. 282:585).
- [0006] 타입 I INF의 기능에 대한 초기의 연구는 바이러스 감염에 대한 선천적 방어에 초점이 맞추어 졌다(할러 등 (1981) J. Exp. Med. 154:199; 린더만 등 (1981) Methods Enzymol. 78:181). 그러나 더욱 최근의 연구는 적응 면역 반응에서 효력있는 면역조절 시토킨으로서 타입 I IFN에 관한 것이다. 특히 타입 I IFN는 Th1통로에서 원래의 T 세포의 변이를 용이하게 하고(브릴크만 등 (1993) J. Exp. Med. 178:1655), 항체 생성을 높이고(핀켈만 등 (1991) J. Exp. Med. 174:1179), 기억 T 세포의 기능적 활성화와 생존을 지지하는 것으로(산티니 등 (2000) J. Exp. Med. 191:1777; 토우 등 (1996) Science 272:1947) 나타났다.
- [0007] 여러 그룹의 최근의 연구에서 IFN- α 는 수지상 세포(DCs)의 성숙 또는 활성화를 증진시킬 수 있음을 제안하였다(산티니 등 (2000) J. Exp. Med. 191:1777; 루푸트 등(1998) J. Immunol. 161:1947; 루푸트 등 (2002) Int. Immunol. 14:367; 라드바니 등 (1999) Scand. J. Immunol. 50:499). 더욱이, 타입 I 인터페론의 증가된 발현이 다수의 자가면역병에 기술되어 있다(포울리스 등 (1987) Lancet 2:1423; 혹스 등 (1982) Arthritis Rheum. 25:396; 헤르츠조그 등 (1988) Clin. Immunol. Immunopathol. 48:192; 홉킨스 및 메걸 (1988) Clin. Exp. Immunol. 73:88; 알빈 및 밀러 (1984) Arthritis Rheum. 27:582). 이의 가장 연구된 예에는 IFN α 의 높아진 수준과 모두 관련이 있는, 인슐린-의존성 당뇨(IDDM)(포울리스 (1987) 위와 같음), 전신 홍반성 낭창(SLE)(혹스 (1982) 위와 같음), 및 IFN- β 가 더욱 중요한 역할을 하는 류마티스성 관절염(RA)(헤르츠조그 (1988), 홉킨스 및 메거 (1988), 알빈 및 밀러 (1984), 위와 같음)이 있다.
- [0008] 더욱이, 인터페론 α 의 투여는 건선, 및 다발성 경화증의 환자에는 기본적 질병을 악화시키고 자가면역병의 이전 경험이 없는 환자에는 SLE 유사 증상을 유도하는 것으로 보고되었다. 인터페론 α 는 또한 정상적인 쥐에서 사구체신염을 유도하고 NZB/W 쥐의 동시적 자가면역병의 발생을 가속화하는 것이 나타났다. 더 나아가, IFN- α 치료법은 몇몇 경우에 발열 및 신경 장애를 포함하는 바람직하지 못한 부작용을 유도하는 것이 나타났다. 따라서, 타입 I IFN 활성의 억제가 환자에게 유익할 수 있는 병리학적인 상황이 있으며 따라서 타입 I IFN 활성을 억제하는데 효과적인 물질이 필요하다.
- [0009] 발명의 요약
- [0010] 본 발명은 IFNAR-1에 결합하고 타입 I 인터페론, 바람직하게는 여러 타입 I 인터페론들의 생물학적 활성을 억제하는 분리된 인간 모노클론 항체를 제공한다. 더욱이 본 항체는 쥐의 항-IFNAR-1 항체, 64G12와 동일한 에피토프에 결합하지 않는다.
- [0011] 일면으로, 본 발명은 항체가 IFNAR-1에 특이적으로 결합하고 다음의 성질들 중 적어도 하나를 나타내는 분리된 인간 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다:
- [0012] a) IFNAR-1에 1×10^{-7} 이상의 친화력의 K_D 로 결합한다;

- [0013] b)여러 타입 I 인터페론들의 생물학적 활성을 억제한다;
- [0014] c)다우디(Daudi) 세포 증식 분석에서 IFN α 2b 의 활성을 억제한다;
- [0015] d)다우디 세포 증식 분석에서 IFN 오메가의 활성을 억제한다;
- [0016] e)IFN α 2b 에 의해 유도된 말초 혈액 단핵 세포에 의한 IP-10 분비를 억제한다;
- [0017] f)IFN 오메가에 의해 유도된 말초 혈액 단핵 세포에 의한 IP-10 분비를 억제한다;
- [0018] g)전신 홍반성 낭창 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제한다; 및
- [0019] h)쥐의 모노클론 항체 64G12(ECACC 기탁 번호 92022605)와 다른 에피토프에 결합한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 항체는 인간 인터페론 알파 수용체 1에 특이적으로 결합하고 1×10^{-8} M 이상의 친화력의 또는 1×10^{-9} M 이상의 친화력의 또는 5×10^{-10} M 이상의 친화력의 또는 2×10^{-10} M 이상의 친화력의 K_D 로 결합한다.
- [0021] 일면으로, 본 발명은 항체가 인간 인터페론 알파 수용체 1에 특이적으로 결합하고, 인간 V_H 4-34 또는 5-51 유전자로 부터 유도된 또는 그의 생성물인 중 사슬 가변 지역을 포함하는 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 다른 일면으로, 본 발명은 항체가 인간 인터페론 알파 수용체 1에 특이적으로 결합하고, 인간 V_K L 18 또는 A27 유전자로 부터 유도된 또는 그의 생성물인 경 사슬 가변 지역을 포함하는 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 또 다른 일면으로, 본 발명은 항체가 인간 인터페론 알파 수용체 1에 특이적으로 결합하고,
- [0022] (a)인간 V_H 4-34 또는 5-51 유전자로 부터 유도된 또는 그의 생성물인 중 사슬 가변 지역; 및
- [0023] (b)인간 V_K L 18 또는 A27 유전자로 부터 유도된 또는 그의 생성물인 경 사슬 가변 지역을 포함하는 분리된 인간 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 항체는 인간 V_H 4-34 유전자의 중사슬 가변 지역 및 인간 V_K L 18 유전자의 경 사슬 가변 지역을 포함하거나 항체는 인간 V_H 5-51 유전자의 중사슬 가변 지역 및 인간 V_K A27 유전자의 경 사슬 가변 지역을 포함한다.
- [0024] 다른 일면으로, 본 발명은 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역;과 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서:
- [0025] (a) 인간 중 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 및 12의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0026] (b) 인간 경 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 21, 22, 23 및 24의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;
- [0027] (c) 항체가 인간 인터페론 알파 수용체 1에 적어도 1×10^{-8} M 이상의 친화력의 결합 친화력으로 특이적으로 결합하고;
- [0028] (d) 항체가 적어도 하나의 타입 I 인터페론의 생물학적 활성을 억제하는,
- [0029] 분리된 인간 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0030] 바람직하게는, 인간 중 사슬 가변 지역 CDR2 서열은 SEQ ID NO: 5, 6, 7, 및 8의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 인간 경 사슬 가변 지역 CDR2 서열은 SEQ ID NO: 17, 18, 19 및 20의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 인간 중 사슬 가변 지역 CDR1 서열은 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 및 4의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 인간 경 사슬 가변 지역 CDR1 서열은 SEQ ID NO: 13, 14, 15, 및 16의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0031] 다른 일면으로, 본 발명은 인간 중 사슬 가변 지역과 인간 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서

- [0032] (a) 인간 중 사슬 가변 지역은 SEQ ID NO: 25, 26, 27, 및 28로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산에 적어도 80%가 동일한 아미노산 서열을 포함하고;
- [0033] (b) 인간 경 사슬 가변 지역은 SEQ ID NO: 29, 30, 31 및 32로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산에 적어도 80%가 동일한 아미노산 서열을 포함하고;
- [0034] (c) 항체가 인간 인터페론 알파 수용체 1에 적어도 1×10^{-8} M 이상의 친화력의 결합 친화력으로 특이적으로 결합하고;
- [0035] (d) 항체가 적어도 하나의 타입 I 인터페론의 생물학적 활성을 억제하는,
- [0036] 분리된 인간 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 항체에는
- [0038] (a) SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 및 4로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0039] (b) SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 및 8로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0040] (c) SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0041] (d) SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 및 16으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0042] (e) SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- [0043] (f) SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 및 24로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함하고;
- [0044] 항체가 인간 인터페론 알파 수용체 1에 적어도 1×10^{-8} M 이상의 친화력의 결합 친화력으로 특이적으로 결합하는, 분리된 인간 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 포함된다.
- [0045] CDR 지역들의 바람직한 조합에는 다음의 것들이 포함된다:
- [0046] (a) SEQ ID NO: 1을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0047] (b) SEQ ID NO: 5를 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0048] (c) SEQ ID NO: 9를 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0049] (d) SEQ ID NO: 13을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0050] (e) SEQ ID NO: 17을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- [0051] (f) SEQ ID NO: 21을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR3.
- [0052] (a) SEQ ID NO: 2을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0053] (b) SEQ ID NO: 6를 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0054] (c) SEQ ID NO: 10를 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0055] (d) SEQ ID NO: 14을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0056] (e) SEQ ID NO: 18을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- [0057] (f) SEQ ID NO: 22을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR3.

- [0058] (a) SEQ ID NO: 3을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0059] (b) SEQ ID NO: 7을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0060] (c) SEQ ID NO: 11을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0061] (d) SEQ ID NO: 15를 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0062] (e) SEQ ID NO: 19를 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- [0063] (f) SEQ ID NO: 23을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR3.

- [0064] (a) SEQ ID NO: 4를 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0065] (b) SEQ ID NO: 8을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0066] (c) SEQ ID NO: 12를 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0067] (d) SEQ ID NO: 16을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0068] (e) SEQ ID NO: 20을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- [0069] (f) SEQ ID NO: 24를 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역 CDR3.

- [0070] 본 발명의 다른 바람직한 항체들에는:
- [0071] (a) SEQ ID NO: 25, 26, 27, 및 28로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역; 및
- [0072] (b) SEQ ID NO: 29, 30, 31 및 32로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역;을 포함하고,
- [0073] 항체가 인간 인터페론 알파 수용체 1에 적어도 1×10^{-8} M 이상의 친화력의 결합 친화력으로 특이적으로 결합하는, 분리된 인간 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 포함된다.
- [0074] 중 및 경 사슬의 바람직한 조합에는 다음의 것들이 포함된다:
- [0075] (a) SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역; 및
- [0076] (b) SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역.

- [0077] (a) SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역; 및
- [0078] (b) SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역.

- [0079] (a) SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역; 및
- [0080] (b) SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역.

- [0081] (a) SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하는 인간 중 사슬 가변 지역; 및
- [0082] (b) SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하는 인간 경 사슬 가변 지역.

- [0083] 본 발명은 다른 일면으로 본 발명에 의해 제공된 참고 항체와 IFNAR-1에 결합하는 것에 대해 경쟁하는 항체에 관한 것이다. 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은;
- [0084] (a) SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- [0085] SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하는 항체;

- [0086] (b) SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- [0087] SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하는 항체;
- [0088] (c) SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- [0089] SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하는 항체; 및
- [0090] (d) SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- [0091] SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하는 항체;로 구성된 군으로부터 참고 항체가 선택되고,
- [0092] 항체가 인간 인터페론 알파 수용체 1에 결합하는 것에 대해 상기 참고 항체와 상호-경쟁하는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0093] 어떤 구체예에서, 본 발명은 항체가 쥐의 모노클론 항체 64G12(ECACC 기탁 번호 92022605)와 같은 에피토프에 결합하지 않는, 인간 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0094] 본 발명의 항체는 임의의 아이소타입일 수 있다. 바람직한 항체는 IgG1 IgG3 또는 IgG4 아이소타입이다. 본 발명의 항체는 가변 및 일정 지역을 포함하는 전-길이 항체일 수 있거나, 이들은 단일 사슬 항체 또는 Fab 또는 Fab'2단편과 같은 그의 항원-결합 단편일 수 있다.
- [0095] 본 발명은 또한 세포독소 또는 방사성 동위원소와 같은 치료제에 결합된, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 면역접합체를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 항체 또는 그의 항원 결합 부분과는 다른 결합 특이성을 갖는 제 2의 기능 부분에 결합되는, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하는 이중특이성 분자를 제공한다.
- [0096] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분, 또는 면역접합체 또는 이중특이성 분자 및 제약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물도 제공된다.
- [0097] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 암호화하는 핵산 분자뿐만 아니라 그러한 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터 및 그러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포도 또한 본 발명에 포함된다. 더욱이 본 발명은 인간 면역 글로불린 중 및 경 사슬 이식유전자를 포함하고, 본 발명의 항체를 발현하는 유전자 이식 쥐뿐만 아니라 그러한 쥐로부터 제조되며, 본 발명의 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.
- [0098] 본 발명은 또한 여기에 제공된 항-IFNAR-1 항체의 서열을 기반으로 하는 "2 세대" 항-IFNAR-1 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들면, 본 발명은
- [0099] (a) (i) SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 및 4로 구성된 군으로부터 선택되는 CDR1 서열, SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 및 8로 구성된 군으로부터 선택되는 CDR2 서열, 및 SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 CDR3 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 항체 서열; 또는 (ii) SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 및 16으로 구성된 군으로부터 선택되는 CDR1 서열, SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 CDR2 서열, 및 SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 및 24로 구성된 군으로부터 선택되는 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 항체 서열을 제공하고;
- [0100] (b) 적어도 하나의 변경된 항체 서열을 생성하기 위해서 중 사슬 가변 지역 항체 서열 및 경 사슬 가변 지역 항체 서열로부터 선택되는 적어도 하나의 가변 지역 항체 서열내에서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변경시키고;
- [0101] (c) 변경된 항체 서열을 단백질로 발현시키는 것을 포함하는:
- [0102] 항- IFNAR-1 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0103] 본 발명은 또한 타입 I 인터페론의 생물학적 활성이 억제되도록 본 발명의 항체를 세포와 접촉시키는 것을 포함하는 인터페론 알파 수용체 1을 발현하는 세포상에서 타입 I 인터페론의 생물학적 활성을 억제하는 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 환자의 타입-I 인터페론 매개 질병이 치료되도록 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 환자에 투여하는 것을 포함하는 치료가 필요한 환자의 타입 I 인터페론-매개 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 타입 I 인터페론-매개 질병은 예를 들면, 인터페론 알파-매개 질병일 수 있다.
- [0104] 본 발명의 방법을 사용하여 치료할 수 있는 질병 또는 장애의 예에는 전신 홍반성 낭창, 인슐린 의존성 당뇨병,

염증성 장 질환, 다발성 경화증, 건선, 자가면역 갑상선염, 류마티스성 관절염, 사구체신염, HIV 감염, AIDS, 이식 거부증 및 이식편대숙주 반응이 포함된다.

[0105] 본 발명의 다른 특징 및 장점들은 제한하는 것으로 해석되지 않는 다음의 상세한 설명과 실시예로 분명해질 것이다. 본 출원에 인용된 모든 참고자료, 궤뱅크 기탁물, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 참고로 여기에 밝히 포함시킨다.

발명의 상세한 설명

[0106] 본 발명은 인터페론 알파 수용체 1(IFNAR-1)에 결합하고 타입 I 인터페론들의 작용을 차단할 수 있는 분리된 모노클론 항체에 관한 것이다. 본 발명은 분리된 항체, 그러한 항체를 만드는 방법, 그러한 항체를 포함하는 면역 접합체 및 이중특이성 분자 및 본 발명의 항체, 면역접합체 또는 이중특이성 분자를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 환자에 있어서, 예를 들면 자가면역 병, 이식 거부, 및 이식편대숙주반응(GVHD)을 포함하는 면역 매개 질병 치료에 있어서, IFNAR-1을 발현하는 세포상에서 타입 I 인터페론이 IFNAR-1에 결합하는 것을 억제하는데 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0107] 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위해서 어떤 용어는 먼저 정의하였다. 부가적인 정의는 상세한 설명을 통해 주어질 것이다.

[0108] "인터페론 알파 수용체-1" "IFNAR-1" 및 "IFNAR-1 항원"이라는 용어는 상호교환가능하게 사용되며, 인간 IFNAR-1의 변이체, 동형체, 중 동종체 및 IFNAR-1의 적어도 하나의 보통의 에피토프를 갖는 유사체가 포함된다. 따라서, 본 발명의 인간 항체는 어떤 경우에 인간이 아닌 다른 종으로부터의 IFNAR-1 또는 인간 IFNAR-1과 구조적으로 연관된 다른 단백질(예를 들면, 인간 IFNAR-1 동종체)과 상호-반응할 수 있다. 다른 경우에, 항체는 인간 IFNAR-1에 온전하게 특이적일 수 있으며, 상호-반응성의 종이나 다른 타입을 나타내지 않는다.

[0109] 인간 IFNAR-1의 완전한 cDNA 서열은 궤뱅크 기탁 번호 NM_000629을 갖는다.

[0110] 여기서 사용되는 "타입 I 인터페론"이라는 용어는 IFNAR-1의 리간드인 분자들의 다수의 타입 I 인터페론 집단(즉, IFNAR-1에 결합할 수 있는 분자들의 다수의 타입 I 인터페론 집단)을 언급하는 것으로 의도된다. 타입 I 인터페론 리간드의 예에는 인터페론 알파 1, 2a, 2b, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 21, 인터페론 베타 및 인터페론 오메가가 있다.

[0111] "면역 반응"이란 용어는 병원체가 침입한 인체, 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 암세포 또는 자가면역 또는 병적 염증의 정상적인 인간 세포 또는 조직의 경우에 선택적인 손상, 파괴 또는 제거를 초래하는 예를 들면 림프구, 항원 제공 세포, 식세포, 과립성 백혈구 및 상피 세포나 간으로부터 생성된 용해성 거대분자(항체, 시토킨 및 보체를 포함하는)의 작용을 말한다.

[0112] "신호 형질도입 통로"는 세포의 한 부분에서 세포의 다른 부분으로 신호를 전달하는 역할을 하는 여러 가지 신호 형질도입 분자사이의 생화학적 관계를 말한다. 여기서 사용된 세포 표면 수용체는 예를 들면 신호를 받고 세포의 원형질막사이로 그러한 신호를 전달할 수 있는 분자 및 분자의 복합체를 포함한다. 본 발명의 세포 표면 수용체의 예에는 IFNAR-1 수용체가 있다.

[0113] 여기서 언급된 "항체"라는 용어는 전체 항체 및 임의의 항원 결합 단편(즉, 항원-결합 부분) 또는 그의 단일 사슬을 포함한다. 항체는 디설파이드 결합에 의해 상호-연결된 적어도 두 개의 중(H) 사슬 및 두 개의 경(L) 사슬을 포함하는 글리코단백질을 말한다. 각각의 중 사슬은 중 사슬 가변 지역(여기에서는 V_H 로 약함)과 중 사슬 일정 지역으로 구성되어 있다. 중 사슬 일정 지역은 세 개의 영역, C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 으로 구성되어 있다. 각각의 경 사슬은 경 사슬 가변 지역(여기에서는 V_L 로 약함)과 경 사슬 일정 지역으로 구성되어 있다. 경 사슬 일정 지역은 하나의 영역, C_L 로 구성되어 있다. V_H 및 V_L 지역은 고가변성의 지역, 상보성 결정 지역(CDR), 더욱 보존되는 균테군데 끼워 넣어진 지역, 골격 지역(FR)으로 더욱 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 는 다음 순서로: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 아미노-말단에서부터 카복시-말단으로 배열된 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 구성되어 있다. 중 및 경 사슬의 가변 지역은 항원과 작용하는 결합 지역을 포함한다. 항체의 일정 지역은, 면역계의 여러 가지 세포(예를 들면, 효과기세포) 및 고전적인 보체계의 첫 번째 성분(C1q)을 포함하며, 숙주 조직 또는 인자에 면역글로불린이 결합하는 것을 매개할 수 있다.

[0114] 여기서 사용된 항체의 "항원-결합 부분"(또는 간단히 "항체 부분")이라는 용어는 항원에 특이적으로 결합하는

능력을 갖는 항체(예를 들면, IFNAR-1)의 하나 또는 그 이상의 단편을 말한다. 항체의 항원-결합 기능은 전-질이 항체에 의해 수행될 수 있음이 나타났다. 항체의 항원-결합 부분이라는 용어 내에 포함된 결합 단편의 예에는 (i) V_L , V_H , C_L 및 C_H 영역들로 구성된 1가 단편, Fab 단편; (ii) 이음 지역에서 디설파이드 다리로 결합된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편, $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 영역들로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 V_L 및 V_H 영역들로 구성된 Fv 단편, (v) V_H 영역으로 구성된 dAb 단편(왈드 등(1989) Nature 341:544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 지역(CDR)이 있다. 더 나아가 Fv 단편의 두 영역, V_L 및 V_H 는 별개의 유전자에 의해 암호화된다 하더라도, 이들은 1가 분자를 형성하기 위해 V_L 및 V_H 지역이 쌍을 이루는 단일한 단백질 사슬로 만들어 질 수 있도록 하는 합성 연결자에 의해, 재조합법을 사용하여 결합될 수 있다.(단일 사슬 Fv(scFv)로 알려짐; 예를 들면, 버드 등 (1988) Science 242:423-426; 및 휴스톤 등 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 참조). 그러한 단일 사슬 항체는 또한 항체의 항원-결합 부분에 포함되는 것으로 의도된다. 이들 항체 단편들은 당업자에 잘 알려진 통상적인 기술을 사용하여 얻어지며, 온전한 항체를 동일한 방법으로 사용을 위해 선별한다.

[0115] 여기서 사용된 "분리된 항체"는 다른 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 언급하는 것으로 의도된다(예를 들면, IFNAR-1에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 IFNAR-1 이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체와는 실질적으로 별개이다). 그러나 IFNAR-1에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종으로부터의 IFNAR-1 분자와 같은 다른 항원에 상호-반응성을 갖는다. 더욱이, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학제가 없다.

[0116] 여기서 사용된 "모노클론 항체" 또는 "모노클론 항체 조성물"이란 용어는 단일 분자 조성물의 항체 분자의 제조물을 언급한다. 모노클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 단일 결합 특이성과 친화성을 나타낸다.

[0117] 여기서 사용된 "인간 항체"라는 용어는 골격 및 CDR 지역 둘 다가 인간 생식계열 면역 글로불린 서열로부터 유도된 가변 지역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 더욱이 항체가 일정 지역을 포함한다면, 일정 지역은 또한 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들면, 시험관내에서의 임의의 또는 위치-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내에서의 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이). 그러나 여기서 사용된 "인간 항체"라는 용어는 쥐와 같은 다른 포유류 종의 생식계열로부터 유도된 CDR 서열이 인간 골격 서열에 이식된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

[0118] "인간 모노클론 항체"라는 용어는 골격 및 CDR 지역 둘 다가 인간 생식계열 면역 글로불린 서열로부터 유도된 가변 지역을 갖는 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 말한다. 한 구체예에서 인간 모노클론 항체는 인간 중 사슬 이식 유전자와 죽지 않은 세포에 접합된 경 사슬 이식 유전자를 포함하는 유전자 이식 비인간 동물, 예를 들면 유전자 이식 쥐로부터 얻어진 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다.

[0119] 여기서 사용된 "재조합 인간 항체"라는 용어는 (a)인간 면역 글로불린 유전자의 유전자 이식 또는 염색체 이식 또는 그로부터 제조된 하이브리도마인 동물(예를 들면, 쥐)로부터 분리된 항체(아래에 더욱 기술됨), (b)인간 항체를 발현하기위해서 형질 전환된 숙주 세포 예를 들면, 트랜스펙토마로부터 분리된 항체, (c)재조합, 결합 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체, 및 (d)인간 면역 글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 짜깁기하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조된, 발현된, 만들어진 또는 분리된 항체와 같은 재조합 수단에 의해 제조된, 발현된, 만들어진 또는 분리된 모든 인간 항체를 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체는 골격 및 CDR 지역이 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 지역을 갖는다. 그러나 어떤 구체예에서, 그러한 재조합 인간 항체는 시험관내에서 돌연변이가 유발될 수 있으며(또는 인간 Ig 서열의 동물 유전자 이식이 사용될 때, 생체 내에서의 체세포 돌연변이 유발) 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 지역의 아미노산 서열이 인간 생식계열 V_H 및 V_L 서열에 연관되고 이로부터 유도되는 한편 생체 내에서 인간 항체 생식계열 목록 내에 자연적으로 존재하지 않는 서열이다.

[0120] 여기서 사용된 "아이소타입"은 중 사슬 일정 지역 유전자에 의해 암호화되는 항체 클래스(예를 들면, IgM 또는 IgG1)를 말한다.

[0121] 여기서 사용된, "특이적 결합"은 미리 결정된 항원에 결합하는 항체를 말한다. 전형적으로, 항체는 10^{-8} M 이하의 분리 상수(K_D)로 결합하고 미리 결정된 항원 또는 밀접하게 연관된 항원이외의 비-특이적 항원(예를 들면, BSA,

카제인)에 결합할 때는 그의 K_D 보다 적어도 두배 적은 K_D 로 미리 결정된 항원에 결합한다. "항원 인식 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 여기서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어로 대체적으로 사용된다.

[0122] 여기서 사용된, K_{assoc} 또는 K_a 는 특정 항체-항원 상호작용의 결합율을 말하는 것으로 의도되는 한편, 여기서 사용된, K_{dis} 또는 K_d 는 특정 항체-항원 상호작용의 분리율을 말하는 것으로 의도된다. 여기서 사용된, K_D 는 K_a 에 대한 K_d 의 비율(즉, K_d/K_a)로 얻어지는 분리상수로 모랄 농도(M)로 나타내는 것으로 의도된다. 항체의 K_D 값은 이 기술 분야에 잘 알려진 방법으로 결정할 수 있다. 항체의 K_D 를 결정하는 바람직한 방법은 표면 세포질 유전자 공명을 사용하는, 바람직하게는 Biacore[®] 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하는 것이다.

[0123] 여기서 사용된, IgG 항체의 "높은 친화력"이란 용어는 10^{-8} M 이하, 더욱 바람직하게는 10^{-9} M 이하, 더더욱 바람직하게는 10^{-10} M 이하의 K_D 를 갖는 항체를 말한다. 그러나 "높은 친화력" 결합은 다른 항체 아이소타입에 따라 변할 수 있다. 예를 들면, IgG 아이소타입에 대한 "높은 친화력" 결합은 10^{-7} M 이하, 더욱 바람직하게는 10^{-8} M 이하의 K_D 를 갖는 항체를 말한다.

[0124] 여기서 사용된, "환자"라는 용어는 임의의 인간 또는 인간이 아닌 동물을 포함한다. "인간이 아닌 동물"이란 용어는 인간이 아닌 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등과 같은, 예를 들면, 포유류 및 비포유류의 모든 척추동물을 포함한다.

[0125] 본 발명의 여러 가지 면들은 다음의 하부항목에서 더욱 상세히 기술한다.

[0126] 항-IFNAR-1 항체

[0127] 본 발명의 항체는 항체의 특별한 기능적 특성 또는 성질에 의해 특징 지워진다. 예를 들면, 본 항체는 IFNAR-1, 바람직하게는 인간 IFNAR-1에 특이적으로 결합한다. 덧붙여서, 본 항체는 사이노몰거스 원숭이 및/또는 레서스 원숭이와 같은 하나 이상의 비-인간 영장류로부터의 IFNAR-1과 상호 작용할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 높은 친화력으로 예를 들면 10^{-7} M 이하의 K_D 로, 더욱 바람직하게는 10^{-8} M 이하 또는 10^{-9} M 이하, 또는 5×10^{-10} M 이하, 또는 2×10^{-10} M 이하의 K_D 로 IFNAR-1에 결합한다.

[0128] 더욱이 본 발명의 항체는 타입 I 인터페론의 생물학적 활성을 억제할 수 있다. 본 항체는 적어도 하나의 타입 I 인터페론의 생물학적 활성을 억제하고, 바람직하게는 여러 타입 I 인터페론(즉, 타입 I 인터페론의 다른 서브타입, 적어도 2, 더욱 바람직하게는 적어도 3, 또는 적어도 4, 또는 적어도 5, 또는 적어도 6, 또는 적어도 7, 또는 적어도 8, 또는 적어도 9, 또는 적어도 10, 또는 적어도 11, 또는 적어도 12, 또는 적어도 13, 또는 적어도 14, 또는 적어도 15개)의 생물학적 활성을 억제한다. 한 바람직한 구체예에서, 본 항체는 다음의 타입 I 인터페론들의 생물학적 활성을 억제한다: $\alpha 1$, $\alpha 2a$, $\alpha 2b$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 10$, $\alpha 14$, $\alpha 16$, $\alpha 17$, $\alpha 21$, 베타 및 오메가. 다른 바람직한 구체예에서, 본 항체는 림프아세포 IFN 및/또는 백혈구 IFN의 활성을 억제한다.

[0129] 타입 I 인터페론의 생물학적 활성을 억제하는 항체의 능력은 이 기술분야에 설정된 하나 이상의 분석으로 평가할 수 있다. 비-제한적인 예에는 다우디 세포 증식의 타입 I IFN-매개 억제의 억제, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 의한 IP-10의 타입 I IFN-유도 발현의 억제, 전신 홍반성 낭창(SLE) 혈장으로 매개된 수치상 세포 발달의 억제, 및 타입 I IFN의 항-바이러스 활성의 억제가 있다. 항체가 "타입 I 인터페론의 생물학적 활성을 억제할 때" 이는 비-특이적인, 대조용 항체에 비해, 적어도 20% 로, 더욱 바람직하게는 적어도 30% 로, 더더욱 바람직하게는 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 로 활성을 억제한다.

[0130] 바람직한 구체예에서, 본 항체는 다우디 세포 증식 분석에서 IFN $\alpha 2b$ 의 활성을 억제하고, 다우디 세포 증식 분석에서 IFN 오메가의 활성을 억제하고, IFN $\alpha 2b$ 또는 IFN 오메가에 의해 유도된 PBMC에 의한 IP-10 분비를 억제하고/거나, SLE 혈장에 의해 매개된 수치상 세포 발달을 억제한다.

[0131] 다른 바람직한 구체예에서, 본 항체는 쥐의 항-IFNAR-1 항체 64G12(ECACC 기탁 번호 92022605로 기탁됨)와 상호-경쟁하지 않는다(즉, 이와 다른 에피토프에 결합한다).

[0132] 항-IFNAR 항체의 기능적 활성들을 평가하기 위한 분석은 실시예들에 더욱 상세히 기술되어 있다. 본 발명의 바

람직한 항체들은 다음의 성질들 중 적어도 하나, 더욱 바람직하게는 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상을 나타낸다:

- [0133] a) IFNAR1(바람직하게는 인간 IFNAR1)에 특이적으로 결합한다;
- [0134] b) IFNAR-1에 1×10^{-8} 이상의 K_D 와 같은 높은 친화력으로 결합한다;
- [0135] c) 여러 타입 I 인터페론들의 생물학적 활성을 억제한다;
- [0136] d) 다우디 세포 증식 분석에서 IFN α 2b의 활성을 억제한다;
- [0137] e) 다우디 세포 증식 분석에서 IFN 오메가의 활성을 억제한다;
- [0138] f) IFN α 2b에 의해 유도된 말초 혈액 단핵 세포에 의한 IP-10 분비를 억제한다;
- [0139] g) IFN 오메가에 의해 유도된 말초 혈액 단핵 세포에 의한 IP-10 분비를 억제한다;
- [0140] h) 전신 홍반성 낭창 혈장에 의해 매개된 수지상 세포 발달을 억제한다; 및
- [0141] i) 쥐의 모노클론 항체 64G12(ECACC 기탁 번호 92022605)와 다른 에피토프에 결합한다(즉 상호-경쟁하지 않는다).
- [0142] 상기한 기능상의 특징 및/또는 실시예에 기술된 기능상의 특징들의 임의의 조합을 본 발명의 항체가 나타낼 수 있다.

[0143] 모노클론 항체 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4

[0144] 본 발명의 바람직한 항체는 실시예에 기술된 바와 같이 분리되고 구조적으로 특징지어진 인간 모노클론 항체 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4이다. 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 V_H 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NOs: 25, 26, 27 및 28에 나타났다. 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 V_L 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NOs: 29, 30, 31 및 32에 나타났다.

[0145] 각각의 이들 항체가 IFNAR-1에 결합할 수 있게 되면, V_H 및 V_L 서열들은 "혼합되고 연결되어" 본 발명의 다른 항-IFNAR-1 결합 분자들을 만들 수 있다. 그러한 "혼합되고 연결된" 항체들의 IFNAR-1 결합은 실시예에서 설명된 타입 I IFN 기능성 억제 분석 및/또는 여기 설명된 결합 분석(예, ELISAs)를 사용하여 시험될 수 있다. 바람직하게는, V_H 와 V_L 사슬이 혼합되고 연결되었을 때 특정 V_H/V_L 쌍으로부터의 V_H 서열은 구조적으로 유사한 V_H 서열로 대체된다. 마찬가지로, 바람직하게는 특정 V_H/V_L 쌍으로부터의 V_L 서열은 구조적으로 유사한 V_L 서열로 대체된다. 예를 들어 3H11과 4G5의 V_H 와 V_L 서열은 혼합되고 연결되기에 특히 용이한데, 이는 이들 항체가 동일한 생식계열 서열(V_H 4-34 및 V_L L18)로부터 유도된 V_H 와 V_L 서열을 사용하고 따라서 이들은 구조 유사성을 나타내기 때문이다. 부가적으로, 11E2와 9D4의 V_H 와 V_L 서열은 혼합되고 연결되기에 특히 용이한데, 이는 이들 항체가 동일한 생식계열 서열(V_H 5-51 및 V_L A27)로부터 유도된 V_H 와 V_L 서열을 사용하고 따라서 이들은 구조 유사성을 나타내기 때문이다.

[0146] 따라서, 일면으로 본 발명은

[0147] (a) SEQ ID NOs: 25, 26, 27, 및 28로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및

[0148] (b) SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 및 32로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역;을 포함하고:

[0149] 항체가 IFNAR-1과 특이적으로 결합하는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0150] 바람직한 중 및 경 사슬 조합에는:

[0151] (a) SEQ ID NO: 25의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및

[0152] (b) SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역; 또는

- [0153] (a) SEQ ID NO: 26의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- [0154] (b) SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역; 또는
- [0155] (a) SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- [0156] (b) SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역; 또는
- [0157] (a) SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역; 및
- [0158] (b) SEQ ID NO: 32의 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역;이
- [0159] 포함된다.
- [0160] 다른 일면으로, 본 발명은 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 중 사슬 및 경 사슬 CDR1s, CDR2s, 및 CDR3s 또는 그의 조합물을 포함하는 항체를 제공한다. 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 V_H CDR1s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 및 4에 나타냈다. 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 V_H CDR2s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 및 8에 나타냈다. 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 V_H CDR3s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 및 12에 나타냈다. 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 V_L CDR1s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 및 16에 나타냈다. 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 V_L CDR2s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 및 20에 나타냈다. 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 V_L CDR3s의 아미노산 서열은 SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 및 24에 나타냈다. CDR 지역은 카벨 시스템을 사용하여 기술하였다(카벨, E. A., 등(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)
- [0161] 각각의 이들 항체가 IFNAR-1에 결합할 수 있고 항원-결합 특이성이 CDR1, 2 및 3지역에 의해 일차적으로 제공되면, V_H CDR1, 2 및 3 서열과 V_K CDR1, 2 및 3서열이 혼합되고 연결되어(즉, 각각의 항체가 V_H CDR1, 2 및 3과 V_K CDR1, 2 및 3을 함유해야 함에도 불구하고, 서로 다른 항체로부터의 CDRs가 혼합되고 연결될 수 있다) 본 발명의 다른 항-IFNAR-1 결합 분자를 생성할 수 있다. 그러한 혼합되고 연결된 항체의 IFNAR-1 결합은 앞서와 실시예에 기술된(예를 들면, ELISAs) 결합 분석를 사용하여 시험할 수 있다. 바람직하게는 V_H CDR 서열들이 혼합되고 연결될 때, 특정 V_H 서열로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열이 구조적으로 유사한 CDR 서열들로 대체될 수 있다. 유사하게, V_K CDR 서열들이 혼합되고 연결될 때, 특정 V_K 서열로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열이 바람직하게는 구조적으로 유사한 CDR 서열들로 대체될 수 있다. 예를 들면, 3F11 및 4G5의 V_H CDR1s가 일부 구조적 유사성을 공유하므로 혼합되고 연결되는 것이 용이하다. 또 다른 예로 11E2 및 9D4의 V_H CDR1s가 일부 구조적 유사성을 공유하므로 혼합되고 연결되는 것이 용이하다. 또 다른 예로 3F11 및 4G5의 V_K CDR1s가 일부 구조적 유사성을 공유하고 있다. 또 다른 예로 11E2 및 9D4의 V_H CDR1s가 일부 구조적 유사성을 공유하고 있다. 모노클론 항체 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4에 대해 여기에 나타난 CDR 서열과 구조적으로 유사한 서열로 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L CDR 지역 서열이 치환됨으로 신규의 V_H 및 V_L 서열이 생성될 수 있음이 당업자에게는 자명하다.
- [0162] 따라서, 다른 일면으로, 본 발명은
- [0163] (a) SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 및 4로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0164] (b) SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 및 8로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0165] (c) SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0166] (d) SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 및 16으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0167] (e) SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변

지역 CDR2; 및

- [0168] (f) SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 및 24로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함하고;
- [0169] 항체가 IFNAR-1과 특이적으로 결합하는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0170] 한 바람직한 구체예에서, 항체는
- [0171] (a) SEQ ID NO: 1을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0172] (b) SEQ ID NO: 5를 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0173] (c) SEQ ID NO: 9을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0174] (d) SEQ ID NO: 13을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0175] (e) SEQ ID NO: 17을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- [0176] (f) SEQ ID NO: 21을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함한다.
- [0177] 다른 바람직한 구체예에서, 항체는
- [0178] (a) SEQ ID NO: 2를 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0179] (b) SEQ ID NO: 6을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0180] (c) SEQ ID NO: 10을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0181] (d) SEQ ID NO: 14를 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0182] (e) SEQ ID NO: 18을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- [0183] (f) SEQ ID NO: 22를 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함한다.
- [0184] 다른 바람직한 구체예에서, 항체는
- [0185] (a) SEQ ID NO: 3을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0186] (b) SEQ ID NO: 7을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0187] (c) SEQ ID NO: 11을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0188] (d) SEQ ID NO: 15를 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0189] (e) SEQ ID NO: 19를 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- [0190] (f) SEQ ID NO: 23을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함한다.
- [0191] 다른 바람직한 구체예에서, 항체는
- [0192] (a) SEQ ID NO: 4를 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0193] (b) SEQ ID NO: 8을 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR2;
- [0194] (c) SEQ ID NO: 12를 포함하는 중 사슬 가변 지역 CDR3;
- [0195] (d) SEQ ID NO: 16을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR1;
- [0196] (e) SEQ ID NO: 20을 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR2; 및
- [0197] (f) SEQ ID NO: 24를 포함하는 경 사슬 가변 지역 CDR3을 포함한다.
- [0198] 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4와 같은 에피토프에 결합하는 항체
- [0199] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 (각각 SEQ ID NOs: 25, 26, 27, 및 28에 보여진 V_H 서열들과 각각 SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 및 32에 보여진 V_L 서열들을 갖고 있는) 모노클론 항체 3F11, 4G5, 11E2, 또는 9D4와 동일한 인간

IFNAR-1 상의 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 그러한 항체는 표준 IFNAR-1 결합분석에서 3F11, 4G5, 11E2, 또는 9D4와 상호-경쟁할 수 있는 능력을 기반으로 확인될 수 있다. 3F11, 4G5, 11E2, 또는 9D4이 인간 IFNAR-1에 결합하는 것을 억제하는 것에 대한 시험 항체의 능력은 시험 항체가 인간 IFNAR-1에의 결합하는 것에 대해 3F11, 4G5, 11E2, 또는 9D4와 경쟁하여 3F11, 4G5, 11E2, 또는 9D4와 동일한 인간 IFNAR-1 상의 에피토프에 결합할 수 있다는 것을 설명한다. 바람직한 구체예에서, 3F11, 4G5, 11E2, 또는 9D4와 동일한 인간 IFNAR-1 상의 에피토프에 결합하는 항체는 인간 모노클론 항체이다. 그러한 인간 모노클론 항체는 실시예에 기술된대로 제조되고 분리될 수 있다.

[0200] 또 다른 바람직한 구체예에서, 항체는 (즉 상호-경쟁하지 않는) 쥐 모노클론 항체 64G12(ECACC 기탁 번호 92022605)와 다른 에피토프에 결합한다.

[0201] 특정 생식계열 서열을 갖는 항체

[0202] 어떤 구체예에서, 본 발명의 항체는 특정 생식계열 중 사슬 면역글로불린 유전자로부터의 중 사슬 가변 지역 및 /또는 특정 생식계열 경 사슬 면역글로불린 유전자로부터의 경 사슬 가변 지역을 포함한다.

[0203] 예를 들면, 한 바람직한 구체예에서, 본 발명은: 항체가

[0204] (a) 인간 VH 4-34 또는 5-51 유전자의 중 사슬 가변 지역을 포함하고;

[0205] (b) 인간 Vk L18 또는 A27 유전자의 경 사슬 가변 지역을 포함하고;

[0206] (c) 항체가 IFNAR-1에 특이적으로 결합하는:

[0207] 분리된 항-IFNAR-1 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다

[0208] VH 4-34 및 Vk L18의 V_H 및 V_k 를 갖는 항체의 예에는 각각 3F11 및 4G5가 포함된다. VH 5-51 및 Vk A27의 V_H 및 V_k 를 갖는 항체의 예에는 각각 11E2 및 9D4가 포함된다.

[0209] 여기서 사용된, 인간 항체는 항체의 가변 지역이 인간 생식계열 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 얻은 것이라면, 특정 생식계열 서열의 "생성물" 또는 "그로부터 유도된" 중 또는 경 사슬 가변 지역을 포함한다. 그러한 시스템은 관심 있는 항원으로 인간 면역글로불린 유전자를 옮기는 유전자 이식 쥐를 면역시키거나 또는 관심 있는 항원으로 파아지에 전시한 인간 면역글로불린 유전자를 스크린하는 것을 포함한다. 인간 생식계열 면역글로불린 서열의 "생성물" 또는 "그로부터 유도된" 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 생식계열 면역글로불린의 아미노산 서열에 비교하고 인간 항체의 서열에 근접한(즉, 가장 큰 %의 동일성) 인간 생식계열 면역글로불린 서열을 선택함으로써 확인할 수 있다. 특정 인간 생식계열 면역글로불린 서열의 "생성물" 또는 "그로부터 유도된" 인간 항체는 예를 들면, 자연적으로-발생하는 체세포 돌연변이 또는 위치-지적 돌연변이의 의도된 도입에 의해, 생식계열 서열에 비교하여 다른 아미노산을 포함할 수 있다. 그러나 선택된 인간 항체는 전형적으로 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 아미노산 서열이 적어도 90% 동일하고 다른 중의 생식계열 면역글로불린 아미노산 서열(예를 들면, 쥐의 생식계열 서열)에 비교할 때 인간으로 인간 항체와 동일한 아미노산 잔기를 포함한다. 어떤 경우에, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 아미노산 서열이 적어도 95% 또는 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%까지도 동일하다. 전형적으로, 특정 인간 생식계열 서열로부터 유도된 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 다른 아미노산이 10개에 지나지 않는다. 어떤 경우에, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화되는 아미노산 서열과 다른 아미노산이 5개 또는 4, 3, 2 또는 1개에 지나지 않는다.

[0210] 동일한 항체

[0211] 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 여기에 기술된 바람직한 항체의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중 및 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서 항체는 본 발명의 항-IFNAR-1 항체의 바람직한 기능적 성질을 유지한다.

[0212] 예를 들면, 본 발명은 중 사슬 가변 지역과 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서:

[0213] (a) 중 사슬 가변 지역은 SEQ ID NOs: 25, 26, 27 및 28로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도

80%가 동일한 아미노산 서열을 포함하고;

- [0214] (b) 경 사슬 가변 지역은 SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 및 32로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80%가 동일한 아미노산 서열을 포함하고;
- [0215] (c) 항체가 IFNAR-1에 특이적으로 결합하고 본 명세서에 기술한 기능적 성질들중 적어도 하나, 바람직하게는 본 명세서에 기술된 기능적 성질들 여러 개를 나타내는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0216] 다른 구체예에서, V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열이 상기에 주어진 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일할 수 있다. 상기에 주어진 서열들의 V_H 및 V_L 지역과 높은(즉, 80% 이상의) 동일성을 갖는 V_H 및 V_L 지역을 갖는 항체는 각각 SEQ ID NOs: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40을 암호화하는 핵산 분자를 돌연변이 시키고(예를 들면, 위치-지적 또는 PCR-매개 돌연변이 유발), 이어서 여기에 기술된 기능 분석을 사용하여 유지된 기능에 대해(즉, 상기 (c), (d) 및 (e)에 주어진 기능들) 암호화된 개조 항체를 시험하여 얻어질 수 있다.
- [0217] 여기서 사용된 아미노산 서열들 사이의 동일성 퍼센트는 두 서열들 사이의 일치성 퍼센트와 등가이다. 두 서열들 사이의 일치성 퍼센트는 두 서열의 최적의 배열을 위해 도입되어야 할, 각각의 간격의 길이와 간격들의 수를 계산하여, 서열에 의해 공유된 일치하는 위치의 수의 함수이다(즉, 동일성%=일치하는 위치의 #/위치의 총# x100). 서열들의 비교와 두 서열사이의 일치하는 퍼센트의 결정은 아래의 비제한 실시예에서 기술된 바와 같이, 수학적 연산을 사용하여 얻을 수 있다.
- [0218] 두 아미노산 서열 사이의 일치성 퍼센트는 PAM120가중치 유수표, 간격 길이 페널티 12 및 간격 페널티 4를 사용하는, ALIGN 프로그램(버전 2)에 포함시킨 E. 메이어 및 W. 밀러(Comput. Appl. Biosci.,4:11-17(1988))의 연산을 사용하여 결정할 수 있다. 부가하면, 두 아미노산 서열사이의 일치성 퍼센트는 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 간격 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 5의 길이 가중치를 사용하는, GCG 소프트웨어 패키지의 GAP프로그램(<http://www.gcg.com> 에서 이용가능한)에 포함된 니들만과 운위의 연산(J. Mol. Biol. 48:444-453(1970))을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0219] 부가적으로 또는 대체적으로, 본 발명의 단백질 서열은 예를 들면, 일치성 관련 서열들에 대해 공개적 데이터베이스에 대한 탐색을 수행하는데, "의문 서열"로 더욱 사용할 수 있다. 그러한 탐색은 알트슐, 등의 (1990)J. Mol. Biol. 215:403-10의 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행할 수 있다. BLAST 단백질 탐색은 본 발명의 항체 분자와 동일한 아미노산 서열을 얻기 위해서 XBLAST 프로그램, 스코어=50, 워드레쓰=3으로 행할 수 있다. 비교를 목적으로 하는 간격이 있는 배열을 얻기 위해, 알트슐, 등의 (1997)Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402에 기술된 바와 같이 간격이 있는 BLAST를 사용할 수 있다. BLAST 및 간격이 있는 BLAST 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램의(예를 들면, XBLAST 및 NBLAST) 애초의 매개변수를 사용할 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. 참조.
- [0220] 보존성 변형물을 갖는 항체
- [0221] 어떤 구체예에서, 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2, 및 CDR3서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역과 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서 하나 또는 그 이상의 CDR 서열은 여기에 기술된 바람직한 항체(예를 들면, 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4)를 기본으로 하는 특정의 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함하고, 항체가 본 발명의 항-IFNAR-1 항체의 바람직한 기능적 성질을 보유한다. 따라서, 본 발명은 CDR1, CDR2, 및 CDR3서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역과 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하며, 여기서:
 - [0222] (a) 중 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 그의 보존성 변형물을 포함하고;
 - [0223] (b) 경 사슬 가변 지역 CDR3 서열이 SEQ ID NO: 21, 22, 23, 및 24로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함하고;
 - [0224] (c) 항체가 IFNAR-1에 특이적으로 결합하고, 여기에 기술한 기능적 성질들중 적어도 하나, 더욱 바람직하게는 여기에 기술된 기능적 성질들 여러 개를 나타내는, 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

- [0225] 다른 구체예에서, 중 사슬 가변 지역 CDR2 서열은 SEQ ID NO: 5, 6, 7, 및 8의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 그의 보존성 변형물을 포함하고; 경 사슬 가변 지역 CDR2 서열은 SEQ ID NO: 17, 18, 19, 및 20의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 그의 보존성 변형물을 포함한다. 또 다른 구체예에서 중 사슬 가변 지역 CDR1 서열은 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 및 4의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 및 그의 보존성 변형물을 포함하고; 경 사슬 가변 지역 CDR1 서열은 SEQ ID NO: 13, 14, 15, 및 16의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 그의 보존성 변형물을 포함한다.
- [0226] 여기서 사용된 "보존성 서열 변형물"이란 용어는 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성에 중대하게 영향을 미치지 않거나 개조하지 않은 아미노산 변형물을 말한다. 그러한 보존성 변형물은 아미노산 치환, 첨가 및 삭제를 포함한다. 위치-지적 돌연변이가 유발 및 PCR-매개 돌연변이가 유발과 같은 이 기술 분야에 알려진 표준 기술로 본 발명의 항체에 변형을 도입할 수 있다. 보존성 아미노산 치환물은 아미노산 잔기가 유사한 측면 사슬을 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것들이다. 유사한 측면 사슬을 갖는 아미노산 잔기의 집단은 이 기술 분야에 규정되어 있다. 이 집단에는 염기성 측면 사슬(예를 들면, 라이신, 알기닌, 히스티딘), 산성 측면 사슬(예를 들면, 아스팔트산, 글루탐산), 비전하 극성 측면 사슬(예를 들면, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측면 사슬(예를 들면, 알라닌, 발린, 로이신, 이소로이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-가지 측면 사슬(예를 들면, 트레오닌, 발린, 이소로이신) 및 방향족 측면 사슬(예를 들면, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 갖는 아미노산이 있다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 지역내의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측면 사슬 집단으로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 개조된 항체는 여기에 기술된 기능 분석을 사용하여 보유 기능(즉, 상기 (c), (d) 및 (e)에 주어진 기능들)을 시험할 수 있다.
- [0227] 제조되고 변형된 항체
- [0228] 본 발명의 항체는 출발 항체에 대해 개조된 성질을 갖는 변형된 항체를 제조하기 위해, 출발 물질로서, 여기에 기술된 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열을 갖는 항체를 사용하여 제조할 수 있다. 항체는 하나 또는 둘의 가변 지역 내에서(즉 V_H 및/또는 V_L) 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 CDR 지역 내에서 및/또는 하나 또는 그 이상의 골격 지역 내에서 하나 또는 그 이상의 잔기를 변형시킴으로써 제조될 수 있다. 부가적으로 또는 대체적으로 항체는 예를 들면, 항체의 효과기 기능을 개조하기 위해서, 일정 지역 내에서 잔기를 변형함으로써 제조될 수 있다.
- [0229] 수행할 수 있는 가변 지역 제조의 한 유형은 CDR 이식이다. 항체는 6개의 중 및 경 사슬 상보성 결정 지역(CDR)내에 위치한 아미노산 잔기를 통해 목표 항원과 우세하게 상호작용한다. 이 이유로 인해, CDR 내의 아미노산 서열은 CDR의 바깥쪽 서열보다 개개의 항체사이에서 더욱 다양하다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원 상호작용에 기여하므로 상이한 성질을 갖는 상이한 항체로부터의 골격 서열에 이식된 특성의 자연적으로 발생하는 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 조립함으로써 특성의 자연적으로 발생하는 항체의 성질을 모방하는 재조합 항체를 발현시킬 수 있다.(예를 들면, 리치만, L. 등 (1998) *Nature* 332:323-327; 존스, P. 등 (1986) *Nature* 321:522-525; 쿨, C. 등 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; 윈터의 미국특허번호 5,225,539, 및 쿨 등의 미국특허번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 참조).
- [0230] 따라서, 본 발명의 다른 구체예는 각각 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 및 4, SEQ ID NO: 5, 6, 7, 및 8 및 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 중 사슬 가변 지역과 각각 SEQ ID NO: 13, 14, 15, 및 16, SEQ ID NO: 17, 18, 19, 및 20 및 SEQ ID NO: 21, 22, 23, 및 24로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경 사슬 가변 지역을 포함하는 분리된 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 따라서, 그러한 항체는 모노클론 항체 3F11, 4G5, 11E2 또는 9D4의 V_H 및 V_L CDR 서열을 포함하고, 이들 항체로부터의 서로 다른 골격 서열도 포함할 수 있다.
- [0231] 그러한 골격 서열은 생식계열 항체 유전자 서열을 포함하는 출판된 참고문헌 또는 공개 DNA 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 예를 들면, 인간 중 및 경 사슬 가변 지역 유전자의 생식계열 DNA 서열은 "V베이스" 인간 생식계열 서열 데이터베이스(인터넷상에서 www.mrcpe.cam.ac.uk/vbase에서 얻을 수 있음), 뿐만 아니라 카벨, E. A., 등 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of

Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242; 톰린슨, I. M., 등 (1992) "the repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; 및 콕스, J. P. L. 등 (1994) "A Directory of Human Germ-lone V_H Segments Reveals s Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836;에서 발견할 수 있고, 그 각각의 내용은 참고로 여기에 특별히 포함시킨다.

- [0232] 본 발명의 항체에 사용하기에 바람직한 골격 서열은 본 발명의 선택된 항체에 사용되는 골격 서열과 구조적으로 유사한, 예를 들면, 3F11 및 4G5 모노클론 항체에 사용되는 V_H 4-34 및 V_L L18 골격 서열, 및 11E2 및 9D4 모노클론 항체에 사용된 V_H 5-51 및 V_L A27 골격 서열과 유사한 것들이다. SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 12의 V_H CDR1, 2 및 3 서열 및 SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 및 24의 V_L CDR1, 2 및 3 서열은 골격 서열이 유도된 생식계열 면역글로불린 유전자에서 발견된 것과 동일한 서열을 갖는 골격 지역에 이식될 수 있거나 또는 생식계열과 비교할 때 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함하는 골격 지역에 CDR 서열이 이식될 수 있다. 예를 들면, 몇몇 경우에 항체의 항원 결합 능력을 유지하거나 증진시키기 위해 골격 지역 내에서 잔기를 돌연변이시키는 것이 이롭다는 것이 발견되었다(예를 들면, 킨 등의 미국 특허 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 참조).
- [0233] 가변 지역 변형의 다른 유형은 V_H 및/또는 V_L CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 지역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이시켜서, 이로써 관심있는 항체의 하나 또는 그 이상의 결합 성질(예를 들면, 친화력)을 개선한다. 위치-지적 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발로 돌연변이가 도입되고 항체 결합에 있어서의 효과 또는 관심있는 다른 기능적 성질이 실시예에 제공되고 여기에 기술된 시험관내 또는 생체 내 분석으로 평가될 수 있다. 바람직하게는 보존성 변형물(상기한 것)이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 첨가, 또는 삭제이나, 바람직하게는 치환이다. 더욱이 전형적으로 기껏해야 다섯 개의 잔기가 CDR 지역이 개조되는 내에서 개조된다.
- [0234] 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은 (a) SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 및 4로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 및 4로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 지역;
- [0235] (b) SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 및 8으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 및 8로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 지역;
- [0236] (c) SEQ ID NOs: 9, 10, 11 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 9, 10, 11 및 12로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3 지역;
- [0237] (d) SEQ ID NOs: 13, 14, 15 및 16으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 13, 14, 15 및 16으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1 지역;
- [0238] (e) SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 17, 18, 19 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2 지역; 및
- [0239] (f) SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 및 24로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 비하여 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 개의 아미노산 치환, 삭제 또는 첨가를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3 지역을 포함하는; 중 사슬 가변 지역을 포함하는, 분리된 항-IFNAR-1 모노클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0240] 본 발명의 제조된 항체에는 예를 들면, 항체의 성질을 개선하기 위해서, V_H 및/또는 V_L 내의 골격 잔기에 변형이 행해진 것들이 포함된다. 전형적으로 그러한 골격 변형은 항체의 면역원성을 감소시킨다. 예를 들면, 한 접근법은 하나 또는 그 이상의 골격 잔기를 상응하는 생식계열 서열로 복귀돌연변이시키는 것이다. 더욱 특히 체세포 돌연변이를 수행한 항체는 항체가 유도된 생식계열 서열과 다른 골격 잔기를 포함할 수 있다. 그러한 잔기는 항

체가 유도된 생식계열 서열에 항체 골격 서열을 비교함으로써 밝혀질 수 있다. 예를 들면, 3F11에서, V_H의 아미노산 잔기 #43(FR2내에서)은 트레오닌인 반면, 상응하는 V_H 4-34 생식계열 서열내의 이 잔기는 알라닌이다(도 5참조). 골격 지역 서열을 이들의 생식계열 배열로 되돌리기 위해서, 체세포 돌연변이를 예를 들면 위치-지적 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발에 의해 생식계열 서열로 복귀 돌연변이시킬 수 있다(예를 들면, 3F11의 V_H의 잔기 43을 트레오닌에서 알라닌으로 복귀돌연변이시킬 수 있다). 다른 예로, 4G5에서, V_H의 아미노산 잔기 #81(FR3내에서)은 아스파라긴인 반면, 상응하는 V_H 4-34 생식계열 서열내의 이 잔기는 라이이다(도 6참조). 골격 지역 서열을 이들의 생식계열 배열로 되돌리기 위해서, 체세포 돌연변이를 아스파라긴에서 라이신으로 복귀돌연변이시킬 수 있다. 다른 예로, 11E2 및 9D4에서, V_H의 아미노산 잔기 #28(FR1내에서)은 이소로이신인 반면, 상응하는 V_H 5-51 생식계열 서열내의 이 잔기는 세린이다(도 7참조). 골격 지역 서열을 이들의 생식계열 배열로 되돌리기 위해서, 체세포 돌연변이를 이소로이신에서 세린으로 복귀돌연변이시킬 수 있다. 그러한 "복귀돌연변이된" 항체는 또한 본 발명에 포함되는 것으로 한다.

- [0241] 골격 변형의 또 다른 유형은 항체의 잠재적 면역원성을 감소시키기 위해서 T 세포 에피토프를 제거하려고, 골격 지역 내에서 또는 하나 또는 그 이상의 CDR 지역 내에서 하나 또는 그 이상의 잔기를 돌연변이시키는 것을 포함한다. 이 접근은 또한 탈면역화에도 언급되며, 칼 등의 미국 특허 공개 번호 20030153043에 상세히 기술되어 있다.
- [0242] 골격 또는 CDR 지역 내에 행한 변형에 부가 또는 대체하여, 본 발명의 항체는, 혈장 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존 세포독성과 같은 항체의 하나 또는 그 이상의 기능적 성질을 전형적으로 고치기 위해서 Fc 지역 내에 변형을 하도록 제조될 수 있다. 더욱이 본 발명의 항체는 화학적으로 변형 시키거나(예를 들면, 하나 또는 그 이상의 화학성분을 항체에 부착시킬 수 있다) 또는 그의 글리코실화를 변경시키기 위해서 변형하여 다시 항체의 하나 또는 그 이상의 기능적 성질을 변경할 수 있다. 각각의 이들 구체에는 아래에 더욱 상세히 기술되어 있다. Fc 지역 내의 잔기 번호는 카벨의 EU 인덱스의 것이다.
- [0243] 한 구체예에서, CH1의 이음 지역이 이음 지역 내의 시스템 잔기의 수가 변경되게 예를 들면 증가하거나 감소하게 변형될 수 있다. 이 접근은 보드머 등의 미국 특허 번호 5,677,425에 더욱 기술되어 있다. CH1의 이음 지역 내의 시스템 잔기의 수가 변경되어 예를 들면 경 및 중 사슬의 조립을 용이하게 하거나 항체의 안정성을 증가 또는 감소시킬 수 있다.
- [0244] 또 다른 구체예에서, 항체의 Fc 이음 지역이 돌연변이되어 항체의 생물학적 반감기가 감소된다. 더욱 특히 항체가 자연 Fc-이음 영역 SpA 결합에 비해 손상된 스타필로코실 단백질 A (SpA)를 갖도록 Fc-이음 단편의 CH2-CH3 영역 계면 지역에 하나 또는 그 이상의 아미노산 돌연변이가 도입된다. 이 접근은 왈드 등의 미국 특허 번호 6,165,745에 더욱 상세히 기술되어 있다.
- [0245] 또 다른 구체예에서, 항체는 그의 생물학적 반감기를 증가시키도록 변형된다. 예를 들면, 왈드의 미국 특허 번호 6,277,375에 기술된 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 다음의 돌연변이가 도입된다: T252L, T254S, T256F. 대체적으로, 생물학적 반감기를 증가시키기 위해서, 항체를 프레스타 등의 미국 특허 번호 5,869,046 및 6,121,022에 기술된 바와 같이, IgG의 Fc 지역의 CH2 영역의 두 개의 루프로부터 취한 구체 수용체 결합 에피토프를 포함시키도록 CH1 또는 CL 지역 내에서 변경시킬 수 있다.
- [0246] 다른 구체예에서, 항체의 효과기 기능을 변경시키기 위해서 적어도 하나의 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 대체함으로써 Fc 지역을 변경시킬 수 있다. 예를 들면, 항체가 효과기 리간드에 대해 변경된 친화성을 갖지만 항체의 항원-결합 능력을 유지하도록, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 다른 아미노산 잔기로 대체할 수 있다. 친화성이 변경된 효과기 리간드는 예를 들면, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이 접근은 윈터 등의 미국 특허 번호 5,624,821 및 5,648,260에 더욱 상세히 기술되어 있다.
- [0247] 다른 실시예에서, 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소 또는 폐지 보체 의존 세포 독성(CDC)을 갖도록 아미노산 잔기 329, 331 및 322으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산을 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 이 접근은 이드소지 등의 미국 특허 번호 6,194,551에 더욱 상세히 기술되어 있다.
- [0248] 다른 실시예에서, 아미노산 위치 231 및 239내의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 변경하여 이로써 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경할 수 있다. 이 접근은 보드머 등의 PCT 공개 WO 94/29351에 더욱 상세히 기술되어 있다.

[0249] 또 다른 실시예에서, 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 또는 439의 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산을 변형시킴으로 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화력을 증가시키고/거나 항체 의존 세포 독성을 매개하는 항체의 능력을 증가시키도록 Fc 지역을 변형한다. 이 접근은 프레스타의 PCT 공개 WO 00/42072에 더욱 기술되어 있다. 더욱이 Fc γ R I, Fc γ R II, Fc γ R III 및 FcRn의 인간 IgG 상의 결합 위치는 지도가 그려졌고, 결합이 증진된 변이도 기술되었다(실드, R.L. 등(2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604 참조). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339 상의 특정 돌연변이는 Fc γ R III 에 대한 결합을 증진시키는 것으로 나타났다. 부가하여, 다음의 조합 돌연변이들은 Fc γ R III 결합을 증진시키는 것으로 나타났다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

[0250] 또 다른 구체예에서, 항체의 글리코실화를 변형하였다. 예를 들면, 항글리코실화된 항체를 만들 수 있다(즉, 항체가 글리코실화가 결여된다). 글리코실화가 변경되어 예를 들면, 항원에 대한 항체의 친화력을 증가시킬 수 있다. 그러한 카보하이드레이트 변형은 예를 들면 항체 서열내의 글리코실화의 하나 또는 그 이상의 위치를 변경함으로써 성취할 수 있다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 가변 지역 골격 글리코실화 위치를 제거하는 결과를 초래하게 되는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환이 행해져서 이로서 그 위치에서의 글리코실화를 제거할 수 있다. 그러한 항글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화력을 증가시킬 수 있다. 그러한 접근은 코 등의 미국 특허 번호 5,714,350 및 6,350,861에 더욱 상세히 기술되어 있다.

[0251] 부가하여 또는 대체적으로, 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 하이포푸코실화 항체 또는 증가된 이분 GlcNac 구조를 갖는 항체와 같은 글리코실화의 변경된 유형을 갖는 항체를 만들 수 있다. 그러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증진시키는 것으로 나타났다. 그러한 카보하이드레이트 변형은, 예를 들면, 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현시킴으로 성취할 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 이 기술 분야에 기술되어 있으며, 본 발명의 제조항체를 발현시켜서 이로서 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생산하기 위해 숙주 세포로 사용될 수 있다. 예를 들면, 하나이 등의 EP 1,176,195에는 세포주 내에서 발현된 항체가 하이포푸코실화를 나타내는, 푸코실 전이효소를 암호화하는, FUT8 유전자가 기능상 찢겨진 세포주가 기술되어 있다. 프레스타의 PCT 공개 WO03/035835에는 Asn(297)-연결 카보하이드레이트에 푸코오스를 부착시키는 능력이 감소되어, 숙주 세포에서 발현된 항체의 하이포푸코실화를 초래하는 변이 CHO 세포주, Lec 13 세포가 기술되어 있다.(또한 실드, R.L. 등, (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740을 보라) 우마나 등의 PCT 공개 WO 99/54342에는 제조된 세포주에서 발현된 항체가 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 증가된 이분 GlcNac 구조를 나타내도록 글리코프로테인-변형 글리코실 전이효소(예를 들면, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐 전이효소 III(GnTIII))를 발현시키도록 제조된 세포주가 기술되어 있다.(또한 우마나 등 (1999) Nat. Biotech. 17:176-180 참조).

[0252] 본 발명에 의해 고려된 본 명세서의 항체의 다른 변형은 페그화(pegylation)이다. 항체를 예를 들면, 항체의 생물학적(예를 들면, 혈장) 반감기를 증가시키기 위해서 페그화할 수 있다. 항체를 페그화하기 위해서, 하나 또는 그 이상의 PEG 기가 항체 또는 항체 단편에 부착하는 조건하에서 PEG의 알데히드 유도체 또는 반응성 에스테르와 같은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 항체 또는 그 단편을 전형적으로 반응시킨다. 바람직하게는 페그화는 반응성 PEG 분자(유사 반응성 수용성 중합체)의 알킬화 반응 또는 아실화 반응을 통해 수행한다. 여기에서 사용된 "폴리에틸렌 글리콜"이란 용어는 모노(C1-C10)알콕시-또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드와 같은 다른 단백질을 유도하기위해 사용할 수 있는 임의의 PEG 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 어떤 구체예에서, 페그화된 항체는 항글리코실화된 항체이다. 단백질을 페그화하는 방법은 이 기술 분야에 잘 알려져 있으며 본 발명의 항체에 적용할 수 있다. 예를 들면 니시무라 등의 EP 0 154 316 및 이시카와 등의 EP 0 401 384를 참조한다.

[0253] 항체를 제조하는 방법

[0254] 따라서, 본 발명의 다른 일면으로, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체 예를 들면, 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4를 이용하여 IFNAR-1에 결합하는 것과 같은 본 발명의 항체의 기능적 성질 적어도 하나를 보유하는 구조적으로 연관된 항-IFNAR-1 항체를 만들 수 있다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 3F11, 4G5, 11E2, 또는 9D4의 CDR 지역 또는 그의 돌연변이를 알려진 골격 지역 및/또는 다른 CDR과 재조합으로 결합시켜서 상기한 바와 같은 본 발명의 부

가적인, 재조합-제조된, 항-IFNAR-1 항체를 만들 수 있다. 변형의 다른 유형에는 앞의 부분에서 기술된 것들이 포함된다. 제조하는 방법의 출발 물질은 여기에 제공된 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열 또는 하나 또는 그 이상의 그의 CDR 지역이다. 제조된 항체를 만들기 위해서, 여기에 제공된 하나 또는 그 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열 또는 하나 또는 그 이상의 그의 CDR 지역을 갖는 항체를 실제로 제조하는 것(즉, 단백질을 발현시키는 것)은 필요하지 않다. 오히려, 서열 내에 포함된 정보가 출발 물질로 사용되어 원래의 서열(들)로부터 유도된 "제 2"의 서열(들)을 만들고 다음에 "제 2"의 서열(들)이 제조되고 단백질로 발현된다.

- [0255] 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은
- [0256] (a) (i) SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 및 4로 구성된 군으로부터 선택되는 서열 CDR1; 및/또는 SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 및 8로 구성된 군으로부터 선택되는 서열 CDR2; 및/또는 SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 및 12로 구성된 군으로부터 선택되는 서열 CDR3를 포함하는 중 사슬 가변 지역 항체 서열; 및/또는 (ii) SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 및 16으로 구성된 군으로부터 선택되는 서열 CDR1; 및/또는 SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 및 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 서열 CDR2; 및/또는 SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 및 24로 구성된 군으로부터 선택되는 서열 CDR3을 포함하는 경 사슬 가변 지역 항체 서열을 제공하고;
- [0257] (b) 적어도 하나의 변경된 항체 서열을 만들기 위해서 첫번째 항체 서열 및/또는 두번째 항체 서열내의 아미노산 잔기 적어도 하나를 변경하고;
- [0258] (c) 변경된 항체 서열을 제조하고
- [0259] (d) 변경된 항체 서열을 단백질로 발현하는 것을: 포함하는 항-IFNAR-1 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0260] 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 변경된 항체 서열을 제조하고 발현시킨다.
- [0261] 바람직하게는, 변경된 항체 서열에 의해 암호화된 항체는 기능적 성질이
- [0262] (i) IFNAR-1에 결합한다;
- [0263] (ii) IFNAR-1에 타입 I 인터페론이 결합하는 것을 억제한다;
- [0264] (iii) 인간 IFNAR-1을 발현하는 살아있는 세포에 결합한다;
- [0265] (iv) 인간 IFNAR-1에 10^{-8} M 이하(예를 들면, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 이하)의 K_D 로 결합한다;
- [0266] (v) IFNAR-1상의 특정 에피토프에 결합한다(상보적 활성을 갖는 모노클론 항체가 조합에 사용될 때 동일한 에피토프에 결합하는 것에 대해 경쟁할 수 있는 가능성을 제거하기 위해서):
- [0267] 에 제한되지는 않으나 이를 포함하는, 여기에 기술된 항-IFNAR-1 항체의 기능적 성질 하나, 몇몇 또는 전부를 보유하는 것이다.
- [0268] 변경된 항체의 기능적 성질은 여기에 기술된 및/또는 이 기술분야에서 사용가능한 표준 분석을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들면, 항체의 IFNAR-1에 결합하는 능력은 실시예에 주어진 것과 같은 표준 결합분석(예를 들면, ELISAs)를 사용하여 결정할 수 있다.
- [0269] 본 발명의 항체를 제조하는 방법의 어떤 구체예에서, 돌연변이가 항-IFNAR-1 항체 암호화 서열(예를 들면, 3F11, 4G5, 11E2, 또는 9D4 암호화 서열)의 일부분 또는 전부에서 임의로 또는 선택적으로 도입되어서 형성된 결과의 변형된 항-IFNAR-1 항체를 여기에 기술된 바와 같이 결합 활성 및/또는 다른 기능적 성질에 대해 스크린할 수 있다. 돌연변이 방법은 이 분야에 기술되어 있다. 예를 들면, 솔트의 PCT 공개 WO 02/092780에 포화 돌연변이 유발, 합성 리간드 조립 또는 그의 조합을 사용하는 항체 돌연변이를 만들고 스크린하는 방법이 기술되어 있다. 대체적으로, 라잘 등의 PCT 공개 WO 03/074679에는 항체의 물리화학적 성질을 최적화하는 컴퓨터 스크린 방법이 기술되어 있다.
- [0270] 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자
- [0271] 본 발명의 다른 일면은 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 핵산은 전체 세포, 세포 용균물 또는 부분적으로 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 알카리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 칼럼 크로마토그래피, 아가로스 젤 전기영동 및 이 기술분야에 잘 알려진 다른 것을 포함하는 표준 기술에 의

해 다른 세포 성분 또는 다른 불순물, 예를 들면, 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제했을 때, 분리되거나 또는 실질적으로 순수하게 된다. (F. 어서벨 등 ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York 참조) 본 발명의 핵산은 예를 들면 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 인트론(intronic) 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[0272] 본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마(예를 들면, 아래에 더욱 기술되는 바와 같이 인간 면역글로불린 유전자를 옮기는 유전자 이식 쥐로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현된 항체에 대해서는, 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 경 및 중 사슬을 암호화하는 cDNA를 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 얻을 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리(예를 들면, 파아지 디스플레이 기술)로부터 얻어진 항체에 대해서는, 항체를 암호화하는 핵산을 라이브러리로부터 얻을 수 있다.

[0273] 본 발명의 바람직한 핵산 분자는 3F11, 4G5, 11E2, 및 9D4 모노클론 항체의 VH 및 VL 서열을 암호화하는 것이다. 3F11 VH 및 VL 서열을 암호화하는 DNA 서열은 SEQ ID NOs: 33 및 37에 각각 나타나 있다. 4G5 VH 및 VL 서열을 암호화하는 DNA 서열은 SEQ ID NOs: 34 및 38에 각각 나타나 있다. 11E2 VH 및 VL 서열을 암호화하는 DNA 서열은 SEQ ID NOs: 35 및 39에 각각 나타나 있다. 9D4 VH 및 VL 서열을 암호화하는 DNA 서열은 SEQ ID NOs: 36 및 40에 각각 나타나 있다.

[0274] 일단 VH 및 VL 단편을 암호화하는 DNA 단편을 얻고, 이 DNA 단편을 표준 재조합 DNA 기술, 예를 들면, 가변 지역 유전자를 전-길이 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시킴으로 더욱 조작할 수 있다. 이 조작에서, VH 또는 VL-암호화 DNA 단편은 항체 일정 지역 또는 유연성 연결자와 같은 다른 단백질을 암호화하는 다른 DNA 단편에 의도적으로 연결된다. 본 명세서에서 사용된 "의도적으로 연결된"이란 용어는 두 개의 DNA 단편에 의해 암호화된 아미노산 서열이 골격에 유지되도록 두 개의 DNA 단편을 결합시키는 것을 의미하는 것으로 의도된다.

[0275] VH 지역을 암호화하는 분리된 DNA는 중 사슬 일정 지역(CH1, CH2 및 CH3)을 암호화하는 다른 DNA 분자에 VH-암호화 DNA를 의도적으로 연결시킴으로 전-길이 중 사슬 유전자로 전환시킬 수 있다. 인간 중 사슬 일정 지역 유전자의 서열은 이 기술분야에 알려져 있고(예를 들면, 카벨, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 미국 Department of Health and Human Services, NIH공개 번호 91-3242 참조), 이 지역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻어질 수 있다. 중 사슬 일정 지역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 일정 지역일 수 있으나, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 일정 지역이다. Fab 단편 중 사슬 유전자에 대해서는, VH-암호화 DNA를 단지 중 사슬 CH1 일정 지역을 암호화하는 다른 DNA 분자에 의도적으로 연결할 수 있다.

[0276] VL 지역을 암호화하는 분리된 DNA는 경 사슬 일정 지역, CL을 암호화하는 다른 DNA 분자에 VL-암호화 DNA를 의도적으로 연결시킴으로 전-길이 경 사슬 유전자(뿐만 아니라 Fab 경 사슬 유전자)로 전환시킬 수 있다. 인간 경 사슬 일정 지역 유전자의 서열은 이 기술 분야에 알려져 있고(예를 들면 카벨, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, 미국 Department of Health and Human Services, NIH 공개 번호 91-3242 참조), 이 지역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 얻어질 수 있다. 경 사슬 일정 지역은 카파 또는 람다 일정 지역일 수 있으나, 가장 바람직하게는 카파 일정 지역이다.

[0277] scFv 유전자를 만들기 위해서, VH-및 VL-암호화 DNA 단편을 유연성 연결자를 암호화하는 예를 들면, 아미노산 서열 (Gly₄-Ser)₃을 암호화하는, 유연한 연결자에 의해 합해진 VH 및 VL 지역을 갖는 다른 단편에 의도적으로 연결하여 VH 및 VL 서열이 인접한 단일-사슬 단백질로 발현될 수 있도록 한다(예를 들면, Bird 등 (1988) Science 242:423-426; Huston 등 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 맥카페르티 등 (1990) Nature 348:552-554 참조).

[0278] 본 발명의 모노클론 항체의 생성

[0279] 본 발명의 모노클론 항체(mAbs)는 통상적인 모노클론 항체 방법론 예를 들면 코홀러 및 밀스테인(1975) Nature 256:495의 표준 체세포 교잡 기술을 포함하는, 여러 가지 기술로 생성될 수 있다. 체세포 교잡 기술이 바람직하지만, 원칙적으로 모노클론 항체를 생성하는 다른 기술, 예를 들면, B 림프구의 바이러스 또는 종양 발생 형질 전환을 사용할 수 있다.

[0280] 하이브리도마를 제조하기 위한 바람직한 동물계는 쥐과이다. 쥐에서의 하이브리도마 생성은 매우 잘 확립된 공

정이다. 접합용의 면역된 비장 세포 분리를 위한 기술 및 면역 프로토콜이 이 분야에 알려져 있다. 접합 파트너 (예를 들면, 쥐의 골수종 세포) 및 접합 공정도 알려져 있다.

- [0281] 본 발명의 혼성의 또는 인간화된 항체는 상기한 바와 같이 제조된 쥐의 모노클론 항체의 서열을 기반으로 제조할 수 있다. 중 및 경 사슬 면역글로불린을 암호화하는 DNA는 관심있는 쥐의 하이브리도마로부터 얻고, 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 쥐가 아닌(예를 들면, 인간) 면역글로불린 서열을 포함하기 위해서 제조될 수 있다. 예를 들면, 혼성의 항체를 만들기 위해서, 쥐의 가변 지역을 이 분야에 알려진 방법을 사용하여 인간 일정 지역에 연결할 수 있다(예를 들면, 카빌리 등의 미국 특허 번호 4,816,567 참조). 인간화된 항체를 만들기 위해서는, 쥐의 CDR 지역을 이 분야에 알려진 방법을 사용하여 인간 골격에 삽입시킬 수 있다.(예를 들면, 윈터의 미국 특허 번호 5,225,539 및 퀸 등의 미국 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 참조).
- [0282] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는 인간 모노클론 항체이다. IFNAR-1에 대한 그러한 인간 모노클론 항체는 쥐의 시스템보다는 인간 면역 시스템 일부를 옮기는 유전자 이식 또는 염색체 이식 쥐를 사용하여 생성될 수 있다. 이 유전자 이식 및 염색체 이식 쥐는 여기서 각각 HuMab 쥐 및 KM 쥐로 언급되는 쥐를 포함하며, 총체적으로 "인간 Ig 쥐"로 언급한다.
- [0283] HuMab mouse®(Medarex, Inc.)는 내생의 μ 및 κ 사슬 자리를 불활성화시키는 표적의 돌연변이를 갖는 재배열되지 않은 인간 중(μ 및 γ) 및 κ 경 사슬 면역글로불린 서열을 암호화하는 인간 면역 글로불린 유전자 미니 자리를 포함한다(예를 들면, 론버그, 등의 (1994) Nature 368(6474):856-859 참조). 따라서, 쥐는 감소된 쥐의 IgG 또는 κ 의 발현을 나타내고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중 및 경 사슬 이식 유전자는 클래스 전환 및 체세포 돌연변이를 하여 높은 친화력의 인간 IgG κ 모노클론을 생성한다(론버그, N. 등 (1994) 위와 같음; reviewed in 론버그, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; 론버그, N. 및 허스갈, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:65-93, 및 하딩, F. 및 론버그, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). HuMab 쥐의 제조와 사용 및 그러한 쥐에 의해 옮겨지는 계능 변형은 테일러, L., 등 (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6259; 첸 J., 등 (1993) International Immunology 5:647-656; 투아일론 등 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 90:3720-3724; 최 등 (1993) Nature Genetics 4:117-123; 첸 J., 등 (1993) EMBO J. 12:821-830; 투아일론 등 (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; 테일러 L., 등 (1994) International Immunology 6:579-591;; 및 피쉬와일드 D., (1996) Nature Biotechnology 14:845-851,에 더욱 기술되어 있고, 이 모든 것의 내용은 참고로 전체를 여기에 특별히 포함시킨다. 모두 론버그 및 케이의 미국 특허 번호 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 및 5,770,429; 수라니 등의 미국 특허 번호 5,545,807 모두 론버그 및 케이의 PCT 공개 번호 WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 및 WO 99/45962 및 코르만 등의 PCT 공개 번호 WO 01/14424를 더욱 참조한다.
- [0284] 다른 구체예에서, 본 발명의 인간 항체는 인간 중 사슬 이식 유전자 및 인간 경 사슬 이식염색체를 옮기는 쥐와 같은 이식유전자 및 이식염색체상에 인간 면역글로불린 서열을 옮기는 쥐를 사용하여 증식시킬 수 있다. 여기에서 "KM 쥐"로 언급되는 그러한 쥐는 이시다 등의 PCT 공개 WO 02/43478에 상세히 기술되어 있다.
- [0285] 더욱이 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대체적인 유전자이식 동물계는 이 분야에서 얻을 수 있으며, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체를 증가시키는데 사용할 수 있다. 예를 들면, 제노마우스(Xenomous; Abgenix, Inc)로 언급되는 대체적인 이식유전자 시스템이 사용될 수 있으며; 그러한 쥐는 예를 들면, 쿠처라파티 등의 미국 특허 번호 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 및 6,162,963에 기술되어 있다.
- [0286] 더욱이 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대체적인 이식염색체 동물계는 이 분야에서 얻을 수 있으며, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체를 증가시키기 위해 사용할 수 있다. 예를 들면, "TC 쥐"로 언급되는, 인간 중 사슬 이식염색체 및 인간 경 사슬 이식염색체 둘 다를 옮기는 쥐를 사용할 수 있으며; 그러한 쥐는 토미주카 등 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727에 기술되어 있다. 더욱이, 인간 중 및 경 사슬 이식염색체를 옮기는 소는 이 분야에 기술(쿠로이와 등 (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) 되어 있으며, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체를 증식시키기 위해 사용할 수 있다.
- [0287] 본 발명의 인간 모노클론 항체는 또한 인간 면역글로불린 유전자의 스크리닝 라이브러리의 파아지 배열법을 사용하여 제조될 수 있다. 인간 항체를 분리하는 그러한 파아지 배열법은 이 분야에 잘 설정되어 있다. 예를 들면:라드너 등의 미국특허번호 5,223,409; 5,403,484; 및 5,571,698; 다월 등의 미국 특허번호 5,427,908 및 5,580,717; 맥카페르티 등의 미국특허번호 5,969,108 및 6,172,197; 및 그리퍼스 등의 미국특허번호

5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 및 6,593,081을 참조한다.

[0288] 본 발명의 인간 모노클론 항체는 인간 항체 반응이 면역에 대해 생성될 수 있도록 그 안에서 인간 면역 세포가 재구성된 SCID 쥐를 사용하여 제조될 수 있다. 그러한 쥐는 예를 들면 윌슨 등의 미국특허번호 5,476,996 및 5,698,767에 기술되어 있다.

[0289] 인간 Ig 쥐의 면역

[0290] 본 발명의 인간 항체를 증식시키기 위해서 인간 Ig 쥐를 사용할 때, 그러한 쥐는 론버그 L. 등 (1994) Nature 368(6474): 856-859; 피쉬월드, D. 등 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851; 및 PCT 공개 WO 98/24884 및 WO 01/14424에 기술된 바와 같이 IFNAR-1 항원 및/또는 IFNAR-1을 발현하는 세포의 정제된 또는 강화된 제조물로 면역시킬 수 있다. 바람직하게는, 쥐의 나이는 첫 번째 주입시 6-16주이다. 예를 들면, IFNAR-1 항원의 정제된 또는 강화된 제조물(5-50 μg)을 사용하여 인간 Ig 쥐 복강내 면역을 시킬 수 있다. IFNAR-1 항원의 정제된 또는 강화된 제조물을 사용하여 면역하여 항체가 생성되지 않는 경우에는, 쥐는 면역 반응을 증진시키기 위해서, IFNAR-1을 발현하는 세포, 예를 들면, 인간 T-세포주로 면역시킬 수도 있다

[0291] IFNAR-1에 대한 전체 인간 모노클론 항체를 생성하는 자세한 공정은 하기 실시예 1에 기술되어 있다. 여러 항원을 사용한 누적된 경험은 완전한 프로인드(Freund) 보조제내의 항원으로 처음에 복강내 면역(IP)시키고, 이어서 불완전한 프로인드(Freund) 보조제내의 항원으로 격주로 IP 면역(총 6번 까지)을 시킬 때 유전자이식 쥐가 반응한다는 것을 보였다. 그러나 프로인드(Freund) 이외의 보조제도 효과적인 것으로 발견되었다. 덧붙여, 보조제가 없을 때 전체 세포는 높은 면역원성인 것으로 나타났다. 면역 반응은 역케도 블리드(retroorbital bleed)로 얻어진 혈장 시료로 면역 프로토콜 과정에 대해 감시될 수 있다. 혈장을 ELISA(상기한 바와 같은)로 스크리닝하고, 항-IFNAR-1 인간 면역글로불린의 충분한 적정량을 갖는 쥐를 접합에 사용할 수 있다. 쥐는 죽여서 비장을 제거하기 3일전에 항원3을 정맥 내에 집어넣었다. 각각의 면역에 대해 2-3 주입을 수행할 필요가 있는 것으로 생각된다. 6-24의 쥐가 각각의 항원에 대해 전형적으로 면역되었다. 보통 HCo7 및 HCo12 균주를 사용한다. 부가하여, HCo7 및 HCo12 이식유전자 둘 다를 두 개의 서로 다른 인간 중 사슬 이식유전자(HCo7/HCo12)를 갖는 하나의 쥐에 함께 주입한다.

[0292] 본 발명의 인간 모노클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

[0293] 본 발명의 인간 모노클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위해서, 면역된 쥐로부터 비장세포 및/또는 림프절 세포를 분리하고 쥐 골수종 세포주와 같은 적절한 죽지 않는 세포주에 접합시킨다. 결과의 하이브리도마를 항원-특이성 항체의 생산에 대해 스크리닝한다. 예를 들면, 면역된 쥐로부터의 비장 림프구의 단일 세포 현탁액을 1/6의 P3X63-Ag8.653 미분비 쥐 골수종 세포(ATCC, CRL 1580)에 50% PEG을 사용하여 접합시킨다. 세포는 바닥이 편평한 미세 적정량 플레이트 내에 약 2×10^5 로 바르고, 이어서 20% 태아 클론 혈청, 18% "653" 조절된 배지, 5% 오리젠 (IGEN), 4-mM L-글루타민, 1mM 피루브산 나트륨, 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50단위/ml 페니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신, 50 mg/ml 젠타마이신과 1xHAT (시그마, HAT를 접합 후 24시간 첨가한다)을 포함하는 선택적 배지 내에서 2주간 배양한다. 약 2주 후, 세포를 HAT가 HT로 대체된 배지 내에서 배양한다. 다음에 각각의 웰을 인간 모노클론 IgM 및 IgG 항체에 대해 ELISA로 스크리닝한다. 일단 하이브리도마가 크게 성장하며, 배지는 보통 10-14일후에 관찰할 수 있다. 하이브리도마를 분비하는 항체를 다시 바르고, 또 스크리닝하고, 인간 IgG에 대해 아직 양성이면, 모노클론 항체를 희석을 제한하면서 적어도 두 번 서브클로닝할 수 있다. 다음에 특징짓기 위한 조직 배양 배지에서 소량의 항체를 생성하기 위해서 안정한 서브클론을 시험관내에서 배양한다.

[0294] 인간 모노클론 항체를 정제하기 위해서, 선택된 하이브리도마를 모노클론 항체 정제를 위한 2-리터 스피너-플라스크에서 성장시킨다. 상청액을 여과하고 농축한 후 단백질 A-세파로스(Pharmacia, Piscataway, N.J.)로 친화성 크로마토그래피한다. 용출된 IgG를 순도를 확인하기위해서 전기영동 및 고 성능 액체 크로마토그래피로 체크한다. 완충액을 PBS로 바꾸고 농도는 1.43의 소광 계수를 사용하여 OD280에 의해 결정한다. 모노클론 항체를 나누어서 -80℃에서 저장한다.

[0295] 본 발명의 모노클론 항체를 생산하는 트랜스펙토마의 생성

- [0296] 본 발명의 항체는 또한 이 분야에 잘 알려진 바와 같이(예를 들면, 모리슨, S. (1985) Science 229:1202) 재조합 DNA 기술 및 유전자 트랜스펙션 방법을 사용하여 숙주 세포 트랜스펙토마로 생산할 수 있다.
- [0297] 예를 들면, 항체 또는 그의 항체 단편을 발현시키기 위해서, 부분 또는 전-길이 경 및 중 사슬을 암호화하는 DNA를 표준 분자 생물학 기술(예를 들면, PCR 증폭 또는 관심있는 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용하는 cDNA 크로닝)로 얻고, DNA를 유전자가 전사 및 번역 표준 서열에 의도적으로 연결될 수 있도록 발현 벡터내로 삽입시킬 수 있다. 여기서, "의도적으로 연결된"이란 용어는 벡터내의 전사 및 번역 표준 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 그들의 의도된 기능으로 작용하도록 항체 유전자를 벡터에 결합(結紮)하는 것을 의미하는 것으로 의도한다. 발현 벡터 및 발현 표준 서열은 사용된 발현 숙주 세포에 양립할 수 있는 것으로 선택한다. 항체 경 사슬 유전자 및 항체 중 사슬 유전자는 분리 벡터내로 삽입하거나 또는 더욱 전형적으로 두 유전자를 동일한 발현 벡터내로 삽입한다. 항체 유전자는 표준 방법(예를 들면, 항체 유전자 단편 및 벡터상의 상보적 제한 위치의 결합 또는 제한 위치가 존재하지 않으면 무딘 끝 결합)으로 발현 벡터내로 삽입시킨다. 여기에 기술된 항체의 경 및 중 사슬 가변 지역은 V_H 단편이 벡터내의 C_H 단편에 의도적으로 연결되고 V_L 단편이 벡터내의 C_L 단편에 의도적으로 연결되도록 원하는 아노스타입의 중 사슬 일정 지역 및 경 사슬 일정 지역을 이미 암호화하는 발현 벡터내로 삽입함으로써 임의의 항체 아노스타입의 전-길이 항체 유전자를 만들기 위해 사용할 수 있다. 부가적으로 또는 대체적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터의 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 신호 펩티드가 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 골격이 연결되도록 벡터 안으로 클로닝할 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중 신호 펩티드(즉, 비-면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩티드)일 수 있다.
- [0298] 항체 사슬 유전자에 부가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포내의 항체 사슬 유전자의 발현을 조절하는 조절 서열을 옹기다. "조절 서열"이라는 용어는 프로모터, 증진인자 및 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 조절하는 다른 발현 조절 요소를 포함하는 것으로 의도된다. 그러한 조절 서열은 예를 들면, Goeddel(유전자 발현 기술. 효소학에서의 방법 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))에 기술되어 있다. 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 고안은 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 의존한다는 것을 당업자는 알고 있다. 포유류 숙주 세포 발현을 위한 바람직한 조절 서열에는 사이토메갈로바이러스(CMV), 시미안 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스(예를 들면, 아데노바이러스 메이저 레이트 프로모터(AdMLP) 및 폴리오마바이러스로부터 유도된 증진 인자 및/또는 프로모터와 같은, 포유류 세포내의 높은 수준의 단백질 발현을 지시하는 바이러스 요소가 포함된다. 대체적으로 바이러스가 아닌 조절 서열 유비퀴틴 프로모터 또는 β -글로빈 프로모터 같은 것을 사용할 수 있다. 더욱이 조절 요소는 인간 T 세포 백혈병 바이러스 타입 1(타카베, Y. 등 (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)의 긴 말단 반복 부분 및 SV40 초기 프로모터로부터의 서열을 포함하는, SR α 프로모터 시스템과 같은, 서로 다른 원천으로부터의 서열로 구성되어 있다.
- [0299] 항체 사슬 유전자 및 조절 서열에 부가하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 선택 가능한 마커 유전자 및 숙주 세포(예를 들면 복제의 오리진)에서 벡터의 복제를 조절하는 서열과 같은 부가적인 서열을 옹기다. 선택 가능한 마커 유전자는 벡터가 도입되는 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다(예를 들면, 엑셀 등의 미국특허 번호 4,399,216, 4,634,665 및 5,179,017, 참조). 예를 들면, 전형적으로 선택 가능한 마커 유전자는 벡터가 도입되는 숙주 세포상에서, G418, 하이그로마이신 또는 메토티렉세이트와 같은 의약에 저항성을 부여한다. 바람직한 선택가능한 마커 유전자에는 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR) 유전자(메토티렉세이트 선택/증폭과 함께 dhfr-숙주세포에서 사용하기 위해) 및 네오 유전자(G418 선택을 위해)가 포함된다.
- [0300] 경 및 중 사슬 발현을 위해, 경 및 중 사슬을 암호화하는 발현 벡터를 표준 기술로 숙주세포에 트랜스펙트시킨다. 트랜스펙션이라는 용어의 여러 가지 형태는 원핵 또는 진핵 숙주 세포내로 외래 DNA를 도입하는데 일반적으로 사용할 수 있는 매우 다양한 기술, 예를 들면, 일렉트로포레이션, 인산칼슘 침착, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 및 이와 유사한 것과 같은 것을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 항체를 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현시키는 것이 이론적으로 가능하지만, 진핵 세포 및 더욱 바람직하게는 포유류 숙주세포에서의 항체의 발현이 가장 바람직한데 그 이유는 그러한 진핵세포 및 특히 포유류 세포가 원핵세포보다 적절히 포개지고 면역학적으로 활성인 항체를 조립하고 분비하는데 더욱 좋기 때문이다. 항체 유전자의 원핵세포 발현은 활성 항체의 높은 수율 생산에 비효율적인 것으로 보고되었다(보스 M. A. 및 우드 C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).
- [0301] 본 발명의 재조합 항체를 발현하기 위한 바람직한 포유류 숙주세포에는 중국 햄스터 난소(CHO 세포)(얼러브 및 체이슨 (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 77:4216-4220에 기술되어 있는 바 dhfr-CHO 세포를 포함하며, 예를 들면 R. J. 카프만 및 P. A. 샤프 (1982) Mol. Biol. 159:601-621에 기술되어 있는 바 DHFR 선택가능한 마

커와 함께 사용되는) NSO 골수종 세포, COS 세포, 및 SP2 세포가 포함된다. 특히 NSO 골수종 세포를 사용할 때는 바람직한 발현 시스템이 W087/04462, W089/01036 및 EP 338,841에 기술된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터를 포유류 숙주세포에 도입시킬 때, 항체를 숙주세포 내에서 발현시키기 위해 또는 더욱 바람직하게는 항체 세포가 자라는 배양 배지로 항체를 분비하기에 충분한 시간동안 숙주세포를 배양함으로써 항체를 생산한다. 항체를 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

[0302] 항원에 대한 항체 결합의 특성화

[0303] 본 발명의 항체를 예를 들면, 표준 ELISA에 의해 IFNAR-1에 대한 결합을 시험할 수 있다. 간단히, 미세적정 플레이트에 정제된 IFNAR-1을 PBS내의 0.25 µg/ml로 바르고, 다음에 PBS내의 5% 소 혈청 알부민으로 차단한다. 항체 희석물들(예를 들면, IFNAR-1-면역 쥐의 혈장 희석물들)을 각각의 웰에 첨가하고, 37°C에서 1-2시간 배양한다. 플레이트를 PBS/트윈으로 씻고 다음에 알칼리성 인산분해효소에 접합된 이차 시약(예를 들면, 인간 항체에 대해서는, 염소-항-인간 IgG Fc-특이성 폴리클론 시약)으로 37°C에서 1시간 배양한다. 씻은 후, 플레이트를 pNPP 기질(1mg/ml)로 발달시키고, 405-650의 OD에서 분석한다. 바람직하게는, 가장 큰 적정물로 발달된 쥐를 접합에 사용한다.

[0304] 상기한 바와 같은 ELISA 분석은 또한 IFNAR-1 면역원과 양성의 반응성을 보여주는 하이브리도마를 스크리닝하기 위해 사용할 수 있다. IFNAR-1에 높은 건인으로 결합하는 하이브리도마를 서브클로닝하고 더욱 특성화한다. -140°C에서 저장되는 5-10 병 세포 배양 배지를 만들고 또한 항체 정제를 위해, 모 세포의 반응성을 유지하는(ELISA에 의해) 각각의 하이브리도마로부터 한 클론을 선택할 수 있다.

[0305] 항-IFNAR-1 항체를 정제하기 위해서, 선택된 하이브리도마를 모노클론 항체 정제를 위한 이-리터 스핀너-플라스크에서 배양시킬 수 있다. 상청액을 여과하고 농축한 후에 단백질 A-세파로스(Pharmacia, Piscataway, NJ)로 친화성 크로마토그래피할 수 있다. 용출된 IgG를 순도가 확정되도록 겔 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피하여 검사할 수 있다. 완충 용액을 PBS로 바꾸고, 1.43의 소광 계수를 사용하여 OD₂₈₀으로 농도를 결정할 수 있다. 모노클론 항체는 나누어서 -80°C에서 저장한다.

[0306] 선택된 항-IFNAR-1 모노클론 항체가 특정 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하기 위해서, 각각의 항체를 시중에서 구입가능한 시약(Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 바이오틴화한다. 표지되지 않은 모노클론 항체 및 바이오틴화 모노클론 항체를 사용하는 경쟁적인 연구는 상기한 바와 같은 IFN 알파 피복-ELISA 플레이트를 사용하여 수행할 수 있다. 바이오틴화 mAb 결합은 스트렙-아비딘-알칼리성 인산분해효소로 검출할 수 있다.

[0307] 정제된 항체의 아이소타입을 결정하기 위해서, 특정 아이소타입의 항체에 대해 특이성을 갖는 시약을 사용하여 아이소타입 ELISA를 수행할 수 있다. 예를 들면, 인간 모노클론 항체의 아이소타입을 결정하기 위해서, 미세적정 플레이트의 웰에 항-인간 면역글로불린 1 µg/ml로 4°C에서 밤새 발라 놓는다. 1% BSA로 차단한 후 플레이트를 시험 모노클론 항체 또는 정제된 아이소타입 대조용 1 µg/ml 또는 그 이하와 주변 온도에서 1-2시간 동안 반응시킨다. 다음에 웰을 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이성 알칼리성 인산분해효소-접합 탐침체와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 발달시키고 상기한 바와 같이 분석한다.

[0308] IFNAR-1을 발현하는 살아있는 세포에 대한 모노클론 항체의 결합을 설명하기 위해서, 유동 세포측정법을 사용할 수 있다. 간단히, IFNAR-1을 발현하는 세포주(표준 성장 조건하에서 배양함)를 0.1% BSA 및 10% 태아 송아지 혈장을 포함하는 PBS내의 모노클론 항체 여러 농도와 혼합하고, 37°C에서 1시간 동안 배양한다. 세척후, 세포를 일차의 항체 착색화와 동일한 조건하에서 형광표지된 항-인간 IgG 항체와 반응시킨다. 시료는 단일 세포에 게이팅하는 광 및 측면 산란 성질을 사용하는 FACScan 장비를 사용하여 분석할 수 있다. 유동 세포 측정 분석(대신에 또는 덧붙여서) 형광 현미경법을 사용하는 대체적인 분석도 사용할 수 있다. 세포들은 상기한 바와같이 착색시킬 수 있고 형광 현미경법으로 검사할 수 있다. 이 방법은 개개의 세포들을 볼 수 있으나, 항원의 밀도에 따라 감도를 감소시킬 수 있다.

[0309] 항-IFNAR-1 인간 IgG를 웨스턴 블롯팅으로 IFNAR-1 항원과의 반응성을 더욱 시험할 수 있다. 간단히, IFNAR-1을 발현하는 세포로부터의 세포 추출물을 제조하고, 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동시킬 수 있다. 전기영동 후, 분리된 항원을 니트로셀룰로오스 막에 전이시키고, 10% 태아 송아지 혈청으로 차단하고, 시험할 모노클론 항체로 탐침한다. 인간 IgG 결합은 항-인간 IgG 알칼리성 인산분해효소를 사용하여 검출할 수 있고 BCIP/NBT 기질 정제(tablet)(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo)로 발달시킬 수 있다.

[0310] 면역접합체

[0311] 다른 일면에서, 본 발명은 세포독소, 의약(예를 들면, 면역억제제) 또는 방사능 독소와 같은 치료학적 성분에 접합된 항-IFNAR-1 항체 또는 그의 단편을 특징으로 한다. 그러한 접합체는 여기서 "면역접합체"로 언급한다. 하나 또는 그 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소"로 언급한다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한(예를 들면, 죽이는) 임의의 것을 포함한다. 예에는 탁솔, 사이토칼라신 B., 글라미시딘 D., 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D., 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 푸로마이신 및 그에 유사체 또는 유사체가 있다. 또한 치료제에는 예를 들면 안티메타볼리트, (예를 들면 메토티레세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-פל팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 싸이클로토스파미드, 부셀판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C., 및 시스-디클로로디안민 프라티늄(II)(DDP) 시스플라틴) 안트라사이클린, (예를 들면, 다우노루비신, (포르멀리 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들면, 닥티노마이신(포르멀리악티노마이신), 블레노마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)), 및 항-유사분열제(예를 들면, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)이 포함된다.

[0312] 본 발명의 항체에 접합시킬 수 있는 치료학적 세포독소의 다른 바람직한 예에는 두오카르마이신, 칼리체아미신, 메이탄신 및 오우리스타틴 및 그의 유도체가 포함된다. 칼리체아미신 항체 접합체의 예는 시중에서 구입할 수 있다(Mylotag™; Wyeth-Ayerst).

[0313] 세포독소는 이 분야에서 이용가능한 링커 기술을 사용하여 본 발명의 항체에 접합시킬 수 있다. 항체에 세포독소를 접합시키는데 사용될 수 있는 링커 유형의 예에는 히드라존, 티오에테르, 에스테르, 디설파이드 및 펩티드-포함 링커가 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 링커는 예를 들면, 리소솜 구역에서 낮은 pH에 의한 분열에 민감한 또는 카텝신(예를 들면, 카텝신 B, C, D)과 같은 종양 조직에서 우세하게 발현되는 단백질분해효소와 같은 단백질분해효소에 의한 분열에 민감한 것을 선택할 수 있다.

[0314] 항체에 치료제 접합을 위한 방법, 세포독소, 및 링커의 유형에 대한 또 다른 논의는 사이트 G., 등 (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; 트레일, P.A 등 (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; 페이네 G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; 알렌, T. M. (2002) Nat. Rev Cancer 2:750-753; 페스탄, I. 및 크레이트만, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; 쉐터, P. D. 및 스프링겔, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264를 참조한다.

[0315] 본 발명의 항체는 또한 방사능 면역접합체로도 언급되는, 세포독성 방사능 제약품을 생성하는 방사성 동위원소에 접합될 수 있다. 진단용 또는 치료용으로 사용될 수 있는 항체에 접합시킬 수 있는 방사성 동위원소의 예에는 요오드¹³¹, 인듐¹¹¹, 이트륨⁹⁰ 및 루테튬¹⁷⁷이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 방사능 면역접합체를 제조하는 방법은 이 분야에 설정되어 있다. 방사능 면역접합체의 예에는 Zevalin™(IDEC Pharmaceuticals) 및 Bexxar™(Corixa Pharmaceuticals)이 포함되며, 시중에서 구입가능하고, 본 발명의 항체를 사용하여 방사능 면역접합체를 제조하는 유사한 방법을 사용할 수 있다.

[0316] 본 발명의 항체 접합체를 주어진 생물학적 반응을 변형시키기 위해서 사용할 수 있으며, 의약 성분을 고전적인 화학 치료제로 제한하는 것으로 생각해서는 안 된다. 예를 들면, 의약 성분은 원하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 그러한 단백질에는 예를 들면, 압린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소같은 효소 활성 독소 또는 그의 활성 단편; 종양 괴사 인자 또는 인터페론-γ과 같은 단백질; 또는 예를 들면, 림포킨, 인터로이킨-1("IL-1"), 인터로이킨-2("IL-2") 인터로이킨-6("IL-6"), 과립구 거대 과아지 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 집락 자극 인자("G-CSF"), 또는 다른 성장 인자들과 같은 생물학적 반응 변형제가 포함될 수 있다.

[0317] 항체에 그러한 치료학적 성분을 접합하는 기술은 잘 알려져 있으며, 예를 들면, 아론 등, "암 치료에 있어서 의약의 면역표적을 위한 모노클론 항체", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, 레이스펠드 등(eds) pp.243-56 (알란 R. 리스, Inc. 1985); 헬스트롬 등, "의약전달을 위한 항체", Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), 로빈슨 등 (eds), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, 암 "치료에 있어서 세포 독성 시약의 항체 담체 재고", Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications, 핀체라 등 (eds),

pp. 475-506 (1985); "암 치료에 있어서 방사능표지된 항체의 치료 용도의 분석, 결과 및 미래 전망", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, 발드윈 등 (eds), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and 소르페 등, "항체-독성 집합체의 제조 및 세포독성", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)을 참조한다.

[0318] 이중 특이성 분자

[0319] 다른 일면으로, 본 발명은 본 발명의 항-IFNAR-1 항체 또는 그의 단편을 포함하는 이중특이성 분자를 특징으로 한다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 적어도 두 개의 서로 다른 결합 위치 또는 표적 분자에 결합하는 이중 특이성 분자를 생성하기 위해 다른 기능성 분자 예를 들면, 다른 펩티드 또는 단백질(예를 들면, 수용체를 위한 다른 항체 또는 리간드)에 결합되거나 유도될 수 있다. 본 발명의 항체는 둘 이상의 서로 다른 결합 위치 및/또는 표적 분자에 결합하는 다중특이성 분자를 생성하기 위해서 하나 이상의 기능성 분자에 사실상 결합되거나 또는 유도될 수 있으며; 그러한 다중특이성 분자는 또한 여기에서 사용되는 "이중특이성 분자"라는 용어에 포함되는 것으로 의도된다. 본 발명의 이중특이성 분자를 만들기 위해서, 본 발명의 항체는 이중특이성 분자가 얻어지도록, 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체와 같은 하나 또는 그 이상의 다른 결합 분자에 기능적으로 결합될 수 있다.

[0320] 따라서, 본 발명은 IFNAR-1에 대한 적어도 하나의 첫 번째 결합 특이성 및 두 번째 표적 에피토프에 대한 두 번째 결합 특이성을 포함하는 이중특이성 분자를 포함한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 두 번째 표적 에피토프는 Fc 수용체, 예를 들면, 인간 FcγRI(CD64) 또는 인간 Fcα 수용체(CD89)이다. 그러므로, 본 발명은 FcγR, FcαR 또는 FcεR 발현 효과기 세포(예를 들면, 단핵세포, 거대과아지 또는 다형핵 세포(PMN)) 및 IFNAR-1을 발현하는 표적 세포 둘 다에 결합할 수 있는 이중특이성 분자를 포함한다. 이들 이중특이성 분자는 효과기 세포에 대해 IFNAR-1 발현 세포를 표적으로 하여 IFNAR-1 발현 세포의 식균작용, 항체 의존 세포-매개 세포독성(ADCC), 시토킨 방출 또는 과산화물 음이온과 같은 Fc 수용체-매개 효과기 세포 활성을 개시시킨다.

[0321] 이중특이성 분자가 다중특이성인 본 발명의 한 구체예에서, 분자는 항-Fc 결합 특이성 및 항-IFNAR-1 결합 특이성에 부가하여, 세 번째 결합 특이성을 더욱 포함한다. 한 구체예에서, 세 번째 결합 특이성은 항-증진 인자(EF) 부분, 예를 들면, 세포독성 활성이 포함된 표면 단백질에 결합하여 표적 세포에 대한 면역 반응을 증진시키는 분자이다. "항-증진 인자 부분"은 주어진 분자 예를 들면, 항원 또는 수용체에 결합하여 이로써 Fc 수용체 또는 표적 세포에 대한 결합 결정체의 효과를 증진시키는 리간드 항원 또는 기능성 항원 단편일 수 있다. "항-증진 인자 부분"은 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 결합할 수 있다. 대체적으로, 항-증진 인자 부분은 첫 번째 및 두 번째 결합 특이체가 결합하는 실체와는 다른 실체에 결합할 수 있다. 예를 들면, 항-증진 인자 부분은 세포독성 T-세포(예를 들면, CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 또는 표적 세포에 대해 면역 반응이 증가되는 다른 면역 세포)에 결합할 수 있다.

[0322] 한 구체예에서, 본 발명의 이중특이성 분자는 결합 특이성으로 예를 들면, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 또는 단일 사슬 Fv를 포함하는 적어도 하나의 항체 또는 그의 항체 단편을 포함한다. 항체는 경 사슬 또는 중 사슬 이합체 또는 래드너 등의 미국 특허 번호 4,946,778(그 내용은 참고로 포함시킨다)에 기술된 바와 같은 단일 사슬 구조물 또는 Fv와 같은 그의 임의의 최소 단편일 수 있다.

[0323] 한 구체예에서, Fcγ 수용체에 대한 결합 특이성은 그 결합이 인간 면역글로불린 G(IgG)에 의해 차단되지 않는 모노클론 항체에 의해 제공된다. 여기서 사용된 IgG 수용체라는 용어는 염색체 1에 위치한 8개의 γ-사슬 유전자를 말한다. 이 유전자는 세 개의 Fcγ 수용체 클래스: FcγRI(CD64), FcγRII(CD32), 및 FcγRIII(CD16)로 분리되는 12개의 전이막 또는 수용성 수용체 아티소폼 전부를 암호화한다. 한 바람직한 구체예에서, Fcγ 수용체는 인간의 높은 친화력 FcγRI 이다. 인간 FcγRI는 단량체 IgG(10⁸-10⁹M⁻¹)에 높은 친화력을 나타내는, 72kDa 분자이다.

[0324] 어떤 바람직한 항-Fcγ 모노클론 항체의 생산 및 특성화는 팡거 등의 PCT 공개 WO 88/00052 및 미국 특허 번호 4,954,617에 기술되어 있고 그 내용은 여기에 참고로 전부 포함시킨다. 이 항체는 수용체의 Fcγ 결합 위치와 다른 위치에서 FcγRI, FcγRII 또는 FcγRIII의 에피토프에 결합하고, 따라서 이들의 결합은 IgG의 생리학적 수준에 의해 실질적으로 차단되지 않는다. 본 발명에 유용한 특정 항-FcγRI 항체는 mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 및 mAb 197이다. mAb 32를 생산하는 하이브리도마는 American Type Culture Collection, ATCC 기탁번호 HB9469 로 얻을 수 있다. 다른 구체예에서, 항-Fcγ 수용체 항체는 모노클론 항체 22(H22)의 형태로

인간화된다. H22 항체의 생산 및 특성화는 그라지아노, R.F. 등 (1995) J. Immunol 155(10):4996-5002 및 PCT WO 94/10332에 기술되어 있다. 세포주를 생산하는 H22 항체는 HA022CL1으로 American Type Culcure Collection 에 기탁되어 있고 기탁 번호는 CRL 11177이다.

[0325] 다른 바람직한 구체예에서, Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 인간 IgA 수용체, 예를 들면, Fc-알파 수용체(Fc α RI(CD89))에 결합하는 항체에 의해 제공된다. "IgA 수용체"라는 용어는 염색체 19에 위치한 하나의 α -유전자(Fc α RI)의 유전자 생산물을 포함하는 것으로 의도된다. 이 유전자는 55-110kDa의 여러 대체적인 삽입 전이막 아이소폼을 암호화하는 것으로 알려져 있다. Fc γ RI(CD89)은 단핵세포/거대 과아지, 호산성 및 호중성 과립구에서는 구성 성분으로 발현하지만, 비-효과기 세포 서식물에서는 발현하지 않는다. Fc α RI는 IgA1 및 IgA2 둘다에 대해 배지 친화성($5 \times 10^7 M^{-1}$)을 가지며, 이는 G-CSF 또는 GM-CSF와 같은 시토킨에 노출되었을 때 증가한다(모르톤, H.C. 등 (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440). A3, A59, A62 및 A77로 규정되고, IgA 리간드 결합 영역 바깥쪽의 Fc α RI에 결합하는 4개의 Fc α RI-특이성 모노클론 항체는 (몬테리오, R.C. 등 (1992) J. Immunol. 148:1764)에 기술되어 있다.

[0326] Fc α RI 및 Fc γ RI 은 본 발명의 이중특이성 분자에 사용하기에 바람직한 개시 수용체인데 그 이유는 이들이 (1)면역 효과기 세포, 예를 들면, 단핵세포, PMN, 거대과아지 및 수지상 세포에서 일차적으로 발현되고; (2)높은 수준(예를 들면, 세포당 5,000-100,000)으로 발현되고; (3)세포독성 활성의 매개체(예를 들면, ADCC, 식균작용)이고; (4)그들을 표적으로 하는, 자체-항원을 포함하는, 항원의 증진된 항원 표시를 매개하기 때문이다.

[0327] 인간 모노클론 항체가 바람직하지만, 본 발명의 이중특이성 분자에 사용할 수 있는 다른 항체에는 쥐의, 혼성의 및 인간화된 모노클론 항체가 있다.

[0328] 본 발명의 이중특이성 분자는 구성된 결합 특이체, 예를 들면, 항-FcR 및 항-IFN 알파 결합 특이체들을 이 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 접합함으로써 제조할 수 있다. 예를 들면, 이중특이성 분자의 각각의 결합 특이체는 별도로 생성되고 다음에 서로 접합시킬 수 있다. 결합 특이체가 단백질 또는 펩티드일 때, 여러 가지 커플링 또는 가교-결합체가 공유 접합에 사용될 수 있다. 가교-결합체의 예에는 단백질 A, 카보디이미드, N-석시니미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)(DTNB), o-페닐렌디말레이미드(oPDM), N-석시니미딜-3-(2-피리딜티오)프로피오네이트(SPDP), 및 설포석시니미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로hexan-1-카복실레이트(설포-SMCC)가 포함된다.(예를들면, 칼포브스카이 등 (1984) J. Exp. Med. 160:1686; 리우, MA 등 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 82:8648 참조). 다른 방법에는 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. 번호 78, 118-132; 브레넨 등 (1985) Science 229:81-83), 및 클레니 등 (1987) J. Immunol. 139:2367-2375)에 기술된 것들이 포함된다. 바람직한 접합체는 SATA 및 설포-SMCC이고, 둘다 피어스 케미칼(Pierce Chemical Co.)(Rockford, IL)로부터 구입할 수 있다.

[0329] 결합 특이체가 항체일 때, 이들은 두 개의 중 사슬의 C-말단 이음 지역의 설프히드릴 결합을 통해 접합될 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 이음 지역은 접합에 앞서 설프히드릴 잔기 흡수 개 바람직하게는 하나를 포함하도록 변형될 수 있다.

[0330] 대체적으로, 두개의 결합 특이체는 동일한 벡터에서 암호화되고 발현되고 동일한 숙주 세포에서 조립될 수 있다. 이 방법은 이중특이성 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂, 또는 리간드 x Fab 접합 단백질일 때 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이성 분자는 하나의 단일 사슬 항체와 결합 결정체를 포함하는 단일 사슬 분자 또는 두 개의 결합 결정체를 포함하는 단일 사슬 이중특이성 분자일 수 있다. 이중특이성 분자는 적어도 두 개의 단일 사슬 분자를 포함할 수 있다. 이중특이성 분자를 제조하는 방법은 예를 들면, 미국 특허 번호 5,260,203; 미국 특허 번호 5,455,030; 미국 특허 번호 4,881,175; 미국특허 번호 5,132,405; 미국 특허 번호 5,091,513; 미국 특허 번호 5,476,786; 미국 특허 번호 5,013,653; 미국 특허 번호 5,258,498; 및 미국특허 번호 5,482,858에 기술되어 있다.

[0331] 그들의 특이성 표적에 대한 이중특이성 분자의 결합은 예를 들면, 효소-연결 면역흡착제 분석(ELISA), 방사능면역분석(RIA), FACS 분석, 생분석(예를 들면, 성장억제), 또는 웨스턴 블롯(Western Blot) 분석으로 확인할 수 있다. 이들 각각의 분석은 일반적으로 관심 있는 복합체에 대해 특이성을 가지는 표지된 시약(예를 들면, 항체)을 사용하여, 특정의 관심 있는 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들면, FcR-항체 복합체는 예를 들면, 항체-FcR 복합체를 인식하고 특이적으로 결합할 수 있는 효소-연결 항체 또는 항체 단편을 사용하여 검출할 수 있다. 대체적으로, 복합체는 임의의 다양한 다른 면역 분석법을 사용하여 검출할 수 있다. 예를 들면, 항체는 방사능 표지되어 방사능면역분석(RIA)에 사용될 수 있다.(예를 들면, 웨인트러브, B., Principles of

Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 3월 1986을 참조하고, 이는 참고로 여기에 포함시킨다). 방사성 동위원소는 γ 계수기 또는 섬광 계수기의 사용과 같은 수단에 의해 또는 자가방사선술로 검출할 수 있다.

[0332] 제약학적 조성물

[0333] 다른 일면으로, 본 발명은 제약학적으로 허용 가능한 담체와 배합된, 본 발명의 모노클론 항체 또는 그의 항원-결합 부분 하나 또는 그 조합을 포함하는 조성물 예를 들면, 제약학적 조성물을 제공한다. 그러한 조성물은 본 발명의 항체, 또는 면역접합체 또는 이중특이성 분자 하나 또는 조합(예를 들면, 둘 또는 그 이상의 상이한)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 제약학적 조성물은 표적 항원상의 상이한 에피토프에 결합하거나 또는 상보적 활성을 갖는 항체(또는 면역접합체 또는 이중특이체)의 조합을 포함한다.

[0334] 본 발명의 제약학적 조성물은 또한 조합 치료로 투여할 수 있다, 즉 다른 치료제와 조합될 수 있다. 예를 들면, 조합 치료는 적어도 하나의 다른 면역억제제와 조합된 본 발명의 항-IFNAR-1 항체를 포함할 수 있다.

[0335] 여기서 사용된 "제약학적으로 허용 가능한 담체"에는 임의의 및 모든 용제, 분산 매체, 피복물, 항세균제 및 항진균제, 등장 흡착 지연제 및 생리학적으로 양립 가능한 이와 유사한 것들이 포함된다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여(예를 들면, 주사 또는 주입에 의해)에 적절하다. 투여 통로에 따라, 화합물을 불활성화시킬 수 있는 다른 자연 조건 및 산의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위해서 활성 성분 즉, 항체, 면역접합체 또는 이중특이성 분자를 물질로 피복시킬 수 있다.

[0336] 본 발명의 제약학적 화합물은 하나 또는 그 이상의 제약학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. "제약학적으로 허용 가능한 염"은 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 임의의 원하지 않는 독성 효과를 전하지 않는 염을 말한다.(예를 들면, 벌지, S. M. 등 (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19 참조). 그러한 염의 예에는 산부가염 및 염기부가염이 포함된다. 산부가염에는 히드로클로릭, 니트릭, 포스포릭, 설퍼릭, 히드로부로믹, 히드로아이오딕, 포스포러스, 및 이와 유사한 것과 같은 비독성 무기산 뿐만 아니라 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환 알카노익산, 히드록시 알카노익산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 설폰산, 및 이와 유사한 것들과 같은 비독성 유기산으로부터 유도된 것들이 포함된다. 염기부가염에는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 및 이와 유사한 것과 같은 알칼리성 토금속류 뿐만 아니라 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로푸로카인, 클로린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인, 및 이와 유사한 것들로부터 유도된 것들이 포함된다.

[0337] 본 발명의 제약학적 조성물은 또한 제약학적으로 허용 가능한 항산화제를 포함한다. 제약학적으로 허용 가능한 항산화제의 예에는 : (1) 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 소듐 바이셀레이트, 소듐 메타바이셀피트, 소듐 설퍼트, 및 이와 유사한 것과 같은 수용성 항산화제; (2) 팔미트산 아스코르빌, 부틸화 히드록시아니솔(BHA), 부틸화 히드록시톨로엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 및 이와 유사한 것과 같은 지용성 항산화제; 및 (3) 구연산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 솔비톨, 타르트산, 인산, 및 이와 유사한 것과 같은 금속 킬레이트화제가 포함된다.

[0338] 본 발명의 제약학적 조성물에 사용할 수 있는 적절한 수용성 및 비수용성 담체의 예에는 물, 에탄올, 폴리올(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 이와 유사한 것과 같은), 및 그의 적절한 혼합물, 올리브유와 같은 식물성 기름, 및 에틸 올레이트와 같은 주사용 유기 에스테르가 포함된다. 적절한 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 피복 물질을 사용함으로써, 분산의 경우에 필요한 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면 활성제를 사용함으로써 유지할 수 있다.

[0339] 이 조성물들은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 포함할 수 있다. 미생물의 존재를 방지하는 것은 상기의 살균 공정 또는 여러 가지 항세균제 및 항진균제 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산, 및 이와 유사한 것들의 함입 둘 다에 의해 확정될 수 있다. 조성물에 당, 염화나트륨 및 이와 유사한 것과 같은 등장제를 함유시키는 것이 또한 바람직하다. 부가하여, 주사할 수 있는 제약학적 형태의 연장된 흡착은 모노스테아르산 알루미늄 및 젤라틴과 같은 흡착을 지연시키는 약제를 포함시킴으로 일어날 수 있다.

[0340] 제약학적으로 허용 가능한 담체는 살균 수용액 또는 분산액 및 살균 수용액 또는 분산액의 즉석 제조용 살균 분말이 포함된다. 제약학적 활성 기질의 약제와 그러한 매체의 사용은 이 분야에 알려져 있다. 임의의 통상적인 매체 또는 약제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 한을 제외하고, 본 발명의 제약학적 조성물에서 그의 사용은 고려된다. 보충 활성 화합물도 본 조성물에 포함시킬 수 있다.

- [0341] 치료용 조성물은 전형적으로 살균되어야 하며 제조 및 저장의 조건하에서 안정성이 있어야 한다. 조성물은 용액, 미세현탁액, 리포솜, 또는 높은 의학농도에 적합한 다른 지시 구조물로 배합될 수 있다. 담체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이와 유사한 것.), 및 그의 적절한 혼합물을 포함하는 용제 또는 분산 매체 일수 있다. 적절한 유동성은 예를 들면 레시틴과 같은 피복을 사용함으로써, 분산의 경우에 필요한 입자 크기를 유지함으로써, 및 계면 활성제를 사용함으로써 유지할 수 있다. 많은 경우에 조성물 내에 등장제 예를 들면, 당, 만니톨과 같은 폴리알코올, 솔비톨 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡착은 흡착을 지연시키는 약제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로 일어날 수 있다.
- [0342] 살균 주사 용액은 적절한 용제에 필요한 양으로 활성 화합물을 필요에 따라 상기에 열거한 성분들 하나 또는 그 조합과 함께 함입시키고 이어서 살균 미세여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 상기 열거한 것들과는 다른 필요한 성분 및 염기성 분산 매체를 포함하는 살균 담체에 활성 화합물을 함입시킴으로 제조할 수 있다. 살균 주사 용액의 제조를 위한 살균 분말의 경우에는, 바람직한 제조법은 사전의 살균-여과 용액으로부터의 임의의 부가적인 원하는 성분과 활성 성분의 분말을 내는 진공 건조 및 냉동-건조(동결건조)이다.
- [0343] 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 결합할 수 있는 활성 성분의 양은 치료할 환자와 특정 투여 방식에 따라 변하게 된다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합할 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 일으키는 조성물의 양이 될 것이다. 일반적으로 100% 중에서 이 양은 제약학적으로 허용가능한 담체와 조합된 활성 성분이 약 0.01%부터 99%까지의 범위가 될 것이고, 바람직하게는 약 0.1%에서 70%까지, 가장 바람직하게는 활성 성분이 약 1%부터 약 30%가 될 것이다.
- [0344] 투여 방법은 최적의 원하는 반응(예, 치료 반응)을 제공하도록 조절된다. 예를 들어 하나의 큰 알약으로 투여할 수 있고 몇 개로 나누어서 시간을 두고 투여할 수도 있으며, 또는 투여량을 치료 상황의 위급성에 의해 지시하는 대로 비례해서 감소하거나 증가시킬 수 있다. 투여의 용이성과 균등한 투여량을 위해서 투여 단위로 비경구 조성물을 처방하는 것이 특히 유리하다. 여기서 사용된 투여 단위 형태는 치료할 환자를 위해 단일의 투여량으로 알맞은 물리적으로 분리된 단위를 일컫는다; 각 단위는 요구되는 제약 담체와 관련하여 요구되는 치료 효과를 생성하기 위해서 계산하여 미리 결정된 활성 화합물의 양을 포함한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 상세한 내역은 (a) 활성 화합물의 유일한 특성과 성취되어야 할 특정 치료 효과, 및 (b) 개개인의 민감도 처치를 위한 활성 화합물을 조합하는 분야에 있어 고유한 한계에 의해 지시되거나 직접적으로 의존된다.
- [0345] 항체의 투여에 있어서, 투여량은 숙주 체중의 약 0.0001에서 100 mg/kg 까지, 더 일반적으로는 0.01에서 5 mg/kg까지의 범위이다. 예를 들어 투여량은 0.3 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중 또는 1-10 mg/kg 범위 내가 될 수 있다. 전형적인 처치 요법은 주당 한번, 매 2주에 한번, 매 3주에 한번, 매 4주에 한번, 한달에 한번, 매 3달에 한번 또는 매 3-6달에 한번 투여를 행한다. 본 발명의 항-IFN 알파 항체에 대한 바람직한 투여 요법은 다음의 투여 계획 중 하나를 사용하여 주어진 항체를 가지고 정맥내 투여를 통해 1 mg/kg 체중 또는 3 mg/kg 체중을 포함한다: (i) 6번의 투여를 매 4주, 그다음 매 3달; (ii) 매 3주; (iii) 3 mg/kg 체중 한번에 이어서 매 3주에 1 mg/kg 체중.
- [0346] 몇 가지 방법에서, 다른 결합 특이성을 가진 둘 또는 그 이상의 모노클론 항체를 동시에 투여하고 이 경우 투여된 각 항체의 투여량은 지시된 범위 안이다. 항체는 보통 여러 경우로 투여된다. 예를 들어 단일 투여 사이의 간격은 매주, 매달, 매 3달 또는 매년이 될 수 있다. 간격은 또한 환자에 있어서의 표적 항원에 대한 항체의 측정 혈액 수준에 의해 가리키는 대로 불규칙하게 될 수도 있다. 어떤 방법에서는 투여량이 약 1-1000 µg/ml의 원형질 항체 농도를, 또한 어떤 방법에서는 약 25-300 µg/ml의 원형질 항체 농도를 성취하도록 조절된다.
- [0347] 다른 방도로, 서방형 제제로 투여할 수 있는데, 이 경우에는 투여를 자주 하지 않게 된다. 투여량과 횟수는 환자에서의 항체의 반감기에 의존해 변화하게 된다. 일반적으로 인간 항체는 가장 긴 반감기를 나타내며 그 뒤에 인간화된 항체, 혼성의 항체 및 비인간 항체가 따른다. 투여량과 투여횟수는 처치법이 질병예방인지 치료를 위한 것인지에 따라 변화될 수 있다. 질병예방적 적용에서는, 장기간에 걸쳐 비교적 빈번하지 않게 비교적 적은 용량이 투여된다. 어떤 환자는 그들의 살아 있는 동안 계속해서 처치를 받기도 한다. 치료적 적용에서는 질병의 진행이 완화되거나 끝나게 되고 바람직하게는 환자가 부분적으로 또는 완전히 질병의 증상이 고쳐질 때까지 비교적 짧은 간격으로 비교적 많은 투여량이 때때로 요구된다. 그 이후에 환자를 질병예방 요법으로 투여될 수 있다.
- [0348] 본 발명의 제약 조성물에서 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 없이 특별한 환자, 조성물, 및 투여 형태에 있어서 요구되는 치료 반응을 달성하기 위한 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위해서 변화될 수

있다. 선택된 용량 수준은 이용된 본 발명의 특별한 조성물의 활성, 또는 에스테르, 염 또는 그것의 아미드, 투여 통로, 투여 시간, 사용된 특별한 화합물의 배출 속도, 처치 지속 기간, 다른 약품, 이용된 특별한 조성물과 조합되어 사용된 화합물 및/또는 물질, 처치 환자의 나이, 성별, 몸무게, 건강상태, 일반적인 건강과 이전의 의학적인 병력, 그리고 의학적 분야에 잘 알려진 요인들과 마찬가지로 이들을 포함하는 약물 동력학의 다양성에 의존할 것이다.

[0349] 본 발명에서 항-IFNAR-1 항체의 "치료에 효과적인 투여량"은 바람직하게는 질병 증상의 심각성의 감소와, 질병 증상이 없는 기간의 횟수와 지속기간의 증가, 또는 질병 고통으로 인한 손상이나 불구의 방지를 가져온다. 예를 들어 전신 홍반성 낭창 (SLE), 치료에 효과적인 투여량은 바람직하게는 SLE와 관련된 육체적 증상, 예를 들어 가령 통증과 피로가 더 악화되는 것을 방지한다. 치료에 효과적인 투여는 바람직하게는 또한 SLE의 발병을 방지하거나 지연시키는 것 가령 이 병의 초기 또는 예비 증상이 나타날 때 요구될 것이다. 마찬가지로 이는 SLE와 관련된 만성적인 진행을 지연시키는 것을 포함한다. SLE 진단에 이용된 실험실 시험들은 화학, 혈액학, 혈청학 및 방사선학을 포함한다. 따라서 특정 처치가 SLE를 치료하는데 있어 치료학적으로 효과적인 투여량인지 아닌지를 결정하는데 전술한 것의 어떤 것들을 모니터링하는 어떤 임상 또는 생화학적 분석이 사용될 것이다. 이 분야에 통상적으로 숙련된 사람은 환자의 칫수, 환자 증상의 심각성, 그리고 특별한 조성물 또는 선택된 투여 통로와 같은 요인에 기초하여 그러한 양을 결정할 수 있다.

[0350] 본 발명의 조성물은 이 분야에 알려진 다양한 방법 중에서 하나 이상을 사용하여 하나 이상의 투여 통로를 통해 투여될 수 있다. 숙련된 자에 의해 평가되는 대로 투여 통로와 처방은 요구된 결과에 의존해 변할 것이다. 본 발명의 항체에 대한 바람직한 투여 통로는 예를 들어 주사 또는 주입에 의해서 정맥내의, 근육내의, 피내의, 복강내의, 피하의, 척추 또는 다른 비경구 투여 통로를 포함한다. 여기서 사용된 "비경구 투여"라는 말은 보통 주사에 의해, 장내의 국부적인 투여와는 다른 투여 방식을 의미하며, 제한 없이, 정맥내의, 근육내의, 동맥내의, 척수장내의, 캡슐내의, 안구내의, 심장내의, 피내의, 복강내의, 경기관외의, 피하의, 손톱밑의, 관절내의, 캡슐하의, 지주막하의, 척추장내의, 경막외 및 흉골내의 주사 및 주입을 포함한다.

[0351] 다른 방도로, 본 발명의 항체는 가령 국부적인, 외피의 또는 점막의 투여 통로와 같은 비경구가 아닌 통로를 통해, 예를 들어 비강내로, 구강내로, 질내로, 직장내로, 설하(혀밑)로 또는 국부적으로 투여할 수 있다.

[0352] 활성 화합물은 급속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체를 사용하여 제조될 수 있는데, 이는 가령 서방형 제제로 이식체, 경피 부착포 및 미세캡슐 전달 시스템을 포함한다. 생체분해가 가능하고 생체적합한 가령 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안히드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 고분자가 사용될 수 있다. 그러한 처방을 준비하기 위한 많은 방법들은 특허로 되어 있거나 이 분야의 숙련된 자에게 일반적으로 알려져 있다. 예를 들면, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. 로빈슨 편집, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참조.

[0353] 치료 조성물은 이 분야에 알려진 의학 기구로 투여될 수 있다. 예를 들어 바람직한 구체예에서 본 발명의 치료 조성물은 바늘없는 피하 주사 기구, 가령 미국 특허 번호 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; 또는 4,596,556에 나타난 기구로 투여될 수 있다. 본 발명에 유용한 잘 알려진 이식체 및 모듈의 예에는: 조절된 속도로 투약을 하기 위한 이식가능한 미세 주입 펌프를 나타내는 미국 특허 번호 4,487,603; 피부를 통해 약물을 투여하는 치료 기구를 나타내는 미국 특허 번호 4,486,194; 정밀한 주입 속도로 약물을 전달하는 약물 주입 펌프를 나타내는 미국 특허 번호 4,447,233; 연속적인 약물 전달을 위한 가변 유량의 이식가능한 주입 기구를 나타내는 미국 특허 번호 4,447,224; 많은 격실을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 나타내는 미국 특허 번호 4,439,196; 삼투성 약물 전달 시스템을 나타내는 미국 특허 번호 4,475,196이 포함된다. 이들 특허들은 참고로 여기에 포함시킨다. 많은 다른 그런 이식체, 전달 시스템 및 모듈들은 이 분야의 숙련자에게 알려져 있다.

[0354] 어떤 구체예에서, 본 발명의 인간 모노클론 항체는 생체 내 적절한 분포를 확보하도록 조제될 수 있다. 예를 들어 혈액뇌장벽(BBB)은 많은 고 친수성 화합물을 제외한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 발달하는 것(요구된다면)을 확정하기 위해서, 그들을 예를 들어 리포솜 내에 조제할 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법에 대해서는 예를 들면, 미국 특허 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331을 참조한다. 리포솜은 특이 세포 또는 기관 내로 선택적으로 옮겨진 하나 이상의 성분을 포함하게 되며 따라서 표적의 약물 전달을 향상시킨다(예를 들면, V.V. 라나드(1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685 참조). 전형적인 표적 성분은 플레이트 또는 비오틴(예를 들면, 로우 등의 미국 특허 5,416,016 참조); 만노시드 (우메자와 등, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 항체 (P.G. 블로만 등 (1995) FEBS Lett. 357:140; M. 오와이스 등 (1995) Antimicrob. Agents

Chemother. 39:180); 표면활성제 단백질 A 수용체 (브리스코 등 (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (슈레이어 등 (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)이 포함된다; 또한 K. 케이나넨: M.L. 라우크카넨 (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. 킬리온; I.J. 피들러 (1994) Immunomethods 4:273을 참조한다.

[0355] 본 발명의 용도 및 방법

[0356] 본 발명의 항체(및 면역접합체 및 이중특이성 분자)는 시험관 내와 생체 내 진단과 치료 용도를 갖는다. 예를 들어, 이 분자들은 다양한 질병들을 치료, 방지, 또는 진단하기 위해 배양물내 세포에, 예를 들면, 시험관내 또는 생체의 또는 환자에게 예를 들면 생체내로 투여될 수 있다. 여기 사용되는 "환자"라는 용어는 인간과 비인간 동물을 포함하는 것으로 의도된다. 비인간 동물은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물과 비포유동물, 가령 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류, 및 파충류를 포함한다. 이 방법은 비정상 또는 부적절한 타입 I 인터페론 발현(예를 들면, 과잉발현)과 연관된 질병을 갖는 인간 환자를 치료하기에 특히 적절하다.

[0357] IFNAR-1에 대한 항체를 다른 시약과 함께 투여할 때, 둘을 차례로 또는 동시에 투여할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체는 하나 이상의 다음의 시약들과 조합하여 사용될 수 있다: 항-IFN α 항체, 항-IFN γ 수용체 항체, 용해성 IFN γ 수용체, 항-TNF 항체, 항-TNF 수용체 항체 및/또는 수용성 TNF 수용체(예를 들면, 미국 특허 번호 5,888,511 참조). 더욱이 본 발명의 항-IFNAR-1 항체는 F1t3 리간드 길항제와의 조합으로 사용될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 출원 번호 2002/0160974 참조).

[0358] 한 구체예에서, 본 발명의 항체(및 면역접합체 및 이중특이성 분자)는 IFNAR-1의 수준 또는 IFNAR-1을 발현하는 세포의 수준을 검출하는데 사용될 수 있다. 이는 예를 들면, 시료(시험관내 시료와 같은) 및 대조용 시료를 항체와 IFNAR-1사이에 복합체 형성을 허락하는 조건하에서 항-IFNAR-1 항체와 접촉시킴으로 이를 수 있다. 항체와 IFNAR-1 사이에 형성된 임의의 복합체는 검출되고 시료 및 대조용으로 비교한다. 예를 들면, ELISA 및 유동 세포측정 분석과 같은 이 기술 분야에 잘 알려진 표준 검출법을 본 발명의 조성물을 사용하여 수행할 수 있다.

[0359] 따라서, 일면으로 본 발명은 항체 또는 그의 부분과 IFNAR-1 사이에 복합체 형성을 허락하는 조건하에서, 시료 및 대조용 시료를 IFNAR-1에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 접촉시키는 것을 포함하는, 시료내의 IFNAR-1(예를 들면, 인간 IFNAR-1 항원)의 존재를 검출하거나 IFNAR-1의 양을 측정하는 방법을 더욱 제공한다. 다음에 복합체 형성을 검출하고, 대조용 시료에 비교한 시료의 복합체 형성의 차이가 시료내의 IFNAR-1의 존재의 지표가 된다.

[0360] 본 발명의 조성물(예를 들면, 항체, 인간 항체, 면역접합체 및 이중특이성 분자)을 포함하는 키트 및 사용에 대한 지시는 또한 본 발명의 범위 내이다. 키트는 본 발명의 하나 이상의 부가적인 항체(예를 들면, 첫 번째의 인간 항체와는 다른 표적 항원 상의 에피토프에 결합하는 상보적 활성을 갖는 항체), 또는 적어도 하나의 부가적 시약을 더 포함할 수 있다. 키트는 전형적으로 키트의 내용물의 의도된 용도를 나타내는 표지를 포함한다. 표지라는 용어는 키트와 함께 또는 그 위에 공급된 임의의 적어 놓은 것 또는 기록된 물질, 또는 그렇지 않으면, 키트에 수반된 것들을 포함한다.

[0361] IFNAR-1은 타입 I 인터페론의 세포 수용체의 일부이고, 타입 I 인터페론은 특히, T 세포 분화, 항체 생산 및 기억 T 세포의 활성화 및 생존에 개재된 면역조절 시토킨인 것으로 알려져 있다. 더욱이, 타입 I 인터페론의 증가된 발현은 다수의 자가면역 질병, HIV 감염, 이식 거부, 이식편대숙주반응(GVHD)에서 기술되어 왔다. 따라서, 타입 I 인터페론의 기능적 활성을 억제하는 본 발명의 항-IFNAR-1 항체(및 면역접합체 및 이중 특이성 분자)는 비정상 또는 바람직하지 못한 타입 I 인터페론 활성을 포함하는 여러 임상적인 표지에 사용될 수 있다. 따라서 본 발명은 타입 I 인터페론-매개 질병 또는 장애가 치료되도록 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분(또는 본 발명의 면역접합체 또는 이중 특이성 분자)를 투여하는 것을 포함하는, 타입 I 인터페론-매개 질병 또는 장애를 억제하는 방법을 제공한다.

[0362] 본 발명의 항체가 사용될 수 있는 자가면역 조건의 특정 예에는: 전신 홍반성 낭창(SLE), 인슐린 의존성 당뇨병(IDDM), 염증성 장 질환(IBD)(크론병, 궤양성 대장염 및 쉐리악병을 포함), 다발성 경화증(MS), 건선, 자가면역 갑상선염, 류마티스 관절염(RA) 및 사구체신염이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱이 본 발명의 항체 조성물은 이식거부의 억제 또는 방지 또는 이식편대숙주반응(GVHD)의 치료 또는 HIV 감염/AIDS의 치료에 사용할 수 있다.

[0363] IFN α 의 높은 수준은 전신 홍반성 낭창(SLE) 환자의 혈청에서 관찰되었다(예를 들면, 김 등(1987) Clin. Exp. Immunol. 70:562-569 참조). 더욱이, 예를 들면, 암 또는 바이러스 감염 치료에 IFN α 를 투여하는 것이 SLE를

유도하는 것으로 나타났다(갈키아-포루아 등 (1998) Clin. Exp. Rheumatol. 16:107-108 참조). 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체는 치료가 필요한 환자에 항체를 투여함으로써 SLE를 치료하는데 사용할 수 있다. 항체는 비-스테로이드 항-염증성 약물(NSAIDs), 진통제, 코르티코스테로이드(예를 들면, 프레디니손, 히드로코르티손), 면역억제제(예를 들면, 시클로포스파미드, 아자티오프린 및 메토티렉세이트), 항말라리아제(예를 들면, 히드록시클로로퀸) 및 dsDNA 항체의 생산을 억제하는 생체 약물(예를 들면, IJP 394)와 같은 다른 항-SLE 시약과 함께 또는 단일로 사용될 수 있다.

[0364] IFN α는 또한 타입 I 당뇨병의 병리학에 관련되어 왔다. 예를 들면, 타입 I 당뇨병 환자의 췌장 베타 세포에서 면역 반응성 IFN α의 존재가 보고되었다(포우리스 등(1987) Lancet 2:1423-1427). 항-바이러스 치료에서 IFN α의 장기간 사용은 또한 타입 I 당뇨병을 일으킨다는 것이 나타났다(와구리 등(1994) Diabetes Res. Clin. Pract. 23:33-36). 따라서 다른 구체예에서, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체는 치료가 필요한 환자에게 항체를 투여함으로써 타입 I 당뇨병의 치료에 사용될 수 있다. 이 항체는 단일로 또는 인슐린과 같은 다른 항-당뇨제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0365] IFNAR에 대한 항체는 염증성 장 질환이 있는 동물 모델에 효과적인 것으로 나타났다(미국 특허 출원 60/465,155 참조). 따라서, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체는 치료가 필요한 환자에게 항체를 투여함으로써, 궤양성 대장염 및 크론병을 포함하는 염증성 장 질환(IBD) 치료에 사용될 수 있다. 본 항체는 메살아민(올살라진 및 발살아지드과 같은 5-아미노살리실릭 산(5-ASA)를 포함하는 다른 시약 및 설파살라진 포함), 비-스테로이드 항-염증성 약물(NSAIDs), 진통제, 코르티코스테로이드(예를 들면, 프레디니손, 히드로코르티손), TNF-억제제(아딜리루마브(Humira®), 에타네르셉트(Enbrel®) 및 인플릭시마브(Remicade®)포함), 면역억제제(예를 들면, 6-메르캅토피린, 아자티오프린 및 시클로스포린 A) 및 항생제와 같은 다른 항-IBD 시약과 조합으로 또는 단일로 사용할 수 있다.

[0366] IFN α를 사용하는 치료는 또한 자가면역 갑상선염을 유도하는 것으로 관찰되었다(몬자니 등 (2004) Clin. Exp. Med. 3:199-210; 푸름멜 및 로이버그 (2003) 티로이드 13:547-551). 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명의 항-IFNAR 항체는 치료가 필요한 환자에 본 항체를 투여함으로써 자가면역성의 일차적 갑상선 기능 부전증, 그레이브병(Graves' Disease), 하시모토 갑상선염 및 갑상선 기능 부전증을 갖는 파괴적인 갑상선염을 포함하는 자가면역 갑상선 질환 치료에 사용할 수 있다. 본 항체는 항-갑상선 의약, 방사성 요오드 및 서브토탈 갑상선 적출술과 같은 치료 또는 다른 시약과 조합으로 또는 단일로 사용할 수 있다.

[0367] 타입 I 인터페론, 특히 IFN-β의 증가된 수준은 RA 환자의 혈장에서 관찰되었다(예를 들면, 헤르츠조그 등 (1988) Clin. Immunol. Immunopath. 48:192 참조). 따라서, 한 구체예에서, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체는 치료가 필요한 환자에 본 항체를 투여함으로써 RA 치료에 사용할 수 있다. 본 항체는 비-스테로이드 항-염증성 약물(NSAID), COX-2 억제제, 진통제, 코르티코스테로이드(예를 들면, 프레디니손, 히드로코르티손), 금, 면역억제제(예를 들면, 메토티렉세이트), B-세포 결핍제(예를 들면, Rituxan™), B-세포 길항제(예를 들면, LymphoStat-B™) 및 항-TNF-α 시약(예를 들면, EMBREL™, HUMIRA® 및 REMICADE™)와 같은 하나 이상의 다른 항-RA 시약과 조합으로 또는 단일로 사용할 수 있다.

[0368] IFN α의 투여가 건선을 악화시키는 것으로 보고되었다. 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체는 치료가 필요한 환자에 본 항체를 투여함으로써 건선 및 건선성 관절염 치료에 사용할 수 있다. 본 항체는 광선 요법, 국부요법(예를 들면, 국부 글루코코르티코이드), 또는 전신 요법(예를 들면, 메토티렉세이트, 합성 레티노이드, 시클로스포린), 항-TNF-α 시약(예를 들면, EMBREL™, HUMIRA® 및 REMICADE™), 및 T-세포 억제제(예를 들면, Raptiva™)과 같은 하나 이상의 다른 항-건선 치료제와 조합으로 또는 단일로 사용할 수 있다.

[0369] IFN α의 높은 수준은 또한 HIV 감염 환자의 순환계에서 관찰되었고, 그의 존재는 AIDS 진행의 예견 표시자이다(테스테파노 등(1982) J. Infect. Disease 146:451; 바드한-라이 등 (1986) Cancer Res. 46:417). 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체는 치료가 필요한 환자에 본 항체를 투여함으로써 HIV 감염 또는 AIDS 치료에 사용할 수 있다. 본 항체는 뉴클레오시드 역 전사효소 억제제, 비-뉴클레오시드 역 전사효소 억제제, 단백질 분해효소 억제제 및 접합 억제제와 같은 다른 항-HIV 시약과 조합으로 또는 단일로 사용할 수 있다.

[0370] IFNAR-1에 대한 항체는 알로이식 거부를 억제하고 알로이식 생존을 연장시키는데 효과적인 것으로 나타났다.(예를 들면, 토베이 등(1996) J. Leukoc. Biol. 59:512-517; 베니즈리 등 (1998) J. 인터페론 사이토킨 Res. 18:273-284 참조). 따라서, 본 발명의 항-IFNAR-1 항체는 또한 알로이식 거부를 억제하고/거나 알로이식 생존을

연장시키기 위해서 이식 수령체에 사용될 수 있다. 본 발명은 치료가 필요한 이식 수령체에 본 발명의 항-IFNAR-1 항체를 투여함으로써 이식 거부를 억제하는 방법을 제공한다. 치료할 수 있는 조직 이식의 예에는 간, 폐, 신장, 심장, 작은 창자, 및 췌장 세포뿐만 아니라 이식편대숙주반응(GVHD)이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 항체는 면역억제제(예를 들면, 시클로스포린, 애저사이어프린, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 마이코페놀레이트 트페틸, 시틸리무스, 라파마이신, 타크로리무스), 항-감염제(예를 들면, 아시클로비르, 클로트리마졸, 간시클로비르, 나이스타틴, 트리메토프림설파르네톡사졸), 이노제(예를 들면, 부메타니드, 푸로세미드, 메톨라존) 및 케양 의약(예를 들면, 시메티딘, 파르노티딘, 란조프라졸, 오메프라졸, 라니티딘, 수크랄페이트)과 같은 이식 거부를 억제하는 다른 시약과 조합으로 또는 단일로 사용할 수 있다.

[0371] 본 발명은 제한으로 해석되어서는 안 되는 다음의 실시예로 더욱 설명된다. 본 출원에 인용된 모든 도면 및 모든 참고문헌, 특허 및 공개 특허 출원의 내용은 참고로 여기에 밝히 포함시킨다.

실시예

[0387] **실시예1: IFNAR-1에 대한 인간 모노클론 항체의 생성:**

[0388] 항원

[0389] IFNAR-1의 세포의 영역을 포함하는 용해성 INFAR-1은 재조합 방법에 의해 생성되며 면역을 위한 항원으로 사용되었다.

[0390] 유전자이식 HuMab 쥐

[0391] IFNAR-1에 대한 완전한 인간 모노클론 항체를 HuMab 유전자이식 쥐의 HCo7, HCo12, 및 HCo7 x HCo12 균주를 사용하여 제조하였으며 이들 각각은 인간 항체 유전자를 발현시킨다. 이 쥐 균주의 각각에서, 내생의 쥐 카파 경사슬 유전자는 첸 등의 (1993) EMBO J. 12:811-820에 기술된 바와 같이 동형접합적으로 찢기어졌고, 내생의 쥐 중 사슬은 PCT 공개 WO 01/09187의 실시예 1에 기술된대로 동형접합적으로 찢기어졌다. 이 쥐 균주 각각은 피시와일드 등의 (1996) Nature Biotechnology 14:845-851에 기술된대로 인간 카파 경사슬 이식유전자, KCo5를 운반한다. HCo7 균주는 미국특허번호 5,545,806; 5,625,825; 및 5,545,807에 기술된대로 HCo7 인간 중 사슬 이식유전자를 운반한다. HCo12 균주는 PCT 공개 WO 01/09187의 실시예 2에 기술된대로 HCo12 인간 중 사슬 이식유전자를 운반한다. HCo7 x HCo12 균주는 HCo7과 HCo12 이식유전자를 운반하며 두 균주를 함께 배양하여 만들어진 다.

[0392] HuMab 쥐 면역:

[0393] IFNAR-1에 대한 완전한 인간 모노클론 항체를 생성하기 위해, HuMab 쥐를 정제된 재결합 IFNAR-1을 항원으로 사용하여 면역시켰다. HuMab 쥐에 대한 일반적인 면역 개략들이 론버그, N. 등의 (1994) Nature 368(6474): 856-859; 피시와일드, D 등의 Nature Biotechnology 14:845-851와 PCT 공개 WO 98/24884에 기술되어 있다. 쥐가 6-16주 되었을 때에 첫 번째로 항원을 주입하였다. 용해성 IFNAR-1 항원의 정제된 재결합 제조물(5-50 µg)을 사용하여 HuMab 쥐에 복강내, 피하(Sc) 또는 훗패드(footpad) 주입을 통해 면역시켰다.

[0394] 유전자이식 쥐는 완전한 프로이드의 보조제 또는 리비(Ribi) 보조제 내의 항원으로 두 번 복강내(IP), 피하(Sc) 또는 훗패드(FP)를 통해 면역시켰고, 이어서 3-21일간 불안정한 프로이드 또는 리비 보조제 내의 항원으로 IP, Sc 또는 FP 면역 (총 11번까지 면역)을 하였다. 면역반응은 역혈도 블리드에 의해 모니터링하였다. 혈장을 ELISA(아래 기술된대로)에 의해 스크리닝하였고, 항-IFNAR-1 인간 면역글로불린의 충분한 적정량을 가진 쥐를 접합에 사용하였다. 쥐는 죽여서 비장을 제거하기 2일 전에 항원 3을 정맥 내에 집어넣었다. 전형적으로, 각 항원에 대해 10-35 접합을 행했다. 수십 마리의 쥐를 각 항원에 대해 면역시켰다.

[0395] 항-IFNAR-1 항체를 생산하는 HuMab 쥐의 선택

[0396] IFNAR-1에 결합하는 항체를 생산하는 HuMab 쥐를 선택하기 위해, 면역된 쥐로부터 나온 혈청을 피쉬월드, 디이. 등 (1996)에 의해 기술된대로 ELISA에 의해 시험하였다. 간단하게 미세적정량의 플레이트를 PBS 내 1-2 ug/ml, 50 ul/웰로 이 콜리(*E. coli*)로부터 정제된 재결합 IFNAR-1로 바르고, 4°C에서 밤새 배양한 후 PBS/트윈(Tween)(0.05%) 내 5%의 병아리 혈청 200 ul/웰로 차단하였다. IFNAR-1-면역 쥐로부터의 혈장 희석물을 각 웰에 첨가하고 상온에서 1-2시간 동안 배양하였다. 플레이트를 PBS/트윈으로 세척하고 그 다음 호오스래디시 과산화효소(HRP)로 접합된 염소-항-인간 IgG Fc 폴리클론 항체로 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 세척한 후, 플레이트를 ABTS 기질 (시그마, A-1888, 0.22 mg/ml)로 발달시키고, OD 415-495에서 분광 광도계로

분석하였다. 항-IFNAR-1 항체의 최고 적정량으로 발달시킨 쥐를 접합에 사용하였다. 접합은 아래 기술한 대로 수행하였으며 하이브리도마 상청액을 ELISA로 항-IFNAR-1 활성에 대해 시험하였다.

- [0397] IFNAR-1에 대한 인간 모노클론 항체를 생성하는 하이브리도마의 생성
- [0398] 쥐 비장세포를 HuMab로부터 분리하여 표준 프로토콜을 기반으로 쥐 골수종 세포주에 PEG를 사용하여 접합시켰다. 이후에 결과적으로 생성된 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝하였다. 면역된 쥐로부터 나온 비장 림프구의 단일 세포 현탁액을 50% PEG(시그마)를 사용하여 사용하여 SP2/0 미분비 쥐 골수종 세포 (ATCC, CRL 1581) 수의 1/4과 접합시켰다. 세포를 바닥이 편평한 미세 적정량 플레이트 내에 약 1×10^5 /웰로 바르고, 10% 태아 소 혈청, 10% P388D1(ATCC, CRL TIB-63) 조절 배지, DMEM (Mediatech, CRL 10013, 고 글루코스, L-글루타민 및 피루브산 나트륨)과 5 mM HEPES 내의 3-5% 오리젠 (IGEN), 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50 mg/ml 젠타마이신 및 1xHAT (시그마, CRL P-7185)를 포함한 선택적 배지 내에서 약 2주간 배양하였다. 1-2주 후 세포를 HAT가 HT로 대체된 배지 내에서 배양하였다. 그 다음 각 웰을 인간 항-IFNAR-1 모노클론 IgG 항체에 대해 (위에 기술된) ELISA에 의해 스크리닝하였다. 하이브리도마 성장이 크게 발생되면 배지를 보통 10-14일 후 검사한다. 하이브리도마를 분비하는 항체는 다시 바르고 다시 스크리닝하고, 인간 IgG에 아직 양성이면, 항-IFNAR-1 모노클론 항체를 희석을 제한하면서 적어도 두 번 서브클로닝하였다. 다음에, 안정된 서브클론을 시험관 내에서 배양하여 조직 배양 배지 내의 항체 소량을 생성하고 특성을 더욱 시험한다.
- [0399] 하이브리도마 클론 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4을 선택하여 더 분석하였다.
- [0400] **실시예 2: 인간 모노클론 항체 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4의 구조적 특성**
- [0401] 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4 모노클론 항체의 중 및 경 사슬 가변 지역을 암호화하는 cDNA 서열을 각각 표준 PCR 기술을 이용하여 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4 하이브리도마로부터 얻고 표준 DNA 서열화 기술을 이용하여 서열화하였다.
- [0402] 3F11의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 1A 및 SEQ ID NO:33과 25에 각각 도시하였다.
- [0403] 3F11의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 1B 및 SEQ ID NO:37과 29에 각각 도시하였다.
- [0404] 3F11 중 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 중 사슬 서열과 비교하여 3F11 중 사슬이 인간 생식계열 VH 4-34로부터의 V_H 단편, 결정되지 않은 D 단편 및 인간 생식계열 J_H 6b로부터의 J_H 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 3F11 V_H 서열을 생식계열 VH 4-34 서열에 정렬시킨 것을 도 5에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카벨 시스템을 사용하여 3F11 V_H 서열을 더 분석함으로써 각각 도 1A와 5 및 SEQ ID NO: 1, 5와 9에 보여진대로 중 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.
- [0405] 3F11 경 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 경 사슬 서열과 비교하여 3F11 경 사슬이 인간 생식계열 VK L18로부터의 V_L 단편 및 인간 생식계열 JK 5로부터의 JK 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 3F11 V_L 서열을 생식계열 VK L18 서열에 정렬시킨 것을 도 8에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카벨 시스템을 사용하여 3F11 V_L 서열을 더 분석함으로써 각각 도 1B와 8 및 SEQ ID NO: 13, 17과 21에 보여진대로 경 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.
- [0406] 4G5의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 2A 및 SEQ ID NO:34와 26에 각각 도시하였다.
- [0407] 4G5의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 2B 및 SEQ ID NO:38과 30에 각각 도시하였다.
- [0408] 4G5 중 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 중 사슬 서열과 비교하여 4G5 중 사슬이 인간 생식계열 VH 4-34로부터의 V_H 단편, 결정되지 않은 D 단편, 및 인간 생식계열 J_H 4b로부터의 J_H 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 4G5 V_H 서열을 생식계열 VH 4-34 서열에 정렬시킨 것을 도 6에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카벨 시스템을 사용하여 4G5 V_H 서열을 더 분석함으로써 각각 도 2A와 6 및 SEQ ID NO: 2, 6과 10에 보여진대로 중 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.
- [0409] 4G5 경 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 경 사슬 서열과 비교하여 4G5 경 사슬이 인간 생식계열 VK L18로부터의 V_L 단편 및 인간 생식계열 JK 2로부터의 JK 단편을 이용한다는 것을 설명하였다.

4G5 V_L 서열을 생식계열 VK L18 서열에 정렬시킨 것을 도 9에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카벨 시스템을 사용하여 4G5 V_L 서열을 더 분석함으로써 각각 도 2B와 9 및 SEQ ID NO: 14, 18과 22에 보여진대로 경 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.

- [0410] 11E2의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 3A 및 SEQ ID NO:35와 27에 각각 도시하였다.
- [0411] 11E2의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 3B 및 SEQ ID NO:39와 31에 각각 도시하였다.
- [0412] 11E2 중 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 중 사슬 서열과 비교하여 11E2 중 사슬이 인간 생식계열 VH 5-51로부터의 V_H 단편, 결정되지 않은 D 단편 및 인간 생식계열 J_H 4b로부터의 J_H 단편으로부터 유도되었거나 또는 매우 유사하다는 것을 설명하였다. 11E2 V_H 서열을 생식계열 VH 5-51 서열에 정렬시키는 것을 도 7에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카벨 시스템을 사용하여 11E2 V_H 서열을 더 분석함으로써 각각 도 3A와 7 및 SEQ ID NO: 3, 7과 11에 보여진대로 중 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.
- [0413] 11E2 경 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 경 사슬 서열과 비교하여 11E2 경 사슬이 인간 생식계열 VK A27로부터의 V_L 단편 및 인간 생식계열 JK 5로부터의 JK 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 11E2 V_L 서열을 생식계열 VK A27 서열에 정렬시키는 것을 도 10에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카벨 시스템을 사용하여 11E2 V_L 서열을 더 분석함으로써 각각 도 3B와 10 및 SEQ ID NO: 15, 19와 23에 보여진대로 경 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.
- [0414] 9D4의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 4A 및 SEQ ID NO:36과 28에 각각 도시하였다.
- [0415] 9D4의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드와 아미노산 서열을 도 4B 및 SEQ ID NO:40과 32에 각각 도시하였다.
- [0416] 9D4 중 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 중 사슬 서열과 비교하여 9D4 중 사슬이 인간 생식계열 VH 5-51로부터의 V_H 단편, 결정되지 않은 D 단편 및 인간 생식계열 J_H 4b로부터의 J_H 단편으로부터 유도되었거나 또는 매우 유사하다는 것을 설명하였다. 9D4 V_H 서열을 생식계열 VH 5-51 서열에 정렬시키는 것을 도 7에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카벨 시스템을 사용하여 9D4 V_H 서열을 더 분석함으로써 각각 도 4A와 7 및 SEQ ID NO: 4, 8과 12에 보여진대로 중 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.
- [0417] 9D4 경 사슬 면역글로불린 서열을 알려진 인간 생식계열 면역글로불린 경 사슬 서열과 비교하여 9D4 경 사슬이 인간 생식계열 VK A27로부터의 V_L 단편 및 인간 생식계열 JK 5로부터의 JK 단편을 이용한다는 것을 설명하였다. 9D4 V_L 서열을 생식계열 VK A27 서열에 정렬시킨 것을 도 10에 나타내었다. CDR 지역을 결정하기 위해 카벨 시스템을 사용하여 9D4 V_L 서열을 더 분석함으로써 각각 도 3B와 10 및 SEQ ID NO: 16, 20과 24에 보여진대로 경 사슬 CDR1, CDR2 및 CD3 지역의 도표를 이끌어냈다.

[0418] **실시예 3: 항-IFNAR-1 인간 모노클론 항체는 인터페론 α2b 의 생물학적 활성을 억제한다**

[0419] 인간 B-림프모세포 버킷 림프종으로부터 유도된, 세포주 다우디(Daudi)는 IFNAR-1을 높은 수준으로 발현하고, 이들 세포의 성장은 타입 I 인터페론들에 의해서 억제된다. 인간 항-IFNAR-1 항체의 기능 차단 능력을 측정하기 위해서, 서로 다른 두 개의 분석, 세포 증식 분석 및 레포터(repoter) 분석을 행한다.

[0420] 첫 번째 분석에서, 다우디 세포를 항체의 존재하 또는 부재하에서 인터페론 α2b와 함께 배양하고, 증식을 ³[H]-티미딘 흡수로 측정하였다. 다우디 세포(ATCC CCL-213)를 10% FCS 및 2 mM 베타 메르캅토에탄올(배지)을 포함하는 RPMI에서 배양하였다. 세포를 원심분리하여 1% 인간 혈청 알부민(배지 및 HS)을 첨가한 배지에서 1 x 10⁶ 세포/ml의 농도로 다시 현탁시켰다. 96-웰 플레이트의 각각의 웰에 적절한 농도의 항체를 포함하는 200U/ml 인터페론 α2b(쉐링 코오포레이션) 100 μl를 첨가하였다. 배지 및 HS내의 다우디 세포 100 μl를 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 48시간동안 배양하였다. 플레이트를 3[H]-티미딘 1 μCi을 넣고 24시간 더 배양하였다. 플레이트를 수확하고, 96-웰 섬유펴터 플레이트에 수집하고, 탐카운트 섬광 계수기(팍커드)를 사용하여 계수하였다. 분당 계수된 수를 항체농도의 함수로 나타내고, 자료를 프리즘 소프트웨어(캘리포니아, 샌디에고)를 사용하

여 비-선형 회귀, S자형 용량-반응(여러 기울기)으로 분석하였다.

[0421] 두 번째 분석에서, U937 세포를 인터페론 자극 반응 요소가 레포터 유전자(ISRE-RG)에 결합된 구조물로 트랜스펙션시키고, 레포터 유전자의 IFN-유도 발현을 억제하는 인간화된 항-IFNAR-1 항체의 능력을 측정하였다. 세포들을 10% FCS 및 2mM 베타 메르캅토에탄올(배지)를 포함하는 RPMI에서 배양하였다. 세포들(1 x 10⁶세포/ml)을 2% 인간 혈청을 첨가한 배지에 다시 현탁시켰다. 100 μl의 세포를 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 항체를 인터페론 α2b(쉐링 토오포레이션) 200 U/ml 를 포함하는 배지에서 연속적으로 희석하고 100 μl를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 밤새 배양하였다. 이 배양에 이어서, 레포터 유전자의 발현을 유동 세포측정법으로 평가하였다. 기하 평균 형광 강도를 항체 농도의 함수로 나타내고 자료를 프리즘 소프트웨어(캘리포니아, 샌디에고)를 사용하여 비-선형 회귀, S자형 용량-반응(여러 기울기)으로 분석하였다.

[0422] 상기한 두 개의 분석을 사용하여, 3F11 인간 모노클론 항체의 효능을 쥐의 항-IFNAR-1 항체 64G12(ECACC 기탁 번호 92022605) 및 인간화된 항-IFNAR-1 항체 D1H3K1(미국 일련 번호 60/465058에 더 기술됨)에 비교하였다. 3F11의 효능은 쥐의 항체보다 5-10배 더 크고 인간화된 항체보다 6-30배 더 큰 것으로 나타났다. 결과는 아래 표 1에 요약해 놓았다.

[0423] 표 1. IFN 알파 2b 상의 인간 항-IFNAR-1 항체의 차단 능력

| | 아이소타입 | 세포 증식 (다우디) EC ₅₀ (nM) | ISRE-RG 레포터 (U937)EC ₅₀ (nM) |
|---------|--------|--------------------------------------|--|
| 64G12 | m IgG1 | 3.1 | 6.0 |
| DI H3K1 | h IgG1 | 9.3 | 8.0 |
| 3F11 | h IgG1 | 0.3 | 1.2 |

[0425] 실시예 4: 항-IFNAR-1 인간 모노클론 항체가 IFN 오메가의 생물학적 활성을 억제한다

[0426] 상기 실시예 3에 기술된 다우디 증식 분석을 사용하여, IFN 오메가 반응을 억제하는 인간 항-IFNAR-1 항체의 능력을 시험하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 적절한 농도의 항체를 포함하는 200 U/ml 인터페론 오메가(PBL) 100 μl를 첨가하였다. 인간 항체 3F11, 4G5, 11E2 및 9D4 는 쥐의 64G12 항체보다 4-18배 더 효능이 있었다 (EC₅₀으로 측정하여). 결과는 아래 표 2에 요약해 놓았다.

[0427] 표 2. IFN 오메가 상의 인간 항-IFNAR-1 항체의 차단 능력

| | 아이소타입 | 세포 증식 (다우디) EC ₅₀ (nM) |
|---------|--------|--------------------------------------|
| 64G12 | m IgG1 | 5.5 |
| DI H3K1 | h IgG1 | 30.7 |
| 3F11 | h IgG1 | 0.6 |
| 4G5 | h IgG1 | 1.4 |
| 11E2 | h IgG1 | 0.3 |
| 9D4 | h IgG1 | 0.3 |

[0429] 실시예 5: 항-IFNAR-1 인간 모노클론 항체가 여러 타입 I IFNs의 생물학적 활성을 억제한다

[0430] 실시예 3에 기술한대로 인터페론 알파는 용량 의존 방식으로 다우디(버킷 림프종, ATCC #CCL-213) 세포의 증식을 억제한다. 그의 수용체에 결합하는 인터페론을 차단하는 중화항체는 증식을 복원할 것이다. 이 세포 증식 분석을 사용하여, 정제된 인간 항-IFN 알파 항체의 특이성은 자연 림프아구증 IFN α, 자연 백혈구 인터페론, 13 재조합체 IFN 알파 서브타입, IFN 베타 및 IFN 오메가의 차단을 시험함으로써 검사하였다.

[0431] 다우디 세포를 96웰의 바닥이 편평한 세포 배양 플레이트 내에서 IFN α 첨가 및 미첨가로 배양 배지(10% FCS, 1x2-ME, L-글루타민 및 페니실린 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640)에서 배양하였다. 시험한 각각의 타입 I 인터페론은 EC₅₀에서 분석하였고 항-IFNAR-1 항체 3F11의 2번 연속 적정으로, 전형적으로 50 ug/ml(312 nM)부터 381 pg/ml(2.4 pM)까지로 혼합되었다. 항체/IFN 혼합물은 1x10⁴ 다우디 세포/100ul/well의 최종밀도로 96 웰 플레이트 내 다우디 세포에 첨가하였고 37°C, 5% CO₂에서 72시간 배양하였다. 증식을 MTS(프로메가), 20ul/well을 첨가하여 분석하였고 3시간 동안 더 배양을 한 다음 490 nm에서의 O.D.를 측정하였다. 생존할 수 있는 세포 수는 읽혀진 O.D.에 비례하였다. 인터페론 차단 비율은 IFN이 없을 때(=100% 차단)와 IFN만 있을 때(=0% 차단)의 다우디 증식에 비교하여 계산되었다. 차단 정도에 따라 3F11 항체 수를 세어 IFN α 서브타입 특이성의 프로필을 얻었다. 그 결과는 인간 항-인터페론 알파 수용체 1 항체 3F11이 림프아구증 IFN, 백혈구 IFN, 및 IFN 오메가와 마찬가지로 IFN α 6, 2b, 2a, 1, 16, 10, 8, 5, 14, 17, 7, 4, 및 21을 포함하는 여러 인터페론 알파 서브타입의 작용을 억제하는 것을 나타냈다. 3F11는 IFN 베타의 낮은 수준 억제자인데, 50% 이상의 억제가 관찰되었다. 인터페론의 차단 %와 표준편차를 아래 표3에 나타내었다.

[0432] 표3: 여러 타입 I 인터페론의 항체 억제

[0433]

| 1000x Ab 에서의 3F11 IFN 차단 (%) | | |
|------------------------------|-------|------|
| IFN | 평균 | 표준편차 |
| 림프아구증 IFN | 94.9 | 2.9 |
| IFN α 6 | 107.1 | 6.6 |
| IFN α 2b | 101.9 | 0.4 |
| IFN α 2a | 103.1 | 3.0 |
| IFN α 1 | 111.6 | 1.9 |
| 백혈구 IFN | 109.4 | 1.4 |
| IFN α 16 | 105.7 | 1.4 |
| IFN α 10 | 96.7 | 5.5 |
| IFN α 8 | 87.5 | 2.6 |
| IFN α 5 | 105.1 | 3.9 |
| IFN α 14 | 100.3 | 1.4 |
| IFN α 17 | 99.8 | 2.4 |
| IFN α 7 | 102.8 | 3.2 |
| IFN α 4 | 100.5 | 2.5 |
| IFN α 21 | 104.4 | 2.3 |
| IFN-베타 | 53.0 | 1.7 |
| IFN-오메가 | 107.1 | 1.3 |

[0434] 실시예 6: 항-IFNAR-1 항체에 의한 IFN-유도 IP-10 분비의 억제

[0435] 세포배양 배지에 IFN 알파 2b를 첨가하면 정상의 말초 혈액 단일핵 세포 (PBMC)에 의한 IP-10 분비가 유도되는 것이 나타났다. 인간 항-IFNAR-1 항체 3F11의 활성을 ELISA 결합 분석에 의해 정상의 PBMC 배양물에 의한 IP-10의 인터페론 유도 분비의 억제에 대해 시험하였다.

[0436] PBMC를 백혈구 IFN, IFN 알파 2b, 또는 IFN ω를 갖는 배양배지(RPMI 1640+10%FBS+1% 인간 혈장)에서 24-48시간동안 배양하였다. 상청액을 수집하고, 1:30 희석에서 제조업자의 추천에 따라 정성적인 샌드위치 ELISA 키트 (Quantikine[®], R&D 시스템)을 사용하여 IP-10/CXCL10 농도에 대해 분석하였다. 결과는 인간 모노클론 항체 3F11이 정상 PBMC 배양물에 의한 IP-10의 백혈구 IFN, 재조합 IFN α2b, 및 재조합 IFN ω 유도 분비를 억제한다는 것을 나타내었다. 이 결과는 표 4에 나타냈다.

[0437] 표 4: 정상 PBMNC 상의 IFN-유도 IP-10 발현의 항체 억제

[0438]

| Ab 처리 | IFN 없음 IP-10 (pg/ml) | 백혈구 IFN IP-10 (pg/ml) | IFN 알파 2b IP-10 (pg/ml) | IFN 오메가 IP-10 (pg/ml) |
|------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 항체 없음 | 907 | 2665 | 2739 | 2904 |
| 3F11 (5 µg/ml) | 387 | 854 | 745 | 674 |
| 대조용 Ig (5 µg/ml) | 838 | 3512 | 3117 | 3960 |

[0439]

* 각 IFN 서브타입의 100U/ml가 배양물에 첨가되었음

[0440]

실시예 7: 항-IFNAR-1 인간 모노클론 항체 상호 경쟁 분석

[0441]

인간 모노클론 항체가 쥐 64G12 모노클론 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 지를 평가하기 위해서, 상호-경쟁 ELISA 분석을 사용하여 본 항체가 동일한 결합 에피토프에 대해 경쟁하는지 결정하였다.

[0442]

96-웰 플레이트에 100 µl/웰(메디아테크)로 새로 제조된 DPBS내 1 µg/ml의 농도의 용해성 CHO-유도 인간 IFNAR-1을 피복하였다. 인간 모노클론 항체 3F11, 4G5, 11E2, 및 9D4를 20 µg/mL로 웰 컬럼 1에 첨가하고, 컬럼 1에서 컬럼 12까지 웰내에서 1:2 비율로 연속적으로 희석하고 이어서 45분간 배양하였다. 0.3 µg/mL의 EC₇₅ 농도에서 쥐 모노클론 항체 64G12를 웰당 50 µL로 첨가하고 플레이트를 30분간 배양하였다. 플레이트를 E1x405 자동 플레이트 세척기(바이오-테크 인스트루먼트)로 3번 세척하였다. 과산화효소 친화성 정제된 F(ab')₂ 염소 항-쥐 IgG(Fc γ 특이적) 항체를 PBS에서 1:3000으로 희석하고 검출 접합체(잭슨 면역연구 실험실, cat. 115-036-0710)로 첨가하였다. 1시간 배양한 후, 플레이트를 E1x405 자동 플레이트 세척기로 3번 세척하였다. 27.8 mg/mL로 ABTS 용액(800 µl ABTS 모액, 30% H₂O₂ 8 µl, 및 시트르산 인산염 완충액 100mL)을 각 웰에 첨가하고 20분간 배양하였다. 플레이트를 참고 파장으로 490nm를 사용하여 415nm에서 읽었다. 결과는 도 11에 나타났다. 이 결과는 인간 항-IFNAR-1 모노클론 항체, 3F11, 4G5, 11E2, 및 9D4가 IFNAR-1에 대한 결합에 대해 64G12와 경쟁하지 않으며, 따라서 64G12와 다른 IFNAR-1상의 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다.

[0443]

실시예 8: SLE 혈장 매개 수지상 세포 발달의 항체 억제

[0444]

SLE 혈장은 정상 인간 단핵세포로부터 수지상 세포 발달을 유도한다. 이 실시예에서, SLE 혈장에 의한 세포 표면 마커 CD38, MHC 클래스 I 및 CD123의 유도를 억제하는 항체의 능력을 평가하여, 수지상 세포 발달의 억제에 대해 정제된 모노클론 인간 항-IFNAR-1 항체를 시험하였다.

[0445]

25 ml의 황갈색 피복을 PBS로 4배 희석하였다. 이 시료를 4 x 50 ml 원뿔 튜브에 분리하고, 15 ml의 림프구 분리 배지(ICN 생의학)를 하부에 층으로 만들었다. 이어서 500 x g에서 30분간 회전시키고 PBMC를 포함하는 황갈색 층을 제거하여 PBS로 세척하였다. 세포를 4x10⁶ 세포/ml로 배양 배지에 다시 현탁시켰다. 배양 배지 내에서 37 °C로 1.5시간 동안 PBMC(2.0x10⁷ 세포/5ml/25cm² 플라스크)를 배양하고 그 다음 비부착 세포를 두 번 세척함으로써 단핵세포를 분리하였다. 두 번째 세척에 이어서 1% 가열 불활성화 인간 혈청을 포함하는 배지 내에서 세포를 배양하였다. 25% SLE 환자 혈장 +/- 중화 항체 및 아이소타입 대조용(30ug/ml)을 배양 플라스크에 첨가하였다; IFN 알파 2b (100 & 10 iu/ml) + 25% 정상 인간 혈장을 마커 유도용 양성 대조용으로 사용하였다. 플라스크를 37°C, 5% CO₂에서 3-7일간 배양하였다. 조절된 배지를 각 플라스크로부터 수확하고, 소르발(Sorvall) RTH-750 회전기상에서 1000rpm으로 원심분리하여 현탁액 세포를 회수하였다. 펠렛으로 된 세포들을 얼음위에 놓고 상청액을 ELISA를 위해 -80°C로 냉각시켰다. 부착성 세포들을 PBS(2ml)로 씻어서 플라스크로부터 회수하고, 이어서, 필요에 따라, 베르센(versene, 3ml)에서 15분간 배양한다. 베르센 배양 후 플라스크를 깨끗이 하고 플라스크를 최종적으로 PBS(2 ml)로 씻는다. 베르센과 PBS 세척한 것 각각을 조절된 배지 수확물로부터 회수된 세포들과 합친다. 한테 모은 세포 현탁액을 소르발 RTH-750 회전기상에서 1000rpm으로 원심분리하고, 결과의 펠렛을 300ul의 착색 완충액(PBS + 0.1 M EDTA + 2% FBS + 1% HS)에 다시 현탁시키고, V-바닥 96-웰 플레이트내로 100ul/웰 현탁시켰다. 플레이트를 소르발 RTH-750 회전기상에서 2800rpm으로 펄스-원심분리하고, 펠렛화된 세포들을 25 µl/웰로 플루로코롬 표지된 항체내에 다음과 같이 다시 현탁시켰다:(1)쥐 항-MHC I-FITC + 쥐 항-CD38-PE, 및 (2) 아이소타입 대조용, 쥐 IgG-FITC + 쥐 IgG-PE. 플레이트를 빛으로부터 보호하고 얼음상에서 45분간

배양하였다. 세포들을 200 μ l의 착색 완충액을 첨가하여 3번 세척하고 이어서 펄스-원심분리하고 최종적으로 PBS내 2% 파라포름알데히드 200 μ l에 다시 현탁시켰다. 수지상 세포의 착색을 벡톤 디킨슨 FACScalibur™으로 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 분석으로부터 오염된 세포를 제거하기 위해 전방산란(Forward Scatter) 대 측면산란(Side Scatter) 그래프 상에 게이트를 그려넣었다. 3F11 존재 하에서 세포 표면 마커 MHC 클래스 I, CD38, 및 CD123의 정상 발현에 의해 설명된대로, 항-IFNAR-1 인간 모노클론 항체 3F11는 수지상 세포 발달의 IFN 알파 의존 공정을 억제하였다. 그 결과를 아래 표5에 나타내었으며, 이 표에서 (A), 및 (B)는 2개의 대표적인 SLE 공여 시료의 결과를 요약한 것이다.

[0446] 표 5: 수지상 세포 성숙의 억제

[0447] (A)

[0448]

| 배양 조건 | 공여 혈장 #40* (13.3 iU/mL**) | | |
|-------------------|---------------------------|-------|------|
| | MHC 클래스I | CD123 | CD38 |
| | MFI | MFI | MFI |
| 0 IFN/mL | 148 | 14 | 40 |
| 10 IFN/mL | 200 | 19 | 44 |
| 100 IFN/mL | 229 | 26 | 63 |
| 0 | 206 | 22 | 47 |
| 3F11 | 115 | 13 | 32 |
| HulgG1 (아이소타입대조용) | 194 | 22 | 62 |

[0449] (B)

[0450]

| 배양 조건 | 공여 혈장 #59* (75.3 iU/mL**) | | |
|-------------------|---------------------------|-------|------|
| | MHC 클래스I | CD123 | CD38 |
| 0 IFN/mL | 229 | 11 | 58 |
| 10 IFN/mL | 271 | 12 | 86 |
| 100 IFN/mL | 294 | 13 | 112 |
| 0 | 202 | 15 | 62 |
| 3F11 | 112 | 8 | 22 |
| HulgG1 (아이소타입대조용) | 266 | 14 | 55 |

[0451] 실시예 9: 다우디 세포 또는 인간 말초 혈액 단핵 세포에 대한 항-IFNAR-1 인간 항체의 스캐차드(Scatchard) 결합 분석

[0452] 인간 말초 혈액 단핵 세포는 피콜(Ficol) 분리를 사용하여 표준 프로토콜에 의해 신선한 혈액으로부터 제조하였다. 다우디 세포는 ATCC로부터 얻고 10% 태아 소 혈청(FBS)을 포함하는 RPMI에서 배양하였다. 세포를 4도에서 10% FBS를 포함하는 RPMI로 2번 세척하고, 세포를 10% 태아 소 혈청(결합 완충액)을 포함하는 RPMI 배지내에서 4×10^7 세포/ml로 맞추었다. 밀리포어(Millipore) 플레이트(MAFB NOB)에 물내의 1% 무지방 건조 밀크로 피복하고 4°C에서 밤새 저장하였다. 플레이트를 결합 완충액으로 세척하고 결합 완충액내의 표지되지 않은 항체(1000-배 초과) 25 μ l를 밀리포어 96 웰 유리 섬유 필터 플레이트(비-특이적 결합 NSB)내의 대조용 웰에 첨가하였다. 완충액 만 25 μ l를 최대 결합 대조용 웰(총 결합)에 첨가하였다. 결합 완충액내의 ¹²⁵I-항-IFNAR-1 항체 여러 농도 25 μ l 및 다우디 세포 또는 인간 말초 혈액 단핵 세포(4×10^7 세포 ml) 25 μ l를 첨가하였다. 플레이트를 4°C, 교반기상 200RPM에서 2시간동안 배양하였다. 배양완료시, 밀리포어 플레이트를 차거운 결합 완충액 0.2ml로

2번 세척하였다. 필터를 제거하고 감마 계수기로 계수하였다. 프리즘 소프트 웨어(캘리포니아, 샌디에고)로 단일 위치 결합 매개변수를 사용하여 평형 결합의 평가를 행했다.

[0453] 상기한 스캐차드 결합 분석을 사용했을 때, 다우디 세포 및 인간 말초 혈액 단핵 세포에 대한 항체의 K_D 는 각각 약 0.2 nM 및 0.5 nM이었다.

[0454] 서열 목록의 요약

| SEQ ID NO: | 서열 | SEQ ID NO: | 서열 |
|------------|-------------------|------------|-------------------|
| 1 | VH CDR1 a.a. 3F11 | 21 | VK CDR3 a.a. 3F11 |
| 2 | VH CDR1 a.a. 4G5 | 22 | VK CDR3 a.a. 4G5 |
| 3 | VH CDR1 a.a. 11E2 | 23 | VK CDR3 a.a. 11E2 |
| 4 | VH CDR1 a.a. 9D4 | 24 | VK CDR3 a.a. 9D4 |
| | | | |
| 5 | VH CDR2 a.a. 3F11 | 25 | VH a.a. 3F11 |
| 6 | VH CDR2 a.a. 4G5 | 26 | VH a.a. 4G5 |
| 7 | VH CDR2 a.a. 11E2 | 27 | VH a.a. 11E2 |
| 8 | VH CDR2 a.a. 9D4 | 28 | VH a.a. 9D4 |
| | | | |
| 9 | VH CDR3 a.a. 3F11 | 29 | VK a.a. 3F11 |
| 10 | VH CDR3 a.a. 4G5 | 30 | VK a.a. 4G5 |
| 11 | VH CDR3 a.a. 11E2 | 31 | VK a.a. 11E2 |
| 12 | VH CDR3 a.a. 9D4 | 32 | VK a.a. 9D4 |
| | | | |
| 13 | VK CDR1 a.a. 3F11 | 33 | VH n.t. 3F11 |
| 14 | VK CDR1 a.a. 4G5 | 34 | VH n.t. 4G5 |
| 15 | VK CDR1 a.a. 11E2 | 35 | VH n.t. 11E2 |
| 16 | VK CDR1 a.a. 9D4 | 36 | VH n.t. 9D4 |
| | | | |
| 17 | VK CDR2 a.a. 3F11 | 37 | VK n.t. 3F11 |
| 18 | VK CDR2 a.a. 4G5 | 38 | VK n.t. 4G5 |
| 19 | VK CDR2 a.a. 11E2 | 39 | VK n.t. 11E2 |
| 20 | VK CDR2 a.a. 9D4 | 40 | VK n.t. 9D4 |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| 41 | VH 4-34 생식계열 a.a. | | |
| 42 | VH 5-51 생식계열 a.a. | | |
| | | | |
| 43 | VK L18 생식계열 a.a. | | |
| 44 | VK A27 생식계열 a.a. | | |
| | | | |
| | | | |

도면의 간단한 설명

[0372] 도1A는 3F11 인간 모노클론 항체의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 33)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 25)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 5) 및 CDR3(SEQ ID NO: 9)지역이 나타나 있다.

[0373] 도1B는 3F11 인간 모노클론 항체의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 36)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 29)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 17) 및 CDR3(SEQ ID NO: 21)지역이 나타나 있다.

[0374] 도2A는 4G5 인간 모노클론 항체의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 34)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 26)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 2), CDR2 (SEQ ID NO: 6) 및 CDR3(SEQ ID NO: 10)지역이 나타나 있다.

- [0375] 도2B는 4G5 인간 모노클론 항체의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 38)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 30)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ ID NO: 18) 및 CDR3(SEQ ID NO: 22)지역이 나타나 있다.
- [0376] 도3A는 11E2 인간 모노클론 항체의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 35)과 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 27)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 7) 및 CDR3(SEQ ID NO: 11)지역이 나타나 있다.
- [0377] 도3B는 11E2 인간 모노클론 항체의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 39)과 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 31)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 15), CDR2 (SEQ ID NO: 19) 및 CDR3(SEQ ID NO: 23)지역이 나타나 있다.
- [0378] 도4A는 9D4 인간 모노클론 항체의 중 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 37)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 28)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 4), CDR2 (SEQ ID NO: 8) 및 CDR3(SEQ ID NO: 12)지역이 나타나 있다.
- [0379] 도4B는 9D4 인간 모노클론 항체의 경 사슬 가변 지역의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 40)과 아미노산 서열(SEQ ID NO: 32)을 보여준다. CDR1(SEQ ID NO: 16), CDR2 (SEQ ID NO: 20) 및 CDR3(SEQ ID NO: 24)지역이 나타나 있다.
- [0380] 도5는 인간 생식계열 V_H4-34 아미노산 서열(SEQ ID NO: 41)과 3F11의 중 사슬 가변 지역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다.
- [0381] 도6은 인간 생식계열 V_H4-34 아미노산 서열(SEQ ID NO: 41)과 4G5의 중 사슬 가변 지역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다.
- [0382] 도7은 인간 생식계열 V_H5-11 아미노산 서열(SEQ ID NO: 42)과 11E2 및 9D4의 중 사슬 가변 지역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다.
- [0383] 도8은 인간 생식계열 V_KL18 아미노산 서열(SEQ ID NO: 43)과 3F11의 경 사슬 가변 지역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다.
- [0384] 도9는 인간 생식계열 V_KL18 아미노산 서열(SEQ ID NO: 43)과 4G5의 경 사슬 가변 지역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다.
- [0385] 도10은 인간 생식계열 V_KA27 아미노산 서열(SEQ ID NO: 44)과 11E2 및 9D4의 경 사슬 가변 지역의 아미노산 서열의 배열을 보여준다.
- [0386] 도11은 인간 IFNAR-1에 직접 향하는 인간 모노클론 항체 3F11이 IFNAR-1에 결합하는 것에 대해 쥐 모노클론 항체 64G12와 경쟁하지 않는 것을 설명하는 실험결과를 나타내는 그래프이다.

도면

도면1A

항-IFNAR 3F11 VH

V 단편 : 4-34
 D 단편 : 결정되지않음
 J 단편 : JH6b

```

1   Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
    CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCT GAG ACC CTG

                                CDR1
                                -----
55  S L T C A V Y G G S F S G Y F W S W
    TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAT TTC TGG AGC TGG

                                CDR2
                                -----
109 I R Q P P G K G L E W I G E I D H S
    ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC GAT CAC AGT

                                CDR2
                                -----
163 G K T N Y N P S L K S R V T I S V D
    GGA AAG ACC AAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTT ACC ATA TCA GTA GAC

217 T S K N Q V S L K L S S V T A A D T
    ACG TCC AAG AAC CAG GTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                -----
271 A V Y Y C A R E S K Y Y F G L D V W
    GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA AGC AAG TAC TAC TTC GGT TTG GAC GTC TGG

325 G Q G T T V T V T S
    GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC ACC TCA
    
```

도면1B

항-IFNAR 3F11 VK

V 단편 : L18

J 단편 : JK5

```

1   A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
   GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
-----
55  V T I T C R A S Q G I Y S V L A W Y
   GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT TAC AGT GTT TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
-----
109 Q Q K P G K T P K L L I Y D A S R L
   CAG CAG AAA CCA GGG AAA ACT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC CGT TTG

                                CDR2
-----
163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T
   GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
-----
217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

                                CDR3
-----
271 F N S Y I T F G Q G T R L E I K
   TTT AAT AGT TAC ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
    
```

도면2A

항-IFNAR 4G5 VH

V 단편 : 4-34
 D 단편 : 결정되지않음
 J 단편 : JH4b

```

1   Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
    CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
55   S L T C A V Y G G S F S N Y Y W S W
    TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT AAT TAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
109  I R Q P P G K G L E W I G E I I L S
    ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC ATT CTT AGT

                                CDR2
163  G S T N Y N P S L K S R V T I S V D
    GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

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

                                CDR3
271  A V Y Y C A R E S K W G Y Y F D S W
    GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG TCT AAA TGG GGT TAC TAC TTT GAC TCC TGG

325  G Q G T L V T V S S
    GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

도면2B

항-IFNAR 4G5 VK

V 단편 : L18

J 단편 : JK2

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

55 V T I T C R A T Q D I S I A L V W Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA ACT CAG GAC ATT AGC ATT GCT TTA GTC TGG TAT

CDR2

109 Q Q K P G K A P E L L I Y D A S G L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT GAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC GGT TTG

CDR2

163 G S G V P S R F S G S G S G T D F T
GGA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGC ACA GAT TTC ACT

CDR3

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

CDR3

271 F N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

도면3A

항-IFNAR 11E2 VH

V 단편 : 5-51
 D 단편 : 결정되지않음
 J 단편 : JH4b

```

1   E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
    GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                -----
55  K I S C K G S G Y I F T N Y W I A W
    AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ATC TTT ACC AAT TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q M P G K G L E S M G I I Y P G
    GTG CGC CAG ATG CCC GGT AAA GGC CTG GAG TCG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                -----
163 D S D I R Y S P S F Q G Q V T I S A
    GAC TCT GAT ATC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

                                CDR3
                                -----
217 D K S I T T A Y L Q W S S L K A S D
    GAC AAG TCC ATC ACC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGT CTG AAG GCC TCA GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A M Y Y C A R H D I E G F D Y W G
    ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAT GAC ATA GAG GGG TTT GAC TAC TGG GGC

325 R G T L V T V S S
    CGG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

도면3B

항-IFNAR 11E2 VK

V 단편 : A27

J 단편 : JK5

```

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

                                     CDR1
55  A T L S C R A S Q S V S S S F F A W
   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TTC TTC GCC TGG

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

   CDR2
163 R A T G I P D R L S G S G S G T D F
   AGG GCC ACT GCC ATC CCA GAC AGG TTA AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

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

   CDR3
271 Q Y D S S A I T F G Q G T R L E I K
   CAG TAT GAT AGC TCA GCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
    
```

도면4A

항-IFNAR 9D4 VH

V 단편 : 5-51
 D 단편 : 결정되지않음
 J 단편 : JH4b

```

1   E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
    GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                -----
55  K I S C K G S G Y I F T N Y W I A W
    AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ATC TTT ACC AAC TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                -----
109 V R Q M P G K G L E S M G I I Y P G
    GTG CGC CAG ATG CCC GGT AAA GGC CTG GAG TCG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                -----
163 D S D I R Y S P S F Q G Q V T I S A
    GAC TCT GAT ATC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

217 D K S I T T A Y L Q W S S L K A S D
    GAC AAG TCC ATC ACC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGT CTG AAG GCC TCA GAC

                                CDR3
                                -----
271 T A M Y Y C A R H D I E G F D Y W G
    ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAT GAC ATA GAG GGG TTT GAC TAC TGG GGC

325 R G T L V T V S S
    CGG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

도면4B

항-IFNAR 9D4 VK

V 단편 : A27

J 단편 : JK5

```

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

                                     CDR1
55   A T L S C R A S Q S V S S S F F A W
   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TTC TTC GCC TGG

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

   CDR2
163  R A T G I P D R L S G S G S G T D F
   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTA AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

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

   CDR3
271  Q Y D S S A I T F G Q G T R L E I K
   CAG TAT GAT AGC TCA GCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
    
```

도면5

항-IFNAR 3F11 VH 지역

```

                                     CDR1
4-34 생식계열:  Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G
G S F S G Y Y W S W I R Q P
3F11 VH:      - - - - -
- - - - - F - - - - -
    
```

```

                                     CDR2
4-34 생식계열:  P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R
V T I S V D T S K N Q F S L
3F11 VH:      - - - - - D - - - K - - - - -
- - - - - V - - -
    
```

```

                                     CDR3
4-34 생식계열:  K L S S V T A A D T A V Y Y C A R
3F11 VH:      - - - - - E S K Y Y F G L D
V W G Q G T T V T V T S
    
```

도면6

항-IFNAR 4G5 VH 지역

4-34 생식계열: Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G ^{CDR1}
 G S F S G Y Y W S W I R Q P
4G5 VH: - - - - -
 - - - - N - - - - -

4-34 생식계열: P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R ^{CDR2}
 V T I S V D T S K N Q F S L
4G5 VH: - - - - - I L - - - - -
 - - - - -

4-34 생식계열: K L S S V T A A D T A V Y Y C A R ^{CDR3}
4G5 VH: N - T - - - - - E S K W G Y Y F D
 S W G Q G T L V T V S S

도면7

항-IFNAR 11E2 및 9D4 VH 지역

5-51 생식계열: E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G ^{CDR1}
 Y S F T S Y W I G W V R Q M P
11E2 VH: - - - - -
 - I - - N - - A - - - - -
9D4 VH: - - - - -
 - I - - N - - A - - - - -

5-51 생식계열: G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q ^{CDR2}
 V T I S A D K S I S T A Y L Q
11E2 VH: - - - - S - - - - I - - - - -
 - - - - T - - - - -
9D4 VH: - - - - S - - - - I - - - - -
 - - - - T - - - - -

5-51 생식계열: W S S L K A S D T A M Y Y C A R ^{CDR3}
11E2 VH: - - - - - H D I E G F D Y W G
 R G T L V T V S S
9D4 VH: - - - - -
 - - - - -

도면8

항-IFNAR 3F11 VK 지역

CDR1

L18 생식계열: A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
 A S Q G I S S A L A W Y
3F11 VK: - - - - -
 - - - - - Y - V - - - - -

CDR2

L18 생식계열: Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S
 R F S G S G S G T D F T
3F11 VK: - - - - - T - - - - - R - - - - -
 - - - - -

CDR3

L18 생식계열: L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P
3F11 VK: - - - - - I T
 F G Q G T R L E I K

도면9

항-IFNAR 4G5 VK 지역

CDR1

L18 생식계열: A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S
 Q G I S S A L A W Y Q Q K P
4G5 VK: - - - - - T
 - D - - I - - V - - - - -

CDR2

L18 생식계열: G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G
 S G T D F T L T I S S L Q P
4G5 VK: - - - - - E - - - - - G - G - - - - -
 - - - - -

CDR3

L18 생식계열: E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P
4G5 VK: - - - - - Y T F G Q G T K L E I
 K

도면10

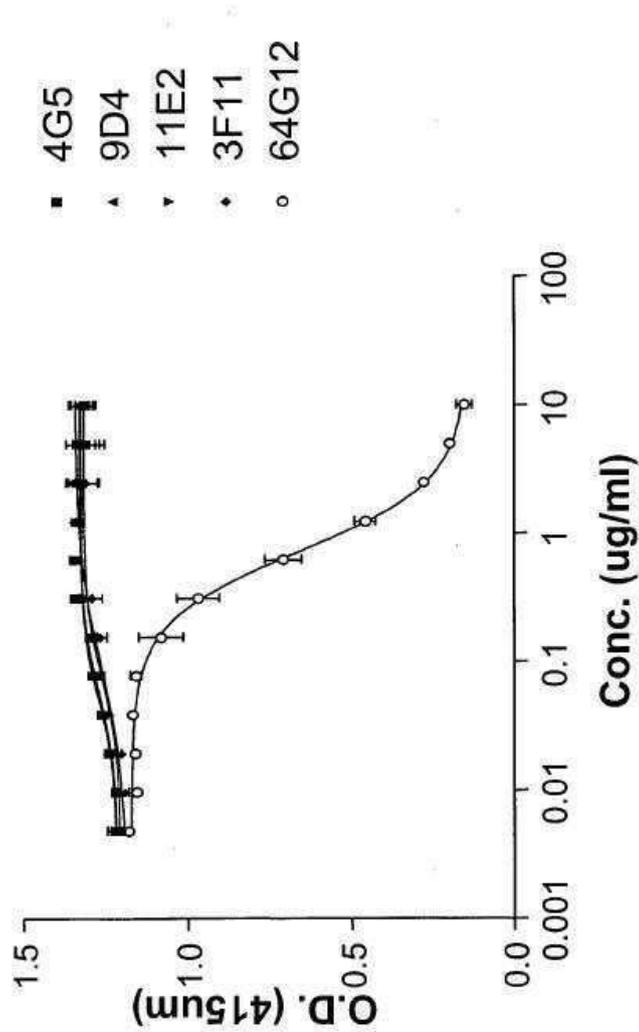
항-IFNAR 11E2 및 9D4 VK 지역

A27 생식계열: E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S ^{CDR1}
 Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P
 11E2 VK: - - - - - F F - - - - -
 9D4 VK: - - - - - F F - - - - -

A27 생식계열: G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G ^{CDR2}
 S G T D F T L T I S R L E P E
 11E2 VK: - - - - - T - - - - - L - - - - -
 9D4 VK: - - - - - T - - - - - L - - - - -

A27 생식계열: D F A V Y Y C Q Q Y G S S P ^{CDR3}
 11E2 VK: - - - - - D - - A I T F G Q G T R L E I K
 9D4 VK: - - - - - D - - A - - - - -

도면11



서열목록

<110> Cardarelli, Josephine M.
 Witte, Alison
 Srinivasan, Mohan

<120> INTERFERON ALPHA RECEPTOR 1 ANTIBODIES AND THEIR

<130> 04280/1201494-US1

<140> 11/157,494

<141> 2005-06-20

<150> 60/581,747

<151> 2004-06-21

<160> 44

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Tyr Phe Trp Ser
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Glu Ile Asp His Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Glu Ile Ile Leu Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Glu Ser Lys Tyr Tyr Phe Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Glu Ser Lys Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 His Asp Ile Glu Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 His Asp Ile Glu Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 13

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Val Leu Ala
 1 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Arg Ala Thr Gln Asp Ile Ser Ile Ala Leu Val
 1 5 10

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Phe Ala
 1 5 10

<210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Phe Ala
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Asp Ala Ser Arg Leu Glu Ser

1 5

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Asp Ala Ser Gly Leu Gly Ser
 1 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Ile Thr
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Ala Ile Thr
 1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Ala Ile Thr
 1 5

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Asp Ile Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Asp Ile Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 29
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 30

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 31
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 32
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttctgagac cctgtccctc 60

 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttatttct ggagctggat ccgccagccc 120

 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcgatcaca gtgaaagac caactacaat 180

 ccgtccctca agagtcagtg taccatatca gtagacacgt ccaagaacca ggtctccctg 240

 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaaagcaag 300

 tactacttcg gtttggagct ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtcac ctca 354

<210> 34
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt aattactact ggagctggat ccgccagccc 120

 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcattctta gtggaagcac caactacaac 180

 ccgtccctca agagtcagtg caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

 aacctgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agagtctaaa 300

 tggggttact accttgactc ctggggccag ggaacctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 35
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 gaggtgcagc tggatgagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tctgtgaagg gtcttgata catctttacc aattactgga tcgctgggt gcgccagatg 120
 cccggtaaag gcctggagtc gatggggatc atctatctg gtgactctga taccagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcac caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagtctgaa ggcctcagac accgcatgt attactgtgc gagacatgac 300
 atagaggggt ttgactactg gggccgggga accctgtca ccgtctctc a 351

<210> 36
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 gccatccagt tgaccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcg gggcaagtca gggcatttac agtgttttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaaactc ctaagctcct gatctatgat gcctcccgtt tggaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatcttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acatcacctt cggccaaggg 300
 acacgactgg agattaaa 318

<210> 37
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 gaggtgcagc tggatgagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tctgtgaagg gtcttgata catctttacc aactactgga tcgctgggt gcgccagatg 120
 cccggtaaag gcctggagtc gatggggatc atctatctg gtgactctga taccagatac 180

agccccctct tccaaggcca ggteaccatc tcagccgaca agtccatcac caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagtctgaa ggcctcagac accgcatgt attactgtgc gagacatgac 300
 atagaggggt ttgactactg gggccgggga accctgtca ccgtctctc a 351

<210> 38
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaactca ggacattagc attgctttag tctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctgagctcct gatctatgat gcctccggtt tgggaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag ttaaatagtt acccgtacac ttttgccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 39
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctctgca gggccagtc agtggttagc agcagcttct tgccttgta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca 180
 gacaggttaa gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcac cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata gctcagcagat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 40
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccagggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagcttct tcgcctggtg ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggt cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggtaa gtggcagtggt gctctgggaca gacttcactc tcaccatcac cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgata gctcagcgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 41
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

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

85

90

95

Arg

<210> 42
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 43
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala

20 25 30

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

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

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

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

<210> 44
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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