



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년03월24일
(11) 등록번호 10-0890088
(24) 등록일자 2009년03월16일

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2003-7010590
(22) 출원일자 2003년08월12일
심사청구일자 2007년02월06일
번역문제출일자 2003년08월12일
(65) 공개번호 10-2004-0062873
(43) 공개일자 2004년07월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/004024
국제출원일자 2002년02월11일
(87) 국제공개번호 WO 2002/64634
국제공개일자 2002년08월22일
(30) 우선권주장
60/268,075 2001년02월12일 미국(US)
60/338,956 2001년11월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W0200109186 A1
US6018031 B1

(73) 특허권자
메다렉스, 인코포레이티드
미국 08540-1437 뉴저지주 프린스턴 스테이트 로드 707
(72) 발명자
허드슨, 데브라
미국94550캘리포니아주리버모어투스카니서클2380
반디원클, 잔
네덜란드엔엘-3707씨케이자이스트베르렌데슬로틀란80
반디크, 마르쿠스, 에이.
네덜란드엔엘-3722지케이취빌토벤가아일란16
(74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 60 항

심사관 : 김지윤

(54) Fc 알파 수용체 (CD89) 에 대한 인간 모노클로날 항체

(57) 요약

본 발명은 인간 이펙터 세포의 IgA에 대한 Fc 수용체에 특이적으로 반응하는 모노클로날 항체를 비롯하여, Fc 알파 수용체 (CD89)에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 개시하였다. 결합제 (예를 들면, 항체)는 표적 세포 (예를 들면, 암 세포, 감염성 제제 등)에 대해 인간 이펙터 세포 (예를 들면, 대식세포)를 표적화하는데에 유용하다. 이러한 목적으로, 이중기능적 항체 또는 이중항체는 항-Fc-알파 수용체 항체로부터 유래한 결합 영역 및 표적-특이적 항체의 결합 영역을 갖도록 구성될 수 있다. 표적화된 이펙터 세포는 표적 세포를 특이적으로 용해시킬 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서

- (a) 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 2의 아미노산 잔기 99-108, 서열 6의 아미노산 잔기 99-108 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;
 - (b) 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 4의 아미노산 잔기 89-97, 서열 8의 아미노산 잔기 90-99 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;
 - (c) 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열 2의 아미노산 잔기 50-66, 서열 6의 아미노산 잔기 50-66 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;
 - (d) 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열 4의 아미노산 잔기 50-56, 서열 8의 아미노산 잔기 51-57 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;
 - (e) 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열 2의 아미노산 잔기 30-35, 서열 6의 아미노산 잔기 31-35 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;
 - (f) 경쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열 4의 아미노산 잔기 24-34, 서열 8의 아미노산 잔기 24-35 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인,
- 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

- (i) 각각 서열 2의 아미노산 잔기 30-35, 아미노산 잔기 50-66 및 아미노산 잔기 99-108을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
 - (ii) 각각 서열 4의 아미노산 잔기 24-34, 아미노산 잔기 50-56 및 아미노산 잔기 89-97을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 5

- (i) 각각 서열 6의 아미노산 잔기 31-35, 아미노산 잔기 50-66 및 아미노산 잔기 99-108을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
 - (ii) 각각 서열 8의 아미노산 잔기 24-35, 아미노산 잔기 51-57 및 아미노산 잔기 90-99를 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 6

중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서

- (a) 중쇄 가변 영역은 서열 2에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 서열 변이체를 포함하고;
- (b) 경쇄 가변 영역은 서열 4에 나타난 아미노산 서열 또는 이의 보존적 서열 변이체를 포함하는 것인,

인간 CD89에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 7

중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서

- (a) 중쇄 가변 영역은 서열 6에 나타낸 아미노산 서열 또는 이의 보존적 서열 변이체를 포함하고;
 - (b) 경쇄 가변 영역은 서열 8에 나타낸 아미노산 서열 또는 이의 보존적 서열 변이체를 포함하는 것인,
- 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 8

각각 서열 2 및 서열 4에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 9

각각 서열 6 및 서열 8에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 10

제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 Fab 단편 또는 단일쇄 항체인 항체.

청구항 11

제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 10^8 M^{-1} 이상의 친화도 상수로 인간 CD89에 결합하는 것인 항체.

청구항 12

제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 10^9 M^{-1} 이상의 친화도 상수로 인간 CD89에 결합하는 것인 항체.

청구항 13

제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 중쇄가 IgG1 중쇄이고 항체 경쇄가 카파 경쇄인 항체.

청구항 14

제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 인간 생식세포주 (germline) V_H 3-30.3 유전자로부터 유래한 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 인간 생식세포주 V_K L18 또는 V_K A27 유전자로부터 유래한 경쇄 가변 영역

을 포함하는 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역이 인간 생식세포주 V_K L18 유전자로부터 유래한 것인 항체.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 경쇄 가변 영역이 인간 생식세포주 V_K A27 유전자로부터 유래한 것인 항체.

청구항 19

인간 중쇄 트랜스진 (transgene) 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 가진 인간 이외의 트랜스제닉 동물로부터 얻어 무한증식 세포와 융합시킨 B 세포를 포함하며, 제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 검출가능한 양으로 생산하는 하이브리도마.

청구항 20

인간 중쇄 및 인간 경쇄를 코딩하는 핵산을 포함하며, 제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 검출가능한 양으로 생산하는 트랜스펙토마 (transfectoma).

청구항 21

인간 중쇄 트랜스진 또는 트랜스염색체 및 인간 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는, 제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 트랜스제닉 세포.

청구항 22

인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 인간 이외의 트랜스제닉 동물을 인간 CD89 또는 인간 CD89를 발현하는 세포로 면역화시켜, 상기 동물의 B 세포에 의해 항체가 생산되도록 하는 단계;

상기 동물의 B 세포를 분리하는 단계;

상기 B 세포를 골수종 세포와 융합하여, CD89에 특이적인 인간 모노클로날 항체를 분비하는 무한증식 하이브리도마 세포를 형성하는 단계; 및

상기 하이브리도마의 배양 상층액으로부터 CD89에 특이적인 인간 모노클로날 항체를 분리하는 단계

를 포함하는, 제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 생산하는 방법.

청구항 23

제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분, 및 CD89 이외의 표적 항원에 결합하는 부분을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 항체가 Fab 단편 또는 단일쇄 항체인 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 25

제23항에 있어서, 표적 항원이 종양 항원인 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 26

제23항에 있어서, 표적 항원에 결합하는 부분이 항체 또는 종양 리간드를 포함하는 것인 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 27

제23항에 있어서, 융합 단백질을 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 28

제23항에 있어서, 화학적으로 연결된 집합체 (conjugate)를 포함하는 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 29

제23항에 있어서, CD89를 발현하는 이펙터 (effector) 세포의 존재하에 표적 항원을 발현하는 세포의 용해

(ADCC)를 유도하는 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 30

제23항에 있어서, 상기 표적 항원이 암종배아성 항원 (CEA), 가스트린-방출 펩티드 (GRP) 수용체 항원, 뮤신 (mucine) 항원, 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R), HER2/*neu*, HER3, HER4, CD20, CD30, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원 및 TAG 72로 구성된 군으로부터 선택된 것인 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 31

제26항에 있어서, 종양 리간드가 EGF, 붐베신, 가스트린-방출 펩티드 (GRP), 리토린, 뉴로메딘 B 또는 뉴로메딘 C로 구성된 군으로부터 선택된 것인 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 32

제26항에 있어서, 종양 리간드가 EGF인 이중특이적 또는 다중특이적 분자.

청구항 33

항원에 연결된, 제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하는 분자 접합체.

청구항 34

제33항에 있어서, 항체가 Fab 단편 또는 단일쇄 항체인 분자 접합체.

청구항 35

제33항에 있어서, 융합 단백질을 포함하는 분자 접합체.

청구항 36

제33항에 있어서, 화학적으로 연결된 접합체를 포함하는 분자 접합체.

청구항 37

제33항에 있어서, 항원이 병원체 성분이거나, 또는 종양 항원 또는 자가항원을 포함하는 것인 분자 접합체.

청구항 38

제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 39

삭제

청구항 40

제23항의 이중특이적 또는 다중특이적 분자, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 41

제33항의 분자 접합체, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 42

제1항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 2종 이상 조합하여 포함하며, 여기서 상기 항체 각각이 인간 CD89의 별개의 에피토프에 결합하는 것인 조성물.

청구항 43

제40항에 있어서, 세포독성제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 44

세포독성제에 연결된, 제1항의 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하는 면역독소 (immunotoxin).

청구항 45

유효량의 제23항의 이중특이적 분자 또는 다중특이적 분자를 포함하며, 상기 이중특이적 분자 또는 다중특이적 분자가 세포 상의 항원에 결합하는 부분을 포함하는 것인, 자가면역 장애, 암 또는 병원성 감염을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 항원이 종양 항원인 제약 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 종양 항원이 난소암, 유방암, 고환암, 전립선암, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 암의 군으로부터 선택된 암 세포에서 유래한 것인 제약 조성물.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 항원이 자가항원인 제약 조성물.

청구항 49

제45항에 있어서, 상기 항원이 미생물로부터 유래한 것인 제약 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 미생물이 박테리아, 바이러스 및 기생생물로 구성된 군으로부터 선택된 것인 제약 조성물.

청구항 51

유효량의 제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하며, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 IgA가 CD89에 결합하는 것을 차단하지 않는 것인, 자가면역 장애, 암 또는 병원성 감염을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

항체와 CD89가 복합체를 형성할 수 있는 조건 하에서 샘플을 제1항 및 제4항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 단계; 및

상기 복합체 형성을 검출하는 단계

를 포함하는, 샘플 중에서 CD89의 존재 또는 CD89를 발현하는 세포의 존재를 검출하는 방법.

청구항 55

인간 CD89에 결합하는 모노클로날 항체의 중쇄, 경쇄 또는 중쇄 및 경쇄 둘다의 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서 중쇄 뉴클레오타이드 서열은 서열 1 및 서열 5로 구성된 군으로부터 선택된 것이고, 경쇄 뉴클레오타이드 서열은 서열 3 및 서열 7로 구성된 군으로부터 선택된 것인 발현 벡터.

청구항 56

서열 2의 아미노산 잔기 99-108, 서열 6의 아미노산 잔기 99-108 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지며, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체의 일부를 구성하는 중쇄 가변 영역 CDR3.

청구항 57

서열 4의 아미노산 잔기 89-97, 서열 8의 아미노산 잔기 90-99 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지며, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체의 일부를 구성하는 경쇄 가변 영역 CDR3.

청구항 58

서열 2의 아미노산 잔기 50-66, 서열 6의 아미노산 잔기 50-66 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지며, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체의 일부를 구성하는 중쇄 가변 영역 CDR2.

청구항 59

서열 4의 아미노산 잔기 50-56, 서열 8의 아미노산 잔기 51-57 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지며, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체의 일부를 구성하는 경쇄 가변 영역 CDR2.

청구항 60

서열 2의 아미노산 잔기 30-35, 서열 6의 아미노산 잔기 31-35 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지며, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체의 일부를 구성하는 중쇄 가변 영역 CDR1.

청구항 61

서열 4의 아미노산 잔기 24-34, 서열 8의 아미노산 잔기 24-35 및 이들의 보존적 서열 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지며, 인간 CD89에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체의 일부를 구성하는 경쇄 가변 영역 CDR1.

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

유효량의 제33항의 분자 접합체를 포함하며, 상기 분자 접합체가 세포 상의 항원에 결합하는 부분을 포함하는 것인, 자가면역 장애, 암 또는 병원성 감염을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 항원이 종양 항원인 제약 조성물.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 종양 항원이 난소암, 유방암, 고환암, 전립선암, 백혈병 및 림프종으로 이루어진 암의 군으로부터 선택된 암 세포에서 유래한 것인 제약 조성물.

청구항 67

제64항에 있어서, 상기 항원이 자가항원인 제약 조성물.

청구항 68

제64항에 있어서, 상기 항원이 미생물로부터 유래한 것인 제약 조성물.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 미생물이 박테리아, 바이러스 및 기생생물로 구성된 군으로부터 선택된 것인 제약 조성물.

명세서

<1> 관련 출원

<2> 본 출원은, 이 거명을 통해 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된 미국 가출원 번호 제60/268,075호 (2001년 2월 12일 출원) 및 미국 가출원 번호 제60/338,956호 (2001년 11월 5일 출원)를 우선권으로 주장한다

배경 기술

- <3> 면역글로블린의 Fc 부분에 대한 수용체는 단핵구, 대식세포 및 다형핵 세포의 많은 방어적 기능을 촉발하는 데 중요하다. 이들 세포 상의 IgG에 대한 수용체 (Fc γ 수용체 또는 Fc γ R)들은 광범위하게 연구되었으며, 이들 수용체에 대한 모노클로날 항체를 발생시켜 이것이 치료적으로 유효하다는 것을 밝혀졌다 (예를 들면, 발명의 명칭이 "인간 단핵구 식세포 상의 면역글로블린 G의 Fc 수용체에 대한 모노클로날 항체 (Monoclonal Antibodies to Fc Receptor for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytes)"인 유럽 특허 제255 249호 참조).
- <4> 또한, IgA 수용체 (Fc α 수용체 또는 CD89)는 이펙터 (effector) 세포의 기능을 증진시킬 수 있다. 리간드가 CD89에 결합하면 백혈구 및 CD89-보유 세포주의 식세포작용 (phagocytosis)과 항체-매개성 세포독성작용이 촉발된다. 또한, CD89는 이펙터 세포 상의 IgG에 대한 수용체와 협력하여 표적 세포에 대한 식세포작용을 강화시킬 수 있다.
- <5> CD89는 인체 중 가장 풍부한 Ig인 IgA의 Fc 부분과 결합하는 수용체이다 (Kerr, M. A. 1990, Biochem. J. 271: 285-296). CD89는 주로 다형핵 백혈구 (PMN), 단핵구, 대식세포, 호중구 및 호산구를 비롯한 세포독성 면역 이펙터 세포상에서 항상 발현된다 (Morton, H. C., et al., 1996, Critical Reviews in Immunology 16: 423). 또한, CD89가 림프구 아개체군 상에서 발현 (Morton, H. C., et al., 1996, Critical Reviews in Immunology 16: 423)되고, 사구체 혈관사이 세포 (mesangial cell) 상에서도 발현 (Gomez-Guerrero, C., et al., 1996, J. Immunol. 156: 4369-4376)되는 것이 보고되었다. 더욱이, 단핵구 및 PMN 상에서 CD89의 발현은 TNF- α (Gesl, A., et al., 1994, Scad. J. Immunol. 39: 151-156; Hostoffer, R. W., et al., 1994, The J. Infectious Diseases 170: 82-87), IL-1, GM-CSF, LPS 또는 포볼 (phorbol) 에스테르 (Shen L., et al., J. Immunol. 152: 4080-4086; Schiller, C. A. et al., 1994, Immunology, 81: 598-604)에 의해 증가될 수 있는 반면에, IFN- γ 및 TGF- β 1은 Fc α RI의 발현을 감소시킨다 (Reterink, T. J. F., et al., 1996, Clin. Exp. Immunol. 103: 161-166).
- <6> 인간 CD89의 α -쇄는 많이 글리코실화되어 있고, IgG 및 IgE에 대한 수용체도 포함하는 Ig 슈퍼-유전자 군에 속하는 타입 I 막형단 분자이다. 19번 염색체 상에 위치한 1개의 유전자는 Fc α RI 알파쇄의, 다양하게 스플라이싱 (splicing)된 다수의 이소타입들을 코딩한다 (55 내지 110 kDa; Morton, H. C., et al., 1996, Critical Reviews in Immunology 16: 423). 골수세포성 CD89는, CD89 신호 전달에 역할을 하는 FcR γ -쇄와 연관되어 있는 것으로 밝혀졌다 (Morton, H. C. et al. 1995, J. Biol. Chem. 270: 29781; Pfefferkorn, L. C., et al. 1995, J. Immunol. 153: 3228-3236; Saito, K. et al., 1995, J. Allergy Clin. Immunol. 96: 1152).
- <7> CD89는 항원이 결합된 IgA1 및 IgA2, 및 모노머성 IgA1 및 IgA2에 모두 결합하며 (Mazangera, R. L. et al., 1990, Biochem. J. 272: 159-165), 이것은 Fc γ R 및 Fc ϵ RI이 각각 IgG 및 IgE로 포화되는 것과 같은 동일한 방법으로 생체내에서 상기 수용체가 모노머성 IgA 항원으로 포화되어 있는 것과 일치한다. 골수 이펙터 세포 상의 CD89와, 중합성 IgA, IgA 면역 복합체, 또는 리간드 결합 도메인 내부 또는 외부의 에피토프에 대해 특이적인 mAb의 교차 결합은 탈과립화, 과산화물 방출, 염증성 사이토카인의 분비, 내포작용 (endocytosis) 및 식세포작용을 자극한다 (Patty, C., A. Herbelin, A. Lihuen, J. F. Bach, and R. C. Monteiro, 1995, Immunology 86: 1-5; Stewart, W. W., R. L. Maz Yegera, L. Shen, and M. A. Kerr, 1994, J. Leucocyte Biology 56: 481-487; Stewart, W. W., and M. A. Kerr, 1990, Immunology 71: 328-334; Shen, L., 1992, J. Leukocyte

Biology 51: 373-378). CD89에 의해 촉발된 이러한 생리학적 반응은 점막 표면 상에서 제1선의 체액성 방어에 중요할 수 있다 (Morton, H. C., M. van Egmond, and J. G. J. van de Winkel, 1996, Critical Reviews in Immunology 16: 423).

<8> 발명의 개요

- <9> 본 발명은 세포독성 촉발 분자인 인간 CD89의 치료능을 이용하기 위한 향상된 면역치료제를 제공한다. 구체적으로는, 본 발명은 인간 CD89에 결합하는 단리된 인간 모노클로날 항체 뿐만 아니라, 이러한 항체를 함유하는 치료용 조성물, 이중특이적 항체 및 분자 복합체를 제공한다.
- <10> 본 발명의 구체적인 실시양태에서, 상기 항체는 IgA에 의해 저해받지 않는다 (예를 들면, 이 항체는 CD89 상에서 IgA 결합 부위와는 다른 부위에 결합함). 다른 실시양태에서, 상기 항체는 IgA가 CD89에 결합하는 것을 저해한다 (예를 들면, 이 항체는 CD89 상에서 IgA의 결합 부위 안에 있거나 또는 그 근처 부위에 결합함).
- <11> 본 발명의 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 항체는 생체내 보체를 활성화시키지 않는 추가의 이점을 갖고 있으며 (예를 들면, 보체-매개성 표적 세포 용해를 유도하지 않음), 이것은 처치 동안의 불리한 부작용을 감소시킨다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 식세포작용 또는 과산화물 음이온 방출과 같은, 1종 이상의 Fc 수용체-매개성 이펙터 세포 활성을 촉발한다.
- <12> 본 발명의 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 항체는 IgG1 (예를 들면, IgG1 κ) 항체 (예를 들면, IgG1 중쇄 및 카파 경쇄를 지닌 항체)이다. 또한, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD 및 IgE를 비롯한 다른 이소타입 항체들도 본 발명에 포함된다. 이들 항체는 완전한 항체이거나, 또는 Fab, F(ab')₂, Fv 및 Fv 쇄 단편을 비롯한 항체의 항원-결합 단편일 수 있다.
- <13> 본 발명의 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 항체는 가변 영역에 서열 1 또는 5, 및 서열 3 또는 7에 각각 나타난 뉴클레오티드 서열 및 그의 보존적 서열 변이체를 포함하는, 인간 IgG 중쇄 및 인간 카파 경쇄의 핵산에 의해 코딩된다. 다른 실시양태에서, 인간 항체에는 서열 2 또는 6, 및 서열 4 또는 8에 각각 나타난 아미노산 서열 및 그의 보존적 서열 변이체를 포함하는, IgG 중쇄 및 카파 경쇄의 가변 영역이 포함된다.
- <14> 본 발명의 구체적인 항체에는, 예를 들면 인간 모노클로날 항체 (mAb) 14.1, 7.4 및 8.2 (각각 14A8, 7F12 및 8D2로도 명명됨), 또는 항체 14.1, 7.4 또는 8.2가 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에 결합 (예를 들면, 서로 경쟁함)하거나, 상기 항체들과 동일한 기능적 결합 특성을 갖는 항체가 포함된다.
- <15> 본 발명의 인간 항체는 숙주 세포 (예를 들면, CHO 세포 또는 림프구성 세포) 내에서 재조합으로 생산되거나, 또는 상기 항체를 발현하는 하이브리도마 (hybridoma) (즉, 상기 항체를 코딩하는 인간 중쇄 트랜스젠 (transgene) 및 인간 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 가진 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)로부터 수득하여 무한증식 세포와 융합시킨 B 세포를 비롯한 하이브리도마)로부터 직접 얻을 수 있다.
- <16> 본 발명의 다른 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 인간 항체는 1개 이상의 하기 성질에 의해 특성화될 수 있다:
- <17> (a) 인간 CD89에 대한 결합 특이성;
- <18> (b) 인간 CD89에 대한 결합 평형 결합 상수 (K_a)가 약 10^7 M^{-1} 이상임;
- <19> (c) 인간 CD89로부터의 해리 상수 (K_d)가 약 10^{-8} s^{-1} 이하임;
- <20> (c) 생체내에서 CD89에 결합시 보체를 활성화시키지 않음;
- <21> (d) 항체가 인간 CD89에 대한 인간 IgA 결합을 저해하지 않고, 인간 CD89 상의 부위에 결합함;
- <22> (e) 항체가, 서열 2 및 서열 6으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 및 그의 보존적 서열 변이체를 포함하는 중쇄, 및 서열 4 및 서열 8로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 및 그의 보존적 서열 변이체를 포함하는 경쇄를 포함함.
- <23> 다른 측면에 있어서, 본 발명은 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 또한, 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 포함한 재조합 발현 벡터 (예를 들면, mAb 14.1, 7.4 또는 8.2의 경쇄 및 중쇄 가변 영역과 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터) 및 이러한 벡터

로 형질감염된 숙주 세포는, 이러한 숙주 세포를 배양함으로써 본 발명의 항체를 생산하는 방법으로서 본 발명에 포함된다.

<24> 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)로부터 수득한 단리된 B 세포를 제공하며, 이것은 본 발명의 인간 항-CD89 항체를 발현한다. 바람직하게는, 상기 단리된 B 세포는 정제된 CD89 항원 제제 또는 CD89 항원이 풍부한 제제, 및(또는) CD89를 발현하는 세포로 면역화된 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)로부터 수득한다. 바람직하게는, 상기 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)은 본 발명 항체의 전부 또는 일부를 코딩하는 인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는다. 그 후, 단리된 B 세포는 무한증식능을 보유하게 되어 인간 항-CD89 항체의 공급원 (예를 들면, 하이브리도마)이 된다.

<25> 따라서 본 발명은 또한, CD89에 특이적으로 결합하는 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마를 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 하이브리도마에는, 본 발명 항체의 전부 또는 일부를 코딩하는 인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 가진 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)로부터 수득하여 무한증식 세포와 융합시킨 B 세포가 포함된다. 본 발명의 구체적인 하이브리도마에는 14.1, 7.4 및 8.2가 포함된다.

<26> 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 트랜스제닉 마우스 (본원에서는 "HuMab"로도 명명함)와 같이, 인간 이외의 트랜스제닉 동물을 제공하며, 이것은 CD89에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 발현한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 인간 이외의 트랜스제닉 동물은 본 발명 항체의 전부 또는 일부를 코딩하는 인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 가진 트랜스제닉 마우스이다. 상기 인간 이외의 트랜스제닉 동물은 정제된 CD89 항원 제제 또는 CD89 항원이 풍부한 제제, 및(또는) CD89를 발현하는 세포로 면역화될 수 있다. 바람직하게는, 상기 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)은 V-D-J 재조합 및 이소타입 전환 (switching)에 의해 CD89에 대한 다수의 인간 모노클로날 항체 이소타입 (예를 들면, IgG, IgA 및(또는) IgM)을 생산할 수 있다. 이소타입 전환은, 예를 들면 고전적인 (classical) 또는 비-고전적인 (non-classical) 이소타입 전환으로 발생할 수 있다.

<27> 다른 측면에 있어서, 본 발명은 CD89와 특이적으로 반응하는 인간 모노클로날 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법에는 본 발명 항체의 전부 또는 일부를 코딩하는 인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 가진 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)을 정제된 CD89 항원 제제 또는 CD89 항원이 풍부한 제제, 및(또는) CD89를 발현하는 세포로 면역화하는 것이 포함된다. 그 후, 상기 동물의 B 세포 (예를 들면, 비장 B 세포)를 수득하고, 골수종 세포와 융합시켜, CD89에 대한 인간 모노클로날 항체를 분비하는 무한증식 하이브리도마 세포를 만든다.

<28> 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 인간 항-CD89 항체는 유도체화되거나, 다른 펩티드 또는 단백질 (예를 들면, 항체, 또는 Fab' 단편과 같은 항체 단편)과 같은 다른 기능적 분자에 연결되거나, 또는 이들 분자와 함께 발현된다. 예를 들면, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 부분은 (예를 들면, 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 생산하기 위한) 다른 항체, 세포독소, 세포의 리간드 또는 항원과 같은 1종 이상의 다른 분자와 기능적으로 (예를 들면 화학 커플링, 유전자 융합, 비공유결합 등에 의해) 연결될 수 있다. 본 발명의 이중특이적 항체 및 다중특이적 항체는, 예를 들면 중앙 세포 상의 에피토프, 자가항체 생산 세포, 병원균 감염 세포 또는 다른 모든 바람직하지 않은 세포와 같은 항원을 선별하기 위해 CD89 발현 세포 (예를 들면, 이펙터 세포)를 표적화하는데 유용하며, 이것에 의하여 상기 항원과 관련되어 있는 세포 또는 병원균의 세포용해 (cytolysis) 또는 식세포작용이 발생한다. 다른 표적 항원에는 가용성 항원, 또는 항원과 미생물 (예를 들면, 바이러스, 기생생물 및 박테리아)의 복합체가 포함된다.

<29> 또한, 본 발명의 다중특이적 분자에는 삼중특이적, 사중특이적 및 다른 다중특이적 분자가 포함된다. 한 실시양태에서, 다중특이적 분자에는 항-강화 인자 (enhancement factor, EF) 부분, 예를 들면 세포독성 활성화에 관여하는 표면 단백질에 결합하는 분자가 포함된다.

<30> 따라서, 본 발명은 매우 다양한 항체 접합체 (conjugates), 이중- 및 다중특이적 분자 및 융합 단백질을 포함하며, 이들은 CD89 발현 세포에 결합하여 다른 분자를 이 세포로 표적화시키거나, 또는 CD89에 결합하여 다른 분자를 또 다른 분자 또는 세포로 표적화시킨다.

<31> 다른 측면에 있어서, 본 발명은 치료적 부분 (예를 들면, 세포독성제, 효소적으로 활성인 독소 또는 그의 단편, 방사성 동위원소, 또는 소분자 항암제)에 연결된, 본 발명의 인간 항-CD89 항체를 포함하는 접합체를 제공한다.

- <32> 별법으로, 본 발명의 항체는 상기 치료제 및 세포독성제에 연결되어 있지 않으면서 이들과 함께 투여될 수 있다. 상기 항체는 이러한 제제와 동시에 (예를 들면, 단일 조성물 내에서 또는 개별적으로) 투여되거나, 또는 상기 제제 투여 이전 또는 이후에 투여될 수 있다. 이러한 제제에는 G-CSF, GM-CSF, IL-2 또는 IFN-알파와 같은 사이토카인, 및 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 술페이트, 카르무스틴, 클로람부실, 및 시클로포스파미드 히드록시우레아와 같은 화학요법제가 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 인간 항체는 방사선 요법과 함께 투여될 수도 있다.
- <33> 다른 측면에 있어서, 본 발명은 제약상 허용가능한 담체, 및 CD89에 특이적으로 결합하는 본 발명의 1종 이상의 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 포함하는 조성물 (예를 들면, 제약 및 진단용 조성물/키트) 을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 조성물은 인간 항체들 또는 그의 항원-결합 부분들의 조합을 포함하며, 바람직하게는 이들 각각은 별개의 에피토프에 결합한다. 본 발명의 1종 이상의 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항원-결합 부분들의 조합을 포함하는 조성물 (예를 들면, 제약 조성물), 및 본 발명의 1종 이상의 이중특이적 또는 다중특이적 분자들 또한 본 발명의 범위 안에 있다.
- <34> CD89 발현 (예를 들면, 과다 발현)과 관련된 질환의 생체내 치료 및 예방에 이용하기 위해서, 본 발명의 인간 항체는 임의의 적합한 투여 경로 (예를 들면, 주사 및 당업계에 공지된 항체-기반 임상 제품들의 다른 투여 경로)를 이용하여 치료상 유효량으로 환자 (예를 들면, 인간 대상체)에게 투여된다.
- <35> 또한, 본 발명의 인간 항체는, 예를 들면 세포 표면 상의 수용체를 캡핑 (capping) 및 제거시킴으로써 이펙터 세포 상의 CD89 수준을 조절하는 데에 이용될 수 있다. 또한, 항-Fc 수용체들의 혼합물도 이러한 목적으로 이용될 수 있다.
- <36> 다른 실시양태에서, IgA가 CD89에 결합하는 것을 차단하거나 또는 저해하는 본 발명의 인간 항체는, 순환하는 IgA-함유 복합체 및(또는) IgA-면역 복합체의 침전을 특징으로 하는 질환 (예를 들면, 만성 간염, 헤노흐-쾨라인 자반증 (Henoch-Schonlein purpura; HSP), IgA 신장병증 (nephropathy) (버거스 질환 (Berger's disease)) 또는 IgA-사구체신염)을 치료하는 데에 유용하다. 본 발명의 인간 항체는 상기 질환을 앓고 있는 환자에게, 생체내에서 내생의 IgA가 CD89와 결합하는 것을 저해하거나 또는 하향조절하기 위해 투여될 수 있다.
- <37> CD89를 지닌 면역 세포 및 특정한 표적 세포 (즉, 제거되었을 경우 숙주에게 이로운 수 있는 세포) 모두에 결합할 수 있는 능력에 기초하여, 본 발명의 이중특이적 및 다중특이적 분자들은 다양한 질환을 치료하는 데에 이용될 수 있다. 이러한 질환에는 자가면역 질환 및 암 (예를 들면, 방광암, 유방암, 결장암, 신장암, 난소암, 고환암, 전립선암, 폐암, 뇌암, 직장암, 췌장암, 간암, 중추신경계암, 두경부암, 신장암, 뼈암, 혈액암 및 림프계암); 바이러스 (예를 들면, HIV, HTLV 및 FELV) 감염, 원생동물 (예를 들면, 톡소플라스마 곤디 (*Toxoplasma gondii*)) 감염, 진균 (예를 들면, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)) 감염, 및 박테리아 (예를 들면, 스탕필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스탕필로코쿠스 헤모리티쿠스 (*Streptococcus hemolyticus*) 및 마이코박테리움 투베르쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*)) 감염과 같은 병원성 감염이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 다른 측면은, 질환을 앓고 있는 유기체로부터의 항원, 감염된 세포로부터의 항원, 질환을 앓고 있는 유기체의 유전자 산물로부터의 항원 또는 암 세포로부터의 항원을 포함함으로써 질환 및 암에 대한 백신 접종에 유용한 분자들을 제공한다. 이러한 목적을 위해, 본 발명은 유용한 효과적인 항원을 면역계로 향하게 하는 결합 결정자와 이 항원을 연결하는 결합제로서의 조성물을 제공한다.
- <38> 한 실시양태에서, 상기 환자는 화학요법제, 방사선 조사, 또는 Fc 수용체 (예를 들면, Fc α 수용체 또는 Fc γ 수용체)의 발현 또는 활성을 조절 (예를 들면, 증가 또는 저해)하는 제제 (예를 들면, 사이토카인)로 더 처리될 수 있다. 치료 중 투여될 수 있는 전형적인 사이토카인에는 과립구 군집-자극 인자 (G-CSF), 과립구-대식세포 군집-자극 인자 (GM-CSF), 인터페론- γ (IFN- γ) 및 종양 괴사 인자 (TNF)가 포함된다. 전형적인 치료제에는, 특히 항-종양제 (예를 들면, 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 술페이트, 카르무스틴, 클로람부실 및 시클로포스파미드 히드록시우레아)가 포함된다.
- <39> 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 샘플 중 CD89의 존재를 시험관내에서 또는 생체내에서 검출하기 위한 (예를 들면, CD89-관련 질환을 진단하기 위한) 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 이것은 시험할 샘플을, 임의로는 대조 샘플과 함께, 항체와 CD89 사이에 복합체를 형성할 수 있는 조건 하에서 본 발명의 인간 모노클로날 항체 (또는 그의 항원-결합 부분)와 접촉시킴으로써 달성된다. 그 후, 복합체 형성을 (예를 들면, ELISA를 이용하여) 검출한다. 시험 샘플과 함께 대조 샘플을 이용할 경우, 양쪽 샘플에서 복합체를 검출하고, 복합체 형성에서 샘플들 사이의 통계적으로 유의한 모든 차이는 시험 샘플 중의 CD89 존재를 나타내는 것이다.

<40> 본 발명의 다른 측면 및 이점은 하기 상세한 설명과 실시예로부터 분명해질 것이며, 이것이 제한적인 것으로 해석되어서는 안된다. 본원의 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에 그 내용이 일일이 나열된 것처럼 참고문헌으로 포함된다.

발명의 상세한 설명

<45> 본 발명은 단리된 인간 모노클로날 항체의 항원-결합 부분을 비롯한 단리된 인간 모노클로날 항체를 제공하며, 이것은 인간 IgA 수용체 (CD89) 상에 존재하는 에피토프에 결합한다. 한 실시양태에서, 상기 인간 항체는 V-D-J 재조합 및 이소타입 전환을 거쳐 CD89에 대한 인간 모노클로날 항체 (예를 들면, IgG, IgA 및(또는) IgE)의 다수 이소타입을 생산할 수 있는 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)에서 생산된다. 따라서, 본 발명의 구체적인 측면에는 항체, 항체 단편 및 그의 제약 조성물이 포함될 뿐만 아니라, 모노클로날 항체를 생산하는 인간 이외의 트랜스제닉 동물, B-세포 및 하이브리도마도 포함된다. 또한, 본 발명은 시험관 내에서 또는 생체내에서 CD89를 발현하는 세포를 검출하거나, 또는 CD89를 발현하는 세포 내에서 이펙터 기능을 촉발 (예를 들면, 본 발명의 항-CD89 항체를 비롯한 이중특이적 항체, 및 표적 세포 상의 항원에 대한 다른 항체를 이용하여 CD89 분자를 교차결합시킴)하기 위해 본 발명의 항체를 이용하는 방법도 포함한다. IgA가 CD89에 결합하는 것을 차단하거나 또는 저해하기 위해 본 발명의 항체를 이용하는 방법도 제공되며, 이것은 순환하는 IgA-함유 복합체 및(또는) IgA-면역 복합체의 침전을 특징으로 하는 질환 (예를 들면, 만성 간염, 헤노흐-췌관 라인 자반증 (HSP), IgA 신장병증 (버거스 질환) 또는 IgA-사구체신염)과 같은 비정상적인 내생의 IgA를 특징으로 하는 질환을 치료하는 데 유용하다.

<46> 본 발명을 보다 쉽게 이해할 수 있도록 하기 위해, 일부 용어를 먼저 정의하였다. 추가의 정의는 발명의 상세한 설명 전반에 걸쳐 기재하였다.

<47> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "CD89", "인간 IgA 수용체" 및 "Fc-알파 수용체" (Fc α RI)는 상호 교환하여 사용하였으며, 19번 염색체 상에 위치한 1개의 α -유전자 (Fc α RI)의 유전자 산물을 포함하는 것이다. 이 유전자는 다수의 다른 방법으로 스플라이싱된 55 내지 110 kDa의 막횡단 이소타입을 코딩하는 것으로 공지되어 있다. Fc α RI (CD89)는 단핵구/대식세포, 호산성 및 호중성 과립구 상에서 항상 발현되며, 비-이펙터 세포 군집 상에서는 그렇지 않다. Fc α RI은 IgA1 및 IgA2에 대해 중간정도의 친화도 (약 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)를 갖고 있으며, 이것은 G-CSF 또는 GM-CSF와 같은 사이토카인에 노출되었을 경우 증가한다 (Morton, H. C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440). Fc α RI 수용체는 (1) 주로 면역 이펙터 세포 (예를 들면, 단핵구, 대식세포, 호중구 및 호산구) 상에서 발현되고; (2) 발현 수준이 높고 (예를 들면, 세포 당 5,000 내지 100,000); (3) 세포독성 활성화 (예를 들면, ADCC, 식세포작용)의 매개자이며; (4) 자가항원을 비롯한 항원들에 대한 강화된 항원 제시를 매개하기 때문에, 본 발명에서 사용하기에 바람직한 촉발 수용체이다.

<48> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이펙터 세포"는, 면역 반응의 인식 및 활성화 단계와 대립되는, 면역 반응의 작용 단계에 관여하는 면역 세포를 의미한다. 대표적인 면역 세포에는 골수 또는 림프 기원의 세포, 예를 들면 림프구 (예를 들면, 세포용해성 T 세포 (CTL)를 비롯한 B 세포 및 T 세포), 살해 (killer) 세포, 자연 살해 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 호중구, 다형핵 세포, 과립구, 비만 세포 및 호염기구가 포함된다. 몇몇 이펙터 세포는 특이적 Fc 수용체를 발현시키며, 특이적 면역 기능을 수행한다. 바람직한 실시양태에서, 이펙터 세포는 항체-의존 세포-매개성 세포독성 (ADCC)을 유도할 수 있다 (예를 들면, 호중구는 ADCC를 유도할 수 있음). 예를 들면, FcR을 발현하는 단핵구, 대식세포는 표적 세포를 특이적으로 죽이고, 항원을 면역계의 다른 성분에 제시하거나, 또는 항원 제시 세포에 결합하는 데에 관여한다. 다른 실시양태에서, 이펙터 세포는 표적 항원, 표적 세포 또는 미생물에 대해 식세포작용을 할 수 있다. 이펙터 세포 상의 특정한 FcR의 발현은 사이토카인과 같은 체액성 인자에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, Fc α RI의 발현은 G-CSF 또는 GM-CSF에 의해 상향조절되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 발현 증가는 표적에 대한 Fc α RI-보유 세포의 이펙터 기능을 증가시킨다. 이펙터 세포는 표적 항원 또는 표적 세포에 대해 식세포작용을 하거나 또는 용해시킬 수 있다.

<49> "표적 세포"는 본 발명의 조성물 (예를 들면, 인간 모노클로날 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 분자)에 의해 표적화될 수 있는 대상체 (예를 들면, 인간 또는 동물)에서의 바람직하지 않은 임의 세포를 의미한다. 한 실시양태에서, 표적 세포는 CD89를 발현하거나 또는 과다 발현하는 세포이다. 다른 실시양태에서, 표적 세포에는 종양 세포가 포함된다. 표적화될 수 있는 종양 세포는 유방암, 난소암, 전립선암, 고환암, 폐암, 결장암, 직장암, 췌장암, 간암, 중추신경계암, 신장암, 두부암, 경부암, 뼈암, 혈액암 및 림프계암을 비롯한 임의 유형의 암에서의 종양 세포이다. 종양세포 외에, 상기 이펙터 세포는 자가면역 질환을 치료하기 위해 자가항체 생산 림

프구에 대해 표적화되거나, 또는 알레르기를 치료하기 위해 IgE-생산 림프구에 대해 표적화될 수 있다. 또한, 상기 표적은 미생물 (박테리아 또는 바이러스) 또는 가용성 항원 (예를 들면, 류마티스 유사 인자, 또는 다른 자가항체 및 독소)일 수 있다. 미생물에는 병원체 (예를 들면, 바이러스, 박테리아, 진균, 원생동물)가 포함된다.

<50> 용어 "항원"은 임의의 천연 면역원성 물질 또는 합성 면역원성 물질, 면역원성 물질의 단편 또는 부분, 펩티드 에피토프 또는 합텐 (hapten)을 의미한다. 또한 용어 "항원"에는 비복합화 형태에서는 비면역원성이나, 복합화 시 면역원성으로 되는 물질도 포함된다. 용어 "비복합화"에는 연결되어 본 발명의 분자 복합체를 형성하기 이전의 물질이 포함된다. 용어 "복합화"에는 연결되어 본 발명의 분자 복합체를 형성하는 물질이 포함된다.

<51> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "성장 저해" (예를 들면, 세포에 대해 언급할 경우)에는 세포를 항-CD89 항체와 접촉시키지 않을 때의 세포 성장과 비교하여, 이 세포를 항-CD89 항체와 접촉시켰을 때의 모든 측정가능한 세포 성장 감소가 포함된다 (예를 들면, 약 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % 또는 100 % 이상의 세포 성장 저해).

<52> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "결합 저해" 및 "결합 차단" (예를 들면, IgA와 같은 CD89 리간드가 CD89에 결합하는 것을 저해/차단함을 의미함)는 상호 교환하여 사용되며, 부분적 및 완전한 저해/차단을 포함한다. CD89에 대한 IgA의 저해/차단은 IgA가 저해 또는 차단되지 않고 CD89에 결합할 경우에, 발생한 이펙터 세포 기능의 정상 수준 또는 유형을 바람직하게 감소시키거나 또는 변경시킨다. 또한, 저해 및 차단에는 상기 리간드를 항-CD89 항체와 접촉시키지 않을 때와 비교하여, 항-CD89 항체와 접촉하였을 때 CD89에 대한 IgA의 모든 측정가능한 결합 친화도 감소가 포함된다 (예를 들면, CD89에 대해 CD89 리간드를 약 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % 또는 100 % 이상 차단함).

<53> 본원에 사용된 용어 "항체"에는 완전한 항체 및 항원 결합 단편 (즉, "항원-결합 부분") 또는 그의 단일쇄가 포함된다. "항체"는 이항화 결합에 의해 서로 결합된 2개 이상의 중쇄 (H) 및 2개 이상의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질, 또는 그의 항원 결합 부분을 의미한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성되어 있다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)으로 구성되어 있다. 각각의 경쇄는 경쇄 불변 영역 (본원에서 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성되어 있다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인 (CL)으로 구성되어 있다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 명명된 초가변 (hypervariability) 영역으로 더 나누어질 수 있고, 초가변 영역 사이에는 프레임워크 (framework) 영역 (FR)으로 명명된, 보존성이 더 높은 영역이 존재한다. VH 및 VL 각각은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 아미노-말단부터 카르복시-말단까지 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되어 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 갖고 있다. 항체의 불변 영역은, 면역글로블린이 면역 시스템의 다양한 세포 (예를 들면, 이펙터 세포) 및 전형적인 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 비롯한 숙주 조직 또는 인자와 결합하는 것을 매개할 수 있다.

<54> 본원에 사용된 바와 같이, 항체의 "항원 결합 부분" (또는 단순히 "항체 부분")이란 용어는 항원 (예를 들면, CD89)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 1종 이상의 항체 단편을 의미한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 항체의 "항원-결합 부분"라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이항화 다리에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 F(ab')₂ 절편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 VL 및 VH 도메인의 단일 아암 (arm)으로 구성된 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편 (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)이 포함된다. 또한, Fv 단편의 2개 도메인 (VL 및 VH)이 비록 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 재조합 방법을 이용하여 두 도메인을, VL 및 VH 영역이 짝을 이루어 1가 분자가 형성된 단일 단백질 쇄 (단일쇄 Fv (scFv)로 공지됨; 예를 들면, 문헌 [Bird et al., (1998) Science 242: 423-426] 및 [Huston et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883] 참조)로 만드는 합성 링커에 의해 연결시킬 수 있다. 이러한 단일쇄 항체도 항체의 "항원-결합 부분"라는 용어에 포함된다. 이들 항체 단편은 당업계 숙련자에게 공지된 통상의 기술을 이용하여 수득하고, 용도에 따라서 완전한 항체에서의 방법과 동일한 방법으로 상기 단편을 스크리닝한다.

<55> 용어 "에피토프"는 항체에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정자를 의미한다. 에피토프는 통상 아미노산 또는 당 측쇄와 같이 화학적으로 활성이 있는 표면 분자들의 군으로 구성되며, 일반적으로 특정한 3차원의 구조적 특징 뿐만 아니라 특정한 대전 특징을 갖는다. 변성 용매 존재하에, 구조적 에피토프에 대한 결합은 파괴되지만 비-구조적 에피토프에 대한 결합은 파괴되지 않는다는 점에서 구조적 에피토프와 비-구조적 에피토프

는 서로 구별된다.

- <56> 용어 "이중특이적 분자"에는 2종의 다른 결합 특이성을 갖는 임의 제제, 예를 들면 단백질, 펩티드, 또는 단백질 또는 펩티드 복합체가 포함된다. 예를 들면, 상기 분자는 (a) 세포 표면 항원 및 (b) 이펙터 세포의 표면 상의 Fc 수용체 (예를 들면, CD89)와 결합하거나 또는 상호작용을 할 수 있다. 용어 "다중특이적 분자" 또는 "이중특이적 분자"에는 2종 이상의 다른 결합 특이성을 갖는 임의 제제, 예를 들면 단백질, 펩티드, 또는 단백질 또는 펩티드 복합체가 포함된다. 예를 들면, 상기 분자는 (a) 세포 표면 항원, (b) 이펙터 세포의 표면 상의 Fc 수용체 및 (c) 1종 이상의 다른 성분과 결합하거나 또는 상호작용을 할 수 있다. 따라서, 본 발명에는 CD89와 같은 세포 표면 항원, 및 이펙터 세포상의 Fc 수용체와 같은 다른 표적에 대한 이중특이적, 삼중특이적, 사중특이적 및 다른 다중특이적 분자가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- <57> 용어 "이중특이적 항체"는 디아바디 (diabody)를 추가로 포함한다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 쇄 상에 발현되는 2가의 이중특이적 항체이지만, 동일 쇄 상의 상기 두 도메인 사이를 연결할 수 없는 짧은 링커를 이용함으로써 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 상기 도메인들이 짝을 이루게 하여 2개의 항원 결합 부위가 생성된다 (예를 들면, 문헌 [Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123] 참조).
- <58> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이중항체"는 2종 이상의 항체, 항체 결합 단편 (예를 들면, Fab), 그의 유도체, 또는 서로 연결된 항원 결합 영역을 의미한다 (이들 중 2종 이상은 서로 다른 특이성을 갖음). 이러한 서로 다른 특이성에는 이펙터 세포 상의 Fc 수용체에 대한 결합 특이성, 및 표적 세포 (예를 들면, 종양 세포) 상의 항원 또는 에피토프에 대한 결합 특이성이 포함된다.
- <59> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"에는 인간 생식세포주 면역글로블린 서열에서 유래한 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체가 포함된다. 본 발명의 인간 항체에는 인간 생식세포주 면역글로블린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들면, 시험관내 랜덤 (random) 또는 위치-특이적 돌연변이에 의해, 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)가 포함될 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식세포주로부터 유래한 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식된 항체는 포함하지 않는다.
- <60> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일 분자 조성의 항체 분자 제제를 말한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 생식세포주 면역글로블린 서열로부터 유래한 가변 및 불변 영역을 지닌, 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 말한다. 한 실시양태에서, 상기 인간 모노클로날 항체는 인간 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 계놈을 가진 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)로부터 수득하여 무한증식 세포와 융합시킨 B 세포를 비롯한 하이브리도마에 의해 생산된다.
- <61> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 방법에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리한 모든 인간 항체, 예를 들면 (a) 인간 면역글로블린 유전자 (하기 단락 I에 더 자세히 기재됨)로 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 마우스)로부터 단리한 항체, (b) 숙주 세포내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 이용하여 발현시킨 항체, (c) 재조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리한 항체, 및 (d) 인간 면역글로블린 유전자 서열을 다른 DNA 서열로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의 수단에 의해 준비되거나, 발현되거나, 생산되거나 또는 단리한 항체가 포함된다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식세포주 면역글로블린 서열에서 유래한 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 일부 실시양태에서는 이러한 재조합 인간 항체를 시험관내에서 돌연변이시킬 수 있으며 (또는, 인간 Ig 서열로 트랜스제닉 동물을 이용한 경우에는 생체내에서 체세포 돌연변이시킬), 따라서 상기 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식세포주 VH 및 VL 서열로부터 유래하고 이와 관련되어 있지만, 생체내 인간 생식세포주 레파토리에 자연적으로 존재하지 않을 수 있다.
- <62> 본원에 사용된 바와 같이, "이중성 항체"는 이러한 항체를 생산하는 인간 이외의 트랜스제닉 유기체와 관련하여 정의된다. 이 용어는 인간 이외의 트랜스제닉 동물이 포함되지 않은, 일반적으로 인간 이외의 트랜스제닉 동물 종으로 구성되지 않은 유기체에서 발견되는 서열에 상응하는 아미노산 서열, 또는 코딩 핵산 서열을 갖는 항체를 의미한다.
- <63> 본 명세서에 사용된 용어 "이종하이브리드 항체"는 다른 유기체 기원의 경쇄 및 중쇄를 갖는 항체를 말한다. 예를 들면, 무린 경쇄와 연결된 인간 중쇄를 갖는 항체가 이종하이브리드 항체이다. 이종하이브리드 항체의 예로는 전술한 키메라 항체 및 인간화 항체가 있다.

- <64> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된 항체"는 서로 다른 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체 (예를 들면, CD89 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없는, CD89에 특이적으로 결합하는 단리된 항체)를 의미한다. 그러나, 인간 CD89의 에피토프, 이소타입 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는, 예를 들면 다른 종 (예를 들면, CD89 종 상동체)에서 유래한 다른 관련 항원들과의 교차 반응성을 갖을 수 있다. 더욱이, 단리된 항체에는 다른 세포성 물질 및(또는) 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 서로 다른 특이성을 갖는 "단리된" 모노클로날 항체들의 조합은 잘 규정된 조성물 중에서 조합된다.
- <65> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "특이적 결합"은 예정된 항원에 항체가 결합하는 것을 의미한다. 전형적으로, 상기 항체는 약 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 의 친화도로 결합하고, 예정된 항원 또는 관련성이 높은 항원 이외의 비-특이적 항원 (예를 들면, BSA, 카세인 (casein))에 결합하는 친화도 보다 2배 이상의 더 높은 친화도로 상기 예정된 항원에 결합한다. 어구 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 대해 특이적인 항체"는 본원에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어와 상호교환 가능하게 사용하였다.
- <66> 본원에 사용된 바와 같이, IgG 항체에 대한 "고친화도"라는 용어는 약 10^7 M^{-1} 이상, 바람직하게는 약 10^8 M^{-1} 이상, 더 바람직하게는 약 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} 또는 그 이상 (예를 들면, 10^{13} M^{-1} 이하, 또는 초과)의 결합 친화도를 의미한다. 그러나, "고친화도" 결합은 다른 항체 이소타입마다 다를 수 있다. 예를 들면, IgM 이소타입에 대한 "고친화도" 결합은 약 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상의 결합 친화도를 의미한다.
- <67> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " K_{assoc} " 또는 " K_a "는 특정한 항체-항원 상호작용의 결합 상수를 의미한다.
- <68> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " K_{dis} " 또는 " K_d "는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리 상수를 의미한다.
- <69> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 클래스 (예를 들면, IgM 또는 IgG1)를 의미한다.
- <70> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이소타입 전환"은 항체의 클래스 또는 이소타입이 한 Ig 클래스에서 다른 Ig 클래스 중 한 클래스로 바뀌는 현상을 의미한다.
- <71> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "전환되지 않은 이소타입"은 이소타입 전환이 일어나지 않은 경우에 생산된 중쇄의 이소타입 클래스를 의미하며, 전환되지 않은 이소타입을 코딩하는 CH 유전자는 전형적으로, 기능적으로 재배열된 VDJ 유전자의 바로 아래에 위치한 제1 CH 유전자이다. 이소타입 전환은 고전적인 이소타입 전환 또는 비-고전적인 이소타입 전환으로 분류된다. 고전적인 이소타입 전환은 트랜스진 내의 1개 이상의 전환 서열 영역이 포함된 재조합 사건에 의해 발생한다. 비-고전적인 이소타입 전환은, 예를 들면 인간 σ_μ 와 인간 Σ_μ (δ -관련 결실) 사이의 상동성 재조합에 의해 발생할 수 있다. 다른 것들 중에서, 트랜스진 간의 재조합 및(또는) 염색체 간의 재조합과 같은 별도의 비-고전적인 전환 메커니즘이 발생하고 이소타입 전환이 수행될 수 있다.
- <72> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "전환 서열"은 전환 재조합을 담당하는 DNA 서열을 말한다. 전형적인 μ 전환 영역인 "전환 공여자 (donor)" 서열은 전환 재조합 동안 결실되는 작제물 영역의 5' (즉, 위쪽)일 것이다. "전환 수용자" 영역은 결실된 작제물 영역과 대체 불변 영역 (예를 들면, γ , ϵ 등) 사이에 있을 것이다. 재조합이 항상 발생하는 특정한 부위가 없기 때문에, 전형적으로 최종 유전자 서열은 작제물로부터 예측될 수 없을 것이다.
- <73> 본원에 사용된 바와 같이, "글리코실화 패턴"은 단백질, 더 구체적으로는 면역글로블린 단백질에 공유 결합된 탄수화물 단위의 패턴으로 정의된다. 상기 이종항체의 글리코실화 패턴이, 트랜스진의 CH 유전자가 유래한 종에서의 패턴보다 인간 이외의 트랜스제닉 동물 종에서의 글리코실화 패턴과 더 유사하다는 것을 당업계의 보통의 숙련자가 인식할 경우에, 이종항체의 글리코실화 패턴은 인간 이외의 트랜스제닉 동물 종에 의해 생산된 항체 상에 자연적으로 발생하는 글리코실화 패턴과 실질적으로 유사하다는 것을 특징으로 할 수 있다.
- <74> 본원에 사용된 바와 같이, 한 대상체에게 적용되는 용어 "자연적으로 발생하는"은 상기 대상체를 자연 상태에서 발견할 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들면, 자연 상태의 공급원으로부터 단리할 수 있고 실험실에서 인간에 의해 고의적으로 변형되지 않은 (바이러스를 비롯한) 유기체에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연적으로 발생하는 서열이다.
- <75> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "재배열된"은 V 절편이 본질적으로 완전한 VH 또는 VL 도메인 각각을 코딩하는

형태로 D-J 또는 J 절편과 바로 인접한 부위에 있는 중쇄 또는 경쇄 면역글로블린 좌위 (locus)의 배열을 의미한다. 재배열된 면역글로블린 유전자 좌위는 생식세포주 DNA와 비교함으로써 확인될 수 있고, 재배열된 좌위는 1종 이상의 재조합 7량체/9량체 상동 원소를 가질 것이다.

- <76> 본원에 사용된 바와 같이, V 절편에 대한 용어 "재배열되지 않은" 또는 "생식세포주 배열"이란 용어는 V 절편이 재조합되지 않음으로써 D 또는 J 절편에 바로 인접하는 배열을 의미한다.
- <77> 본원에 사용된 바와 같이, "핵산 분자"에는 DNA 분자 및 RNA 분자가 포함된다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있지만, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다.
- <78> 본원에 사용된 바와 같이, CD89에 결합하는 항체 또는 항체 부분 (예를 들면, VH, VL, CDR3)을 코딩하는 핵산에 대한 용어 "단리된 핵산 분자"는 항체 또는 항체 부분을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 내에, CD89 이외의 다른 항원에 결합하는 항체 또는 항체 부분을 코딩하는 다른 뉴클레오타이드 서열이 없고, 다른 서열은 인간 게놈 DNA 내의 핵산을 자연적으로 플랭킹 (flanking)할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 한 실시양태에서, 인간 항-CD89 항체 또는 그의 부분에는 14.1, 7.4, 8.2의 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열이 포함될 뿐만 아니라, 각각 서열 1, 3, 5, 7, 및 2, 4, 6, 8에 나타낸 서열을 갖는 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL) 가변 영역이 포함된다.
- <79> 본원에 개시하고 청구한 바와 같이, 서열 1 내지 8에 나타낸 서열에는 "보존적 서열 변이체", 즉 상기 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 항체 또는 상기 아미노산 서열을 지닌 항체의 결합 특성에 심각하게 영향을 주지 않거나 또는 변화시키지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열의 변이체가 포함된다. 이러한 보존적 서열 변이체에는 뉴클레오타이드 및 아미노산이 치환, 부가 및 결실된 것이 포함된다. 변이는 위치-지정 돌연변이 및 PCR-매개 돌연변이와 같이 당업계에서 공지된 표준 기술에 의해 서열 1 내지 8 내로 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환에는 아미노산 잔기를, 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환하는 것이 포함된다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기들의 군이 당업계에 정의되어 있다. 이러한 군들에는 염기성 측쇄 (예를 들면, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들면, 아스파르트산, 글루탐산), 대전되지 않은 극성 측쇄 (예를 들면, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들면, 알라닌, 발린, 루신, 이소루신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄 (예를 들면, 트레오닌, 발린, 이소루신) 및 방향족 측쇄 (예를 들면, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산들이 포함된다. 따라서, 인간 항-CD89 항체 내의 예측된 비-필수적인 아미노산 잔기는 바람직하게는, 동일한 측쇄 군에서의 다른 아미노산 잔기로 치환된다.
- <80> 별법으로, 다른 실시양태에서, 돌연변이는 포화 돌연변이와 같은 방법에 의해 항-CD89 항체 코딩 서열의 전장 서열 또는 부분 서열을 따라 임의로 도입될 수 있으며, 생성된 변이 항-CD89 항체는 결합 활성에 의해 스크리닝될 수 있다.
- <81> 따라서, 본원에 개시된 (중쇄 및 경쇄 가변 영역의) 뉴클레오타이드 서열 (즉, 서열 1, 3, 5 및 7)에 의해 코딩되는 항체 및(또는) 본원에 개시된 (중쇄 및 경쇄 가변 영역의) 아미노산 서열 (즉, 서열 2, 4, 6 및 8)을 지닌 항체에는, 보존적으로 변형된 유사 서열에 의해 코딩되거나 또는 상기 유사 서열을 지닌 실질적으로 유사한 항체가 포함된다. 서열 1 내지 8과 같이 본원에 개시한 부분 (즉, 중쇄 및 경쇄 가변 영역) 서열에 기초하여, 이러한 실질적으로 유사한 항체를 발생시키는 방법에 대한 추가의 논의를 하기하였다.
- <82> 핵산의 경우, 용어 "실질적인 상동성"이란 두 핵산 또는 그의 특정 서열이 최적으로 정렬되어 비교될 때, 뉴클레오타이드가 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실을 갖고, 약 80 % 이상, 통상적으로 약 90 내지 95 % 이상, 보다 바람직하게는 약 98 내지 99.5 % 이상 동일함을 의미한다. 또는, 실질적인 상동성은 상기 절편이 선택적인 혼성화 조건 하에서 상기 가닥의 상보 서열과 혼성화할 때 존재한다.
- <83> 두 서열 사이의 동일성%는 갭 (gap)의 수 및 각 갭의 길이를 고려하여 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 서열에 의해 나누어진 동일한 부위의 수의 함수이다 (즉, % 상동성 = 동일한 부위의 수/ 부위의 총 수 x 100). 서열의 비교 및 두 서열 사이의 동일성% 측정은 하기 비제한적 실시예에 기재된 바와 같이 수학적 알고리즘을 이용하여 달성할 수 있다.
- <84> 두 뉴클레오타이드 서열 사이의 동일성%는 NWSgapdna CMP 매트릭스, 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 이용한, GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 이용가능함) 중의 GAP 프로그램을 이용하여 측정할 수 있다. 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성%는 PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 이용한 ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 안에 도입된, 이. 메이어스 (E. Meyers) 및 더블유. 밀러 (W. Miller)의 알고리즘 (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988))을

이용하여 측정할 수도 있다. 또한, 두 아미노산 서열 사이의 동일성%는 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 이용한, GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 이용가능함) 중의 GAP 프로그램 안에 도입된 니들만-분취 (Needleman-Wunsch) 알고리즘 (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970))을 이용하여 측정할 수 있다.

<85> 본 발명의 핵산 및 단백질 서열을 "쿼리 (query) 서열"로서 이용하여 공개 데이터베이스에서 검색을 수행하여, 예를 들면 관련 서열을 확인할 수 있다. 이러한 검색은 문헌 [Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 이용하여 수행될 수 있다. NBLAST 프로그램 (스코어 = 100, 단어 길이 = 12)을 이용하여 BLAST 뉴클레오티드 검색을 수행함으로써 본 발명의 핵산 분자와 상동성이 있는 뉴클레오티드 서열을 얻을 수 있다. XBLAST 프로그램 (스코어 = 50, 단어 길이 = 3)을 이용하여 BLAST 단백질 검색을 수행함으로써 본 발명의 단백질 분자와 상동성이 있는 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교 목적의 갭 정렬을 얻기 위해서는, 문헌 [Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402]에 기재된 바와 같이 Gapped BLAST를 이용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 경우에, 각 프로그램 (예를 들면, XBLAST 및 NBLAST)의 초기 매개변수를 사용할 수 있다 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 참조).

<86> 핵산은 부분 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 완전한 세포 또는 세포 용해물에 존재할 수 있다. 핵산이 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 칼럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 그 외 당업계에 잘 공지되어 있는 다른 기술을 비롯한 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 다른 오염물질 (예를 들면, 다른 세포성 핵산 또는 단백질)로부터 분리 정제된 경우에, 상기 핵산은 "단리된" 것이거나 또는 "실질적으로 순수한 형태로 된" 것이다 (문헌 [F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)] 참조).

<87> cDNA, 게놈 또는 그의 혼합물로부터의 본 발명의 핵산 조성물은 종종 천연 서열로 존재하지만 (변형된 제한효소 부위 등은 제외함), 표준 기술에 따라 돌연변이되어 유전자 서열을 제공할 수 있다. 코딩 서열의 경우, 이들 돌연변이는 원하는 아미노산 서열에 영향을 줄 수 있다. 특히, 천연 V 서열, D 서열, J 서열, 불변 서열, 전환 서열, 및 본원에 기재된 다른 이러한 서열과 실질적으로 상동성이 있거나 이들로부터 유래한 DNA 서열도 고려된다 (여기서, "유래한"은 한 서열이 다른 서열과 동일하거나, 또는 다른 서열로부터 변형된 것임을 의미함).

<88> 핵산이 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계를 갖도록 위치하고 있을 때, 이 핵산은 "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들면, 프로모터 또는 인핸서가 서열의 전사에 영향을 준다면 코딩 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 것이다. 전사 조절 서열의 경우, 작동가능하게 연결되어 있다는 것은 연결된 DNA 서열이 인접해 있고, 필요한 경우 두 개의 단백질 코딩 영역이 인접하여 리딩 프레임으로 연결되어 있다는 것을 의미한다. 전환 서열의 경우, 작동가능하게 연결되어 있다는 것은 서열이 전환 재조합을 수행할 수 있음을 의미한다.

<89> 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 연결된 다른 핵산을 전달할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 벡터 중 한 유형은 "플라스미드"이며, 이것은 추가의 DNA 절편이 라이게이션될 수 있는 원형 이중가닥 DNA 루프를 의미한다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터인데, 이 벡터에서 추가의 DNA 절편은 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 일부 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다 (예를 들면, 박테리아 복제 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜형 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들면, 비-에피솜형 포유동물 벡터)도 숙주 세포내로 도입시 숙주 세포의 게놈 내로 삽입되어 숙주 게놈과 함께 복제될 수 있다. 더욱이, 일부 벡터는 이들과 작동가능하게 연결된 유전자를 발현시킬 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "발현 벡터")로 언급된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 사용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 흔히 사용되는 벡터의 형태이므로 상호 교환하여 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 바이러스 벡터 (예를 들면, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 동일한 기능을 갖는 다른 형태의 발현 벡터를 포함한다.

<90> 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 단순히 "숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 의미한다. 이러한 용어는 특정 대상 세포 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손도 의미하는 것임을 이해하여야 한다. 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해 후속 세포에서 일부 변형이 일어날 수 있기 때문에, 사실상 이러한 자손은 모 (母)세포와 동일하지 않을 수 있지만 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"란 용어의 범위에 여전히 포함된다. 재조합 숙주 세포에는, 예를 들면 CHO 세포 및 림프구성 세포가 포함된다.

<91> 본 발명의 다양한 측면을 하기 단락에 더 자세히 기재하였다.

<92> I. CD89에 대한 인간 항체의 생산

<93> 본 발명의 모노클로날 항체 (mAb)는 통상적인 모노클로날 항체 방법론, 예를 들면 표준 체세포 혼성화 기술 (Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975))을 비롯한 다양한 기술에 의해 생산될 수 있다. 대체로 체세포 혼성화 방법이 바람직하지만, 모노클로날 항체를 생산하는 다른 기술 (예를 들면, B 림프구의 바이러스성 또는 종양성 형질전환)이 이용될 수도 있다.

<94> 하이브리도마를 제조하는 데 바람직한 동물 시스템은 무린 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 제조는 매우 잘 확립된 방법이다. 융합용 면역화 비장세포를 단리하는 면역화 프로토콜 및 기술이 당업계에 공지되어 있다. 또한, 융합 파트너 (예를 들면, 무린 골수종 세포) 및 융합 방법도 공지되어 있다.

<95> 바람직한 실시양태에서, CD89에 대한 인간 모노클로날 항체는 마우스 시스템보다는 인간 면역 시스템의 일부를 수반하는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 발생시킬 수 있다. 본원에서 "HuMAb" 마우스로 불리는 이들 트랜스제닉 마우스는, 내생의 μ 쇄 및 κ 쇄 좌위를 불활성화시키는 표적 돌연변이와 함께, 재배열되지 않은 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로블린 서열을 코딩하는 인간 면역글로블린 유전자 미니좌위를 갖고 있다 (Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859). 따라서, 상기 마우스는 마우스의 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 보이고, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스진은 면역화에 반응하여 클래스 전환 및 체세포 돌연변이를 통해 고친화성 인간 IgG κ 모노클로날 항체를 생산한다 (Lonberg, N. et al. (1994), 상게서; reviewed in Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; 및 Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764: 536-546). HuMAb 마우스의 제조는 하기 단락 II 및 문헌 [Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 3720-3724; Choi et al., (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Lonberg et al., (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764: 536-546; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851]에 상세히 기재되어 있고, 이들의 내용은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다. 또한, 미국 특허 제5,545,806호, 제5,569,825호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,789,650호, 제5,877,397호, 제5,661,016호, 제5,814,318호, 제5,874,299호 및 제5,770,429호 (Lonberg and Kay, and GenPharm International); 미국 특허 제5,545,807호 (Surani et al.); 1998년 6월 11일 공개된 WO 98/24884; 1994년 11월 10일 공개된 WO 94/25585; 1993년 6월 24일 공개된 WO 93/1227; 1992년 12월 23일 공개된 WO 92/22645; 1992년 3월 19일 공개된 WO 92/03918도 참조할 수 있는데, 이들의 개시 내용은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다. 별법으로, 실시예 2에 기재한 HC012 트랜스제닉 마우스를 이용하여 인간 항-CD89 항체를 생산할 수 있다.

<96> HuMAb 면역화

<97> CD89에 대한 완전한 인간 모노클로날 항체를 생산하기 위해, 문헌 [Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851] 및 WO 98/24884에 기재된 바와 같이 HuMAb 마우스를 정제된 CD89 항원 제제 또는 이 항원이 풍부한 제제, 및(또는) CD89를 발현하는 세포로 면역화시킬 수 있다. 바람직하게는, 제1 주입시 마우스는 6 내지 16주 된 것이다. 예를 들면, HuMAb 마우스는, 단리된 CD89 항원 제제 또는 이 항원이 풍부한 제제 (예를 들면, CD89를 발현하는 LNCaP 세포로부터 정제함) (5 내지 20 μ g)를 복강내에 주입함으로써 면역화시킬 수 있다. 정제된 CD89 항원 제제 또는 이 항원이 풍부한 제제를 사용한 면역화로 항체가 발생하지 않을 경우에, CD89를 발현하는 세포 (예를 들면, 종양 세포주)로 마우스를 면역화시켜 면역 반응을 촉진시킬 수도 있다.

<98> 다양한 항원에 대한 누적된 경험을 통해, HuMAb 트랜스제닉 마우스는 프로인트 완전 면역보조제 (complete Freund's adjuvant) 중의 항원을 이 마우스의 복강내에 주입 (IP)하여 초기 면역화시킨 후, 프로인트 불완전 면역보조제 (incomplete Freund's adjuvant) 중의 항원으로 매주 IP 면역화 (총 6회 이하)하는 것에 가장 잘 반응한다는 것이 밝혀졌다. 면역 반응은 안와후 (retroorbital) 출혈에 의해 얻어지는 혈장 샘플을 사용하여 면역화 프로토콜 과정에 걸쳐 관찰할 수 있다. ELISA로 혈장을 스크리닝할 수 있고 (아래에 설명함), 항-CD89 인간 면역글로블린의 역가가 충분한 마우스를 융합에 사용할 수 있다. 마우스를 희생시켜 비장을 적출하기 3일 전에, 항원을 정맥내에 주입하여 부스팅시킬 수 있다. 각 항원에 대해 2 내지 3회의 융합을 수행할 필요가 있

을 수 있다. 수마리의 마우스가 각 항원에 대해 면역화될 것이다. 예를 들면, HC07 및 HC012 계통의 총 12마리 HuMAb 마우스를 면역화시킬 수 있다.

<99> CD89에 대한 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 제조

<100> 표준 프로토콜을 기초로 하여, 마우스 비장세포를 단리하고 PEG로 마우스 골수종 세포주와 융합시킬 수 있다. 그 후, 제조된 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝한다. 예를 들면, 50 % PEG를 사용하여 면역화 마우스로부터의 비장 림프구의 단일 세포 현탁액을 P3X63-Ag8.653 비분비 마우스 골수종 세포 (ATCC, CRL 1580) 수의 1/6에 상응하는 수의 세포와 융합시킨다. 약 2×10^5 개의 세포를 평판 바닥 마이크로타이터 플레이트에 플레이트한 후, 20 % 태아 클론 혈청 (Fetal Clone Serum), 18 % "653" 조절 배지, 5 % 오리젠 (IGEN), 4 mM L-글루타민, 1 mM L-글루타민, 1 mM 피루빈산나트륨, 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-머캅토에탄올, 50 유닛/ml 페니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신, 50 mg/ml 젠타마이신 및 1 x HAT (Sigma; HAT는 융합으로부터 24 시간 후 첨가함)이 함유된 선별 배지에서 2주 동안 인큐베이션한다. 2주 후, HAT를 HT로 바꾼 배지에서 세포를 배양한다. 그 후, 각각의 웰을 인간 항-CD89 모노클로날 IgM 및 IgG 항체에 대한 ELISA로 스크리닝하였다. 일단 광범위한 하이브리도마 성장이 일어나면, 통상 10 내지 14일 후 배지를 관찰한다. 항체를 분비하는 하이브리도마를 다시 플레이트하고, 다시 스크리닝하고, 인간 IgG, 항-CD89 모노클로날 항체에 대해 여전히 양성이면 제한 희석법으로 2회 이상 서브클론을 스크리닝할 수 있다. 그 후, 안정한 서브클론을 시험관내에서 배양하여 특성화를 위한 소량의 항체를 조직 배양 배지 중에서 생산한다.

<101> 완전한 항체를 발현하기 위한 부분 항체 서열의 이용

<102> 항체는 주로, 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 내에 위치한 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호 작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 각 항체들 사이에서 CDR 바깥쪽의 서열보다 더욱 다양하다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원 상호작용에 관여하기 때문에, 다른 성질을 가진 다른 항체의 프레임워크 서열 상에 이식된, 자연 발생의 특정 항체로부터의 CDR 서열을 포함한 발현 벡터를 제조함으로써, 자연 발생의 특정 항체가 지닌 특징을 모방하는 재조합 항체를 발현하는 것이 가능하다 (Riechmann, L. et al., 1988, Nature 332: 323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321: 522-525; Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033). 이러한 프레임워크 서열은 생식세포주 항체 유전자 서열이 포함된 공개 DNA 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 상기 생식세포주 서열에는 B 세포 성숙시 V(D)J 연결에 의해 형성된 완전하게 조립된 가변 영역이 포함되어 있지 않기 때문에, 성숙 항체 유전자 서열과 다를 것이다. 또한, 생식세포주 유전자 서열은 각각 가변 영역에 균등하게 분포되어 있는 고친화도의 제2 레파토리 항체의 각 뉴클레오타이드 서열과도 다를 것이다. 예를 들면, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역의 아미노-말단 부분에 비교적 낮은 빈도로 발생한다. 예를 들면, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역 1의 아미노 말단 부분 및 프레임워크 영역 4의 카르복시-말단 부분에 비교적 낮은 빈도로 발생한다. 더욱이, 많은 체세포 돌연변이가 항체의 결합 특성을 유의하게 변화시키지는 않는다. 이러한 이유로, 원래의 항체와 유사한 결합 특성을 지닌 완전한 재조합 항체를 재생산하기 위해 특정 항체의 전체 DNA 서열을 얻을 필요는 없다 (이 거명을 통해 본원에 참고문헌으로 포함된, 1999년 3월 12일 출원된 PCT/US99/05535 참조). CDR 영역에 놓여 있는 부분 중쇄 및 경쇄 서열은 전형적으로 이러한 목적에 충분하다. 상기 부분 서열은 재조합된 항체 가변 유전자에 기여하는 생식세포주 가변 및 연결 유전자 절편을 결정하는 데 이용된다. 그 후, 생식세포주 서열은 가변 영역의 결실 부분을 채워넣는 데 이용된다. 중쇄 및 경쇄 리더 서열은 단백질 성숙시 절단되어 최종 항체의 특성에 기여하지 않는다. 이러한 이유로, 발현 작제물을 위해 상응하는 생식세포주의 리더 서열을 이용할 필요가 있다. 결실 서열을 부가하기 위해서는, 클로닝된 cDNA 서열을 라이게이션 또는 PCR 증폭에 의해 합성 올리고뉴클레오타이드와 결합시킬 수 있다. 별법으로, 전체 가변 영역을 한 세트의 짧은 중복 올리고뉴클레오타이드로 합성하고 PCR 증폭에 의해 결합함으로써, 전체 합성 가변 영역 클론을 만들 수 있다. 이 방법은, 특정 제한 부위의 제거 또는 포함, 또는 특정 코돈의 최적화와 같은 일정한 이점이 있다.

<103> 하이브리도마로부터의 중쇄 및 경쇄 전사체의 뉴클레오타이드 서열을, 합성 올리고뉴클레오타이드의 중복된 세트를 디자인하는 데에 이용하여, 천연 서열과 동일한 아미노산 코딩 능력을 지닌 합성 V 서열을 제조하였다. 상기 합성 중쇄 및 카파쇄의 서열은 3가지 방식 (반복된 뉴클레오타이드 염기 서열이 올리고뉴클레오타이드의 합성 및 PCR 증폭을 용이하게 하기 위해 개재됨; 코작 (Kozak)의 규칙 (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870)에 따라 최적의 번역 개시 부위가 혼입됨; 및 HindIII 부위가 번역 개시 부위 위쪽에 도입됨)으로 천연 서열과 상이할 수 있다.

<104> 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 있어서, 최적화된 코딩 가닥 서열 및 이에 상응하는 비-코딩 가닥 서열은 비-코딩 올

리고뉴클레오타이드의 대략 중앙 부근에서 30 내지 50개의 뉴클레오타이드로 절단된다. 따라서, 각각의 쇠에서 상기 올리고뉴클레오타이드는 150 내지 400개의 뉴클레오타이드 절편에 걸친 중복된 이중 가닥 세트의 조합으로 조립될 수 있다. 그 후, 상기 풀 (pool)을 주형으로 사용하여 150 내지 400 뉴클레오타이드의 PCR 증폭 생성물을 제조한다. 전형적으로, 단일 가변 영역 올리고뉴클레오타이드 세트는 2개의 풀로 나누어질 것이며, 이들은 별도로 증폭되어 2개의 중복 PCR 생성물을 생성한다. 그 후, 이들 중복 생성물을 PCR 증폭에 의해 결합시켜 완전한 가변 영역을 만든다. 또한, 발현 벡터 작제물 내로 쉽게 클로닝될 수 있는 단편을 만들기 위해, PCR 증폭시 중쇄 또는 경쇄 불변 영역 (카파 경쇄의 BbsI 부위 또는 감마 중쇄의 AgeI 부위 포함)의 중복 단편이 포함되는 것이 바람직할 수도 있다.

<105> 그 후, 재구성된 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 클로닝된 프로모터 서열, 번역 개시 서열, 불변 영역 서열, 3' 비번역 서열, 폴리아데닐화 서열 및 전사 종결 서열과 결합되어 발현 벡터 작제물을 형성한다. 중쇄 및 경쇄 발현 작제물은 단일 벡터 내에 결합되거나, 숙주 세포 내로 동시에 형질감염되거나, 순차적으로 형질감염되거나, 또는 각 숙주 세포에 개별적으로 형질감염된 후 융합되어 상기 2개의 쇠를 발현하는 숙주 세포를 형성할 수 있다.

<106> 인간 IgG κ 에 대한 발현 벡터의 구성에 사용되는 플라스미드를 하기하였다. 이 플라스미드는 PCR로 증폭된 V 중쇄 및 V 카파 경쇄 cDNA 서열이 완전한 중쇄 및 경쇄 미니유전자 (minigene)를 재구성하는 데 사용될 수 있다. 이들 플라스미드는 완전한 인간 항체, 키메라 IgG1 κ 항체 또는 IgG4 κ 항체를 발현하는 데 사용될 수도 있다. 유사한 플라스미드가 다른 중쇄 이소타입의 발현을 위해, 또는 람다 경쇄를 포함하는 항체의 발현을 위해 제조될 수 있다.

<107> 따라서, 본 발명의 다른 측면에 있어서, 본 발명의 인간 항-CD89 항체 14.1, 7.4 또는 8.2의 구조적 특징은, CD89에 결합하는 것과 같은 본 발명 항체의 1개 이상의 기능적 성질을 보유한, 구조적으로 관련된 인간 항-CD89 항체를 생산하는 데에 이용된다. 더 구체적으로는, 14.1, 7.2 또는 8.2의 1개 이상의 CDR 영역이 재조합에 의해 공지의 인간 프레임워크 영역 및 CDR과 결합하여, 추가의 재조합으로 조작된 본 발명의 인간 항-CD89 항체를 생산할 수 있다.

<108> 따라서, 다른 실시양태에서 본 발명은, (1) 인간 중쇄 프레임워크 영역 및 인간 중쇄 CDR (여기서, 1개 이상의 인간 중쇄 CDR은 도 1 또는 도 3에 나타난 CDR의 아미노산 서열로부터 선택된 아미노산 서열 (또는 서열 2 또는 서열 6의 상응하는 아미노산 잔기)을 포함함); 및 (2) 인간 경쇄 프레임워크 영역 및 인간 경쇄 CDR (여기서, 1개 이상의 인간 경쇄 CDR은 도 2 또는 도 4에 나타난 CDR의 아미노산 서열로부터 선택된 아미노산 서열 (또는 서열 4 또는 서열 8의 상응하는 아미노산 잔기)을 포함함)을 포함하는 항체 (여기서, 항체는 CD89에 결합하는 능력을 보유함)를 제조하는 것을 포함하는 항-CD89 항체 제조 방법을 제공한다. 상기 항체가 CD89에 결합하는 능력은 실시예에 기재한 것 (예를 들면, ELISA)과 같은 표준 결합 분석을 이용하여 측정될 수 있다.

<109> 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인이 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화도에 특히 중요한 역할을 하는 것으로 당업계에 잘 공지되어 있기 때문에, 상기한 바와 같이 제조된 본 발명의 재조합 항체는, 바람직하게는 14.1, 7.4 또는 8.2의 중쇄 및 경쇄 CDR3을 포함한다. 상기 항체는 14.1, 7.4 또는 8.2의 CDR2를 더 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 (1) 인간 중쇄 프레임워크 영역, 인간 중쇄 CDR1 영역, 인간 중쇄 CDR2 영역 및 인간 중쇄 CDR3 영역 (여기서, 인간 중쇄 CDR3 영역은 도 1 또는 도 3에 나타난 14.1, 7.2 및 8.2의 CDR3 (또는 서열 2 또는 서열 6의 상응하는 아미노산 잔기)으로부터 선택됨); 및 (2) 인간 경쇄 프레임워크 영역, 인간 경쇄 CDR1 영역, 인간 경쇄 CDR2 영역 및 인간 경쇄 CDR3 영역 (여기서 인간 경쇄 CDR3 영역은 도 2 및 도 4에 나타난 14.1, 7.4 및 8.2의 CDR3 (또는 서열 4 또는 서열 8의 상응하는 아미노산 잔기)으로부터 선택됨)을 포함하는 항-CD89 항체 (여기서, 항체는 CD89에 결합함)를 추가로 제공한다. 상기 항체는 14.1, 7.4 또는 8.2의 중쇄 CDR2 및(또는) 경쇄 CDR2를 더 포함할 수 있다. 상기 항체는 14.1, 7.4 또는 8.2의 중쇄 CDR1 및(또는) 경쇄 CDR1을 더 포함할 수 있다.

<110> 바람직하게는, 상기 조작된 항체의 CDR1, CDR2 및(또는) CDR3은 본원에 개시된 14.1, 7.4 또는 8.2의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 그러나, 당업자는 항체가 CD89에 효과적으로 결합하는 능력을 여전히 보유하면서, 14.1, 7.4 및 8.2의 정확한 CDR 서열에서 약간 벗어나는 것 (예를 들면, 보존적 치환)도 가능할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 다른 실시양태에서 상기 조작된 항체는, 예를 들면 14.1, 7.4 또는 8.2의 1개 이상의 CDR과 90 %, 95 %, 98 % 또는 99.5 % 동일한 1개 이상의 CDR로 구성될 수 있다.

<111> 단순히 CD89에 결합하는 것 이외에, 상기한 것과 같은 조작된 항체는

<112> 1) CD89를 발현하는 살아있는 세포에 결합;

- <113> 2) CD89에 대한 높은 결합 친화도;
- <114> 3) CD89 상의 특정한 에피토프에 결합 (보체 활성을 갖는 모노클로날 항체와 함께 사용할 경우, 동일한 에피토프에 결합하기 위해 경쟁하는 가능성을 제거하기 위함);
- <115> 4) CD89 발현 세포의 오폐소닌화 (opsonization); 및(또는)
- <116> 5) 인간 이펙터 세포의 존재 하에, CD89 발현 세포의 성장 저해, 식세포작용 및(또는) 사멸을 매개
- <117> 하는 것과 같은, 본 발명 항체의 다른 기능적 성질 보유에 대해 선택될 수 있다.
- <118> CD89에 대한 인간 모노클로날 항체 결합의 특성화
- <119> 본 발명의 인간 모노클로날 CD89 항체의 결합을 특성화하기 위해, 예를 들면 ELISA로 면역화 마우스의 혈청을 시험할 수 있다. ELISA 프로토콜의 전형적인 (그러나, 비제한적인) 예에서는, 마이크로타이터 플레이트를 PBS 중의 정제된 CD89 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 코팅한 후, PBS 중의 5 % 소혈청 알부민으로 블로킹한다. CD89-면역화 마우스의 혈장 희석액을 각 웰에 첨가하고, 37 °C에서 1 내지 2시간 동안 인큐베이션한다. 이 플레이트를 PBS/트윈 (Tween)으로 세척한 후, 알칼리성 포스파타제에 접합된 염소-항-인간 IgG Fc-특이적 폴리클로날 시약을 첨가하여 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 세척 후, 플레이트는 pNPP 기질 (1 mg/ml)로 현상하고, 405 내지 650의 OD에서 분석한다. 바람직하게는, 가장 높은 역가를 나타내는 마우스를 융합에 사용할 것이다.
- <120> 이와 같은 ELISA 분석법은 CD89 면역원에 양성 반응성을 나타내는 하이브리도마를 스크리닝하는 데에 이용될 수도 있다. CD89에 대한 높은 결합력으로 결합하는 하이브리도마를 서브클로닝하고 그 특징을 더 규명할 것이다. 모세포의 반응성을 보유하는 (ELISA로 분석함) 각 하이브리도마로부터의 1개의 클론을 선택하여, 5 내지 10개의 바이알 세포 배양 (-140 °C에 저장함)을 제조할 수 있고 항체를 정제할 수 있다.
- <121> 인간 항-CD89 항체를 정제하기 위해, 선별된 하이브리도마를 2 리터 스피너-플라스크에서 배양하여 모노클로날 항체를 정제할 수 있다. 상등액을 여과하고 농축한 후 단백질 A-세파로스 (Pharmacia, Piscataway, NJ)를 사용한 친화 크로마토그래피를 수행할 수 있다. 용출된 IgG는 겔 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피로 분석하여 순도를 확인할 수 있다. 완충 용액을 PBS로 교체할 수 있고, 1.43 흡광 계수를 이용한 OD₂₈₀으로 농도를 측정할 수 있다. 모노클로날 항체는 분취하여 -80 °C에 저장할 수 있다.
- <122> 선별된 인간 항-CD89 모노클로날 항체가 특정한 에피토프에 결합하는 것을 측정하기 위해, 시판 중인 시약 (Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 각 항체를 바이오틴화할 수 있다. 상기한 바와 같이 CD89가 코팅된 ELISA 플레이트를 이용하여, 표지되지 않은 모노클로날 항체 및 바이오틴화된 모노클로날 항체를 사용한 경쟁 연구를 수행할 수 있다. 바이오틴화된 mAb의 결합은 스트렙-아비딘 알칼리성 포스파타제 프로브로 검출할 수 있다.
- <123> 정제된 항체의 이소타입을 결정하기 위해, 이소타입 ELISA를 수행할 수 있다. 예를 들면, 마이크로타이터 플레이트의 웰을 4 °C에서 밤새 항-인간 Ig 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 코팅할 수 있다. 5 % BSA로 블로킹한 후, 상기 플레이트를 상온에서 2시간 동안 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모노클로날 항체 또는 정제된 이소타입 대조군과 반응시킨다. 그 후, 웰을 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이적 알칼리성 포스파타제가 접합된 프로브와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 전술한 바와 같이 현상하고 분석한다.
- <124> 모노클로날 항체가, CD89를 발현하는 살아있는 세포에 결합하는 것을 입증하기 위해, 유동 세포 계수기 (flow cytometry)를 이용할 수 있다. 전형적인 (그러나 비제한적인) 유동 세포 계수기 프로토콜을 예시하면, CD89를 발현하는 세포주 (표준 성장 조건 하에서 성장한 것)를, 0.1 % 트윈 80 및 20 % 마우스 혈청이 함유된 PBS 중의 다양한 농도의 모노클로날 항체와 혼합하고, 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 세척 후, 상기 세포를 1차 항체 염색과 동일한 조건 하에서 플루오레세인 (Fluorescein)으로 표지된 항-인간 IgG 항체와 반응시킨다. 광, 및 단일 세포 상에서 나타나는 측면 산란성을 이용한 FACSscan 기구로 샘플을 분석할 수 있다. 형광 현미경을 이용한 다른 분석법을 유동 세포 계수기 분석법과 함께 또는 유동 세포 계수기 분석법 대신에 사용할 수 있다. 전술한 바와 같이 세포를 염색하고 형광 현미경으로 조사할 수 있다. 이 방법으로 개별 세포를 볼 수 있지만, 항원의 밀도에 따라 민감성이 감소될 수 있다.
- <125> 웨스턴 블랏팅 (Western blotting)으로 항-CD89 인간 IgG와 CD89 항원의 반응성에 대해 더 시험할 수 있다. 예를 들면, CD89를 발현하는 세포로부터의 세포 추출물을 준비하여 나트륨 도데실 술페이트 (SDS) 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분석할 수 있다. 전기영동 후, 분리된 항원을 니트로셀룰로스 막에 옮기고 20 % 마우스 혈청으로 블로킹하고, 시험할 모노클로날 항체로 탐지한다. 인간 IgG 결합은 항-인간 IgG 알칼리성 포스

파타제를 사용하여 검출하고, BCIP/NBT 기질 정제 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)로 현상할 수 있다.

II. 인간 모노클로날 항-CD89 항체를 생산하는 인간 이외의 트랜스제닉 동물 제조

또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 바람직하게는 고 친화도를 갖고 CD89에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 발현할 수 있는 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)을 제공한다. 바람직한 실시양태에서는, 상기 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스 (HuMab 마우스))은 인간 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는다. 한 실시양태에서, 상기 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)은 정제된 CD89 항원 또는 CD89 항원이 풍부한 제제, 및(또는) CD89를 발현하는 세포로 면역화된다. 바람직하게는, 상기 인간 이외의 트랜스제닉 동물 (예를 들면, 트랜스제닉 마우스)은 V-D-J 재조합 및 이소타입 전환을 통해, CD89에 대한 인간 모노클로날 항체의 다수의 이소타입 (예를 들면, IgG, IgA 및(또는) IgE)들을 생산할 수 있다. 이소타입 전환은, 예를 들면 고전적인 또는 비-고전적인 이소타입 전환에 의해 발생할 수 있다.

이중항체 레파토리를 이용하여 외래 항원 자극에 대해 반응하는 인간 이외의 트랜스제닉 동물을 디자인하는 것은, 이중 면역글로블린 트랜스진이 트랜스제닉 동물 내에 포함되어 있고 B-세포 발생 경로를 통해 정확하게 작동하는 것을 필요로 한다. 바람직한 실시양태에서, 이중 중쇄 트랜스진의 정확한 작동에는 이소타입 전환이 포함된다. 따라서, 본 발명의 트랜스진은 이소타입 전환, 및 (1) 고 수준의 세포-유형 특이적 발현, (2) 기능성 유전자 재배열, (3) 대립유전자 배제의 활성화 및 대립유전자 배제에 대한 반응, (4) 주요 레파토리의 충분한 발현, (5) 신호 전달, (6) 체세포 과다돌연변이, 및 (7) 면역 반응 동안의 트랜스진 항체 좌위의 우성화 (domination) 중 하나 이상을 나타내도록 구성된다.

상기 기준 모두를 충족시킬 필요는 없다. 예를 들면, 트랜스제닉 동물에서 내생의 면역글로블린 좌위의 기능이 손상된 실시양태의 경우, 트랜스진은 대립유전자 배제를 활성화할 필요가 없다. 또한, 트랜스진이 기능적으로 재배열된 중쇄 및(또는) 경쇄 면역글로블린 유전자를 포함하는 실시양태의 경우, 기능적 유전자 재배열의 두번째 기준은 적어도 트랜스진이 이미 재배열된 경우에는 필요치 않다. 분자 면역학의 배경 기술에 대하여는, 이 거명을 통해 본원에 참고문헌으로 포함된 문헌 [Fundamental Immunology, 2nd edition (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N. Y.]을 참조한다.

몇몇 실시양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생산하는 데 이용되는 인간 이외의 트랜스제닉 동물은 트랜스제닉 동물의 생식세포주에서 재배열된 이중 면역글로블린 중쇄 및 경쇄 트랜스진, 재배열되지 않은 이중 면역글로블린 중쇄 및 경쇄 트랜스진, 또는 이들의 조합을 갖고 있다. 중쇄 트랜스진은 각각 1개 이상의 C_H 유전자를 포함한다. 또한, 중쇄 트랜스진은 트랜스제닉 동물의 B-세포에서 다수의 C_H 유전자를 코딩하는 이중성 트랜스진의 이소타입 전환을 뒷받침할 수 있는 기능적 이소타입 전환 서열을 가질 수 있다. 이러한 전환 서열은 트랜스진 C_H 유전자의 공급원 역할을 하는 종으로부터의 생식세포주 면역글로블린 좌위에서 자연적으로 발생하는 것이거나, 또는 이러한 전환 서열이 트랜스진 작제물을 수용하게 될 종 (트랜스제닉 동물)에서 발생하는 것들로부터 유래할 수 있다. 예를 들면, 트랜스제닉 마우스를 제조하는 데 사용되는 인간 트랜스진 작제물은, 이 구조물이 마우스 중쇄 좌위에서 자연적으로 발생하는 것과 유사한 전환 서열을 포함하는 경우에 이소타입 전환 사건이 더 높은 빈도로 나타날 수 있으며, 이것은 아마도 마우스 전환 서열이 마우스 전환 리콤비나제 효소 시스템을 이용하여 작동을 최적화하지만 인간 전환 서열의 경우에는 그렇지 못한 것과 같을 것이다. 전환 서열은 통상의 클로닝 방법에 의해 단리되고 클로닝되거나, 또는 면역글로블린 전환 영역 서열과 관련된 공개 서열 정보를 기초로 디자인된 합성 올리고뉴클레오타이드를 중첩시켜 신생 (de novo) 합성될 수 있다. (이 거명을 통해 본원에 참고문헌으로 포함된 문헌 [Mills et al., Nucl. Acids Res. 15: 7305-7316 (1991); Sideras et al., Intl. Immunol. 1: 631-642 (1989)] 참조).

상기 각각의 트랜스제닉 동물에서, 기능적으로 재배열된 이중성 중쇄 및 경쇄 면역글로블린 트랜스진은 트랜스제닉 동물의 B-세포내에 상당한 비율 (10 % 이상)로 존재한다.

본 발명의 트랜스제닉 동물을 제조하는 데 사용된 트랜스진에는, 1개 이상의 가변 유전자 절편, 1개의 변화 (diversity) 유전자 절편, 1개의 연결 (joining) 유전자 절편 및 1개 이상의 불변 영역 유전자 절편을 코딩하는 DNA를 포함하는 중쇄 트랜스진이 포함된다. 면역글로블린 경쇄 트랜스진에는 1개 이상의 가변 유전자 절편, 1개의 연결 유전자 절편 및 1개 이상의 불변 영역 유전자 절편을 코딩하는 DNA가 포함된다. 중쇄 및 경쇄 유전자 절편을 코딩하는 유전자 절편은 인간 이외의 트랜스제닉 동물로 구성되지 않은 종으로부터의 면역글로블린 중쇄 및 경쇄 유전자 절편을 코딩하는 DNA로부터 유래하거나 또는 이 DNA와 상응한다는 점에서 인간 이외의 트

랜스제닉 동물에 대하여 이중성이다. 본 발명의 한 측면에 있어서, 상기 트랜스진은 각 유전자 절편이 재배열되지 않도록, 즉 기능적 면역글로블린 경쇄 또는 중쇄를 코딩하도록 재배열되지 않게 구성된다. 재배열되지 않은 이러한 트랜스진은 V, D 및 J 유전자 절편의 재조합 (기능적 재배열)을 유지시키며, 바람직하게는 CD89 항원에 노출되는 경우에 D 영역 유전자 절편의 전부 또는 일부가, 인간 이외의 트랜스제닉 동물 내에서 생성된 재배열된 면역글로블린 중쇄 내로 혼입되는 것을 유지시킨다.

<133> 별도의 실시양태에서, 상기 트랜스진은 재배열되지 않은 "미니좌위"를 포함한다. 이러한 트랜스진은 전형적으로 C, D 및 J 절편 뿐만 아니라 V 유전자 절편 하위 세트의 실질적인 부분을 포함한다. 이와 같은 트랜스진 작제물에서, 다양한 조절 서열, 예를 들면 프로모터 서열, 인핸서 서열, 클래스 전환 영역 서열, RNA 프로세싱에 대한 스플라이스-공여체 및 스플라이스-수용체 서열, 및 재조합 신호 서열 등은 이중 DNA로부터 유도된 상응하는 서열을 포함한다. 이러한 조절 서열은 본 발명에 이용된 인간 이외의 동물과 동일한 종 또는 그와 관련된 종으로부터의 트랜스진 내로 혼입될 수 있다. 예를 들면, 인간 면역글로블린 유전자 절편은 트랜스제닉 마우스에서 사용된 설치류 면역글로블린 인핸서 서열을 갖는 트랜스진과 결합할 수 있다. 별법으로, 합성 조절 서열은 트랜스진 내에 혼입될 수 있으며, 여기서 합성 조절 서열은 포유류의 게놈에서 자연적으로 발생하는 것으로 알려진 기능적 DNA 서열과 상동성이 없다. 합성 조절 서열은, 예를 들면 스플라이스-수용체 부위 또는 프로모터/인핸서 모티프 (motif)의 허용가능한 서열을 특정화하는 것과 같은 공통의 규칙에 따라 디자인된다. 예를 들면, 미니좌위는 자연 발생적인 생식세포주 Ig 좌위에 비해 필수적이지 않은 DNA 부분 (예를 들면, 개재 (intervening) 서열; 인트론 또는 그의 부분)의 내부(즉, 그 부분의 말단부는 아님)에서 결실을 1개 이상 갖는 게놈 면역글로블린 좌위의 부분을 포함한다.

<134> 본 발명의 바람직한 실시양태에서, CD89에 대한 인간 항체를 생산하는 데 이용된 트랜스제닉 동물은, 그 내용이 본원에 참고문헌으로 포함된 WO 98/24884의 실시예 12에 기재된 트랜스진 (예를 들면, pHCl 또는 pHCl2)을 1 카피 (copy) 이상, 전형적으로 2 내지 10 카피, 때로는 25 내지 50 카피 또는 그 이상을 포함하며, WO 98/24884의 실시예 5, 6, 8 또는 14에 기재된 경쇄 트랜스진의 단일 카피를 포함하는 동물과 교배되고, 그 자손은 WO 98/24884의 실시예 10에 기재된 J_H 결실 동물과 교배된다. 동물을 교배하여 이 세가지 특성 각각에 대한 동형 접합체를 만들어 낸다. 이들 동물은 하기의 유전자형을 갖는다: 재배열되지 않은 인간 중쇄 미니좌위의 단일 카피 (염색체 반수체 세트 당) (WO 98/24884의 실시예 12에 기재됨); 재배열된 인간 κ 경쇄 작제물의 단일 카피 (염색체 반수체 세트 당) (WO 98/24884의 실시예 14에 기재됨); 및 기능적 J_H 절편의 전부가 제거되는, 내생의 마우스 중쇄 좌위 각각에서의 결실 (WO 98/24884의 실시예 10에 기재됨). 이러한 동물을 J_H 절편의 결실에 대해 동형접합인 마우스 (WO 98/24884의 실시예 10)와 교배하여, J_H 결실에 대하여 동형접합이고 인간 중쇄 및 경쇄 작제물에 대하여는 반접합인 자손을 생산한다. 생산된 동물에 항원을 주사하고, 이 동물을 상기 항원에 대한 인간 모노클로날 항체를 생산하는 데에 이용한다.

<135> 이러한 동물로부터 단리된 B 세포는 각 유전자의 단일 카피만을 포함하고 있기 때문에 인간 중쇄 및 경쇄에 대하여 단일특이적이다. 또한, 상기 B 세포는 내생의 마우스 중쇄 유전자 카피 2개 모두가, WO 98/24884의 실시예 9 및 12에 기재된 바와 같이 도입된 J_H 영역에 걸친 결실에 의해 기능적이지 못하기 때문에 인간 또는 마우스 중쇄에 대하여 단일특이적일 것이다. 또한, B 세포의 실질적인 부분은, 재배열된 인간 κ 경쇄 유전자의 단일 카피의 발현이 B 세포의 상당한 부분에서 내생의 마우스 κ 및 람다 λ 유전자의 재배열을 대립유전자적으로 및 이소타입적으로 배제할 것이기 때문에 인간 또는 마우스 경쇄에 대하여 단일특이적일 것이다.

<136> 바람직한 실시양태의 트랜스제닉 마우스는 천연 마우스의 면역글로블린과 이상적으로 실질적으로 유사한, 상당한 레퍼토리를 포함하는 면역글로블린을 생산할 것이다. 따라서, 예를 들면 내생의 Ig 유전자가 불활성화된 경우의 실시양태에서, 면역글로블린의 총 수준은 혈청 1 ml 당 약 0.1 내지 10 mg, 바람직하게는 혈청 1 ml 당 0.5 내지 5 mg, 이상적으로는 혈청 1 ml 당 약 1.0 mg 이상의 범위일 것이다. IgM으로부터 IgG로의 전환을 수행할 수 있는 트랜스진이 트랜스제닉 마우스에 도입된 경우에, 성체 마우스의 혈청 내 IgG 대 IgM의 비율은 바람직하게는 약 10:1이다. IgG 대 IgM 비율은 비성숙 마우스에서는 훨씬 더 낮을 것이다. 일반적으로, 비장 및 림프절 B 세포의 약 10 % 초과, 바람직하게는 40 내지 80 %가 인간 IgG 단백질을 독점적으로 발현한다.

<137> 레퍼토리는 이상적으로는 비-트랜스제닉 마우스에서 나타난 것과 비슷하고, 일반적으로는 그의 약 10 % 이상일 것이며, 바람직하게는 25 내지 50 % 이상일 것이다. 일반적으로, 약 1,000종 이상의, 바람직하게는 10⁴ 내지 10⁶ 종 이상의 서로 다른 면역글로블린 (이상적으로는 IgG)이, 마우스 게놈내에 도입된 서로 다른 V, J 및 D 영역의 수에 주로 의존하여 생산될 것이다. 이러한 면역글로블린은 전형적으로 매우 항원성인 단백질 (예를

들면, 스타필로코쿠스 (staphylococcus) 단백질 A)의 약 1/2 이상을 인식할 것이다. 전형적으로, 상기 면역글로블린은 미리 선택된 항원에 대하여 약 10^7 M^{-1} 이상, 바람직하게는 약 10^9 M^{-1} 이상, 더 바람직하게는 약 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , 10^{12} M^{-1} 또는 그 이상 (예를 들면, 10^{13} M^{-1} 이하 또는 초과)의 친화도를 나타낼 것이다.

<138> 몇몇 실시양태에서, 예정된 항원 타입에 대한 항체 반응에서 나타나는 V 유전자의 선택을 제한하기 위해서는, 예정된 레퍼토리를 갖는 마우스를 생산하는 것이 바람직할 수 있다. 예정된 레퍼토리를 갖는 중쇄 트랜스진은, 예를 들면 인간에서 예정된 항원 유형에 대한 항체 반응에서 주로 이용되는 인간 VH 유전자를 포함할 수 있다. 별법으로, 몇몇 VH 유전자는 다양한 이유로 인해 (예를 들면, 예정된 항원에 대한 고 친화성 V 영역을 코딩할 가능성이 낮기 때문에; 체세포 돌연변이 및 친화성 증대를 수행할 성향이 낮기 때문에; 또는 어떤 인간에 대하여 면역원성이기 때문에) 정의된 레퍼토리로부터 배제될 수 있다. 따라서, 다양한 중쇄 또는 경쇄 유전자 절편을 지닌 트랜스진의 재배열에 앞서, 이러한 유전자 절편은 예를 들면, 혼성화 또는 DNA 서열분석에 의해 트랜스제닉 동물 이외의 다른 유기체 종으로부터의 유전자 절편임을 쉽게 확인할 수 있다.

<139> 상기한 바와 같이 본 발명의 트랜스제닉 마우스를, 정제된 CD89 항원 제제 또는 CD89 항원이 풍부한 제제 및(또는) CD89 발현 세포로 면역화할 수 있다. 이 마우스는 트랜스진 내의 전환 재조합 (시스-전환)을 통해 클래스-전환을 수행하여 CD89에 반응성인 면역글로블린을 발현하는 B 세포를 생산할 것이다. 면역글로블린은 인간 서열 항체일 수 있으며, 여기서 그의 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드는, 체세포 돌연변이에 의해 유도되는 서열 및 V 영역 재조합 연결부 뿐만 아니라 생식세포주-코딩 서열을 포함할 수 있는 인간 트랜스진 서열에 의해 코딩되며, 이러한 인간 면역글로블린 서열은, 체세포 돌연변이 및 특이한 V-J 및 V-D-J 재조합 연결의 결과로서 다른 비-생식세포주 서열이 존재할 경우에도 인간 V_L 또는 V_H 유전자 절편, 및 인간 J_L 또는 J_H 절편에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열과 실질적으로 동일한 것으로 언급될 수 있다. 이러한 인간 서열 항체에 대하여, 각 쇄의 가변 영역은 인간 생식세포주 V, J 및 (중쇄의 경우에는) D 유전자 절편에 의해 전형적으로 80 % 이상 코딩되고, 종종 가변 영역의 85 % 이상은 트랜스진 상에 존재하는 인간 생식세포주 서열에 의해 코딩되며, 흔히 가변 영역 서열의 90 또는 95 % 이상은 트랜스진 상에 존재하는 인간 생식세포주 서열에 의해 코딩된다. 그러나, 비-생식세포주 서열은 체세포 돌연변이 및 VJ 및 VDJ 연결에 의해 도입되기 때문에, 인간 서열 항체는 흔히, 마우스의 생식세포주 내의 인간 트랜스진에서 발견되는 인간 V, D 또는 J 유전자 절편에 의해 코딩되지 않는 일부 가변 영역 서열 (보다 덜 흔하게는 불변 영역 서열)을 가질 것이다. 전형적으로, 이러한 비-생식세포주 서열 (또는 각각의 뉴클레오티드 위치)은 CDR 내에 또는 그 근처에, 또는 체세포 돌연변이가 밀집되어 있는 것으로 알려진 영역 내에 밀집되어 있을 것이다.

<140> 예정된 항원에 결합하는 인간 서열 항체는, 인간 서열 γ 쇄 (예를 들면, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$ 또는 $\gamma 3$) 및 인간 서열 경쇄 (예를 들면, κ)를 포함하는 인간 항체가 생산되도록, 이소타입 전환으로부터 형성될 수 있다. 이러한 이소타입-전환된 인간 서열 항체는 흔히, 항원에 의한 B 세포의 친화도 성숙 및 선택의 결과로서, 특히 그 후 2차 (또는 그 이후의) 항원 투여의 결과로서, 전형적으로는 가변 영역 내에, 흔히 CDR의 잔기 약 10개 또는 그 안에 1개 이상의 체세포 돌연변이를 갖는다. 이와 같은 고 친화도 인간 서열 항체는 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상, 전형적으로 $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상, 종종 $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 이상, 때로는 $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 내지 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 이상의 결합 친화도를 가질 수 있다.

<141> 본 발명의 다른 측면은, CD89에 대해 고 친화도 (예를 들면, $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 초과)로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 발현하는 하이브리도마를 생산하는데 사용될 수 있는 마우스 유래의 B 세포에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 다른 실시양태에서, 이러한 하이브리도마는 $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상의 친화도 상수 (K_a)를 갖고 CD89와 결합하는 면역글로블린을 포함하는 조성물을 생산하는데 이용되며, 여기서 상기 면역글로블린은,

<142> (1) 인간 V_L 유전자 절편 및 인간 J_L 절편에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 (2) 인간 C_L 유전자 절편에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 경쇄 불변 영역으로 구성된 인간 서열 경쇄; 및

<143> (1) 인간 V_H 유전자 절편, 임의로는 D 영역 및 인간 J_H 절편에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 (2) 인간 C_H 유전자 절편에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열과 실질적으로 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 불변 영역으로 구성된 인간 서열 중쇄

- <144> 를 포함한다.
- <145> CD89에 대한 고 친화성 인간 모노클로날 항체의 발생은 통합된 인간 면역글로블린 트랜스진을 포함하는 계놈을 갖는 트랜스제닉 마우스에서 인간 가변 영역 유전자 절편의 레퍼토리를 확장하는 방법에 의해 촉진되며, 이 방법은 통합된 인간 면역글로블린 트랜스진에는 존재하지 않는 V 영역 유전자 절편을 포함하는 V 유전자 트랜스진을 계놈 내에 도입하는 것을 포함한다. 흔히, V 영역 트랜스진은, 인간 계놈에서 자연적으로 발생하거나 또는 재조합 방법에 의해 서로 각각 스플라이싱될 수 있고, 인간 V_H 또는 $V_L(V_K)$ 유전자 절편 분석의 일부를 포함하는 효모 인공 염색체이며, 순서를 벗어나거나 또는 생략된 V 유전자 절편이 포함될 수 있다. 흔히, 5개 이상의 기능적 V 유전자 절편은 YAC 상에 함유되어 있다. 이 방법의 변형법에서, V 레퍼토리 확장 방법에 의해 생산된 트랜스제닉 마우스를 만들 수 있으며, 이 마우스는 V 영역 트랜스진상에 존재하는 V 영역 유전자 절편, 및 인간 Ig 트랜스진에서 코딩되는 C 영역에 의해 코딩되는 가변 영역 서열을 포함하는 면역글로블린쇄를 발현시킨다. V 레퍼토리 확장 방법에 의해, 5개 이상의 별개의 V 유전자를 갖는 트랜스제닉 마우스를 생산할 수 있으며, 약 24개 이상의 V 유전자를 지닌 마우스도 생산할 수 있다. 몇몇 V 유전자 절편은 비-기능적일 수 있으며 (예를 들면, 슈도진 (pseudogene) 등), 이러한 절편은 보유되거나, 또는 필요할 경우 당업자에게 공지된 재조합 방법에 의해 선택적으로 결실될 수 있다.
- <146> 마우스 생식세포주가, J 및 C 유전자 절편을 가진 인간 Ig 트랜스진에는 실질적으로 존재하지 않는 확장된 V 절편 레퍼토리를 갖는 기능적 YAC를 포함하도록 조작한다면, 확장된 V 절편 레퍼토리를 갖는 기능적 YAC가 다른 인간 Ig 트랜스진을 갖는 마우스 생식세포주 내로 도입되는 경우의 배경을 비롯한 다른 유전적 배경으로 전달되고 도입될 수 있다. 확장된 V 절편 레퍼토리를 가진 다기능성 YAC를 생식세포주 내로 도입하여 인간 Ig 트랜스진 (또는 다수의 인간 Ig 트랜스진들)과 함께 작동시킬 수 있다. 비록 본원에서는 YAC 트랜스진으로 언급하였지만, 이 트랜스진이 계놈 내로 통합되는 경우에, 이 트랜스진에는 효모에서의 자발적 복제에 필요한 서열 등의 효모 서열이 실질적으로는 결여되어 있을 수 있으며, 이러한 서열은 효모에서의 복제가 더 이상 필요하지 않게 된 다음에 (즉, 마우스 ES 세포 또는 마우스 전접합체 (prozygote)로의 도입에 앞서) 유전자 조작 (예를 들면, 제한 절단 및 필스-필드 겔 전기영동 또는 다른 적합한 방법)에 의해 임의로 제거될 수 있다. 인간 서열 면역글로블린의 발현 특성을 증대시키는 방법에는, 인간 Ig 트랜스진을 가진 트랜스제닉 마우스, 및 임의로는 확장된 V 절편 레퍼토리를 지닌 YAC를 가진 트랜스제닉 마우스를 기르는 것이 포함된다. V_H 및 V_L 유전자 절편은 둘 다 YAC 상에 존재할 수 있다. 상기 트랜스제닉 마우스는, 인간 Ig 트랜스진 및(또는) 인간의 다른 림프구 단백질을 코딩하는 트랜스진이 포함된 인간의 다른 트랜스진을 갖는 배경을 비롯한, 당업자에 의해 요구되는 모든 배경에 도입될 수 있다. 또한, 본 발명은 확장된 V 영역 레퍼토리 YAC 트랜스진을 갖는 트랜스제닉 마우스에 의해 생산되는 고 친화도 인간 서열 면역글로블린을 제공한다. 비록 앞 부분에서는 본 발명의 트랜스제닉 동물의 바람직한 실시양태에 대하여 기술되어 있지만, 하기의 4가지 범주로 분류된 다른 실시양태도 본 발명에서 고려된다.
- <147> I. 재배열되지 않은 중쇄 및 재배열된 경쇄 면역글로블린 트랜스진을 가진 트랜스제닉 동물;
- <148> II. 재배열되지 않은 중쇄 및 경쇄 면역글로블린 트랜스진을 가진 트랜스제닉 동물;
- <149> III. 재배열된 중쇄 및 재배열되지 않은 경쇄 면역글로블린 트랜스진을 가진 트랜스제닉 동물; 및
- <150> IV. 재배열된 중쇄 및 경쇄 면역글로블린 트랜스진을 가진 트랜스제닉 동물.
- <151> 이러한 트랜스제닉 동물 범주 중에서, 바람직한 순서는 $II > I > III > IV$ (여기서, 내생의 경쇄 유전자 (또는 적어도 κ 유전자)는 상동성 재조합 (또는 다른 방법)에 의해 낙아웃 (knock out)됨) 및 $I > II > III > IV$ (여기서, 내생의 경쇄 유전자는 낙아웃되지 않으며, 대립유전자 배제에 의해 우성화되어야 함)이다.
- <152> **III. CD89에 결합하는 이중특이적/다중특이적 분자**
- <153> 본 발명의 다른 실시양태에서, CD89에 대한 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 다른 기능성 분자, 예를 들면 다른 펩티드 또는 단백질 (예를 들면 Fab' 단편)으로 유도체화시키거나 그에 연결하여, 여러개의 결합 부위 또는 표적 에피토프와 결합하는 이중특이적 분자 또는 다중특이적 분자를 생성시킬 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 부분을 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체 등과 같은 하나 이상의 다른 결합 분자에 기능적으로 연결시킬 수 있다 (예를 들면 화학적 커플링, 유전자 융합 또는 비공유결합 등에 의해 연결함). 또한, 상기 항체 또는 항체 단편을 중앙 항원 등과 같은 항원에 연결시킴으로써 상기 항원이 CD89를 발현하는 면역 세포에 표적화되어, 예를 들면 항원이 내부화되었다가 제시되는 과정을 강화시켜

궁극적으로는 면역 반응을 자극하도록 할 수 있다.

<154> 따라서, 본 발명은 CD89에 대한 하나 이상의 제1 결합 특이성 및 표적 세포, 예를 들면 종양 세포의 표적 에피토프에 대한 제2 결합 특이성을 포함하는 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자를 포함한다. CD89에 대한 무린 항체 및 종양 항원에 대한 제2 항체를 포함하는 이중특이적 항체는 효과적인 항-종양제임이 입증된 바 있다. 예를 들면, 문헌 ([Valerius, T. et al. (1997) Blood 90:4485-4492] (G-CSF 요법과 병행하거나 병행하지 않고 사용한 Fc α RI x HER-2/Neu 이중특이적 항체의 항-종양 활성을 기재함), [Elsasser, D. et al. (1999) Anticancer Res. 19:1525-1528] (G-CSF 또는 GM-CSF 요법과 병행하거나 병행하지 않고 사용한 Fc α RI x EGFR 이중특이적 항체의 항-종양 활성을 기재함), [Stockmeyer, B. et al. (2000) J. Immunol. 165:5954-5961] (G-CSF 또는 GM-CSF 요법과 병행하거나 병행하지 않고 사용한 Fc α RI x CD20 이중특이적 항체의 항-종양 활성을 기재함), [Stockmeyer, B. et al. (2001) J. Immunol. Methods 248:103-111] (G-CSF 또는 GM-CSF 요법과 병행하거나 병행하지 않고 사용한 Fc α RI x CD20 및 Fc α RI x HER-2/neu 이중특이적 항체의 항-종양 활성을 기재함) 및 [Sundarapandian, K. et al. (2001) J. Immunol. Methods 248:113-123] (Fc α RI x CD30 이중특이적 항체의 항-종양 활성을 기재함))을 참조한다. 본 발명의 인간 항-CD89 항체는 항-종양제로서 동일한 유형의 이중특이적 작제물에 사용될 수 있다.

<155> 표적화될 수 있는 종양 세포는 유방, 난소, 전립선, 고환, 폐, 결장, 직장, 췌장, 간, 중추신경계, 신장, 머리, 목, 뼈, 혈액 및 림프계의 암 등을 비롯한 임의의 암 유형의 종양 세포이다. 바람직한 표적 항원에는 암종배아성 항원 (CEA), 가스트린 방출 펩티드 수용체 항원, 무신 항원, EGF-R, HER2/*neu*, HER3, HER4, CD20, CD30, MAGE 항원, SART 항원, MUC1 항원, c-erb-2 항원 및 TAG 72가 포함된다. TAG 72는, 예를 들면 유방, 결장 및 난소 종양에서 발견된다. CEA에 특이적인 항원 결합 영역은 예를 들면 MFE-23이라고 일컫는 단일쇄 항체로부터의 영역일 수 있으며, 문헌 ([Casey et al. (1994) J. Immunol. Methods 179:105] 및 [Chester et al. (1994) Lancet 343:455])에 기재되어 있다. 항-HER2/*neu* 항체는 세포주 520C9에 의해 생산된다 [Ring et al. 1991 J. Immunol. 28:915-917]. 항체 H425는 항-EGF-R 항체 M425의 인간화 형태이다. TAG 72에 대한 항체는 PCT 출원 공개 WO 93/11161, PCT 출원 공개 WO 90/04410 (허여된 유럽 특허 제365 997호에 상응함), PCT 출원 공개 WO 93/12231 및 PCT 출원 공개 WO 89/01783에 기재되어 있는 모노클로날 항체 cc49이다. 다른 항원은 B 세포 림프종, 예를 들면 HLA-DR, CD74, CD79, CD20, CD30, CD37 및 CD19과 관련된 항원일 수 있다. 다른 혈액 질환과 관련된 항원도 본 발명의 범위에 속한다. 따라서, 본 발명은 백혈병 및 림프종 등과 같은 혈액 세포 장애의 치료 방법도 제공한다.

<156> 유방암 및 난소암은 성 호르몬-의존성 암일 수 있다. 유방 종양은 비정상적으로 발현된 수용체, 예를 들면 인간-EGF-유사 수용체족 (HER), 예를 들면 HER-2, -3 및 -4의 수용체를 특징으로 할 수 있다. 본 발명은 HER 항원에 관한 이러한 실시양태에 제한되지 않는다. 천연 HER 리간드인 헤레굴린 (heregulin)은 암이 진행되는 동안 하나 이상의 HER 수용체를 발현하는 유방 종양 세포를 표적화하는 수단으로서 인간 모노클로날 항체, 예를 들면 이중특이적 항체 (BsAb) 또는 다중특이적 분자에 혼입될 수 있다. 추가로, 헤레굴린 분자는 예를 들면 HER-2, -3 또는 -4 각각의 단량체를 조합하여 함유하는 이중이량체 HER 수용체에 대한 결합 결정자이다. 한 실시양태에서, 모노클로날 항체는 미국 특허 제5,367,060호에 나타낸 헤레굴린 B2의 아미노산 171 내지 239를 포함한다. 미국 특허 제5,367,060호에 개시된 바와 같이, 헤레굴린 B2의 다른 부분 뿐만 아니라 다른 헤레굴린 분자의 부분을 사용할 수도 있다.

<157> 또한, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 중추신경계의 종양 치료에도 사용될 수 있다. 정상적인 포유동물의 태아 발생 동안에 발현되는 네스틴 단백질은 대부분의 형태의 뇌암을 비롯한 중추신경계의 종양에서 발현된다 (맥케이 (McKay), 디. 귀. 로날드 (D. G. Ronald)의 미국 특허 제5,338,839호, 1994년 8월 16일). 또한, 네스틴은 피부의 흑색종 및 다른 기관으로 전이된 흑색종에서도 발현 [V. A. Florenes, R. Holm, O. Myklebost, U. Lendahl, O. Fodstad, Cancer Res. 54:354-6, 1994]되며, 검출 및 치료가 어렵다. 뇌종양 치료에 본 발명의 분자들을 사용하는 경우, 바람직한 전달 부위는 중추신경계에 직접 전달하거나, 척추 주사 또는 미세 바늘 전달을 통해 뇌에 직접 전달하는 것이다. 전이성 암의 경우, 바람직한 전달 경로는 순환계에 직접 주사하거나, 본원에 기재한 생체의 혈액 방법을 이용하는 것이다.

<158> 본 발명의 방법을 사용할 수 있는 다른 종양 유형의 예로는 환자에서 정상적으로는 2개의 무손상 카피에서 발견되는 유전자의 단일 카피에서 체세포 돌연변이가 발생하여 일어난 소아 신장암인 빌름스 종양 (Wilm's tumor) [A. J. Buckler, K. M. Call, T. M. Glaser, D. A. Haber, D. E. Housman, C. Y. Ito, J. Pelletier, Rose, E. A. Rose, 미국 특허 제5,350,840호] 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 빌름스 종양은 95 %의 경우가 외과적으로 치유될 수 있으며, 결합체는 외과 환자를 위한 보조적 치료 양식으로서 적합하다고 여겨진다. 본 발

명의 물질의 조성물 및 방법이 적합한, 공지된 암-관련 단백질의 다른 예로는 위장관암 (알. 피셀 (R. Fishel) 등의 국제 출원 WO 95/14085, 1995년 5월 26일)과 관련된 단백질, 화학요법 동안에 여러가지 약물 내성 발생을 특징으로 하는 단백질 (제이. 엠. 크루프 (J. M. Croop) 등의 미국 특허 제5,198,344호), *Rb*, *ras* 및 *c-myc* 등과 같이 당업자에게 공지되어 그 서열을 당업자가 분석용으로 이용할 수 있는 다수의 종양유전자 등이 있다. 본 발명의 조성물은 예를 들면 종양 전이를 증대시킨다고 여겨지는 분비된 효소, 예를 들면 매트릭스 메탈로프로테이나제의 저해에 적합하다 [Liotta, L. A., et al., (1991), Cell, 64:327-336]. 상기와 같은 효소 저해의 실시양태에서, 매트릭스 메탈로프로테이나제에 대한 결합 결정자 및 Fc α R에 대한 다른 결합 결정자를 보유하는 결합제는 이들 효소의 원래 위치에서의 (*in situ*) 활성 저해 및 제거를 용이하게 할 것이다. 상기 조성물을 표준 외과 방법 및 화학요법과 병행하여 사용하는 경우에는 암 재발이 감소되고 장기간 생존률이 증가될 것이라 예측된다.

<159> 이펙터 세포는 종양 세포 뿐만 아니라, 자가-항체를 생산하는 림프구를 표적으로하여 자가면역 질환의 치료하거나, IgE를 생산하는 림프구를 표적으로 하여 알레르기를 치료할 수 있다. 본 발명의 결합제로 치료할 수 있는 자가면역 장애로는 진성 당뇨병, 관절염 (류마티스 관절염, 연소성 류마티스 관절염, 골관절염, 건선성 관절염 등), 다발성 경화증, 중증 근무력증, 진신성 홍반성 루푸스, 자가면역 갑상선염, 피부염 (아토피성 피부염 및 습진 피부염 등), 건선, 쇼그렌 증후군 (Sjogren's Syndrome) 및 쇼그렌 증후군에 이어지는 건조 각막결막염, 원형 탈모증, 절지동물에 물려서 일어나는 반응으로 인한 알레르기 반응, 크론병, 아프타성 궤양, 홍채염, 결막염, 각막결막염, 궤양성 대장염, 천식, 알레르기성 천식, 피부 홍반성 루푸스, 경피증, 질염, 직장염, 약물 발진, 나병 역전 반응, 나병 결절 홍반, 자가면역 포도막염, 알레르기성 뇌척수염, 급성 피사성 출혈 뇌장애, 특발성 양쪽 진행성 감각신경 난청, 재생불량성 빈혈, 순수 적혈구 빈혈, 특발성 혈소판감소증, 다발연골염, 베게너 육아종증, 만성 간염, 스티븐스-존슨 증후군, 특발성 스프루우, 편평 태선, 크론병, 그레브스 눈병, 유육종증, 원발성 담즙 간경변, 후포도막염 및 간질성 폐 섬유증 등이 있다. 따라서, 자가면역 질환은 예를 들면 인간 CD89에 특이적인 하나 이상의 항원 결합 영역 및 자가면역 세포상의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 보유하는 항체를 자가면역 질환을 앓는 대상체에게 투여함으로써 치료할 수 있다. 한 실시양태에서, 표적 에피토프는 자가-항체상의 에피토프이다. 따라서, 표면에 자가-항체를 보유하는 휴지기의 B 림프구는 B 림프구와 CD89를 발현하는 이펙터 세포를 연결짓는 다중특이적 항체에 의해 표적화되어 파괴됨으로써, 이펙터 세포 기능을 유도하여 B 림프구의 용해를 초래할 수 있다.

<160> 유사하게, CD89에 대한 하나 이상의 결합 특이성 및 IgE를 생산하는 림프구상의 에피토프에 대한 하나 이상의 결합 특이성을 보유하는 항체를 알레르기 치료에 사용할 수 있다. 또한, 대상체의 알레르기 치료에 사용되는 항체는 IgE 항체상의 에피토프에 대해 특이적인 하나 이상의 항원 결합 영역을 보유하는 결합제일 수도 있다. 따라서, 이러한 결합제는 CD89를 발현하는 이펙터 세포 및 표면이 IgE로 코팅되어 있는 표적 세포, 예를 들면 호염기구 및 비만 세포를 연결함으로써, 표적 세포를 용해시킬 수 있다. 이러한 처치는 항원이 IgE 분자에 결합하는 것을 방지할 수 있기 때문에, 이들 세포가 알레르기에 관여하는 매개인자, 예를 들면 히스타민을 분비하는 것을 방지할 수도 있다. 추가로, 항체는 가용성 IgE에 결합함으로써 IgE가 비만 세포 및 호염기구에 결합하는 것을 방지할 수도 있다.

<161> 또한, 표적은 미생물 (박테리아 또는 바이러스) 또는 가용성 항원 (예를 들면 류마티스 유사 인자 또는 다른 자가항체 및 독소)일 수도 있다. 미생물은 병원체, 예를 들면 바이러스, 박테리아, 진균, 원생동물 등을 포함한다. 또한, 미생물은 미생물에 의해 감염된 세포, 예를 들면 병원체로 감염된 세포를 표적화함으로써 표적화될 수도 있다.

<162> 따라서, 본 발명은 예를 들면 감염증을 앓는 대상체에게 CD89에 대해 특이적인 하나 이상의 항원 결합 영역 및 미생물상의 에피토프에 대해 특이적인 하나 이상의 항원 결합 영역을 보유하는 본 발명의 이중특이적 분자를 유효량으로 투여함으로써 감염증을 치료하는 방법을 제공한다. 용어 "감염성 질환"은 1종 이상의 박테리아, 바이러스, 진균 및 원생동물에 의해 초래되는 장애를 포함하는 것을 의미하며, 이러한 질환을 초래하는 유기체를 통칭하여 "병원체"라고 지칭한다. 본 발명에서, 병원체의 예로는 마이코박테리움 투베르쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 레프라 (*M. leprae*), 슈도모나스 에루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 시겔라 디센테리아 (*Shigella dysenteria*), 살모넬라 티피 (*Salmonella typhi*), 살모넬라 파라티피 (*S. paratyphi*), 스타필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코쿠스 헤모리틱우스 (*Streptococcus hemolyticus*), 헤모필루스 뉴모니아 (*Hemophilus pneumoniae*), 에셰리히아 콜라이 (*Escherichia coli*) 혈청형 O157, 클라미디아 (*Chlamydia*) 종, 헬리코박터 (*Helicobacter*) 종, HIV-1, -2 및 -3, HTLV, FELV, HSV-I 및 -II, B형 간염 바이러스 (예를 들면 HBV 주 표면 항원), 비-A형 비-B형 비-C형 간염

바이러스, 엡스테인-바르 바이러스 (EBV 당단백질), 폭스 바이러스, 광견병 바이러스; 아스퍼질러스 (*Aspergillus*) 종; 엔트아메바 히스톨리티카 (*Entamoeba histolytica*), 지아르디아 (*Giardia*) 종; 뉴캐슬병 바이러스; 톡소플라스마 곤다이 (*Toxoplasma gondii*); 및 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 단백질 스크리닝 및 펩티드 분석을 통해, 이들 유기체로부터 독특한 에피토프를 시험관내 수득하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 바람직한 항체는 이들 미생물 중 임의의 미생물 상의 에피토프에 대해 특이적인 하나 이상의 항원 결합 영역을 보유한다.

<163> 바람직한 실시양태에서, 상기 항체는 HIV 바이러스의 외피 당단백질, 예를 들면 HIV의 gp41에 대해 특이적인 항원 결합 영역을 보유한다. gp120 또는 CD4에 대해 특이적인 항체도 본 발명의 범위에 속한다. 한 실시양태에서, 상기 항체는 인간 항-HIV-1 IgG1 mAb, DZ33으로부터 유래한다.

<164> IgA는 점막 방어에서 중요한 역할을 하고, CD89는 점막 영역의 이펙터 세포, 예를 들면 단핵구 및 대식세포상에서 발견된다 (예를 들면, 문헌 [Shen, L. and Collins, J. (1989) Immunology 68:491] 참조). 예를 들면, 폐에서 점막 표면의 단핵구 및 대식세포 등은 CD89를 발현하는 것으로 밝혀졌다 [Shen, L. and Collins, J. (1989) Immunology 68:491]. 따라서, 본 발명은 점막 영역으로부터 미생물 또는 불필요한 임의의 세포를 제거하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 점막 부위가 종종 유기체 침입의 진입 지점이라는 측면과, 추가로는 과산화물이 강력한 미생물 작용제라는 측면에서 특히 유용하다. 예를 들면, 수퍼옥사이드 등과 같은 산소 대사물질은 살균 및 정균 효과를 갖는 것으로 나타났다.

<165> 표적 에피토프에 대한 항원 결합 영역은 수용체에 대한 리간드, 예를 들면 성장 인자 또는 분화 인자일 수도 있으며, 이들 성장 인자 또는 분화 인자에 대한 수용체를 보유하는 세포에 대한 결합제를 표적으로 할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 항체는 표적 성장 인자 (EGF) 또는 표적 성장 인자 수용체 (EGF-R)와 상호작용할 수 있는 그의 적어도 일부 또는 그의 변형된 형태를 포함할 수 있다. 또한, 상기 항체는 헤레굴린의 결합 부분을 포함할 수도 있다. 본 발명의 다른 바람직한 실시양태에서, 리간드는 작은 펩티드, 예를 들면 붐베신, 가스트린-방출 펩티드 (GRP), 리토린, 뉴로메딘 B 또는 뉴로메딘 C이다. 상기 펩티드의 서열은 예를 들면 미국 특허 제 5,217,955호 등에서 찾을 수 있으며, 상기 문헌의 내용은 본원에 참고문헌으로 인용된다. 상기 리간드는 이들 펩티드 중 임의의 펩티드의 변형된 형태일 수도 있다. 변형은 수용체와의 결합을 증가시킬 수도 있고, 수용체와의 결합을 감소시킬 수도 있으며, 또는 수용체와의 결합에 영향을 미치지 않을 수도 있다. 또한, 리간드 변형은 효능제를 길항제로 전환시켜, 리간드가 세포 증식을 자극하는 것이 아니라 저해할 수도 있다. 리간드 변형은 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실, 치환 또는 변형일 수 있다.

<166> 표적화를 위한 이펙터 세포는 인간 백혈구, 바람직하게는 대식세포일 수 있다. 다른 세포로는 단핵구 또는 다른 IgA-수용체 보유 세포 등이 있다. 필요할 경우, 이펙터 세포는 치료받을 숙주로부터 얻을 수 있다.

<167> 표적화된 이펙터 세포, 즉, 본 발명의 결합제로 코팅된 이펙터 세포는 생리적으로 허용가능한 용액 중의 세포 현탁액으로서 투여될 수 있다. 투여되는 세포의 수는 약 10^8 내지 10^9 일 수 있지만, 치료 목적에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 이는 표적 세포에서 위치를 결정하고, 항체 의존-매개성 세포용해 (ADCC)를 통해 표적 세포를 사멸시키는데 충분한 양일 것이다. 투여 경로도 달라질 수 있다. 예를 들면 종양 요법에서, 표적화된 이펙터 세포는 종양의 위치에 따라 정맥내 투여하거나 종양 부위에 직접 투여할 수 있으며, 예를 들면 난소 암종의 경우에는 복강에 직접 투여할 수 있다.

<168> 본 발명의 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자는 제3의 결합 특이성을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제3 결합 특이성은 항-강화 인자 (EF) 부분, 예를 들면 세포독성 활성화에 관여하는 표면 단백질과 결합함으로써 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 분자이다. "항-강화 인자 부분"은 주어진 분자, 예를 들면 항원 또는 수용체와 결합함으로써 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 대한 결합 결정자의 효과를 강화시키는 항체, 기능적 항체 단편 또는 리간드일 수 있다. "항-강화 인자 부분"은 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원과 결합할 수 있다. 별법으로, 항-강화 인자 부분은 제1 및 제2 결합 특이성이 결합하는 실체와는 다른 실체에 결합할 수 있다. 예를 들면, 항-강화 인자 부분은 세포독성 T-세포와 결합 (예를 들면 표적 세포에 대한 면역 반응의 증가를 일으키는 CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 또는 다른 면역 세포를 통해 결합함)할 수 있다.

<169> 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자는 결합 특이성으로서 예를 들면 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 또는 단일쇄 Fv 등을 비롯한 1종 이상의 항체 또는 그의 항체 단편을 포함한다. 1990년 8월 7일자로 라드너 (Ladner) 등에게 허여된 미국 특허 제 4,946,778호에 기재된 바와 같이, 항체는 경쇄 또는 중쇄 이량체 또는 Fv 또는 단일쇄 작제물 등과 같은 그의 임의의 최소 단편일 수도 있으며, 상기 문헌은 그 전문이 본원

에 참고문헌으로 인용된다.

- <170> 인간 모노클로날 항체가 바람직하지만, 본 발명의 이중특이적 분자 또는 다중특이적 분자에 사용될 수 있는 다른 항체는 무린, 키메라 및 인간화 모노클로날 항체이다.
- <171> 키메라 마우스-인간 모노클로날 항체 (즉, 키메라 항체)는 당업계에 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 무린 (또는 다른 종) 모노클로날 항체 분자의 Fc 불변 영역을 코딩하는 유전자를 제한 효소로 절단하여 무린 Fc를 코딩하는 영역을 제거하고, 인간 Fc 불변 영역을 코딩하는 유전자의 동등한 부분으로 치환한다 (로빈슨 (Robinson) 등의 국제 특허 공개 PCT/US86/02269, 아키라 (Akira) 등의 유럽 특허 출원 제 184,187호, 다니구찌, 엠. (Taniguchi, M.)의 유럽 특허 출원 제 171,496호, 모리슨 (Morrison) 등의 유럽 특허 출원 제 173,494호, 뉴베르거 (Neuberger) 등의 국제 출원 WO 86/01533, 카빌리 (Cabilly) 등의 미국 특허 제 4,816,567호, 카빌리 등의 유럽 특허 출원 제 125,023호, 문헌 [Better et al. (1988) Science 240:1041-1043], [Liu et al. (1987) PNAS 84:3439-3443], [Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526], [Sun et al. (1987) PNAS 84:214-218], [Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005], [Wood et al. (1985) Nature 314:446-449] 및 [Shaw et al., 1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559] 참조).
- <172> 키메라 항체는 항원 결합에 직접 관여하지 않는 Fv 가변 영역의 서열을 인간 Fv 가변 영역의 동등한 서열로 대체함으로써 추가로 인간화될 수 있다. 인간화 키메라 항체에 대한 일반적인 고찰은 문헌 ([Morrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207] 및 [Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214])에 제시되어 있다. 이들 방법은 중쇄 또는 경쇄 중 하나 이상으로부터 면역글로불린 Fv 가변 영역의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 단리하고, 조작하고, 발현시키는 것을 포함한다. 이러한 핵산의 공급원은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들면 항-GPII_bIII_a 항체를 생산하는 하이브리도마 7E3으로부터 얻을 수 있다. 그 후, 키메라 항체를 코딩하는 재조합 DNA 또는 그의 단편을 적절한 발현 벡터 내에 클로닝할 수 있다. 별법으로, 적합한 인간화 항체는 CDR 치환법에 의해 생산할 수 있다 (미국 특허 제 5,225,539호, 문헌 [Jones et al. 1986 Nature 321:552-525], [Verhoeyan et al. 1988 Science 239:1534] 및 [Beidler et al. 1988 J. Immunol. 141:4053-4060] 참조).
- <173> 특정 인간 항체의 모든 CDR은 적어도 인간 CDR이 아닌 CDR의 일부로 대체될 수도 있고, 또는 상기 CDR의 일부만이 인간 CDR이 아닌 CDR로 대체될 수도 있다. 단지, 인간화 항체가 Fc 수용체에 결합하는데 요구되는 수 만큼의 CDR을 대체할 필요가 있다.
- <174> 인간 항체 CDR의 적어도 일부를, 인간 항체가 아닌 항체로부터 유래한 CDR로 대체할 수 있는 임의의 방법을 통해 항체를 인간화할 수 있다. 윈터 (Winter)는 본 발명의 인간화 항체 제조에 사용될 수 있는 방법을 문헌 [1987년 3월 26일자로 출원된 영국 특허 출원 GB 2188638A]에 기재하고 있으며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다. 국제 출원 WO 94/10332 (발명의 명칭: Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytes)에 기재된 올리고뉴클레오타이드 위치-지정 돌연변이유발법을 이용하여 인간 CDR을 인간 CDR이 아닌 CDR로 대체할 수 있다.
- <175> 또한, 특정 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 키메라 및 인간화 항체도 본 발명의 범위에 속한다. 특히, 바람직한 인간화 항체는 프레임워크 영역 내에 예를 들면 항원에 대한 결합을 개선시키는 아미노산 치환부를 갖는다. 예를 들면, 마우스 CDR을 갖는 인간화 항체에서 인간 프레임워크 영역 내에 위치하는 아미노산은 마우스 항체의 상응하는 부위에 위치하는 아미노산으로 대체될 수 있다. 이러한 치환은 몇몇 경우에서 인간화 항체와 항원의 결합을 개선시킨다고 공지되어 있다. 본원에서는 아미노산이 부가, 결실 또는 치환된 항체를 변형된 항체 또는 변경된 항체라고 지칭한다.
- <176> 또한, 변형된 항체라는 용어는 예를 들면 항체 일부를 결실, 부가 또는 치환하여 변형시킨 모노클로날 항체, 키메라 항체 및 인간화 항체 등의 항체도 포함하는 것을 의미한다. 예를 들면, 항체의 불변 영역을 결실시키고 이를 항체의 반감기, 예를 들면 혈청 반감기, 안정성 또는 친화성을 증가시키는 불변 영역으로 대체함으로써 항체를 변형시킬 수 있다. 임의의 변형을 통해 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자가 CD89에 대해 특이적인 하나 이상의 항원 결합 영역을 보유하고 하나 이상의 이펙터 기능을 촉발한다면, 이러한 임의의 변형은 본 발명의 범위에 속한다.
- <177> 본 발명의 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자는 화학적 기술 (예를 들면 문헌 [D. M. Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807] 참조), "폴리도마 (polydome)" 기술 (리딩 (Reading)의 미국 특허 제 4,474,893호 참조) 또는 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조할 수 있다.
- <178> 특히, 본 발명의 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자는 당업계에 공지되어 있으며 본원에 제공된 실시예 부분

에 기재된 방법을 이용하여 성분 결합 특이성, 예를 들면 항-표적 세포 결합 특이성과 항-CD89 결합 특이성을 접합시켜 제조할 수 있다. 예를 들면, 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자의 각 결합 특이성을 별도로 생성한 후에 서로 접합시킬 수 있다. 결합 특이성이 단백질 또는 펩티드인 경우, 다양한 커플링제 또는 가교결합제를 사용하여 공유 접합시킬 수 있다. 가교결합제의 예로는 단백질 A, 카르보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산) (DTNB), o-페닐렌디말레이미드 (oPDM), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP) 및 술포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (술포-SMCC) 등이 있다 (예를 들면 문헌 [Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686], [Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648] 참조). 다른 방법으로는 문헌 ([Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132)], [Brennan et al. (Science (1985) 229:81-83)] 및 [Glennie et al. (J. Immunol. (1987) 139:2367-2375)]에 기재된 방법들이 포함된다. 바람직한 접합제는 SATA 및 술포-SMCC이며, 이들 모두가 피어스 케미칼 컴퍼니 (Pierce Chemical Co.) (미국 일리노이주 록크포트 소재)로부터 구입할 수 있다.

<179> 결합 특이성이 항체 (예를 들면 2개의 인간화 항체)인 경우, 2개 중쇄의 C-말단 힌지 영역의 술포히드릴 결합을 통해 이들을 접합시킬 수 있다. 특히 바람직한 실시양태에서, 힌지 영역이 술포히드릴 잔기를 홀수개, 바람직하게는 1개 함유하도록 변형시킨 후에 접합시킨다.

<180> 별법으로, 이들 두 결합 특이성 모두는 동일한 벡터 내에 코딩되어 동일한 숙주 세포에서 발현 및 조립될 수 있다. 이러한 방법은 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F (ab')₂ 또는 리간드 x Fab 융합 단백질인 경우에 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자, 예를 들면 이중특이적 분자는 단일쇄 분자, 예를 들면 단일쇄 이중특이적 항체, 하나의 단일쇄 항체 및 결합 결정자를 포함하는 단일쇄 이중특이적 분자, 또는 두개의 결합 결정자를 포함하는 단일쇄 이중특이적 분자일 수 있다. 또한, 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자는 단일쇄 분자일 수도 있고, 또는 둘 이상의 단일쇄 분자를 포함할 수도 있다. 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자의 제조 방법은 예를 들면 미국 특허 제5,260,203호, 동 제5,455,030호, 동 제4,881,175호, 동 제5,132,405호, 동 제5,091,513호, 동 제5,476,786호, 동 제5,013,653호, 동 제5,258,498호 및 동 제5,482,858호 등에 기재되어 있다.

<181> 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자와 그들의 특이적 표적과의 결합은 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA), 방사선면역분석법 (RIA), FACS 분석법, 생물분석법 (예를 들면, 성장 저해) 또는 웨스턴 블랏 (Western Blot) 분석법을 통해 확인할 수 있다. 통상적으로, 이들 각 분석법은 특정 관심 복합체에 대해 특이적인 표지된 시약 (예를 들면, 항체)을 사용함으로써 상기 관심 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들면, FcR-항체 복합체는 예를 들면 항체-FcR 복합체를 인식하여 그와 특이적으로 결합하는 효소-연결 항체 또는 항체 단편을 사용하여 검출할 수 있다. 별법으로, 상기 복합체는 임의의 다양한 기타 면역분석법을 이용하여 검출할 수 있다. 예를 들면, 항체를 방사성 표지하여 방사선면역분석법 (RIA)에서 사용할 수 있다 (예를 들면, 이 거명을 통해 본원에 참고문헌으로 포함된 문헌 [Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986] 참조). 방사성 동위원소는 γ 계수법 또는 섬광 계수법에 의하거나, 또는 자기방사법 등을 통해 검출할 수 있다.

<182> IV. 결합 분석

<183> 여러가지 분석을 수행하여 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분이 CD89, 예를 들면 인간 CD89에 특이적으로 결합한다는 것을 밝힐 수 있다. 예를 들면, 다양한 세포에 대하여 상기 항체의 결합과 IgA의 결합을 비교하는 결합 분석을 수행할 수 있는데, IgA는 일부의 세포 (예를 들면 단핵구 및 대식세포)에 결합하고, 몇몇 세포 (예를 들면 K-562 세포)에는 결합하지 않는다. 본 발명의 항체는 IgA와 동일 세트의 세포에 실질적으로 결합해야 한다. 상기 항체 및 IgA를 사용한 경쟁 결합 실험은 두가지 작용제 모두가 동일 에피토프를 인식하는지의 여부를 지시할 것이다. 결합 실험은 무엇보다도 유동 세포 계수 실험, 간접 면역형광 분석 또는 ELISA일 수 있다. 추가로, IgA 및 상기 항체는 동일 세포로부터 유사 분자량의 단백질을 면역침전시켜야 한다. 또한, CD89를 보유한 세포 용해물을 IgA로 예비제거 (preclear)하면, 이러한 예비제거가 없는 경우에 비해 항체를 사용한 단백질 면역침전량이 더 적어야 한다. 유사하게, 세포 용해물을 상기 항체로 예비제거하면, 이러한 예비제거가 없는 경우에 비해 IgA를 사용한 단백질 면역침전량이 더 적어야 한다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분 및 IgA가 동일 항원을 인식함을 증명하기 위한 다른 시험은 당업계에 공지되어 있다. 또한, 인간 CD89 등의 CD89가 클로닝되었기 때문에, 재조합으로 생산된 CD89 또는 그의 일부를 사용하거나 형질감염되어 CD89를 발현하는 세포를 사용하여, 항체와 CD89의 결합을 입증할 수 있다.

- <184> 한 실시양태에서, 본 발명의 항체가 표적 세포를 이펙터 세포에 연결시키는 경우, 상기 항체는 이펙터 세포에 의한 표적 세포의 식세포작용을 자극시킨다. 예를 들면, CD89에 대해 특이적인 하나 이상의 항원 결합 영역 및 표적 세포상의 에피토프에 대한 하나의 항원 결합 영역을 보유하는 본 발명의 바람직한 이중특이적 항체는 표적 세포의 식세포작용을 유도할 수 있다. 사실, 항-적혈구 F(ab')₂에 연결된 My43 (마우스 항-CD89 항체)의 이중 항체가 단핵구에 의한 적혈구 식세포작용을 매개함이 밝혀진 바 있다.
- <185> 식세포작용 분석은 다음과 같이 수행할 수 있다: 패킹된 (packed) 표적 세포, 예를 들면 ox 적혈구 (OE) (10 μ l)를 미리 측정해 둔 농도의 F(ab')₂-Ig 접합체 20 μ l과 10℃에서 16시간 동안 혼합하여 로제트 (rosette)가 최대로 형성되게 한다. 이중항체로 코팅된 OE를 세척하여 4 x 10⁷ 개 세포/ml로 조정하고, 동일 부피의 2 x 10⁶ 개 세포/ml의 골수 세포와 혼합한다. 상기 혼합물을 37℃에서 10분 동안 인큐베이션하고, 세포를 펠렛화하여 20분 동안 더 인큐베이션한 후에 제거되지 않은 OE를 염화암모늄 완충액으로 4℃에서 용해시킨다. 식세포작용은 라이트 김자 (Wright's Giemsa) (시그마 제품)로 염색된 세포회전물 제제 (cytospin preparation)의 현미경 검사를 통해 분석할 수 있다. 2벌의 슬라이드에서 200개 이상의 세포가 계수된다. 식세포작용은 하나 이상의 제거된 적혈구(들)을 함유하는 세포의 비율 (%)로서 정량화될 수 있다.
- <186> 바람직한 항체는 산화적 파열, 즉 이펙터 세포에 CD89가 결합된 후 이펙터 세포에서 과산화물 음이온의 생산을 촉발한다. 예를 들면, My43 (마우스 항-CD89 항체)가 인터페론- γ 를 처리한 U937 세포에 의한 과산화물 음이온의 생산을 촉발하는 것으로 나타났다.
- <187> 과산화물 분석은 고상에서 수행하거나 용액 중에서 수행할 수 있다. 고상 과산화물 분석은 다음과 같이 수행할 수 있다: 평판 바닥 6-웰 PVC 조직 배양 플레이트 (미국 매사추세츠주 베드포드에 소재하는 팔콘 플라스틱 박스터 코포레이션 (Falcon Plastics Baxter Corporation) 제품)에 웰 당 PBS 중 100 μ g/ml의 폴리-L-라이신 (미국 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마 제품) 1 ml을 실온에서 30분 동안 처리할 수 있다. 흡인시켜 건조시키고, 글루타르알데히드 (2%, 시그마 제품)를 첨가하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션할 수 있다. PBS로 4회 세척한 후에, 원하는 양의 Ig를 함유하는 PBS 1 ml을 첨가하여 상온에서 2시간 동안 인큐베이션할 수 있다. 이어서, 상기 웰을 PBS로 세척하고, PBS 중 100 mM 글리신/0.1% BSA를 첨가한 후, 4℃에서 18시간 동안 인큐베이션할 수 있다. 이어서, 이들을 PBS로 2회 세척하고 크랩스 링거 히피스 (Krebs Ringer Hepes) 완충 염 용액 (KRH)으로 1회 세척하여 3 x 10⁶ 개 세포/웰을, KCN 1 mM 및 말 심장 페리시토크롬 c (시그마 제품) 1 mg/ml이 함유된 KRH 중에 첨가할 수 있다. 상기 세포를 5분 동안 100 x g로 회전시켜 플레이트상에 모으고, 37℃에서 인큐베이션시킨다. PMA (시그마 제품)를 지시된 최종 농도로 양성 대조군에 첨가한다. 30분 후에, 내용물을 제거하여 회전시켜 모으고, 상층액을 다이아테크 (Dynatech) 분광광도계 (미국 버지니아주 찰틸리에 소재하는 다이아테크 랩스 (Dynatech Labs) 제품)에서 550 nm에서 판독할 수 있다.
- <188> 현탁 과산화물 분석을 다음과 같이 수행할 수 있다: 세포를 mAb와 함께 4℃에서 45분 동안 인큐베이션시킨 후에 KRH 중에서 세척하고, KCN 1 mM 및 말 심장 페리시토크롬 c (시그마 제품) 1 mg/ml이 함유된 KRH 중에 재현탁하여 37℃에서의 인큐베이션을 개시할 수 있다. PMA (시그마 제품)를 지시된 농도로 양성 대조군에 첨가할 수 있다. 30분 후에, 샘플을 제거하여 회전시켜 모으고, 상층액을 다이아테크 분광광도계 (다이아테크 랩스 제품)에서 550 nm에서 판독할 수 있다.

<189> V. 항체 접합체/면역독소

- <190> 다른 측면에서, 본 발명은 치료 성분, 예를 들면 세포독소, 약물 또는 방사성 동위원소에 접합된 인간 항-CD89 모노클로날 항체 또는 그의 단편을 특징으로 한다. 세포독소에 접합되는 경우에는 이들 항체 접합체를 "면역독소"라 지칭한다. 세포독소 또는 세포독성제로는 세포에 유해한 (예를 들면, 세포를 사멸시키는) 임의의 작용제 등이 있다. 그의 예로는 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미토크산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-테히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 푸로마이신 및 그들의 유사체 또는 동족체 등이 있다. 치료제로는 대사 억제물질 (예를 들면, 메토폭세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예를 들면, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로토스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스-디클로로디아민 플라티늄(II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예를 들면, 다우노루비신 (이전에는 다우노마이신이라 함) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들면, 닥티노마이신 (이전에는 악티노마이신이라 함), 블레오마이신, 미트라마이신 및

안트라마이신 (AMC)) 및 유사분열 억제제 (예를 들면, 빈크리스틴 및 빈블라스틴) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 항체를 방사성 동위원소, 예를 들면 방사성 요오드에 접합시켜 CD89-관련 장애, 예를 들면 암 치료용 세포독성 방사성의약품을 생성할 수 있다.

<191> 본 발명의 항체 접합체를 사용하여 주어진 생물학적 반응을 변형시킬 수 있으며, 약물 성분이 전형적인 화학 치료제로 제한되는 것으로 여겨서는 안된다. 예를 들면, 약물 성분은 원하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질의 예로는 효소 활성 독소 또는 그의 활성 단편, 예를 들면 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예를 들면 종양 괴사 인자 또는 인터페론- γ ; 또는 생물학적 반응 변형자, 예를 들면 림포카인, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식세포 군집 자극 인자 ("GM-CSF"), 과립구 군집 자극 인자 ("G-CSF") 또는 기타의 성장 인자 등을 들 수 있다.

<192> 이러한 치료 성분을 항체에 접합시키는 기술은 공지되어 있으며, 예를 들면 문헌 ([Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)], [Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)], [Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)], ["Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)] 및 [Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)])을 참조한다.

<193> **VI. 제약 조성물**

<194> 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분(들) 중 하나 또는 그들의 조합을 함유하고, 제약상 허용가능한 담체와 함께 제제화된 조성물, 예를 들면 제약 조성물을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 조성물은 본 발명의 여러개 (예를 들면, 2개 이상)의 단리된 인간 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 조합을 포함한다. 바람직하게는, 조성물 중의 항체 또는 그의 항원 결합 부분 각각은 CD89의 미리 선택된 다른 에피토프에 결합한다.

<195> 한 실시양태에서, 상기 조성물은 본 발명의 이중특이적 분자 또는 다중특이적 분자 (예를 들면, 표적 세포에 대한 하나 이상의 결합 특이성 및 CD89에 대한 하나 이상의 결합 특이성을 보유함) 중 하나 또는 그들의 조합을 포함한다.

<196> 또한, 본 발명의 제약 조성물은 병용 치료법으로, 즉 다른 작용제와 병용하여 투여할 수 있다. 예를 들면, 병용 치료법은 본 발명의 조성물을 1종 이상의 항-종양제 또는 다른 통상의 요법제와 함께 포함할 수 있다.

<197> 본원에 사용된 바와 같이, "제약상 허용가능한 담체"는 생리적으로 상용가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅액, 향균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여 (예를 들면 주사 또는 주입에 의한 투여)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉 항체, 이중특이적 분자 및 다중특이적 분자는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산 및 다른 천연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅될 수 있다.

<198> "제약상 허용가능한 염"은 모 (母) 화합물의 원하는 생물학적 활성을 보유하고, 임의의 불필요한 독물학적 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다 (예를 들면 문헌 [Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조). 이러한 염의 예로는 산 부가염 및 염기 부가염이 포함된다. 산 부가염으로는 비독성 무기산, 예를 들면 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산 및 아인산 등으로부터 유래한 염 뿐만 아니라 비독성 유기산, 예를 들면 지방족 모노카르복실산 및 디카르복실산, 페닐치환된 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족산, 지방족 술폰산 및 방향족 술폰산 등으로부터 유래한 염이 포함된다. 염기 부가염으로는 알칼리 토금속, 예를 들면 나트륨, 칼륨, 마그네슘 및 칼슘 등으로부터 유래한 염 뿐만 아니라 비독성 유기 아민, 예를 들면 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민 및 프로카인 등으로부터 유래한 염이 포함된다.

<199> 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자라면 알 수 있는 바와 같이, 투여 경로 및(또는) 투여 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 활성 화합물은 급속한 방출에 대해 화합

물을 보호하는 담체, 예를 들면 이식물, 경피 패치 (patch) 및 미세캡슐화 전달 시스템 등을 비롯한 제어 방출형 제제와 함께 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들면 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리산무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 이러한 제제의 많은 제조 방법들은 특허가 허여되었거나, 당업자에게 통상적으로 공지되어 있다. 예를 들면 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

<200> 본 발명의 화합물을 특정 투여 경로를 통해 투여하기 위해서는, 화합물의 불활성화를 방지하는 물질로 화합물을 코팅하거나, 또는 그 물질과 함께 화합물을 동시투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들면, 적절한 담체, 예를 들면 리포솜 또는 희석제 중의 화합물을 대상체에게 투여할 수 있다. 제약상 허용가능한 희석제로는 염수 및 완충 수용액 등이 있다. 리포솜에는 수용유중수 CGF 에멀전 뿐만 아니라 통상의 리포솜도 포함된다 [Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27].

<201> 제약상 허용가능한 담체로는 멸균 수용액 또는 분산액 및 주사가 가능한 멸균 용액 또는 분산액의 즉석 제조용 멸균 분말 등이 있다. 제약상 활성 물질에 이러한 매질 및 작용제를 사용하는 것은 당업계에 공지되어 있다. 통상적인 임의의 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 사용가능하지 않은 경우를 제외하고는, 이들을 본 발명의 제약 조성물 중에 사용하는 것이 고려된다. 또한, 보충 활성 화합물을 조성물 중에 혼입시킬 수도 있다.

<202> 전형적으로, 치료용 조성물은 제조 및 보관 조건 하에서 멸균되어 있고 안정해야 한다. 조성물은 높은 약물 농도에 적합한 용액, 마이크로에멀전, 리포솜 또는 다른 규칙적 형태의 작제물로서 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들면 물, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들면 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들면 레시틴 등의 코팅물을 사용함으로써, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 계면활성제를 사용함으로써 적당한 유동성을 유지할 수 있다. 많은 경우에서, 등장화제, 예를 들면 당, 폴리알콜, 예를 들면 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물 중에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면 모노스테아레이트 염 및 젤라틴 등을 포함시켜, 이의 흡수 시간을 연장시킬 수 있다.

<203> 주사가 가능한 멸균 용액은 필요량의 활성 화합물을 상기 언급된 성분 중 하나 또는 그들의 조합물과 함께 적절한 용매 중에 혼입시키고, 필요에 따라서는 이후에 멸균 미세여과함으로써 제조할 수 있다. 통상적으로, 분산액은 염기성 분산 매질 및 상기 언급된 것들로부터 필요한 기타 성분들을 함유하는 멸균 비히클 중에 활성 화합물을 혼입시켜 제조한다. 주사가 가능한 멸균 용액의 제조를 위한 멸균 산제의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분의 분말 및 미리 멸균 여과해 둔 임의의 원하는 추가의 성분 용액으로부터 상기 성분의 분말을 생성하는 진공 건조법 및 냉동-건조법 (동결건조)이다.

<204> 투여 방법을 조정하여 원하는 최적의 반응 (예를 들면, 치료 반응)을 제공한다. 예를 들면, 단일 볼루스를 투여할 수 있고, 투여량을 시간에 따라 여러회에 걸쳐 분할하여 투여할 수도 있으며, 또는 응급 치료 상황에서 지시되는 바와 같이 투여량을 비례적으로 감소시키거나 증가시킬 수도 있다. 투여를 쉽게 하고 균일 투여량을 투여하기 위해서는 비경구 조성물을 단위 투여량 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 단위 투여량 형태는 치료받을 대상체를 위한 단위 투여량으로서 적합한, 물리적으로 별개인 단위를 지칭하며, 각 단위는 원하는 치료 효과를 나타내도록 계산된 소정량의 활성 화합물 및 필요한 제약 담체를 함유한다. 본 발명의 단위 투여량 형태는 (a) 활성 화합물의 고유한 특성 및 달성될 특정 치료 효과 및 (b) 개체에 있어서의 민감성 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 배합하는 기술에 고유한 제한에 따라 달라지고, 이에 직접 의존한다.

<205> 제약상 허용가능한 항산화제의 예로는 (1) 수용성 항산화제, 예를 들면 아스코르브산, 시스테인 염산염, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨 및 아황산나트륨 등, (2) 지용성 항산화제, 예를 들면 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트 및 알파-토코페롤 등 및 (3) 금속 킬레이팅제, 예를 들면 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산 및 인산 등이 있다.

<206> 치료용 조성물의 경우, 본 발명의 제제는 경구, 비강, 국소 (구강 및 설하 등), 직장, 질내 및(또는) 비경구 투여에 적합한 제제를 포함한다. 제제는 편리하게는 단위 투여량 형태로 제공될 수 있으며, 제약 분야에 공지된 임의의 방법을 통해 제조될 수 있다. 담체 물질과 배합되어 단일 투여량 형태를 생성할 수 있는 활성 성분의 양은 치료받을 대상체 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 통상적으로, 담체 물질과 배합되어 단일 투여량 형태를 생성할 수 있는 활성 성분의 양은 치료 효과를 나타내는 조성물의 양일 것이다. 통상적으로, 100 %

를 기준으로 할 때, 이 양에서 활성 성분은 약 0.01 % 내지 약 99 %, 바람직하게는 약 0.1 % 내지 약 70 %, 가장 바람직하게는 약 1 % 내지 약 30 % 범위일 것이다.

- <207> 또한, 질내 투여에 적합한 본 발명의 제제로는 당업계에 적절하다고 공지된 담체 등을 함유하는 질좌제, 탐폰, 크림제, 겔제, 페이스트제, 폼 (foam)제 또는 분무제 등이 있다. 본 발명의 조성물의 국소 또는 경피 투여를 위한 투여 형태로는 산제, 분무제, 연고제, 페이스트제, 크림제, 로션제, 겔제, 용액제, 패치 및 흡입제 등이 있다. 활성 화합물은 제약상 허용가능한 담체 및 필요할 수 있는 임의의 보존제, 완충액 또는 추진제와 함께 멸균 조건 하에서 혼합될 수 있다.
- <208> 본원에 사용된 바와 같이, "비경구 투여" 및 "비경구 투여하다"라는 어구는 장내 투여 및 국소 투여가 아닌 투여 방식, 통상적으로는 주사에 의한 투여 방식을 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 피막내 (intracapsular), 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관 (transtracheal), 피하, 표피하, 관절내, 피막하 (subcapsular), 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- <209> 본 발명의 제약 조성물 중에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리에올 (예를 들면 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그들의 적합한 혼합물, 식물성유, 예를 들면 올리브유 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들면 에틸 올레레이트 등이 있다. 예를 들면 레시틴 등의 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기를 유지함으로써, 계면활성제를 사용함으로써 적당한 유동성을 유지할 수 있다.
- <210> 이들 조성물은 보조제, 예를 들면 보존제, 습윤제, 에멀전화제 및 분산제를 포함할 수도 있다. 미생물 존재의 방지는 멸균 방법 (상기 문헌)을 사용하고 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올 및 페놀 소르브산 등을 포함시킴으로써 달성될 수 있다. 또한, 등장화제, 예를 들면 당 및 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 주사가 가능한 제형에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴 등을 포함시켜, 이의 흡수 시간을 연장시킬 수 있다.
- <211> 본 발명의 화합물을 의약품으로서 인간 및 동물에게 투여하는 경우, 이를 단독으로 투여하거나, 예를 들면 0.01 내지 99.5 % (더욱 바람직하게는 0.1 내지 90 %)의 활성 성분을 제약상 허용가능한 담체와 함께 함유하는 제약 조성물로서 투여할 수 있다.
- <212> 선택된 투여 경로와는 관계 없이, 적합한 수화 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물 및(또는) 본 발명의 제약 조성물을 당업자에게 공지된 통상의 방법을 통해 제약상 허용가능한 투여 형태로 제제화한다.
- <213> 본 발명의 제약 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은 달라질 수 있어서, 특정 환자에 대한 원하는 치료 반응을 달성하는 데 효과적이며 환자에게 독성이 없는 활성 성분의 양, 조성물 및 투여 방식을 달성할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배출 속도, 처치 기간, 사용된 특정 조성물과 함께 사용되는 기타 약물, 화합물 및(또는) 물질, 치료받을 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강 및 기존의 의학적 병력 및 의학 분야에 공지된 유사한 인자 등을 비롯한 다양한 약력학적 인자에 따라 달라질 것이다.
- <214> 당업계에 대한 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사라면, 필요한 제약 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있을 것이다. 예를 들면, 의사 또는 수의사는 제약 조성물 중에 사용되는 본 발명의 화합물의 투여량을 원하는 치료 효과 달성에 필요한 수준보다 더 낮은 수준에서 시작하여 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적합한 1일 투여량은 치료 효과를 나타내기에 효과적인 가장 낮은 투여량인 화합물의 양일 것이다. 이러한 효과적인 투여량은 일반적으로 상기한 인자들에 따라 달라질 것이다. 투여는 정맥내, 근육내, 복강내 또는 피하, 바람직하게는 표적 부위 근처에 투여되는 것이 바람직하다. 원한다면, 치료용 조성물의 효과적인 1일 투여량은 하루 동안 적절한 시간 간격으로, 경우에 따라서는 단위 투여량 형태로서 개별 투여되는 2회, 3회, 4회, 5회 또는 6회 이상의 분할 투여량으로서 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 단독으로 투여될 수 있지만, 제약 제제 (조성물)로서 투여하는 것이 바람직하다.
- <215> 치료용 조성물은 당업계에 공지된 의료 기기를 사용하여 투여할 수 있다. 예를 들면, 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 치료용 조성물은 무(無)바늘 피하 주사기, 예를 들면 미국 특허 제5,399,163호, 동 제5,383,851호, 동 제5,312,335호, 동 제5,064,413호, 동 제4,941,880호, 동 제4,790,824호 또는 동 제4,596,556호에 개시된 기기를 사용하여 투여할 수 있다. 본 발명에 유용한 공지된 이식물 및 모듈의 예로는 제어된 속도로 약제를 투약하는 이식용 미세주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제4,487,603호, 피부를 통해 약제를 투여하는 치료 기기를 개시하는 동 제4,486,194호, 정확한 주입 속도로 약제를 전달하는 약제 주입 펌프를 개시하는 동

제4,447,233호, 지속적인 약물 전달을 위한 가변 흐름의 이식용 주입 장치를 개시하는 동 제4,447,224호, 멀티-챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 동 제4,439,196호 및 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 동 제4,475,196호 등이 있다. 이들 특허 문헌들은 이 거명을 통해 본원에 참고문헌으로 포함된다. 많은 기타의 이러한 이식물, 전달 시스템 및 모듈은 당업자에게 공지되어 있다.

<216> 특정 실시양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 생체내에서 적당하게 분포될 수 있도록 제제화할 수 있다. 예를 들면, 혈뇌장벽(血腦障壁) (BBB)은 고도로 친수성인 많은 화합물들을 배제한다. 본 발명의 치료용 화합물이 BBB를 통과하도록 하기 위해서는 (필요한 경우), 예를 들면 이들을 리포솜 내에 제제화할 수 있다. 리포솜의 제조 방법에 관해서는 예를 들면 미국 특허 제4,522,811호, 동 제5,374,548호 및 동 제5,399,331호 등을 참조한다. 리포솜은 선택적으로 특정 세포 또는 기관으로 수송되는 하나 이상의 성분들을 포함할 수 있기 때문에, 표적화된 약물 전달을 강화시킨다 (예를 들면, 문헌 [V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685] 참조). 표적화 성분의 예로는 폴레이트 또는 바이오틴 (예를 들면, 로우 (Low) 등의 미국 특허 제 5,416,016호; 만노시드 [Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038]; 항체 ([P. G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140], [M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]); 계면활성제 단백질 A 수용체 [Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134] (그의 다른 종은 본 발명의 제제 뿐만 아니라 발명된 분자의 성분을 포함할 수 있음); p120 ([Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090], [K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123], [J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273] 참조) 등이 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 치료용 화합물은 리포솜 중에 제제화되며, 더욱 바람직한 실시양태에서, 리포솜은 표적화 성분들을 포함한다. 가장 바람직한 실시양태에서, 볼루스를 주사하여 리포솜 중의 치료용 화합물을 중앙 또는 감염 부위 근처로 전달한다. 조성물은 쉽게 주사할 수 있을 정도로 유동성이 있어야 한다. 조성물은 제조 및 보관 조건 하에서 안정해야 하며, 박테리아 및 진균 등의 미생물 오염 작용에 대하여 보존되어야 한다.

<217> "치료 유효 투여량"은 미처치 대상체에 비하여 중앙 성장을 약 20 % 이상, 더욱 바람직하게는 약 40 % 이상, 보다 더욱 바람직하게는 약 60 % 이상, 훨씬 더욱 바람직하게는 약 80 % 이상 저해하는 것이 바람직하다. 화합물에 의한 암 저해력은 인간 중앙에서의 효능이 예측되는 동물 모델 시스템에서 평가할 수 있다. 별법으로, 조성물의 이러한 특성은 당업자에게 공지된 분석법을 통해 화합물에 의한 시험관내 저해력을 조사함으로써 평가할 수 있다. 치료 유효량의 치료용 화합물은 대상체에서 중앙 크기를 감소시키거나 증상을 완화시킬 수 있다. 당업자라면 대상체의 신장, 대상체의 증상의 심각성 및 선택된 특정 조성물 또는 투여 경로 등의 인자를 기초로 하여 투여량을 정할 수 있을 것이다.

<218> 조성물은 멸균된 것이어야 하며, 주사기를 통해 전달될 수 있을 정도로 유동성이 있어야 한다. 담체는 물 뿐만 아니라 등장성의 완충 염수 용액, 에탄올, 폴리올 (예를 들면 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그들의 적합한 혼합물일 수 있다. 예를 들면 레시틴 등의 코팅물을 사용함으로써, 분산액의 경우에는 필요한 입자 크기를 유지함으로써, 계면활성제를 사용함으로써 적절한 유동성을 유지할 수 있다. 많은 경우에서, 등장화제, 예를 들면 당, 폴리알콜, 예를 들면 만니톨 또는 소르비톨 및 염화나트륨을 조성물 중에 포함시키는 것이 바람직하다. 주사가 가능한 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴 등을 포함시켜, 이를 장기간에 걸쳐 흡수시킬 수 있다.

<219> 활성 화합물이 상기 기재한 바와 같이 적절하게 보호되면, 화합물을 예를 들면 불활성 희석제 또는 흡수가 가능한 식용성 담체와 함께 경구 투여할 수 있다.

<220> VII. 본 발명의 용도 및 방법

<221> 본 발명의 조성물 (예를 들면, CD89에 대한 인간 모노클로날 항체 및 그의 유도체/접합체)은 시험관내 및 생체 내 진단 및 치료에 유용성이 있다. 예를 들면, 이들 분자를 예를 들면 시험관내 또는 생체의 배양 세포 또는 예를 들면 대상체의 생체내 세포에 투여하여 각종 장애를 치료, 예방 또는 진단할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "대상체"라는 용어는 인간 및 인간 이외의 동물을 포함하는 의미이다. 바람직한 인간 동물은 CD89의 발현, 전형적으로는 CD89의 이상 발현 (예를 들면, 과다 발현)을 특징으로 하는 장애를 앓는 인간 환자를 포함한다.

<222> 예를 들면, 상기 조성물을 시험관내 또는 생체내 사용하여 CD89에 의해 매개되는 질환을 진단할 수 있다. 본 발명의 항체를 사용하여 CD89의 수준 또는 막 표면에 CD89를 함유하는 세포의 수준을 검출한 후에, 상기 수준을 특정 질환의 증상과 연계시킬 수 있다. 별법으로, 상기 항체를 사용하여 CD89 기능을 저해하거나 차단할 수 있으며, 이를 통해 특정 질환의 증상을 예방 또는 완화시킴으로써, CD89를 상기 질환의 매개인자로서 연루시킬

수 있다. 이는 항-CD89 항체와 CD89 사이의 복합체 형성을 허용하는 조건 하에서 샘플 및 대조용 샘플을 상기 항체와 접촉시킴으로써 달성될 수 있다. 샘플 및 대조군에서 항-CD89 항체와 CD89 사이에 형성된 임의의 복합체를 검출하고 비교한다.

<223> 다른 실시양태에서, 본 발명의 인간 항체 또는 그의 결합 부분을 사용하여, 예를 들면 세포 표면상의 수용체를 포획 및 제거함으로써 이펙터 세포에서의 CD89 수준을 조절할 수 있다. 이러한 목적을 위해, 항-Fc 수용체 항체들의 혼합물을 사용할 수도 있다.

<224> 추가로, 상기 기재한 이중특이적 인간 항체 및 다중특이적 인간 항체를 사용하여 자가면역 장애, 암 또는 병원성 감염 등과 같은 장애를 치료하는 방법도 본 발명의 범위에 속한다. 이러한 항체는 CD89에 대한 하나 이상의 결합 특이성 및 표적 항원으로서의 항원 결합 영역에 대한 하나 이상의 결합 특이성을 포함한다. 다른 실시양태에서, 항체는 동일한 표적 항원 및(또는) 수용체의 여러가지 에피토프로의 항원 결합 영역의 결합 특이성에 대한 제3 결합 특이성을 포함한다. 대상체에서 불필요한 세포, 즉, 표적 세포 또는 항원을 제거하는 방법은 대상체를 본 발명의 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로 처리하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 대상체에서 혈액 또는 혈액 세포 샘플의 분취액을 수득하는 단계, 상기 혈액 또는 혈액 세포를 제약상 허용가능한 담체 중 치료 유효 투여량의 본 발명의 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체로 생체의 처리하는 단계 및 상기 처리된 혈액 또는 혈액 세포를 대상체에게 다시 되돌리는 단계를 포함한다. 혈액 샘플의 세포를 분리하고 배양하여 증식시키는 것이 바람직하고, 혈액 샘플의 세포를 CD89의 수 또는 CD89의 활성을 강화시키는 작용제로 처리하는 것이 더욱 바람직하다. 이러한 작용제로는 사이토카인, 림포카인 또는 성장 인자, 예를 들면 G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF 및 인터루킨, 예를 들면 IL-2, IL-10 및 IL-12 등이 있다.

<225> 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체를 암 항원, 병원체 또는 병원체로 감염된 세포에서 발견되는 항원에 대해 면역화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 제약상 허용가능한 담체 중 CD89에 대한 결합 특이성 및 감염성 병원 유기체 또는 감염된 세포의 항원 또는 암세포의 에피토프에 대한 결합 특이성을 보유하는 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 별법으로, 상기 조성물은 감염성 병원 유기체 또는 감염된 세포 또는 암세포의 하나 이상의 항원에 연결된 항-CD89 항체를 포함할 수 있다.

<226> 다른 실시양태에서, CD89에의 IgA 결합을 차단하거나 저해하는 본 발명의 인간 항체를 비정상적인 내생의 IgA를 특징으로 하는 질환, 예를 들면 순환 IgA-함유 복합체 및(또는) IgA-면역 복합체의 침전을 특징으로 하는 질환, 예를 들면 만성 간염, 헤노흐-선라인 자반병 (HSP), IgA 신장병증 (베르베르병) 또는 IgA-사구체신염의 치료에 사용한다. 본 발명의 인간 항-CD89 항체를 이러한 장애를 앓는 환자에게 투여하여, CD89에의 내생의 IgA 결합을 저해하거나 하향조절할 수 있다. 예를 들면, 메카니즘에 제한되려는 의도는 아니지만, 본 발명의 항-CD89 항체 투여에 의해 CD89가 차단되어, 비정상적인 내생의 IgA가 수용체와 결합할 수 없게 되어 바람직하지 못한 이펙터 기능을 촉발할 수 없게 된다.

<227> 다른 실시양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 보체-매개성 세포 용해를 유도하지 않거나 단지 최소의 정도로만 유도한다는 이점이 있기 때문에, 보체에 의해 활성화된 증상, 예를 들면 좌창 촉발의 부작용이 더욱 적다.

<228> 본 발명의 조성물 (예를 들면 인간 항체, 다중특이적 분자 및 이중특이적 분자)의 적합한 투여 방법은 항체-기재 요법 분야에 공지되어 있다. 사용되는 분자의 적합한 투여량은 대상체의 연령 및 체중 및 사용된 특정 약물에 따라 달라질 것이다. 문헌 [Goldenberg, D. M. et al. (1981) Cancer Res. 41:4354-4360] 및 유럽 특허 제 0365 997호에 기재된 바와 같이, 상기 분자를 방사선헌종, 예를 들면 ¹³¹I, ⁹⁰Y 및 ¹⁰⁵Rh 등에 커플링시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물 (예를 들면, 인간 항체, 다중특이적 분자 및 이중특이적 분자)을 감염 억제제에 커플링할 수도 있다.

<229> 인간 항-CD89 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 사이토카인 또는 화학요법제 등의 다른 치료제와 동시투여하거나, 기타의 공지된 요법제, 예를 들면 방사선 등과 같은 항암 요법제와 동시투여할 수도 있다. 이러한 치료제로는 무엇보다도 사이토카인, 예를 들면 G-CSF, GM-CSF, IL-2, IFN- γ 및 IFN- α , 항-신생물제, 예를 들면 독소루비신 (아드리아마이신), 시스플라틴 블레오마이신 술페이트, 카르무스틴, 클로람부실 및 시클로포스파미드 히드록시우레아 등이 있으며, 이들 자체로는 환자에게 독성이거나 거의 독성인 수준에서 효과적인 뿐이다. 시스플라틴은 100 mg/m²의 투여량으로 4주 마다 1회 정맥내 투여되고, 아드리아마이신은 60 내지 75 mg/m²의 투여량으로 21일 마다 1회 정맥내 투여된다. 본 발명의 인간 항-CD89 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 이와 상이한 메카니즘을 통해 작용하는 화학요법제의 동시투여는 인간 종양 세포에 세포독성 효과를 야기하는 2종의 항암제

를 제공하는 셈이다. 이러한 동시투여는 종양 세포에서 약물 내성을 발생시키거나, 종양 세포의 항원성을 변화시켜 종양 세포가 항체에 반응하지 않게 되는 문제점을 해결할 수 있다.

<230> 또한, 보체 결합 부위, 예를 들면 IgG1, -2 또는 -3 또는 IgM에서 보체와 결합하는 부분을 보유하는 본 발명의 조성물 (예를 들면 인간 항체, 다중특이적 분자 및 이중특이적 분자)을 보체의 존재하에 사용할 수도 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 결합제 및 적절한 이펙터 세포를 사용하여 표적 세포를 포함하는 세포 집단을 생체의 치료하는 것은, 보체 또는 보체를 함유하는 혈청을 첨가함으로써 보충될 수 있다. 보체 단백질을 결합시킴으로써, 본 발명의 결합제로 코팅된 표적 세포의 식세포작용을 개선시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물 (예를 들면 인간 항체, 다중특이적 분자 및 이중특이적 분자)로 코팅된 표적 세포를 보체에 의해 용해시킬 수도 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 보체를 활성화시키지 않는다.

<231> 또한, 본 발명의 조성물 (예를 들면, 인간 항체, 다중특이적 분자 및 이중특이적 분자)은 보체와 함께 투여될 수도 있다. 따라서, 인간 항체, 다중특이적 분자 또는 이중특이적 분자 및 혈청 또는 보체를 포함하는 조성물은 본 발명의 범위에 속한다. 이러한 조성물은 보체가 인간 항체, 다중특이적 분자 또는 이중특이적 분자에 근접해서 위치한다는 점에서 유리하다. 별법으로, 본 발명의 인간 항체, 다중특이적 분자 또는 이중특이적 분자 및 보체 또는 혈청을 개별 투여할 수 있다.

<232> 또한, 본 발명의 조성물 (예를 들면, 인간 항체, 다중특이적 분자 및 이중특이적 분자) 및 사용 지침을 포함하는 키트도 본 발명의 범위에 속한다. 상기 키트는 보체 등과 같은 1종 이상의 추가의 시약 또는 본 발명의 1종 이상의 추가의 인간 항체 (예를 들면, 제1 인간 항체와는 다르며, CD89 항원의 에피토프에 결합하는 보체 활성을 갖는 인간 항체)를 추가로 함유할 수 있다.

<233> 또한, 본 발명의 조성물 (예를 들면, 인간 항체, 다중특이적 분자 및 이중특이적 분자)을 사용하여, CD89를 발현하는 세포를 표적화할 수 있으며, 예를 들면 이러한 세포를 표지할 수 있다. 이렇게 사용되는 경우, 검출될 수 있는 분자에 결합제를 연결시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 CD89를 발현하는 세포를 생체의 또는 시험관내에서 위치결정하는 방법을 제공한다. 검출가능한 표지는 예를 들면 방사성 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자일 수 있다.

<234> 한 실시양태에서, 본 발명은 CD89에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 CD89 사이의 복합체 형성을 허용하는 조건 하에서 샘플 및 대조용 샘플을 상기 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플 중에서 CD89 항원의 존재를 검출하는 방법 또는 CD89 항원의 양을 측정하는 방법을 제공한다. 그 후, 복합체의 형성을 검출하는데, 샘플과 대조용 샘플에서 복합체 형성에 차이가 나는 것은 샘플 중에 CD89 항원이 존재함을 지시하는 것이다.

<235> 다른 실시양태에서, 본 발명은 생체내 또는 시험관내에서 Fc-발현 세포의 존재를 검출하는 방법 또는 그의 양을 정량하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 검출가능한 마커에 접합된 본 발명의 조성물 (예를 들면, 다중특이적 분자 또는 이중특이적 분자) 또는 그의 단편을 대상체에게 투여하는 단계 및 (ii) 상기 대상체를 상기 검출가능한 마커를 검출하는 수단에 노출시켜 Fc-발현 세포를 함유하는 영역을 확인하는 단계를 포함한다.

<236> 본 발명은 하기 실시예를 통해 추가로 예시되지만, 본 발명이 이 실시예로 제한되는 것으로 여겨서는 안된다. 모든 도면 및 본 출원 명세서에서 인용된 참고문헌, 특허 문헌 및 특허 출원 공개의 내용은 그 전문이 본원에 참고문헌으로 포함된다.

실시예

<237> **실시예 1: CD89에 대한 완전 인간 모노클로날 항체 제조를 위한 트랜스제닉 (Cmu 표적화된) 마우스의 생성**

<238> CMD 표적화 벡터의 제작

<239> 플라스미드 pICEmu는 Balb/C 계능 람다 파지 라이브러리로부터 수득한, mu 유전자를 스패닝 (spanning)하는 뮤린 Ig 중쇄 좌위의 EcoRI/XhoI 단편을 함유한다 [Marcu et al. Cell 22:187, 1980]. 이 계능 단편을 플라스미드 pICEMI9H의 XhoI/EcoRI 부위에 서브클로닝하였다 [Marsh et al; Gene 32, 481-485, 1984]. pICEmu에 포함된 중쇄 서열은 mu 인트론 인헨서의 3'에 인접 위치하는 EcoRI 부위의 하류로부터 mu 유전자의 마지막 막횡단 엑손의 약 1 kb 하류에 위치하는 XhoI 부위까지 뻗어있지만, mu 스위치 반복 영역의 많은 부분은 이. 콜라이 (*E. coli*)에서의 계대배양에 의해 결실되었다.

<240> 표적화 벡터를 다음과 같이 제작하였다: 1.3 kb HindIII/SmaI 단편을 pICEmu로부터 절단하여 HindIII/SmaI으로

절단시킨 pBluescript (미국 캘리포니아주 라 졸라에 소재하는 스트라타진 (Stratagene) 제품)에 서브클로닝하였다. 이 pICEmu 단편은 CmuI 5'의 약 1 kb에 위치하는 HindIII 부위로부터 CmuI 내에 위치하는 SmaI 부위까지 뺀어있다. 생성된 플라스미드를 SmaI/SpeI으로 절단시키고, CmuI 3'의 SmaI 부위로부터 마지막 Cmu 엑손의 하류에 인접 위치하는 XbaI 부위까지 뺀어있는, pICEmu로부터의 약 4 kb SmaI/XbaI 단편을 삽입하였다. 생성된 플라스미드 pTARI을 SmaI 부위에서 선형화하고, neo 발현 카세트를 삽입하였다. 이 카세트는 마우스 포스포글리세레이트 키나제 (pgk) 프로모터 (XbaI/TaqI 단편, [Adra et al. (1987) Gene 60:65-74])의 전사 제어하에 있으며, pgk 폴리아데닐화 부위 (PvuII/HindIII 단편, [Boer et al. (1990) Biochemical Genetics 28:299-308])를 함유하는 neo 유전자로 구성된다. 이 카세트는 플라스미드 pKJ1 (문헌 [Tybulewicz et al. (1991) Cell 65:1153-1163]에 기재되어 있음)으로부터 수득하는데, 이로부터 neo 카세트를 EcoRI/HindIII 단편으로서 절단하고, EcoRI/HindIII로 절단시킨 pGEM-7Zf(+) 내에 서브클로닝시켜 pGEM-7 (KJ1)을 생성한다. pGEM-7 (KJ1)을 EcoRI/SalI으로 절단하여 neo 카세트를 절단해 내고 평활 말단화하여 플라스미드 pTARI의 SmaI 부위에 게놈 Cmu 서열의 반대 방향으로 서브클로닝하였다. 문헌 [Mansour et al. (1988) Nature 336:348-352]에 기재된 바와 같이, 생성된 플라스미드를 NotI로 선형화하고, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 (tk) 카세트를 삽입하여 상동성 재조합체를 보유하는 ES 클론이 증가되도록 하였다. 문헌 [Tybulewicz et al. (1991) Cell 65:1153-1163]에 기재된 바와 같이, 이 카세트는 마우스 pgk 프로모터 및 폴리아데닐화 부위에 의해 둘러싸여 있는 tk 유전자의 코딩 서열로 구성된다. 생성된 CMD 표적화 벡터는 중쇄 좌위와 총 약 5.3 kb의 상동성을 함유하며, neo 발현 카세트가 제1 Cmu 엑손의 유일한 SmaI 부위에 삽입된 돌연변이체 mu 유전자를 생성하도록 고안되었다. 표적화 벡터를 플라스미드 서열 내를 절단하는 PvuI로 선형화시킨 후에 ES 세포로 전기천공시켰다.

<241> 표적화된 ES 세포의 생성 및 분석

<242> 본질적으로는 문헌 [Robertson, E. J. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford:IRL Press, p. 71-112]에 기재된 바와 같이, AB-1 ES 세포 [McMahon, A. P. and Bradley, A., (1990) Cell 62:1073-1085]를 세포분열 불활성인 SNL76/7 세포 공급층상에서 성장시켰다 (동일 문헌). 선형화된 CMD 표적화 벡터를 하스티 (Hasty) 등의 문헌 [Hasty, P. R. et al. (1991) Nature 350:243-246]에 기재된 방법에 따라 AB-1 세포에 전기천공하였다. 전기천공된 세포를 100 mm 디쉬에 1×10^6 내지 2×10^6 개 세포/디쉬의 밀도로 플레이팅하였다. 24시간 후에, 배지에 G418 ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 활성 성분 (mL)) 및 FIAU ($5 \times 10^{-7} \text{ M}$)를 첨가하고, 8 내지 9일에 걸쳐 약물-내성 클론이 발생되도록 하였다. 클론을 골라 내어 트립신으로 처리하고, 두 부분으로 나누어 추가로 증식시켰다. 이어서, 각 클론으로부터 유도된 세포의 절반을 동결시키고 나머지 절반은 벡터와 표적 서열 사이의 상동성 재조합에 대하여 분석하였다.

<243> 서던 블랏 혼성화를 통해 DNA 분석을 수행하였다. 라이어드 (Laird) 등의 문헌 [Laird, P. W. et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19:4293]에 기재된 바와 같이, 클론으로부터 DNA를 단리하였다. 단리된 게놈 DNA를 SpeI으로 절단시키고, mu 인트론 인헨서와 mu 스위치 영역 사이의 서열과 혼성화하는, 915 bp SacI 단편인 프로브 A (도 1 참조)로 탐지하였다. 프로브 A는 야생형 좌위로부터의 9.9 kb SpeI 단편, 및 CMD 표적화 벡터와 상동성 재조합되는 mu 좌위로부터의 진단용 7.6 kb 밴드를 검출한다 (neo 발현 카세트는 SpeI 부위를 함유함). 서던 블랏 분석을 통해 스크리닝된 1132개의 G418 및 FIAU 내성 클론 중 3개가 mu 좌위에서의 상동성 재조합을 지지하는 7.6 kb SpeI 밴드를 나타내었다. 이들 3개 클론을 효소 BglII, BstXI 및 EcoRI로 추가로 절단하여, 벡터가 mu 유전자에 상동적으로 통합되었음을 확인하였다. 프로브 A와 혼성화되는 경우, 야생형 DNA를 BglII, BstXI 또는 EcoRI으로 절단하여 서던 블랏으로 분석한 결과, 각각 15.7 kb, 7.3 kb 및 12.5 kb 크기의 단편이 생성되었지만, 표적화된 mu 대립유전자의 존재는 각각 7.7 kb, 6.6 kb 및 14.3 kb 크기의 단편으로 나타났다. SpeI으로 절단하여 검출된 3개의 양성 클론 모두가, neo 카세트가 CmuI 엑손으로 삽입된 것으로 진단되는 예상 BglII, BstXI 및 EcoRI 제한 단편을 나타내었다.

<244> 돌연변이된 mu 유전자를 보유하는 마우스의 생성

<245> 브래들리 (Bradley) 등의 문헌 [Bradley, A. (1987) in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach. (E. J. Robertson, ed.) Oxford:IRL Press, p. 113-151]에 기재된 바와 같이, 번호 264, 272 및 408로 명명된 3개의 표적화된 ES 클론을 해동시키고 C57BL/6J 배반포에 주입하였다. 주입된 배반포를 가임신 상태의 암컷 자궁 내에 옮겨, 주입 ES 세포 및 숙주 배반포로부터 유도된 세포의 혼합물을 나타내는 키메라 마우스를 생성시켰다. 키메라에서 ES 세포의 분포 정도는 흑색 C57BL/6J 배경상에서 ES 세포주로부터 유도되는 아구티 (agouti) 외피의 착색량에 의해 육안으로 추정할 수 있다. 클론 272 및 408은 키메라를 단지 낮은 비율 (%)로만 생성 (즉, 아구티 착색 비율 (%)이 낮음)하였지만, 클론 264는 수컷 키메라를 높은 비율

(%)로 생성하였다. 이들 키메라를 C57BL/6J 암컷과 교배하여 아구티 자손을 발생시켰으며, 이는 ES 세포 계능의 생식세포주 전달을 지시한다. 꼬리 생체검사법으로부터의 DNA를 BglI로 절단하고 서던 블랏 분석을 수행하여, 표적화된 mu 유전자를 스크리닝하였다 (ES 세포 DNA의 분석에 대하여 상기 기재된 바와 같음). 아구티 자손의 약 50 %는 15.7 kb의 야생형 밴드 뿐만 아니라 7.7 kb의 혼성화 BglI 밴드도 나타내었으며, 이는 표적화된 mu 유전자의 생식세포주 전달을 입증하는 것이다.

<246> mu 유전자의 기능적 불활성화에 대한 트랜스제닉 마우스의 분석

<247> Cmu1로의 neo 카세트 삽입이 Ig 중쇄 유전자를 불활성시키는지 여부를 결정하기 위해, JH 유전자 절편을 결실시켜 중쇄 발현을 불활성화시키는 JHD 돌연변이에 대해 동형접합인 마우스와 클론 264 키메라를 교배하였다 [Chen et al., (1993) Immunol. 5:647-656]. 아구티 자손이 4 마리 생성되었다. 이들 동물이 1개월령일 때 혈청을 채취하여 ELISA를 통해 무린 IgM의 존재에 대하여 분석하였다. 자손 4 마리 중 2 마리에서는 IgM이 완전히 결여되어 있었다 (표 1 참조). 꼬리 생체검사법으로부터의 DNA를 BglI 절단 및 프로브 A와의 혼성화 (도 1 참조), 및 StuI 절단 및 475 bp EcoRI/StuI 단편과의 혼성화 (동일 문헌)에 의해 서던 블랏 분석을 수행하여 상기 4마리 동물의 유전자형을 결정함으로써, 혈청 IgM을 발현시키지 못하는 동물은 중쇄 좌위의 한 대립유전자가 JHD 돌연변이를 보유하며 나머지 대립유전자는 Cmu1 돌연변이를 보유한다는 것을 입증하였다. JHD 돌연변이에 대하여 이형접합인 마우스는 혈청 Ig를 야생형 수준으로 나타내었다. 이 데이터는 Cmu1 돌연변이가 mu 유전자의 발현을 불활성화시킨다는 것을 입증한다.

표 1

<248>

마우스	혈청 IgM ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IgH 채 유전자형
42	< 0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	< 0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6F1	153	+/+
JHD	< 0.002	JHD/JHD

<249> 표 1은 CMD 돌연변이 및 JHD 돌연변이를 둘다 보유하는 마우스 (CMD/JHD), JHD 돌연변이에 대하여 이형접합인 마우스 (+/JHD), 야생형 (129Sv x C57BL/6J) F1 마우스 (+/+) 및 JHD 돌연변이에 대하여 동형접합인 B 세포 결핍 마우스 (JHD/JHD)에 대하여 ELISA를 통해 검출된 혈청 IgM의 수준을 나타낸다.

<250> **실시예 2: CD89에 대한 완전 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 HC012 트랜스제닉 마우스의 생성**

<251> HC012 인간 중쇄 트랜스진

<252> pH2의 80 kb 삽입체 [Taylor et al., 1994, Int. Immunol., 6:579-591] 및 pVx6의 25 kb 삽입체의 동시주입에 의해 HC012 트랜스진을 생성시켰다. 플라스미드 pVx6를 하기 기재된 바와 같이 제작하였다:

<253> 인간 생식세포주 VH1-18 (DP-14) 유전자를 약 2.5 kb의 5' 플랭킹 및 5 kb의 3' 플랭킹 게놈 서열과 함께 포함하는 8.5 kb HindIII/SalI DNA 단편을 플라스미드 벡터 pSP72 (미국 위스콘신주 매디슨에 소재하는 프로메가 (Promega) 제품) 내에 서브클로닝하여 플라스미드 p343.7.16을 생성하였다. 인간 생식세포주 VH5-51 (DP-73) 유전자를 약 5 kb의 5' 플랭킹 및 1 kb의 3' 플랭킹 게놈 서열과 함께 포함하는 7 kb BamHI/HindIII DNA 단편을 pBR322 기체의 플라스미드 클로닝 벡터 pGP1f [Taylor et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295]에 클로닝하여 플라스미드 p251f를 생성시켰다. pGP1f로부터 유도된 새로운 클로닝 벡터 pGP1k를 EcoRV/BamHI로 절단하여 인간 생식세포주 VH3-23 (DP47) 유전자를 약 4 kb의 5' 플랭킹 및 5 kb의 3' 플랭킹 게놈 서열과 함께 포함하는 10 kb EcoRV/BamHI DNA 단편에 라이게이션시켰다. 생성된 플라스미드 p112.2RR.7을 BamHI/SalI로 절단하고, p251f의 정제된 7 kb BamHI/SalI 삽입체로 라이게이션시켰다. 생성된 플라스미드 pVx4를 XhoI로 절단하고, p343.7.16의 8.5 kb XhoI/SalI 삽입체로 라이게이션시켰다.

<254> VH1-18 유전자를 다른 2개의 V 유전자와 동일한 방향으로 함유하고 있는 클론을 얻었다. 이어서, pVx6로 명명한 이 클론을 NotI로 절단하고, 호간 (Hogan) 등의 문헌 [B. Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 2nd edition, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY]에 기재된 바

와 같이, 정제된 26 kb 삽입체를 pH2의 정제된 80 kb NotI 삽입체와 함께 1 : 1의 몰비로 1/2일 된 (C57BL/6J x DBA/2J) F2 배아의 전핵에 동시주입하였다. 주입된 배아에서 발생한 마우스로부터 Vx6 및 HC2 모두로부터의 서열을 포함하는 트랜스제닉 마우스의 3개 독립 계통을 확립하였다. 이 계통들을 (HC012)14881, (HC012)15083 및 (HC012)15087로 명명하였다. 이어서, 이들 3개의 계통 각각을 실시예 1에서 기재한 CMD 돌연변이, JKD 돌연변이 [Chen et al. 1993, EMBO J. 12:811-820] 및 (KCo5)9272 트랜스진 [Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14:845-851]을 포함하는 마우스와 교배하였다. 생성된 마우스는 내생의 마우스 중쇄 좌위 및 카파 경쇄 좌위의 파괴에 대하여 동형접합인 배경에서 인간 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 트랜스진을 발현시켰다.

<255> 실시예 3: CD89에 대한 인간 모노클로날 항체 및 이중특이적 항체의 생산

<256> 재조합 가용성 CD89 항원을 사용하여 HC012 마우스를 면역화함으로써, 인간 항-CD89 모노클로날 항체를 생성하였다.

<257> 특히, HC012 마우스를 먼저 프로인트 완전 면역보조제 중에 에멀전화시킨 항원 20 μ g으로 면역화한 후에, 프로인트 불완전 면역보조제 중에서 2회 이상 면역화하였다. 마우스는 2주 마다 복강내 주사를 통해 면역화하였다.

<258> 최종 면역화한 지 10일 후에, ELISA를 통해 인간 IgG 항-CD89 역가를 결정하였다 (하기 기재한 바와 같음). 충분한 역가 (항-CD89 IgG 반응)를 발생시키는 마우스를 항원 23 μ g으로 IV 부스팅하고, 제3일 및 제2일 후에 비장절제술을 시술하였다. 반응하는 마우스로부터 비장을 수거하여 단일 세포로 분산시켰다.

<259> 항-CD89 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 항-CD89 항체를 함유하는 혈장을 보유하는 마우스의 비장세포를 P3X63-Ag8.653 세포 (ATCC에 기탁번호 ATCC CRL 1580으로 기탁된 비분비성 마우스 골수종 세포) 및 PEG와 융합시켰다. 하이브리도마를 성장시킨 후에, 항-인간 IgG ELISA를 이용하여 하이브리도마를 함유하는 각 웰을 인간 IgG의 생산에 대하여 스크리닝하였다.

<260> 하기 특성을 기준으로 양성 하이브리도마를 스크리닝하여 선별하였다: (1) 인간 IgG1 κ 항체의 생산, (2) 가용성 재조합 CD89에의 결합 및 (3) CD89-발현 면역 세포에의 결합. 7.4 (7F12), 8.2 (8D2) 및 14.1 (14A8)이라 지칭한 3개의 양성 클론이 이러한 기준에 부합됨을 알아냈다.

<261> 결합 분석에는 고상 ELISA 기재의 분석을 이용하였다. 간략하게 설명하면, PBS 중의 가용성 재조합 CD89 (1 μ g/ml)를 96-웰 마이크로타이터 플레이트에 코팅하고 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, 상기 플레이트를 PBS-0.2 % 트윈-20 (PBST)으로 세척하고, PBST 중 닭 혈청 알부민으로 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 항-CD89를 생산하는 하이브리도마로부터의 상층액 또는 정제된 항체 (PBS 중)를 웰에 가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 상기와 같이 PBST로 세척한 다음, HRP-접합된 염소-항-인간 50 μ l와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후에, ABTS (0.1 M 시트르산 500 ml 중 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산) 150 mg, pH 4.35)/H₂O₂ (ABTS 용액 10 ml 당 30 % H₂O₂ 10 μ l) 크로마젠/기질 용액 100 μ l를 각 웰에 첨가하고 405 nm의 파장에서 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 샘플을 판독하였다.

<262> CD89와 결합한 인간 IgG를 생산하는 하이브리도마는 이소타입에 대하여 ELISA (인간 카파)로 분석 (상기한 바와 동일한 프로토콜)했을 때 추가의 특징이 있었다.

<263> 인간 IgG1 κ 이소타입을 보유하는 가용성 CD89과 결합하는 항체의 생산을 기준으로, 3개의 세포주 7.4, 8.2 및 14.1을 선별하였다. 1 내지 5 % 팔타클론 (Fetalclone) (미국 유타주 로간에 소재하는 하이클론 (Hyclone) 제품)을 함유하는 HyQ-CCM1 배지를 사용하여, 셀맥스 (Cellmax) 생물반응기 (미국 캘리포니아주 라구나 힐스에 소재하는 셀코 (Cellco) 제품)로부터 항체를 단리하고, 칼럼 크로마토그래피하여 정제하였다. 형광 이소티오시아네이트 (FITC)를 사용하여 표지하는 경우, 정제된 모노클로날 항체를 0.3 M 탄산나트륨 완충액 (pH 9.5)에 대하여 전반적으로 투석하였다. DMSO 1 ml 중 고체 FITC 1 mg을 용해시켜 FITC 저장 용액을 제조하였다. 항체 단백질 1 mg 당 FITC 50 μ g을 제공하는 양으로 FITC 저장 용액을 적가하면서 계속 혼합하였다. FITC를 첨가한 다음, 상기 용액을 실온에서 1 내지 3시간 동안 암조건 하에 인큐베이션하였다. FITC 표지된 항체를 PBS 중에서 평형화시킨 세파덱스 (Sephadex) G-10 칼럼 상에서 겔 여과하여 단리하였다.

<264> 하기의 실시예에 기재한 바와 같이, 정제된 항체들은 결합 특이성 및 활성과 관련한 추가의 특징이 있었다.

<265> 실시예 4: CD89에 대한 인간 모노클로날 항체의 특성화

<266> **I. 결합/특이성 연구**

<267> ELISA로 검출했을 때 CD89에 유의한 결합을 나타낸 하이브리도마 상층액으로부터 정제한 모노클로날 항체 (Mab) (예를 들면 7.4, 8.2 및 14.1)를 하기한 바와 같이 유동 세포 계수기 (FACS 분석법)를 이용하여 추가로 시험하고, 하기하는 CD89 발현 세포에 결합한다는 것을 확인하였다: (1) 형질전환되어 인간 CD89 ("2a1.6/CD89 세포")를 발현하는 뮤린 2a1.6 세포, (2) 인간 PMNL 세포 ("HuPMN") 및 (3) 트랜스제닉 마우스로부터 분리된, 인간 CD89를 발현하는 PMNL 세포 ("Fc α RI Tg MsPMN").

<268> 특히, Mab 14.1는 CD89 (Fc α RI)를 IgA-결합 부위가 아닌 위치의 세포외 도메인 2 내에서 인식하는 것으로 확인되었고, 이는 공지된 뮤린 항-CD89 Mab, 예를 들면 Fc α RI 리간드-결합 도메인을 차단하는 My43 (마우스 IgM)과 구별된다 (문헌 [Shen, L. et al., 1989 R Immunol. 143:4117]).

<269> PMNL 분리

<270> 피콜-히스토파크 (Ficoll-Histopaque) (시그마 제품) 밀도 구배 원심분리를 통해 건강한 지원자의, 헤파린을 처리한 정맥혈로부터 인간 PMNL를 분리하였다. 세포회전물 제제로 측정된 PMNL 순도는 95 % 초과였으며, 세포 생존율은 98 % 초과였다 (트립판 블루 배제법으로 측정함).

<271> 뮤린 PMNL을 분리하기 전에, 마우스에 폴리에틸렌-글리콜 과립군-자극 성장 인자 (PEG-G CSF, 신장은 미국 캘리포니아주 싸우전드 오우크스 암겐에 거주하는 제이. 앤더슨 박사로 부터 얻음) 15 μ g를 피하 주사하여 PMNL 수를 증가시켰다. 3일 후에, 안와후 신경총 (retro-orbital plexus)으로부터 혈액을 수집하였다. 저장(低張) 용혈을 통해 적혈구를 제거한 후에, 10 % FCS로 보충한 RPMI 1640 배지 (미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드에 소재하는 킴코 BRL (Gibco BRL) 제품)를 사용하여 남아있는 백혈구를 3회 세척하였다. FACSsan (미국 캘리포니아주 산 조세에 소재하는 벡톤 딕킨슨 (Becton Dickinson) 제품)상에서 FACS 분석을 수행하고, 백혈구가 약 55 %의 PMNL, 약 40 %의 림프구, 약 3 %의 단핵구 및 약 1 %의 호산구로 구성되어 있음을 확인하였다. 트립판 블루 배제법을 통해 측정된 세포 생존율은 언제나 95 % 초과였다.

<272> FACS 분석 1 (결합 연구)

<273> 항체 희석물 50 μ l를 Facs 완충액 50 μ l 중 50,000개의 2a1.6/CD89 세포에 첨가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 상기 세포를 Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하여 토끼 (Fab₂) 항-Hu IgG-FITC와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하고, Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하였다. 세포를 Facs 완충액 200 μ l 중에 재현탁시켰다. 팩스칼리버 (Facsclibur) (벡톤 딕킨슨 제품)에서 형광을 측정하였다.

<274> FACS 분석 2 (특이성 연구 1)

<275> Facs 완충액 중 1 mg/ml 25 μ l를 Facs 완충액 50 μ l 중 50,000개의 2a1.6/CD89 세포에 첨가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 항체 희석물 25 μ l를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하고, Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하였다. 이어서, 세포를 토끼 (Fab₂) 항-Hu IgG-FITC와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하고, Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하여 Facs 완충액 200 μ l 중에 재현탁시켰다. 팩스칼리버 (벡톤 딕킨슨 제품)에서 형광을 측정하였다.

<276> FACS 분석 3 (특이성 연구 2)

<277> 항체 희석물 50 μ l를 Facs 완충액 50 μ l 중 50,000개의 2a1.6/CD89 세포 뿐만 아니라 대조군 세포인 Jurkat/IIIa, CHO/IIIbNA.2, CHO/IIIbNA.1, 2a1.6/CD64 또는 SLC 세포에도 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하고, Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하였다. 이어서, 세포를 토끼 (Fab₂) 항-Hu IgG-FITC와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하고, Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하였다. 세포를 Facs 완충액 200 μ l 중에 재현탁시켰다. 팩스칼리버 (벡톤 딕킨슨 제품)에서 형광을 측정하였다.

<278> FACS 분석 4 (전혈 결합 연구)

<279> 항체 희석물 50 μ l를 인간, 마우스 또는 CD89 Tg 마우스 전혈 50 μ l에 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 Facs 용해 완충액으로 용해시켜 4 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션하고, Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하였으며, 토끼 (Fab₂) 항-Hu IgG-FITC와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하고 Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하였다. 이어서, 세포를 Facs 완충액 200 μ l 중에 재현탁시켰다. 팩스칼리버 (벡톤 딕킨슨 제품)에서 형광을 측정하였다.

II. 경쟁 연구

하기에 기재한 바와 같은 차단 연구 및 저해 ELISA를 통해, Mab 14.1 및 7.4를 인간 IgA 및 Mab My43 (마우스 항-CD89 항체)와 CD89의 결합 저해력에 대하여 시험하였다.

MY43은 IgA와 마찬가지로 천연 리간드 결합 부위에서 CD89에 결합하기 때문에 IgA 결합과 경쟁한다. 또한, Mab 14.1 및 7.4도 Mab A77 및 A59 (이들은 천연 리간드인 IgA의 결합 부위가 아닌 위치에서 결합함)과 CD89의 결합 저해력에 대해 시험하였다.

Mab 14.1은 IgA 및 MY43 결합을 저해하지 않았으나, A77 및 A59과 CD89의 결합은 저해하였고, 이는 상기 항체가 천연 리간드 결합 부위가 아닌 위치에서 결합함을 나타내는 것이다.

Mab 7.4는 IgA, MY43, A77 또는 A59와 CD89의 결합을 저해하지 않았으며, 이는 상기 항체 역시 천연 리간드 결합 부위가 아닌 위치에서 결합하나 14.1과는 다른 부위에서 결합함을 나타낸다.

차단 연구

항체 희석물 25 μ l를 FACS 완충액 50 μ l 중 50,000개의 2a1.6/CD89에 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 인큐베이션 하였다. 준최적 농도의 A77-FITC, A59-PE 또는 MY43 25 μ l를 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하고, FACS 완충액 100 μ l로 3회 세척하였다. MY43을 처리한 세포를 토끼 (Fab₂) 항-Hu IgG-FITC와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션하고, FACS 완충액 100 μ l로 3회 세척하였다. 이어서, 세포를 FACS 완충액 200 μ l 중에 재현탁시켰다. 팩스칼리버 (벡톤 디킨슨 제품)에서 형광을 측정하였다.

저해 ELISA

PBS 중 가용성 재조합 CD89 (1 μ g/ml) 100 μ l/웰을 사용하여 96-웰 ELISA (평판) 바닥 플레이트를 코팅하고 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. ELISA 플레이트를 털어내고 웰 당 100 μ l의 PBS/0.05 % 트윈/1% 닭 혈청 (PBST/Ch)과 함께 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 털어내고 PBST/Ch 중에서 희석한 과량의 항체 (50 μ l/웰)와 함께 10분 동안 인큐베이션시켰다. aIgA2 용액을 PBST/Ch 중에 웰 당 50 μ l씩 투여량 반응으로 첨가하고, 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 PBS/0.05 % 트윈 (PBST)로 3회 세척하고 웰 당 4E8-바이오틴 (마우스 항-IgA) 100 μ l와 함께 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 PBST로 3회 세척하고, 웰 당 PBST/Ch 중 Strep-HRP 100 μ l와 함께 실온에서 60분 동안 인큐베이션하고, PBST로 3회 세척하여 ABTS로 ELISA를 수행하였다. 바이오-텍 (Bio-tek) 판독기에서 405 nm의 파장에서의 최적 밀도를 판독하였다.

III. 면역침전 연구

Mab 14.1 및 7.4는 가용성 재조합 CD89 (sCD89)을 면역침전시키는 것으로 밝혀졌다.

간략하게 설명하면, ProtG 세파로스 고속 (ProtG Sepharose Fast Flow) 칼럼을 PBS로 3회 세척하였다. PBS 중의 세척된 비드로 sCD89를 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 예비제거하였다. 예비제거된 sCD89를 마우스 IgG 또는 인간 IgG 항체와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. CD89/IgG 용액을 ProtG로 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 세척한 후에 PBS로 5회 세척하였다. 이어서, 샘플을 SDS-PAGE 샘플 완충액 중에 재현탁하고, SDS-PAGE 구배 겔에서 분리한 후에 겔을 코마시 브릴리언트 블루 (Commassie Brilliant Blue)로 염색하였다.

IV. 친화성 연구

Mab 14.1 및 7.4의 친화도 반응속도, 즉, 결합 평형 결합 상수 (K_a) 및 해리 상수 (K_d)를 하기와 같이 측정하였다:

Mab 14.1의 경우, K_a 는 약 1.5×10^9 이고 K_d 는 약 6.8×10^{-10} 인 것으로 측정되었다.

Mab 7.4의 경우, K_a 는 약 2.0×10^8 이고 K_d 는 약 5.1×10^{-9} 인 것으로 측정되었다.

sCD89를 칩에 고정시키고, 다양한 농도의 Mab를 상기 칩에 흘림으로써, BIAcore 분석을 사용하여 친화도 반응속도를 측정하였다. 또한, sCD89를 Mab에 흘림으로써 Mab 포획 분석도 수행하였다. 상기 항원 및 인간 IgG의 고정화는 아민 커플링을 통해 수행하였다. 상기 키트는 BIAcore로부터 구입한 것이었으며, 이는 칩 및 완충액을 포함하고 있다. 랭뮤어 (langmuir) 모델을 사용하여 작도하였다. 상기 장치와 관련있는 소프트웨어에서 이용

가능한 모델을 통해 데이터 분석을 수행하였다.

<297> 실시예 5: CD89에 대한 인간 모노클로날 항체의 활성

<298> I. 칼슘 유출 (flux) 연구

<299> Mab 14.1를 하기와 같이 시험하여 이것이 칼슘 유출을 유도함을 밝혀냈다. Mab 7.4는 칼슘 유출을 유도하지 않았다.

<300> 무혈청 배지 1.52 ml 중에 3×10^6 개의 세포를 재현탁시켜 3회 세척한 후에, SNARF-1 38 μ l 및 FLUO-3 38 μ l를 첨가하였다. 세포를 암조건 하에 37 °C에서 인큐베이션하고 따뜻한 (37 °C) 무혈청 배지 5 ml를 첨가하였으며, 세포를 37 °C에서 5분 더 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 무혈청 배지로 2회 세척하고, 항체 항-Fc α R1로 코팅하여 다시 세척하였다. 세포를 Ca^{++} 이동화 (Mobilisation) 완충액 중에 재현탁하고, 유동 세포 계수기로 24초 동안 작동시켜 기준 수준을 확립하였다. 이어서, 가교 항체 항-Hu IgG-Fc 세포를 첨가하고 4분 동안 모니터링하였다. 음성 대조군을 확립하기 위해, 항-Fc α R1과 함께 인큐베이션하지 않은 세포를 사용하였다.

<301> II. 인간 C1q 결합 연구

<302> 하기 단락에 기재한 바와 같이 ELISA 및 FACS를 사용하여, Mab 14.1 및 7.4를 hC1q의 고정력에 대하여 시험하고 (ELISA), CD89 발현 세포에 결합된 경우에 대해서도 시험 (FACS 분석)하였다.

<303> Mab 14.1는 ELISA에서 hC1q를 고정시킬 수 있었으며, 세포에 결합된 경우에는 약하게 고정시켰다. Mab 7.4는 ELISA에서 hC1q를 고정시킬 수 있었으나, 세포에 결합된 경우에는 고정시키지 못하였다. 세포에 결합한 경우는 생체내 조건을 반영하는 것이며, 이때 이들 Mab가 hC1q를 고정시킬 수 없는 것은 요법에서, 예를 들면 보체 캐스케이드 (표적 세포 용해가 일어남)를 개시하는 것이 바람직하지 않은 상황에서 그들의 사용을 특히 가치있게 만드는 것이다.

<304> ELISA 분석

<305> 간략하게 설명하면, PBS 중 인간 IgG (3 μ g/ml) (대조군으로는 hIgG1, hIgG2, hIgG3 및 hIgG4를 사용함) 100 μ l/웰을 사용하여 96-웰 ELISA (편평) 바닥 플레이트를 실온에서 밤새 인큐베이션하여 털어낸 다음, 웰 당 100 μ l의 인산염/NaCl/젤라틴/트윈 완충액 (C1q-ELISA 희석물)을 사용하여 실온에서 60분 동안 코팅하였다. 플레이트를 털어내고 C1a-ELISA 희석물 중에서 희석하여 20 μ g/ml (100 μ l/웰)로 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였으며, C1q-ELISA 희석물로 3회 세척하였다. 이어서, 플레이트에 웰 당 C1q-ELISA 희석물 100 μ l 중에 희석한 토끼 항-hC1q를 첨가하여 실온에서 60분 동안 인큐베이션하고, C1q-ELISA 희석물로 3회 세척하여 웰 당 C1q-ELISA 희석물 100 μ l 중에 희석한 PO-접합된 돼지 항-Rb IgG-Fc와 함께 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 C1q-ELISA 희석물로 3회 세척하였다. ABTS로 ELISA를 전개하고, 바이오-테크 판독기에서 405 nm의 파장에서의 최적 밀도를 판독하였다.

<306> FACS 분석

<307> C1q-Facs 완충액 중 항체 희석물 25 μ l를 Facs 완충액 및 NaCl (C1q-Facs 완충액) 50 μ l 중 50,000개의 2a1.6/CD89 세포에 첨가하여 4 °C에서 15분 동안 인큐베이션하고, 여기에 C1q-Facs 완충액 중 hC1q (20 μ g/ml) 25 μ l를 첨가하여 4 °C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 C1q-Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하고, 토끼 항-hC1q-FITC와 함께 4 °C에서 30분 동안 인큐베이션하여 C1q-Facs 완충액 100 μ l로 3회 세척하였다. 세포를 C1q-Facs 완충액 200 μ l 중에 재현탁시켰다. 펙스칼리버 (벡톤 디킨슨 제품)에서 형광을 측정하였다.

<308> 등가물

<309> 당업자는 일상적인 실험 이외의 실험을 사용하지 않고도 본원에 기재된 본 발명의 특정한 실시양태의 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기하는 청구의 범위에 포함된다.

도면의 간단한 설명

<41> 도 1은 HuMAb 14.1의 V_H -영역의 뉴클레오타이드 서열 및 상응하는 아미노산 서열을 나타낸다. CDR 영역도 나타내

었다. HuMAb 14.1의 V_H -영역에 이용된 생식세포주 (germline) 절편에는 V_H 3-30.3, D 6-13 및 JH4b가 포함된다.

<42> 도 2는 HuMAb 14.1의 V_K -영역의 뉴클레오티드 서열 및 상응하는 아미노산 서열을 나타낸다. CDR 영역도 나타내었다. HuMAb 14.1의 V_K -영역에 이용된 생식세포주 절편에는 V_K L18 및 JK3이 포함된다.

<43> 도 3은 HuMAb 8D2의 V_H -영역의 뉴클레오티드 서열 및 상응하는 아미노산 서열을 나타낸다. CDR 영역도 나타내었다. HuMAb 8D2의 V_H -영역에 이용된 생식세포주 절편에는 V_H 3-30.3, D 7-27 및 JH3b가 포함된다.

<44> 도 4는 HuMAb 8D2의 V_K -영역의 뉴클레오티드 서열 및 상응하는 아미노산 서열을 나타낸다. CDR 영역도 나타내었다. HuMAb 8D2의 V_K -영역에 이용된 생식세포주 절편에는 V_K A27 및 JK2가 포함된다.

도면

도면1

항-CD89 14.1 VH

```

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG OCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
R L S C A A S G F T F S S Y V L H W
AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGT TAT GTT CTG CAC TGG

                                CDR2
V R Q A P G K G L D W V A V I S D D
GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAT TGG GTG GCA GTG ATA TCA GAT GAT

                                CDR2
G R N K Y F A D S V K G R F T I S R
GGA AGG AAT AAA TAC TTC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
T A V Y Y C V R E G Y S G S W F D Y
ACG GCT GTG TAT TAC TGT GTG AGA GAA GGG TAT AGC GGC AGC TGG TTT GAC TAC

W G Q G T L V T V S S
TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면2

항-CD89 14.1 VK

```

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 CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

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

                                CDR2
Q Q K P G K A P K L L I Y G A S S L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCC TCC AGT TGG

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

                                CDR3
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
F N S Y P F T F G P G T K V D I K
TTT AAT AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

```


도면3

항-CD89 8.2 VH

```

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
-----
R L S C A A S G F T F S S Y A M H W
AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT ATG CAC TGG

                                CDR2
-----
V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D
GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT

                                CDR2
-----
G R N K D Y A D S V K G R F T I S R
GGA AGA AAT AAA GAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
-----
T A V H Y C A R L D W G Y D A F D I
ACG GCT GTG CAT TAC TGT GCG AGG CTT GAC TGG GGA TAT GAT GCT TTT GAT ATC

W G Q G T M V T V S S
TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA

```

도면4

항-CD89 8.2 VK

```

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
-----
A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

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

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

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

                                CDR3
-----
Q Y G S S P P Y T F G Q G T K L E I
CAG TAT GGT AGC TCA CCT CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC

K
AAA

```

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Medarex, Inc. et al.

<120> HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES TO FC ALPHA
RECEPTOR (CD89)

<130> MXI-211

<150> US 60/338,956

<151> 2001-11-05

<150> US 60/268,075

<151> 2001-02-12

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 357
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 caggtgcaac tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag ccctcggatt caccttcagt agttatgttc tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggattg ggtggcagtg atatcagatg
 atggaaggaa taaatacttc 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagagaaggg 300
 tatagcggca gctggtttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20
 25 30
 Val Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Asp Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Phe Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Val Arg Glu Gly Tyr Ser Gly Ser Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtc gggcattagc agtgcttttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatggt gcctccagtt
 tggaaggtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccattcac tticggccct 300
 gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 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 Gly Ala Ser Ser Leu Glu Gly 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 Phe

85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagaaa taaagactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240
ctgcaaatga
acagcctgag agctgaggac acggctgtgc attactgtgc gaggcttgac 300
tggggatatg atgcttttga tatctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 357

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val His Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Asp Trp Gly Tyr Asp Ala
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 7
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtcag gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaag 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagttg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt
ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacctcc gtacactttt 300
ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 327

<210> 8

<211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 Leu Glu Ile Lys
 100 105