(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월26일
(11) 등록번호 10-1333449
(24) 등록일자 2013년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7005738(분할)
(22) 출원일자(국제) 2004년12월10일
심사청구일자 2012년03월29일
(85) 번역문제출일자 2012년03월02일
(65) 공개번호 10-2012-0030602
(43) 공개일자 2012년03월28일
(62) 원출원 특허 10-2006-7013685
원출원일자(국제) 2004년12월10일
심사청구일자 2009년02월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/041506
(87) 국제공개번호 WO 2005/058815
국제공개일자 2005년06월30일
(30) 우선권주장
60/529,180 2003년12월10일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Juournal of Immunology, vol. 167, pp.4091-4097(2001)
전체 청구항 수 : 총 21 항

(73) 특허권자
메다렉스, 엘.엘.시.
미국, 08540 뉴저지, 프린스톤, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
데쉬판데 쉬리칸트
미국 캘리포니아주 94555 프레몬트 레머 테라스 5910
후앙 하이춘
미국 캘리포니아주 94539 프레몬트 수에노 웨이 2425
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김성기, 김진희

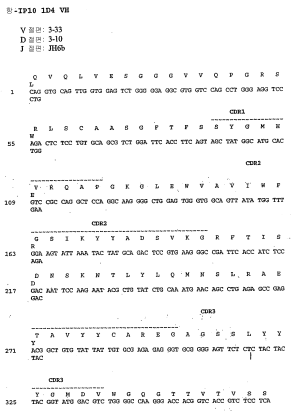
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **ＩＰ－１０ 항체 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 IP-10에 높은 친화도로 결합하며, IP-10의 그의 수용체에의 결합을 억제하며, IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하며 IP-10 유도된 세포 이동을 억제하는 단리된 단일클론 항체, 특히 인간 항체를 제공한다. 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자, 본 발명의 항체를 발현하기 위한 발현 벡터, 숙주 세포 및 방법도 제공된다. 본 발명의 항체를 포함하는 면역콘쥬게이트, 2특이성 분자 및 약학 조성물도 제공된다. 본 발명은 또한 여러 염증성 및 자가면역성 질환을 치료하는 방법을 비롯한, 본 발명의 항체를 사용한 IP-10 활성의 억제 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1a



(72) 발명자

스리니바산 모한

미국 캘리포니아주 95014 쿠퍼티노 레드 퍼 코트 21073

카다렐리 조세핀 엠.

미국 캘리포니아주 94070 산 칼로스 레슬리 드라이브 126

왕 창유

미국 캘리포니아주 94555 프레몬트 에이피티. 203 다윈 드라이브 3803

패스모어 데이빗

미국 캘리포니아주 94041 마운틴 뷰 에이피티. 6 처치 스트리트 98

란간 반기푸람 에스.

미국 캘리포니아주 94523 플레젠트 힐 빌리지 스퀘어 플레이스 42

레인 토마스 이.

미국 캘리포니아주 92612 어빈 하베이 코트 76

케이르스테드 한스 에스.

미국 캘리포니아주 92612 어빈 멘델 코트 2

리우 마이클 티.

미국 캘리포니아주 어빈 엘름허스트 1102

특허청구의 범위

청구항 1

단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분으로서,

(a) 서열 번호 1의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 13의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

서열 번호 24의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

서열 번호 51의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 62의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

서열 번호 73의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

(b) 서열 번호 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 17의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

서열 번호 28의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

서열 번호 55의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 66의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

서열 번호 77의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는

(c) 서열 번호 9의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 21의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

서열 번호 32의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

서열 번호 59의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 70의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

서열 번호 81의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

을 포함하고, 상기 항체가 인간 IP-10에 특이적으로 결합하는 것인 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열 번호 1의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 13의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

서열 번호 24의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

서열 번호 51의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 62의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

서열 번호 73의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 3

제1항에 있어서,

서열 번호 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 17의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

서열 번호 28의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

서열 번호 55의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 66의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

서열 번호 77의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 4

제1항에 있어서,

서열 번호 9의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 21의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

서열 번호 32의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

서열 번호 59의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 70의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

서열 번호 81의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 5

제1항에 있어서, IgG1 또는 IgG4 이소타입(isotype)의 전장 항체인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 6

제1항에 있어서, 항체 단편 또는 단일쇄 항체인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 7

제1항에 있어서,

(i) IP-10의 CXCR3에의 결합을 억제하는 기능적 특성;

(ii) IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하는 기능적 특성;

(iii) IP-10 유도된 세포 이동을 억제하는 기능적 특성;

(iv) 붉은털 원숭이 IP-10과 교차 반응하는 기능적 특성; 또는

(v) 마우스 IP-10과 교차 반응하지 않는 기능적 특성

중 하나 이상을 나타내는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 8

제1항에 있어서,

(a) 서열 번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열 번호 84의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 9

제1항에 있어서,

(a) 서열 번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열 번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 10

제1항에 있어서,

(a) 서열 번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열 번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체인 항체 또는 그의 항원 결합 부분.

청구항 12

치료제에 결합된 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하는 면역콘쥬게이트(immunoconjugate).

청구항 13

제12항에 있어서, 치료제가 세포 독소인 면역콘쥬게이트.

청구항 14

제12항에 있어서, 치료제가 방사성 동위원소인 면역콘쥬게이트.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 부분과는 상이한 결합 특이성을 갖는 제2 작용성 부분에 결합된 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하는 2특이성(bispecific) 분자.

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 17

제16항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 18

제17항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 19

인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 트랜스진(transgene)을 포함하며, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 항체를 발현하는 트랜스제닉(transgenic) 마우스.

청구항 20

제19항의 마우스로부터 제조되며, 상기 항체를 생산하는 하이브리도마.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

항-IP-10 항체의 제조 방법으로서,

(a) (i) 서열 번호 1의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 13의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

서열 번호 24의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

서열 번호 51의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 62의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

서열 번호 73의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

(ii) 서열 번호 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 17의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

서열 번호 28의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

서열 번호 55의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 66의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

서열 번호 77의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는

(iii) 서열 번호 9의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 21의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

서열 번호 32의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

서열 번호 59의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

서열 번호 70의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

서열 번호 81의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

을 제공하는 단계;

(b) 중쇄 가변 영역 항체 서열 및 경쇄 가변 영역 항체 서열로부터 선택되는 하나 이상의 가변 영역 항체 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경하여 하나 이상의 변경된 항체 서열을 생성하는 단계; 및

(c) 변경된 항체 서열을 단백질로서 발현시키는 단계

를 포함하는 제조 방법.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2003년 12월 10일자로 출원된 미국 가출원 제60/529,180호를 우선권으로 주장한다. 전술한 출원의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 인터페론 감마 유도성 단백질 10 (interferon gamma inducible protein 10, IP-10) (CXCL10으로도 공지됨)은 원래 인터페론 감마 (IFN-감마)로 처리된 세포에서의 IP-10 유전자의 발현에 기초하여 동정된 10 kDa 케모카인이다 (문헌[Luster, A. D. 등 (1985) Nature 315: 672-676]). IP-10은 주화 활성을 갖는 단백질, 예를 들어 혈소판 인자 4 및 베타-트롬보글로불린과, 세포 분열 활성 (mitogenic activity)을 갖는 단백질, 예를 들어 결합 조직 활성화 펩티드 III에 대하여 상동성을 나타낸다 (문헌[Luster, A. D. 등 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2868-2871]). IP-10은 IFN-감마에 반응하여 내피 세포, 단핵구, 섬유아세포 및 각질 형성 세포를 비롯한 다양한 세포에 의해 분비된다 (문헌[Luster, A. D.and Ravetch, J. V. (1987) J. Exp. Med. 166: 1084-1097]). IP-10은 또한 인간 피부에서의 지연성 과민 반응 (delayed type hypersensitivity, DTH) 반응에 있어서 진피 대식 세포 및 내피 세포에 존재하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Kaplan, G. 등 (1987) J. Exp. Med. 166: 1098-1108]). IP-10은 또한, 원래 IFN-감마에 의해 유도되는 것을 기초로 하여 동정되었지만, 예를 들어 수지상 세포에서 IFN-알파에 의해 유도될 수 있다 (문헌[Padovan, E. 등 (2002) J Leukoc. Biol. 71: 669-676]). IP-10 발현은 또한 IFN-감마, 바이러스 및 리포폴리사카라이드와 같은 자극에 의해 중추 신경계 세포, 예를 들어 성상 세포 및 소신경교 세포(microglia)에서 유도될 수 있다 (문헌[Vanguri, R. and Farber, J. M. (1994) J. Immunol. 152: 1411-1418]; 문헌[Ren, L. Q. 등 (1998) Brain Res. Mol. Brain Res. 59: 256-263]). IP-10의 면역 생물학적 특성은 문헌[Neville, L. F 등 (1997) Cytokine Growth Factor Rev. 8 : 207-219]에 개관되어 있다.

[0004] IP-10의 수용체는 7개의 막투과성 (transmembrane) 수용체인 CXCR3로 동정되었다 (문헌[Loetscher, M. 등 (1996) J. Exp. Med. 184: 963-969]). CXCR3은 활성화된 T 림프구 상에서는 발현되지만 휴지 T 림프구 상에서

도 발현되지 않고, B 림프구, 단핵구 또는 과립구 상에서도 발현되지 않는다는 것이 밝혀졌다 (문헌[Loetscher, M. 등, 상기 참조]). CXCR3 발현은 TGF-베타 1을 이용한 자극에 의해 NK 세포 상에서 상향 조절되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Inngjerdingen, M. 등 (2001) Blood 97: 367-375]). CXCR3의 2가지 다른 리간드인 MIG (문헌[Loetscher, M. 등, 상기 참조]) 및 ITAC (문헌[Cole, K. E. 등 (1998) J. Exp. Med. 187: 2009-2021])도 동정되었다.

[0005] IP-10의 CXCR3에의 결합은 활성화된 T 세포에서 칼슘 이동 (calcium mobilization) 및 주화성을 매개하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Loetscher, M. 등, 상기 참조]). 주화성 및 세포내 칼슘 이동은 활성화된 NK 세포 상에서의 IP-10의 CXCR3에의 결합에 의해서도 유도된다 (문헌[Maghazachi, A. A. 등 (1997) FASEB J. 11: 765-774]). 흉선 내에서 IP-10은 TCR$\alpha\beta^+$ $CD8^+$ T 세포, TCR$\gamma\delta^+$ T 세포 및 NK-타입 (type) 세포에 대한 화학 유인 물질 (chemoattractant)인 것으로 밝혀졌다 (문헌[Romagnani, P. 등 (2001) Blood 97: 601-607]).

[0006] IP-10 또는 그의 수용체인 CXCR3은 다발성 경화증 (예를 들어 문헌[Sorensen, T. L. 등 (1999) J. Clin. Invest. 103: 807-815] 참조), 류마티스 관절염 (예를 들어 문헌[Patel, D. D. 등 (2001) Clin. Immunol. 98: 39-45] 참조), 궤양성 대장염 (예를 들어 문헌[Uguccioni, M. 등 (1999) Am. J. Pathol. 155: 331-336] 참조), 간염 (예를 들어 문헌[Narumi, S. 등 (1997) J. Immunol. 158: 5536-5544] 참조), 척수 손상 (예를 들어 문헌[McTigue, D. M. 등 (1998) J. Neurosci. Res. 53: 368-376]; 문헌[Gonzalez 등 2003. Exp. Neurol. 184:456-463] 참조), 전신성 홍반성 루푸스 (예를 들어 문헌[Narumi, S. 등 (2000) Cytokine 12: 1561- 1565] 참조), 이식 거부 (예를 들어 문헌[Zhang, Z. 등 (2002) J. Immunol. 168: 3205-3212] 참조), 쇼그렌 증후군 (Sjogren's syndrome) (예를 들어 문헌[Ogawa, N. 등 (2002) Arthritis Rheum. 46: 2730-2741] 참조)을 비롯한 다양한 다른 염증성 및 자가 면역 질병에서 동정되었다. 따라서 이 활성을 억제하는 치료제, 특히 인간에서의 사용에 적합한 약제가 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 IP-10에 결합하며 다수의 바람직한 특성을 나타내는 단리된 단일클론 항체, 특히 인간 단일클론 항체를 제공한다. 이러한 특성은 인간 IP-10에 높은 친화도로 결합하며, 붉은털 원숭이 (rhesus monkey) IP-10과 교차 반응성을 갖지만 인간 MIG, 인간 ITAC 또는 마우스 IP-10과의 상당한 교차 반응성은 결여된 것을 포함한다. 또한, IP-10의 그의 수용체 CXCR3에의 결합을 억제하는 항체는 수용체 발현 세포에서 IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하며 IP-10에 의해 유도된 세포 이동 (cell migration) (주화성)을 억제한다. 또한, 본 발명의 항체는 다발성 경화증으로 진단된 인간 대상의 뇌 부분에서 IP-10에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 바람직한 실시 형태에 있어서, 인간 IP-10은 서열 번호 121에 나타내어져 있는 아미노산 서열 [젠뱅크 (Genbank) 등록 번호: NP_001556]을 갖는 폴리펩티드를 포함하며; CXCR3은 서열 번호 122에 나타내어져 있는 아미노산 서열 [젠뱅크 등록 번호: NP_001495]을 갖는 폴리펩티드를 포함하고; 붉은털 원숭이 IP-10은 서열 번호 123에 나타내어져 있는 아미노산 서열 [젠뱅크 등록 번호: AAK95955]을 갖는 폴리펩티드를 포함하며; 마우스 IP-10은 서열 번호 124에 나타내어져 있는 아미노산 서열 [젠뱅크 등록 번호: NP_067249]을 갖는 폴리펩티드를 포함하고; 인간 MIG는 서열 번호 125에 나타내어져 있는 아미노산 서열 [젠뱅크 등록 번호: NP_002407]을 갖는 폴리펩티드를 포함하고/하거나 인간 ITAC는 서열 번호 126에 나타내어져 있는 아미노산 서열 [젠뱅크 등록 번호: NP_005400]에 나타내어져 있는 아미노산 서열을 포함한다.

[0009] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서, 항체는 IP-10에 특이적으로 결합하고, 인간 V_H 3-33 유전자, 인간 V_H 3-30.3 유전자, 인간 V_H 5-51 유전자 및 인간 V_H 4-61 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 V_H 생식 세포 (germline) 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 실시 형태에 있어서 본 발명은 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서, 항체는 IP-10에 특이적으로 결합하며, 인간 V_k A27 유전자, 인간 V_k L15 유전자, 인간 V_k L6 유전자 및 인간 V_k L18 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 V_k 생식 세포 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 또다른 실시 형태에 있어서, 본 발명은 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서, 항체는 IP-10에 특이적으로

결합하며,

[0010] (a) 인간 V_H 3-33 유전자, 인간 V_H 3-30.3 유전자, 인간 V_H 5-51 유전자 및 인간 V_H 4-61 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 V_H 생식 세포 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역; 및

[0011] (b) 인간 V_k A27 유전자, 인간 V_k L15 유전자, 인간 V_k L6 유전자 및 인간 V_k L18 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 V_k 생식 세포 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역

[0012] 를 포함한다.

[0013] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서, 항체는

[0014] (a) 인간 V_H 3-33 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역; 및

[0015] (b) 인간 V_k A27 유전자, 인간 V_k L15 유전자 및 인간 V_k L6 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 V_k 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역

[0016] 을 포함하며 IP-10에 특이적으로 결합한다.

[0017] 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명은 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서, 항체는

[0018] (a) 인간 V_H 3-30.3 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역; 및

[0019] (b) 인간 V_k L6 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역

[0020] 을 포함하며 IP-10에 특이적으로 결합한다.

[0021] 또다른 실시 형태에 있어서, 본 발명은 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서, 항체는

[0022] (a) 인간 V_H 5-51 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역; 및

[0023] (b) 인간 V_k L18 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역

[0024] 을 포함하며 IP-10에 특이적으로 결합한다.

[0025] 또다른 실시 형태에 있어서, 본 발명은 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서, 항체는

[0026] (a) V_H 4-61 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 중쇄 ℃가가변 영역; 및

[0027] (b) 인간 V_k A27 유전자의 산물이거나 이 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역

[0028] 를 포함하며 IP-10에 특이적으로 결합한다.

[0029] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서,

[0030] (a) 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 번호 24-34의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체 (conservative modification)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고,

[0031] (b) 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 번호 73-83의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며,

[0032] (c) 항체는 IP-10에 특이적으로 결합하고,

[0033] (d) 항체는 하기의 기능적 특성 중 하나 이상을 나타낸다:

[0034] (i) 항체는 IP-10의 CXCR3에의 결합을 억제하며;

[0035] (ii) 항체는 IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하고;

[0036] (iii) 항체는 IP-10 유도된 세포 이동을 억제하며;

[0037] (iv) 항체는 붉은털 원숭이 IP-10과 교차 반응하고;

[0038] (v) 항체는 마우스 IP-10과 교차 반응하지 않으며;

[0039] (vi) 항체는 인간 MIG와 교차 반응하지 않고;

[0040] (vii) 항체는 인간 ITAC와 교차 반응하지 않는다.

[0041] 바람직한 실시 형태에 있어서, 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열 번호 13-23의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열 번호 62-72의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 다른 바람직한 실시 형태에 있어서, 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열 번호 1-12의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 경쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열 번호 51-61의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 항체는 예를 들어 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0042] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며, 여기서,

[0043] (a) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 35-46의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과의 상동성이 80% 이상인 아미노산 서열을 포함하고,

[0044] (b) 경쇄 가변 영역은 서열 번호 84-94의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과의 상동성이 80% 이상인 아미노산 서열을 포함하며,

[0045] (c) 항체는 IP-10에 특이적으로 결합하고,

[0046] (d) 항체는 하기의 기능적 특성 중 하나 이상을 나타낸다:

[0047] (i) 항체는 IP-10의 CXCR3에의 결합을 억제하며;

[0048] (ii) 항체는 IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하고;

[0049] (iii) 항체는 IP-10 유도된 세포 이동을 억제하며;

[0050] (iv) 항체는 붉은털 원숭이 IP-10과 교차 반응하고;

[0051] (v) 항체는 마우스 IP-10과 교차 반응하지 않으며;

[0052] (vi) 항체는 인간 MIG와 교차 반응하지 않고;

[0053] (vii) 항체는 인간 ITAC와 교차 반응하지 않는다.

[0054] 항체는 예를 들어 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0055] 본 발명의 바람직한 실시 형태에 있어서 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분은

[0056] (a) 서열 번호 1-12의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0057] (b) 서열 번호 13-23의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0058] (c) 서열 번호 24-34의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0059] (d) 서열 번호 51-61의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0060] (e) 서열 번호 62-72의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0061] (f) 서열 번호 73-83의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0062] 을 포함하며,

[0063] 여기서, 항체는 IP-10에 특이적으로 결합한다.

[0064] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서, 본 발명은

[0065] (a) 서열 번호 35-46의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0066] *(b) 서열 번호 84-94의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0067] 을 포함하는 단리된 단일클론 항체, 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하며,

[0068] 여기서, 항체는 IP-10에 특이적으로 결합한다.

[0069] 본 발명의 다른 태양에 있어서, IP-10에의 결합에 있어서 임의의 전술한 항체와 경쟁하는 항체, 또는 그의 항원 결합 부분이 제공된다.

[0070] 예를 들어 본 발명의 항체는 예를 들어 IgG1 또는 IgG4 이소타입의 전장 항체일 수 있다. 대안적으로는 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fab 또는 Fab'2 단편이거나, 단일쇄 항체일 수 있다.

[0071] 본 발명은 또한 치료제, 예를 들어 세포 독소 (cytotoxin) 또는 방사성 동위원소에 결합된, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하는 면역콘쥬게이트 (immunoconjugate)를 제공한다. 본 발명은 또한 결합 특이성이 항체 또는 그의 항원 결합 부분과는 다른 제2 작용성 부위에 결합된, 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하는 2특이성 (bispecific) 분자를 제공한다.

[0072] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분, 또는 면역콘쥬게이트 또는 2특이성 분자 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물도 제공된다.

[0073] 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 코딩하는 핵산 분자와, 그러한 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 그러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포도 본 발명에 포함된다. 또한 본 발명은 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 트랜스진 (transgene)을 포함하며 본 발명의 항체를 발현하는 트랜스제닉 (transgenic) 마우스와, 그러한 마우스로부터 제조되며 본 발명의 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.

[0074] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 활성화된 T 세포 또는 NK 세포를 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 접촉시켜 염증성 또는 자가 면역성 반응을 억제하는 단계를 포함하는, 활성화된 T 세포 또는 NK 세포에 의해 매개되는 염증성 또는 자가 면역성 반응의 억제 방법을 제공한다.

[0075] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 치료가 필요한 대상에게 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하여 대상의 염증성 질환 또는 자가 면역성 질환을 치료하는 단계를 포함하는, 치료가 필요한 대상의 염증성 질환 또는 자가 면역성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 이 질환은 예를 들어 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 염증성 장질환 (예를 들어 궤양성 대장병, 크론병 (Crohn's disease)), 전신성 홍반성 루푸스, 제I형 당뇨병, 염증성 피부 질병 (예를 들어 건선, 편평 태선), 자가 면역성 갑상선 질환 (예를 들어 그레이브스병 (Graves' disease), 하시모토 갑상선염 (Hashimoto's thyroiditis)), 쇼그렌 증후군, 폐 염증 (pulmonary inflammation) (예를 들어 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐 사르코이드증 (pulmonary sarcoidosis), 림프구성 폐포염), 이식 거부, 척수 손상, 뇌 손상 (예를 들어 뇌졸중), 퇴행성 신경 질환 (예를 들어 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병), 치은염, 유전자 요법에 의해 유도된 염증, 혈관 생성 질환, 염증성 신장 질환 (예를 들어 IgA 신병증 (nephropathy), 막증식성 사구체신염, 급속 진행성 사구체신염) 및 죽상 동맥경화일 수 있다.

[0076] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 치료가 필요한 대상에게 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 투여하여 대상의 바이러스 또는 박테리아 감염을 치료하는 단계를 포함하는, 치료가 필요한 대상의 원하지 않는 IP-10 활성을 포함하는 바이러스 또는 박테리아 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어 항체는 바이러스성 뇌수막염, 바이러스성 뇌염 또는 세균성 뇌수막염의 치료를 위하여 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 바이러스 감염은 예를 들어 인간 면역 결핍 바이러스 (human immunodeficiency virus, HIV), C형 간염 바이러스 (hepatitis C virus, HCV), 제I형 단순 포진 바이러스 (herpes simplex virus type I, HSV-1) 또는 중증 급성 호흡기 증후군 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) 바이러스에 의해 매개될 수 있다.

[0077] 본 발명은 본원에 제공된 항-IP-10 항체의 서열을 기본으로 하는 "2세대" 항-IP-10 항체의 제조 방법도 제공한다. 예를 들어 본 발명은

[0078] (a) (i) 서열 번호 1-12의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR1 서열; 서열 번호 13-23의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR2 서열; 및/또는 서열 번호 24-34의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR3 서

열을 포함하는 중쇄 가변 영역 항체 서열; 및 (ii) 서열 번호 51-61의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR1 서열; 서열 번호 62-72의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR2 서열; 및/또는 서열 번호 73-83의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 항체 서열을 제공하는 단계; (b) 중쇄 가변 영역 항체 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 항체 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경하여 하나 이상의 변경된 항체 서열을 생성하는 단계; (c) 변경된 항체 서열을 단백질로 발현시키는 단계를 포함하는, 항-IP-10 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0079] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 한정하는 것으로 파악되어서는 아니되는 실시예로부터 명백해질 것이다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용되는 모든 참고 문헌, 젠뱅크 엔트리 (entry), 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 명확하게 본원에 참고로 포함된다.

발명의 효과

[0080] 본 발명은 IP-10에 높은 친화도로 결합하며, IP-10의 그의 수용체에의 결합을 억제하며, IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하며 IP-10 유도된 세포 이동을 억제하는 단리된 단일클론 항체, 특히 인간 항체를 제공한다. 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자, 본 발명의 항체를 발현하기 위한 발현 벡터, 숙주 세포 및 방법도 제공된다. 본 발명의 항체를 포함하는 면역콘쥬게이트, 2특이성 분자 및 약학 조성물도 제공된다. 본 발명은 또한 여러 염증성 및 자가면역성 질환을 치료하는 방법을 비롯한, 본 발명의 항체를 사용한 IP-10 활성의 억제 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0081] 도 1A에는 1D4 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 99) 및 아미노산 서열 (서열 번호 35)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 1), CDR2 (서열 번호 13) 및 CDR3 (서열 번호 24) 영역이 도시되어 있으며 V, D 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 1B에는 1D4 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 110) 및 아미노산 서열 (서열 번호 84)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 51), CDR2 (서열 번호 62) 및 CDR3 (서열 번호 73) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 2A에는 1E1 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 100) 및 아미노산 서열 (서열 번호 36)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 2), CDR2 (서열 번호 14) 및 CDR3 (서열 번호 25) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 2B에는 1E1 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 111) 및 아미노산 서열 (서열 번호 85)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 52), CDR2 (서열 번호 63) 및 CDR3 (서열 번호 74) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 3A에는 2G1 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 101) 및 아미노산 서열 (서열 번호 37)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 3), CDR2 (서열 번호 15) 및 CDR3 (서열 번호 26) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 3B에는 2G1 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 112) 및 아미노산 서열 (서열 번호 86)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 53), CDR2 (서열 번호 64) 및 CDR3 (서열 번호 75) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 4A에는 3C4 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 102) 및 아미노산 서열 (서열 번호 38)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 4), CDR2 (서열 번호 16) 및 CDR3 (서열 번호 27) 영역이 도시되어 있으며 V, D 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 4B에는 3C4 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 113) 및 아미노산 서열 (서열 번호 87)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 54), CDR2 (서열 번호 65) 및 CDR3 (서열 번호 76) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 5A에는 6A5 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 103) 및 아미노산 서열 (서열 번호 39)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 5), CDR2 (서열 번호 17) 및 CDR3 (서열 번호 28) 영역이 도시되어 있으며 V, D 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 5B에는 6A5 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 114) 및 아미노산 서열 (서열 번호 88)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 55), CDR2 (서열 번호 66) 및 CDR3 (서열 번호 77) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 6A에는 6A8 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 104) 및 아미노산 서열 (서열 번호 40)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 6), CDR2 (서열 번호 18) 및 CDR3 (서열 번호 29) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 6B에는 6A8 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 115) 및 아미노산 서열 (서열 번호 89)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 56), CDR2 (서열 번호 67) 및 CDR3 (서열 번호 78) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 7A에는 6B10 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 105) 및 아미노산 서열 (서열 번호 41)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 7), CDR2 (서열 번호 19) 및 CDR3 (서열 번호 30) 영역이 도시되어 있으며 V, D 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 7B에는 6B10 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 116) 및 아미노산 서열 (서열 번호 90)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 57), CDR2 (서열 번호 68) 및 CDR3 (서열 번호 79) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 8A에는 7C10 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 106) 및 아미노산 서열 (서열 번호 42)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 8), CDR2 (서열 번호 20) 및 CDR3 (서열 번호 31) 영역이 도시되어 있으며 V, D 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 8B에는 7C10 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 117) 및 아미노산 서열 (서열 번호 91)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 58), CDR2 (서열 번호 69) 및 CDR3 (서열 번호 80) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 9A에는 8F6 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 107) 및 아미노산 서열 (서열 번호 43)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 9), CDR2 (서열 번호 21) 및 CDR3 (서열 번호 32) 영역이 도시되어 있으며 V, D 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 9B에는 8F6 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 118) 및 아미노산 서열 (서열 번호 92)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 59), CDR2 (서열 번호 70) 및 CDR3 (서열 번호 81) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 10A에는 10A12 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 108) 및 아미노산 서열 (서열 번호 44)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 10), CDR2 (서열 번호 22) 및 CDR3 (서열 번호 33) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다. 대안적으로는, CDR1 내의 아미노산 잔기 32는 시스테인에서 세린으로 돌연변이되어 (서열 번호 11), 서열 번호 45의 VH 서열이 될 수 있다.

도 10B에는 10A12 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 119) 및 아미노산 서열 (서열 번호 93)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 60), CDR2 (서열 번호 71) 및 CDR3 (서열 번호 82) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 11A에는 13C4 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 109) 및 아미노산 서열 (서열 번호 46)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 12), CDR2 (서열 번호 23) 및 CDR3 (서열 번호 34) 영역이 도시되어 있으며 V, D 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 11B에는 13C4 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 (서열 번호 120) 및 아미노산 서열 (서열 번호 94)이 도시되어 있다. CDR1 (서열 번호 61), CDR2 (서열 번호 72) 및 CDR3 (서열 번호 83) 영역이 도시되어 있으며 V 및 J 생식 세포 유래체가 나타내어져 있다.

도 12에는 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 및 10A12의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의, 인간 생식 세포 V_H 3-33의 아미노산 서열 (서열 번호 47)과의 정렬이 도시되어 있다.

도 13에는 6B10 및 8F6의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의, 인간 생식 세포 V_H 3-30.3의 아미노산 서열 (서열 번호 48)과의 정렬이 도시되어 있다.

도 14에는 3C4의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의, 인간 생식 세포 V_H 5-51의 아미노산 서열 (서열 번호 49)과의 정렬이 도시되어 있다.

도 15에는 13C4의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의, 인간 생식 세포 V_H 4-61의 아미노산 서열 (서열 번호 50)과의 정렬이 도시되어 있다.

도 16에는 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 및 13C4의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의, 인간 생식 세포 V_k A27의 아미노산 서열 (서열 번호 95)과의 정렬이 도시되어 있다.

도 17에는 1E1, 6B10 및 8F6의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의, 인간 생식 세포 V_k L6의 아미노산 서열 (서열 번호 96)과의 정렬이 도시되어 있다.

도 18에는 3C4의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의, 인간 생식 세포 V_k L18의 아미노산 서열 (서열 번호 97)과의 정렬이 도시되어 있다.

도 19에는 7C10의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의, 인간 생식 세포 V_k L15의 아미노산 서열 (서열 번호 98)과의 정렬이 도시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 본 발명은 IP-10에 특이적으로 결합하며 IP-10의 기능적 특성을 억제하는 단리된 단일클론 항체, 특히 인간 단일클론 항체에 관한 것이다. 소정 실시 형태에 있어서 본 발명의 항체는 특정 중쇄 및 경쇄 생식 세포 서열로부터 유래되고/되거나 특정 아미노산 서열을 포함하는 CDR 영역과 같은 특정한 구조적 특징을 포함한다. 본 발명은 단리된 항체, 그러한 항체의 제조 방법, 그러한 항체를 포함하는 면역콘쥬게이트 및 2특이성 분자와, 본 발명의 항체, 면역콘쥬게이트 또는 2특이성 분자를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 예를 들어 여러 염증성 또는 자가 면역성 질환의 치료에 있어서 염증성 또는 자가 면역성 반응을 억제하기 위한 항체의 사용 방법과, 원하지 않는 IP-10 활성을 포함하는 바이러스 감염의 치료 방법에 관한 것이다.

[0083] 본 발명을 보다 쉽게 이해할 수 있게 하기 위하여 소정의 용어가 먼저 정의된다. 추가의 정의가 발명의 상세한 설명 전반에 걸쳐 나타내어져 있다.

[0084] "인터페론 감마 유도성 단백질 10", "IP-10" 및 "CXCL10"이라는 용어는 서로 바꾸어서 사용될 수 있으며 인간 IP-10의 변이체, 이소타입 및 종 동족체를 포함한다. 따라서 본 발명의 인간 항체는 소정의 경우에 있어서 인간 이외의 종으로부터 유래된 IP-10과 교차 반응할 수도 있다. 다른 경우에 있어서는 항체는 인간 IP-10에 대하여 완전히 특이적일 수도 있으며 종 또는 기타 유형의 교차 반응성을 나타내지 않을 수도 있다. 인간 IP-10의 전 아미노산 서열의 젠뱅크 등록 번호는 NP_001556 (서열 번호 121)이다. 붉은털 원숭이 IP-10의 전 아미노산 서열의 젠뱅크 등록 번호는 AAK95955 (서열 번호 123)이다. 마우스 IP-10의 전 아미노산 서열의 젠뱅크 등록번호는 NP_067249 (서열 번호 124)이다.

[0085] "CXCR3"이라는 용어는 IP-10의 수용체 (CXCL10)를 말한다. 인간 CXCR3의 전 아미노산 서열의 젠뱅크 등록 번호는 NP_001495 (서열 번호 122)이다.

[0086] "MIG"라는 용어는 IP-10과는 다르며 감마 인터페론에 의해 유도되는 모노카인으로도 공지된 CXCR3의 리간드를 말한다. 인간 MIG의 전 아미노산 서열의 젠뱅크 등록 번호는 NP_002407 (서열 번호 125)이다.

[0087] "ITAC"라는 용어는 IP-10과는 다르며 인터페론 유도성 T 세포 알파 화학 유인 물질로도 공지된 CXCR3의 리간드를 말한다. 인간 ITAC의 전 아미노산 서열의 젠뱅크 등록 번호는 NP_005400 (서열 번호 126)이다.

[0088] "면역 반응"이라는 용어는 예를 들어 림프구, 항원 제시 세포, 식세포 (phagocytic cell), 과립구와, 상기 세포 또는 간에 의해 생산되는 용해성 거대 분자 (항체, 사이토카인 및 보체 포함)의 작용을 말하며, 이는 침입 병원체, 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 암세포, 또는 자가 면역 또는 병적 염증의 경우 정상 인간 세포 또는 조직을 선택적으로 손상시키거나, 이들을 파괴하거나, 이들을 인체로부터 제거한다.

[0089] "신호 전달 경로"는 신호를 세포의 하나의 부분에서 세포의 다른 부분으로 전송하는 데에 있어서 그 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들 사이의 생화학적 관계를 말한다.

[0090] 본원에 사용되는 바와 같이 "세포 표면 수용체"라는 용어는 예를 들어 신호를 받아서 그러한 신호를 세포의 원

형질막을 가로질러 전송할 수 있는 분자 및 분자 복합체를 포함한다. 본 발명의 "세포 표면 수용체"의 예로는 IP-10 분자가 결합되는 CXCR3이 있다.

[0091] 본원에 언급되는 바와 같이 "항체"라는 용어는 전 항체 및 임의의 항원 결합 단편 (즉, "항원 결합 부분") 또는 그 단일쇄를 포함한다. "항체"는 디술피드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질, 또는 그의 항원 결합 부분을 말한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인인 C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3}으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 C_L로 이루어진다. V_H 및 V_L 영역은 골격 영역 (framework region, FR)으로 칭해지는, 보다 보존된 영역이 군데 군데 산재된, 상보성 결정 영역 (complementarity determining region, CDR)으로 칭해지는 과변이 (hypervariability) 영역으로 추가로 다시 나뉘어질 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 하기의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호 작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 여러 세포 (예를 들어 이펙터 (effecter) 세포) 및 전형적인 보체계 (classical complement system)의 제1 성분 (C1q)을 포함하여, 면역글로불린의 숙주 조직 또는 인자에의 결합을 매개할 수 있다.

[0092] 본원에서 사용되는 바와 같이 항체의 "항원 결합 부분" (또는 단순히 "항체 부분")이라는 용어는 항원 (예를 들어 IP-10)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 하나 이상의 항체 단편을 말한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) V_L, V_H, C_L 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 일가 단편인 Fab 단편; (ii) 경첩 영역에서 디술피드 가교에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암 (arm)으로 이루어진 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) V_H 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (문헌[Ward 등,(1989) Nature 341: 544-546]); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인, V_L 및 V_H가 개별적인 유전자에 의해 코딩된다 해도, 이들은 재조합 방법을 이용하여 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루어 일가 분자 (단일쇄 Fv (scFv)로 공지됨)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어지게 할 수 있는 합성 링커에 의해 접합될 수 있다 (예를 들어 문헌[Bird 등 (1988) Science 242: 423-426]; 및 문헌[Huston 등 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883] 참조). 그러한 단일쇄 항체도 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어 내에 포함시키려고 한다. 이러한 항체 단편은 당업계의 숙련자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 수득되며 이 단편들은 온전한 항체에서와 동일한 방식으로 유용성에 대하여 스크리닝된다.

[0093] 본원에 사용되는 바와 같이 "단리된 항체"는 항원 특이성이 상이한 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 말하려는 것이다 (예를 들어 IP-10에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 IP-10 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음). 그러나 IP-10에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원, 예를 들어 다른 종 유래의 IP-10 분자에 대하여 교차 반응성을 가진다. 또한 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학 물질이 실질적으로 없을 수도 있다.

[0094] 본원에 사용되는 바와 같이 "단일클론 항체" 또는 "단일클론 항체 조성물"이라는 용어는 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 말한다. 단일클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타낸다.

[0095] 본원에 사용되는 바와 같이 "인간 항체"라는 용어는 골격 및 CDR 영역 둘 모두가 인간 생식 세포 면역글로불린 서열로부터 유래되는 가변 영역을 갖는 항체를 포함하려는 것이다. 또한 항체가 불변 영역을 포함하는 경우 이 불변 영역도 인간 생식 세포 면역글로불린 서열로부터 유래된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식 세포 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수도 있다 (예를 들어 시험관 내에서의 랜덤 돌연변이 또는 부위 특이적 돌연변이에 의해, 또는 생체 내에서의 체세포 돌연변이에 의해 도입되는 돌연변이). 그러나, 본원에서 사용되는 바와 같이 "인간 항체"라는 용어는 다른 포유류 종, 예를 들어 마우스의 생식 세포로부터 유래되는 CDR 서열이 인간 골격 서열 상으로 그래프팅된 항체를 포함하려는 것은 아니다.

[0096] "인간 단일클론 항체"라는 용어는 골격 및 CDR 영역 둘 모두가 인간 생식 세포 면역글로불린 서열로부터 유래되는 가변 영역을 가지며 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 말한다. 일 실시 형태에 있어서 인간 단일클론 항체는 불멸화 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 인간 외 (nonhuman)

트랜스제닉 동물, 예를 들어 트랜스제닉 마우스로부터 수득되는 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0097] 본원에 사용되는 바와 같이 "재조합 인간 항체"라는 용어는 재조합 방법에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 단리되는 모든 인간 항체, 예를 들어 (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대하여 트랜스제닉이거나 트랜스크로모조말 (transchromosomal)인 동물 (예를 들어 마우스) 또는 그로부터 제조한 하이브리도마로부터 단리된 항체 (하기에 또한 기술되어 있음), (b) 인간 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어 트랜스펙토마 (transfectoma)로부터 단리된 항체, (c) 재조합, 조합 (combinatorial) 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱 (splicing)을 포함하는 임의의 다른 수단으로 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체는 골격 및 CDR 영역이 인간 생식 세포 면역글로불린 서열로부터 유래되는 가변 영역을 가진다. 그러나 소정 실시 형태에 있어서 그러한 재조합 인간 항체는 시험관 내에서 돌연변이가 유발될 수 있으며 (또는, 인간 Ig 서열에 있어서 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우, 생체 내 체세포 돌연변이 유발) 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은, 인간 생식 세포 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되어 그와 연관되지만 생체 내에서 인간 항체 생식 세포 레퍼토리 내에는 천연적으로 존재하지 않을 수도 있는 서열이다.

[0098] 본원에 사용되는 바와 같이 "이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체류 (예를 들어 IgM 또는 IgG1)를 말한다.

[0099] "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"라는 용어는 본원에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어와 서로 바꾸어서 사용될 수 있다.

[0100] 본원에 사용되는 바와 같이 "인간 IP-10에 특이적으로 결합되는" 항체는 인간 IP-10에 5 x 10^{-9}M 이하, 더 바람직하게는 2 x 10^{-9} M 이하, 더욱 더 바람직하게는 1 x 10^{-10} M 이하의 K_D로 결합하는 항체를 말하려는 것이다. "붉은털 원숭이 IP-10과 교차 반응하는" 항체는 붉은털 원숭이 IP-10에 0.5 x 10^{-8}M 이하, 더 바람직하게는 5 x 10^{-9} M 이하, 더욱 더 바람직하게는 2 x 10^{-9} M 이하의 K_D로 결합하는 항체를 말하려는 것이다. "마우스 IP-10과 교차 반응하지 않는" 또는 "인간 MIG와 교차 반응하지 않는" 또는 "인간 ITAC와 교차 반응하지 않는" 항체는 마우스 IP10, 인간 MIG 또는 인간 ITAC에 1.5 x 10^{-8} M 이상, 더 바람직하게는 5-10 x 10^{-8} M 또는 그 이상, 더욱 더 바람직하게는 1 x 10^{-7} M 이상의 K_D로 결합하는 항체를 말하려는 것이다. 소정 실시 형태에 있어서 마우스 IP-10, 인간 MIG 및/또는 인간 ITAC와 교차 반응하지 않는 항체는 표준 결합 분석에서 상기 단백질에 대하여 본질적으로 검출할 수 없는 결합을 나타낸다.

[0101] 본원에 사용되는 바와 같이 "IP-10의 CXCR3에의 결합을 억제하는" 항체는 IP-10이 CXCR3에 결합하는 것을 1 nM 이하, 더 바람직하게는 0.75 nM 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.5 nM 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.25 nM 이하의 K_i로 억제하는 항체를 말하려는 것이다.

[0102] 본원에 사용되는 바와 같이 "IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하는" 항체는 IP-10 유도된 칼슘 유동을 10 nM 이하, 더 바람직하게는 7.5 nM 이하, 더욱 더 바람직하게는 5 nM 이하, 더욱 더 바람직하게는 2.5 nM 이하의 IC_{50}으로 억제하는 항체를 말하려는 것이다.

[0103] 본원에 사용되는 바와 같이 "IP-10 유도된 세포 이동을 억제하는" 항체는 인간 IP-10 유도 세포 이동을 2 ㎍/ml 이하, 더 바람직하게는 1 ㎍/ml 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.5 ㎍ 이하, 더욱 더 바람직하게는 0.25 ㎍/ml 이하의 IC_{50}으로 억제하는 항체를 말하려는 것이다.

[0104] 본원에 사용되는 바와 같이 "K_{assoc}" 또는 "K_a"라는 용어는 특정 항체-항원 상호 작용의 회합 속도 (association rate)를 말하려는 것이며, 반면, 본원에서 사용되는 바와 같이 "K_{dis}" 또는 "K_d"라는 용어는 특정 항체-항원 상호 작용의 해리 속도를 말하려는 것이다. 본원에 사용되는 바와 같이 "K_D"라는 용어는 해리 상수를 말하려는 것이며, 이는 K_d 대 K_a의 비 (즉, K_d/K_a)로부터 얻어지고 몰 농도 (M)로 표현된다. 항체의 K_D 값은 당업계에서 잘 확립된 방법을 이용하여 결정할 수 있다. 항체의 K_D를 결정하는 바람직한 방법은 표면 플라즈몬 공명 기술 (surface plasmon resonance)의 사용에 의한 것, 바람직하게는 Biacore (등록상표) 시스템과 같은 바이오센서

시스템의 사용에 의한 것이다.

[0105] 본원에 사용되는 바와 같이 IgG 항체에 있어서의 "높은 친화도"라는 용어는 표적 항원에 대하여 10^{-8} M 이하, 더 바람직하게는 10^{-9} M 이하, 더욱 더 바람직하게는 10^{-10} M 이하의 K_D를 갖는 항체를 말한다. 그러나, "높은 친화도"의 결합은 다른 항체 이소타입에 있어서 다양할 수 있다. 예를 들어 IgM 이소타입에 있어서 "높은 친화도"의 결합은 K_D가 10^{-7} M 이하, 더 바람직하게는 10^{-8} M 이하인 항체를 말한다.

[0106] 본원에 사용되는 바와 같이 "대상"이라는 용어는 임의의 인간 또는 인간외 동물을 포함한다. "인간외 동물"이라는 용어는 모든 척추 동물, 예를 들어 포유류 및 포유류외 동물 (non-mammal), 예를 들어 인간외 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.

[0107] 본 발명의 여러 태양이 하기의 세부 항목에서 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0108] 항-IP-10 항체

[0109] 본 발명의 항체는 항체의 특정의 기능적 특징 또는 특성을 그 특징으로 한다. 예를 들어 본 항체는 인간 IP-10에 특이적으로 결합한다. 추가로, 본 항체는 하나 이상의 인간외 영장류, 예를 들어 붉은털 원숭이 유래의 IP-10과 교차 반응할 수도 있다. 바람직하게는 본 항체는 마우스 IP-10과는 교차 반응하지 않는다. 또한, MIG 및 ITAC도 CXCR3 수용체의 리간드이지만, 본 발명의 항체는 바람직하게는 인간 MIG 또는 인간 ITAC와 교차 반응하지 않는다.

[0110] 바람직하게는 본 발명의 항체는 IP-10에 높은 친화도로, 예를 들어 10^{-8} M 이하 또는 10^{-9} M 이하 또는 심지어 10^{-10} M 이하의 K_D로 결합한다.

[0111] 또한, 본 발명의 항체는 IP-10의 하나 이상의 기능적 활성을 억제할 수 있다. 예를 들어 일 실시 형태에 있어서 본 항체는 IP-10의 CXCR3에의 결합을 억제한다. 다른 실시 형태에 있어서 본 항체는 IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제한다. 또다른 실시 형태에 있어서 본 항체는 IP-10 유도된 세포 이동 (주화성)을 억제한다.

[0112] 여러 종의 IP-10 및/또는 MIG 또는 ITAC에 대한 항체의 결합 능력을 평가하는 표준 분석법은 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯 (Western blot) 및 RIA를 포함하여 당 업계에 공지되어 있다. 적합한 분석법은 실시예에 상세하게 기술되어 있다. 항체의 결합 동력학 (예를 들어 결합 친화도)은 또한 당업계에 공지된 표준 분석법, 예를 들어 Biacore 분석법에 의해 검토 평가될 수 있다. IP-10의 기능적 특성 (예를 들어 수용체 결합, 칼슘 유동, 주화성)에 대한 항체의 영향을 평가하기 위한 분석법이 실시예에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0113] 따라서, 당업계에 공지되어 있으며 본원에 기술되어 있는 방법에 따라 측정되는 바와 같이 상기 IP-10의 기능적 특성 (예를 들어 생화학적 활성, 면역 화학적 활성, 세포 활성, 생리학적 활성 또는 기타 생물학적 활성 등) 중 하나 이상을 "억제"하는 항체는 항체의 부재 하에서 (또는 예를 들어 관계없는 특이성의 대조 항체가 존재할 경우) 보여지는 것에 비하여 특정 활성이 통계학적으로 유의하게 감소되는 것과 관련된다는 것을 알 것이다. 바람직하게는 IP-10 활성을 억제하는 항체는 측정되는 파라미터를 10% 이상, 더 바람직하게는 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 통계학적으로 유의하게 감소시키는 것을 초래하며 소정의 바람직한 실시 형태에 있어서 본 발명의 항체는 IP-10의 기능적 활성을 92%, 94%, 95%, 97%, 98% 또는 99%보다 많이 억제할 수도 있다.

[0114] 단일클론 항체 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4

[0115] 본 발명의 바람직한 항체는 실시예 1 및 2에서 기술된 바와 같이 단리되고 구조적으로 특성화된 인간 단일클론 항체 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4이다. 다른 바람직한 항체는 10A12S이며, 여기서, 10A12의 중쇄의 아미노산 잔기 32 (V_H CDR1 내)는 시스테인에서 세린으로 돌연변이되었다. 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 및 13C4의 V_H 아미노산 서열은 각각 서열 번호 35-46에 예시되어 있다. 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4의 V_L의 아미노산 서열은 각각 서열 번호 84-94에 예시되어 있다.

[0116] 이 항체들 각각이 IP-10에 결합할 수 있다면, V_H 및 V_L 서열은 "혼합 및 매치되어" 본 발명의 다른 항-IP-10 결합 분자를 생성할 수 있다. 그러한 "혼합 및 매치된" 항체의 IP-10 결합은 상기 및 실시예에 기술되어 있는

(예를 들어 ELISA) 결합 분석법을 사용하여 시험할 수 있다. 바람직하게는, V_H 및 V_L 사슬이 혼합 및 매칭될 경우, 특정 V_H/V_L 쌍 유래의 V_H 서열은 구조적으로 유사한 V_H 서열로 대체된다. 마찬가지로, 바람직하게는 특정 V_H/V_L 쌍 유래의 V_L 서열은 구조적으로 유사한 V_L 서열로 대체된다. 예를 들어 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 또는 10A12S의 V_H 및 V_L 서열은 혼합 및 매치가 특히 쉬운데, 이는 이 항체들에서 동일한 생식 세포 서열로부터 유래되는 V_H 및 V_L 서열이 사용되며 (VH 3-33 및 Vk A27), 따라서 이들이 구조적 유사성을 나타내기 때문이다. 마찬가지로, 6B10 및 8F6의 V_H 및 V_L 서열도 혼합 및 매치가 특히 쉬운데, 이는 이들도 동일한 생식 세포 서열로부터 유래되는 V_H 및 V_L 서열을 사용하며 (VH 3-30.3 및 Vk L6) 따라서 이들이 구조적 유사성을 나타내기 때문이다. 대안적으로는, 예를 들어 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 또는 10A12S의 V_H 서열은 13C4의 V_L과 쌍을 이룰 수 있는데, 이는 원래 생식 세포 V_k A27의 V_L 서열 및 13C4의 V_L 서열과 쌍을 이룬 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 또는 10A12S의 V_H 서열도 생식 세포 V_k A27로부터 유래되기 때문이다. 마찬가지로, 7C10 또는 1E1의 V_L 서열은 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 또는 10A12S의 V_H와 쌍을 이룰 수 있는데, 이는 원래 생식 세포 V_H 3-33의 V_H 서열과 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 및 10A12S의 V_H 서열과 쌍을 이룬 7C10 및 1E1의 V_L 서열이 생식 세포 V_H 3-33으로부터 또한 유래되기 때문이다. 단일클론 항체인 항체 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4에 있어서 본원에 개시된 V_H 및 V_L 서열로부터 구조적으로 유사한 다른 V_H/V_L 서열 쌍이 생성될 수 있다는 것이 당업계의 숙련자에게 자명할 것이다.

[0117] 따라서 일 태양에 있어서 본 발명은

[0118] (a) 서열 번호 35-46의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0119] (b) 서열 번호 84-94의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0120] 을 포함하며, IP-10에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0121] 바람직한 중쇄 및 경쇄 조합은

[0122] (a) 서열 번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 84의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0123] (a) 서열 번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0124] (a) 서열 번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0125] (a) 서열 번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 87의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0126] (a) 서열 번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0127] (a) 서열 번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0128] (a) 서열 번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 90의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0129] (a) 서열 번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0130] (a) 서열 번호 43의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0131] (a) 서열 번호 44 또는 45의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 93의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

[0132] (a) 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열 번호 94의 아미노산 서열을 포함하

는 경쇄 가변 영역

[0133] 을 포함한다.

[0134] 다른 태양에 있어서 본 발명은 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 및 13C4의 중쇄 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 그 조합을 포함하는 항체를 제공한다. 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 및 13C4의 V_H CDR1의 아미노산 서열이 서열 번호 1-12에 예시되어 있다. 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4의 V_H CDR2의 아미노산 서열이 서열 번호 13-23에 예시되어 있다. 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4의 V_H CDR3의 아미노산 서열이 서열 번호 24-34에 예시되어 있다. 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4의 V_k CDR1의 아미노산 서열이 서열 번호 51-61에 예시되어 있다. 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4의 V_k CDR2의 아미노산 서열이 서열 번호 62-72에 예시되어 있다. 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4의 V_k CDR3의 아미노산 서열이 서열 번호 73-83에 예시되어 있다. CDR 영역은 카바트 (Kabat) 시스템을 이용하여 기술되어 있다 (문헌[Kabat, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]).

[0135] 상기 항체들 중 각각이 IP-10에 결합하며 항원 결합 특이성이 주로 CDR1, 2 및 3 영역에 의해 제공된다면, V_H CDR1, 2 및 3 서열과 V_L CDR1, 2 및 3 서열은 "혼합 및 매치"되어 (즉, 상이한 항체 유래의 CDR은, 각각의 항체가 V_H CDR1, 2 및 3과 V_L CDR1, 2 및 3을 반드시 포함하여야 함에도 불구하고, 혼합 및 매치될 수 있음) 본 발명의 다른 항-IP-10 결합 분자를 생성할 수 있다. 그러한 "혼합 및 매치된" 항체의 IP-10 결합은 상기 및 실시예 (예를 들어 ELISA)에 기술되어 있는 결합 분석법을 이용하여 시험할 수 있다. 바람직하게는 V_H CDR 서열이 혼합 및 매치될 경우, 특정 V_H 서열 유래의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 마찬가지로, V_L CDR 서열이 혼합 및 매치될 경우, 특정 V_L 서열 유래의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR 3 서열은 바람직하게는 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 예를 들어 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 10A12S의 V_H CDR1은 몇몇 구조적 유사성을 공유하며 따라서 혼합 및 매칭하기가 쉬우며, 반면 3C4 및 13C4의 V_H CDR1은 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 10A12S의 V_H CDR1과 구조적으로 유사하지 않으며 따라서 그들과 혼합 및 매치되어서는 아니된다. 신규한 V_H 및 V_L 서열은, 하나 이상의 V_H 및/또는 V_L CDR 영역의 서열 대신에 단일클론 항체인 항체 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4에 있어서 본원에 개시된 CDR 서열 유래의 구조적으로 유사한 서열을 사용함으로써 생성할 수 있다는 것이 당업계의 숙련자에게는 자명할 것이다.

[0136] 따라서, 다른 태양에 있어서 본 발명은

[0137] (a) 서열 번호 1-12의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0138] (b) 서열 번호 13-23의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0139] (c) 서열 번호 24-34의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0140] (d) 서열 번호 51-61의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0141] (e) 서열 번호 62-72의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0142] (f) 서열 번호 73-83의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0143] 을 포함하며, IP-10에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0144] 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0145] (a) 서열 번호 1의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0146] (b) 서열 번호 13의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0147] (c) 서열 번호 24의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0148] (d) 서열 번호 51의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0149] (e) 서열 번호 62의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0150] (f) 서열 번호 73의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0151] 을 포함한다.

[0152] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0153] (a) 서열 번호 2의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0154] (b) 서열 번호 14의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0155] (c) 서열 번호 25의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0156] (d) 서열 번호 52의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0157] (e) 서열 번호 63의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0158] (f) 서열 번호 74의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0159] 을 포함한다.

[0160] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0161] (a) 서열 번호 3의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0162] (b) 서열 번호 15의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0163] (c) 서열 번호 26의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0164] (d) 서열 번호 53의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0165] (e) 서열 번호 64의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0166] (f) 서열 번호 75의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0167] 을 포함한다.

[0168] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0169] (a) 서열 번호 4의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0170] (b) 서열 번호 16의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0171] (c) 서열 번호 27의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0172] (d) 서열 번호 54의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0173] (e) 서열 번호 65의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0174] (f) 서열 번호 76의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0175] 을 포함한다.

[0176] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0177] (a) 서열 번호 5의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0178] (b) 서열 번호 17의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0179] (c) 서열 번호 28의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0180] (d) 서열 번호 55의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0181] (e) 서열 번호 66의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0182] (f) 서열 번호 77의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0183] 을 포함한다.

[0184] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0185] (a) 서열 번호 6의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0186] (b) 서열 번호 18의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0187] (c) 서열 번호 29의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0188] (d) 서열 번호 56의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0189] (e) 서열 번호 67의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0190] (f) 서열 번호 78의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0191] 을 포함한다.

[0192] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0193] (a) 서열 번호 7의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0194] (b) 서열 번호 19의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0195] (c) 서열 번호 30의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0196] (d) 서열 번호 57의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0197] (e) 서열 번호 68의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0198] (f) 서열 번호 79의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0199] 을 포함한다.

[0200] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0201] (a) 서열 번호 8의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0202] (b) 서열 번호 20의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0203] (c) 서열 번호 31의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0204] (d) 서열 번호 58의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0205] (e) 서열 번호 69의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0206] (f) 서열 번호 80의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0207] 을 포함한다.

[0208] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0209] (a) 서열 번호 9의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0210] (b) 서열 번호 21의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0211] (c) 서열 번호 32의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0212] (d) 서열 번호 59의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0213] (e) 서열 번호 70의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0214] (f) 서열 번호 81의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0215] 을 포함한다.

[0216] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0217] (a) 서열 번호 10 또는 11의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0218] (b) 서열 번호 22의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0219] (c) 서열 번호 33의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0220] (d) 서열 번호 60의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0221] (e) 서열 번호 71의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0222] (f) 서열 번호 82의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0223] 을 포함한다.

[0224] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 항체는

[0225] (a) 서열 번호 12의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

[0226] (b) 서열 번호 23의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

[0227] (c) 서열 번호 34의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

[0228] (d) 서열 번호 61의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

[0229] (e) 서열 번호 72의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

[0230] (f) 서열 번호 83의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

[0231] 을 포함한다.

[0232] 특정의 생식 세포의 서열을 갖는 항체

[0233] 소정 실시 형태에 있어서 본 발명의 항체는 특정의 생식 세포의 중쇄 면역글로불린 유전자 유래의 중쇄 가변 영역 및/또는 특정의 생식 세포의 경쇄 면역글로불린 유전자 유래의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0234] 본원에서 입증된 바와 같이, 인간 생식 세포의 VH 3-33 유전자, VH 3-30.3 유전자, VH 5-51 유전자 또는 VH 4-61 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하며 IP-10에 특이적인 인간 항체가 제조되었다. 따라서 본 발명은 VH 3-33, VH 3-30.3, VH5-51 및 VH 4-61로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 VH 생식 세포 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다. 바람직하게는 본 항체는 인간 IP-10 폴리펩티드 (예를 들어 젠뱅크 등록 번호 NP_001556의 서열을 포함함)에 특이적이다.

[0235] 본원에서 또한 입증된 바와 같이, 인간 생식 세포 Vk A27 유전자, Vk L15 유전자, Vk L6 유전자 또는 Vk L18 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하며 IP-10에 특이적인 인간 항체가 제조되었다. 따라서 본 발명은 Vk A27, Vk L15, Vk L6 및 Vk L18로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 Vk 생식 세포 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다. 바람직하게는 본 항체는 인간 IP-10 폴리펩티드 (젠뱅크 등록 번호 NP_001556의 서열을 포함함)에 특이적이다.

[0236] 바람직한 본 발명의 항체는 상기에 열거된 인간 생식 세포 VH 유전자들 중 하나의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하며 또한 상기에 열거된 인간 생식 세포 Vk 유전자들 중 하나의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것이다. 따라서 다른 실시 형태에 있어서 본 발명은

[0237] (a) VH 3-33, VH 3-30.3, VH 5-51 및 VH 4-61로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 VH 생식 세포 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역; 및

[0238] (b) Vk A27, Vk L15, Vk L6 및 Vk L18로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 Vk 생식 세포 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다. 바람직하게는 본 항체는 인간 IP-10 폴리펩티드 (예를 들어 젠뱅크 등록 번호 NP_001556의 서열을 포함함)에 특이적이다.

[0239] 본 발명은 또한 특정의 VH 및 Vk 생식 세포 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 바람직한 조합을 포함하는 항체를 제공한다. 예를 들어 바람직한 실시 형태에 있어서 본 발명은

[0240] (a) (서열 번호 47에 나타내어져 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 VH3-33 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하며;

[0241] (b) (각각 서열 번호 95,98 및 97에 나타내어져 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 Vk A27, L15 또는 L6 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

[0242] (c) IP-10에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0243] 일 실시 형태에 있어서 본 항체는 인간 Vk A27 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 각각 VH 3-33 및 Vk A27의 V_H 및 V_K를 갖는 항체의 예는 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 및 10A12S를 포함한다. 다른 실시 형태에 있어서 본 항체는 인간 Vk L15 유전자의 산물이거나 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 각각 VH 3-33 및 Vk L15의 V_H 및 V_K를 갖는 항체의 예로는 7C10이 있다. 다른 실시 형태에 있어서, 본 항체는 인간 Vk L6 유전자의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 각각 VH3-33 및 Vk L6의 V_H 및 V_K를 갖는 항체의 예로는 1E1이 있다.

[0244] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 발명은

[0245] (a) (서열 번호 48에 나타내어져 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 VH 3-30.3 유전자의 중쇄 가변 영역 또는 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하며;

[0246] (b) (서열 번호 96에 나타내어져 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 Vk L6 유전자의 경쇄 가변 영역 또는 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

[0247] (c) IP-10에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0248] 각각 VH 3-30.3 및 Vk L6을 갖는 항체의 예는 6B10 및 8F6을 포함한다.

[0249] 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 발명은

[0250] (a) (서열 번호 49에 나타내어져 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 VH 5-51 유전자의 중쇄 가변 영역 또는 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하며;

[0251] (b) (서열 번호 97에 나타내어져 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 Vk L18 유전자의 경쇄 가변 영역 또는 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

[0252] (c) IP-10에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0253] 각각 VH 5-51 및 Vk L18의 V_H 및 V_K를 갖는 항체의 예로는 3C4가 있다.

[0254] 또다른 바람직한 실시 형태에 있어서 본 발명은

[0255] (a) (서열 번호 50에 나타내어져 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 VH 4-61 유전자의 중쇄 가변 영역 또는 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하며;

[0256] (b) (서열 번호 95에 나타내어져 있는 아미노산 서열을 코딩하는) 인간 Vk A27 유전자의 경쇄 가변 영역 또는 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

[0257] (c) IP-10에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0258] 각각 VH 4-61 및 Vk A27의 V_H 및 V_K를 갖는 항체의 예로는 13C4가 있다.

[0259] 본원에 사용되는 바와 같이 인간 항체는 항체의 가변 영역이 인간 생식 세포 면역글로불린 유전자가 이용되는 시스템으로부터 수득되는 경우 특정 생식 세포 서열의 "산물"이거나 상기 서열로부터 "유래되는" 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 그러한 시스템은 인간 면역글로불린 유전자를 지니는 트랜스제닉 마우스를 목적 항원으로 면역화하거나 파지 상에서 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 목적 항원으로 스크리닝하는 것을 포함한다. 인간 생식 세포 면역글로불린 서열의 "산물"이거나 상기 서열로부터 "유래되는" 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 생식 세포 면역글로불린의 아미노산 서열과 비교하고 서열에 있어서 인간 항체의 서열과 가장 가까운 (즉, 가장 큰 %의 동일성) 인간 생식 세포 면역글로불린 서열을 선발함으로써 그와 같이 동정될 수 있다. 특정 인간 생식 세포 면역글로불린 서열의 "산물"이거나 "상기 서열로부터 "유래되는" 인간 항체는, 예를 들어 자연 발생 체세포 돌연변이 또는 특정 부위 돌연변이 (site-directed mutation)의 의도적 도입으로 인하여 생식 세포의 서열에 비하여 차이가 나는 아미노산을 포함할 수도 있다. 그러나 선발된 인간 항체는 전형적으로 아미노산 서열에 있어서 인간 생식 세포 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노

산 서열과의 동일성이 90% 이상이며 다른 종의 생식 세포 면역글로불린 아미노산 서열 (예를 들어 쥣과 생식 세포 서열)과 비교할 경우 인간 항체를 인간이라고 확인하는 아미노산 잔기를 포함한다. 소정의 경우에 있어서 인간 항체는 아미노산 서열에 있어서 생식 세포 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과의 동일성이 95% 이상, 또는 심지어 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99%일 수도 있다. 전형적으로는 특정 인간 생식 세포 서열로부터 유래되는 인간 항체는 인간 생식 세포 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 10개 이하로 차이가 나는 아미노산을 디스플레이한다. 소정의 경우에 있어서 인간 항체는 이 생식 세포 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 5개 이하, 또는 심지어 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하로 차이가 나는 아미노산을 디스플레이할 수도 있다.

[0260] 상동성 항체

[0261] 또다른 실시 형태에 있어서 본 발명의 항체는 본원에 개시되어 있는 바람직한 항체의 아미노산 서열과 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서, 항체는 본 발명의 항-IP-10 항체의 요망되는 기능적 특성을 보유한다.

[0262] 예를 들어 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하는데, 여기서,

[0263] (a) 중쇄 가변 영역은 서열 번호 35-46의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과의 상동성이 80% 이상인 아미노산 서열을 포함하며;

[0264] (b) 경쇄 가변 영역은 서열 번호 84-94의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과의 상동성이 80% 이상인 아미노산 서열을 포함하고;

[0265] (c) 항체는 IP-10에 특이적으로 결합하며,

[0266] (d) 항체는 하기의 기능적 특성 중 하나 이상을 나타낸다:

[0267] (i) 항체는 IP-10의 CXCR3에의 결합을 억제하고;

[0268] (ii) 항체는 IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하며;

[0269] (iii) 항체는 IP-10 유도된 세포 이동을 억제하고;

[0270] (iv) 항체는 붉은털 원숭이 IP-10과 교차 반응하며;

[0271] (v) 항체는 마우스 IP-10과 교차 반응하지 않고;

[0272] (vi) 항체는 인간 MIG와 교차 반응하지 않으며;

[0273] (vii) 항체는 인간 ITAC와 교차 반응하지 않는다.

[0274] 여러 실시 형태에 있어서 본 항체는 상기 (d) 내지 (j)로서 열거된 기능적 특성 중 1가지 이상, 2가지 이상, 3가지 이상, 4가지 이상, 5가지 이상 또는 6가지 이상의 특성을 나타낼 수도 있다. 항체는 예를 들어 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0275] 다른 실시 형태에 있어서 V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열은 상기에 나타내어져 있는 서열과의 상동성이 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%일 수도 있다. 각각 서열 번호 35-46 및 84-94의 V_H 및 V_L 영역에 대한 상동성이 높은 (즉, 80% 이상) V_H 및 V_L 영역을 갖는 항체는 서열 번호 35-46 및/또는 84-94의 서열을 코딩하는 핵산 분자의 돌연변이 유발 (예를 들어 특정 부위 돌연변이 또는 PCR 매개된 돌연변이 유발), 이어서 본원에 기술된 기능적 분석을 이용한 코딩된 변경 항체의 보유된 기능 (즉, 상기 (c) 내지 (j)에 나타내어져 있는 기능)에 대한 시험에 의해 수득될 수 있다.

[0276] 본원에 사용되는 바와 같이 두 아미노산 서열들 사이의 상동성 퍼센트는 두 서열들 사이의 동일성 퍼센트와 등가이다. 두 서열들 사이의 동일성 퍼센트는, 두 서열의 최적 정렬을 위하여 도입할 필요가 있는 갭의 갯수 및 각각의 갭의 길이를 고려하여 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 갯수의 함수이다 (즉, 상동성 % = 동일한 위치의 갯수/위치의 총 갯수 x 100). 하기의 비제한적 예에 기술되어 있는 바와 같이, 두 서열들 사이의 서열의 비교 및 동일성 퍼센트의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성할 수 있다.

[0277] 두 아미노산 서열들 사이의 동일성 퍼센트는, PAM120 가중 (weight) 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭

페널티를 이용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 포함된 E. Meyers 및 W. Miller의 알고리즘 (문헌[Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17(1988)])을 사용하여 결정할 수 있다. 또한 두 아미노산 서열들 사이의 동일성 퍼센트는, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 중 어느 하나와, 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 이용하여 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램 (http://www.gcg.com에서 입수가능함) 내로 포함된 Needleman 및 Wunsch (문헌[J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)])의 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다.

[0278] 부가적으로 또는 대안적으로, 본 발명의 단백질 서열은 공용 데이타베이스에 대한 검색을 수행하기 위한, 예를 들어 관련 서열을 확인하기 위한 "쿼리 (qurey) 서열"로 또한 사용될 수 있다. 그러한 검색은 문헌[Altschul, 등 (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10]의 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 이용하여 수행할 수 있다. BLAST 단백질 검색은, 본 발명의 항체 분자와 상동성인 아미노산 서열을 얻기 위하여 XBLAST 프로그램, 스코어 (score) = 50, 단어 길이 = 3을 이용하여 수행할 수 있다. 비교 목적용의 갭화 정렬을 얻기 위해서는 Gapped BLAST를 문헌[Altschul 등, (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402]에 기술되어 있는 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 경우에는 각각의 프로그램 (예를 들어 XBLAST 및 NBLAST)의 초기 설정 (default) 파라미터를 사용할 수 있다. http://www.ncbi.nlm.nih.gov를 참조한다.

[0279] 보존성 변형을 포함하는 항체

[0280] 소정 실시 형태에 있어서 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 상기 CDR 서열들 중 하나 이상은 본원에 개시된 바람직한 항체 (예를 들어 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 또는 13C4)를 기반으로 하는 특정된 아미노산 서열, 또는 그의 보존성 변형체를 포함하며, 항체는 본 발명의 항-IP-10 항체의 요망되는 기능적 특성을 보유한다. 따라서 본 발명은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공하는데, 여기서,

[0281] (a) 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 번호 24-34의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며;

[0282] (b) 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 번호 73-83의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

[0283] (c) 항체는 IP-10에 특이적으로 결합되며;

[0284] (d) 항체는 하기의 기능적 특성 중 하나 이상을 나타낸다:

[0285] (i) 항체는 IP-10의 CXCR3에의 결합을 억제하고;

[0286] (ii) 항체는 IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하며;

[0287] (iii) 항체는 IP-10 유도된 세포 이동을 억제하고;

[0288] (iv) 항체는 붉은털 원숭이 IP-10과 교차 반응하며;

[0289] (v) 항체는 마우스 IP-10과 교차 반응하지 않고;

[0290] (vi) 항체는 인간 MIG와 교차 반응하지 않으며;

[0291] (vii) 항체는 인간 ITAC와 교차 반응하지 않는다.

[0292] 바람직한 실시 형태에 있어서 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열 번호 13-23의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열 번호 62-72의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 다른 바람직한 실시 형태에 있어서 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 번호 1-12의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열 번호 51-61의 아미노산 서열, 및 그의 보존성 변형체로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0293] 여러 실시 형태에 있어서 본 항체는 상기 (d) 내지 (j)로 열거된 기능적 특성들 중 1가지 이상, 2가지 이상, 3가지 이상, 4가지 이상, 5가지 이상 또는 6가지 이상을 나타낼 수도 있다. 그러한 항체는 예를 들어 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0294] 본원에 사용되는 바와 같이 "보존성 서열 변형체"라는 용어는, 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성에 유의하게 영향을 주거나 상기 결합 특성을 유의하게 변경시키지 않는 아미노산 변형체를 말하려는 것이다. 그러한 보존성 변형체는 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 당업계에 공지된 표준 기술, 예를 들어 특정 부위 돌연변이 유발 및 PCR 매개된 돌연변이 유발에 의해 본 발명의 항체 내로 도입될 수 있다. 보존성 아미노산 치환체는 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리는 당업계에서 정의되었다. 이 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄 (예를 들어 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지화된 측쇄 (예를 들어 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하는 아미노산을 포함한다. 이와 같이, 본 발명의 항체의 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리 유래의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있으며 변경된 항체는 본원에 기술되어 있는 기능적 분석법을 이용하여 기능 유지 (즉, 상기 (c) 내지 (j)에 나타내어져 있는 기능)에 대하여 시험할 수 있다.

[0295] 본 발명의 항-IP-10 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체

[0296] 다른 실시 형태에 있어서 본 발명은 본원에서 제공된 본 발명의 여러 항-IP-10 항체가 결합하는 것과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 예를 들어 본원에 개시된 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 또는 13C4 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 다른 인간 항체를 제공한다. 그러한 추가의 항체는 표준 IP-10 결합 분석에서 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 또는 13C4와 같은, 본 발명의 다른 항체와 교차 경쟁하는 (예를 들어 통계학적으로 유의한 방식으로 그의 결합을 경쟁적으로 억제하는) 능력을 기초로 하여 확인될 수 있다. 예를 들어 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 또는 13C4의 인간 IP-10에의 결합을 억제하는 시험 항체의 능력은 시험 항체가 인간 IP-10에의 결합에 있어서 이 항체와 경쟁할 수 있음을 입증하는 것이며, 그러한 항체는 비제한적 이론에 따르면 그가 경쟁하는 항체와 동일하거나 연관된 (예를 들어 구조적으로 유사하거나 공간적으로 근접함) 인간 IP-10 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 바람직한 실시 형태에 있어서 인간 IP-10 상에서 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 또는 13C4와 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 인간 단일클론 항체이다. 그러한 인간 단일클론 항체는 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 제조 및 단리될 수 있다.

[0297] 엔지니어링 (engineered) 및 변형된 항체

[0298] 본 발명의 항체는 또한 변형된 항체를 엔지니어링하기 위한 출발 재료로서 본원에 개시된 V_H 및/또는 V_L 서열 중 하나 이상을 갖는 항체를 사용하여 제조할 수 있는데, 출발 항체 유래의 변형된 항체는 변경된 특성을 가질 수 있다. 항체는 하나의 가변 영역 또는 둘 모두의 가변 영역 (즉, VH 및/또는 VL) 내의, 예를 들어 하나 이상의 CDR 영역 내 및/또는 하나 이상의 골격 영역 내의 하나 이상의 잔기의 변형에 의해 엔지니어링할 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로 항체는 예를 들어 항체의 이펙터 기능(들)을 변경시키기 위하여 불변 영역(등) 내의 잔기를 변형함으로써 엔지니어링할 수 있다.

[0299] 수행될 수 있는 가변 영역 엔지니어링의 1가지 유형은 CDR 그래프팅이다. 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR)에 위치하는 아미노산 잔기를 통하여 표적 항원과 상호 작용한다. 이런 이유 때문에 CDR 내의 아미노산 서열은 CDR 바깥의 서열보다 개개의 항체들 사이에서 보다 다양하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호 작용에 대하여 책임이 있기 때문에, 상이한 특성을 갖는 상이한 항체 유래의 골격 서열 상으로 그래프팅된 특정의 자연 발생 항체 유래의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터의 제작에 의해 특정의 자연 발생 항체의 특성을 모방하는 재조합 항체를 발현시키는 것이 가능하다 (예를 들어 문헌[Riechmann, L. 등 (1998) Nature 332: 323-327]; 문헌[Jones, P.등 (1986) Nature 321: 522-525]; Queen, C. 등 (1989) Proc. Natl. Acad. See. U.S.A. 86: 10029-10033]; Winter의 미국 특허 제5,225,539호와, Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 동 제5,585,089호; 동 제5,693,762호 및 동 제6,180,370호 참조).

[0300] 따라서 본 발명의 다른 실시 형태는 각각 서열 번호 1-12, 서열 번호 13-23 및 서열 번호 24-34의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역과, 각각 서열 번호 51-61, 서열 번호 62-72 및 서열 번호 73-83의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 이와 같이, 그러한 항체는 단일클론 항체 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 또는 13C4의 V_H 및 V_L CDR 서열을 포함하지만 이 항체들 유래의 상이한 골격

서열을 포함할 수도 있다.

[0301] 그러한 골격 서열은 생식 세포 항체 유전자 서열을 포함하는 공용 DNA 데이타베이스 또는 공개된 참고 문헌으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자의 생식 세포 DNA 서열은 ""VBase" 인간 생식 세포 서열 데이타베이스(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 인터넷 상에서 이용가능함)와, 문헌[Kabat, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]; 문헌[Tomlinson, I. M. , 등 (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227: 776-798]; 및문헌[Cox, J. P. L. 등 (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24: 827-836]에서 찾아볼 수 있는데, 상기 문헌 각각의 내용은 본원에 참고로 명백하게 포함된다.

[0302] 본 발명의 항체에서 사용하기 위한 바람직한 골격 서열은 본 발명의 선택된 항체에 의해 사용되는 골격 서열과 구조적으로 유사한, 예를 들어 본 발명의 바람직한 단일클론 항체에 의해 사용되는 V_H 3-33, 3-30.3, 4-61 또는 5-51 서열 [서열 번호 47-50] 및/또는 V_k A27, L6, L18 또는 L15 골격 서열 [서열 번호 95-98]과 구조적으로 유사한 것이다. V_H CDR1, 2 및 3 서열과 V_L CDR1, 2 및 3 서열은 골격 서열이 유래되는 생식 세포 면역글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 서열을 갖는 골격 영역 상으로 그래프팅될 수 있거나, 이 CDR 서열들은 생식 세포 서열에 비하여 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 골격 영역 상으로 그래프팅될 수 있다. 예를 들어 소정 경우에 있어서 골격 영역 내의 잔기를 돌연변이시켜 항체의 항원 결합 능력을 유지 또는 증강시키는 것이 유익하다는 것이 밝혀졌다 (예를 들어 Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 동 제5,585,089호; 동 제5,693,762호 및 동 제6,180,370호 참조).

[0303] 가변 영역 변형의 다른 유형은 V_H 및/또는 V_L CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이시키고 그럼으로써 목적 항체의 하나 이상의 결합 특성 (예를 들어 친화도)을 개선하는 것이다. 특정 부위 돌연변이 유발 또는 PCR 매개 돌연변이 유발을 수행하여 돌연변이(들)를 도입할 수 있으며, 항체 결합에 대한 영향, 또는 목적으로 하는 기타 기능적 특성은 본원에 기술되어 있으며 실시예에 제공되어 있는 바와 같이 시험관 내 또는 생체 내 분석법으로 평가할 수 있다. 바람직하게는 보존성 변형 (상기에 논의되어 있는 바와 같음)이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 부가 또는 결실일 수도 있지만 바람직하게는 치환이다. 또한, 전형적으로 CDR 영역 내의 단지 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 잔기가 변경된다.

[0304] 따라서, 다른 실시 형태에 있어서 본 발명은 (a) 서열 번호 1-12의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1-12의 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 영역; (b) 서열 번호 13-23의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 13-23의 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 영역; (c) 서열 번호 24-34의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 24-34의 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3 영역; (d) 서열 번호 51-61의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 51-61의 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1 영역; (e) 서열 번호 62-72의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 62-72의 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2 영역; 및 (f) 서열 번호 73-83의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 73-83의 서열에 비하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-IP-10 단일클론 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0305] 본 발명의 바람직한 치환 돌연변이는 10A12 mAb의 V_H 사슬의 CDR1 내의 위치 32에서 시스테인 잔기가 세린 잔기로 치환된 것이다. 이러한 변형된 형태의 10A12는 본원에서 10A12S로 칭해진다. 10A12의 V_H 사슬의 아미노산 서열이 서열 번호 44에 예시되어 있으며 10A12S의 V_H 사슬의 아미노산 서열이 서열 번호 45에 예시되어 있다.

[0306] 본 발명의 엔지니어링된 항체는 예를 들어 항체의 특성의 개선을 위하여 V_H 및/또는 V_L 내의 골격 잔기를 변형시

킨 것을 포함한다. 전형적으로는 그러한 골격 변형은 항체의 면역원성의 감소를 위하여 행해진다. 예를 들어 한가지 접근법은 하나 이상의 골격 잔기를 상응하는 생식 세포 서열로 "복귀 돌연변이시키는 (backmutated)" 것이다. 더 구체적으로는, 체세포 돌연변이가 일어난 항체는 이 항체가 유래되는 생식 세포 서열과는 다른 골격 잔기들을 포함할 수도 있다. 그러한 잔기는 항체 골격의 서열을 항체가 유래되는 생식 세포 서열과 비교함으로써 확인할 수 있다. 예를 들어 6A5의 경우, V_H의 아미노산 잔기 #2 (FR1 내)는 메티오닌이며 반면 상응하는 V_H 3-33 생식 세포 서열에서의 이 잔기는 발린이다 (도 12 참조). 골격 영역의 서열을 그의 생식 세포 배열 (configuration)로 되돌리기 위하여 체세포 돌연변이는 예를 들어 특정 부위 돌연변이 유발 또는 PCR 매개 돌연변이 유발에 의해 생식 세포 서열로 "복귀 돌연변이시킬" 수 있다 (예를 들어 6A5의 V_H의 잔기 2는 메티오닌에서 발린으로 "복귀 돌연변이시킬" 수 있음). 그러한 "복귀 돌연변이된" 항체도 본 발명에 포함시키려 한다.

[0307] 다른 유형의 골격 변형은 골격 영역 내에서, 또는 심지어 하나 이상의 CDR 영역 내에서 하나 이상의 잔기를 돌연변이시켜 T 세포 에피토프를 제거하고 그럼으로써 항체의 잠재적인 면역원성을 감소시키는 것을 포함한다. 이러한 접근법은 "면역 제거(deimmunization)"로도 칭해지며 Carr 등의 미국 특허 공보 제20030153043호에 더욱 상세하게 개시되어 있다.

[0308] 골격 또는 CDR 내에서 만들어진 변형 외에도, 또는 상기 변형에 대하여 대안적으로, 본 발명의 항체를 엔지니어링하여 Fc 영역 내에 변형을 포함시킬 수도 있으며, 전형적으로는 항체의 하나 이상의 기능적 특성, 예를 들어 혈청중 반감기 (serum half-life), 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원 의존성 세포 독성을 변경시킬 수도 있다. 또한 본 발명의 항체는 화학적으로 변형시키거나 (예를 들어 하나 이상의 화학적 부분을 항체에 부착시킬 수 있음) 그의 글리코실화가 변경되도록, 또, 항체의 하나 이상의 기능적 특성이 변경되도록 변형시킬 수도 있다. 이러한 실시 형태 각각은 하기에 더욱 상세하게 기술되어 있다. Fc 영역 중의 잔기의 넘버링은 Kabat의 EU 인덱스의 것이다.

[0309] 일 실시 형태에 있어서, CH1의 경첩 영역은 경첩 영역 중의 시스테인 잔기의 갯수가 변경되도록, 예를 들어 증가 또는 감소되도록 변형된다. 이러한 접근법은Bodmer 등의 미국 특허 제5,677,425호에 또한 개시되어 있다. CH1의 경첩 영역 중의 시스테인의 갯수는 예를 들어 경쇄 및 중쇄의 어셈블리 (assembly)를 용이하게 하기 위하여 또는 항체의 안정성을 증가 또는 감소시키기 위하여 변경된다.

[0310] 다른 실시 형태에 있어서 항체의 Fc 경첩 영역은 항체의 생물학적 반감기의 감소를 위하여 돌연변이된다. 더 구체적으로는 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 Fc-경첩부 단편의 CH2-CH3 도메인 경계 영역 내로 도입되어서 항체는 천연 Fc-경첩 도메인의 스타필로코실 (Staphylococcyl) 단백질 A (SpA) 결합에 비하여 약화된 SpA 결합력을 가진다. 이러한 접근법은 Ward 등의 미국 특허 제6,165,745호에 더욱 상세하게 개시되어 있다.

[0311] 다른 실시 형태에 있어서, 항체는 그의 생물학적 반감기의 증가를 위하여 변형된다. 여러 접근법이 가능하다. 예를 들어 Ward 등의 미국 특허 제6,277,375호에 개시되어 있는 바와 같이, 하기 돌연변이 중 하나 이상이 도입될 수 있다: T252L, T254S, T256F. 대안적으로는, Presta 등의 미국 특허 제5,869,046호 및 동 제6,121,022호에 개시되어 있는 바와 같이, 생물학적 반감기의 증가를 위하여, 항체는 IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 2개의 루프로부터 위해지는 재생 수용체 (salvage receptor) 결합 에피토프를 포함하도록 CH1 또는 CL 영역 내에서 변경시킬 수 있다.

[0312] 또다른 실시 형태에 있어서, Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체하여 항체의 이펙터 기능(들)을 변경함으로써 변경시킨다. 예를 들어 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산을 상이한 아미노산 잔기로 대체하여 항체가 이펙터 리간드에 대하여 변경된 친화도를 가지지만 부모 항체의 항원 결합 능력은 유지하도록 할 수 있다. 친화도가 변경된 이펙터 리간드는 예를 들어 Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이러한 접근법은 둘 모두 Winter 등의 특허인 미국 특허 제5,624,821호 및 동 제5,648,260호에 더욱 상세하게 개시되어 있다.

[0313] 다른 예에 있어서, 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산은, 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소되거나 무효화된 보체 의존성 세포 독성 (complement dependent cytotoxicity, CDC)을 가지도록 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 이러한 접근법은 Idusogie 등의 미국 특허 제6,194,551호에 더욱 상세하게 개시되어 있다.

[0314] 다른 예에 있어서, 아미노산 위치 231 및 239 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경시킴으로써 항체가 보체를 고정시키는 능력을 변경시킨다. 이러한 접근법은 Bodmer 등의 PCT 공보 제WO 94/29351호에 또한 개시되어 있다.

[0315] 또다른 예에 있어서, Fc 영역을 변형하여 항체가 항체 의존성 세포 독성(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 매개하는 능력을 증가시키고/시키거나 하기 위치의 하나 이상의 아미노산을 변형함으로써 Fcɣ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시킨다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439. 이러한 접근법은 Presta의 PCT 공보 제WO 00/42072호에 또한 개시되어 있다. 또한, FcɣR1, FcɣRII, FcɣRIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 부위가 지도화되었으며 결합력이 개선된 변이체가 개시되었다 (문헌[Shields, R. L. 등 (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604] 참조). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339에서의 특정 돌연변이는 FcɣRIII에의 결합을 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 부가적으로, 하기의 조합의 돌연변이체는 FcɣRIII 결합을 개선시키는 것으로 밝혀졌다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

[0316] 또다른 실시 형태에 있어서 항체의 글리코실화가 변형된다. 예를 들어 비글리코실화 (aglycosylated) 항체가 만들어질 수 있다 (즉, 항체에는 글리코실화가 결여됨). 글리코실화는 예를 들어 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시키기 위하여 변경될 수 있다. 그러한 탄수화물 변형은 예를 들어 항체 서열 내의 하나 이상의 글리코실화 부위의 변경에 의해 성취될 수 있다. 예를 들어 하나 이상의 아미노산 치환이 만들어져 하나 이상의 가변 영역 골격의 글리코실화 부위를 제거함으로써 상기 부위에서 글리코실화를 제거할 수 있다. 그러한 비글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수도 있다. 그러한 접근법은 Co 등의 미국 특허 제5,714,350호 및 동 제6,350,861호에 더욱 상세하게 개시되어 있다.

[0317] 부가적으로 또는 대안적으로, 글리코실화 유형이 변경된 항체, 예를 들어 푸코실 잔기의 양이 감소된 하이포푸코실화 (hypofucosylated) 항체 또는 GlcNac 구조의 양분이 증가된 항체가 만들어질 수 있다. 그러한 글리코실화 패턴 변경은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다. 그러한 탄수화물 변형은 예를 들어 항체를 글리코실화 기구가 변경된 숙주 세포에서 발현시킴으로써 성취될 수 있다. 글리코실화 기구가 변경된 세포는 당업계에 개시되었으며 이는 본 발명의 재조합 항체를 발현하고 그럼으로써 글리코실화가 변경된 항체를 생성하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어 Hanai 등의 유럽 특허 제1,176,195호에는 푸코실 트랜스퍼라제를 코딩하는 FUT8 유전자가 기능적으로 파괴되어서, 그러한 세포주에서 발현되는 항체는 하이포푸코실화를 나타내는 세포주가 개시되어 있다. Presta의 PCT 공보 제WO 03/035835호에는 변이체 CHO 세포주, Lec13 세포가 개시되어 있는데, 상기 세포는 푸코스가 Asn(297)-결합 탄수화물에 부착되는 능력이 감소되었으며, 또한 상기 숙주 세포에서 발현되는 항체가 하이포푸코실화된다 (또한 문헌 [Shields, R. L. 등 (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740] 참조). Umana 등의 PCT 공보 제WO 99/54342호에는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제 (예를 들어 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 엔지니어링되어서 엔지니어링된 세포주에서 발현되는 항체가 항체의 ADCC 활성을 증가시키는 GlcNac 구조체의 양분 증가를 나타내는 세포주가 개시되어 있다 (또한 문헌[Umana 등 (1999) Nat. Biotech. 17:176-180] 참조).

[0318] 본 발명에 의해 고려되는 본원의 항체의 다른 변형은 페길화(pegylation)이다. 항체는 예를 들어 항체의 생물학적 (예를 들어 혈청중) 반감기의 증가를 위하여 페길화될 수 있다. 항체의 페길화를 위해서는, 전형적으로 항체 또는 그의 단편을, 하나 이상의 PEG 기가 항체 또는 항체 단편에 부착하게 되는 조건 하에서, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 예를 들어 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 반응시킨다. 바람직하게는 페길화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성의 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통하여 실시된다. 본원에 사용되는 바와 같이, "폴리에틸렌 글리콜"이라는 용어는 다른 단백질의 유도체화를 위하여 사용된 임의의 유형의 PEG, 예를 들어 모노 (C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 포함하려는 것이다. 소정 실시 형태에 있어서 페길화될 항체는 비글리코실화 항체이다. 단백질의 페길화 방법은 당업계에 공지되어 있으며 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어 Nishimura 등의 유럽 특허 제0 154 316호 및 Ishikawa 등의 유럽 특허 제0 401 384호를 참조한다.

[0319] 항체의 엔지니어링 방법

[0320] 상기에 논의되어 있는 바와 같이, 본원에 개시되어 있는 V_H 및 V_L 서열을 갖는 항-IP-10 항체는 VH 및/또는 VL 서열, 또는 그에 부착된 불변 영역(들)을 변형시킴으로써 새로운 항-IP-10 항체를 생성하기 위하여 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 태양에 있어서, 본 발명의 항-IP-10 항체, 예를 들어 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 또는 13C4의 구조적 특징을 사용하여 본 발명의 항체의 하나 이상의 기능적 특성, 예를 들어 인간 IP-10 및 붉은털 원숭이 IP-10에는 결합하지만 마우스 IP-10 또는 인간 MIG 또

는 인간 ITAC에는 결합하지 않는 것과, 또한 IP-10의 하나 이상의 기능적 특성 (예를 들어 CXCR3 결합, 칼슘 유동, 주화성)을 억제하는 것을 유지하는 구조적으로 연관된 항-IP-10 항체를 생성한다. 상기에 논의되어 있는 바와 같이, 예를 들어 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S 또는 13C4, 또는 그의 돌연변이의 하나 이상의 CDR 영역을 공지된 골격 영역 및/또는 다른 CDR과 재조합적으로 조합하여 재조합적으로 엔지니어링된 추가의 본 발명의 항-IP-10 항체를 생성할 수 있다. 다른 유형의 변형은 이전의 절에서 기술된 것을 포함한다. 엔지니어링 방법에 있어서의 출발 재료는 본원에 제공되어 있는 하나 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열, 또는 그의 하나 이상의 CDR 영역이다. 엔지니어링된 항체의 생성을 위해서는, 본원에 제공된 하나 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열, 또는 그의 하나 이상의 CDR 영역을 갖는 항체를 실제로 제조 (즉, 단백질로서 발현시킴)할 필요는 없다. 오히려, 서열(들)에 포함된 정보를 출발 재료로 이용하여 원래 서열(들)로부터 유래되는 "2세대" 서열(들)을 생성하고 이어서 "2세대" 서열(들)은 단백질로서 제조 및 발현된다.

[0321] 따라서, 다른 실시 형태에 있어서 본 발명은 항-IP-10 항체의 제조 방법으로서

[0322] (a) (i) 서열 번호 1-12의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR1 서열, 서열 번호 13-23의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR2 및/또는 서열 번호 24-34의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 항체 서열; 및 (ii) 서열 번호 51-61의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR1 서열, 서열 번호 62-72의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR2 서열 및/또는 서열 번호 73-83의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역 항체 서열을 제공하는 단계와;

[0323] (b) 중쇄 가변 영역 항체 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 항체 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경시켜 하나 이상의 변경된 항체 서열을 생성하는 단계와;

[0324] (c) 변경된 항체 서열을 단백질로서 발현하는 단계

[0325] 를 포함하는 방법을 제공한다.

[0326] 표준의 분자 생물학 기술을 이용하여 변경된 항체 서열을 제조 및 발현시킬 수 있다.

[0327] 바람직하게는, 변경된 항체 서열(들)에 의해 코딩되는 항체는 본원에 기술된 항-IP-10 항체의 기능적 특성들 중 하나, 일부 또는 전부를 유지하는 것인데, 기능적 특성은 하기를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다:

[0328] (i) 인간 IP-10에 특이적으로 결합되며;

[0329] (ii) IP-10의 CXCR3에의 결합을 억제하며;

[0330] (iii) IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하며;

[0331] (iv) IP-10 유도된 세포 이동을 억제하며;

[0332] (v) 붉은털 원숭이 IP-10과 교차 반응하며;

[0333] (vi) 마우스 IP-10과 교차 반응하지 않으며;

[0334] (vii) 인간 MIG와 교차 반응하지 않으며;

[0335] (viii) 인간 ITAC와 교차 반응하지 않는다.

[0336] 변경된 항체는 상기의 (i) 내지 (viii)로 나타내어져 있는 기능적 특성들 중 1가지 이상, 2가지 이상, 3가지 이상, 4가지 이상, 5가지 이상, 6가지 이상 또는 7가지 이상을 나타낼 수도 있다.

[0337] 변경된 항체의 기능적 특성은 당업계에서 이용가능하고/하거나 본원에 기술된 표준 분석법, 예를 들어 실시예에 나타내어진 것 (예를 들어 ELISA, 칼슘 유동 분석, 주화성 분석)을 이용하여 평가할 수 있다.

[0338] 본 발명의 항체의 엔지니어링 방법의 소정 실시 형태에 있어서, 돌연변이는 항-IP-10 항체의 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 랜덤하게 또는 선택적으로 도입될 수 있으며 생성된 변형 항-IP-10 항체는 본원에 기술되어 있는 바와 같이 결합 활성 및/또는 기타 기능적 특성에 대하여 스크리닝될 수 있다. 돌연변이 방법은 당업계에서 개시되었다. 예를 들어 Short의 PCT 공보 제WO 02/092780호에는 포화 돌연변이 생성법, 합성 라이게이션 어셈블리법 또는 그의 조합을 이용하여 항체 돌연변이를 생성 및 스크리닝하는 방법이 개시되어 있다. 대안적으로는, Lazar 등의 PCT 공보 제WO 03/074679호에는 항체의 물리화학적 특성의 최적화를 위한 컴퓨터에 의한 (computational) 스크리닝 방법의 사용 방법이 개시되어 있다.

[0339] 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자

[0340] 본 발명의 다른 태양은 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 이 핵산은 전세포 (whole cell), 세포 용해물 (lysate) 중에 존재하거나, 또는 부분적으로 정제된 형태 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수도 있다. 핵산은, 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴드화 (banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기 영동 및 당업계에 잘 알려진 기타의 것을 포함하는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 기타 오염 물질, 예를 들어 다른 세포의 핵산 또는 단백질로부터 정제되어 나올 경우 "단리"되거나 "실질적으로 순수하게 되는" 것이다. 예를 들어 문헌[F. Ausubel, 등, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York]을 참조한다. 본 발명의 핵산은 예를 들어 DNA 또는 RNA일 수 있으며 인트론 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 바람직한 실시 형태에 있어서 핵산은 cDNA 분자이다.

[0341] 본 발명의 핵산은 표준의 분자 생물학 기술을 이용하여 수득될 수 있다. 하이브리도마 (예를 들어 하기에 추가로 기술되는 바와 같이 인간 면역글로불린 유전자를 지니는 트랜스제닉 마우스로부터 제조되는 하이브리도마)에 의해 발현되는 항체에 있어서, 하이브리도마에 의해 만들어지는 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술로 수득할 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리 (예를 들어 파지 디스플레이 기술을 이용함)로부터 수득되는 항체에 있어서는 항체를 코딩하는 핵산이 라이브러리로부터 회수될 수 있다.

[0342] 본 발명의 바람직한 핵산 분자는 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 또는 13C4 단일클론 항체의 VH 및 VL 서열을 코딩하는 것이다. 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4의 VH 서열을 코딩하는 DNA 서열이 각각 서열 번호 99-109에 예시되어 있다. 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4의 VL 서열을 코딩하는 DNA 서열이 각각 서열 번호 110-120에 예시되어 있다.

[0343] 일단 VH 및 VL 절편을 코딩하는 DNA 단편이 수득되면, 상기 DNA 단편은 예를 들어 가변 영역 유전자를 전장 항체 사슬의 유전자로, Fab 단편의 유전자로, 또는 scFv 유전자로 변환시키기 위하여 표준 재조합 DNA 기술로 추가로 조작할 수 있다. 이러한 조작에 있어서, VL- 또는 VH-코딩 DNA 단편은 다른 단백질을 코딩하는 다른 DNA 단편, 예를 들어 항체 불변 영역 또는 가요성 링커에 작동되게 결합된다 (operatively linked). 이 문맥에서 사용되는 바와 같이, "작동되게 결합된"이라는 용어는 2개의 DNA 단편에 의해 코딩되는 아미노산 사열이 프레임에 맞게 (in-frame) 남아있도록 2개의 DNA 단편이 결합되는 것을 의미하려는 것이다.

[0344] VH 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 VH-코딩 DNA를 중쇄 불변 영역 (CH1, CH2 및 CH3)을 코딩하는 다른 DNA 분자에 작동되게 결합시킴으로써 전장 중쇄 유전자로 변환시킬 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있으며 (예를 들어 문헌[Kabat, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조) 상기 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭으로 수득할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있지만 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역이다. Fab 단편의 중쇄의 유전자에 있어서 VH-코딩 DNA는 단지 중쇄 CH1 불변 영역을 코딩하는 다른 DNA 분자에 작동되게 결합될 수 있다.

[0345] VL 영역을 코딩하는 단리된 DNA는 VL-코딩 DNA를 경쇄 불변 영역을 코딩하는 다른 DNA 분자에 작동되게 결합시킴으로써 (Fab 경쇄 유전자 뿐만 아니라) 전장 경쇄 유전자로 변환시킬 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있으며 (예를 들어 문헌[Kabat, E. A.,등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조) 상기 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭으로 수득할 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있지만 가장 바람직하게는 카파 불변 영역이다.

[0346] scFv 유전자의 생성을 위해서는, VH- 및 VL-코딩 DNA 단편을, 가요성 링커를 코딩하는, 예를 들어 아미노산 서열 $(Gly_4-Ser)_3$을 코딩하는 다른 단편에 작동되게 결합시켜서, VH 및 VL 서열이 인접 (contiguous) 단일쇄 단백질로 발현될 수 있도록 하는데, VL 및 VH 영역은 가요성 링커에 의해 결합된다 (예를 들어 문헌[Bird 등(1988) Science 242: 423-426; 문헌[Huston 등(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883]; 문헌[McCafferty 등, (1990) Nature 348: 552-554] 참조).

[0347] 본 발명의 단일클론 항체의 제조

[0348] 본 발명의 단일클론 항체 (mAb)는 통상적인 단일클론 항체에 대한 방법을 비롯한 다양한 기술, 예를 들어 문헌[Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495]의 표준 체세포 혼성화 기술로 제조할 수 있다. 원칙적으로는

체세포 혼성화 절차가 바람직하기는 하지만 단일클론 항체의 다른 제조 기술, 예를 들어 B 림프구의 바이러스성 또는 발암성 형질전환법이 이용될 수 있다.

[0349] 하이브리도마의 제조를 위한 바람직한 동물 시스템은 쥣과 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생성은 매우 잘 확립된 절차이다. 면역화 프로토콜 및 융합용의 면역화 비장 세포 (splenocyte)의 단리 기술은 당업계에 공지되어 있다. 융합 상대 (partner) (예를 들어 쥣과 골수종 세포) 및 융합 절차도 공지되어 있다.

[0350] 본 발명의 키메라 또는 인간화 항체는 상기한 바와 같이 제조되는 쥣과 단일클론 항체의 서열을 기초로 하여 제조할 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 DNA는 목적하는 쥣과 하이브리도마로부터 수득되며 표준의 분자 생물학 기술을 이용하여 쥣과 외 (예를 들어 인간)의 면역글로불린 서열을 포함하도록 엔지니어링할 수 있다. 예를 들어 키메라 항체의 생성을 위해서는, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 쥣과 가변 영역을 인간 불변 영역에 결합시킬 수 있다 (예를 들어 Cabilly 등의 미국 특허 제4,816,567호 참조). 인간화 항체의 생성을 위해서는, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 쥣과 CDR 영역을 인간 골격 내로 삽입할 수 있다 (예를 들어 Winter 등의 미국 특허 제5,225,539호와, Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 동 제5,585,089호; 동 제5,693,762호 및 동 제6,180,370호 참조).

[0351] 바람직한 실시 형태에 있어서 본 발명의 항체는 인간 단일클론 항체이다. IP-10에 대해 유도되는 그러한 인간 단일클론 항체는 마우스 시스템보다는 오히려 인간 면역계의 일부를 지니는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모조믹 (transchromosomic) 마우스를 사용하여 생성할 수 있다. 이러한 트랜스제닉 및 트랜스크로모조믹 마우스는 본원에서 각각 HuMAb 마우스 및 KM 마우스로 칭해지는 마우스를 포함하며 본원에서 "인간 Ig 마우스"로 총칭된다.

[0352] HuMAb 마우스(등록상표) (Medarex, Inc.)는 재배열되지 않은 (unrearranged) 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열을 코딩하는 인간 면역글로불린 유전자의 미니 유전자좌 (miniloci)를, 내인성 μ 및 κ 사슬 유전자좌를 불활성화시키는 표적 돌연변이와 함께 포함한다 (예를 들어 문헌[Lonberg, 등 (1994) Nature 368 (6474): 856- 859] 참조). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ의 발현 감소를 나타내며, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스진은, 면역화에 반응하여, 클래스 스위칭 (class switching) 및 체세포 돌연변이를 받게 되어 높은 친화도의 인간 IgGκ 단일클론을 생성하게 된다 (문헌[Lonberg, N. 등 (1994), 상기 참조]; 문헌[Lonberg, N. (1994)]에서 개관되어 있는 문헌[Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101]; 문헌[Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev.Immunol. 13: 65-93] 및 문헌[Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764: 536-546]). HuMab 마우스의 제조 및 사용과, 그러한 마우스에 의해 보유되는 게놈 변형은 문헌[Taylor, L. 등 (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295]; 문헌[Chen, J. 등 (1993) International Immunology 5: 647-656]; 문헌[Tuaillon 등 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724]; 문헌[Choi 등 (1993) Nature Genetics 4: 117-123]; 문헌[Chen, J. 등 (1993) EMBO J. 12: 821-830]; 문헌[Tuaillon 등 (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920]; 문헌[Taylor, L. 등 (1994) International Immunology 6: 579-591]; 및 문헌[Fishwild, D. 등 (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851]에 또한 기술되어 있는데, 상기 문헌 모두의 내용은 본원에 그의 전체 내용이 참고로 특정적으로 포함된다. 또한 미국 특허 제5,545,806호; 동 제5,569,825호; 동 제5,625,126호; 동 제5,633,425호; 동 제5,789,650호; 동 제5,877,397호; 동 제5,661,016호; 동 제5,814,318호; 동 제5,874,299호; 및 동 제5,770,429호 - 모두 Lonberg 및 Kay의 특허- ; Suraniet의 미국 특허 제5,545,807호; PCT 공보 제WO 92/03918호, 동 제WO 93/12227호, 동 제WO 94/25585호, 동 제WO 97/13852호, 동 제WO 98/24884호 및 동 제WO 99/45962호 - 모두 Lonberg 및 Kay의 특허 - ; 및 Korman 등의 PCT 공보 제WO 01/14424호를 참조한다.

[0353] 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명의 인간 항체는 트랜스진 및 트랜스크로모좀 상에 인간 면역글로불린 서열을 지니는 마우스, 예를 들어 인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스크로모좀을 지니는 마우스를 사용하여 생기게 할 수 있다. 본원에서 "KM 마우스"로 칭해지는 그러한 마우스는 Ishida 등의 PCT 공보 제WO 02/43478호에 상세하게 개시되어 있다.

[0354] 또한 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 트랜스제닉 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하며 본 발명의 항-IP-10 항체를 생기게 하기 위하여 이를 사용할 수 있다. 예를 들어 Xenomouse (Abgenix,Inc.)로 칭해지는 대안적인 트랜스제닉 시스템이 사용될 수 있으며, 그러한 마우스는 예를 들어 Kucherlapati 등의 미국 특허 제5,939,598호; 동 제6,075,181호; 동 제6,114,598호; 동 제6,150,584호 및 동 제6,162,963호에 개시되어 있다.

[0355] 또한, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 트랜스크로모조믹 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하며 본 발명의 항-IP-10 항체를 생기게 하기 위하여 이를 사용할 수 있다. 예를 들어 인간 중쇄 트랜스크로모좀

및 인간 경쇄 트랜스크로모좀 둘 모두를 지니며 "TC 마우스"로 칭해지는 마우스가 사용될 수 있으며, 그러한 마우스는 문헌[Tomizuka 등 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727]에 개시되어 있다. 또한 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스크로모좀을 지니는 소가 당업계에 개시되었으며 (문헌[Kuroiwa 등 (2002) Nature Biotechnology 20: 889-894]) 본 발명의 항-IP-10 항체를 생기게 하기 위하여 이를 사용할 수 있다.

[0356] 본 발명의 인간 단일클론 항체는 인간 면역글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하기 위한 파지 디스플레이 방법을 이용하여서도 제조할 수 있다. 인간 항체를 단리하기 위한 그러한 파지 디스플레이 방법이 당업계에 확립되어 있다. 예를 들어 Ladner 등의 미국 특허 제5,223,409호; 동 제5,403,484호; 및 동 제5,571,698호; Dower 등의 미국 특허 제5,427,908호 및 동 제5,580,717호; McCafferty 등의 미국 특허 제5,969,108호 및 동 제6,172,197호와; Griffiths 등의 미국 특허 제5,885,793호; 동 제6,521,404호; 동 제6,544,731호; 동 제6,555,313호; 동 제6,582,915호 및 동 제6,593,081호를 참조한다.

[0357] 본 발명의 인간 단일클론 항체는 인간 면역 세포가 재구성되어서 인간 항체 반응이 면역화시에 생성될 수 있는 SCID 마우스를 사용하여서도 제조할 수 있다. 그러한 마우스는 예를 들어 Wilson 등의 미국 특허 제5,476,996호 및 동 제5,698,767호에 개시되어 있다.

[0358] 인간 Ig 마우스의 면역화

[0359] 문헌[Lonberg, N. 등 (1994) Nature 368 (6474): 856-859]; 문헌[Fishwild, D. 등 (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851]; 및 PCT 공보 제WO 98/24884호와 제WO 01/14424호에 기술되어 있는 바와 같이, 인간 Ig 마우스를 사용하여 본 발명의 인간 항체를 생성되게 할 경우, 그러한 마우스는 IP-10 항원 및/또는 재조합 IP-10 또는 IP-10 융합 단백질의 정제 제제 또는 풍부화 (enriched) 제제로 면역화할 수 있다. 바람직하게는 마우스는 제1 주입시 6-16주령일 것이다. 예를 들어 정제 또는 재조합 IP-10 항원 제제 (5-50 μg)를 사용하여 인간 Ig 마우스를 복강내 면역화로 면역화할 수 있다.

[0360] IP-10에 대한 전적인 (fully) 인간 단일클론 항체를 생성하기 위한 상세한 절차가 하기 실시예 1에 기술되어 있다. 여러 항원을 이용한 누적 경험에 의하면 완전 프로인트 아쥬반트 (complete Freund's adjuvant) 중의 항원을 이용한 처음의 복강내 (IP) 면역화, 이어서 불완전 프로인트 아쥬반트 중 항원을 이용한 격주 IP 면역화 (최대 총 6주)할 때 트랜스제닉 마우스가 반응한다는 것이 밝혀졌다. 그러나 프로인트 이외의 아쥬반트도 효과적인 것으로 밝혀졌다. 또한 아쥬반트의 부재 하에서의 전 세포는 고도로 면역원성인 것으로 밝혀졌다. 면역 반응은 면역화 프로토콜 코스에 걸쳐 모니터링할 수 있는데, 혈장 샘플은 레트로오비탈 (retroorbital) 채혈로 수득한다. 혈장은 ELISA (하기에 기술되어 있음)로 스크리닝할 수 있으며 항-IP-10 인간 면역글로불린의 역치가 충분한 마우스를 융합에 사용할 수 있다. 마우스는 희생 및 비장 제거 3일 전에 항원으로 정맥내로 면역 강화 (boost)할 수 있다. 각각의 면역화에 있어서 2-3회의 융합이 수행될 필요가 있을 수 있다고 기대된다. 전형적으로 6 내지 24마리 사이의 마우스가 각각의 항원에 대하여 면역화된다. 일반적으로 HCo7 및 HCo12 주 (strain) 둘 모두가 사용된다. 또한 HCo7 및 HCo12 트랜스진 둘 모두는 2개의 상이한 인간 중쇄 트랜스진 (HCo7/HCo12)을 갖는 단일 마우스 내로 함께 번식될 (bred) 수 있다.

[0361] 본 발명의 인간 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

[0362] 본 발명의 인간 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성을 위하여 면역화된 마우스 유래의 비장 세포 및/또는 림프절 세포를 단리하고 적절한 불멸화 세포주, 예를 들어 마우스 골수종 세포주에 융합시킬 수 있다. 생성된 하이브리도마는 항원 특이성 항체의 생산에 대하여 스크리닝될 수 있다. 예를 들어 면역화 마우스 유래의 비장 림프구의 단일 세포 현탁물은 50% PEG를 이용하여 1/6의 갯수의 P3X63-Ag8.653 비분비 마우스 골수종 세포 (ATCC, CRL 1580)에 융합시킬 수 있다. 세포를 평평한 바닥의 마이크로타이터 (microtiter) 플레이트에 대략 2 x 10^5개로 도말하고, 이어서 20%의 태아 클론 (Clone) 혈청, 18%의 "653" 조절 배지, 5%의 오리겐 (IGEN), 4 mM의 L-글루타민, 1 mM의 피루브산나트륨, 5 mM의 HEPES, 0.055 mM의 2-메르캅토에탄올, 50 단위/ml의 페니실린, 50 mg/ml의 스트렙토마이신, 50 mg/ml의 겐타마이신 및 1X HAT (Sigma; HAT은 융합한지 24시간 후에 첨가함)을 포함하는 선택 배지에서 2주간 배양한다. 대략 2주 후 HAT를 HT로 대체한 배지에서 세포를 배양할 수 있다. 이어서 개개의 웰을 인간 단일클론 IgM 및 IgG 항체에 대하여 ELISA로 스크리닝할 수 있다. 일단 많은 하이브리도마 성장이 일어나면, 일반적으로 10-14일 후에 배지를 관찰할 수 있다. 항체 분비 하이브리도마를 재도말하고, 다시 스크리닝하고, 인간 IgG에 대하여 여전히 양성일 경우 단일클론 항체를 한정 희석에 의해 2회 이상 서브클로닝할 수 있다. 이어서 안정한 서브클론은 시험관 내에서 배양하여 적은 양의 항체를 조직 배양용 배지에서 특성화를 위하여 생성할 수 있다.

[0363] 인간 단일클론 항체의 정제를 위해서는, 선발된 하이브리도마를 단일클론 항체 정제를 위하여 2리터 스피너 (spinner) 플라스크에서 배양할 수 있다. 상청액을 여과하고 농축시킨 후 단백질 A-세파로스를 포함하는 친화성 크로마토그래피 (Pharmacia, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 한다. 용출된 IgG는 겔 전기 영동 및 고성능 액체 크로마토그래피로 체크하여 순도를 보장할 수 있다. 완충제 용액은 PBS로 교환할 수 있으며 농도는 1.43의 소광 계수를 사용하여 OD280에 의해 측정할 수 있다. 단일클론 항체는 분취하여 -80℃에서 보관할 수 있다.

[0364] 본 발명의 단일클론 항체를 생산하는 트랜스펙토마 (transfectoma)의 생성

[0365] 또한 본 발명의 항체는 예를 들어 당업계에 잘 알려져 있는 재조합 DNA 기술 및 유전자 트랜스펙션 방법의 조합을 이용하여 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산할 수 있다 (예를 들어 문헌[Morrison, S. (1985) Science 229: 1202]).

[0366] 예를 들어 항체 또는 그의 항체 단편의 발현을 위하여, 부분적이거나 전장인 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA를 표준 분자 생물학 기술 (예를 들어 PCR 증폭 또는 목적 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용한 cDNA 클로닝)로 수득할 수 있으며 이 DNA는 유전자가 전사 및 번역 제어 서열에 작동되게 결합되도록 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 이와 관련하여, "작동되게 결합된"이라는 용어는 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 의도된 기능을 하도록 항체 유전자가 벡터 내로 라이게이션된다는 것을 의미하려는 것이다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용되는 발현용 숙주 세포와 상용성이도록 선택된다. 항체의 경쇄 유전자 및 항체의 중쇄 유전자는 별개의 벡터 내로 삽입되거나, 더 전형적으로는 두 유전자 모두 동일한 발현 벡터 내로 삽입된다. 항체는 표준 방법 (예를 들어 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보성 제한 효소 부위의 라이게이션, 또는 제한 효소 부위가 전혀 존재하지 않을 경우 블런트 (blunt) 말단 라이게이션)으로 발현 벡터 내로 삽입된다. 본원에 기술되어 있는 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역은, 요망되는 이소타입의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 이미 코딩하고 있는 발현 벡터 내로 이들을 삽입함으로써 V_H 절편이 벡터 내의 C_H 절편(들)에 작동되게 결합되고 V_L 절편이 벡터 내의 C_L 절편에 작동되게 결합되도록 하여 임의의 항체 이소타입의 전장 항체 유전자를 생성하는 데에 사용될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터의 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 신호 펩티드가 프레임에 맞게 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 결합되도록 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이종성 신호 펩티드 (즉, 면역글로불린 외 단백질 유래의 신호 펩티드)일 수 있다.

[0367] 항체 사슬 유전자 외에도, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 사슬 유전자의 발현을 제어하는 조절 서열을 지닌다. "조절 서열"이라는 용어는 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소 (예를 들어 폴리아데닐화 신호)를 포함하려는 것이다. 그러한 조절 서열은 예를 들어 문헌[Goeddel, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)]에 기술되어 있다. 당업계의 숙련자라면 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 디자인이 형질전환시킬 숙주 세포의 선택, 요망되는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 달라질 수 있음을 인식할 것이다. 포유류 숙주 세포 발현에 있어서 바람직한 조절 서열은 포유류 세포에서 단백질이 높은 수준으로 발현되게 하는 바이러스 요소, 예를 들어 사이토메갈로바이러스 (cytomegalovirus, CMV), 시미언 바이러스 40 (Simian Virus 40, SV40), 아데노바이러스 (예를 들어 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (AdMLP)) 및 폴리오마 (polyoma) 바이러스로부터 유래되는 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 대안적으로는 비바이러스 조절 서열, 예를 들어 유비퀴틴 프로모터 또는 β-글로빈 프로모터가 사용될 수 있다. 또한, 상이한 공급원 유래의 서열로 구성된 조절 요소, 예를 들어 SRα 프로모터 시스템은 SV40 초기 프로모터 유래의 서열 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 제1형의 긴 말단 반복체 (long terminal repeat)를 포함한다 (문헌[Takebe, Y. 등 (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466-472]).

[0368] 항체 사슬 유전자 및 조절 서열 외에도, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 추가의 서열, 예를 들어 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예를 들어 복제 원점) 및 선발가능한 마커 유전자를 지닐 수도 있다. 선발가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선발을 용이하게 한다 (예를 들어 모두 Axel 등의 특허인 미국 특허 제4,399,216호, 동 제4,634,665호 및 동 제5,179,017호 참조). 예를 들어 전형적으로 선발가능한 마커 유전자는 약물, 예를 들어 G418, 하이그로마이신 또는 메토트렉세이트에 대한 내성을 벡터가 도입된 숙주 세포에 부여한다. 바람직하며 선발가능한 마커 유전자는 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR) 유전자 (dhfr-숙주 세포에서 메토트렉세이트 선발/증폭으로 사용하기 위함) 및 neo 유전자 (G418 선발용)를 포함한다.

[0369] 경쇄 및 중쇄의 발현에 있어서, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 발현 벡터(들)는 표준 기술로 숙주 세포 내로 트랜스

펙션시킨다. 여러 유형의 "트랜스펙션"이라는 용어는 원핵 또는 진핵 숙주 세포 내로 외인성 DNA를 도입하는 데에 통상 사용되는 매우 다양한 기술, 예를 들어 전기 영동법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 등을 포함하려는 것이다. 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 본 발명의 항체를 발현시키는 것이 이론적으로 가능하지만, 진핵 세포, 가장 바람직하게는 포유류 숙주 세포에서의 항체의 발현이 가장 바람직한데, 이는 그러한 진핵 세포, 특히 포유류 세포가 적당하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체를 원핵 생물보다 더 어셈블링 및 분비할 것 같기 때문이다. 항체 유전자의 원핵 생물 발현은 고수율의 활성 항체의 생성에는 효과가 없는 것으로 보고되었다 (문헌[Boss, M. A. and Wood, C.R. (1985) Immunology Today 6: 12-13]).

[0370] 본 발명의 재조합 항체를 발현하는 데에 바람직한 포유류 숙주 세포는 중국 햄스터 난소 (Chinese Hamster Ovary, CHO) 세포 (예를 들어 문헌[R. J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621]에 기술되어 있는 바와 같이, DHFR 선발가능한 마커와 함께 사용되는, 문헌[Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220]에 기술되어 있는 dhfr- CHO 세포를 포함함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 특히, NSO 골수종 세포에서 사용함에 있어서, 다른 바람직한 발현 시스템은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 유럽 특허 제EP 338,841호에 개시되어 있는 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 코딩하는 재조합 발현 벡터가 포유류 숙주 세포 내로 도입될 경우 항체는 숙주 세포에서 항체가 발현되게 하기에 충분한 기간 동안, 또는 더 바람직하게는 숙주 세포가 배양되는 배양 배지 내로 항체가 분비되게 하기에 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 제조된다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 회수될 수 있다.

[0371] 항원에의 항체 결합의 특성화

[0372] 본 발명의 항체는 예를 들어 표준 ELISA로 IP-10에의 결합에 대하여 시험할 수 있다. 간략하게는, 마이크로타이터 플레이트를 PBS 중의 0.25 μg/ml의 정제 IP-10으로 코팅하고 이어서 PBS 중 5% 소 혈청 알부민으로 차단한다. 항체의 희석물 (예를 들어 IP-10-면역화 마우스 유래의 혈장의 희석물)을 각각의 웰에 첨가하고 37℃에서 1-2시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 PBS/트윈으로 세척하고 이어서 알칼리 포스파타제에 콘쥬게이션된 2차 시약 (예를 들어 인간 항체의 경우 염소-항-인간 IgG Fc-특이적 다중클론 시약)과 함께 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 세척 후 플레이트를 pNPP 기질 (1 mg/ml)로 발색시키고 405-650의 OD에서 분석한다. 바람직하게는 가장 높은 역치를 나타낸 마우스를 융합에 사용한다.

[0373] 상기에 기술되어 있는 ELISA 분석법을 또한 사용하여 IP-10 면역원과의 양성 반응성을 나타내는 하이브리도마에 대하여 스크리닝할 수 있다. IP-10에 높은 친화력으로 결합하는 하이브리도마를 서브클로닝하고 추가로 특성화한다. 부모 세포의 반응성을 유지하는 (ELISA에 의해) 각각의 하이브리도마 유래의 하나의 클론을 -140℃에서 보관되는 5-10개의 바이알의 세포 은행의 제조 및 항체 정제를 위하여 선발할 수 있다.

[0374] 항-IP-10 항체의 정제를 위해서는, 선발된 하이브리도마를 단일클론 항체 정제를 위하여 2리터 스피너 플라스크에서 배양할 수 있다. 상청액을 여과하고 농축시킨 후 단백질 A-세파로스 (Pharmacia, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 포함하는 친화성 크로마토그래피를 한다. 용출된 IgG는 겔 전기 영동 및 고성능 액체 크로마토그래피로 체크하여 순도를 보증할 수 있다. 완충제 용액은 PBS로 교환할 수 있으며 농도는 1.43의 소광 계수를 사용하여 OD_{280}으로 측정할 수 있다. 단일클론 항체는 분취하여 -80℃에서 보관할 수 있다.

[0375] 선발된 항-IP-10 단일클론 항체가 특유한 에피토프에 결합하는지를 결정하기 위해서는, 각각의 항체를 구매가능한 시약 (Pierce, 미국 일리노이주 록포드 소재)을 사용하여 비오티닐화할 수 있다. 미표지 단일클론 항체 및 비오티닐화 단일클론 항체를 사용한 경쟁 연구는 상기한 바와 같이 IP-10 코팅된 ELISA 플레이트를 사용하여 수행할 수 있다. 비오티닐화 mAb 결합은 스트렙-아비딘-알칼리 포스파타제 프로브로 탐지할 수 있다.

[0376] *정제된 항체의 이소타입의 결정을 위해서는, 이소타입 ELISA를, 특정 이소타입의 항체에 특이적인 시약을 사용하여 수행할 수 있다. 예를 들어 인간 단일클론 항체의 이소타입의 결정을 위해서는, 마이크로타이터 플레이트의 웰을 4℃에서 하룻밤 1 μg/ml의 항-인간 면역글로불린으로 코팅할 수 있다. 1% BSA를 이용한 차단 후 플레이트는 주위 온도에서 1 내지 2시간 동안 1 μg/ml 이하의 시험 단일클론 항체 또는 정제된 이소타입 대조와 반응시킨다. 이어서 웰은 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이성 알칼리 포스파타제-콘쥬게이션 프로브와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 발색시키고 상기한 바와 같이 분석한다.

[0377] 항-IP-10 인간 IgG는 또한 웨스턴 (Western) 블로팅으로 IP-10 항원과의 반응성에 대하여 시험될 수 있다. 간략하게는, IP-10을 제조하고 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 처한다. 전기 영동 후,

분리된 항원을 니트로셀룰로오스 막으로 옮기고, 10%의 소 태아 혈청으로 차단하고, 시험할 단일클론 항체로 프로빙한다. 인간 IgG 결합은 항-인간 IgG 알칼리 포스파타제를 사용하여 탐지하고 BCIP/NBT 기질 정제 (Sigma Chem. Co., 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)로 발색시킬 수 있다.

[0378] 면역콘쥬게이트

[0379] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 치료제 부분, 예를 들어 세포 독소, 약물 (예를 들어 면역 억제제) 또는 방사성 독소에 콘쥬게이션된 항-IP-10 항체 또는 그의 단편을 그 특징으로 한다. 그러한 콘쥬게이트는 본원에서 "면역콘쥬게이트"로 칭해진다. 하나 이상의 세포 독소를 포함하는 면역콘쥬게이트는 "면역 독소"로 칭해진다. 세포 독소 또는 세포 독성 약제는 세포에 유해한 (예를 들어 세포를 사멸시키는) 임의의 약제를 포함한다. 예에는 탁솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티듐 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노르루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀올, 및 퓨로마이신과 그의 유사체 또는 동족체가 포함된다. 치료제는 또한 예를 들어 대사 길항제 (antimetabolite) (예를 들어 메토트렉세이트, 6-메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예를 들어 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로토스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C와, 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예를 들어 다우노루비신 (이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어 닥티노마이신 (이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신 (AMC))와, 항세포 분열제 (anti-mitotic agent) (예를 들어 빈크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함한다.

[0380] 본 발명의 항체에 콘쥬게이션될 수 있는 치료용 세포 독소의 다른 바람직한 예에는 듀오카르마이신, 칼리케아미신, 마이탄신 및 아우리스타틴과 그의 유도체가 포함된다. 칼리케아미신 항체 콘쥬게이트의 예는 구매가능하다 (Mylotarg (상표명); Wyeth-Ayerst).

[0381] 세포 독소는 당업계에서 이용가능한 링커 기술을 사용하여 본 발명의 항체에 콘쥬게이션시킬 수 있다. 세포 독소를 항체에 콘쥬게이션시키기 위하여 사용된 링커 유형의 예에는 히드라존, 티오에테르, 에스테르, 디술피드 및 펩티드-함유 링커가 포함되지만 이로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어 리소좀 구획 내에서 낮은 pH에 의해 절단되기 쉽거나 프로테아제, 예를 들어 종양 조직에서 우선적으로 발현되는 프로테아제, 예를 들어 카텝신 (예를 들어 카텝신 B, C, D)에 의해 절단되기 쉬운 링커가 선택될 수 있다.

[0382] 세포 독소의 유형, 링커 및 치료제를 항체에 콘쥬게이션시키는 방법에 대한 추가의 논의에 대해서는 문헌[Saito, G. 등 (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215]; 문헌[Trail, P. A. 등 (2003) Cancer Immunol Immunother. 52: 328-337]; 문헌[Payne, G. (2003) Cancer Cell 3: 207-212]; 문헌[Allen, T. M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 750-763]; 문헌[Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) Curer. Opin. Investig. Drugs 3: 1089-1091]; 문헌[Senter, P. D. and Springer, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264]을 또한 참조한다.

[0383] 본 발명의 항체는 방사성 면역콘쥬게이트로도 칭해지는 세포 독성 방사성 약의 생성을 위하여 방사성 동위 원소에 또한 콘쥬게이션시킬 수 있다. 진단용 또는 치료용으로 사용하기 위하여 항체에 콘쥬게이션될 수 있는 방사성 동위 원소의 예에는 요오드^{131}, 인듐^{111}, 이트륨^{90} 및 루테튬^{177}이 포함되지만 이로 한정되는 것은 아니다. 방사성 면역콘쥬게이트의 제조 방법은 당업계에 확립되어 있다. Zevalin (상표명) (IDEC Pharmaceuticals) 및 Bexxar (상표명) (Corixa Pharmaceuticals)를 비롯한 방사성 면역콘쥬게이트의 예가 구매가능하며, 유사한 방법을 본 발명의 항체를 사용한 방사성 면역콘쥬게이트의 제조에 사용할 수 있다.

[0384] 본 발명의 항체 콘쥬게이트를 사용하여 주어진 생물학적 반응을 변형시킬 수 있으며, 약물 부분은 전통적인 화학 치료제로 한정되는 것으로 파악되어서는 아니된다. 예를 들어 약물 부분은 요망되는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 그러한 단백질은 예를 들어 효소적 활성 독소 또는 그의 활성 단편, 예를 들어 아브린 (abrin), 리신 (ricin) A, 슈도모나스 (pseudomonas) 내독소 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예를 들어 종양 괴사 인자 또는 인터페론-γ; 또는 생물학적 반응 변형제, 예를 들어 림포카인, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 과립구 대식 세포 콜로니 자극 인자 (granulocyte macrophage colony stimulating factor, "GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자 ("G-CSF"), 또는 기타 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0385] 그러한 치료제 부분을 항체에 콘쥬게이션시키는 기술은 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[Arnon 등,

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

[0386] 2특이성 분자

[0387] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 본 발명의 항-IP-10 항체 또는 그의 단편을 포함하는 2특이성 분자를 그 특징으로 한다. 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분은 다른 작용성 분자, 예를 들어 다른 펩티드 또는 단백질 (예를 들어 다른 항체 또는 수용체 리간드)로 유도체화되거나 그에 결합되어 2개 이상의 상이한 결합 부위 또는 표적 분자에 결합하는 2특이성 분자를 생성할 수 있다. 본 발명의 항체는 사실상 하나보다 많은 다른 작용성 분자로 유도체화되거나 그에 결합하여 2개보다 많은 상이한 결합 부위 및/또는 표적 분자에 결합하는 다특이성 (multispecific) 분자를 생성할 수도 있으며, 그러한 다특이성 분자도 본원에 사용되는 "2특이성 분자"라는 용어에 포함시키려고 한다. 본 발명의 2특이성 분자의 생성을 위하여, 본 발명의 항체는 2특이성 분자가 생성되도록 하나 이상의 다른 결합 분자, 예를 들어 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합 모방체에 기능적으로 결합시킬 수 있다 (예를 들어 화학적 커플링, 유전자 융합, 비공유 회합 (noncovalent association) 또는 다른 것에 의해).

[0388] 따라서, 본 발명은 IP-10에 대한 하나 이상의 제1 결합 특이성 및 제2 표적 에피토프에 대한 제2 결합 특이성을 포함하는 2특이성 분자를 포함한다. 본 발명의 특정 실시 형태에 있어서, 제2 표적 에피토프는 Fc 수용체, 예를 들어 인간 FcγRI (CD64) 또는 인간 Fcα 수용체 (CD89)이다. 따라서, 본 발명은 FcγR, FcαR 또는 FcεR 발현 이펙터 세포 (예를 들어 단핵구, 대식 세포 또는 다형핵 세포 (polymorphonuclear cell, PMN))와, IP-10을 발현하는 표적 세포 둘 모두에 결합할 수 있는 2특이성 분자를 포함한다. 이러한 2특이성 분자는 IP-10 발현 세포를 이펙터 세포로 표적화하고 Fc 수용체 매개된 이펙터 세포 활성, 예를 들어 IP-10 발현 세포의 식세포 작용 (phagocytosis), 항체 의존성 세포 매개 세포 독성 (ADCC), 사이토카인 방출, 또는 슈퍼옥시드 음이온의 생성을 유발한다.

[0389] 2특이성 분자가 다특이성인 본 발명의 실시 형태에 있어서, 이 분자는 항-Fc 결합 특이성 및 항-IP-10 결합 특이성 외에도, 제3 결합 특이성을 추가로 포함할 수 있다. 일 실시 형태에 있어서, 제3 결합 특이성 부분 (specificity)은 항-증강 인자 (enhancement factor, EF) 부분, 예를 들어 세포 독성 활성에 연루된 표면 단백질에 결합하고 그럼으로써 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 분자이다. "항-증강 인자 부분"은 주어진 분자, 예를 들어 항원 또는 수용체에 결합하며, 그럼으로써 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 대한 결합 결정부의 효과를 증강시키는 항체, 작용성 항체 단편 또는 리간드일 수 있다. "항-증강 인자 부분"은 Fc 수용체 또는 표적 세포 항원에 결합할 수 있다. 대안적으로는 항-증강 인자 부분은 제1 및 제2 결합 특이성 부분이 결합하는 실체와는 다른 실체에 결합할 수 있다. 예를 들어 항-증강 인자 부분은 (예를 들어 CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 또는 표적 세포에 대한 면역 반응을 증가시키는 기타 면역 세포를 통하여) 세포 독성 T-세포에 결합할 수 있다.

[0390] 일 실시 형태에 있어서 본 발명의 2특이성 분자는 결합 특이성 부분로서 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, 또는 단일쇄 Fv를 비롯하여 하나 이상의 항체 또는 그의 항체 단편을 포함한다. 본 항체는 또한 Ladner 등의 미국 특허 제4,946,778호에 개시되어 있는 바와 같이 경쇄 또는 중쇄 이량체, 또는 그의 임의의 최소 단편, 예를 들어 Fv 또는 단일쇄 제작물일 수도 있는데, 상기 특허의 내용은 참고로 명백하게 포함된다.

[0391] 일 실시 형태에 있어서, Fcγ 수용체에 대한 결합 특이성 부분은 단일클론 항체에 의해 제공되는데, 상기 단일클론 항체의 결합은 인간 면역글로불린 G (IgG)에 의해 차단되지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "IgG 수용체"라는 용어는 1번 염색체 상에 위치하는 8개의 γ-사슬 유전자 중 임의의 것을 말한다. 상기 유전자는 총 12개의 막투과성 또는 용해성 수용체 이소폼을 코딩하며 상기 이소폼은 하기의 3가지의 Fcγ 수용체류로 분류된다: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), 및 FcγRIII (CD16). 바람직한 일 실시 형태에 있어서, Fcγ 수용체는 높은 친화도의 인간 FcγRI이다. 인간 FcγRI은 72 kDa의 분자이며, 이는 IgG 단량체에 대하여 높은 친화도

(10^8 - 10^9 M^{-1})를 나타낸다.

[0392] 소정의 바람직한 항-Fcγ 단일클론 항체의 제조 및 특성화는 Fanger 등의 PCT 공보 제WO 88/00052호 및 미국 특허 제4,954,617호에 개시되어 있는데, 상기 공보 및 특허의 교시 내용은 본원에 참고로 전적으로 포함된다. 이러한 항체는 수용체의 Fcγ 결합 부위와는 다른 부위에서 FcγRI, FcγRII 또는 FcγRIII의 에피토프에 결합하며, 따라서 그의 결합은 생리학적인 수준의 IgG에 의해서는 실질적으로 차단되지 않는다. 본 발명에서 유용한 특이적 항-FcγRI 항체로는 mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 및 mAb 197이 있다. mAb 32를 생산하는 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection), ATCC 등록 번호 HB9469로 입수가능하다. 다른 실시 형태에 있어서 항-Fcγ 수용체 항체는 인간화된 형태의 단일클론 항체 22 (H22)이다. H22 항체의 제조 및 특성화는 문헌[Graziano, R. F. 등 (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002] 및 PCT 공보 제WO 94/10332호에 기술되어 있다. H22 항체 생산 세포주는 명칭 HA022CL1 하에 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션에 기탁되었으며 등록 번호는 CRL 11177이다.

[0393] 또다른 바람직한 실시 형태에 있어서, Fc 수용체에 대한 결합 특이성은 인간 IgA 수용체, 예를 들어 Fc-알파 수용체 (FcαRI (CD89))에 결합하는 항체에 의해 제공되는데, 상기 항체의 결합은 바람직하게는 인간 면역글로불린 A (IgA)에 의해 차단되지 않는다. "IgA 수용체"라는 용어는 19번 염색체 상에 존재하는 하나의 α 유전자 (FcαRI)의 유전자 산물을 포함하려는 것이다. 상기 유전자는 55 내지 110 kDa의 여러 대안적으로 스플라이싱된 막투과성 이소폼을 코딩하는 것으로 공지되어 있다. FcαRI (CD89)은 단핵구/대식 세포, 호산성 및 호중성 과립구 상에서는 구성적으로 (constitutively) 발현되지만 이펙터 외 세포 (non-effector cell) 집단 상에서는 그러하지 아니하다. FcαRI은 IgA1 및 IgA2 둘 모두에 대하여 중간 정도의 친화도 (대략 5 x 10^7 M^{-1})를 가지는데, 상기는 사이토카인, 예를 들어 G-CSF 또는 GM-CSF에의 노출시 증가된다 (문헌[Morton, H. C. 등 (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440]). A3, A59, A62 및 A77로 동정되었으며 IgA 리간드 결합 도메인 바깥에서 FcαRI에 결합하는 4종의 FcαRI-특이성 단일클론 항체가 개시되었다 (문헌[Monteiro, R. C. 등 (1992) J. Immunol. 148: 1764]).

[0394] FcαRI 및 FcγRI은 본 발명의 2특이성 분자에서 사용하기 위한 바람직한 트리거 (trigger) 수용체인데, 이는 이들이 (1) 주로 면역 이펙터 세포, 예를 들어 단핵구, PMN, 대식 세포 및 수지상 세포 상에서 발현되며; (2) 고수준으로 발현되며 (예를 들어 5,000-100,000/세포); (3) 세포 독성 활성 (예를 들어 ADCC, 식세포 작용)의 매개체이며; (4) 자신을 표적으로 하는 자가-항원을 비롯한 항원의 항원 제시 증강을 매개하기 때문이다.

[0395] 인간 단일클론 항체가 바람직하지만, 본 발명의 2특이성 분자에 이용될 수 있는 다른 항체로는 쥣과 항체, 키메라 항체 및 인간화 단일클론 항체가 있다.

[0396] 본 발명의 2특이성 분자는, 당업계에 공지된 방법을 사용하여 구성성 결합 특이성 부분, 예를 들어 항-FcR 및 항-IP-10 결합 특이성 부분을 콘쥬게이션함으로써 제조할 수 있다. 예를 들어 2특이성 분자의 각각의 결합 특이성 부분은 개별적으로 생성되고 이어서 서로에게 콘쥬게이션될 수 있다. 결합 특이성 부분이 단백질 또는 펩티드일 경우, 다양한 커플링제 또는 가교 결합제가 공유 결합에 의한 콘쥬게이션에 사용될 수 있다. 가교 결합제의 예에는 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)가 포함된다 (예를 들어 문헌[Karpovsky 등 (1984) J. Exp. Med. 160: 1686]; 문헌[Liu, MA 등 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648] 참조). 다른 방법에는 문헌[Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132]; 문헌[Brennan 등 (1985) Science 229:81-83], 및 문헌[Glennie 등 (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375]에 기술되어 있는 것이 포함된다. 바람직한 콘쥬게이팅제로는 SATA 및 술포-SMCC가 있는데, 이 둘 모두는 Pierce Chemical Co. (미국 일리노이주 록포드 소재)로부터 입수가능하다.

[0397] 결합 특이성 부분이 항체일 경우, 이들은 2개의 중쇄의 C-말단 경첩 영역의 술프히드릴 결합을 통하여 콘쥬게이션될 수 있다. 특히 바람직한 실시 형태에 있어서 경첩 영역은 홀수의 갯수의 술프히드릴 잔기, 바람직하게는 하나의 술프히드릴 잔기를 포함하도록 변경된 후 콘쥬게이션된다.

[0398] 대안적으로는, 결합 특이성 부분 둘 모두는 동일한 벡터에서 코딩되고 동일한 숙주 세포에서 발현 및 어셈블링될 수 있다. 이 방법은 2특이성 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x $F(ab')_2$ 또는 리간드 x Fab 융합 단백질일 경우 특히 유용하다. 본 발명의 2특이성 분자는 하나의 단일쇄 항체 및 결합 결정부를 포함하는 단일쇄 분자, 또는 2개의 결합 결정부를 포함하는 2특이성 단일쇄 분자일 수 있다. 2특이성 분자는 2개 이상의 단일쇄

분자를 포함할 수도 있다. 2특이성 분자의 제조 방법이 예를 들어 미국 특허 제5,260,203호; 미국 특허 제5,455,030호; 미국 특허 제4,881,175호; 미국 특허 제5,132,405호; 미국 특허 제5,091,513호; 미국 특허 제5,476,786호; 미국 특허 제5,013,653호; 미국 특허 제5,258,498호; 및 미국 특허 제5,482,858호에 개시되어 있다.

[0399] 2특이성 분자의 그의 특정 표적에의 결합은 예를 들어 효소-결합된 면역 흡착 분석법 (enzyme-linkedimmunosorbent assay, ELISA), 방사 면역 분석법 (rdioimmunoassay, RIA), FACS 분석법, 생물 분석법 (bioassay) (예를 들어 성장 억제), 또는 웨스턴 블롯 분석법으로 확인될 수 있다. 상기 분석법 각각에서는 일반적으로 목적 복합체에 특이적인 표지 시약 (예를 들어 항체)을 이용함으로써 특정의 목적으로 하는 단백질-항체 복합체의 존재가 검출된다. 예를 들어 FcR-항체 복합체는 예를 들어 효소 결합된 항체 또는 항체-FcR 복합체를 인식하여 그에 특이적으로 결합하는 항체 단편을 사용하여 검출할 수 있다. 대안적으로는 이 복합체는 임의의 다양한 다른 면역 분석법을 사용하여 검출할 수 있다. 예를 들어 항체는 방사성 표지되어 방사 면역 분석 (RIA)에서 사용될 수 있다 (예를 들어 본원에 참고로 포함된 문헌[Weintraub, B., Principlesof Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986] 참조). 방사성 동위원소는 γ 카운터 또는 신틸레이션 카운터의 사용과 같은 수단에 의해 또는 자가 방사법 (autoradiography)에 의해 검출될 수 있다.

[0400] 약학 조성물

[0401] 다른 태양에 있어서 본 발명은 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화되는, 본 발명의 단일클론 항체들, 또는 그의 항원 결합 부분(들) 중 하나 또는 그 조합을 포함하는 조성물, 예를 들어 약학 조성물을 제공한다. 그러한 조성물은 (예를 들어 2종 이상의 상이한) 본 발명의 항체들, 또는 면역콘쥬게이트 또는 2특이성 분자들 중 하나 또는 그 조합을 함유할 수도 있다. 예를 들어 본 발명의 약학 조성물은 표적 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하거나 상보성 활성을 갖는 항체들 (또는 면역콘쥬게이트 또는 2특이성 물질(bispecific))의 조합을 함유할 수 있다.

[0402] 본 발명의 약학 조성물은 또한 병용 요법에서, 즉, 다른 약제와 조합되어 투여될 수 있다. 예를 들어 병용 요법은 1종 이상의 다른 항염증제 또는 면역 억제제와 조합된 본 발명의 항-IP-10 항체를 포함할 수 있다. 병용 요법에서 사용될 수 있는 치료제의 예가 하기의 본 발명의 항체의 용도에 대한 절에서 더욱 더 상세하게 기술되어 있다.

[0403] 본원에 사용되는 바와 같이 "약학적으로 허용가능한 담체"는 생리학적으로 상용성인 임의의, 그리고 모든 용매, 분산 매체, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장성의 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는 담체는 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 비경구 투여, 척추 투여 또는 표피 투여 (예를 들어 주사 또는 주입에 의한 것임)에 적합하다. 투여 경로에 따라 활성 화합물, 즉, 항체, 면역콘쥬게이트 또는 2특이성 분자는 산 및 이 화합물을 불활성화시킬 수도 있는 기타의 천연적인 조건으로부터 화합물을 보호하기 위한 재료로 코팅될 수도 있다.

[0404] 본 발명의 약학 조성물은 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수도 있다. "약학적으로 허용가능한 염"은 부모 화합물의 요망되는 생물학적 활성은 유지하지만 요망되지 않는 모든 독물학적 효과는 부여하지 않는 염을 말한다 (예를 들어 문헌[Berge, S. M., 등 (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19] 참조). 그러한 염의 예는 산 부가염 및 염기 부가염을 포함한다.

[0405] 산부가염은 비독성 무기 산, 예를 들어 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등과, 비독성 유기산, 예를 들어 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등으로부터 유도되는 것을 포함한다. 염기 부가염은 알칼리 토금속, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과, 비독성 유기 아민, 예를 들어 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유도되는 것을 포함한다.

[0406] 본 발명의 약학 조성물은 또한 약학적으로 허용가능한 산화 방지제를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 산화 방지제의 예는 (1) 수용성 산화 방지제, 예를 들어 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 중황산나트륨, 메타중황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 유용성 산화 방지제, 예를 들어 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과; (3) 금속 킬레이팅제, 예를 들어 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 포함한다.

[0407] 본 발명의 약학 조성물에 이용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등)과, 그의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어 올리브유, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트를 포함한다. 적당한 유동성은 예를 들어 코팅재, 예를 들어 레시틴의 사용에 의해, 분산물의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0408] 이러한 조성물은 또한 아쥬반트, 예를 들어 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 포함할 수 있다. 미생물의 존재의 방지는 상기의 살균 절차에 의해, 그리고 여러 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 함유에 의해 보증될 수 있다. 등장제, 예를 들어 당, 염화나트륨 등을 조성물 내로 함유시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 제약 형태의 흡수 연장은 흡수를 지연시키는 약제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 함유에 의해 초래될 수 있다.

[0409] 약학적으로 허용가능한 담체는 주사가능한 살균 용액 또는 분산물의 즉석 제조를 위한 살균 수성 용액 또는 분산물 및 살균 분말을 포함한다. 약학적 활성 물질을 위한 그러한 매체 및 약제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 통상적인 매체 또는 약제가 활성 화합물과 불상용성인 경우를 제외하고는, 본 발명의 약학 조성물에서의 그의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물이 본 조성물 내로 또한 혼입될 수 있다.

[0410] 치료 조성물은 전형적으로 제조 및 보관 조건 하에서 안정하고 살균성이어야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 리포좀, 또는 높은 약물 농도에 적합한 기타 규정된 구조체로 제형화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등)과, 그의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매체일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어 코팅, 예를 들어 레시틴의 사용에 의해, 분산물의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 다수의 경우에 있어서, 등장제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예를 들어 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 조성물 중에 함유시키는 것이 바람직하다. 주사가능한 조성물의 흡수 연장은 조성물 중에 흡수를 지연시키는 약제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 함유시킴으로써 초래될 수 있다.

[0411] 주사가능한 살균 용액은 활성 화합물을 요구되는 양으로, 상기에 열거된 성분들 중 하나 또는 그 조합을 포함하는 적절한 용매 중에 혼입하고, 요구될 경우 그 후 살균 미세 여과로 제조할 수 있다. 일반적으로 분산물은 기본적인 분산 매체 및 상기에 열거된 것으로부터의 요구되는 기타 성분을 포함하는 살균 비히클 내로 활성 화합물을 혼입함으로써 제조된다. 주사가능한 살균 용액의 제조용의 살균 분말의 경우에는, 바람직한 제조 방법으로는 활성 성분의 분말 + 이전에 살균 여과된 그의 용액으로부터의 임의의 추가의 요망되는 성분을 생성하는 진공 건조법 및 동결 건조법 (냉동 건조법)이 있다.

[0412] 담체 물질과 조합되어 단일 투여 형태를 생성하는 활성 성분의 양은 치료할 대상 및 특정 투여 방식에 따라 달라진다. 담체 물질과 조합되어 단일 투여 형태를 생성할 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양이다. 일반적으로 100%를 기준으로, 이 양은 약학적으로 허용가능한 담체와 조합된 활성 성분 약 0.01% 내지 약 99%, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 1% 내지 약 30%의 범위이다.

[0413] 투여 섭생은 최적의 요망되는 반응 (예를 들어 치료적 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어 단일 알약 (bolus)이 투여될 수 있거나, 여러 개로 나뉘어진 용량이 시간에 걸쳐 투여될 수 있거나 이 용량은 치료적 상황의 위급성에 의해 지시되는 바와 같이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 투여의 용이성 및 투여량의 일관성을 위하여 단위 투여 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 바와 같이 단위 투여 형태는 치료할 대상용의 단일한 투여량으로서 적합화된 물리적으로 별개인 단위를 말하며, 각각의 단위는 요구되는 약학 담체와 결부되어 요망되는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 포함한다. 본 발명의 단위 투여 형태에 대한 상세 사항은 (a) 활성 화합물의 특유한 특징 및 성취할 특정 치료 효과와, (b) 그러한 활성 화합물을 개체에서의 민감성 치료용으로 혼합하는 분야에 고유한 제한 사항에 의해, 그리고 이것에 직접적으로 의존하여 지시된다.

[0414] 항체의 투여에 있어서, 투여량은 숙주의 체중 1 kg 당 0.0001 내지 100 mg, 더 일반적으로는 0.01 내지 5 mg이다. 예를 들어 투여량은 체중 1 kg 당 0.3 mg, 1 mg, 3 mg, 5 mg 또는 10mg일 수 있거나 1-10 mg 범위일 수 있다. 예시적인 치료 섭생법은 주 1회, 매 2주에 1회, 매 3주에 1회, 매 4주에 1회, 월 1회, 매 3개월에 1회 또는 매 3개월 내지 6개월에 1회 투여를 수반한다. 본 발명의 항-IP-10 항체의 바람직한 투여 섭생법은 정맥내 투여를 통한 체중 1 kg 당 1 mg 또는 3 mg을 포함하며, 항체는 하기의 투여 일정 중 하나를 사용하여 주어진다: (i) 매 4주, 6회 투여, 이어서 매 3개월 투여; (ii) 매 3주에 투여; (iii) 매 3주에 체중 1 kg 당 3 mg을 1회

투여, 이어서 체중 1 kg 당 1 mg 투여.

[0415] 몇몇 방법에 있어서, 결합 특이성이 상이한 2종 이상의 단일클론 항체를 동시에 투여하는데, 이 경우 투여되는 각각의 항체의 투여량은 지시된 범위 이내이다. 항체는 일반적으로 다회의 시기에 투여된다. 단일 투여 사이의 간격은 예를 들어 1주, 1개월, 매 3개월 또는 1년일 수 있다. 간격은 또한 환자에 있어서 표적 항원에 대한 항체의 혈중 수준의 측정에 의해 지시되는 바와 같이 불규칙적일 수 있다. 몇몇 방법에 있어서 투여량은 약 1-1000 μg/ml, 그리고 몇몇 방법에서는 약 25-300 μg/ml의 혈장 항체 농도를 성취하도록 조정된다.

[0416] 대안적으로는 항체는 지속 방출형 제형으로 투여될 수 있는데, 이 경우 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여량 및 빈도는 환자에서의 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로 인간 항체가 가장 긴 반감기를 나타내며, 그 다음이 인간화 항체, 키메라 항체, 그리고 인간외 항체이다. 투여 빈도 및 투여량은 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적 용도에 있어서는, 비교적 낮은 투여량이 장기간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여된다. 몇몇 환자는 남은 여생 동안 치료를 계속하여 받는다. 치료적 용도에 있어서는, 질환의 진행이 감소 또는 종료될 때까지, 바람직하게는 환자가 질환의 증상의 부분적 또는 전적인 개선을 나타낼 때까지 비교적 짧은 간격으로 비교적 높은 투여량이 때로 요구된다. 그 후, 환자에게 예방적 섭생법이 시행될 수 있다.

[0417] 본 발명의 약학 조성물 중 활성 성분의 실제 투여량 수준은, 환자에게 유독하게 됨이 없이, 특정 환자에 있어서의 요망되는 치료적 반응, 조성물, 및 투여 방식을 성취하기에 유효한 활성 성분의 양이 얻어지도록 달라질 수 있다. 선택된 투여량 수준은 이용되는 본 발명의 특정 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 이용되는 특정 화합물의 배설 속도, 치료 지속 기간, 이용되는 특정 조성물과 조합되어 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료할 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 종합적인 건강 및 이전의 병력을 비롯한 다양한 약물 동력학적 인자와, 의료 분야에서 잘 알려져 있는 유사 인자에 따라 달라진다.

[0418] 본 발명의 항-IP-10 항체의 "치료적 유효 투여량"은 바람직하게는 질환 증상의 중증도를 감소시키거나, 질환의 무증상 기간의 빈도 및 지속 기간을 증가시키거나, 질환의 고통으로 인한 손상 또는 장애를 예방한다. 류마티스 관절염 (RA)의 경우, 치료적 유효 용량은 RA와 결부된 신체 증상, 예를 들어 통증, 피로, 조조 강직 (1시간보다 많이 계속됨), 미만성 근육통, 식욕 상실, 병약, 열감이 있는 관절통, 종창, 압통, 및 비활동 후의 관절 경직의 추가의 악화를 예방한다. 치료적 유효 용량은 바람직하게는 RA의 개시도 예방 또는 지연시키는데, 이는 예를 들어 이 질환의 초기 또는 예비 징후가 존재할 경우 요망될 수 있다. 마찬가지로 이것은 RA와 결부된 만성적인 진행을 지연시키는 것을 포함한다. RA의 진단에 이용되는 실험실 시험은 화학적 시험 (IP-10 수준의 측정을 포함함), 혈액학적 시험, 혈청학적 시험 및 방사선학적 시험을 포함한다. 따라서, 전술한 것 중 임의의 것을 모니터링하는 임의의 임상 또는 생화학적 분석을 사용하여 특정 치료가 RA의 치료에 있어서 치료적으로 유효한 용량인지를 결정할 수 있다. 당업계의 숙련자라면 대상의 크기, 대상의 증상의 중증도, 및 특정의 선택된 투여 경로 또는 조성물과 같은 인자에 기초하여 그러한 양을 결정할 수 있다.

[0419] *본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통하여 투여할 수 있다. 숙련자에 의해 인식되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 요망되는 결과에 따라 달라진다. 본 발명의 항체에 있어서 바람직한 투여 경로는 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 피하, 척수 또는 기타 비경구 경로의 투여, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 투여를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "비경구 투여"라는 용어는 일반적으로 주사에 의한, 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 한정됨이 없이, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 관절낭내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관 (transtracheal), 피하, 표피하, 관절강내, 피막하, 지주막하, 척수강내, 경막외강 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.

[0420] 대안적으로는, 본 발명의 항체는 비경구 (non-parenteral) 경로, 예를 들어 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어 비강내 투여 경로, 경구 투여 경로, 질 투여 경로, 직장 투여 경로, 설하 투여 경로 또는 국소 투여 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0421] 활성 화합물은 이식체, 경피 패치, 및 미세캡슐화 전달 시스템을 비롯한, 방출 제어형 제형과 같이, 이 화합물이 급속 방출되는 것을 방지하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 생분해성 생체 적합성 중합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리언히드라이드 (polyanhydride), 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리아세트산이 사용될 수 있다. 그러한 제형의 다수의 제조 방법은 특허되거나 일반적으로 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다. 예를 들어 문헌[Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson,

ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978] 참조.

[0422] 치료 조성물은 당업계에 공지된 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어 바람직한 실시 형태에 있어서 본 발명의 치료 조성물은 무침(needleless) 피하 주사 장치, 예를 들어 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 장치로 투여할 수 있다. 잘 알려진 이식체 및 본 발명에 유용한 모듈의 예는, 제어된 속도로 의약을 분배하기 위한 이식가능한 마이크로-주입 펌프가 개시되어 있는 미국 특허 제4,487,603호, 피부를 통하여 의약을 투여하기 위한 치료 장치가 개시되어 있는 미국 특허 제4,486,194호, 정확한 주입 속도로 의약을 전달하기 위한 의약 주입 펌프가 개시되어 있는 미국 특허 제4,447,233호, 연속적인 약물 전달을 위한 가변 유동식의 이식가능한 주입 기구가 개시되어 있는 미국 특허 제4,447,224호, 다중 챔버 구획이 있는 삼투성 약물 전달 시스템이 개시되어 있는 미국 특허 제4,439,196호, 및 삼투성 약물 전달 시스템이 개시되어 있는 미국 특허 제4,475,196호를 포함한다. 상기 특허는 본원에 참고로 포함되어 있다. 다수의 다른 그러한 이식체, 전달 시스템 및 모듈이 당업계의 숙련자에게 공지되어 있다.

[0423] 소정 실시 형태에 있어서 본 발명의 인간 단일클론 항체는 생체 내에서의 적당한 분배를 보증하도록 제형화될 수 있다. 예를 들어 혈액-뇌 장벽 (blood-brain barrier, BBB)은 다수의 고도로 친수성인 화합물을 배제한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 가로지르는 것을 보증하기 위하여 (요망될 경우), 이들은 예를 들어 리포좀 중에 제형화될 수 있다. 리포좀의 제조 방법에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 제4,522,811호; 동 제5,374,548호; 및 동 제5,399,331호를 참조한다. 리포좀은 특정 세포 또는 기관 내로 선택적으로 운송되며 따라서 표적화된 약물의 전달을 증강시키는 하나 이상의 부분을 포함할 수도 있다 (예를 들어 문헌[V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685] 참조). 예시적인 표적화 부분은 폴레이트 또는 비오틴 (예를 들어 Low 등의 미국 특허 제5,416,016호 참조); 만노시드 (문헌[Umezawa 등, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038]); 항체 (문헌[P. G. Bloeman 등 (1995) FEBS Lett. 357: 140]; 문헌[M. Owais 등 (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180] 참조); 계면활성 단백질 A 수용체 (문헌[Briscoe 등 (1995) Am.J. Physio. 1233: 134]); p120 (문헌[Schreier 등 (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090])을 포함하며; 문헌[K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123]; 문헌[J. J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273]도 참조한다.

[0424] 본 발명의 용도 및 방법

[0425] 본 발명의 항체 (및 면역콘쥬게이트와 2특이성 분자)는 시험관 내 및 생체 내 진단 및 치료 용도를 가진다. 예를 들어 이 분자들은 예를 들어 시험관 내에서 또는 엑스 비보에서 (ex vivo) 배양물 중 세포에서, 또는 생체 내에서 대상의 세포에서 투여되어 다양한 질병을 치료, 예방 또는 진단할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "대상"이라는 용어는 인간 및 인간외 동물을 포함하려는 것이다. 인간외 동물은 모든 척추 동물, 예를 들어 포유류 및 포유류 외 동물, 예를 들어 인간외 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 본 방법은 IP-10 발현 이상과 결부된 질병을 갖는 인간 환자의 치료에 특히 적합하다. IP-10에 대한 항체가 다른 약제와 함께 투여될 경우, 이 둘은 순서대로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0426] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항체 (및 면역콘쥬게이트와 2특이성 분자)는 IP-10의 수준, 또는 IP-10을 포함하는 세포의 수준의 탐지를 위하여 사용될 수 있다. 이는 예를 들어 샘플 (예를 들어 시험관 내 샘플) 및 대조 샘플을, 항체와 IP-10 사이에 복합체가 형성되도록 하는 조건 하에서 항-IP-10 항체와 접촉시킴으로써 성취될 수 있다. 항체와 IP-10 사이에 형성되는 모든 복합체가 샘플과 대조에서 탐지 및 비교된다. 예를 들어 당업계에 잘 알려진 표준 탐지 방법, 예를 들어 ELISA와 유세포 분석을 본 발명의 조성물을 사용하여 수행할 수 있다.

[0427] 따라서, 일 태양에 있어서, 본 발명은 샘플 및 대조 샘플을, 항체 또는 그의 일부와 IP-10 사이에 복합체가 형성되도록 하는 조건 하에서, IP-10에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분과 접촉시키는 단계를 포함하는, 샘플 중의 IP-10 (예를 들어 인간 IP-10 항원)의 존재를 탐지하는 방법 또는 IP-10의 양을 측정하는 방법을 또한 제공한다. 이어서 복합체의 형성을 탐지하는데, 여기서, 대조 샘플과 비교되는 샘플 사이의 복합체 형성에 있어서의 차이는 샘플 중에 IP-10이 존재함을 나타내는 것이다.

[0428] 또한 본 발명의 범주 이내인 것은 본 발명의 조성물 (예를 들어 항체, 인간항체, 면역콘쥬게이트 및 2특이성 분자)과 사용 설명서를 포함하는 키트이다. 본 키트는 1종 이상의 추가의 시약, 또는 1종 이상의 추가의 본 발명의 항체 (예를 들어 제1 항체와는 다른 표적 항원 상의 에피토프에 결합하는 상보성 활성을 갖는 항체)를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 전형적으로 키트의 내용물의 사용 의도를 나타내는 라벨을 포함한다. 라벨이라는

용어는 키트 상에 또는 키트와 함께 공급되거나, 그렇지 않을 경우 키트에 동반되는 임의의 기입 물질 또는 기록 물질을 포함한다.

[0429] IP-10은 활성화된 T 세포 및 NK 세포에 대하여 화학 유인 물질 효과를 가지며 그러한 세포를 염증성 및 자가 면역성 반응 부위로 모집하는 것으로 공지되어 있다. 따라서 본 발명의 항-IP-10 항체 (및 면역콘쥬게이트와 2특이성 분자)를 사용하여 다양한 임상 징후의, 활성화된 T 세포 및/또는 NK 세포에 의해 매개되는 염증성 또는 자가 면역성 반응을 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명은 활성화된 T 세포 또는 NK 세포를 본 발명의 항체 또는 그의 항원 결합 부분 (또는 본 발명의 면역콘쥬게이트 또는 2특이성 분자)과 접촉시켜 염증성 또는 자가 면역성 반응이 억제되도록 하는 단계를 포함하는, 활성화된 T 세포 및/또는 NK 세포에 의해 매개되는 염증성 또는 자가 면역성 반응의 억제 방법을 제공한다. 본 발명의 항체가 사용될 수 있는 염증성 또는 자가 면역성 병의 구체예는 하기를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다:

[0430] A. 다발성 경화증 및 기타 탈수초성 질환

[0431] IP-10 mRNA의 발현이 다발성 경화증의 마우스 모델인 쥣과의 실험용 알러지성 뇌척수염 (experimental allergic encephalomyelitis, EAE)에서 증가되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Godiska, R. 등 (1995) J. Neuroimmunol. 58: 167-176). 또한, IP-10의 수준 증가가 급성 탈수초 이벤트 동안 MS 환자의 뇌척수액에서 발견되었다 (문헌[Sorensen, T. L. 등 (1999) J. Clin. Invest. 103: 807-815]; 문헌[Franciotta 등 (2001) J. Neuroimmunol. 115 :192-198]). IP-10은 또한 MS 병변에서 성상 세포에 의해서 발현이 되지만 영향을 받지 않은 백질에서는 발현되지 않으며 (문헌[Balashov, K. E. 등 (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6873-6878]) MS 반점 내에서 대식 세포에 의해, 그리고 주변 실질 (parenchyma)에서 반응성 성상 세포에 의해 발현되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Simpson, J. E. 등 (2000) Neuropathol. Appl. Neurobiol. 26: 133-142]). PCT 공보 제WO 02/15932호에는 MS의 마우스 간염 바이러스 (MHV) 모델에서 항-IP-10 항체의 투여에 의해 T 림프구 및 대식 세포 침입이 감소되며, 탈수초의 진행이 억제되고, 재수초가 증가되며 신경학적 기능이 개선됨이 개시되어 있다 (예를 들어 문헌[Liu, M.T. 등 (2001) J. Immunol. 167: 4091-4097]을 또한 참조). 쥣과 항-IP-10 항체의 투여는 쥣과 EAE에 있어서 임상 및 조직학적 질환의 이환율과 중증도를 감소시키는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Fife, B.T. 등 (2001) J. Immunol. 166: 7617-7624]).

[0432] 전술한 사항에 비추어 보면, 본 발명의 항-IP-10 항체는 항체를 치료가 필요한 대상에게 투여함으로써 MS 및 기타 탈수초 질환의 치료에 사용할 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 항-MS제, 예를 들어 인터페론 베타-1a (예를 들어 Avonex (등록상표), Rebif (등록상표)), 인터페론 베타-1b (예를 들어 Betaseron (등록상표)), 글라티라메르 아세테이트 (예를 들어 Copaxone (등록상표)) 및/또는 미톡산트론 (예를 들어 Novantrone (등록상표))과 조합되어 사용될 수 있다.

[0433] B. 류마티스 관절염

[0434] IP-10의 수준은 류마티스 관절염 (RA) 환자의 활막액, 활막 조직 및 혈청에서 유의하게 상승되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Patel, D. D. 등 (2001) Clin. Immunol. 98:39-45]; 문헌[Hanaoka, R. 등 (2003) Arthritis Res. and Therapy 5: R74-R81]). IP-10의 수용체인 CXCR3은 RA 환자 유래의 활막 조직 내에서 비만 세포 (mast cell) 상에서 우선적으로 발현되는 것으로 밝혀졌다 (Ruschpler, P. 등 (2003) Arthritis Res. Ther. 5: R241-R252]). 아쥬반트 유도된 관절염 (adjuvant induced arthritis, AA)의 쥐 모델에 있어서, 자기 IP-10에 대한 검출가능한 자가항체 반응이 보고되었다 (문헌[Salomon, I. 등 (2002) J. Immunol. 169: 2685-2693]). 또한, IP-10-코딩 DNA 백신의 투여에 의해 쥐 내에서 중화 항-IP-10 항체의 생성이 증대되었으며, 상기 IP-10 자가항체는 나이브 (naive) 쥐에게 AA에 대한 내성을 차용에 의한 방법으로 (adoptively) 전할 수 있다 (문헌[Salomon, I. 등, 상기 참조]).

[0435] 전술한 사항에 비추어 보면, 본 발명의 항-IP-10 항체는 항체를 치료가 필요한 대상에게 투여함으로써 류마티스 관절염의 치료에 사용할 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 항-RA제, 예를 들어 비스테로이드계 항염증약 (non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID), 진통제, 코르티코스테로이드 (예를 들어 프레드니손, 히드로코르티손), TNF-억제제 (아딜리무마브 (Humira (등록상표)), 에타네르셉트 (Enbrel (등록상표)) 및 인플릭시마브 (Remicade (등록상표))를 포함함), 질환 변형 항류마티스약 (메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 시클로스포린, 아우라노핀, 아자티오프린, 골드 소듐티오말레이트, 히드록시클로로퀸 술페이트, 레플루노미드, 미노시클린, 페니실아민 및 술파살라진을 포함함), 섬유 근육통용 의약, 골다공증용 의약 및 통풍용 의약과 조합되어 사용될 수 있다.

[0436] C. 염증성 장질환

[0437] IP-10 발현은 궤양성 대장염 환자로부터 취해진 결장 생검체의 점막 고유층을 침윤하는 세포에서 유의하게 증강되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Uguccioni, M. 등 (1999) Am. J. Pathol. 155: 331-336]). 또한, IP-10의 중화는 급성 대장염에 있어서 상피 궤양으로부터 마우스를 방어하고 선화 세포의 생존성을 증강시키는 것으로 밝혀졌다 (Sasaki, S. 등 (2002) Eur. J. Immunol. 32: 3197-3205]). 또한, 인간에서의 크론병과 유사한 대장염이 발병된 IL-10 -/- 마우스에 있어서, 항-IP-10 항체를 이용한 치료에 의해 염증의 스코어링 (scoring)이 개선되었다 (Singh, U.P. 등 (2003) J. Immunol. 171: 1401-1406).

[0438] 전술한 사항에 비추어보면, 본 발명의 항-IP-10 항체는 항체를 치료가 필요한 대상에게 투여함으로써 궤양성 대장염 및 크론병을 비롯한 염증성 장질환 (IBD)의 치료에서 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 항-IBD제, 예를 들어 메살라민을 포함하는 약물 (술파살라진과, 5-아미노살리실산 (5-ASA)을 포함하는 기타 약제, 예를 들어 올살라진 및 발살라지드), 비스테로이드계 항염증약 (NAID), 진통제, 코르티코스테로이드 (예를 들어 프레디니손, 히드로코르티손), TNS-억제제 (아딜리무마브 (Humira (등록상표)), 에타네르셉트 (Enbrel (등록상표)) 및 인플릭시마브 (Remicade (등록상표))를 포함함), 면역 억제제 (예를 들어 6-메르캅토퓨린, 아자티오프린 및 시클로스포린 A) 및 항생제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0439] D. 전신성 홍반성 루푸스

[0440] 혈청 IP-10 수준은 전신성 홍반성 루푸스 (SLE) 환자에서 두드러지게 증가함이 밝혀졌으며 이 수준은 질환의 활성과 상관 관계가 있음이 밝혀졌다 (예를 들어 문헌[Naurmi, S. 등 (2000) Cytokine 12: 1561-1565] 참조). 따라서, 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항-IP-10 항체는 치료를 필요로 하는 대상에게 본 항체를 투여함으로써 SLE의 치료에 사용할 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 항-SLE제, 예를 들어 비스테로이드계 항염증약 (NSAID), 진통제, 코르티코스테로이드 (예를 들어 프레디니손, 히드로코르티손), 면역 억제제 (예를 들어 시클로포스파미드, 아자티오프린 및 메토트렉세이트), 항말라리아제 (예를 들어 히드록시클로로퀸) 및 dsDNA 항체의 생성을 억제하는 생물학적 약물 (예를 들어 LJP 394)과 조합되어 사용될 수 있다.

[0441] E. 제I형 당뇨병

[0442] 혈청 IP-10 수준은 제I형 당뇨병 환자, 특히 최근에 질환이 개시된 환자에서 상승되는 것으로 밝혀졌으며, 이 수준은 GAD 자가 항체에 대하여 양성인 환자에 있어서 GAD-반응성 감마-인터페론-생산 T 세포의 갯수와 상관 관계가 있는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Shimada, A. 등 (2001) Diabetes Care 24: 510-515]). 개별적인 연구에서, 혈청 IP-10 수준은 새롭게 질환이 진단된 환자 및 이 질환에 대하여 고위험성인 환자에서 증가되며, IP-10의 농도는 IFN-감마의 수준과 상관 관계가 있음이 밝혀졌다 (문헌[Nicoletti, F. 등 (2002) Diabetologia 45: 1107-1110]). 또한, 베타 세포는 IP-10을 분비하여 T 세포를 화학 유인하는 것으로 입증되었으며, CXCR3 결핍성 마우스는 제I형 당뇨병의 개시가 지연되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Frigerio, S. 등 (2002) Nature Medicine 8: 1414-1420]).

[0443] 따라서, 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항-IP-10 항체는 치료가 필요한 대상에게 항체를 투여함으로써 제I형 당뇨병의 치료에 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 항당뇨병제, 예를 들어 인슐린과 조합되어 사용될 수 있다.

[0444] F. 염증성 피부 질병

[0445] IP-10 발현은 다양한 염증성 피부 질병과 결부되는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어 IP-10은 활성 건선 반점으로부터의 진피 침윤물 및 각질 형성 세포에서 검출되었다 (문헌[Gottlieb, A. B. 등 (1988) J. Exp. Med. 168: 941-948]). 또한, CXCR3은 진피 CD3+ 림프구에 의해 발현되는데, 이는 CXCR3이 건선성 진피로의 T 림프구의 트래피킹 (trafficking)에 연루됨을 시사하는 것이다 (문헌[Rottman, J. B. 등 (2001) Lab. Invest. 81: 335-347]). 따라서, 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항-IP-10 항체는 치료가 필요한 대상에게 항체를 투여함으로써 건선을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 상요되거나 다른 약제 또는 치료법, 예를 들어 국소 치료 (예를 들어 스테로이드, 콜타르, 칼시포트리엔, 타자로텐, 안트랄린, 살리실산), 광요법, 전신 투약 (예를 들어 메토트렉세이트, 경구용 레티노이드, 시클로스포린, 푸마르산 에스테르) 및/또는 생물학적 약물 (예를 들어 알레파셉트 (alefacept), 에팔리주마브 (efalizumab))과 조합되어 사용될 수 있다.

[0446] 피부 및 구강 점막의 만성 염증성 질환인 편평 태선은 CXCR3을 발현하는 침윤 CD4+ 및 CD8+ T 세포와 결부된 것으로 밝혀졌으며, 또한, CD8+ 침윤 세포 용해 T 세포는 그의 세포 용해 과립에서 IP-10을 갖는 것으로 밝혀졌고

병변성 각질 형성 세포는 IP-10을 과다 발현하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Iijima, W. 등 (2003) Am. J. Pathol. 163: 261-268]). 따라서, 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항-IP-10 항체는 치료가 필요한 대상에게 항체를 투여함으로써 편평 태선을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 약제 또는 치료법, 예를 들어 항염증제, 항히스타민제, 코르티코스테로이드 및 광요법과 조합되어 사용될 수 있다.

[0447] IP-10 발현은 다른 염증성 피부 질병, 예를 들어 만성 원판상 홍반상 낭창(discoid lupus erythematosus) 및 예스너 (Jessner) 림프구 침윤의 피부에서 상승되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Flier, J. 등 (2001) J. Pathol. 194: 398-405]). 따라서, 본 발명의 항-IP-10 항체는 치료가 필요한 대상에게 항체를 투여함으로써 이러한 염증성 피부 질병을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 상기에 기술되어 있는 바와 같이, 항체는 단독으로 사용되거나 다른 약제 또는 치료법과 조합되어 사용될 수 있다.

[0448] G. 자가 면역성 갑상선 질환

[0449] IP-10 및 CXCR3 둘 모두는 그레이브스병 (GD)을 앓고 있는 환자의 갑상선에서는 발현되지만, 정상적인 갑상선 조직에서는 발현되지 않거나 (불충분하게 발현되는) 것으로 밝혀졌으며, 발현은 최근 개시된 GD 환자에서 가장 높았다 (문헌[Romagnani, P. 등, Am. J. Pathol. 161 : 195-206]). IP-10은 또한 하시모토 갑상선염을 앓고 있는 환자의 갑상선 조직에서 발현되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Kemp, E. H. 등 (2003) Clin. Endocrinol. 59: 207-213]). 따라서, 다른 실시 형태에 있어서 본 발명의 항-IP-10 항체는 치료가 필요한 대상에게 항체를 투투여함으로써 그레이브스병 및 하시모토 갑상선염을 비롯한 자가 면역성 갑상선 질환을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 약제 또는 치료법, 예를 들어 항-갑상선약, 방사성 요오드 및 갑상선 아전절제술 (subtotal thyroidectomy)과 조합되어 사용될 수 있다.

[0450] H. 쇼그렌 증후군

[0451] IP-10 mRNA의 발현은 쇼그렌 증후군 (SS) 환자의 타액선에서 유의하게 상향 조절되는 것으로 밝혀졌는데, 발현은 림프성 침윤물에 인접한 선관 상피에서 가장 두드러졌다 (예를 들어 문헌[Ogawa, N. 등 (2002) Arthritis Rheum. 46: 2730-2741] 참조). 따라서, 다른 실시 형태에 있어서 본 발명의 항-IP-10 항체는 치료가 필요한 대상에게 항체를 투여함으로써 쇼그렌 증후군을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 항-SS제, 예를 들어 인공 윤활제 (예를 들어 무방부제 인공 눈물, 인공 타액, 무취 스킨 로션, 비강용 염수 스프레이 및 질 윤활제), 안구 건조증 치료용의 Lacriserts (등록상표), 구강 건조증 치료용의 필로카르핀 히드로클로라이드 (Salagen (등록상표)) 및 세이이멜린 (Eyoxac (등록상표)), 비스테로이드계 항염증약 (NSAID), 스테로이드 및 면역 억제약과 조합되어 사용될 수 있다.

[0452] I. 폐 염증

[0453] IP-10 발현은 알러지성 천식의 마우스 모델에서 조사하였는데, 그 결과에 의하면, IP-10은 알레르겐 공격 (challenge) 후 폐에서 상향 조절되며 IP-10의 과다 발현은 기도 과민반응 증가, 호산구 과다증, IL-4 수준 증가 및 CD8+ 림프구의 모집과 결부된다는 것이 입증되었다 (문헌[Medoff, B. D. 등 (2002) J. Immunol. 168: 5278-5286]). 또한, 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD)이 발병된 흡연자는 그의 세기관지 상피에서 IP-10을 발현하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Saetta,. M. 등 (2002) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 165: 1404-1409]). 또한, 폐 사르코이드증 및 림프구성 폐포염 환자의 기관지폐포 세척액에서 IP-10의 높은 수준이 입증되었다 (문헌[Agostini, C. 등 (1998) J. Immunol. 161: 6413-6420]).

[0454] *따라서, 다른 실시 형태에 있어서, 본 발명의 항-IP-10 항체는, 치료가 필요한 대상에게 항체를 투여함으로써, 폐 염증을 그 특징으로 하는 질환, 예를 들어 천식, COPD, 폐 사르코이드증 또는 림프구성 폐포염의 치료에서 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 폐 염증을 감소시키는 다른 약제, 예를 들어 크로몰린 소듐, 네도크로밀 소듐, 흡입 코르티코스테로이드, 전신용 (예를 들어 경구) 코르티코스테로이드, 단기간 작용성 베타 길항제, 단기간 작용성 기관지 확장제, 장기간 작용성 베타 길항제 또는 작동제 (경구 또는 흡입용), 류코트리엔 변형제, 테오필린 및 산소 요법과 조합되어 사용될 수 있다.

[0455] J. 이식 거부

[0456] IP-10은 이식 조직의 거부에서 그 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어 중화 항-IP-10 항체를 이용하여 마우스를 처리하면 소장 동종 이식체 (allograft)의 생존성이 증가되고 점막 고유층에서의 숙주 T 세포 및 NK 세포의 축적이 감소되었다 (문헌[Zhang, Z. 등 (2002) J. Immunol. 168: 3205-3212]). 또한, 췌도 동종 이식을

받은 마우스에 있어서, 항-IP-10 항체 치료는 또한 동종 이식체의 생존성을 증가시키고 림프구성 이식체 침윤을 감소시켰다 (문헌[Baker, M. S. 등 (2003) Surgery 134: 126-133]). 부가적으로, 정상 심장이 아닌 심장 동종 이식체는 IP-10 및 CXCR3을 발현하는 것으로 밝혀졌으며, IP-10 수준의 상승은 심장 동종 이식 후 관동맥질환 (cardiac allograft vasculopathy)과 결부되었다 (문헌[Zhao, D. X. 등 (2002) J. Immunol 169:1556-1560]). CXCR3 및 IP-10은 또한 폐 동종 이식체를 침윤하는 염증 세포에 의해 발현되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Agostini, C. 등(2001) Am J. Pathol. 158: 1703-1711]). 생체 내에서의 CXCR3 또는 IP-10의 중화는, 쥣과 폐 이식 모델에서, 폐 이식 수여체에 있어서의 생존성에 대한 주요 제한 사항인 폐색성 세기관지염 증후군 (bronchiolitis obliterans syndrome, BOS)을 약화시키는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Belperio, J. A. 등 (2002) J. Immunol. 169: 1037-1049]).

[0457] 전술한 사항에 비추어 보면, 본 발명은 본 발명의 항-IP-10 항체를 치료가 필요한 이식 수여체에게 투여함으로써 이식 거부를 억제하는 방법도 제공한다. 치료될 수 있는 조직 이식의 예는 간, 폐 (예를 들어 BOS의 치료), 신장, 심장, 소장 및 췌도 세포를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 항체는 단독으로 사용되거나 이식 거부를 억제하는 다른 약제, 예를 들어 면역 억제제 (예를 들어 시클로스포린, 아자티오프린, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 미코페놀레이트 모페틸, 시릴리무스, 라파마이신, 타크로리무스), 항감염제 (예를 들어 아시클로비르, 클로트리마졸, 간시클로비르, 니스타틴, 트리메토프림술파르네톡사졸), 이뇨제 (예를 들어 부메타니드, 푸로세미드, 메토라존) 및 궤양용 의약 (예를 들어 시메티딘, 파르노티딘, 란소프라졸, 오메프라졸, 라니티딘, 수크랄페이트)과 조합되어 사용될 수 있다.

[0458] K. 척수 손상

[0459] 척수의 외상성 손상에 의해 염증성 세포의 침윤이 일어난다. IP-10은 척수 손상 이후의 이차적인 퇴화에서 중심적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Gonzalez 등 (2003) Exp. Neurol. 184: 456-463]; 또한 PCT 공보 제WO 03/06045호 참조). IP-10은 손상 후 6시간 및 12시간에서의 타박상을 입은 쥐 척수 (문헌[McTigue, D. M. 등 (1998) J.Neurosci. Res. 53:368-376]) 및 손상 후 6시간에서의 손상을 입은 마우스 척수 (문헌[Gonzalez 등 (2003) 상기 참조])에서 유의하게 상승되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 척수 손상 후의 IP-10 활성의 억제는 염증성 세포의 침윤을 감소시키고 따라서 염증에 대한 이차 조직 손상을 감소시키는 데에 유용한 것으로 밝혀졌다. 억제는 또한 염증성 세포의 침윤을 감소시키고, 이차 퇴화를 감소시키고 외상성 뇌 손상 및 뇌졸중 이후의 회복을 개선시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 치료가 필요한 대상에게 본 발명의 항-IP-10을 투여하는 단계를 포함하는, 치료가 필요한 대상의 척수 손상 및 뇌 손상 (예를 들어 뇌졸중)을 치료하는 방법도 제공한다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 약제, 예를 들어 다른 항염증제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0460] L. 퇴행성 신경 질환

[0461] 중추 신경계 내에서의 IP-10 및 CXCR3 발현은 알츠하이머병 (AD)과 결부된 병리학적 변화와 결부되어 상향 조절되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Xia, M. Q. and Hyman, D. T. (1999) J. Neurovirol. 5: 32-41]). AD 뇌 내에서 CXCR3은 여러 피질 및 피질하 부위 (subcortical region)에서 뉴런 및 뉴런 과정에서 구성적으로 발현되는 것으로 밝혀졌으며 IP-10은 성상 세포에서 발현되는 것으로 밝혀졌고 그 수준은 정상 뇌에 비하여 두드러지게 상승되었다 (문헌[Xia, M. Q. 등 (2000) J. Neuroimmunol. 108: 227-235]). 따라서, 본 발명의 항체는, 치료가 필요한 대상에게 단독의 항-IP-10 항체 또는 다른 치료제와 조합된 항-IP-10 항체를 투여함으로써 퇴행성 신경 질환, 예를 들어 알츠하이머병 및 파킨슨병을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 알츠하이머병의 치료를 위하여 항-IP-10 항체와 조합될 수 있는 약제의 예는 콜린에스테라제 억제제 (도네페질, 리바스티그민, 갈란타민, 타크린) 및 비타민 E를 포함한다. 파킨슨병의 치료를 위하여 항-IP-10 항체와 조합될 수 있는 약제의 예로는 레보도파가 있다.

[0462] M. 치은염

[0463] *변연성 치주염은 염증성 치은 조직과 결부되어 있다. IP-10을 생산하는 세포와, CXCR3 수용체를 발현하는 세포가 인간 염증성 치은 조직에서 발견되었다 (문헌[Kabashima, H. 등 (2002) Cytokine 20: 70-77]). 따라서, 다른 실시 형태에 있어서 본 발명의 항-IP-10 항체는 치료가 필요한 대상에게 항체를 투여함으로써 치은염을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 약제 또는 치료법, 예를 들어 항-치은 구강 세척제 (예를 들어 항생제 구강 세척제), 치주 스케일링 및 치근면 활택술 (root planing)과 치주 수술과 조합되어 사용될 수 있다.

[0464] N. 유전자 요법 결부된 염증

[0465] 유전자 요법에서 사용되는 아데노바이러스 (adenovirus) 벡터로 사용되는 복제 결함성 아데노바이러스는 이 바이러스 벡터에 의해 감염된 조직에서 급성 손상 및 염증을 야기할 수 있다. 그러한 아데노바이러스 벡터는 NFkB의 캡시드-의존성 활성화를 통하여 IP-10의 발현을 유도하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Borgland, S.L. 등 (2000) J. Virol. 74: 3941-3947]). 따라서, 본 발명의 항-IP-10 항체는, IP-10의 원하지 않는 생성을 촉진하는 아데노바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터가 이용되는 유전자 요법 치료 동안 IP-10 유도된 손상 및/또는 염증을 억제하기 위하여 사용될 수 있다.

[0466] O. 혈관 생성 질환

[0467] IP-10은 시험관 내 및 생체 내에서 혈관 생성을 억제하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Strieter 등 (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 210: 51-57]; 문헌[Angiolillo 등 (1995) J. Exp. Med. 182: 155-162]; 문헌[Luster 등 (1995) J. Exp. Med. 182 :219-231]). 혈관 생성은 다수의 질환 과정, 예를 들어 외상에 대한 치유 반응에서 결정적인 역할을 한다. 예를 들어 손상된 척수 내의 혈관계는 손상 후 적어도 28일까지 활성 리모델링 (remodeling) 상태로 남아있다 (문헌[Popovich 등 (1997) J. Comp. Neurol. 377: 443-464]).

[0468] IP-10은 내피 세포 성장 및 주화성의 억제를 통하여 그의 혈관 억제 (angiostatic) 효과를 발휘하는 것으로 생각된다. IP-10은 이것을 그의 헤파린 결합 모티프를 통하여, 그리고 수용체 매개 기전을 통하여 한다. 헤파린-결합 모티프를 통하여 IP-10은 혈관 생성 인자 FGF-2 및 VEFG165가 그의 수용체에 결합되지 않도록 한다. IP-10은 또한 수용체 매개 과정을 통하여 그의 효과를 발휘한다. IP-10의 수용체인 CXCR3은 대안적으로 스플라이싱되어 2종의 공지된 변이체인 CXCR3A 및 CXCR3B를 생성한다. CXCR3A 수용체에의 IP-10 결합에 의해 표적 세포가 증식되고 표적 세포의 주화성이 생성되며, 반면, CXCR3B 수용체에의 IP-10 결합은 성장 및 주화성의 억제의 반대의 효과를 가진다. IP-10이 혈관 억제 인자로 작용하는 것은 CXCR3B 수용체를 통해서이다 (문헌[Lasagni 등 (2003) J. Exp. Med. 197: 1537-1549]).

[0469] 전술한 사항에 비추어 보면, 본 발명의 항-IP-10 항체는 혈관 생성을 필요로 하는 질환, 예를 들어 IP-10의 혈관 억제 거동이 치유를 지연 또는 방지하며 질환 과정을 악화시키는 질환의 치료에서 사용될 수 있다. 그러한 질환은 1) 상처 치유, 여성 성 주기 (estrus cycle), 임신, 운동 유발성 비대증 등에 영향을 줄 수 있는 생리학적 혈관 신생 (neovascularization) 이상; 2) 측부 혈관 형성의 유도 (심근 허혈, 말초 허혈, 뇌 허혈을 포함함), 관상 동맥 질환, 말초 혈관 질환, 뇌졸중, 창상 치유, 기관 이식, 예를 들어 췌도 세포 이식 후의 생착 (engraftment), 골절 및 건 회복술 (tendon repair), 재건 수술, 조직 엔지니어링, 재협착, 모발 손실, 육창성 및 울혈성 궤양, 위궤양, 태반 기능 부전증, 비패혈성 괴사, 폐 및 전신성 고혈압, 혈관성 치매, 알츠하이머병, CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy); 갑상선 위낭종 (thyroid psuedocyst) 및 림프부종을 포함하는 혈관 신생의 촉진을 필요로 할 수 있는 징후와; 3) 혈관 기형, 건선 및 자간 전증을 포함하는 혈관 리모델링을 필요로 할 수 있는 징후를 포함한다. 본 발명의 항체는 단독으로 사용되거나 다른 혈관 생성 유도제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0470] P. 염증성 신장 질환

[0471] CXCR3 수용체는 IgA 신병증, 막증식성 사구체신염 또는 급속 진행성 사구체신염 환자의 혈관 사이질 세포에 의해 발현되는 것으로 보고되었다 (문헌[Romagnani, P. 등 (1999) J. Am. Soc. Nephrol. 10: 2518-2526]). 또한, 신독성 신장염의 마우스 모델에서, IP-10 mRNA의 수준은 신장염 유도 후 7일에 신장염 신장의 피질에서 6배 증가되었다 (문헌[Schadde, E. 등 (2000) Nephrol. Dial. Transplant. 15: 1046-1053]). 또한, 높은 수준의 IP-10 발현이 정상 신장에 비하여 사구체 신염에 걸린 인간 환자의 신장 생검 표본에서 관찰되었다 (문헌[Romagnani, P. 등 (2002) J. Am. Soc. Nephrol. 13: 53-64). 따라서, 본 발명의 항-IP-10 항체는 IgA 신병증, 막증식성 사구체신염 및 급속 진행성 사구체신염을 비롯한 염증성 신장 질환의 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 항체는 단독으로 사용되거나 사구체 신염의 치료에 사용되는 다른 약제 또는 치료법, 예를 들어 항생제, 이뇨제, 고혈압용 의약 및 투석과 조합되어 사용될 수 있다.

[0472] Q. 아테롬성 동맥 경화증

[0473] IP-10은 아테롬성 동맥 경화증의 병인에의 기여에 있어서 평활근 세포의 중요한 특징인 혈관 평활근에 대한 미토겐 및 화학 유인 인자인 것으로 밝혀졌다 (예를 들어 Wang, X. 등 (1996) J. Biol.Cher. 271: 24286-24293]). IP-10은 또한 LPS 또는 인터페론 감마를 이용한 치료 후 평활근 세포에서 유도되는 것으로 밝혀졌으며, 또한 풍선 혈관 성형 후의 쥐 경동맥에서 유도되었다 (문헌[Wang, X. 등 (1996) 상기 참조]). 또한, IP-10

은 아테롬-결부 내피 세포, 평활근 세포 및 대식 세포에서 발현되는 것으로 입증되었는데, 이는 죽종 생성(atherogenesis) 동안 혈관벽 병변 내에서 관찰된 활성화된 T 세포의 모집 및 유지에 있어서의 IP-10의 역할을 시사하는 것이다 (문헌[Mach, F. 등 (1999) J. Clin. Invest. 104: 1041-1050]). 따라서, 본 발명의 항-IP-10 항체는 아테롬성 동맥 경화증의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 사용되거나 아테롬성 동맥 경화증의 치료에 사용도는 다른 약제 또는 치료법, 예를 들어 고혈압용 의약 및 콜레스테롤 저하약과 조합되어 사용될 수 있다.

[0474] R. 바이러스 감염

[0475] IP-10은 여러 바이러스 감염에서 상향 조절될 수 있으며 바이러스 감염과 싸우기 위한 활성화된 T 세포의 모집에 있어서 유익한 역할을 할 수 있다. 그러나 소정의 경우에 있어서, 바이러스 감염 동안의 IP-10의 생성은 해로운 영향을 줄 수도 있으며, 따라서 IP-10의 활성은 원해지지 않을 수 있고 본 발명의 항-IP-10 항체를 사용하여 그러한 바이러스 감염에 있어서 IP-10 활성을 억제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0476] 예를 들어 IP-10은 단핵구 유래의 대식 세포 및 말초 혈액 림프구에서 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV)의 복제를 촉진하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Lane, B. R. 등 (2003) Virology 307: 122-134]). 또한, IP-10의 수준은 HIV 감염 환자의 뇌 및 뇌척수액에서, 그리고 HIV gp120-트랜스제닉 마우스의 중추 신경계에서 상승되어 있다 (문헌[Asensio, V. C. 등 (2001) J. Virol. 75: 7067-7077]).

[0477] 또한 IP-10의 수준은 만성 지속성 C형 간염 바이러스 (HCV) 환자 및 만성 활성 간염 환자에서 상승되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Narumi, S. 등 (1997) J. Immunol. 158: 5536-5544]). HCV-감염 간에 있어서, IP-10은 간세포에 의해서는 발현되지만 간 내의 다른 세포 유형에 의해서는 발현되지 않는 것으로 밝혀졌으며, 혈액에 비하여 유의하게 더 높은 비율의 CXCR3 양성 T 세포가 간에서 발견되었다 (문헌[Harvey, C. E. 등 (2003) J. Leukoc. Biol. 74: 360-369]).

[0478] IP-10의 분비 증가는 마우스에 있어서 급성 안구 제I형 단순 포진 바이러스(HSV-1) 감염에 대한 염증 반응과 결부된 것으로 밝혀졌으며, 항-IP-10 항체로 HSV-1 감염 마우스를 치료하면 각막 실질 (corneal stroma) 내로의 단핵 세포 침윤이 감소되고, 각막 병상 (pathology)이 감소되고 급성 간염 동안 각막 실질로부터 망막으로의 바이러스의 진행이 억제되는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Carr, D. J. 등 (2003) J.Virol 77: 10037-10046]).

[0479] IP-10 발현은 또한 바이러스성 뇌수막염에서 발현되는 것으로 밝혀졌다. IP-10은 바이러스성 뇌수막염 환자의 CSF에 존재하며 호중구, 말초 혈액 단핵 세포 및 활성화된 T 세포 상에서의 주화 활성에 책임이 있는 것으로 입증되었다 (문헌[Lahrtz, F. 등 (1997) Eur. J. Immunol. 27: 2484-2489]; 문헌[Lahrtz, F. 등 (1998) J. Neuroimmunol. 85: 33-43]).

[0480] 전술한 사항에 비추어 보면, 본 발명의 항-IP-10 항체는 치료를 필요로 하는 대상에게 항체를 투여함으로써 원하지 않는 IP-10 활성을 포함하는 바이러스 감염을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 치료될 수 있는 바이러스 감염의 비제한적 예는 HIV (예를 들어 HIV-유도된 뇌염), HCV, HSV-1, 바이러스성 뇌수막염 및 중증 급성 호흡기 증후군 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)을 포함한다. 항체는 단독으로 사용되거나 다른 항바이러스제, 예를 들어 HIV 감염에 있어서 뉴클레오시드/뉴클레오티드 역전사효소 억제제, 뉴클레오시드 외 (non-nucleoside) 역전사효소 억제제 및/또는 프로테아제 억제제 (및 그의 조합), HCV 감염에 있어서 인터페론 알파 2a, 페길화 인터페론 알파 2a, 및/또는 리바비린과, HSV-1 감염에 있어서, 아시클로비르, 발라시클로비르 및/또는 팜시클로비르와 조합되어 사용될 수 있다.

[0481] S. 세균 감염

[0482] 세균 감염은 영향을 받은 세포에서 IP-10 생성을 유도한다 (문헌[Gasper, N. A. 등 (2002) Infect Immun. 70: 4075-82] 참조). 세균성 뇌수막염도 IP-10 발현을 불러일으키는 것으로 특정적으로 공지되어 있다 (문헌[Lapinet, J. A. 등 (2000) Infect Immun. 68: 6917- 23]). IP-10은 또한 세균 감염 모델에서 정세관의 고환 체세포에 의해 생산되는데, 이는 세균 감염의 병인에서 고전적으로 관찰되는, 고환 감염 동안의 호중구 및 T 림프구의 축적에 있어서의 상기 케모카인의 가능한 역할을 나타내는 것이다 (문헌[Aubry, F. 등 (2000) Eur Cytokine Netw. 11: 690-8]).

[0483] 전술한 사항에 비추어 보면, 본 발명의 항-IP-10 항체는 항체를 치료가 필요한 대상에게 투여함으로써 원하지 않는 IP-10 활성을 포함하는 세균 감염을 치료하는 데에 사용될 수 있다. 세균 감염의 예에는 세균성 뇌수막염 및 세균성 폐렴이 포함되지만 이로 한정되는 것은 아니다. 본 항체는 단독으로 사용되거나 다른 항균제, 예를

들어 항생제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0484] 본 발명을 하기 실시예로 추가로 설명하는데, 하기 실시예는 추가의 한정으로 파악되어서는 아니된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고 문헌, 특허 및 특허 공개 공보와 모든 도면의 내용은 본원에 참고로 명백하게 포함된다.

[0485] **실시예 1: IP-10에 대한 인간 단일클론 항체의 생성**

[0486] 항원

[0487] 키홀 림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin, KLH)에 콘쥬게이션된 정제된 재조합 인간 IP10 또는 이.콜라이 (E.coli)로부터 유래되는 정제된 재조합 인간 IP10 (PeproTech,Inc., 카탈로그 번호: 300-12)을 항원으로 사용하였다.

[0488] 트랜스제닉 HuMab 및 KM 마우스

[0489] IP10에 대한 전적인 인간 단일클론 항체는 HuMab 트랜스제닉 마우스의 HCo7, HCo12 및 HCo17 주와 트랜스제닉 트랜스크로모조믹 마우스의 KM 주를 사용하여 제조하였는데, 이들 각각은 인간 항체 유전자를 발현한다. 상기 마우스 주 각각에 있어서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자는 문헌[Chen 등 (1993) EMBO J. 12: 811-820]에 기술되어 있는 바와 같이 동형 접합에 의해 (homozygously) 파괴시켰으며 내인성 마우스 중쇄 유전자는 PCT 공보 제WO 01/09187호의 실시예 1에 기술되어 있는 바와 같이 동형 접합에 의해 파괴시켰다. 문헌[Fishwild 등 (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851]에 기술되어 있는 바와 같이, 각각의 상기 마우스 주는 인간 카파 경쇄 트랜스진인 KCo5를 지닌다. 미국 특허 제5,545,806호; 동 제5,625,825호; 및 동 제5,545,807호에 개시되어 있는 바와 같이, HCo7 주는 HCo7 인간 중쇄 트랜스진을 지닌다. PCT 공보 제WO 01/09187호의 실시예 2에 개시되어 있는 바와 같이 HCo12 주는 HCo12 인간 중쇄 트랜스진을 지닌다. 하기의 실시예 8에 기술되어 있는 바와 같이 HCo17 주는 HCo17 인간 중쇄 트랜스진을 지닌다. PCT 공보 제WO 02/43478호에 개시되어 있는 바와 같이 KM 주는 SC20 트랜스크로모좀을 포함한다.

[0490] HuMab 및 KM의 면역화:

[0491] IP10에 대한 전적인 인간 단일클론 항체의 생성을 위하여, 이.콜라이로부터 유래되는 정제된 재조합 IP10 또는 IP10-KLH 콘쥬게이트를 항원으로 이용하여 HuMab 마우스 및 KM 마우스를 면역화하였다. HuMab 마우스에 있어서의 일반적인 면역화 방법은 문헌[Lonberg, N. 등 (1994) Nature 368 (6474): 856-859]; 문헌[Fishwild, D. 등 (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851] 및 PCT 공보 제WO 98/24884호에 기술되어 있다. 마우스는 항원의 제1 주입시에 6-16주령이었다. IP10 항원의 정제된 재조합 제제 (5-15 ㎍) (예를 들어 IP10을 발현하는 트랜스펙션된 이.콜라이로부터 정제됨)를 사용하여 HuMab 마우스 및 KM 마우스를 복강내 면역화, 피하 면역화(Sc)로 면역화하거나 풋패드 (footpad) 주사를 통하여 면역화하였다.

[0492] 트랜스제닉 마우스는 완전 프로인트 아쥬반트 또는 Ribi 아쥬반트 중의 항원으로 복강내 (IP) 면역화, 피하 (Sc) 면역화, 또는 풋패드 (FP) 주사를 통한 면역화로 2회 면역화하고, 이어서 불완전 프로인트 아쥬반트 또는 Ribi 아쥬반트 중 항원을 이용하여 3-21일간의 IP, Sc 또는 FP 면역화로 면역화하였다 (최고 총 11회의 면역화). 면역 반응을 레트로오비탈 채혈로 모니터링하였다. 혈장을 ELISA로 스크리닝하고 (하기에 기술되어 있음), 항-IP10 인간 면역글로불린의 역치가 충분한 마우스를 융합에 사용하였다. 마우스를 항원으로 정맥내 면역 강화로 면역 강화시키고 그렇게 한지 3일 후 및 2일 후에 희생시키고 비장을 제거하였다. 전형적으로 각각의 항원에 대하여 10-35회의 융합을 수행하였다. 수십마리의 마우스를 각각의 항원에 대하여 면역화하였다. 총 82마리의 HCo7, HCo12, HCo17 마우스 및 KM 마우스의 주를 IP10으로 면역화하였다.

[0493] 항-IP10 항체를 생산하는 HuMab 또는 KM 마우스의 선발

[0494] IP10에 결합하는 항체를 생산하는 HuMab 또는 KM 마우스의 선발을 위하여, 면역화 마우스 유래의 혈청을 문헌[Fishwild, D. 등 (1996)]에 기술되어 있는 바와 같이 ELISA로 시험하였다. 간략하게는, 마이크로타이터 플레이트를 PBS 중 1-2 ㎍/ml의 이.콜라이 유래의 정제된 재조합 IP10으로 코팅하고, 이어서 50 ㎕/웰을 4℃에서 하룻밤 인큐베이션시키고 이어서 PBS/트윈 (0.05%) 중 5%의 닭 혈청 200 ㎕/웰로 차단하였다. IP10-면역화 마우스 유래의 혈장의 희석물을 각각의 웰에 첨가하고 주위 온도에서 1-2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/트윈으로 세척하고 이어서 서양 고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 콘쥬게이션된 염소-항-인간 IgG Fc 다중클론 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 플레이트를 ABTS 기질 (Sigma, A-1888, 0.22 mg/ml)을 이용하여 발색시키고 OD 415-495에서 분광 광도계로 분석하였다. 가장 높은 역치의 항-IP10 항체를

나타낸 마우스를 융합에 사용하였다. 융합은 하기에 기술되어 있는 바와 같이 수행하였으며 ELISA로 하이브리도마 상청액을 항-IP10 활성에 대하여 시험하였다.

[0495] IP10에 대한 인간 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 제조:

[0496] 표준 프로토콜에 기초하여 HuMab 마우스 및 KM 마우스로부터 단리한 마우스 비장 세포를 마우스 골수종 세포주에 PEG로 융합시켰다. 이어서 생성된 하이브리도마를 항원 특이성 항체의 생산에 대하여 스크리닝하였다. 면역화 마우스 유래의 비장 림프구의 단일 세포 현탁물을, 50% PEG (Sigma)를 이용하여 1/4의 갯수의 SP2/0 비분비 마우스 골수종 세포 (ATCC, CRL1581)에 융합시켰다. 세포를 평평한 바닥의 마이크로타이터 플레이트에 대략 1 x 10^5개/웰로 도말하고, 이어서 10%의 소 태아 혈청, 10%의 P388D1 (ATCC, CRLTIB-63) 조절 배지, DMEM (Mediatech, CRL 10013, 고 글루코스, L-글루타민 및 피루브산나트륨을 포함함) 중의 3-5%의 오리겐 (origen) (IGEN) + 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50 mg/ml의 겐타마이신 및 1x HAT (Sigma, CRL P-7185)을 포함하는 선발 배지에서 약 2주간 배양하였다. 1-2주 후, HAT를 HT로 대체한 배지에서 세포를 배양하였다. 이어서 개개의 웰을 ELISA (상기에 기술되어 있음)로 인간 항-IP10 단일클론 IgG 항체에 대하여 스크리닝하였다. 일단 엄청난 하이브리도마 성장이 일어나면, 배지를 일반적으로 10-14일 후에 모니터링하였다. 항체 분비 하이브리도마를 재도말하고, 다시 스크리닝하고, 인간 IgG에 대하여 여전히 양성일 경우, 항-IP10 단일클론 항체를 한정 희석으로 2회 이상 서브클로닝하였다. 이어서 안정한 서브클론을 시험관 내에서 배양하여 추가의 특성화를 위한 조직 배양용 배지 중의 적은 양의 항체를 생성하였다.

[0497] 하이브리도마 클론 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4를 추가의 분석을 위하여 선발하였다.

[0498] **실시예 2: IP-10에 대한 인간 단일클론 항체의 구조적 특성화**

[0499] 표준 PCR 기술을 사용하여 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 6B10, 7C10, 8F6, 10A12 및 13C4 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA 서열을 상응하는 하이브리도마로부터 수득하고 표준 DNA 서열 결정 기술을 사용하여 서열을 결정하였다. DNA 서열 결정 만으로는 항체 구조를 명료하게 결정하기에 충분하지 않은 경우, 단백질 분석 (예를 들어 N-말단 아미노산 분석 및 질량 분광법)을 또한 수행하였으며 그 결과를 DNA 서열 분석과 비교함으로써 정확한 항체의 구조를 결정하였다. 구조 분석의 결과는 하기와 같다:

[0500] 1D4의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 99 및 35와 도 1A에 예시되어 있다. 1D4의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 110 및 84와 도 1B에 예시되어 있다.

[0501] 1E1의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 100 및 36과 도 2A에 예시되어 있다. 1E1의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 111 및 85와 도 2B에 예시되어 있다.

[0502] 2G1의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 101 및 37과 도 3A에 도시되어 있다. 2G1의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 112 및 86과 도 3B에 예시되어 있다.

[0503] 3C4의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 102 및 38과 도 4A에 도시되어 있다. 3C4의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 113 및 87과 도 4B에 예시되어 있다.

[0504] 6A5의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 103 및 39와 도 5A에 도시되어 있다. 6A5의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 114 및 88과 도 5B에 예시되어 있다.

[0505] 6A8의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 104 및 40과 도 6A에 도시되어 있다. 6A8의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 115 및 89와 도 6B에 예시되어 있다.

[0506] 6B10의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 105 및 41과 도 7A에 도시되어 있다. 6B10의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 116 및 90과 도 7B에 예시되어 있다.

[0507] 7C10의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 106 및 42와 도 8A에 도시되어 있다. 7C10의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 117 및 91과 도 8B에 예시되어 있다.

[0508] 8F6의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 107 및 43과 도 9A에 도시되어 있다. 8F6의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 118 및 92와 도 9B에 예시되어 있다.

[0509] 10A12의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 108 및 44와 도 10A에 도시되어 있다. 10A12의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 119 및 93과 도 10B에 예시되어 있다.

[0510] 13C4의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 109 및 46과 도 11A에 도시되어 있다. 13C4의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열이 각각 서열 번호 120 및 94와 도 11B에 예시되어 있다.

[0511] 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 및 10A12의 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식 세포 면역글로불린 중쇄 서열과 비교한 것에 의하면 상기의 항체의 중쇄에서 인간 생식 세포 V_H 3-33 유래의 V_H 절편이 이용된다는 것이 입증되었다. 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 및 10A12의 V_H 서열을 생식 세포 V_H 3-33 서열 (서열 번호 47)에 대하여 정렬한 것이 도 12에 도시되어 있다. Kabat 시스템의 CDR 영역 결정법을 사용하여 1D4, 1E1, 2G1, 6A5, 6A8, 7C10 및 10A12 V_H 서열을 추가로 분석하여 각각 도 1A, 2A, 3A, 5A, 6A, 8A 및 10A에 도시되어 있는 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 도시하였다.

[0512] 6B10 및 8F6의 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식 세포 면역글로불린 중쇄 서열과 비교한 것에 의하면 상기의 항체의 중쇄에서 인간 생식 세포 V_H 3-30.3 유래의 V_H 절편이 이용된다는 것이 입증되었다. 6B10 및 8F6의 V_H 서열을 생식 세포 V_H 3-33 서열 (서열 번호 48)에 대하여 정렬한 것이 도 13에 도시되어 있다. Kabat 시스템의 CDR 영역 결정법을 사용하여 6B10 및 8F6 V_H 서열을 추가로 분석하여 각각 도 7A 및 9A에 도시되어 있는 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 도시하였다.

[0513] 3C4의 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식 세포 면역글로불린 중쇄 서열과 비교한 것에 의하면 상기의 항체의 중쇄에서 인간 생식 세포 V_H 5-51 유래의 V_H 절편이 이용된다는 것이 입증되었다. 3C4의 V_H 서열을 생식 세포 V_H 5-51 서열 (서열 번호 49)에 대하여 정렬한 것이 도 14에 도시되어 있다. Kabat 시스템의 CDR 영역 결정법을 사용하여 3C4 V_H 서열을 추가로 분석하여 도 4A에 도시되어 있는 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 도시하였다.

[0514] 13C4의 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식 세포 면역글로불린 중쇄 서열과 비교한 것에 의하면 상기의 항체의 중쇄에서 인간 생식 세포 V_H 4-61 유래의 V_H 절편이 이용된다는 것이 입증되었다. 13C4의 V_H 서열을 생식 세포 V_H 4-61 서열 (서열 번호 50)에 대하여 정렬한 것이 도 15에 도시되어 있다. Kabat 시스템의 CDR 영역 결정법을 사용하여 13C4 V_H 서열을 추가로 분석하여 도 11A에 도시되어 있는 바와 같이 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 도시하였다.

[0515] 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 및 13C4의 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식 세포 면역글로불린 경쇄 서열과 비교한 것에 의하면 상기의 항체의 경쇄에서 인간 생식 세포 V_k A27 유래의 V_L 절편이 이용된다는 것이 입증되었다. 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 및 13C의 V_L 서열을 생식 세포 V_k A27 서열 (서열 번호 95)에 대하여 정렬한 것이 도 16에 도시되어 있다. Kabat 시스템의 CDR 영역 결정법을 사용하여 1D4, 2G1, 6A5, 6A8, 10A12 및 13C4의 V_L 서열을 추가로 분석하여 각각 도 1B, 3B, 5B, 6B, 10B 및 11B에 도시되어 있는 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 도시하였다.

[0516] 1E1, 6B10 및 8F6의 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식 세포 면역글로불린 경쇄 서열과 비교한 것에 의하면 상기의 항체의 경쇄에서 인간 생식 세포 V_k L6 유래의 V_L 절편이 이용된다는 것이 입증되었다. 1E1, 6B10 및 8F6의 V_L 서열을 생식 세포 V_k L6 서열 (서열 번호 96)에 대하여 정렬한 것이 도 17에 도시되어 있다.

Kabat 시스템의 CDR 영역 결정법을 사용하여 1E1, 6B10 및 8F6의 V_L 서열을 추가로 분석하여 각각 도 2B, 7B 및 9B에 도시되어 있는 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 도시하였다.

[0517] 3C4의 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식 세포 면역글로불린 경쇄 서열과 비교한 것에 의하면 3C4의 항체의 경쇄에서 인간 생식 세포 V_k L18 유래의 V_L 절편이 이용된다는 것이 입증되었다. 3C4의 V_L 서열을 생식 세포 V_k L18 서열 (서열 번호 97)에 대하여 정렬한 것이 도 18에 도시되어 있다. Kabat 시스템의 CDR 영역 결정법을 사용하여 3C4의 V_L 서열을 추가로 분석하여 도 4B에 도시되어 있는 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 도시하였다.

[0518] 7C10의 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식 세포 면역글로불린 경쇄 서열과 비교한 것에 의하면 7C10의 항체의 경쇄에서 인간 생식 세포 V_k L15 유래의 V_L 절편이 이용된다는 것이 입증되었다. 7C10의 V_L 서열을 생식 세포 V_k L15 서열 (서열 번호 98)에 대하여 정렬한 것이 도 19에 도시되어 있다. Kabat 시스템의 CDR 영역 결정법을 사용하여 7C10의 V_L 서열을 추가로 분석하여 도 8B에 도시되어 있는 바와 같이 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 도시하였다.

[0519] **실시예 3: 항-IP-10 인간 단일클론 항체의 결합 특이성 및 결합 동력학의 특성화**

[0520] 본 실시예에 있어서, 항-IP-10 항체의 결합 친화도, 결합 동력학 및 결합 특이성을 Biacore 분석으로 조사하였다. 또한 결합 특이성 및 교차-경쟁을 ELISA로 조사하였다.

[0521] Biacore 분석

[0522] 항-IP-10 항체를 Biacore 분석 (Biacore AB, 스웨덴 웁살라 소재)으로 친화도 및 결합 동력학에 대하여 특성화하였다. Biacore AB에 의해 제공되는 EDC/NHS 커플링 프로토콜을 사용하여 이.콜라이 발현된 정제 재조합 인간 IP-10 (R&D Systems)을 CM5 센서 칩에 97 RU로 커플링시켰다. 결합은 40 ㎕/분의 유속에서 33-267 nM의 농도로 HBS EP 완충제 (Biacore AB에 의해 제공됨) 중 항체를 유동시킴으로써 측정하였다. 항원-항체의 회합 동력학은 5분 동안 추적하였으며 (followed) 해리 동력학은 8분 동안 추적하였다. 회합 및 해리 곡선은 BIAevaluation 소프트웨어 (Biacore AB)를 사용하여 1:1의 Langmuir 결합 모델에 대하여 보정하였다. 회합 단계 (association phase) 및 해리 단계 (dissociation phase)에 있어서의 초기의 수십초에 상응하는 데이타만을 곡선 보정에 고려하여 친화력의 영향을 최소화하였다. 실험은 25℃ 및 37℃ 둘 모두에서 수행하였다. 결정된 K_D, k_{on} 및 k_{off} 값을 25℃에서의 결합의 경우에는 표 1에, 그리고 37℃에서의 결합의 경우에는 표 2에 나타낸다.

표 1

인간 IP-10을 이용한 25℃에서의 결합의 특성화

클론 ID	친화도 $K_D \times 10^{-9}$ (M)	온 (on) 속도 $K_{on} \times 10^4$ (1/Ms)	오프 (off) 속도 $K_{off} \times 10^{-5}$ (1/s)
7C10	0.02	1.70	0.04
10A12	0.53	3.83	2.02
8F6	0.81	23.3	19.0
10A12S	0.88	3.68	3.24
6A5	1.20	3.11	3.64
6A5 배치 2*	0.96	3.20	3.10
1D4	1.20	8.40	10.20
6B10	1.78	9.50	17.2
2G1	1.90	3.78	0.75

* 6A5 배치 2는 샘플 6A5와 비교시 6A5 하이브리도마의 상청액으로부터의 정제된 항체의 독립적인 샘플임.

[0523]

표 2

인간 IP-10을 이용한 37℃에서의 결합의 특성화

클론 ID	친화도 $K_D \times 10^{-9}$ (M)	온 속도 $K_{on} \times 10^{4}$ (1/Ms)	오프 속도 $K_{off} \times 10^{-5}$ (1/s)
7C10	0.016	5.27	0.08
10A12	0.34	11.1	3.81
8F6	0.78	34.7	27.0
10A12S	0.49	9.10	4.43
6A5	0.70	10.2	7.15
6A5 배치 2	0.74	8.41	6.26
1D4	1.15	16.6	19.2
6B10	2.54	19.9	50.4
2G1	0.34	14.8	4.97

[0524]

[0525] 해리 단계 동안 항체-항원 복합체의 절반의 해리에 걸리는 시간에 의해 정의되는 바와 같이 항체의 반감기 (시간 단위)를 25℃ 및 37℃에서 측정하였다. 값은 해리 곡선을 연장하여 Y-축의 해리 센소그램 (sensogram)의 50% 감소에 요구되는 시간에 도달함으로써 결정하였다. 그 결과를 하기 표 3에 나타낸다:

표 3

25℃ 및 37℃에서의 항체의 반감기

클론 ID	25℃에서의 반감기 (시간)	37℃에서의 반감기 (시간)
2G1	25.67	3.87
10A12	9.53	5.05
10A12S	5.94	4.34
6A5	5.29	2.69
6A5 배치 2	6.21	3.87
1D4	1.88	1.00
6B10	1.12	0.38
8F6	1.01	0.71

[0526]

[0527] 25℃에서의 항체의 붉은털 원숭이 IP-10, 인간 MIG, 인간 ITAC 및 마우스 IP-10과의 교차 반응성은 인간 IP-10에 대하여 상기에 기술한 바와 동일한 방법을 사용하여 Biacore 분석으로 측정하였다. 인간 MIG, 인간 IP-10 및 마우스 IP-10은 시판용의 것을 수득하였으며 (PeproTech, 미국 뉴저지주 로키 힐 소재), 반면 붉은털 원숭이 IP-10은 재조합 발현으로 만들고 표준 방법으로 정제하였다. 항원은 CM5 센서 칩에 140 RU (붉은털 원숭이 IP-10), 457 RU (인간 MIG), 206 RU (인간 ITAC) 및 150 RU (마우스 IP-10)로 콘쥬게이션시켰다. 희합 센소그램은 133 nM의 농도의 HBS EP 완충제 중 항체를 5분 동안 유동시킴으로써 수득하였다. 이어서 유동을 중지시키고 해리를 5분 동안 모니터링하였다. 회합 및 해리 곡선은BIAevaluation 소프트웨어 (Biacore AB)를 사용하여 Langmuir 결합 모델에 대하여 보정하였다. 교차 반응성 실험의 결과가 하기 표 4에 요약되어 있다.

표 4

여러 CXCR3 리간드와의 항-IP-10의 교차 반응성

클론 ID	붉은털 원숭이 IP-10 $K_D \times 10^{-9}$ (M)	인간 MIG $K_D \times 10^{-9}$ (M)	인간 ITAC $K_D \times 10^{-9}$ (M)	생쥐 IP-10 $K_D \times 10^{-9}$ (M)
7C10	4.4	105.0	결합하지 않음	464.0
10A12	0.71	161.0	결합하지 않음	결합하지 않음
8F6	0.81	결합하지 않음	결합하지 않음	결합하지 않음
10A12S	1.21	722.0	결합하지 않음	결합하지 않음
6A5	1.06	결합하지 않음	결합하지 않음	결합하지 않음
6A5 배치 2	1.23	결합하지 않음	결합하지 않음	결합하지 않음
1D4	0.94	결합하지 않음	결합하지 않음	결합하지 않음
6B10	2.01	15.4	51.5	105.0
2G1	0.26	70.1	결합하지 않음	결합하지 않음

[0528]

[0529] ELISA 분석

[0530] ELISA 분석법을 사용하여 추가의 실험을 수행하여 인간 MIG, 붉은털 원숭이 IP-10 또는 마우스 IP-10에 대한 항-IP-10 항체의 항원 교차 반응성을 조사하였다. ELISA에 사용한 절차는, 1 ㎍/ml의 재조합 인간 IP-10, 인간 MIG (PeproTech, 카탈로그 번호 300-26), 마우스 IP-10 (PeproTech, 카탈로그 번호 250-16) 또는 재조합 붉은털 원숭이 IP-10으로 마이크로타이터 플레이트를 코팅한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1에서 기술한 바와 같았다. EC_{50} 값 (ng/ml 단위)으로 표현되는 결과가 하기 표 5에 요약되어 있다.

표 5

ELISA에 의한 여러 CXCR3 리간드와의 항-IP-10의 교차 반응성

클론 ID	인간 IP-10 (EC_{50} ng/ml)	원숭이 IP-10 (EC_{50} ng/ml)	인간 MIG (EC_{50} ng/ml)	생쥐 IP-10
10A12	40	80	180	결합하지 않음
10A12S	4.9	15.6	380	결합하지 않음
2G1	30	30	45	결합하지 않음
6A5	35	90	결합하지 않음	결합하지 않음
6A5 배치 2	62	125	결합하지 않음	결합하지 않음
6B10	30	45	20	결합하지 않음
8F6	90	31	결합하지 않음	결합하지 않음
1D4	25	62	결합하지 않음	결합하지 않음

[0531]

[0532] 여러 항-IP-10 항체들 사이의 교차 경쟁 연구를 비오티닐화 형태의 6A5 및 2G1을 사용하여 ELISA로 또한 수행하여 이 항체들이 IP-10 상의 상이한 에피토프를 인식하는지를 측정하였다. 경쟁 ELISA의 절차는 상기 실시예 1에 기술되어 있는 ELISA와 유사하였다. 간략하게는, 마이크로타이터 플레이트를 PBS 중 0.2 ㎍/ml, 50 ㎕/웰의 이.콜라이 유래의 정제된 재조합 IP-10으로 코팅하고, 4℃에서 하룻밤 인큐베이션시켰다. 이어서 웰을 PBS/트윈 (0.05%) 중 5%의 닭 혈청 200 ㎕/웰로 차단하였다. 정제된 인간 항-인간 IP-10 항체의 희석물 (2 ㎍/ml 내지 3.91 ng/ml)을 각각의 웰에 첨가하고 주위 온도에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/트윈으로 세척하고 이어서 0.1 ㎍/ml의 비오틴-6A5 또는 비오틴-2G1과 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 플레이트를 PBS/트윈으로 3회 세척하였다. 세척 후, 포스페이트 표지된 스트렙타비딘 (KPL, 카탈로그 번호: 15-30-00)을 5% 닭 혈청 중에 1:2000으로 희석시켜 각각의 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세

척 후, 플레이트를 p-NPP 기질 (Moss, Inc. 로트 10274021)로 발색시키고 OD 405에서 분광 광도계로 분석하였다. 기대되는 바와 같이, 미표지 2G1은 IP-10에의 결합에 있어서 비오틴-2G1과 경쟁할 수 있었으며, 또한 미표지 6A5, 7C10, 10A12, 10A12S, 6B10, 8F6 및 1D4는 각각이 인간 IP-10에 대한 비오틴-2G1의 결합과 경쟁할 수 있었다. 이와 유사하게, 미표지 6A5는 IP-10에의 결합에 있어서 비오틴-6A5와 경쟁할 수 있으며, 또한 미표지 2G1, 7C10, 10A12, 10A12S, 6B10, 8F6 및 1D4는 각각이 인간 IP-10에의 비오틴 6A5의 결합과 경쟁할 수 있었다. 이러한 결과는 상기 항체들 각각이 인간 IP-10의 동일한 에피토프 (또는 에피토프 군)에 대하여 결합 특이성을 가진다는 것을 나타낸다.

[0533] **실시예 4: CXCR3에의 IP-10의 결합의 억제**

[0534] 본 실시예에 있어서, 수용체 발현 세포 상에서 인간 IP-10이 그의 수용체 CXCR3에 결합하는 것을 억제하는 항-IP-10 항체의 능력을 조사하였다. 먼저, Scatchard 분석을, CXCR3를 발현하도록 트랜스펙션된 300.19 세포에의 ^{125}I-IP-10의 결합에 대하여 수행하였다. 이 세포를 10% FCS 및 G418 선발물을 포함하는 RPMI 배지에서 배양하였다. 사용 이전에 세포는 행크 균형 염 용액 (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS)으로 4℃에서 2회 세척하고 4 x 10^7개의 세포/ml로 조정하였다. 유리 섬유 플레이트 (Millipore MultiScreen (등록상표), 카탈로그 번호MAFBNOB50)를 실험 하루 전에 200 ㎕의 0.1% 폴리에틸렌이민 용액으로 차단하였다. 연구일에 차단 완충제를 Millipore 다기관 (manifold)을 사용하여 흡인하였다. 플레이트를 200 ㎕의 결합 완충제 (50 mM HEPES, pH 7.2, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, 0.5% BSA)를 이용하여 3회 세척하였다. 25 ㎕의 결합 완충제, 이어서 25 ㎕의 1000배 과량의 미표지 IP-10 또는 결합 완충제를 각각의 웰에 첨가하였다. 증가 농도의 25 ㎕의 ^{125}I-IP-10 (Amersham, 카탈로그 번호 IM332-25μCi), 이어서 1 x 10^6개의 세포/웰의 밀도의 25 ㎕의 세포를 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 60분 동안 플레이트 진탕기 상에서 인큐베이션하고 200 ㎕/세척의 부피의 세척 완충제 (10 mM HEPES, pH 7.2, 0.5 M NaCl, 0.5% BSA)로 3회 세척하였다. 플레이트를 건조시키고, 25 ㎕의 신틸런트 (scintillant)를 첨가하고 플레이트를 Wallac Microbeta Counter 상에서 카운팅하였다. 데이타는 Prism 소프트웨어를 사용하여 분석하고 K_D를 계산하였다. 수용체 결합에 있어서 0.231 nM의 평균 K_D가 결정되었다.

[0535] 다음, 100 pM의 ^{125}I-hIP-10이 CXCR3 발현 세포에 결합하는 것을 억제하는 항-IP-10 항체의 능력을 조사하였다. 상기에 기술한 실험과 유사한 방식으로 경쟁 분석을 수행하였다. 간략하게는, 25 ㎕의 결합 완충제, 이어서 증가하는 농도의 25 ㎕의 항-IP-10 항체를 유리 섬유 필터 플레이트에 첨가하였다. 25 ㎕의 ^{125}I-IP-10을 0.100 nM의 최종 농도로 첨가하였다. 마지막으로 1 x 10^6개의 세포/웰의 밀도의 25 ㎕의 세포를 첨가하고 플레이트를 실온에서 60분 동안 플레이트 진탕기 상에서 인큐베이션하고, 세척하고 상기한 바와 같이 카운팅하였다. EC_{50} 값은 Prism 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. K_i 값 (nM 단위)을 하기 식을 사용하여 결정하였다:

[0536] $$K_i = \frac{EC_{50}}{1 + [L]/K_D}$$

[0537] 그 결과가 하기 표 6에 요약되어 있다:

표 6

CXCR3에의 IP-10의 결합의 억제

클론 ID	Ki(nM)
10A12	0.09
10A12S	0.06
2G1	0.09
8F6	0.16
1E1	0.29
6B10	0.30
7C10	0.41
6A5	0.67
6A5 배치 2	0.35
1D4	0.86

[0538]

[0539] **실시예 5: IP-10 유도된 칼슘 유동의 억제**

[0540] 본 실시예에 있어서, IP-10 유도된 칼슘 유동을 억제하는 항-IP-10 항체의 능력은 CXCR3을 발현하도록 트랜스펙션된 300.19 세포 또는 CXCR3을 발현하는 항-CD3 활성화된 인간 말초 혈액 림프구 (PBL)를 사용하여 조사하였다. PBL의 제조를 위하여, 정상 인간 혈액을 표준 Ficoll 분리로 정제하였다. 정제된 인간 PBL은 3 ㎍/ml의 항-CD3 항체로 코팅된 플레이트에 세포를 첨가하고 이를 10% FBS를 포함하는 RPMI에서 배양함으로써 자극하였다. 인큐베이션한지 3일 후, 세포를 500 U/ml의 IL-2를 포함하는 성장 배지에서 유지하였다. 연구일에 세포를 세척하고 2.5 x 10^7개의 세포/ml의 밀도로 배지에 재현탁하였다. CXCR3을 발현하도록 트랜스펙션된 300.19 세포를 10% FBS를 함유하는 RPMI에서 배양하였다. 300.19 세포를 2 x 10^6개의 세포/ml로 성장 배지에 재현탁하였다.

[0541] 분석의 수행을 위하여, 폴리-D-리신 (Corning/Costar, 카탈로그 번호 3667)으로 코팅된, 측면은 흑색이고 (black-sided) 바닥은 투명한 (clear-bottomed) 96웰 플레이트에 100 ㎕의 세포 현탁물을 첨가하였다. 100 ㎕의 칼슘 3 키트 로딩 염료 (FlexStation(상표명), Molecular Devices, Inc., 미국 캘리포니아주 서니베일 소재)를 각각의 웰에 첨가하고 플레이트를 1100 RPM에서 4분 동안 스핀시키고 (spun) 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 96웰의 시약용 플레이트를 사용하여, 인간 IP-10 (Peprotech, 카탈로그 번호 300-12)을 20 mM HEPES 및 1% FBS (300.19 세포의 경우 800 pM, 그리고 인간 PBL의 경우 1200 pM)를 함유하는 행크 균형 염 용액 중에 희석시켰다. 항체를 IP-10을 포함하는 시약용 플레이트에서 연속적으로 희석시켰다. 완충제 단독 또는 IP-10 단독을 포함하는 대조 웰을 포함시켰다. 웰 당 22 ㎕의 IP-10/항체 용액을 염료 표지 세포를 포함하는 플레이트에 첨가하고 칼슘 유동은 200초의 기간에 걸쳐 제조업자의 지시에 따라 FlexStation (상표명) 기기를 사용하여 칼슘 3 형광성을 모니터링함으로써 측정하였다. 곡선 하의 면적 (area under the curve, AUC)은 표준 프로토콜에 따라 20-100초 사이에서의 칼슘의 유동량을 적분함으로써 계산하였다 (예를 들어 문헌[Smart D. 등 (1999) Br. J. Pharmacol. 128: 1-3] 참조). 데이타를 Prism 소프트웨어 (Molecular Devices, Inc.)를 사용하여 분석하고 IC_{50} 값 (nM 단위)을 결정하였다. 그 결과가 하기 표 7에 요약되어 있다:

표 7

IP-10 유도된 칼슘 유동의 억제

클론 ID	HPBL에 있어서의 IC_{50} (nM)	300.19 세포에 있어서의 IC_{50} (nM)
10A12	1.25	0.18
10A12S	2.31	0.08
2G1	2.98	0.50
8F6	6.27	0.30
1E1	3.64	NT
6B10	4.40	0.50
7C10	8.15	0.77
6A5	2.85	0.61
6A5 배치 2	2.18	0.42
1D4	4.07	0.34

[0542]

[0543] **실시예 6: IP-10 유도된 세포 이동의 억제**

[0544] IP-10에 의해 유도되는 세포의 이동을 억제하는 항-IP-10 항체의 능력을 시험관 내 주화성 분석으로 조사하였다. 이 실험에 있어서, CXCR3 발현 300.19 세포를 사용하였으며 이 세포는 (i) 100 ng/ml의 재조합 인간 IP-10 (rhIP-10); (ii) (천연 IP-10 및 MIG의 분비를 유도하는) IFN 감마로 자극된 THP-1 세포의 상청액 - 여기서, THP-1 유래된 IP-10은 16 ng/ml의 농도로 존재하며 MIG 활성은 2.5 ㎍/ml의 항-MIG (R&D Systems)를 첨가하여 차단함 - ; 또는 (iii) 100 ng/ml의 재조합 붉은털 원숭이 머카크 (macaque) IP-10 (rrmIP-10)으로 자극하였다. 세포 이동의 억제를 여러 농도의 항체를 사용하여 평가하고 주화성 지수를 결정하였다.

[0545] 구체적으로는, 주화성의 억제는 표준 96웰 플레이트 분석 (Multiscreen MIC 플레이트 (Millipore))을 사용하여 평가하였다. 트랜스펙션된 세포주의 경우 5 ㎛의 필터를 사용하였으며, 일차 세포의 경우에는 3 ㎛의 필터를 사용하였다. 반응 세포 (300.19 CXCR3+; MBP-특이성 인간 PBMC 세포)를 1 x 10^6개의 세포로 주화성용 완충제 (RPMI + 1% BSA 또는 FBS)에 재현탁시켰다. 100 ㎕의 세포 현탁물을 상부의 웰에 첨가하고 37℃에서 30분 동안 인큐베이션되게 하였다. 5% CO_2를 인가한 후 하부의 웰에 첨가하였다.

[0546] 인간 및 붉은털 원숭이 머카크 IP-10을 100 ng/ml로 제조하고, THP-1 유래의 IP-10일 경우, THP-1 세포를 IFN-γ (0.2 ng/ml)로 자극하고 상청액을 수집하였으며, MS CSF 유래의 IP-10은 순수한 것으로 사용하였다. 리간드는 150 μL의 주화성용 완충제 중에 제조하고 하부 챔버에 두었다.

[0547] 주화성 억제 분석에 있어서, 리간드는 다양한 농도의 지시된 항-IP-10 항체 (5 ㎍/ml, 2.5 ㎍/ml, 1.25 ㎍/ml, 0.613 ㎍/ml, 0.3 ㎍/ml, 0.015 ㎍/ml)와 함께 37℃, 5% CO_2에서 30분 동안 예비 인큐베이션한 후 분석을 하였다. 상부 챔버를 웰 위에 두고, 웰을 37℃, 5% CO_2에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 마지막에, 반응 세포를 상부 챔버로부터 흡인하였다. 상부 챔버를 조심스럽게 제거하였다. 세포를 400x의 배율로 4개의 랜덤 필드 (field)/웰에서 카운팅하였다. 데이타를 3개의 웰의 것을 평균하고 주화성 지수로 제시하였다 (즉, 배지 단독에 비하여 리간드에 반응하는 이동의 배수 (fold)).

[0548] IC_{50} 값으로 표현되는 결과가 하기 표 8에 요약되어 있다:

표 8

IP-10 유도된 세포 이동의 억제

클론 ID	rhIP-10 IC_{50} (μg/ml)	THP-1 IP-10 IC_{50} (μg/ml)	rrmIP-10 IC_{50} (μg/ml)
6A5 (배치 2)	0.156	0.132	0.119
8F6	0.355	0.173	0.100
6B10	1.1	0.193	0.149
10A12S	0.115	0.211	15.1
1D4	0.156	0.247	0.163

[0549]

[0550] 다발성 경화증 (MS) 환자 유래의 뇌척수액 (CSF)에 반응하는 CXCR3-발현 300.19 세포의 이동을 억제하는 항-IP-10 항체의 능력도 조사하였다. 또, 2.5 μg/ml의 항-MIG 항체를 CSF 샘플에 첨가하여 MIG 활성을 중화시켰다. IC_{50} 값으로 표현되는 두 실험으로부터의 결과가 하기 표 9에 요약되어 있다.

표 9

MS-CSF 유도된 세포 이동의 억제

클론 ID	실험 1 IC_{50} (μg/ml)	실험 2 IC_{50} (μg/ml)
6A5 (배치 2)	0.100	0.236
10A12S	0.562	0.577

[0551]

[0552] 세포 이동은 또한 CXCR3-발현 300.19 세포 및 200 ng/ml의 재조합 인간 MIG (R&D Systems)를 사용하여 수행하여 MIG-유도된 세포 이동을 억제하는 항-IP-10 항체의 능력을 조사하였다. 항-IP-10 항체인 6B10, 8F6, 1D4, 6A5 배치 2, 10A12 및 10A12S를 1 μg/ml로 하여 개별적으로 시험하였는데 이들은 MIG-유도된 세포 이동을 억제하지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0553] **실시예 7: MS 환자의 뇌 박편에의 항체의 결합**

[0554] 본 실시예에 있어서, 다발성 경화증 (MS) 환자 유래의 뇌 박편 (section)을 염색 (stain)하는 항-IP-10 항체의 능력을 조사하였다. 57세의 여성 MS 환자 유래의 뇌 박편을 부검 후 19.8시간에 수득하였는데 이것에는 남아있는 백질 전반에 걸쳐 다수의 추가의 보다 작은 반점 (plaque)이 존재하면서 불규칙적인 형상의 뇌실 주위 반점 (1.3 cm x 1.0 cm)이 나타났다. LFB 염색에 의하면 완전한 탈수초가 나타났다. 면역 조직 화학적 실험은 6A5 (배치 2) 및 10A12S 항-IP-10 항체와, 양성 대조 및 음성 대조 항체로서 항-GFAP 및 항-CD68을 사용하여 상기 박편 상에서 수행하였다.

[0555] 표준적인 면역 조직 화학적 프로토콜을 상기 박편의 항-IP-10 스테이닝에 이용하였다. 박편은 2%-10% 혈청을 사용하여 차단하였다. 2% 혈청 중에 1:100으로 희석시킨 100 μl/박편의 일차 항체 (예를 들어 6A5)를 첨가하고, 이어서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 선택적으로는, 박편을 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하고 세척하였다. 이어서 이차 항-인간 비오티닐화 항체 (2% 혈청 중에 희석시킴 (100 μl/박편))를 첨가하고 실온에서 30-60분간 인큐베이션하였다. 내인성 퍼옥시다제는 MeOH 중의 묽은 H_2O_2를 첨가하여 제거하였다. 다음, ABC 용액 (Vector Labs)을 100 μl/박편으로 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. DAB 기질 용액을 사용 직전에 제조하였다. 100 μl/박편을 슬라이드에 적용한 후 (발색이 필요할 경우) 암소에서 10-20분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 슬라이드를 헤마톡실린 핵 염색으로 3분 동안 대조 염색하였다 (진행은 1분 후 체크함). 마지막으로 슬라이드를 45초 동안 2% 중탄산나트륨에서 인큐베이션하여 발색시켰다.

[0556] 그 결과에 의하면, 6A5 및 10A12S 둘 모두가 MS 환자의 뇌 박편에서 원위치에서 IP-10에 결합할 수 있음이 나타

났는데, 6A5 염색이 10A12S 염색보다 강렬하였다.

[0557] 실시예 8: 트랜스제닉 마우스의 HCo17 주의 제작

[0558] HCo17 트랜스제닉 마우스 주는 pHC2의 80 kb 삽입체 (insert) (문헌[Taylor 등 (1994) Int. Immunol., 6: 579-591]), pVX6의 25 Kb 삽입체, 및 yIgH24 염색체의 대략 460 kb의 효모 인공 염색체 단편의 공동 주입 (coinjection)으로 생성하였다. pHC2 제작물 단독은 생체 내에서 전적으로 재배열되어 작용성 인간 중쇄 면역글로불린 유전자좌를 형성할 수 있으며, pVX6 및 yIgH24를 부가하여 추가의 생식 세포 V_H의 다양성을 제공하였다. HCo17의 생성을 위하여 사용된 DNA 혼합물의 개개의 성분이 하기에 기술되어 있다.

[0559] 상기에 기술되어 있는 pHC2 삽입체는 하기의 4개의 작용성 인간 생식 세포 V_H 유전자 절편을 포함한다: 1-69 (DP-10), 5-51 (DP-73), 4-34 (DP-63), 및 3-30.3 (DP-46). 또한, 이 제작물은 15개의 작용성 D 절편, 모든 6개의 J 절편과, μ 및 γ1 불변 영역 절편 및 작용성 μ-γ1 스위치 영역을 포함하는 인간 게놈 서열도 포함한다.

[0560] pVX6 삽입체는 3개의 인간 생식 세포 VH 절편인 VH1-18 (DP-14), VH5-51 (DP-73) 및 VH3-23 (DP-47)을 포함한다. 대략 2.5 kb의 5' 측면 게놈 서열, 및 5 kb의 3' 측면 게놈 서열과 함께, 생식 세포 인간 VH1-18 (DP-14) 유전자를 포함하는 8.5 kb의 HindIII/SalI DNA 단편을 플라스미드 벡터 pSP72 (Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 내로 서브클로닝하여 플라스미드 p343.7.16을 생성하였다. 대략 5 kb의 5' 측면 게놈 서열, 및 1 kb의 3' 측면 게놈서열과 함께, 생식 세포 인간 VH5-51 (DP-73) 유전자를 포함하는 7 kb의 BamHI/HindIII DNA 단편을 pBR322 기반의 플라스미드 클로닝 벡터 pGP1f (문헌[Taylor 등 (1992) Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295]) 내로 클로닝하여 플라스미드 p251f를 생성하였다. pGP1f로부터 유래되는 새로운 클로닝 벡터 pGP1k를 EcoRV/BamHI으로 절단하고, 대략 4 kb의 5' 측면 게놈 서열 및 5 kb의 3' 측면 게놈 서열과 함께, 생식 세포 인간 VH3-23 (DP47) 유전자를 포함하는 10 kb의 EcoRV/BamHI DNA 단편에 라이게이션하였다. 생성된 플라스미드 p112.2RR.7을 BamHI/SalI으로 절단하고, p251f의 7 kb의 정제된 BamHI/SalI 삽입체를 라이게이션시켰다. 생성된 플라스미드 pVx4를 XhoI으로 절단하고 p343.7.16의 8.5 kb의 XhoI/SalI 삽입체를 라이게이션시켰다. 다른 2개의 V 유전자와 동일한 배향의 VH1-18 유전자를 포함하는 클론을 수득하였다. 이어서 Vx6로 명명된 이 클론을 삽입체 제조를 위하여 NotI으로 절단하였다.

[0561] 효모 인공 염색체 (YAC) yIgH24는, VH3 및 VH4 패밀리 특이적 프라이머를 사용하여 PCR 스크리닝으로 원래 동정되었으며 VH 함유량에 의해 인간 염색체 14에 지도화되었다. yIgH24는 VH 패밀리인 VH1, VH2, VH3, VH4, 및 VH5, 특히 적어도 VH1-24, VH1-45, VH1-46, VH2-26, VH3-30, V 3-30.5, VH3-30.3, VH3-33, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH4-28, VH4-30, VH4-30.4, VH4-30.3, VH4-31, VH4-34,4-39, 및 VH5-51의 구성원을 비롯한 VH 절편을 포함하는 것으로 확립되었다.

[0562] pVX6 (26 kb), pHC2 (80 kb), 및 yIgH24 (대략 460 kb) 유래의 정제된 삽입체를 1:1의 몰비로 조합하고, 문헌[Hogan 등, B. Hogan 등, Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 2nd edition, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N. Y.]에 기술되어 있는 바와 같이 1/2일 (C57BL/6J x DBA/2J) F2 배아의 전핵 내로 미세 주입하였다. pVx6, HC2 및 yIgH24 유래의 서열을 포함하는 트랜스제닉 마우스의 시조 (founder) 주를, 미세 주입된 배아로부터 발달한 마우스로부터 확립하였다. 이 주를 (HCo17) 25950으로 명명하였다.

[0563] 이어서 (HCo17) 25950 주를, CMD 돌연변이 (PCT 공보 제WO 01/09187호의 실시예 1에 기술되어 있음), JKD 돌연변이 (문헌[Chen 등 (1993) EMBO J. 12: 811-820]), 및 (KCo5) 9272 트랜스진 (문헌[Fishwild 등 (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851])을 포함하는 마우스와 교배시켰다. 생성된 마우스는 내인성 마우스 중쇄 및 카파 경쇄 유전자좌의 파괴에 있어서 배경 (background) 동형 접합성으로 인간 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 트랜스진을 발현한다.

[0564] 서열 목록의 개요

서열 번호	서열	서열 번호	서열
1	VH CDR1 a.a. 1D4	24	VH CDR3 a.a. 1D4
2	VH CDR1 a.a. 1E1	25	VH CDR3 a.a. 1E1
3	VH CDR1 a.a. 2G1	26	VH CDR3 a.a. 2G1
4	VH CDR1 a.a. 3C4	27	VH CDR3 a.a. 3C4
5	VH CDR1 a.a. 6A5	28	VH CDR3 a.a. 6A5
6	VH CDR1 a.a. 6A8	29	VH CDR3 a.a. 6A8
7	VH CDR1 a.a. 6B10	30	VH CDR3 a.a. 6B10
8	VH CDR1 a.a. 7C10	31	VH CDR3 a.a. 7C10
9	VH CDR1 a.a. 8F6	32	VH CDR3 a.a. 8F6
10	VH CDR1 a.a. 10A12	33	VH CDR3 a.a. 10A12
11	VH CDR1 a.a. 10A12S	34	VH CDR3 a.a. 13C4
12	VH CDR1 a.a. 13C4		
		35	VH a.a. 1D4
13	VH CDR2 a.a. 1D4	36	VH a.a. 1E1
14	VH CDR2 a.a. 1E1	37	VH a.a. 2G1
15	VH CDR2 a.a. 2G1	38	VH a.a. 3C4
16	VH CDR2 a.a. 3C4	39	VH a.a. 6A5
17	VH CDR2 a.a. 6A5	40	VH a.a. 6A8
18	VH CDR2 a.a. 6A8	41	VH a.a. 6B10
19	VH CDR2 a.a. 6B10	42	VH a.a. 7C10
20	VH CDR2 a.a. 7C10	43	VH a.a. 8F6
21	VH CDR2 a.a. 8F6	44	VH a.a. 10A12
22	VH CDR2 a.a. 10A12	45	VH a.a. 10A12S
23	VH CDR2 a.a. 13C4	46	VH a.a. 13C4
47	VH 3-33 생식세포 a.a.	49	VH 5-51 생식세포 a.a.
48	VH 3-30.3 생식세포 a.a.	50	VH 4-61 생식세포 a.a.

[0565]

서열 번호	서열	서열 번호	서열
51	Vk CDR1 a.a. 1D4	73	Vk CDR3 a.a. 1D4
52	Vk CDR1 a.a. 1E1	74	Vk CDR3 a.a. 1E1
53	Vk CDR1 a.a. 2G1	75	Vk CDR3 a.a. 2G1
54	Vk CDR1 a.a. 3C4	76	Vk CDR3 a.a. 3C4
55	Vk CDR1 a.a. 6A5	77	Vk CDR3 a.a. 6A5
56	Vk CDR1 a.a. 6A8	78	Vk CDR3 a.a. 6A8
57	Vk CDR1 a.a. 6B10	79	Vk CDR3 a.a. 6B10
58	Vk CDR1 a.a. 7C10	80	Vk CDR3 a.a. 7C10
59	Vk CDR1 a.a. 8F6	81	Vk CDR3 a.a. 8F6
60	Vk CDR1 a.a. 10A12	82	Vk CDR3 a.a. 10A12
61	Vk CDR1 a.a. 13C4	83	Vk CDR3 a.a. 13C4
62	Vk CDR2 a.a. 1D4	84	Vk a.a. 1D4
63	Vk CDR2 a.a. 1E1	85	Vk a.a. 1E1
64	Vk CDR2 a.a. 2G1	86	Vk a.a. 2G1
65	Vk CDR2 a.a. 3C4	87	Vk a.a. 3C4
66	Vk CDR2 a.a. 6A5	88	Vk a.a. 6A5
67	Vk CDR2 a.a. 6A8	89	Vk a.a. 6A8
68	Vk CDR2 a.a. 6B10	90	Vk a.a. 6B10
69	Vk CDR2 a.a. 7C10	91	Vk a.a. 7C10
70	Vk CDR2 a.a. 8F6	92	Vk a.a. 8F6
71	Vk CDR2 a.a. 10A12	93	Vk a.a. 10A12
72	Vk CDR2 a.a. 13C4	94	Vk a.a. 13C4
95	Vk A27생식세포 a.a.	97	Vk L18 생식세포a.a.
96	Vk L6 생식세포 a.a.	98	Vk L15 생식세포 a.a.

[0566]

서열 번호	서열	서열 번호	서열
99	VH n.t. 1D4	121	인간 IP-10 a.a.
100	VH n.t. 1E1	122	인간 CXCR3 a.a.
101	VH n.t. 2G1	123	붉은털 원숭이 IP-10 a.a.
102	VH n.t. 3C4	124	생쥐 IP-10 a.a.
103	VH n.t. 6A5	125	인간 Mig a.a.
104	VH n.t. 6A8	126	인간 ITAC a.a.
105	VH n.t. 6B10		
106	VH n.t. 7C10		
107	VH n.t. 8F6		
108	VH n.t. 10A12		
109	VH n.t. 13C4		
110	Vk n.t 1D4		
111	Vk n.t. 1E1		
112	Vk n.t. 2G1		
113	Vk n.t. 3C4		
114	Vk n.t. 6A5		
115	Vk n.t. 6A8		
116	Vk n.t. 6B10		
117	Vk n.t. 7C10		
118	Vk n.t. 8F6		
119	Vk n.t. 10A12		
120	Vk n.t 13C4		

[0567]

[0568] **균등 범위**

[0569] 당업계의 숙련자라면, 일상적일 뿐인 실험을 이용하여 본원에 기술된 본 발명의 특정 실시 형태의 다수의 균등 범위의 실시 형태를 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 균등 범위를 하기의 청구의 범위에 포함시키려고 한다.

도면

도면1a

항-IP10 1D4 VH

V 절편: 3-33
D 절편: 3-10
J 절편: JH6b

```
      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S
      L
1     CAG GTG CAG TTG 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  G  M  H
      W
55    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC
      TGG

                                                     CDR2

      ---------------------
      V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V  I  W  F
      E
109   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TTT
      GAA

                  CDR2
      -----------------------------------------------
      G  S  I  K  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S
      R
163   GGA AGT ATT AAA TAC TAT 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
217   GAC AAT TCC AAG AAT ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG
      GAC

                                                  CDR3
      ---------------------------------------------
      T  A  V  Y  Y  C  A  R  E  G  A  G  S  S  L  Y  Y
      Y
271   ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGA GAG GGT GCG GGG AGT TCT CTC TAC TAC
      TAC

          CDR3
      --------------------
      Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
325   TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

도면1b

항-IP10 1D4 VK

V 절편: A27
J 절편: JK2

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
     R
  1  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   G   H   L   A
     W
 55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC GGA CAC TTA GCC
     TGG

                                                                  CDR2

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

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


     ~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C
     Q
217  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   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I
     K
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC
     AAA
```

도면2a

항-IP10 1E1 VH

V 절편 : VH3-33
D 절편 : 미결정
J 절편 : JH3a

```
      Q   E   Q   L   V   E   S   G   G   N   V   V   Q   P   G   R   S
      L
1     CAG GAG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA AAC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC
      CTG

                                                        CDR1
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   T   Y   G   M   H
      W
55    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTT AGT ACT TAT GGC ATG CAC
      TGG

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

                    CDR2
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      G   S   D   K   Y   Y   A   D   S   V   K   D   R   F   T   V   S
      K
163   GGA AGT GAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GAC CGA TTC ACG GTC TCC
      AAA

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

                                                    CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   N   I   A   V   A   D   V   A   F
      D
271   ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA AAT ATA GCA GTG GCT GAC GTT GCT TTT
      GAT

      CDR3

      ~~~
      L   W   G   Q   G   T   M   V   T   V   S   S
325   CTC TGG GGC CAG GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
```

도면2b

항-IP10 1E1 VK

V 절편 : L6
J 절편 : JK4

```
     E   I   V   L   T   Q   S   P   A   I   L   S   L   S   P   G   E
R
1    GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ATC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA
AGA

                                CDR1
                            ----------------------------------------
     A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W
Y
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG
TAC

                                                                CDR2

                    ----------
     Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N
R
109  CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC
AGG

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

     CDR3

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

               CDR3
     ----------------------------------
     R   S   N   W   P   P   L   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I
K
271  CGT AGC AAC TGG CCT CCA CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC
AAA
```

도면3a

항-IP10 2G1 VH

V 절편 : 3-33
D 절편 : 미결정
J 절편 : JH6b

```
     Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
1    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   N   C   G   M   H   W
55   AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TGT GGC ATG CAC TGG

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

                    CDR2
     ----------------------------------------------
     G   I   N   E   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163  GGA ATT AAT GAA TAC TAT 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
217  GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

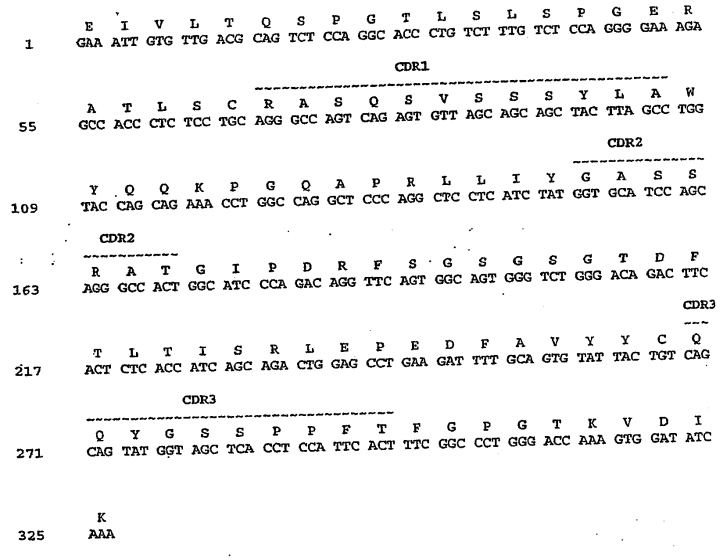
                                                CDR3
                                                ----------------------------------
     T   A   V   F   Y   C   A   R   D   W   P   E   G   Y   Y   N   G   M
271  ACG GCT GTG TTT TAC TGT GCG AGA GAC TGG CCT GAG GGC TAC TAC AAC GGC ATG

     CDR3
     --------
     D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325  GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

도면3b

항-IP10 2G1 VK

V 절편 : A27
J 절편 : JK3



도면4a

항-IP10 3C4 VH

V 절편 : 5-51
D 절편 : D2-15
J 절편 : JH1

```
    E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G   E   S
L
1   GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT
CTG
                                                              CDR1
                                                         ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    K   I   S   C   K   G   S   G   Y   N   F   P   S   Y   W   I   G
W
55  AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AAC TTT CCC AGC TAC TGG ATC GGC
TGG
                                                                CDR2
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    V   R   Q   M   P   G   K   G   L   E   W   M   G   V   I   S   P
G
109 GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG GTC ATC TCT CCT
GGT
                CDR2
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    D   S   D   T   R   Y   S   P   S   F   Q   G   Q   V   T   I   S
A
163 GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAA GTC ACC ATC TCA
GCC

    D   K   S   I   S   T   A   Y   L   Q   W   S   S   L   K   A   S
D
217 GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG
GAC
                                                      CDR3
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    T   A   M   Y   Y   C   A   R   G   Y   C   S   G   G   S   C   Y
P
271 ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA GGA TAT TGT AGT GGT GGT AGC TGC TAC
CCA
        CDR3
~~~~~~~~~~~~~~~~~
    F   F   Q   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
325 TTC TTC CAG TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCC
```

도면4b

항-IP10 3C4 VK

V 절편 : L18
J 절편 : JK4

```
    A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
1   GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC 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
55  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   D   A   S   S   L
109 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG
CDR2
~~~~~~~
    E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 GAA AGT 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
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG
         CDR3
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
    F   D   S   F   P   H   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271 TTT GAT AGT TTC CCT CAC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

도면5a

항-IP10 6A5 VH

V 절편 : 3-33
D 절편 : 3-10
J 절편 : JH6b

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

                                                            CDR1
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        R   L   S   C   T   A   S   G   F   T   F   S   N   N   G   M   H
        W
55      AGA CTC TCC TGT ACA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC AAT GGC ATG CAC
        TGG

                                                                CDR2

        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   W   F
        D
109     GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TTT
        GAT

                        CDR2
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        G   M   N   K   F   Y   V   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S
        R
163     GGA ATG AAT AAA TTC TAT GTA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC
        AGA

        D   N   S   K   N   T   L   Y   L   E   M   N   S   L   R   A   E
        D
217     GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG GAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG
        GAC

                                                    CDR3
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        T   A   I   Y   Y   C   A   R   E   G   D   G   S   G   I   Y   Y
        Y
271     ACG GCT ATA TAT TAC TGT GCG AGA GAA GGG GAT GGT TCG GGG ATT TAT TAC
        TAC

            CDR3
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325     TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

도면5b

항-IP10 6A5 VK

V 절편 : A27
J 절편 : JK3

```
        E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1       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
55      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAT TTA GCC TGG

                                                        CDR2
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~
        Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109     TAC CAG CAG AAA 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
163     AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                CDR 3
                                                                ~~~~
        T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217     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   I   F   T   F   G   P   G   T   K   V   D   I
271     CAG TAT GGT AGC TCA CCT ATA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC

        K
325     AAA
```

도면6a

항-IP10 6A8 VH

V 절편 : 3-33
D 절편 : 미결정
J 절편 : JH6b

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

                                                          CDR1
                                                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     R   L   S   C   T   A   S   G   F   T   F   S   T   Y   G   M   H
     W
55   AGA CTC TCC TGT ACA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT GGC ATG CAC
     TGG

                                                                  CDR2
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   I   I   W   F
     D
109  GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA ATT ATA TGG TTC
     GAT

                     CDR2
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     G   S   N   E   D   Y   A   A   S   V   K   G   R   F   T   I   S
     R
163  GGA AGT AAT GAA GAT TAT GCA GCC 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
217  GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG
     GAC

                                                  CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     T   A   V   Y   Y   C   A   R   E   G   D   G   S   S   L   Y   Y
     Y
271  ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GGG GAT GGG AGC TCC TTA TAC TAC
     TAC

         CDR3
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325  TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

도면6b

항-IP10 6A8 VK

V 절편 : A27
J 절편 : JK4

```
     E   V   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
R
1    GAA GTT 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   I   S   S   G   Y   L   A
W
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT ATT AGC AGC GGC TAC TTA GCC
TGG

                                                                CDR2

     ~~~~~~~~~~~~~~~~
     Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S
S
109  TAC CAG CAG AAA 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
163  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
217  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   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

도면7a

항-IP10 6B10 VH

V 절편 : 3-30.3
D 절편 : 5-12
J 절편 : JH4b

```
     Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
  1  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   N   S   A   M   H   W
 55  AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TCT GCT ATG CAC
TGG
                                                         CDR2
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   L   I   P   F   D
109  GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA CCA TTT
GAT
                 CDR2
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     G   Y   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163  GGA TAC AAT AAA TAC 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
217  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   A   R   E   G   G   Y   T   G   Y   D   G   G
271  ACG GCT GTG TAT TAC TGC GCG AGA GAA GGT GGA TAT ACT GGC TAC GAT GGG
GGA

     CDR3
     ~~~~~~~~~~~
     F   D   Y   W   G   Q   G   I   L   V   T   V   S   S
325  TTT GAC TAT TGG GGC CAG GGA ATC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

도면7b

항-IP10 6B10 VK

V 절편 : L6
J 절편 : JK2

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
      R
1     GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA
      AGA

                                CDR1
                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W
      Y
55    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG
      TAC

                                                                CDR2
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N
      R
109   CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC
      AGG

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


      CDR3

      ~~~~~~~
      L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
      Q
217   CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG
      CAG

                CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      R   S   N   W   P   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I
      K
271   CGT AGC AAC TGG CCT CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC
      AAA
```

도면8a

항-IP10 7C10 VH

V 절편 : 3-33
D 절편 : 3-10
J 절편 : JH4b

```
                                                                  CDR1
                                                  ------------------
      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
1     CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                                  R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   S   G   M   H   W
55    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TCT GGC ATG CAC TGG

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

                      CDR2
------------------------------------------------
      G   I   I   Q   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163   GGA ATT ATT CAA TAC TAT GCC GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   I   N   S   L   R   A   E   D
217   GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATA AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

                                                  CDR3
                                  ------------------
      T   A   V   Y   Y   C   A   T   E   R   G   T   H   Y   Y   G   S   G
271   ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACA GAG AGG GGC ACG CAT TAC TAT GGT TCG GGG

        CDR3
----------------
      S   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
325   AGT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

도면8b

항-IP10 7C10 VK

V 절편 : L15
J 절편 : JK4

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

                                  CDR1
                  ------------------------------------------------
      V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A   W
Y
55    GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG
TAT

                                                                  CDR2
      ----------------------
      Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A   S   S
L
109   CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT
TTG

      CDR2
      --------
      Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
T
163   CAA AGT 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
217   CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA
CAG

            CDR3
      ----------------------------
      Y   N   S   Y   P   P   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271   TAT AAT AGT TAC CCT CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

도면9a

항-IP10 8F6 VH

V 절편 : 3-30.3
D 절편 : 6-13
J 절편 : JH4b

```
     Q   V   Q   L   V   D   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L
   1 CAG GTG CAA CTG GTG GAC TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC
CTG

                                                                 CDR1
                                                                 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   N   T   Y   G   M   H   W
  55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AAT ACC TAT GGC ATG CAC
TGG

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

                        CDR2
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     G   I   I   K   H   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   T   R
 163 GGA ATC ATT AAA CAC TAC GCC GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATA ACC
AGA

     D   N   S   K   N   M   V   H   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D
 217 GAC AAT TCC AAG AAC ATG GTG CAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG
GAC

                                                         CDR3
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
     T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   S   S   S   W   Y   V   Y   F   D
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT AGC AGC AGC TGG TAC GTC TAC TTT
GAC

     CDR3
     ~~~~~~~~~~~~
     Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
 325 TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

도면9b

항-IP10 8F6 VK

V 절편 : L6
J 절편 : JK1

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
     R
  1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA
     AGA

                                CDR1
                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   V   A   W
     Y
 55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC GTA GCC TGG
     TAC

                                                                CDR2
                                                                ~~~~
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N
     R
109  CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC
     AGG

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


      CDR3
      ~~~~~~~~
      L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   I   Y   Y   C   Q
     Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA ATT TAT TAC TGT CAG
     CAG


                CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      R   S   N   S   P   P   W   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I
     K
271  CGT AGC AAC TCG CCT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC
     AAA
```

도면10a

항-IP10 10A12 VH

V 절편 : 3-33
D 절편 : 미결정
J 절편 : JH6b

```
      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
      L
1     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   N   C   G   M   H
      W
55    AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TGT GGC ATG CAC
      TGG

                                                                  CDR2
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   L   I   G   F
      D
109   GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA GGG TTT
      GAT

                    CDR2
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      G   I   N   E   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S
      R
163   GGA ATT AAT GAA TAC TAT 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
217   GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG
      GAC

                                              CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   W   P   E   G   Y   Y   N   G
      M
271   ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGA GAC TGG CCT GAG GGC TAC TAC AAC GGC
      ATG

      CDR3
      ~~~~~~~~
      D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325   GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

도면10b

항-IP10 10A12 VK

V 절편 : A27
J 절편 : JK3

```
     E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
     R
1    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
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC
     TGG

                                                                CDR2
     ~~~~~~~~~~~~~~~~
     Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S
     S
109  TAC CAG CAG AAA 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
163  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
217  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   F   T   F   G   P   G   T   K   V   D
     I
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCT CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT
     ATC


     K
325  AAA
```

도면11a

항-IP10 13C4 VH

V 절편 : 4-61
D 절편 : 3-10
J 절편 : JH6b

```
      Q   V   Q   L   Q   E   S   G   P   G   L   V   K   P   S   E   T
      L
1     CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC
      CTG

                                                                CDR1

      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      S   L   T   C   T   I   S   G   G   S   V   S   S   G   D   Y   Y
      W
55    TCC CTC ACC TGC ACT ATC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GGT GAT TAC TAC
      TGG

      CDR1                                                          CDR2
      ~~~
      ~~~~~~~~~~~
      S   W   I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   N   I
      Y
109   AGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG AAC ATC
      TAT

                      CDR2
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   S   G   S   T   N   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I
      S
163   TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA
      TCG

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

                                                    CDR3

      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   G   T   V   V   R   G
      I
271   GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGG GGT ACT GTG GTT CGG GGA
      ATT

                  CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      I   H   Y   Y   Y   Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T
      V
325   ATC CAT TAC TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG
      GTC

      T   V   S   S
379   ACC GTC TCC TCA
```

도면11b

항-IP10 13C4 VK

V 절편 : A27
J 절편 : JK2

```
                E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
                R
1               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
55              GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC
                TGG

                                                                            CDR2

                ~~~~~~~~~~~~~~~~
                Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S
                S
109             TAC CAG CAG AAA 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
163             AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC
                TTC

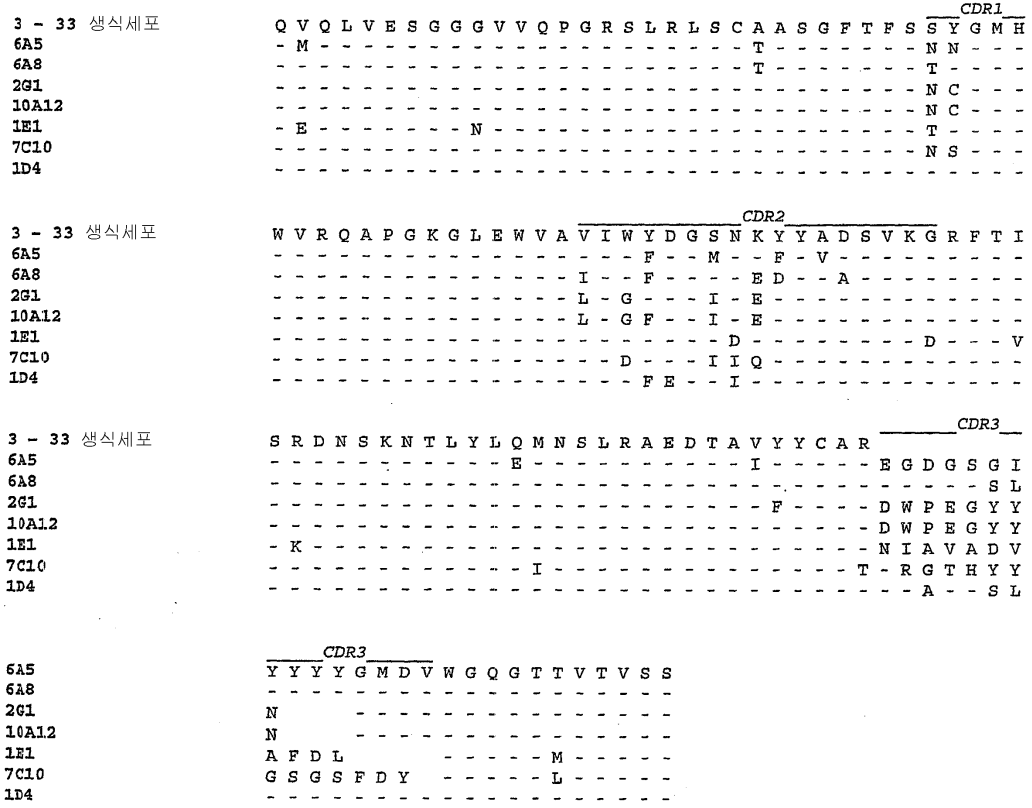

                CDR3

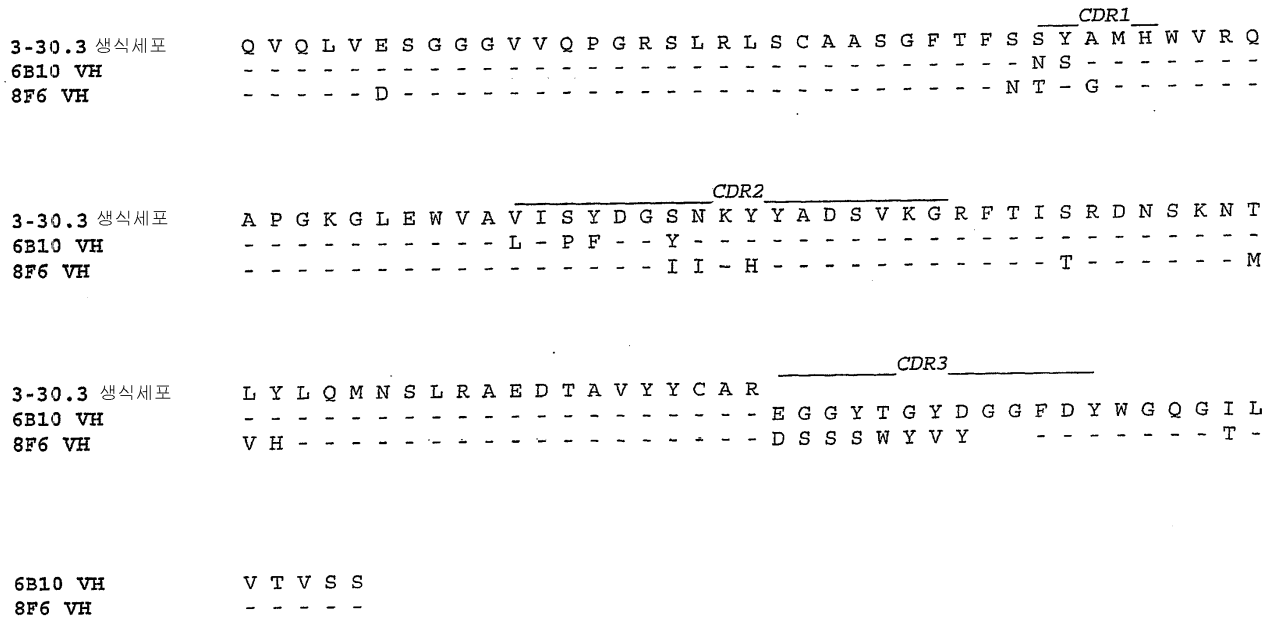
                ~~~~
                T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C
                Q
217             ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT
                CAG

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


                 K
325             AAA
```

도면12




CDR1
3-30.3 생식세포 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W V R Q
6B10 VH - N S - - - - - - -
8F6 VH - - - - - D - N T - G - - - - - -
CDR2
3-30.3 생식세포 A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T
6B10 VH - - - - - - - - - - L - P F - - Y -
8F6 VH - - - - - - - - - - - - - - - - I I - H - - - - - - - - - - T - - - - - - M
CDR3
3-30.3 생식세포 L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
6B10 VH - E G G Y T G Y D G G F D Y W G Q G I L
8F6 VH V H - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D S S S W Y V Y - - - - - - - T -
6B10 VH V T V S S
8F6 VH - - - - -

도면14

CDR1
CDR2
CDR3
CDR3
5-51 생식세포
3C4 VH
E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T S Y W I G
- -
5-51 생식세포
3C4 VH
W V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q V T I
- - - - - - - - - - - - - - - - V - S - - - - - - - - - - - - - - - -
5-51 생식세포
3C4 VH
S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R
- G Y C S G G G S
3C4 VH
C Y P F F Q Y W G Q G T L V T V S S

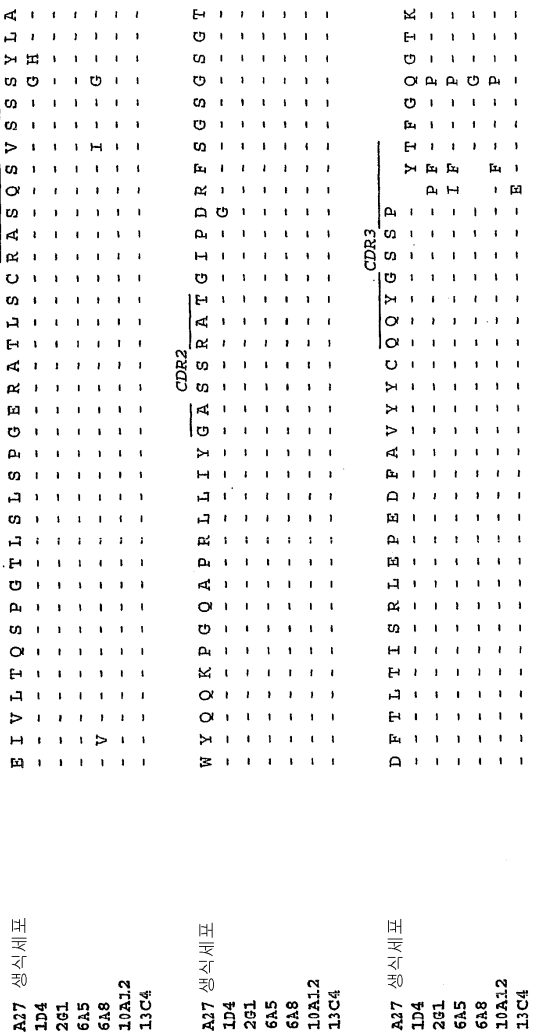
도면15

```
                                                CDR1
4-61 생식세포 :  Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G S Y Y W S W I R Q P
13C4 VH:         - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - I - - - - - - - - - - D - - - - - - - -

                                    CDR2
4-61 생식세포 :  P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L
13C4 VH:         - - - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                CDR3
4-61 생식세포 :  S S V T A A D T A V Y Y C A R _____________________________ W G Q G T T V T V S
13C4 VH:         - - - - - - - - - - - - - G G G T V V R G I I H Y Y Y Y G M D V
S
```

도면16


CDR1
A27 생식세포 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A
1D4 - G H - -
2G1 -
6A5 -
6A8 - V - I - - G - - - -
10A12 -
13C4 -
CDR2
A27 생식세포 W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T
1D4 - G - - - - - - - - - - -
2G1 -
6A5 -
6A8 -
10A12 -
13C4 -
CDR3
A27 생식세포 D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P Y T F G Q G T K
1D4 -
2G1 - P F - - P - - - -
6A5 - I F - - P - - - -
6A8 - G - - - -
10A12 - F - - P - - -
13C4 - E - - - - - -
A27 생식세포 L E I K
1D4 V D - -
2G1 V D - -
6A5 V - - -
6A8 V D - -
10A12 - - - -
13C4

도면17

CDR1
CDR2
CDR3
L6 생식세포 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A
1E1 - - - - - - - I -
6B10 -
8F6 - V -
L6 생식세포 W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G
1E1 -
6B10 -
8F6 -
L6 생식세포 T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P P L T F G G G
1E1 - Y - - - Q -
6B10 -
8F6 - - - - - - - - - - - - - - - - - - I - - - - - - - S - - W - - - Q -
1E1 T K V E I K
6B10 - - L - - -
8F6 - - - - - -

도면18

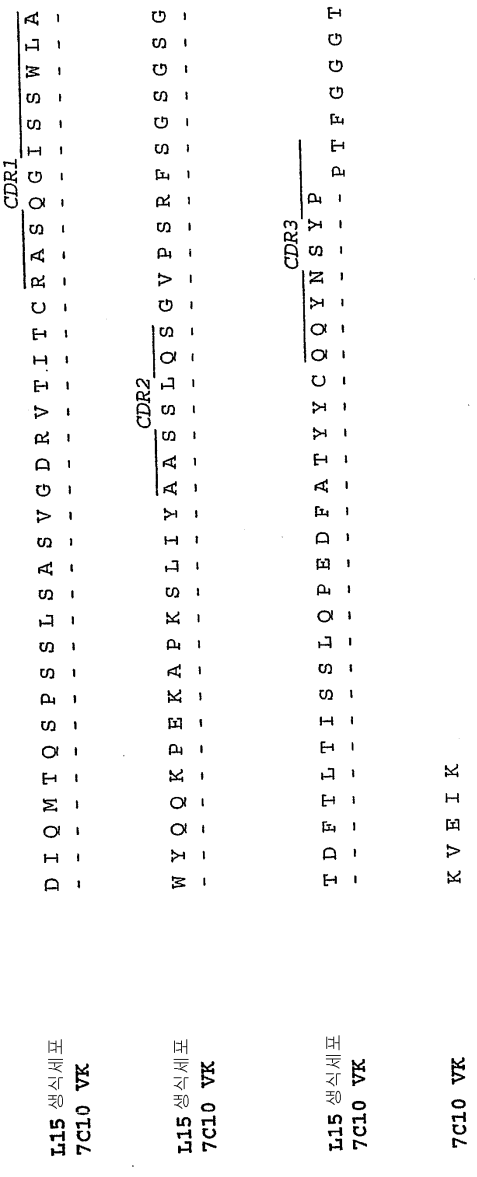
```
                                                                 CDR1
L18 생식세포:  A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S A L A
3C4 VK:       - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                   CDR2
L18 생식세포:  W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G
3C4 VK:       - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

                                                              CDR3
L18 생식세포:  T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P
3C4 VK:       - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D - F - H T F G G G T

3C4 VK:       K V E I K
```

도면19



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부