



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0041951  
(43) 공개일자 2014년04월04일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C07K 16/08 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)<br/>A61K 39/42 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-7006967(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2008년07월16일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2011-7001329<br/>원출원일자(국제) 2008년07월16일<br/>심사청구일자 2011년01월26일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2014년03월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2008/002683</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2010/007463<br/>국제공개일자 2010년01월21일</p> | <p>(71) 출원인<br/>인스티튜트 포 리서치 인 바이오메드슨<br/>스위스, 씨에이치-6500 벨린조나, 비아 빈센조 벨라 6</p> <p>(72) 발명자<br/>란자베시아, 안토니오<br/>스위스, 씨에이치-6500 벨린조나, 비아 빈센조 벨라 6, 인스티튜트 포 리서치 인 바이오메드슨<br/>마카그노, 아날리사<br/>스위스, 씨에이치-6500 벨린조나, 비아 빈센조 벨라 6, 인스티튜트 포 리서치 인 바이오메드슨</p> <p>(74) 대리인<br/>손민</p> |
|--|---|

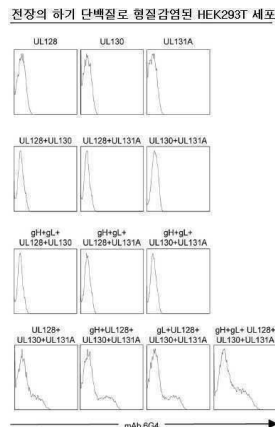
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 인간 사이토메갈바이러스 중화 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 사이토메갈바이러스 (hCMV)에 특이적인 중화 항체에 관한 것이며, 특히 본 발명의 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 특이적이다. 본 발명의 항체는 고효능으로 감염을 중화시킨다. 본 발명은 또한 이와 같은 항체를 생산하는 불사화된 B 세포, 이와 같은 항체가 결합하는 에피토프 뿐만 아니라, 스크리닝 방법 및 질환의 진단 및 치료에 이와 같은 항체 및 에피토프의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의해 인식되는 에피토프를 형성하는 복합체인, hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 복합체에 특이적이고, 또한 인간 사이토메갈바이러스 (hCMV)에 의한 내피세포, 망막세포 또는 수지상 세포의 감염을 중화시키며, 이때 hCMV 50% 중화에 요구되는 항체의 농도가  $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$  이하인, 분리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 에피토프는 상기 복합체의 세 가지 단백질에 의해 형성된 형태학적 에피토프 (conformational epitope)인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 포함하는, hCMV 감염 치료용 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서, hCMV 감염을 중화시키는 제2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 추가로 포함하는, 조성물.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제2 항체는 hCMV 단백질 gB, hCMV 단백질 gH, hCMV 단백질 UL128, hCMV 단백질 UL130/UL131A의 조합, hCMV 단백질 gM/gN의 조합, hCMV 단백질 gH/gL/UL128/UL130의 조합, 또는 hCMV 단백질 UL128/UL130/UL131A의 조합에 결합하는 것인, 조성물.

### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 단계를 포함하는, hCMV 감염 치료용 약제의 제조 방법.

### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 hCMV 감염을 중화시키는 제2 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는 단계를 포함하는, hCMV 감염 치료용 약제의 제조 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제2 항체는 hCMV 단백질 gB, hCMV 단백질 gH, hCMV 단백질 UL128, hCMV 단백질 UL130/UL131A의 조합, hCMV 단백질 gM/gN의 조합, hCMV 단백질 gH/gL/UL128/UL130의 조합, 또는 hCMV 단백질 UL128/UL130/UL131A의 조합에 결합하는 것인, 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 여기에서 언급된 모든 문헌은 그의 전체가 참고로 포함된다.

[0002] 본 발명은 인간 사이토메갈바이러스 (hCMV)의 중화에 고효능을 가지며, 그리고 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 특이적인 항체, 그리고 이와 같은 단클론 항체를 생산하는 불사화된 (immortalised) B 세포에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항체가 결합하는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 의해 결정된 에피토프 뿐만 아니라 스크리닝 방법, 질병의 진단, 예방 및 치료에 이와 같은 항체 및 에피토프의 이용에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0003] 인간 사이토메갈바이러스 (hCMV)는 면역억제된 성인 및 태아에 감염된 경우 심각한 병인의 원인이 될 수 있는 널리 분포된 병원균이며, 그리고 아테롬성 동맥경화증과 같은 만성 질환에 연루되어 있다. hCMV는 섬유아세포, 내피세포, 상피세포 및 조혈세포를 포함하는 다중 세포를 감염시킨다[1]. *in vitro*에서 후보 백신으로 개발되고 있는 hCMV의 변식된 감쇠된 균주들은 내피세포에 대한 친화성(tropism)을 상실하였으나, 섬유아세포를 감염시키는 능력은 보유하고 있다[2]. 두 가지 바이러스성 당단백질 복합체는 hCMV의 세포 친화성을 조절하는 것으로 보인다. 당단백질, 가령, gH, gL 및 gO의 복합체는 섬유아세포의 감염에 필요한 것으로 보이며, gH, gL 및 UL131-UL128 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 복합체는 내피세포, 상피세포 및 수지상 세포의 감염에 연루되어 있다[2-8]
- [0004] 과면역(Hyper immune) 글로블린은 이식과 연루된 hCMV 질환의 예방용으로 이미 시판되고 있으며, 그리고 최근 증거자료에서 과면역 글로블린은 임산부에서 치료효과를 가진다는 것이 설명되어 있다[9]. 이와 같은 치료 접근법은 전달되는 중화 항체의 적은 양으로 인하여 한계가 있으며, 이와 같은 이유로 높은 중화력을 가진 인간 항체 (가령, 인간 단클론 항체)의 이용성이 매우 바람직하다. 그러나, hCMV 중화 항체의 표적은 입증되어야 한다. gH, gB 그리고 UL128 및 UL130 유전자 산물에 대한 일부 항체는 *in vitro*에서 중화 활성이 설명되어 있고 [7, 10, 11], 또한 gH에 대한 항체는 임상 시험(치료 효과 부족으로 중단됨)에서 평가되었고, 지금까지 분리된 항체의 중화 효능은 중간 정도다. 중화는 0.5 내지 20 microgram/ml 범위의 항체 농도에서 관찰되었다. 더욱이, 현행 방법은 일반적으로 표적 세포로 섬유아세포를 이용하여 항-hCMV 항체의 중화 효능을 측정한다. 그러나, hCMV는 다른 세포 타입 가령, 내피세포, 상피세포 및 백혈구를 감염시켜 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. UL128 및 UL130에 대한 공지의 항체는 내피세포 감염을 중화시키는데 매우 낮은 효능을 보이며[7], 그리고 비-섬유아세포 표적 세포의 감염을 높은 효율로 중화시킬 수 있는 이용가능한 임의의 단클론 항체는 없는 것으로 보인다.
- [0005] 따라서, 비-섬유아세포 표적 세포의 hCMV 감염을 더 높은 효능으로 중화시키는 항체가 필요하며, 뿐만 아니라 이와 같은 항체가 결합하는 표적을 밝힐 필요가 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 hCMV 감염을 높은 효능으로 중화시키는 신규한 항체 뿐만 아니라 본 발명의 항체가 결합하는 신규한 에피토프의 발견에 일부 근거한다. 따라서, 한 구체예에서, 본 발명은 hCMV 중화에 고효능을 가지는 중화 항체 또는 항체 단편을 포함하며, 여기서, 상기 항체 또는 항체 단편은 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 특이적이다.

### 과제의 해결 수단

- [0007] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 핵산 분자를 포함한다.
- [0008] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 포함한다.
- [0009] 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 세포를 포함한다.
- [0010] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 hCMV의 중화에 있어서 고효능을 가진 항체를 발현시키는 분사화된 B 세포 클론을 포함하고, 여기서, 상기 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 복합에 대해 특이적이다.
- [0011] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 항체에 결합하는 에피토프를 포함한다.
- [0012] 추가 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 항체에 결합되는 에피토프를 포함하는 면역원성(immunogenic) 폴리펩티드를 포함한다.
- [0013] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 항체에 결합하는 에피토프에 결합하는 리간드를 포함한다.
- [0014] 추가 구체예에서, 본 발명은 hCMV를 중화시키는데 고효능을 가지는 항체를 생산하는 방법을 포함하고, 여기서,

상기 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 특이적이다. 이 방법은 (i) 본 발명의 항체를 발현시키는 불사화된 B 세포 클론을 배양하고 또한 (ii) B 세포로부터 항체를 분리시키는 단계를 포함한다.

[0015] 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항체 단편, 본 발명의 핵산, 본 발명의 항체를 발현시키는 불사화된 B 세포 클론, 또는 본 발명의 항체 또는 항체 단편에 결합하는 에피토프를 포함하는 면역원성 폴리펩티드를 포함하는 약학 조성물을 포함한다.

[0016] 추가 구체예에서, 본 발명은 진단 또는 치료에 이용을 위하여 hCMV를 중화시키는데 고효능을 가지는 항체 또는 항체 단편을 포함하고, 여기서, 상기 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 특이적이며; 본 발명은 진단 또는 치료에 이용을 위하여 hCMV를 중화시키는데 고효능을 가지는 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 핵산을 포함하며, 여기서, 상기 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 특이적이며; 본 발명은 진단 또는 치료에 이용을 위하여 hCMV를 중화시키는데 고효능을 가지는 항체를 발현시키는 불사화된 B 세포 클론을 포함하며, 여기서, 상기 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 특이적이며; 또는 본 발명은 진단 또는 치료에 이용을 위하여 hCMV를 중화시키는데 고효능을 가지는 항체에 결합하는 에피토프를 포함하는 면역원성 폴리펩티드를 포함하며, 여기서, 상기 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 특이적이다.

[0017] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 항체 단편, 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 핵산, 또는 본 발명의 항체에 결합하는 에피토프를 포함하는 hCMV 감염 진단용 키트를 포함한다.

[0018] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 재조합 세포를 준비하는 방법을 포함한다. 이 방법은 (i) 본 발명의 항체를 발현시키는 불사화된 B 세포 클론으로부터 핵산을 서열화시키고 또한 (ii) (i) 단계로부터 수득된 서열 정보를 이용하여 소량의 항체를 숙주에서 발현되도록 발현 숙주내로 삽입하기 위한 핵산을 제조하는 단계를 포함한다.

[0019] 추가 구체예에서, 본 발명은 hCMV 중화에 고효능을 가지며, 그리고 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 복합에 특이적인 항체를 생산하는 방법을 포함한다. 이 방법은 상기에서 설명된 방법에 의해 수득될 수 있는 발현 숙주를 배양 또는 2차 배양하고, 또한 선택적으로 소량의 항체를 정제하는 것을 포함한다.

[0020] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 hCMV에 대항하여 면역 반응을 유도할 수 있는 폴리펩티드를 스크리닝 하는 방법을 포함하는데, 이 방법은 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 이용하여 폴리펩티드 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 인간 단클론 항체 (mAb) 6G4는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 의해 측정된 에피토프를 인지한다는 것을 설명하는 FACS 분석을 보여준다.

도 2는 항체 6G4의 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 나타낸다. CDR 서열은 굵게 표시된 부분이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 hCMV 감염을 높은 효능으로 중화시키는 신규한 항체의 발견에 일부 근거한다. 이와 같은 항체는 주어진 양의 바이러스를 중화시키는데 매우 낮은 농도를 필요로 하기 때문에 바람직하다. 적은 양의 항체를 투여하면서 높은 보호수준을 제공한다. 인간 단클론 항체 및 이와 같은 항체를 분비하는 불사화된 B 세포 클론도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0023] 본 발명자들은 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 복합에 대한 항체가 hCMV 중화에 특히 효과적이라는 것을 발견하였다. 어떠한 이론에 결부되지 않고, 이와 같은 복합은 항체가 인지하는 독특한 에피토프를 형성하는 UL128, UL130 및 UL131A의 정확한 조합체가 될 수 있다.

[0024] 본 발명은 또한 항체가 결합하는 에피토프의 특징과, 면역 반응을 일으키는데 이와 같은 에피토프의 사용에 관한 것이다.

[0025] 본 발명은 또한 본 발명의 항체 및 이들이 결합하는 에피토프와 관련된 다양한 방법 및 용도에 관한 것이다.

[0026] **본 발명의 항체**

- [0027] 본 발명은 hCMV 중화에 특히 고효능을 가진 단클론 항체 또는 재조합 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 이들 단클론 항체 또는 재조합 항체의 단편, 특히, 이 항체의 항원-결합 활성을 보유하는 단편을 제공한다. 본 명세서에서, "hCMV의 중화에 고효능"이란 표준 분석에서 본 발명의 항체 분자가 당분야의 공지의 항체, 예를 들면, MSL-109, 8F9 또는 3E3와 비교하였을 때 훨씬 낮은 농도에서 hCMV를 중화시킨다는 것을 의미한다.
- [0028] 한 구체예에서, 본 발명의 항체 분자는  $0.16\mu\text{g}/\text{ml}$  또는 이보다 낮은 농도(예, 0.15, 0.125, 0.1, 0.075, 0.05, 0.025, 0.02, 0.015, 0.0125, 0.01, 0.0075, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 또는 그 미만)에서 hCMV를 중화시킬 수 있다. 또 다른 구체예에서, 항체는  $0.016\mu\text{g}/\text{ml}$  또는 그 미만 (예,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-12}$  M,  $10^{-13}$  M 보다 더 낮은 항체 농도에서)의 농도에서 hCMV를 중화시킬 수 있다. 이것은 공지의 항체 예를 들면, MSL-109, 8F9 또는 3E3가 동일한 역가의 hCMV를 중화시키는데 요구하는 농도와 *in vitro*에서 비교하였을 때 hCMV의 임상 분리체의 50%를 중화하는데 요구하는 항체의 농도는 매우 낮다는 것을 의미한다. 추가 구체예에서, *in vitro*에서 hCMV의 임상 분리물에 의해 내피 세포, 상피 세포 그리고 수지상 세포의 감염의 50%를 중화시키는데 요구되는 본 발명의 항체 농도는 MSL-109, 8F9 또는 3E3가 요구하는 농도보다 10배 또는 그 이상(예, 25배, 50배, 75배, 100배, 150배, 200배 또는 그 이상)으로 더 낮다. 효능은 본 발명 기술 분야에 공지된 표준 중화 분석을 이용하여 측정되었다.
- [0029] 본 발명의 항체는 몇 가지 세포 타입의 hCMV 감염을 중화시킬 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 내피 세포의 감염을 방지한다. 본 발명의 항체는 상피 세포, 예를 들어 망막 세포, 및 골수종 세포, 가령 수지상 세포의 감염을 방지할 수 있다.
- [0030] 이들 항체는 적절하게 조제되었을 때 예방 또는 치료제로 이용되거나, 또는 진단 도구로 이용될 수 있다.
- [0031] "중화 항체"는 숙주에서 감염을 시작하기 위하여 또는 영속시키기 위하여 병원균의 능력을 중화시킬 수 있는 항체다. 본 발명은 중화 인간 단클론 항체를 제공하는데, 여기서, 항체는 hCMV의 항원을 인지한다.
- [0032] 특히, 본 발명에 따른 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 복합에 대해 특이성을 가진다.
- [0033] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 6G4로 지칭되는 단클론 항체다. 이 항체는 hCMV 감염된 도너(donor)로부터 분리된 것으로, 6G4로 지칭되는 불사화된 B 세포 클론에 의해 만들어진다. 이 항체는 내피 세포, 상피 세포, 예를 들면, 망막 세포, 그리고 골수종 세포, 예를 들면, 수지상 세포의 hCMV 감염을 중화시킨다.
- [0034] 6G4의 중쇄는 서열 번호: 7에 열거된 아미노산 서열을 가지고, 그리고 경쇄는 서열 번호: 8에 열거된 아미노산 서열을 가진다. 항체 중쇄의 CDR은 차례로 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3라고 한다. 유사하게, 항체 경쇄의 CDR은 차례로 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3라고 한다. CDR 아미노산의 위치는 IMGT 넘버링 시스템[12, 13, 14]에 따라 정의된다: CDR1 - IMGT 위치 27 내지 38, CDR2 - IMGT 위치 56 내지 65 그리고 CDR3 - IMGT 위치 105 내지 117.
- [0035] 이 항체의 CDR 아미노산 서열은 표 1에 나타난다.

**표 1**

	6G4
CDRH1	GYRFTSY (SEQ ID NO:1)
CDRH2	IYPGDSDI (SEQ ID NO:2)
CDRH3	ARLSLTESGDYVGAFDI (SEQ ID NO:3)
CDRL1	QSLVYSDDNIF (SEQ ID NO:4)
CDRL2	KVS (SEQ ID NO:5)
CDRL3	MQGRHWPLFT (SEQ ID NO:6)

- [0036]
- [0037] 본 발명은 6G4의 하나 또는 그 이상의 중쇄(예, 하나, 둘 또는 세 개 모두)를 포함하는 중쇄 CDR를 포함하는 항체를 포함한다 (서열 번호: 1-3).
- [0038] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 (i) CDRH1에 대한 서열 번호:1, CDRH2에 대한 서열 번호:2 및 CDRH3에 대한 서열 번호:3을 포함하는 중쇄를 포함한다.
- [0039] 또 다른 구체예에서, 6G4의 하나 또는 그 이상의 경쇄(예, 하나, 둘 또는 세 개 모두)를 포함하는 경쇄 CDR를



포함하는 항체를 포함한다 (서열 번호: 4-6).

- [0040] 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 (i) CDRL1에 대한 서열 번호:4, CDRL2에 대한 서열 번호:5 및 CDRL3에 대한 서열 번호:6을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0041] 또 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 복합에 특이성을 가지며, 또한 서열 번호:7의 아미노산 서열에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 가진 아미노산 서열을 가진 중쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호:7에 열거된 서열을 가지는 중쇄를 포함한다.
- [0042] 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 복합에 특이성을 가지며, 또한 서열 번호:8의 아미노산 서열에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 가진 아미노산 서열을 가진 경쇄를 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호:8에 열거된 서열을 가지는 경쇄를 포함한다.
- [0043] 본 발명의 항체는 또한, 하이브리드 항체 분자를 포함하는데, 이 분자는 6G4로부터 하나 또는 그 이상의 CDR 및 동일한 에피토프에 대한 또 다른 항체로부터 하나 또는 그 이상의 CDR을 포함한다. 한 구체예에서, 이와 같은 하이브리드 항체는 6G4의 세 개의 CDR 및 동일한 에피토프에 대한 또 다른 항체로부터 세 개의 CDR을 포함한다. 따라서, 바람직한 하이브리드 항체는 i) 6G4로부터 세 개의 경쇄 CDR 및 동일한 에피토프에 대한 또 다른 항체로부터 세 개의 중쇄 CDR을 포함하고, 또는 ii) 6G4로부터 세 개의 중쇄 CDR과 동일한 에피토프에 대한 또 다른 항체로부터 세 개의 경쇄 CDR을 포함한다.
- [0044] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 중쇄, 경쇄 및 CDR의 전부 또는 일부를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명에 따른 핵산 서열은 서열 번호:9 또는 서열 번호: 10에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 가지는 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 핵산 서열은 서열 번호:9 (6G4 중쇄 가변 부위를 인코딩하는)의 서열 또는 서열 번호: 10 (6G4 경쇄 가변 부위를 인코딩하는)의 서열을 가진다. 추가 구체예에서, 본 발명의 핵산 서열은 서열 번호: 11 (6G4 CDRH1을 인코딩하는), 서열 번호: 12 (6G4 CDRH2를 인코딩하는), 서열 번호: 13 (6G4 CDRH3을 인코딩하는), 서열 번호: 14 (6G4 CDRL1을 인코딩하는), 서열 번호: 15 (6G4 CDRL2을 인코딩하는) 및 서열 번호: 16 (6G4 CDRL3을 인코딩하는)를 포함하는 다양한 CDR을 인코딩하는 것을 포함한다. 유전자 코드의 중복성(redundancy)로 인하여, 이들 서열의 변이체는 동일한 아미노산 서열을 인코딩할 것이다. 이들 변이체들도 본 발명의 범위내 포함된다.
- [0045] 변이체 항체도 본 발명의 범위내에 포함된다. 따라서, 출원에 언급된 서열의 변이체들도 본 발명의 범위에 포함된다. 이와 같은 변이체들은 면역 반응 동안 *in vivo* 체세포 돌연변이 또는 불사화된 B 세포 클론 배양시 *in vitro*에서 생성된 천연 변이체를 포함한다. 대안으로, 변이체들은 상기 언급된 것과 같이 유전자 코드의 축중(degeneracy)로 인하여 발생될 수 있다. 대안으로, 자연 변이체는 전사 또는 해독시 오류로 인하여 생성될 수도 있다.
- [0046] 개선된 친화성 및/또는 효능을 가지는 항체 서열의 추가 변이체는 본 발명 분야에 공지된 방법들에 의해 수득될 수 있고, 또한 이는 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들면, 더욱 개선된 친화성을 가지는 항체를 수득하기 위하여 아미노산 치환이 이용될 수 있다. 대안으로, 뉴클레오타이드 서열의 코돈 최적화를 이용하여 항체 생산을 위한 발현계에 해독 효능을 개선시킬 수 있다. 더욱이, 본 발명의 핵산 서열에 직접적인 진화 방법을 적용시켜 항체 특이성 또는 중화 활성에 최적화된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또한 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0047] 한 구체예에서, hCMV 감염을 중화시키는 변이체 항체 서열은 본 출원에 언급된 서열과 70% 또는 그 이상(예를 들면, 75%, 80%, 85% 90% 95%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상) 아미노산 서열 상동성을 공유할 수 있다. 일부 구체예에서, 이와 같은 서열 상동성은 기준 서열(예, 본 출원에 언급된 서열)의 전장에 대해 계산된다. 일부 추가 구체예에서, 여기에서 언급된 상동성 비율은 NCBI (the National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)가 명시된 디폴트 변수들을 이용하여 BLAST 버전 2.1.3을 이용하여 결정된다 [Blosom 62 매트릭스, 갭 개방 페널티=11 및 갭 연장 페널티=1].
- [0048] 본 발명의 범위에는 본 발명에 따른 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터도 포함된다. 이와 같은 벡터로 형질변환된 세포 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이와 같은 세포의 예로는 진핵 세포, 예를 들면, 이스트 세포, 동물 세포 또는 식물 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 한 구체예에서, 세포는 포유류, 예를 들면, 인간, CHO, HEK293T, PER.C6, NSO, 골수종 또는 하이브리도마 세포가 된다.

- [0049] 본 발명은 또한 본 발명의 항체에 결합할 수 있는 에피토프에 결합되는 단클론 항체에 관한 것으로, 단클론 항체 6G4를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 단클론 항체 및 재조합 항체들은 개별 폴리펩티드 또는 이에 대한 기타 항원의 동정 및 정제에 특히 유용하다. 본 발명의 항체는 면역학적 측정, 방사능면역분석(RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착분석(ELISA)에서 시약으로 이용될 수 있는 추가 용도를 가진다. 이들 용도에서, 항체는 분석학적으로-감지가 가능한 시약 예를 들면, 방사능동위원소, 형광 분자 또는 효소로 라벨될 수 있다. 항체는 또한 분자 동정 및 항원의 특징화(에피토프 매핑)에 이용될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 항체는 치료 부위로 운반되는 약물에 결합되거나 또는 감지가 가능한 라벨에 결합되어, 관심 세포를 포함하는 부위, 예를 들면, hCMV로 감염된 세포의 영상화를 실행할 수 있다. 항체를 약물 및 감지가 가능한 라벨에 결합시키는 방법들은 감지가 가능한 라벨을 이용한 영상화 방법으로 당해 분야에 공지되어 있다. 라벨된 항체는 다양한 라벨을 이용하는 다양한 분석에 이용될 수 있다. 본 발명의 항체와 관심 에피토프(hCMV 에피토프) 사이에 항체-항원 복합체의 형성은 항체에 감지가 가능한 물질을 부착시켜 실행될 수 있다. 적합한 탐지 수단은 라벨을 이용하는 것을 포함하는데, 예를 들면, 방사능핵종 효소, 코엔자임, 형광물질, 화학적 발광물질, 색원체, 효소 기질 또는 공-인자, 효소 저해물질, 보결기(prosthetic group) 복합체, 자유 라디칼, 입자, 염료 등을 포함한다. 적합한 효소의 예로는 양고추냉이 과산화효소, 알칼리 포스포타제,  $\beta$ -갈락토시다제 또는 아세틸콜린 에스테라제를 포함하고; 적합한 보결기 조합체의 예로는 스트렙타아비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴을 포함하고; 적절한 형광 물질의 예로는 옴벨리페론, 플로로레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플로로레신, 단실 클로라이드 또는 피코에리틴을 포함하고; 발광 물질의 예로는 루미놀을 포함하고; 생발광물질의 예로는 루시페라제, 루시페린, 및 에퀴오린을 포함하고; 또한 적합한 방사능 활성 물질의 예로는  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , 또는  $^3\text{H}$ 를 포함한다. 이와 같은 라벨된 시약은 공지의 다양한 분석, 예를 들면, 방사능면역분석, 효소 면역분석, 가령, ELISA, 형광 면역분석 및 이와 유사한 분석에 이용될 수 있다. 예를 들면, 참고문헌 15-18을 참고.
- [0052] 본 발명에 따른 항체는 치료 모이어티 예를 들면, 사이토크신, 치료제 또는 방사능활성 금속 이온 또는 방사능 동위원소에 콘쥬게이트될 수 있다. 방사능동위원소의 예로는 I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111, 및 이와 유사한 것들을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이와 같은 항체 콘쥬게이트는 주어진 생물학적 반응을 변화시키는데 이용될 수 있고, 약물 모이어티는 통상의 화학적 치료제로 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 약물 모이어티는 원하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드가 될 수 있다. 이와 같은 단백질은 예를 들면, 독소 가령, 아브린, 리친 A, 뉴도모나스 엑소독소 또는 디프테리아 독소를 포함할 수 있다.
- [0053] 항체에 이와 같은 치료 모이어티를 콘쥬게이트시키는 기술은 공지되어 있다. 예를 들면, *Arnon et al (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al (Alan R Liss, Inc), pp 243-256, ed Hellstrom et al (1987) "Antibodies for Drug delivery," in Controlled Drug Delivery, ed Robinson et al (2d ed, Marcel Dekker, Inc), pp 623-653, Thorpe (1985) "Antibodies carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy A Review," in Monoclonal Antibodies '84 Biological and Clinical Applications, ed Pinchra et al., pp 475-506 (Editrtcc Kurtis, Milano, Italy, 1985), "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibodies in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed Baldwin et al (Academic Press, New York, 1985), pp 303-316, and Thorpe et al (1982) Immunol Rev 62 119-158.*
- [0054] 대안으로, 항체는 참고문헌 19에서 설명된 것과 같이, 제2항체에 콘쥬게이트되어, 항체-콘쥬게이트를 형성할 수 있다. 그 외에, 라벨과 본 발명의 항체 사이에 링커가 이용될 수 있다[20]. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 방사능활성, 요오드, 인디움, 이트륨 또는 당분야에 공지된 다른 방사능활성 입자로 직접적으로 라벨될 수 있다[21]. 치료는 콘쥬게이트된 및 콘쥬게이트안된 항체를 동시에 또는 순차적으로 투여하는 복합 요법으로 구성될 수 있다[22, 23].
- [0055] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 고정 서포트에 부착되어 있을 수 있다.
- [0056] 추가적으로, 본 발명의 항체, 또는 이의 기능적 항체 단편은 폴리머에 공유적 콘쥬게이트에 의해 화학적으로 변형되어 이들의 순환 반감기를 증가시킬 수 있다. 폴리머의 예들, 그리고 이를 펩티드에 부착시키는 방법은 참

고문헌 24-27에 나타나있다. 일부 구체예에서, 상기 폴리머는 폴리옥시에틸렌된 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)으로 구성된 군으로부터 선택할 수 있다. PEG는 실온에서 물에 용해가능하며, 일반식  $R(O-CH_2-CH_2)_n-OR$ 이며, 여기서 R은 수소결합이 되거나, 알킬 또는 알카놀과 같은 보호기가 될 수 있다. 한 구체예에서, 보호기는 1 내지 8의 탄소 원자를 가질 수 있다. 추가 구체예에서, 보호기는 메틸이다. n은 양수 정수가 된다. 한 구체예에서, 부호 n은 1 내지 1,000 사이의 정수이다. 또 다른 구체예에서 n은 2 내지 500사이의 정수이다. 한 구체예에서, PEG는 1,000 내지 40,000 사이의 평균 분자량을 가진다. 추가 구체예에서, PEG는 2,000 내지 20,000 사이의 평균 분자량을 가진다. 또 다른 구체예에서, PEG는 3,000 내지 12,000 사이의 평균 분자량을 가진다. 한 구체예에서, PEG는 적어도 하나의 하이드록시기를 가진다. 또 다른 구체예에서, PEG는 말단 하이드록시기를 가진다. 또 다른 구체예에서, 이는 저해제에 있는 자유 아미노기와 반응하여 활성화된 말단 하이드록시기가 된다. 그러나, 반응기의 타입과 그 양은 본 발명의 공유적으로 콘쥬게이트된 PEG/항체를 얻기 위해 다양하게 변화될 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0057] 수용성 폴리옥시에틸화된 폴리올 또한 본 발명에서 유용하다. 여기에는 폴리옥시에틸화된 솔비톨, 폴리옥시에틸화된 글로코즈, 폴리옥시에틸화된 글리세롤 (POG), 이와 유사한 것들이 포함된다. 한 구체예에서, POG가 이용된다. 임의의 이론에 구애됨이 없이, 이는 폴리옥시에틸화된 글리세롤의 글리세롤 기본골격은 자연적으로 생성되는, 예를 들면, 동물 및 인간에서 생성되는 모노-, 디-, 트리글리세리드와 동일한 기본골격이기 때문일 수 있고, 따라서 이와 같은 분자는 체내에서 외부 이물질로 나타나지 않을 것이다. 일부 구체예에서, POG는 PEG와 동일한 범위의 분자량을 가진다. POG의 구조는 참고문헌 28에서 볼 수 있다.

[0058] 순환 반감기를 증가시키는데 이용될 수 있는 또 다른 약물전달체는 리포솜이다. 리포솜 운반체를 준비하는 방법은 참고문헌 29, 30 및 31에서 논의된다. 기타 약물 전달체는 당분야에 공지되어 있고, 또한 예를 들면, 참고문헌 32 및 33에서 논의된다.

[0059] 본 발명의 항체는 정제된 형태로 제공될 수 있다. 일반적으로, 항체는 기타 폴리펩티드가 실질적으로 없는 조성물에 존재하는데, 예를 들면, 조성물의 90% 미만(중량), 통상 60% 미만, 그리고 좀더 통상적으로는 50% 미만이 기타 폴리펩티드로 구성된다.

[0060] 본 발명의 항체는 사람이 아닌 숙주, 예를 들면, 마우스(또는 이형성) 숙주에서 면역원성이다. 특히, 항체는 인간이 아닌 숙주에서는 면역원성이나, 인간 숙주에서는 면역원성이 아닌 이디오토프를 가질 수 있다. 인간에 대한 본 발명의 항체는 숙주 예를 들면, 마우스, 염소, 토끼, 비-영장류 포유류 등과 같은 숙주로부터 용이하게 분리될 수 없는 것과, 그리고 인간화 또는 제노 마우스(xeno-mice)로부터 일반적으로 수득되지 않는 것도 포함된다.

[0061] 본 발명의 항체는 임의의 이소타입 (예를 들면, IgA, IgG, IgM 가령,  $\alpha$ ,  $\gamma$  또는  $\mu$  중쇄)가 될 수 있지만, 일반적으로 IgG가 될 것이다. IgG 이소타입내에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서브클래스가 될 수 있다. 본 발명의 항체는  $\kappa$  또는  $\lambda$  경쇄를 가질 수 있다.

## [0062] 항체의 생산

[0063] 본 발명에 따른 단클론 항체는 당분야에 임의의 공지된 방법에 의해 만들어질 수 있다. 하이브리도마 기술을 이용하여 단클론 항체를 만드는 일반적인 방법도 잘 공지되어 있다[34, 35]. 바람직하게는 대안적인 EBV 불사화 방법(참고문헌 36에 기술되어 있음)이 이용된다.

[0064] 참고문헌 36에서 기술된 방법을 이용하여, 본 발명의 항체를 생산하는 B 세포는 다클론성 B 세포 활성화물질 존재하에 EBV로 형질변환될 수 있다. EBV를 이용한 형질변환은 표준 기술이며, 또한 다클론성 B 세포 활성화물질을 포함하도록 용이하게 개조될 수 있다.

[0065] 세포 성장 및 분화의 추가 자극제가 형질변환 단계 동안에 선택적으로 추가되어, 효능을 더 강화시킬 수 있다. 이와 같은 자극제는 사이토킨 예를 들면, IL-2 및 IL-15가 될 수 있다. 한 측면에서, IL-2가 불사화 단계에 추가되어, 불사화 효과를 더 개선시키지만, 반드시 사용해야 하는 것은 아니다.

[0066] 이들 방법에 의해 생성된 불사화된 B 세포는 당분야에 공지된 방법을 이용하여 배양될 수 있고, 이로부터 항체가 분리된다.

[0067] 단클론 항체는 원하는 경우, 여과, 원심분리, 및 다양한 크로마토그래피 방법, 예를 들면, HPLC 또는 친화력 크



로마토그래피를 이용하여 추가로 정제될 수 있다. 약학-등급의 항체를 생산하는 기술을 포함한 단클론 항체의 정제 기술은 당분야에 잘 공지되어 있다.

[0068] 본 발명의 단클론 항체의 단편은 효소 예를 들면, 펩신 또는 파파인과 같은 효소로 절단하는 방법, 및/또는 화학적 환원에 의해 이황화결합의 절단으로 단클론 항체로부터 수득될 수 있다. 대안으로, 단클론 항체의 단편은 중쇄 또는 경쇄의 서열 일부를 클로닝시키고, 발현시켜 수득될 수 있다. 항체 "단편"은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편을 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 단클론 항체의 중쇄 및 경쇄로부터 유도된 단일-쇄 Fv 단편 (scFv)을 포함하는데, 예를 들면, 본 발명은 본 발명의 항체의 CDR를 포함하는 scFv를 포함한다. 또한, 중쇄 또는 경쇄 단량체 및 이량체 뿐만 아니라 단일 쇄 항체, 예를 들어, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 펩티드 링커에 의해 연결된 단일 쇄 Fv를 포함한다.

[0069] 분자생물학의 표준기술들을 이용하여, 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 코드하는 DNA 서열을 만들 수 있다. 바람직한 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성 기술을 이용하여 완전히 또는 부분적으로 합성될 수 있다. 부위-직접적인 돌연변이 및 폴리메라제 쇄 반응(PCR) 기술도 적절하게 이용될 수 있다.

[0070] 임의의 적합한 숙주 세포/백터 시스템은 본 발명의 항체 분자 또는 이의 단편을 인코딩하는 DNA 서열의 발현에 이용될 수 있다. 박테리아, 예를 들면, 대장균(*E. coli*) 및 기타 미생물 시스템은 항체 단편 예를 들면, Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편, 그리고 특히 Fv 단편 및 단일 쇄 항체 단편, 예를 들면, 단일 쇄 Fvs의 발현에 부분적으로 이용될 수 있다. 진핵세포, 예를 들면, 포유류, 숙주 세포 발현 시스템은 완전한 항체 분자를 포함하는 더 큰 항체 분자의 생산에 이용될 수 있다. 적합한 포유류 숙주 세포는 CHO, HEK293T, PER.C6, NSO, 골수종 또는 하이브리도마 세포를 포함한다.

[0071] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 항체 분자 생산 공정을 제공하는데, 이 공정은 본 발명의 백터를 포함하는 숙주 세포를 본 발명의 항체를 인코딩하는 DNA로부터 단백질 발현을 유도하는데 적합한 조건하에 배양시키고, 그리고 항체 분자를 분리하는 단계를 포함한다.

[0072] 항체 분자는 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드만을 포함할 수 있는데, 이 경우 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드 코딩 서열은 숙주 세포를 형질감염시키는데 이용될 필요가 있다. 중쇄와 경쇄를 모두 포함하는 산물을 생산하기 위해서, 세포 주는 두 개 백터로 형질감염될 수 있는데, 제1 백터는 경쇄 폴리펩티드를 인코딩하고, 그리고 제2 백터는 중쇄 폴리펩티드를 인코딩한다. 대안으로, 단일 백터가 이용될 수도 있고, 이 백터는 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를 인코딩하는 서열을 포함한다.

[0073] 대안으로, 본 발명에 따른 항체는 i) 세포에서 본 발명에 따른 핵산 서열을 발현시키고, 또한 ii) 발현된 항체 산물을 분리함으로써 생성될 수 있다. 추가적으로, 이 방법은 iii) 항체를 정제하는 단계를 포함할 수 있다.

## [0074] B 세포의 스크리닝 및 분리

[0075] 형질변형된 B 세포는 원하는 항원 특이성의 항체를 생산하는 것으로 스크리닝될 수 있는데, 개별 B 세포 클론은 포지티브 세포로부터 생성될 수 있다.

[0076] 스크리닝 단계는 ELISA, 조직 또는 세포 (형질변형된 세포 포함)의 착색, 중화 분석 또는 원하는 항원 특이성을 동정하는데 공지된 기타 다수의 방법중 하나에 의해 실시될 수 있다. 분석은 단순한 항원 인지에 기초하여 선택되거나, 또는 원하는 기능, 예를 들면, 단순한 항원-결합 항체보다는 중화 항체를 선택하는, 표적 세포의 특징, 예를 들면, 시그널링 캐스케이드, 이들의 형상, 성장 속도, 다른 세포에 영향을 주는 능력, 다른 세포들 또는 다른 시약들에 의한 영향에 반응 또는 조건의 변화, 분화 상태 등을 바꿀 수 있는 항체를 선택하는 것과 같은 추가 근거에 의해 선택될 수 있다.

[0077] 포지티브 세포 혼합물로부터 개별 클론을 분리시키는 클론 단계는 제한 희석, 마이크로메뉴플레이션 (micromanipulation), 세포 소팅(sorting)에 의한 단일 세포 침착 또는 당분야에 공지된 다른 방법을 이용하여 실시될 수 있다.

[0078] 본 발명의 불사화된 B 세포 클론은 다양한 방법으로 이용될 수 있는데, 예를 들면, 연구를 위한 관심의 단클론 항체를 인코딩하는 핵산 (DNA 또는 mRNA)의 소스, 단클론 항체의 소스로 이용될 수 있다.

[0079] 본 발명은 불사화된 B 메모리 림프구를 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기서, 이 림프구는 hCMV에 특이적인 높은 중화 효능을 가진 항체를 만들고, 여기서, 항체는 하루에 세포당  $\geq 5\text{pg}$ 으로 생산된다. 본 발명은 또한 불

사화된 B 메모리 림프구의 클론을 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기서, 클론은 hCMV에 특이적인 높은 중화 효능을 가진 단클론 항체를 만들고 여기서, 항체는 하루에 세포당  $\geq 5\text{pg}$ 으로 생산된다. 바람직하게는 이 클론은 hCMV 감염을 중화시키는데 고효능을 가진 단클론 항체를 만든다.

[0080] 본 발명에 따른 바람직한 불사화된 B 세포 클론은 6G4이다.

## [0081] 에피토프

[0082] 상기에서 언급된 바와 같이, 본 발명의 항체는 이들이 결합되는 에피토프를 매핑(map)하는데 이용될 수 있다. 본 발명자들은 내피세포, 상피세포 예를 들면, 망막 세포 및 골수종 세포 예를 들면, 수지상 세포의 hCMV 감염을 중화시키는 항체 6G4가 hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A에 의해 결정된 에피토프로 향한다는 것을 발견하였다. 비록 본 발명자들은 이론에 결부되는 것을 원하지 않지만, 항체 6G4가 이들 세가지 단백질에 의해 형성된 입체적(conformational) 에피토프에 결합한다고 여겨진다.

[0083] 본 발명의 항체에 의해 인지되는 에피토프는 다수의 용도를 가진다. 정제된 또는 합성형의 에피토프 및 이의 미모토프(mimotopes)는 면역 반응을 일으키는데(예를 들면, 백신으로 또는 다른 용도의 항체 생산을 위하여) 사용되거나 또는 에피토프 또는 이의 미모토프와 면역 반응하는 항체에 대해 환자 혈청을 스크리닝하는데 이용될 수 있다. 한 구체예에서, 이와 같은 에피토프 또는 미모토프, 또는 에피토프 또는 미모토프를 포함하는 항원은 면역 반응을 일으키는 백신으로 이용될 수 있다. 본 발명의 항체 및 항체 단편은 또한 백신 품질을 모니터링하는 방법에 이용될 수 있다. 특히, 항체는 정확한 모양의 정확한 면역원성 에피토프를 포함하는 백신에서 항원을 점검하는데 이용될 수 있다.

[0084] 에피토프는 또한 이 에피토프에 결합하는 리간드를 스크리닝하는데 유용할 수 있다. 이와 같은 리간드는 낙타, 상어, 및 기타 종으로부터 항체, 항체 단편, 펩티드, 파지 디스플레이 기술 산물, 압타머, 에드넥틴 또는 에피토프를 차단하여 감염을 예방할 수 있는 다른 바이러스 또는 세포 단백질의 단편을 포함하나 이에 한정되지 않은 항체를 포함한다. 이와 같은 리간드도 본 발명의 범위에 포함된다.

## [0085] 재조합 발현

[0086] 본 발명의 불사화된 B 메모리 림프구는 후속적인 재조합 발현을 위한 항체 유전자의 클로닝을 위한 핵산 원료로 이용될 수 있다. 재조합원으로부터 발현은 B 세포 또는 하이브리도마로부터 발현을 목적으로 하는 것 보다는 약학적 목적 예를 들면, 안정성, 재생성, 배양 용이성 등에 의해 좀 더 통상적인 것이다.

[0087] 따라서, 본 발명은 재조합 세포를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (i) 관심 항체를 인코딩하는 B 세포 클론으로부터 하나 또는 그 이상 핵산(예, 중쇄 및/또는 경쇄 유전자)을 수득하고, 또한 (ii) 숙주내에서 관심 항체의 발현이 허용되도록 발현 숙주안으로 핵산을 삽입하는 단계를 포함한다.

[0088] 유사하게, 본 발명은 재조합 세포를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (i) 관심 항체를 인코딩하는 B 세포 클론으로부터 핵산을 서열화시키고, 그리고 (ii) (i) 단계의 서열 정보를 이용하여, 숙주내에서 관심 항체의 발현이 허용되도록 발현 숙주안으로 삽입될 핵산을 제조하는 단계를 포함한다. 제한효소 부위를 도입시키기 위하여, 코돈 용도를 변화시키기 위하여, 및/또는 전사 및/또는 해독 조절 서열을 최적화시키기 위하여 (i)와 (ii) 단계 사이에서 핵산이 조작될 수도 있으나 반드시 그럴 필요는 없다.

[0089] 본 발명은 또한 재조합 세포를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 숙주 세포에 소량의 단클론 항체를 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 핵산을 형질도입시키는 단계를 포함하고, 여기서, 핵산은 본 발명에 따른 불사화된 B 세포 클론으로부터 유도된 핵산이 된다. 따라서 핵산을 우선 준비하고, 이를 이용하여 숙주 세포를 형질변환시키는 과정은 상이한 장소(예, 다른 나라)에서 다른 사람들에게 의해 상이한 시간대에서 실행될 수 있다.

[0090] 본 발명의 이와 같은 재조합 세포는 발현 및 배양 목적으로 이용될 수 있다. 이는 특히 대규모의 약물 생산을 위한 항체 발현에 유용하다. 또한, 이들은 약학 조성물의 활성 성분으로 이용될 수 있다. 임의의 적합한 배양 기술이 이용될 수 있는데, 정적 배양(static culture), 롤러 바틀 배양(roller bottle culture), 복수액(ascites fluid), 중공-섬유 타입 바이오리액터 카트리지(hollow-fiber type bioreactor cartridge), 모듈라 미니발효기(modular minifermenter), 교류 탱크(stirred tank), 마이크로캐리어 배양기(microcarrier culture), 세라믹 코어 살수(ceramic core perfusion)등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

- [0091] B 세포로부터 면역글로블린 유사체를 수득하고 서열화시키는 방법은 당분야에 잘 공지되어 있다 (예, 참고문헌 37)
- [0092] 발현 숙주는 이스트, 동물 세포, 특히 포유류 세포 (예, CHO 세포, NSO 세포, 인간 세포 예를 들면, PER.C6 [Cruce11, 참고문헌 38] 또는 HKB-11 [Bayer; 참고문헌 39 & 40] 세포, 골수종 세포 [41 & 42], 등), 뿐만 아니라 식물 세포를 포함하는 진핵세포가 바람직하다. 바람직한 발현 숙주는 본 발명의 항체를 글리코실화시킬 수 있는데, 특히 인간에서 면역원성이 아닌 탄수화물 구조로 글리코실화시킬 수 있다. 한 구체예에서, 발현 숙주는 무-혈청 배지에서 성장할 수 있다. 추가 구체예에서, 발현 숙주는 동물에서 유도된 산물없이 배양물에서 성장할 수 있다.
- [0093] 발현 숙주는 세포 주를 제공하기 위해 배양될 수 있다.
- [0094] 본 발명은 소요의 항체를 인코딩하는 하나 또는 그 이상 핵산 분자(예, 중쇄 및 경쇄 유전자)를 준비하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (i) 본 발명에 따른 불사화된 B 세포 클론을 준비하고, (ii) 소요의 항체를 인코딩하는 핵산을 B 세포 클론으로부터 수득하는 단계를 포함한다. 본 발명은 소요의 항체를 인코딩하는 핵산 서열을 수득하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (i) 본 발명에 따른 불사화된 B 세포 클론을 준비하고, (ii) B 세포 클론으로부터 소요의 항체를 인코딩하는 핵산을 서열화하는 단계를 포함한다.
- [0095] 본 발명은 소요의 항체를 인코딩하는 핵산 분자를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 본 발명에 따른 형질 변환된 B 세포로부터 수득된 B 세포 클론으로부터 핵산을 수득하는 단계를 포함한다. 따라서, B 세포 클론을 우선 수득하고, 그 다음 이로부터 핵산을 준비하는 과정은 상이한 장소(예, 다른 나라)에서 다른 사람들에 의해 상이한 시간대에서 실행될 수 있다.
- [0096] 본 발명은 항체 (예, 약학적 용도)를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (i) 소요의 항체를 발현시키는 선택된 B 세포 클론으로부터 하나 또는 그 이상 핵산(예, 중쇄 및 경쇄 유전자)을 수득하고/또는 서열화시키고, (ii) 소요의 항체를 발현시키는 발현 숙주를 만들기 위해 핵산을 이용하거나 숙주 내로 삽입시키고, (iii) 소요의 항체가 발현되는 조건하에 발현 숙주를 배양 또는 2차 배양(sub-culture)시키고, 또한 선택적으로 (iv) 소요의 항체를 정제하는 단계를 포함한다.
- [0097] 본 발명은 항체를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 소요의 항체가 발현되는 조건하에 발현 숙주 세포 집단을 배양 또는 2차 배양시키고, 그리고 선택적으로 소요의 항체를 정제하는 단계를 포함하는데, 여기서, 상기 발현 숙주 세포 집단은 (i) 상기에서 설명된 것과 같이 준비된 B 메모리 림프구 집단에 의해 생성되는 소요의 항체를 인코딩하는 핵산을 제공하고 (ii) 소요의 항체를 발현시킬 수 있는 발현 숙주 내로 핵산을 삽입하고; 그리고 (iii) 삽입된 핵산을 포함하는 발현 숙주를 배양 또는 2차 배양시켜, 발현 숙주 세포 집단을 생산하는 단계를 포함한다. 따라서, 재조합 발현 숙주를 우선 준비하고, 이를 배양시켜 항체를 발현시키는 과정은 상이한 장소(예, 다른 나라)에서 다른 사람들에 의해 상이한 시간대에서 실행될 수 있다.
- [0098] **약학적 조성물**
- [0099] 본 발명은 본 발명의 항체 및/또는 항체 단편 및/또는 이와 같은 항체를 인코딩하는 핵산 및/또는 이와 같은 항체를 발현시키는 불사화된 B 세포 및/또는 본 발명의 항체에 의해 인지되는 에피토프를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 약학 조성물을 투여하기 위하여 약리학적으로 허용가능한 담체를 또한 포함할 수 있다. 담체는 조성물을 제공받은 개체에 유해한 항체의 생산을 유도하거나 독성이 있어서는 안된다. 적합한 담체는 크고, 느리게 대사되는 거대분자, 예를 들면, 단백질, 폴리펩티드, 리포솜, 폴리사카라이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리머 아미노산, 아미노산 코폴리머 및 비활성 바이러스 입자가 될 수 있다.
- [0100] 약리학적으로 허용가능한 염이 이용될 수 있는데, 예를 들면 미네랄산염, 예를 들면, 염화수소산염, 브롬화수소산염, 인산염 및 황산염 또는 유기산 염 예를 들면, 아세테이트, 프로피오네이트 말로네이트 및 벤조에이트가 이용될 수 있다.
- [0101] 치료 조성물내에 약리학적으로 허용가능한 담체는 추가로 액체 예를 들면, 물, 염, 글리세롤 및 에탄올을 포함한다. 추가적으로, 보조 물질 가령, 가습제 또는 유화제 또는 pH 완충 물질이 조성물에 존재할 수 있다. 이와 같은 담체는 약학 조성물을 환자가 복용하도록 정제, 알약, 당의정, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리 및 현탁액으로 조제될 수 있도록 한다.
- [0102] 본 발명의 범위 내에서, 투약형태는 비경구 투여에 적합한 형태, 예를 들면, 주사 또는 주입, 예를 들면, 정맥

주사 또는 연속 주입에 적합한 형태를 포함할 수 있다. 산물이 주사 또는 주입을 위한 경우, 오일 또는 수용성 비이클 내에 현탁액, 용액, 에멀전의 형태를 취할 수 있고, 예를 들면, 현탁제, 보존제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형이 포함될 수 있다. 대안으로, 항체 분자는 사용 전 적절한 멸균 액체로 재구성할 수 있도록 건조된 형태가 될 수도 있다.

[0103] 일단 조제되면, 본 발명의 조성물은 개체에 직접 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 본 조성물은 인간에게 투여하기에 적합하다.

[0104] 본 발명의 약학 조성물은 임의의 다수의 경로, 경구, 정맥, 근육, 동맥내, 수질내, 복강내, 척추내, 심실내, 경피, 진피를 통하여, 경피, 국소, 피하, 비강, 장, 혀아래, 질내 또는 직장 경로를 포함하나 이에 한정되지 않는 경로를 통하여 바로 투여될 수 있다. 하이포스프레이(Hyposprays)를 이용하여 본 발명의 약학적 조성물을 투여할 수 있다. 일반적으로, 치료 조성물은 주사용으로 액체 용액 또는 현탁액으로 준비될 수 있다. 주사 전에 액체 비이클 내에 용액 또는 현탁액에 적절한 고형 제형으로 준비될 수도 있다.

[0105] 본 조성물의 직접적인 운반은 피하, 복강, 정맥 또는 근육으로 주사에 의해 실시될 수 있거나 또는 조직의 세포 사이의 공간으로 운반될 수도 있다. 본 조성물은 또한 병소로 투여될 수도 있다. 치료 약량은 단약 약량 일정 또는 다중 약량 일정이 될 수 있다. 공지의 항체 기초 제약은 투여 빈도에 대한 지침을 제공하는데, 예를 들면, 약물이 매일, 주 단위, 월 단위로 제공되어야 하는지에 대한 지침이 제공된다. 빈도 및 투약량은 증상의 중증도에 따라 달라질 수도 있다.

[0106] 본 발명의 조성물은 다양한 형태로 조제될 수 있다. 예를 들면, 본 조성물은 액체 용액 또는 현탁액의 주사액으로 제조될 수 있다. 주사전 액체 비이클에 용액 또는 현탁액에 적합한 고형 제형을 제조할 수도 있다(예를 들면, 보존제를 포함하는 멸균수로 재구성시키기 위한 동결건조된 조성물 가령, Synagis™ 및 Herceptm™) 조성물은 국소 투여용으로 준비될 수 있는데, 예를 들면, 연고, 크림 또는 분말로 준비될 수 있다. 조성물은 경구 투여용, 예를 들면, 정제 또는 캡슐, 스프레이 또는 시럽(선택적으로 향이 첨가된)으로 제조될 수 있다. 본 조성물은 폐 투여, 예를 들면, 미세 분말 또는 스프레이를 이용한 흡입기로 투여하기 위해 조제될 수 있다. 본 조성물은 좌약 또는 질 좌약으로 조제할 수 있다. 본 조성물은 비강, 귀, 안구 투여를 위해 드롭으로 조제할 수 있다. 조성물은 환자에게 투여하기 전, 복합된 조성물이 재구성되도록 고안된 키트 형태가 될 수 있다. 예를 들면, 동결건조된 항체는 멸균수 또는 멸균 완충액과 함께 키트에 제공될 수 있다.

[0107] 본 조성물 내에 활성 성분은 항체 분자, 항체 단편 또는 변이체 및 유도체가 될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 이와 같은 경우, 위장관에서 분해되기 쉽다. 따라서, 조성물이 위장관을 이용한 경로로 투여된다면, 본 조성물은 위장관에서 항체의 분해로부터 항체를 보호하고, 위장관에 일단 흡수되면 항체를 방출시킬 수 있는 물질을 포함해야 할 것이다.

[0108] 약리학적으로 허용가능한 담체의 철저한 고찰은 Gennaro (2000) Remington The Science and Practice of Pharmacy 20th edition, ISBN 0683306472을 이용한다.

[0109] 본 발명의 약학 조성물은 일반적으로 5.5 내지 8.5 범위의 pH를 가지며, 일부 구체예에서, 6 내지 8의 범위가 될 수 있으며, 추가 구체예는 약 pH7이다. pH는 완충액을 이용하여 유지시킬 수 있다. 본 조성물은 멸균되거나 및/또는 발열원이 없을 것이다. 본 조성물은 인간에 대해 등장성이다. 한 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 멸봉된 용기로 공급된다.

[0110] 약학 조성물은 본 발명의 하나 또는 그 이상 본 발명의 항체 및/또는 본 발명의 하나 또는 그 이상 불사화된 B 세포 및/또는 본 발명의 항체에 결합하는 에피토프를 포함하는 폴리펩티드의 유효량을 포함할 것이며, 여기서 유효량은 원하는 질환 또는 상태를 치료, 경감 또는 예방하는데 충분한 양이거나 또는 감지가능한 치료 효과를 나타내는 양이다. 치료 효과는 신체적 증상의 감소도 포함된다. 임의의 특정 개체에 대한 유효 투약량은 일반적으로 신체 크기, 건강, 상태의 특징 및 정도, 투여를 위해 선택된 치료제 또는 치료제 복합물에 따라 달라질 것이다. 주어진 상태에 대한 유효량은 통상적인 실험에 의해 결정되며, 임상치의 판단 범위내에 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 유효량은 본 발명의 조성물이 투여되는 개체에서 약 0.01mg/kg 내지 약 50mg/kg, 또는 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg이 될 것이다. 공지의 항체에 기초된 약학에서는 이에 대한 지침을 제공하는데, 예를 들면, Herceptin™ 은 21 mg/ml 용액으로 정맥 주입에 의해 투여되는데, 초기 로딩 투약량은 4mg/kg(체중)이며, 주간 유지 약량은 2mg/kg(체중)이고, Rituxan™ 는 375mg/m<sup>2</sup>으로 주간 투여된다.

[0111] 한 구체예에서, 조성물은 추가적인 또는 시너지 치료 효과를 제공하기 위하여 하나 이상(예, 2, 3, 4, 5, 등)의 본 발명의 항체를 포함할 수 있다. 추가 구체예에서, 본 조성물은 본 발명의 하나 또는 그 이상 (예, 2, 3, 4,



5, 등) 항체 또는 항체 단편과, 그리고 hCMV에 대항하는 하나 또는 그 이상 (예, 2, 3, 4, 5, 등)의 항체 또는 항체 단편을 포함할 수 있다. 예를 들면, 한 항체는 hCMV 단백질 UL 128, UL130 및 UL131A의 복합에 의해 결정된 에피토프에 결합할 수 있고, 다른 항체는 추가 hCMV 단백질에 결합할 수 있을 것이다. 이 구체예에서, hCMV 단백질은 gB, gH, gL, gM, gN, gO, UL128, UL130 또는 UL131A이거나 이의 복합이 될 수 있다. 추가 구체예에서, 제 2 항체 또는 항체 단편은 MSL-109, 8F9 또는 3E3에 의해 인지되는 에피토프에 특이적일 수 있다. 추가 구체예에서, 한 항체는 섬유아세포의 감염을 중재하는 기전을 표적으로 할 수 있고, 다른 항체는 내피 세포의 감염을 중재하는 기전을 표적으로 할 수 있다. 최적의 임상 효과를 위하여, hCMV 감염 및 유지의 두 가지 기전을 모두 처리하는 것이 유리할 수 있다.

[0112] 본 발명의 항체 또는 항체 단편들은 다른 치료법, 예, 화학요법 화합물, 방사능치료 등과 함께 투여(복합 또는 별도)될 수 있다. 바람직한 치료 화합물은 항-바이러스 화합물, 예를 들면, 강시클로비르(ganciclovir), 포스카르네트(foscarnet) 및 시도포비르(cidofovir)를 포함한다. 이와 같은 복합 치료법은 단독으로 투여되었을 때 개별 치료 물질과 비교하여 부가적인 또는 시너지 개선을 제공한다. "시너지(synergy)"는 두 개 또는 그 이상의 활성 물질의 복합 효과가 각 활성 물질의 개별 효과의 합보다 더 큰 경우에 복합 효과를 설명하기 위해 이용된다. 따라서, 두개 또는 그 이상의 물질의 복합 효과가 활성 또는 과정의 "시너지 저해"를 초래하면, 활성 또는 과정의 저해는 각 활성 물질의 저해효과의 합보다 더 크다. "시너지 치료 효과"는 두 개 또는 그 이상의 치료법의 복합시에 관찰되는 치료 효과를 말하며, 여기서, 치료 효과(임의의 다수 변수들에 의해 측정되었을 때)는 각 개별 치료법에서 관찰되는 개별 치료 효과의 합보다 더 크다.

[0113] 항체 또는 항체 단편들은 hCMV 감염 치료시 기존에 반응이 없었던, 가령, 항-hCMV 치료에 저항성을 보인 환자들에게 투여될 수 있다. 이와 같은 치료에는 항-바이러스제를 이용한 기존 치료가 포함될 수 있다. 이것은 hCMV의 항-바이러스 저항성 균주로 인한 감염 때문일 수 있다.

[0114] 본 발명의 항체를 포함하는 본 발명의 조성물에서, 항체는 조성물에서 전체 단백질의 적어도 50 중량% (예, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상)으로 구성될 수 있다. 따라서, 항체는 정제된 형태다.

[0115] 본 발명은 약제를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (i) 본 발명의 항체를 준비하고, 또한 (ii) 정제된 항체와 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합시키는 단계를 포함한다.

[0116] 본 발명은 약제를 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 항체와 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합시키는 단계를 포함한다. 여기서, 항체는 본 발명의 형질변형된 B 세포로부터 수득된 단클론 항체이다. 따라서 단클론 항체를 우선 준비하고, 약제를 조제하는 과정은 상이한 장소(예, 다른 나라)에서 다른 사람들에 의해 상이한 시간대에서 수행할 수 있다.

[0117] 치료 목적으로 항체 또는 B 세포를 운반하는 대안으로, 소량의 단클론 항체 (또는 이의 활성 단편)를 인코딩하는 핵산(일반적으로 DNA)을 개체로 운반시키는 것이 가능하며, 이때 핵산은 in situ 개체에서 발현되어, 원하는 치료효과를 제공할 수 있다. 적합한 유전자 치료법 및 핵산 운반 벡터는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0118] 본 발명의 조성물은 면역원성 조성물이며, 일부 구체예에서, hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 복합시에 발견되는 에피토프를 포함하는 항원을 포함하는 백신 조성물이 될 수 있다. 대안 조성물은 (i) hCMV 단백질 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 의해 형성된 에피토프를 포함하는 항원, 그리고 (ii) hCMV 단백질 gB, gH, gL, gM, gN, gO, UL128, UL130 또는 UL131A 또는 이의 조합에서 발견되는 에피토프를 포함하는 항원을 포함한다. 본 발명에 따른 백신은 예방(예, 감염 예방) 또는 치료 (예, 감염을 치료하기 위하여) 백신일 수 있다.

[0119] 조성물은 특히 다중 약량 포맷으로 포장되는 경우 항균제를 포함할 수 있다.

[0120] 조성물은 계면활성제, 가령, Tween (폴리소르베이트), 예를 들어, Tween 80을 포함할 수 있다. 계면활성제는 일반적으로 <0.01%의 낮은 수준으로 존재한다.

[0121] 조성물은 강장성(tonicity)을 제공하기 위하여 나트륨염(예, 염화나트륨)을 포함할 수 있다.  $10 \pm 2 \text{mg/ml}$  NaCl의 농도가 일반적이다.

[0122] 조성물은 슈가 알코올(예, 만니톨) 또는 이사카라이드(예, 슈크로스 또는 트레할로즈)를 대략  $15\text{--}30 \text{mg/ml}$  (예  $25 \text{mg/ml}$ )으로 포함할 수 있으며, 특히, 조성물이 동결건조되거나 또는 동결건조된 물질로부터 재구성된 물질을 포함하는 경우에 포함할 수 있다. 재구성용 조성물의 pH는 재구성 전 대략 6.1로 조정될 수 있다.



- [0123] 본 발명의 조성물은 또한 하나 또는 그 이상의 면역조절제를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 면역조절제는 어주번트(adjuvant)를 포함한다.
- [0124] 본 발명의 에피토프 조성물은 세포 중개된 면역 반응 뿐만 아니라 체액 면역 반응을 모두 유도하여 hCMV 감염을 효과적으로 처리할 수 있다. 이와 같은 면역 반응은 hCMV에 노출시에 신속하게 반응하는 오래 유지되는 (예, 중화) 항체를 유도하고, 세포 중개된 면역성을 유도할 수 있다.
- [0125] **의학적 치료 및 용도**
- [0126] 본 발명의 항체 및 항체 단편은 hCMV 감염의 치료, hCMV 감염의 예방 또는 hCMV 감염 진단용으로 이용될 수 있다.
- [0127] 진단 방법은 항체 또는 항체 단편을 시료와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 이와 같은 시료는 예를 들면, 타액선, 폐, 간, 췌장, 신장, 귀, 눈, 태반, 영양기관, 심장, 난소, 뇌하수체, 부신, 갑상선, 뇌 또는 피부에서 취한 조직 시료가 될 수 있다. 진단 방법에는 항원/항체 복합체의 탐지가 포함될 수 있다.
- [0128] 본 발명은 따라서, (i) 본 발명에 따른 항체, 항체 단편, 또는 변이체 및 유도체, (ii) 본 발명에 따른 불사화된 B 세포 클론, (iii) 본 발명의 항체, 예를 들면, 6G4에 결합할 수 있는 에피토프 또는 (iv) 치료에 이용되는 본 발명의 항체, 예를 들면, 6G4에 결합하는 에피토프에 결합할 수 있는 리간드, 바람직하게는 항체를 제공한다.
- [0129] 또한, 환자를 치료하는 방법도 제공되는데, 이 방법은 (i) 본 발명에 따른 항체, 항체 단편, 또는 변이체 및 유도체, (ii) 본 발명에 따른 불사화된 B 세포 클론, (iii) 본 발명의 항체, 예를 들면, 6G4에 결합할 수 있는 에피토프 또는 (iv) 본 발명의 항체, 예를 들면, 6G4에 결합하는 에피토프에 결합할 수 있는 리간드, 바람직하게는 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0130] 본 발명은 또한, hCMV 감염의 예방 또는 치료용 약물 제조에 (i) 본 발명에 따른 항체, 항체 단편, 또는 변이체 및 유도체, (ii) 본 발명에 따른 불사화된 B 세포 클론, (iii) 본 발명의 항체, 예를 들면, 6G4에 결합하는 에피토프, 또는 (iv) 본 발명의 항체, 예를 들면, 6G4에 결합할 수 있는 에피토프에 결합하는 리간드, 바람직하게는 항체의 용도를 제공한다.
- [0131] 본 발명은 hCMV 감염의 예방 또는 치료용 약물로 사용되는 본 발명의 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 환자의 치료 및/또는 환자의 진단을 위한 약물 제조에서 본 발명의 항체 및/또는 단백질의 용도를 제공한다. 또한, 치료를 요하는 개체를 치료 또는 진단을 실시하는 방법도 제공하는데, 이 방법은 개체에게 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 개체는 인간일 수 있다. 치료 효과를 점검하는 한 가지 방법은 본 발명의 조성물을 투여한 후 질환 증상을 모니터링하는 것을 포함한다. 치료는 단일 약량 일정 또는 다중 약량 일정이 될 수 있다.
- [0132] 한 구체예에서, 본 발명의 항체, 항체 단편, 불사화된 B 세포 클론, 에피토프, 또는 조성물은 이와 같은 치료를 요하는 개체로 투여될 수 있다. 이와 같은 개체는 면역결핍된 개체를 포함한 hCMV 감염에 위험한 또는 감염될 수 있는 개체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예시적인 개체는 HIV에 감염된 또는 이식 환자와 같은 면역억제 치료법을 받고 있는 개체를 포함한다.
- [0133] 본 발명의 항체는 수동적 면역화에 이용될 수 있다.
- [0134] 본 발명에서 설명된 것과 같은 항체 및 이의 단편은 hCMV 감염 진단을 위한 키트에 이용될 수 있다.
- [0135] 본 발명의 항체에 결합할 수 있는 에피토프, 예를 들면, 단클론 항체 6G4 은 보호성 항-hCMV 항체 존재를 감지함으로써 백신 접종 과정의 효과를 모니터링하는 키트에 이용될 수 있다.
- [0136] 본 발명에서 설명된 바와 같은 항체, 항체 단편, 또는 변이체 및 이의 유도체들은 또한 원하는 면역원성을 가진 백신 제조를 모니터링하는 키트에 이용될 수 있다.
- [0137] 본 발명은 단클론 항체와, 하나 또는 그 이상 약제학적으로 허용가능한 담체를 혼합하는 단계를 포함하는 약제를 제조하는 방법을 제공하는데, 여기서, 단클론 항체는 본 발명의 발현 숙주로부터 수득된 단클론 항체다. 따라서, 단클론 항체를 우선 수득하고(예, 이를 발현시키고 및/또는 정제시키며), 이어서 이를 약제학적으로 담체와 혼합하는 과정은 상이한 장소(예, 다른 나라)에서 다른 사람들에 의해 상이한 시간대에서 실행될 수 있다.

- [0138] 본 발명의 형질변형된 B 세포로 시작되는, 배양, 2차 배양, 클로닝, 2차-클로닝, 서열화, 핵산 준비의 다양한 단계들은 각 단계에서 선택적으로 최적화시키면서 형질변형된 B 세포에 의해 발현되는 항체를 영속시키기 위하여 실행될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 방법들은 항체를 인코딩하는 핵산에 적용되는 최적화(예를 들면, 친화적 성숙 또는 최적화) 기술을 더 포함한다. 본 발명은 이와 같은 단계 중에 이용된 그리고 준비된 모든 세포, 핵산, 벡터, 서열, 항체 등을 포함한다.
- [0139] 이들 모든 방법에서, 발현 숙주에 이용된 핵산은 특정 핵산 서열에 삽입, 결손 또는 수정을 위해 조작될 수 있다. 이와 같은 조작에 의한 변화는 제한효소부위 도입, 코돈 용도 수정, 전사 및/또는 해독 조절 서열의 추가 또는 최적화를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 인코딩된 아미노산을 변형시키기 위하여 핵산을 수정시키는 것도 가능하다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상(예, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등) 아미노산 치환, 결손 및/또는 삽입을 항체 아미노산 서열로 도입시키는 것도 유용하다. 이와 같은 점 돌연변이는 효과물질 기능, 항원-결합 친화력, 해독 후 변형, 면역원성 등을 수정할 수 있다. 면역원성 등은 공유기(라벨)의 부착을 위한 아미노산을 도입시키거나 또는 태그(정제 목적)를 도입시킬 수 있다. 돌연변이는 특정 부위로 도입되거나 또는 무작위로 도입된 후 선별(분자 발달)이 이어진다.
- [0140] **일반적 사항**
- [0141] “포함하는(comprising)”는 “포함하는(including)” 뿐만 아니라, “구성된(consisting)” 예를 들면, X를 포함하는(comprising) 조성물은 배타적으로 X로 구성되거나 또는 추가적인 다른 것 예를 들면, X+Y를 포함한다는 것이 될 수 있다.
- [0142] “실질적으로(substantially)”는 “완전하게(completely)”를 배제하지 않는데, 예를 들면, Y가 실질적으로 없는 조성물은 Y가 완전하게 없는 것일 수도 있다. 필요한 경우, “실질적으로”는 본 발명의 정의에서 생략할 수 있다.
- [0143] 수치  $x$ 와 관련하여 용어 “약(about)”는 예를 들면,  $x \pm 10\%$ 를 의미한다.
- [0144] 여기에서 사용된 것과 같은 용어 “질환(disease)”은 “장애(disorder)” 또는 “증상(condition)”(의학적 증상)과 일반적으로 동의어이고, 호환적으로 사용되는데, 이들 모두 인간 또는 동물 신체에 비정상적인 상태 또는 정상 기능을 손상시키는 이의 일부를 말하는 것으로 일반적으로 구별가능한 징조 및 증후에 의해 전형적으로 나타나며, 인간 또는 동물의 수명을 단축시키거나 삶의 질을 저하시키는 원인이 된다.
- [0145] 여기에서 사용된 것과 같이, 환자의 “치료(treatment)”는 예방 및 방지를 포함한다. 용어 “환자”는 인간을 포함하는 모든 포유동물을 의미한다. 환자의 예로는 인간, 소, 개, 고양이, 말, 염소, 양, 돼지 및 토끼를 포함한다. 일반적으로 환자는 인간이다.
- [0146] **실시예**
- [0147] 다음의 실시예들은 단지 예시를 위해 제공되며, 본 발명의 범위를 제한시키기 위한 의도는 아니다.
- [0148] **실시예 1: hCMV 중화 활성을 위한 B 세포 클로닝 및 스크리닝**
- [0149] 혈청내에 높은 hCMV 중화 항체 역가를 가진 기증자들이 확인되었다. 메모리 B 세포가 분리되고, 참고문헌 36에서 설명된 것과 같은 EBV 및 CpG를 이용하여 불사화시켰다. 간략하게 설명하자면, 메모리 B 세포는 CD22 비드를 이용하여 네가티브 선별, 이어서, 특이적 항체와 세포 소팅(sorting)을 이용하여  $IgM^+$ ,  $IgD^+$ ,  $IgA^+$  B 세포를 제거하여 분리되었다. 소트된 세포 ( $IgG^+$ )는 CpG 2006 및 조사된(irradiated) 동종이계 단핵 세포 존재하에 EBV로 불사화시켰다. 50개 메모리 B 세포를 각 포함하는 복제 배양물(Replicate cultures)은 20개 96웰 U자형 바닥 플레이트에 셋업하였다. 2주 후에, 배양 상층액을 수거하고, 별도의 분석에서 섬유아세포 또는 상피세포의 hCMV 감염을 중화시키는 능력에 대해 테스트하였다. B 세포 클론은 참고문헌 36에서 설명된 것과 같이, 포지티브 다클론 배양물로부터 분리되었다. 선별된 클론의 상층액에 있는 IgG 농도는 IgG-특이적인 ELISA를 이용하여 측정하였다.
- [0150] 바이러스 중화 분석을 위하여 임상적인 hCMV 분리체의 역가 양을 동량의 배양 상층액과 혼합하거나 또는 중화항체를 포함하는 인간 혈청 희석물과 혼합하였다. 실온에서 1시간 항온처리한후, 혼합물은 96웰 편평 바닥 플레이트내에서 내피세포(예, HMEC-1 세포), 상피세포(예, ARPE 망막 세포), 또는 섬유아세포(예, MRC-9 또는 간엽줄기 세포)의 합류(confluent) 단층에 첨가하고, 2일간 37℃에서 항온처리 하였다. 상층액은 버리고, 세포는 냉각 메탄올로 고정시키고, hCMV 초기 항원에 대한 마우스 단클론 항체 혼합물로 착색시키고, 이어서 형성-라벨

된 염소 항-마우스 Ig로 착색시켰다. 플레이트는 형광 현미경을 이용하여 분석 하였다. 중화 항체 부재하에, 감염된 세포는 ~1,000/field이며, 중화 항체 포화 농도 존재하에, 감염은 완전히 저해되었다. 바이러스 중화 분석은 또한 표적 세포로 수지상 세포를 이용하여 수행하였다. 중화 역가는 hCMV 감염의 50% 감소를 제공하는 항체의 농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 나타낸다.

[0151] 표 2는 UL128, UL130 및 UL131A의 조합에 특이성을 보이는 6G4는 내피, 망막 및 수지상 세포의 hCMV 감염을 매우 낮은 농도에서 중화시킬 수 있다(즉, 고효능을 가진다)는 것을 보여준다.

표 2

	50% 중화( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
	섬유아세포	내피/망막/수지상 세포
클론		
6G4	*	0.004
Cytotec <sup>^</sup>	5,000	50
기증자 혈청	33	1

[0153] \* 테스트된 최고 농도(예  $>2\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서 중화 없음. <sup>^</sup>Cytotect (Biotest)는 hCMV 과다면역 IgG의 집합(pool)이다.

#### [0154] 실시예 2: 단클론 항체에 의해 인지되는 표적 항원들의 확인

[0155] 내피세포의 감염을 중화시키는 인간 단클론 항체 6G4의 특이성을 측정하기 위하여, 전장의 hCMV 단백질 UL128, UL130, UL131A, gH, gL, gB, gM, 및 gN를 인코딩하는 하나 또는 그 이상의 벡터를 작제하였다. HEK293T 세포는 이들 벡터 단독 또는 복합으로 형질감염되었다. 36시간 후, 세포들은 고정되었고, 침투화시키고(permeabilized), 그리고 6G4으로, 이어서, 염소 항-인간 IgG로 착색시켰다. 도 1은 단클론 항체 6G4가 적어도 UL128, UL130 및 UL131A를 공동-발현시키는 세포를 착색하였다는 것을 보여준다. 6G4 착색 강도는 가상 전체 당 단백질 gCIII를 재구성하기 위하여 gH 및 gL가 UL128, UL130 및 UL131A와 함께 공동-형질감염되었을 때 증가되었다. 이들 데이터에서, 단클론 항체 6G4는 hCMV 단백질 UL 128, UL130 및 UL131A의 조합에 의해 한정된 형태학적 에피토프에 특이적이라는 것을 제시한다. 가장 가능한 것은 이 에피토프는 UL128, UL130 및 UL131A가 gH 및 gL와 함께 gCIII에서 어셈블리될 때만 적절한 형태에 있다는 것이다.

[0156] 본 발명은 실시예를 통하여 설명되었지만, 본 발명의 범위 및 사상 범위 내에서 변형이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0157] 참고문헌

- [1] Plachter *et al.* (1996) *Adv Virus Res* 46:195-261.
- [2] Gerna *et al.* (2002) *J Med Virol* 66:335-339.
- [3] Adler *et al.* (2006) *J Gen Virol* 87:2451-2460.
- [4] Gerna *et al.* (2005) *J Gen Virol* 86:275-284.
- [5] Hahn *et al.* (2004) *J Virol* 78:10023-10033.
- [6] Patrone *et al.* (2005) *J Virol* 79:8361-8373.
- [7] Wang (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18153-18158.
- [8] Wang *et al.* (2005) *J Virol* 79:10330-10338.
- [9] Nigro *et al.* (2005) *N Engl J Med* 353:1350-1362.
- [10] Borucki *et al.* (2004) *Antiviral Res* 64:103-111.
- [11] McLean *et al.* (2005) *J Immunol*, 174:4768-4778.
- [12] Lefranc *et al.* (2003) *Dev Comp Immunol* 27(1):55-77.
- [13] Lefranc *et al.* (1997) *Immunology Today*, 18:509.
- [14] Lefranc (1999) *The Immunologist*, 7:132-136.
- [15] US 3,766,162
- [16] US 3,791,932
- [17] US 3,817,837
- [18] US 4,233,402
- [19] US 4,676,980
- [20] US 4,831,175
- [21] US 5,595,721
- [22] WO00/52031
- [23] WO00/52473
- [24] US 4,766,106
- [25] US 4,179,337
- [26] US 4,495,285
- [27] US 4,609,546
- [28] Knauf *et al.* (1988) *J. Bio. Chem.* 263:15064-15070
- [29] Gabizon *et al.* (1982) *Cancer Research* 42:4734
- [30] Cafiso (1981) *Biochem Biophys Acta* 649:129
- [31] Szoka (1980) *Ann. Rev. Biophys. Eng.* 9:467
- [32] Poznansky *et al.* (1980) *Drug Delivery Systems* (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) pp. 253-315
- [33] Poznansky (1984) *Pharm Revs* 36:277
- [34] Kohler, G. and Milstein, C., 1975, *Nature* 256:495-497.
- [35] Kozbar *et al.* 1983, *Immunology Today* 4:72.
- [36] WO2004/076677

[0158]

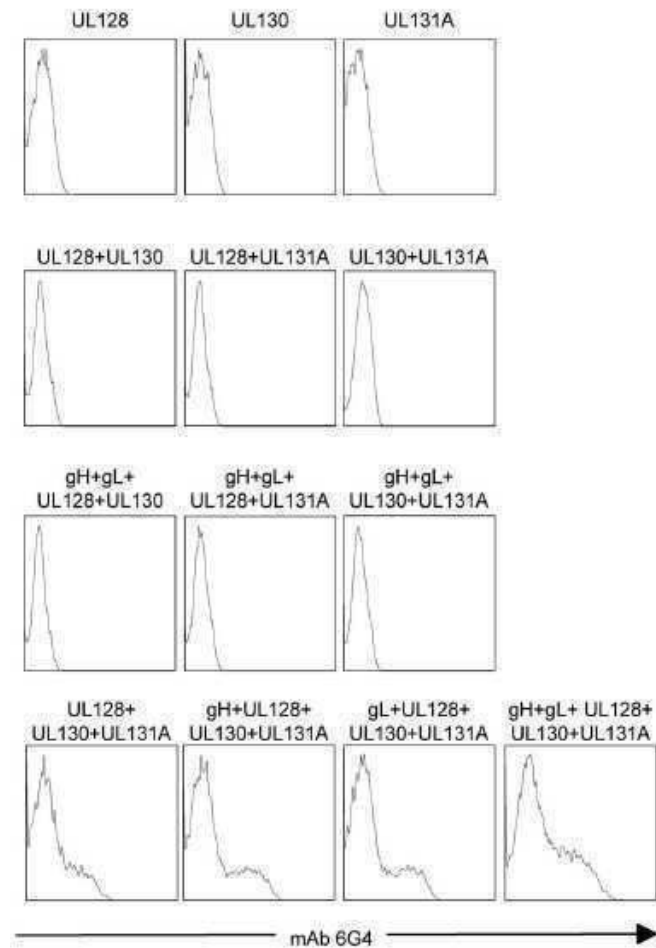
- [37] Chapter 4 of Kuby *Immunology* (4th edition, 2000; ASIN: 0716733315
- [38] Jones *et al.* *Biotechnol Prog* 2003,19(1):163-8
- [39] Cho *et al.* *Cytotechnology* 2001,37:23-30
- [40] Cho *et al.* *Biotechnol Prog* 2003,19:229-32
- [41] US 5,807,715
- [42] US 6,300,104

[0159]

도면

도면1

전장의 하기 단백질로 형질감염된 HEK293T 세포





## 도면2

### 6G4-VH

gagggtgcagctgggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccggaagtcctctgaggatctcctgtaaggctctctgg  
atacaggtttaccagctactacatcgccctgggtgcgccacatgcccgggaaaggccctggagtggtatggggatcatct  
atcctgggtgactctgatatcacatagcccgctccttcccaaggccaggtcaccatctcagccgacaagtcgccact  
accgctacctgcaatggagcagcctgagggtcctggacacccgcatgtactactgtgagagactctcattaacaga  
gtccggtgactacgtcgggtgcgtttgatattctggggccaagggaacaatggtcaccgtctctctcag

EVQLVQSGAEVKKPKGKSLRISCKASGYRFTSYIIAWVRHMPGKGLEWMGIIPGDSIDITYSPSFQGGQVTISADKSAI  
TAYLQWSSLRASDTAMYYCARLSLTESGDYVGAFDIWGQGTMTVTVSS

### 6G4-VL

gattttgtgtgactcagtcctccactctcctcggcgctcaccctgggacagccgggctccatctcctgcagggtctaa  
tcaaagcctcgtatagctgatgacaacatottcttgaattgggttcagcaggggcccaggccaaacctccaaggcgcc  
taattctataaggtttctaacccgggactctgggggtcccagacagattcagcggcagtggttcaggcactgatttcaca  
ctgaaaaatcagcaggggtggaggctgaggatgttggcgctttattactgcattgcaaggtagacactgggctcctctatt  
caotttcgggcccctgggacccaagtggtatcaaac

DFVLTSQSPSLAVTLGQPASISCRSNQSLVYSDDNIFLNWFQQGPGQPPARLIYKVSNRDSGVDPDRFSGSGSGTDFT  
LKISRVEAEDVGVYYCMQGRHWPLFTFGPGTKVDIK

## 서열목록

- <110> INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE
- <120> HUMAN CYTOMEGALOVIRUS NEUTRALISING ANTIBODIES AND USE THEREOF
- <130> IPA110010-US-DI
- <160> 16
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Gly Tyr Arg Thr Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Gly Asp Ser Asp

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Arg Ser Thr Ser Gly Asp Tyr Val Gly Ala Asp

1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Val Tyr Ser Asp Asp Asn

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Val Ser

1

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Arg His Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Val Ser Gly Ala Val Lys Lys Gly Lys Ser Arg Ser Cys Lys Ala

1 5 10 15

Ser Gly Tyr Arg Thr Ser Tyr Tyr Ala Trp Val Arg His Met Gly Lys  
 20 25 30  
 Gly Trp Met Gly Tyr Gly Asp Ser Asp Thr Tyr Ser Ser Gly Val Thr  
 35 40 45  
 Ser Ala Asp Lys Ser Ala Thr Thr Ala Tyr Trp Ser Ser Arg Ala Ser  
 50 55 60

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Ser Gly Asp Tyr Val  
 65 70 75 80  
 Gly Ala Asp Trp Gly Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 85 90

<210> 8  
 <211> 75  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

Asp Val Thr Ser Ser Ala Val Thr Gly Ala Ser Ser Cys Arg Ser Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Val Tyr Ser Asp Asp Asn Asn Trp Gly Gly Arg Arg Tyr Lys Val

20 25 30  
 Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Asp Arg Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 35 40 45  
 Asp Thr Lys Ser Arg Val Ala Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gly  
 50 55 60  
 Arg His Trp Thr Gly Gly Thr Lys Val Asp Lys  
 65 70 75

<210> 9  
 <211> 373  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggaagtc tctgaggatc 60

tcctgtaagg ctcttgata caggtttacc agctactaca tcgcctgggt gcgccacatg 120

cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccacatac 180  
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccgccac taccgcctac 240  
ctgcaatgga gcagcctgag ggctcggac accgccatgt actactgtgc gagactctca 300  
ttaacagagt ccggtgacta cgtcgggtgcg ttgataatct ggggccaagg gacaatggtc 360  
accgtctctt cag 373

<210> 10  
<211> 343  
<212> DNA

<213> Homo sapiens  
<400> 10

gattttgtgc tgactcagtc tccactctcc ctggccgtca cccttggaca gccggcctcc 60  
atctcctgca ggictaatca aagcctcgta tacagtgatg acaacatctt ctgaattgg 120  
tttcagcagg ggccaggcca acctccaagg cgcctaattt ataaggttcc taaccgggac 180  
tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240  
agcagggtgg aggctgagga tggtggcggt tattactgca tgcaaggtag aactggcct 300  
cctctattca ctttcggccc tgggacaaaa gtggatatca aac 343

<

210> 11  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 11

ggatacaggt ttaccagcta ctac 24

<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 12

atctatcctg gtgactctga tacc 24

<210> 13  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<400> 13

gcgagactct cattaacaga gtccggtgac tacgtcggcg cgtttgatat c	51
<210> 14	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
caaagcctcg tatacagtga tgacaacatc ttc	33
<210> 15	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
aaggtttct	9
<210> 16	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 16	
atgcaaggta gacactggcc tcctctattc act	33