(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12P 21/08

(45) 공고일자 2000년04월15일
(11) 등록번호 10-0253426
(24) 등록일자 2000년01월24일

(21) 출원번호 10-1992-0702000
(22) 출원일자 1992년08월20일
(86) 국제출원번호 PCT/GB 91/02300
(86) 국제출원일자 1991년12월20일
(65) 공개번호 특1992-0703832
(43) 공개일자 1992년12월18일
(87) 국제공개번호 WO 92/11383
(87) 국제공개일자 1992년07월09일
(81) 지정국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히덴스타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 이탈리아 룩셈부르크 네델란드 스웨덴 그리스 모나코
OA OAPI특허 : 베닌 부르키나파소 카메룬 중앙아프리카공화국 차드 콩고 아이보리코스트 가봉 기니 말리 모리타니아 세네갈 토고
국내특허 : 오스트리아 오스트레일리아 바바도스 불가리아 브라질 카나다 스위스 리히덴스타인 체코슬로바키아 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 룩셈부르크 마다가스카 말라위 네델란드 노르웨이 몽고 루마니아 수단 스웨덴 소련 폴란드 미국
(30) 우선권주장 PCT/GB90/02017 1990년12월21일 EPO(WO)
9109645.3 1991년05월03일 영국(GB)
(73) 특허권자 쎌테크리미티드 죤 에드워드 베리언
영국,벅크셔에스엘1 4이엔,슬로흐,배쓰로드216
(72) 발명자 아데어, 존, 로버트
영국, 벅스 HP 14 3RN, 하이 위콤, 스톡켄 쳐치,죠지 로오드 23
에쓰월, 딜지트, 신프
영국, 런던 WC1 7CHX,타비스톡 스퀘어, 놀리스 하우스, 플랫 35
엠타즈, 죤, 스팬서
영국, 벅스 SL7 1SQ, 말로우, 템플, 템플 밀 아이랜드 49
보드머, 마크, 윌리엄
영국, 옥스포드 OX1 5AS, 사우스 힌크씨, 매너 로오드 5, 로즈 코타즈
(74) 대리인 김동엽, 임석재

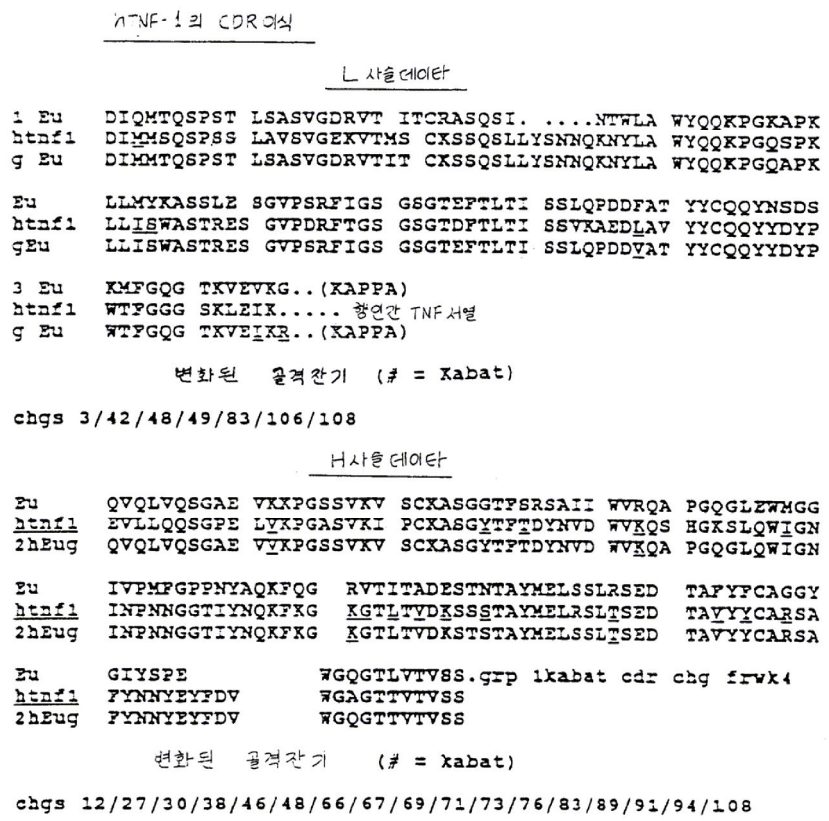
심사관 : 이천영

(54) TNF-α에 특이적인 재조합 항체

요약

인간 TNFα에 대해 특이성을 갖는 재조합, 특히 인간형화된, 즉 인간형화된 키메라 항체와 CDR-이식된 인간형 항체가 진단과 치료에 사용되기 위해 제공된다. 특히 항체 분자는 뮤린 모노클로날 항체 CB0006, CB0010, hTNF3 이나 101.4에서 유도된 항원 결합부위를 갖고 있다. 바람직한 CDR-이식되고 인간형화된 항-hTNFα 항체는 인간 수용체 골격과 공여체 항원결합 부위를 포함하는 가변부 영역을 포함하는데, 여기서 상기 골격은 특정위치에 공여체 잔기를 포함한다. 항체분자는 바람직하지 않을 정도로 높은 레벨의 TNF로 인한 장애나 이의 위험으로부터 고통받는 인간 환자를 치료하는데, 특히 패혈증, 내독소성이나 심혈관계 쇼크의 감염성 장애와 면역조절 장애를 치료하는데 사용될 것이다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

TNF-α에 특이적인 재조합 항체

[발명의 분야]

본 발명은 종양 괴사 인자 알파(TNF-α)의 항원 결정 인자에 대한 특이성을 갖는 재조합된, 특히 인간형화된 항체분자와 재조합 DNA 기술을 사용하는 이의 제조방법 및 이의 치료학적 이용에 관한 것이다.

본 발명의 설명을 위한 "재조합 항체 분자"란 용어는 재조합 DNA 기술의 사용과 천연 면역글로부린의 어떤 유사체나 이의 단편을 포함하는 임의의 방법에 의해 제조된 항체분자를 설명한다.

또한, 본 발명에 있어서, "인간형화된 항체 분자"란 용어는 비-인간종으로부터의 면역글로부린에서 유도된 항원 결합부위를 가지고 있고, 인간 면역글로부린으로부터 유도된 분자의 면역글로부린에서 유도된 일부분이 그대로 남아있는 분자를 설명한다. 그러므로, 인간형화된 항체분자는 인간의 불변부영역에 결합되어 있는 완전한 비-인간 H 및/또는 L 사슬 가변부 영역을 포함하는 인간형화된 키메라 항체 분자를 포함한다. 인간형화된 항체분자는 또한 H 및/또는 L 사슬 인간 가변부 골격으로 이식된 비-인간 항체로부터의 하나 또는 그 이상의 CDR을 포함하는 CDR-이식된 인간형화된 항체분자를 포함한다.

항체의 항원결합 특이성은 가변부 영역의 골격부 위로 옮겨지는 비교적 짧은 펩타이드 서열인 상보성 결정부(CDR)에 의해 결정된다. 각각의 H와 L사슬 가변부 영역에는 3개의 CDR(CDR1, CDR2와 CDR3)이 있다.

"MAb"란 약어는 모노클로날 항체를 의미한다. 본 설명에 있어서, 참고문헌은 숫자로 매겨진 공고물로 나타내고, 이 공고물은 설명부의 끝에 순서대로 나타냈다.

[발명의 배경]

천연 면역글로부린은 효소분해에 의해 유도된 Fab, Fv, $(Fab')_2$와 Fc 단편과 같은 다양한 이의 단편으로서 수년동안 알려져 있다. 천연 면역글로부린은 일반적으로 각각의 상부 암(arm)쪽의 끝을 향해 항원결합 부위를 갖는 Y-형태의 분자를 포함한다. 구조의 잔부와 특히 Y의 줄기는 면역글로부린과 함께 효과기 기능을 매개한다.

천연 면역 글로부린은 분석, 진단, 그리고 좀 더 한정적인 범위로 치료에 이용되었다. 그러나, 이러한 이용, 특히 치료적 이용은 천연 면역 글로부린의 다세포성(폴리클로날)성질 때문에 지연되고 있다. 치료제로서의 면역 글로부린의 잠재성을 실현하기 위한 중요한 단계는 제한된 특이성(1)의 모노클로날 항체(MAb)의 제조 기술을 발견하는 것이다.

그러나, 대부분의 MAb는 설치류 골수종(rodent myeloma) 세포와 설치류의 비장 세포의 융합물인 하이브리도마에 의해 생산되고 따라서 이들은 본질적으로 설치류 단백질이다. 인체 MAb의 생산에 관한 보고는

거의 없다.

대부분의 유용한 MAb 설치류에 기원하기 때문에 인체에서 자연적으로 항원성을 나타내고 따라서 HAMA(Human Anti-Mouse Antibody 인체 항-마우스 항체)반응이라 불리우는 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있다. 따라서, 인체에서 치료제로서의 설치류 MAb의 사용은 원천적으로 제한되는데 왜냐하면 인간은 MAb에 대해 면역적 반응을 개시할 것이고 또한 전체적으로 MAb를 제거하거나 적어도 이의 효과를 감소시키리라는 사실때문이다. 따라서 실행에 있어서, 설치류 기원의 MAb는 바람직하지 않은 반응을 일으키는 것 뿐만 아니라 HAMA 반응이 곧 MAb를 무효화 하기 때문에 한가지 이상의 또는 몇몇 치료를 위해 환자에게 사용될 수는 없다. 예를들면, T-세포 수용체-CD3 복합체내의 항원을 인식하는 OKT3 마우스 IgG2a/K MAb는 전세계적으로 여러 나라에서 급성 이인자형 이식 거부중 치료에서 면역 억제제로 유용하다고 밝혀졌다(Chatenoud 등 ((2)와 Jeffers 등 (3)). 그러나, 이러한 저러한 MAb의 설치류적 특성의 관점에서, 주요 항-유전형 성분을 포함하는 중요한 HAMA 반응 1 사용상 중에 증가될 것이다. 명확하게, 이러한 바람직하지 않은 HAMA 반응을 감소시키거나 제거하는 것이 크게 요구되어 졌고 따라서 이러한 항체의 사용범위가 확대되었다.

따라서 인체에서 비-인체 MAb를 덜 항원성이 되게 하기 위한 제안이 이루어졌다. 이러한 기술은일반적으로 "인간형화(Humanisation)" 기술이라고 명명될 수 있다. 이러한 기술들은 전형적으로 항체분자의 폴리펩타이드 사슬을 암호화 하는 DNA 서열을 조작하는 재조합 DNA 기술의 사용을 포함한다.

한 항체의 전(全) 가변성 영역으로 이뤄진 항원 결합부위가 있는 키메라항체(Chimeric Antibody) 생산을 포함하는 MAb의 인간형화를 위한 선방법은 다른 항체로부터 유도된 불변의 영역과 연결된다. 이러한 키메라화(Chimerisation) 공정을 수행키 위한 방법은 EP-120694(Celltech 회사), EP0125023(Genentech 회사와 City of Hope), EP-A-0 171496(Res Dev. 회사.일본), EP-A-0 173494(스탠포드 대학)과 WO86/01533(Celltech 회사)에 설명되어 있다. 이러한 선행특허 출원은 마수스 MAb로부터의 가변성 영역과 인체 면역 글로부린으로부터의 불변의 영역을 지닌 항체분자를 제조하는 방법을 개시하고 있다.

그러나 이러한 인간형화된 키메라 항체는 여전히 무시할 수 없을 정도의 비율로 비인간 아미노산 서열, 즉 다시 말하면 전 비-인간 가변성 영역을 함유하고 있다. 따라서, 특히 만약 연장된 기간에 걸쳐서 투여된다면 여전히 몇몇 HAMA 반응을 일으키게 될 것이다(Begent 등 (4)).

또 다른 대안적 길(방법)에 있어서, 마우스 MAb의 EP-A-0239400(겨울호)에 개시되어 있는 상보성 결정부위(CDR)는 긴 올리고 핵산염을 사용한 부위 직접 변이(site directed mutagenesis)에 의해 인간 면역 글로부린의 가변성 영역의 골격부위로 이식되었다. 위와 같은 CDR-이식된 인간형화된 항체는 이들이 훨씬 작은 비율로 포함하고 있다는 비인간 아미노산 서열의 견지에서 인간형화된 키메라 항체보다 HAMA 반응을 훨씬 덜 일어나게 한다.

CDR-이식에 의해 MAb를 인간형화 하는 초기 작업은 NP나 NIP 항원과 같은 MAb를 식별할 수 있는 합성 항원으로써 수행되었다. 그러나, 인간-세포위의 마우스 MAb 식별 라이소자임(1ysosyme)과 레트 MAb 식별 항원에 있어서의 실시예들은 각각 Verhoeyen 등(참고문헌 5)과 Riechmann 등(참고문헌 6)에 개시되어 있는 CDR-이식에 의해 인간형화 된다. 인간의 T-세포위의 항원에 대한 CDR-이식된 항체의 제조는 또한 WO89-07452(의학연구 의회)에 개시되어 있다.

Riechmann 등/의학 연구의회에 의해 CDR 부위만의 이전(kabat 참고문헌 (7)과 (8)에 설명되어 있듯이)은 CDR-이식된 제품에 있어서 만족할만한 항원 결합능을 제공하기에는 충분하지 않다는 것이 발견되었다. Riechmann 등은 인간 H사슬 서열의 27위의 세린(Serine)잔기를 만족할만한 항원 결합능이 있는 CDR-이식된 제품을 얻기 위해 상응하는 레트 페닐알라닌(Phenylalanine)잔기로 변화시키는 것이 필요하다는 것을 알아냈다. H 사슬(Heavy chain)의 27위의 잔기는 CDR 1에 인접한 루우프 내에 있다. 부가적으로 H 사슬의 30위에 있는 인간 세린을 레트의 타이로신으로 바꾼 또 다른 구조는 단지 27위만 세린에서 페닐알라닌으로 변경된 인간형화된 항체에 비해 그다지 중요한 변경된 결합능을 가지고 있지는 않다. 이러한 결과는 CDR 부위 밖에서, 바람직하게는 H 사슬의 CDR 1에 인접해 있는 구조상의 루우프에서 인간 서열의 잔기로의 변화가 좀더 복작한 항원을 식별하는 CDR-이식 항체에 대해 효과적인 항원 결합능을 얻기 위해 필요하다는 것을 나타내 준다. 획득한 최상의 CDR-이식 항체의 결합친화력에 대해서는 최초의 원 MAb 보다 여전히 그 친화성이 훨씬 달하다.

가장 최근의 Queen 등(9)은 뮤린 MAb(항-tac)의 CDR과 인간 면역 글로부린 골격, 불변성 영역을 결합함으로써 인터루킨(interleukin)2 수용체에 결합하는 인간형된 항체의 제조에 관해 설명하고 있다. 인간의 골격영역이 항-Tac MAb 서열과의 상동을 최대화 하기 위해 선택되어 진다. 부가적으로, 컴퓨터 모델링(Computer modelling)이 CDR 또는 항원과 기꺼이 서로 반응하는 골격의 아미노산 잔기를 확인하기 위해 사용되었고, 마우스 아미노산은 항체의 인간형화에 있어서 이러한 위치들에 사용되었다.

WO 90/07861 Queen 등에서 인간형화된 면역 글로부린의 디자인을 위한 4가지 기준이 제안되어 있다. 첫번째 기준은 인간형화된 비-인간 공여체(donor) 면역 글로부린과 유별나게 상동적인 특정 인간 면역 글로부린으로 부터의 골격을 인간 수여체(acceptor)로 사용한다는 것이거나 또는 많은 인간 항체로부터의 일치된 골격을 사용한다는 것이다. 두번째 기준은 만약 인간 수여체 잔기가 유별나거나 공여체 잔기가 골격의 특이 잔기에의 인간서열에 대해서 전형적이라면 수여체 보다는 다소 공여체 아미노산을 사용한다는 것이다.

세번째 기준은 CDR에 바로 인접해 있는 위치에서 수여체 보다는 공여체의 골격아미노산 잔기를 사용한다는 것이다. 네번째 기준은 아미노산의 3차원의 면역 글로부린 모델에서 CDR의 약 3Å내에 측쇄원자를 가지고 있을 것으로 예상되고 인간형화된 면역 글로부린의 CDR이나 또는 항원과 서로 반응할 수 있을 것으로 예상되는 골격 위치에서 공여체 아미노산 잔기를 사용한다는 것이다. 제2의 기준, 제3 또는 제4의 기준이 부가적으로 적용될 수도, 또는 제1의 기준에 대해 양자택일적으로 적용될 수도 있고, 단독으로 혹은 서로 결합해서 적용될 수도 있다.

WO 90/07861에는 단독 CDR-이식 인간형화된 항체의 제조에 관해 자세하게 설명되어 있는데, 이 인간형화

된 항체는 IL-2 수용체의 p55 Tac 단백질에 대한 특이성을 가지고 있다. 상기 전체 4가지의 기준을 결합하여 이러한 인체형화된 항체 즉 수여체로서 사용된 인간 항체 Eu(7)의 가변성 골격을 디자인 하는데 적용되었다. 결과로서 생긴 인간형화된 항체에 있어서, 공여체 CDR는 Kabat 등(참고문헌 7 & 8)에 의해 정의되어 있고 덧붙여서 마우스 공여체 잔기는 인간 수여체 잔기 즉 H 사슬의 제27위, 30위, 48위, 66위, 67위, 89위, 91위, 94위, 103위, 104위, 105위와 107위 그리고 L 사슬의 제48위, 60위, 63위의 장소에서 사용되었고 또한 가변성의 영역골격의 장소에서도 사용되었다. 얻어진 인간형화된 항-Tac 항체는 3 $\times 10M^{-1}$의 p55에 대해 뮤린 MAb의 1/3정도의 친화성을 갖고 있는 것으로 보고되어졌다.

더구나 우리는 CDR-이식 인간형화된 항체 분자의 제조에 대해 더욱더 연구를 하여 잔기의 아미노산 동일성이 만족할 만한 결합친화력이 있는 CDR-이식된 제품을 얻는데 중요한 가변성 영역(즉 다시말해서 가변성 영역의 kabat CDR 와 구조상 루우프)의 골격내의 위치 단계(hierarchy)를 확인했다. 이것은 공여체 면역 글로부린과 수여체 골격간의 상동 레벨에 관계없이 매우 광범위하게 적용될 수 있는 만족할만한 CDR-이식된 제품을 얻기 위한 약물의 공정성적표(Protocol)를 만들 수 있도록 했다. 우리가 중요하다고 확인한 잔기 세트는 Queen 등(참고문허 9)에 의해 확인된 잔기와 일치하지는 않는다. 계류중인 우리의 국제특허출원 WO91/09967은 CDR 이식되고, 특히 인간형화된, 항체 H 및 L 사슬을 제조하고 임의의 요구되는 특이성의 분자를 완성하는 원인을 개시하고 있다. 국제특허출원 WO/91/09967의 총 개시는 참고문헌과 함께 개시되어 있다.

Tempest 등(10)은 최근 생체내에서 인간의 호흡기 합포 바이러스(RSV) 감염을 저해하는데 사용하기 위한 재성형된 인간의 모노클로날 항체의 제조에 대해 설명하고 있다. 이 재성형된 항체는 뮤린 MAb의 CDR을 암호화하는 합성 올리고 뉴클레오티드를 이식함으로써 제조되고, 이것은 인간 IgG1의 골격을 암호화하는 DNA, 즉 모노클로날 항체로 부위-직접 돌연변이 시킴으로써 RSV 감염을 중화시킨다. 그러나, CDR만 마우스와 인간항체 사이로 전이된 간단한 재성형 항체는 단지, 상기 발명의 배경에서 그다지 중요하지 않은, RSV에 대해 빈약한 결합력을 보인다. 부분적으로 결합능을 회복하기 위해서는 부가적으로 H사슬의 CDR3에 인접해 있는 골격부내의 인간잔기를 마우스 잔기로 전환하는 것이 필요하다고 밝혀졌다. Tempest 등은 WO91/09967의 원안에서 확인된 중요위치에서 인간 간지를 마우스 잔기로 전환하지 않았다.

TNFα는 면역계의 세포에 의해서 유리되고 상호반응하는 시토킨이다. 따라서 TNFα는 그람음성균의 리포폴리사카라이드(LPS)에 의해 활성화되는 대식세포에 의해 유리된다. TNFα는 세균 패혈증에 따른 내독소 쇼크의 전개와 발병에 관련된 중요 중심부의 내인성 매개체로 나타났다.

TNFα에 대한 항체는 내독소 쇼크의 예방과 치료를 위해 제안되어 왔다(Beutler 등 (11)). 그러나 그러한 치료에 유용한 TNFα에 대한 항체는 전형적으로 뮤린 MAb이다. 그렇듯이, 한가지나 또는 소수의 몇몇 치료를 위해 사용될 경우 발생될 수 있는 바람직하지 않은 HAMA(인간 항-마우스 항체)의 관점에서 보면 이러한 뮤린 MAb는 인간의 치료를 위해 단지 제한적으로만 사용된다. 따라서, 그것은 인간을 치료하는데 사용되는 인간형화된 항-TNFα를 제조하기 위해서 매우 바람직한 목적이다.

우리의 계류중인 국제특허 출원 WO91/09967은 무엇보다도, TNFα에 대해 특이성을 갖는 인간형화된 CDR-이식 항체의 제조에 관해 개시하고 있다. 특히 WO91/09967의 실시예 5에는 61E 17(달리는 CB0006으로 알려져 있음), hTNF1(CB0010으로 알려져 있음), hTNF3과 101.4로 확인된 뮤린 항-인간 TNFα MAb에서 유도된 인간 TNFα에 대한 특이적인 인간형화된 CDR 이식항체의 제조에 관해 개시되어 있다. 본 출원은 특별히 인간 TNFα에 대한 재조합되고, 특히 인간형화된 항체에 관한 것이고, WO91/09967에 개시되어 있는 것들을 포함하며, hTNF1(DB0010)을 기본으로 하는 인간 TNFα에 대한 더욱더 개량된 인간형화된 CDR-이식 항체에 관한 것이다. 다양한 항-인간 TNFα 뮤린 MAb를 더욱 연구한 결과 hTNF1과 101.4가 특별히 항-TNF 치료에 사용되기에 바람직한 특성을 가지고 있음이 밝혀졌다.

[발명의 요약]

따라서, 본 발명은 인간 TNFα에 대해 특이성을 갖는 재조합 항체분자를 제공한다.

본 발명의 재조합 항체 분자는 바람직하게는 TNF를 중화시키는, 즉, 다시 말하면 생체내나 또는 시험관내 실험에서 측정했을때 인간 TNFα의 생리적 활성을 감소시키거나 저해할 수 있다.

바람직하게, 본 발명은 뮤린 MAb CB0006, CB0010, hTNF3이나 101.4, 특히 뮤린 MAb CB0010이나 101.4에서 유도된 항원결합 부위를 갖는 재조합 항체 분자를 제공한다.

바람직하게, 본 발명의 재조합 항체 분자는 인간형화된 키메라 항체 분자와 CDR-이식된 인간형화된 항체 분자 모두를 포함하는 인간형화된 항체 분자이다.

본 설명을 하는데 있어서, "인간형화된 키메라 항체 분자(Chimeric humanised antibody molecule)"는 인간 불변부에 결합되어 있는 완전한 비-인간(즉 뮤린 MAb)가변부를 포함하고 "CDR-이식된 인간형화된 항체 분자"는 인간의 H 및/또는 L 사슬 가변부 골격으로 이식된 비-인간 항체(즉, 뮤린 MAb) 유래의 하나나 그 이상의 CDR을 포함하는 항체 H 및/또는 L 사슬을 포함한다.

본 발명의 CDR-이식된 인간형화된 항-TNFα 항체는 WO91/09967에 설명되어 있는 본발명의 첫번째, 두번째, 세번째 및 네번째 양태에 정으된 대로 항-인간 TNFα 항체 H와 L 사슬 및 분자를 포함한다.

[발명의 상세한 설명]

결국, 첫번째 바람직한 양태에서, 본 발명은 제6, 23위 및/또는 제24, 48위 및/또는 제49, 71위 및/또는 제73, 75위 및/또는 제76위 및/또는 제78위와 제88위 및/또는 91위 중 적어도 하나에 공여체 잔기를 포함하는 인간의 수여체 골격과 공여체 결합부위를 포함하는 가변성 부위 영역을 갖는 CDR이 이식된 인간형화된 항-hTNFα 항체 H사슬을 제공한다.

첫번째 바람직한 양태에서, H사슬 골격은 23, 24, 49, 71, 73과 78위 또는 23, 24와 49위에 공여체 잔기를 포함한다. H사슬 골격의 제71, 73과 78위의 잔기는 바람직하게는 모두 수여체이거나 또는 모두 공여

체 잔기이다.

특히 첫번째 바람직한 양태에 있어서, H사슬 골격은 부가적으노 제6, 37, 48과 94위의 하나, 몇몇 또는 모든 위치에 공여체 잔기를 포함한다. 또한 보통 종(species)을 가로질러 보존되는 H사슬 골격의 위치 즉 다시말하면 제2, 4, 25, 36, 39, 47, 93, 103, 104, 106과 107위의 잔기는 만약 공여체와 수여체간에 서로 보존되지 않는다면 부가적으로 공여체 잔기를 함유한다.

덧붙여서 H 사슬 골격은 선택적으로 다음의 위치중 하나, 몇몇 또는 모든 위치에 공여체 잔기를 함유한다.

1과 3,

72와 76,

69(만약 48위가 공여체와 수여체간에 아무런 변화가 없을때이다.)

38과 46(만약 48위가 공여체 잔기일때)

80과 20,

67,

82와 18(만약 67위가 공여체 잔기일때)

91,

88위와,

9, 11, 41, 87, 108, 110위와 112위에서 어떤 한 위치 또는 하나 이상의 위치.

본 설명에서, 전형적으로 공여체 항체튼 설치류의 MAb와 같은 비-인간 항-hTNFα 항체이고, 수여체 항체는 인간항체이다.

본 발명의 CDR이 이식된 인간형화된 항-hTNFα 항체 생성물에서, 공여체 항원 결합부위는 전형적으로 공여체 항체로부터의 CDR을 적어도 포함한다. 보통 공여체 항체 결합부위는 H사슬과/또는 L사슬의 가변성 영역 각각의 적어도 2개의 CDR이나 바람직하게는 3개의 모든 CDR를 함유한다. CDR은 kabat CDR, 구조상 루우프 CDR나 또는 kabat와 구조상 루우프 CDR의 혼성(Composite), 그리고 이러한 것들의 어떠한 배합을 포함할 것이다. 바람직하게는, CDR-이식된 H사슬의 가변성 영역의 항원 결합부위는 CDR2(잔기 50-65)와 CDR3(잔기 95-102)에서 kabat CDR에 상응하는 CDR과 CDR1(잔기 26-35)에서 kabat와 구조상 루우프 CDR의 혼성을 포함한다. 바람직한 CDR 지정은 첫번째 바람직한 양태의 CDR-이식 H 사슬에 대해 사용되는데, 즉 26-30잔기는 CDR1 내에 포함된다.

본 출원에서 상기와 또 다른 곳에서 주어진 잔기 명칭은 kabat 넘버링(kabat numbering)에 따라 번호를 붙였다(참고문헌 7와 8). 따라서 잔기 명칭은 아미노산 잔기의 선상 넘버링과 직접적으로 항상 상응하지는 않는다. 사실상 선상 아미노산 서열은 기본적인 가변성 영역 구조의 구조적 성분(골격이든지 또는 CDR 이든지 간에)의 축소 또는 삽입에 상응하는 엄밀한 kabat 넘버림에 있어서 보다 더 작은 또는 부가적인 아미노산을 포함할 것이다. 예를 들어, Queen 등(참고문헌 9)에 의해 설명된 항-Tac 항체의 H사슬 가변성 영역은 kabat 넘버링에 있어서 CDR2의 잔기 52후에 하나의 아미노산 삽입(잔기 52a)을 포함하고 있고 골격 잔기 82후에 3개의 아미노산 삽입(잔기 82a, 82b, 82c)을 포함하고 있다. 잔기의 정확한 kabat 넘버링은 "표준" kabat 넘버링된 서열을 지닌 항체 서열의 상동 부위에 주어진 항체를 정렬함으로써 결정될 것이다.

본 발명의 상기 및 다른곳에서 설명되었듯이, 본 발명의 CDR-이식된 인간형화된 항체 분자가 특별한 공여체/수여체 항체쌍에 사용될때, 몇몇 경우에서 공여체와 수여체의 아미노산 잔기는 공여체 잔기로의 변화를 위해 확인된 특별한 위치에서 서로 동일할 것이고, 따라서 변화가 없거나 또는 수용체 골격 잔기가 필요하게 된다.

두번째 바람직한 양태에 있어서, 본 발명은 또한 골격이 제1위와/또는 3위, 46위와/또는 47위의 적어도 한 위치에 공여체 잔기를 함유하는 수여체 골격과 공여체 CD2 결합부위를 포함하는 가변성 부위 영역을 지닌 CDR-이식된 인간형화된 항-hTNFα 항체 L사슬을 제공한다.

바람직하게는 이 바람직한 양태의 CDR 이식된 L사슬은 46위와/또는 47위에 공여체 잔기를 포함한다.

또한 세번째의 바람직한 양태에 있어서, 본 발명은 골격이 제46위, 48위, 58위와 71위의 적어도 어느 한 위치에 공여체 잔기를 함유하는 인간 수여체 골격과 공여체 항원결합부위를 포함하는 가변성 부위영역을 지닌 CDR-이식된 인간형화된 항-hTNFα 항체 L사슬을 제공한다.

세번째 바람직한 양태에서 골격은 제46위, 48위, 58위와 71위의 모든 위치에 공여체 잔기를 포함한다.

두번째와 세번째의 바람직한 양태에 있어서, 골격은 부가적으로 제36위, 44위, 47위, 85위와 87위에 공여체 잔기를 포함한다. 마찬가지로 보통 종을 가로질러 보존되는 L사슬골격의 위치, 즉 제2위, 4위, 6위, 35위, 49위, 62위, 64-69위, 98위, 99위, 101위와 102위는, 만약 공여체와 수여체간에 서로 보존되지 않는다면 부가적으로 공여체 잔기를 포함한다. 가장 바람직한 L사슬 골격은 부가적으로 제2, 4, 6, 35, 36, 38, 44, 47, 49, 62, 64-69, 85, 87, 98, 99, 101과 102위에 공여체 잔기를 포함한다.

덧붙여서 두번째 및 세번째의 바람직한 양태의 골격은 선택적으로 다음의 위치 중 하나, 몇몇 또는 모든 위치에 공여체 잔기를 함유한다:

1과 3위,

63위,

60위(만약 60과 65위가 잠재적 염교(salt bridge)를 형성할 수 있다면)

70위(만약 70위와 24위가 잠재적인 염표를 형성할 수 있다면)

73위와 21위(만약 47위가 공여체와 수여체 사이에 차이가 있다면)

37위와 45위(만약 47 이가 공여체와 수여체 사이에 차이가 없다면)

제10, 12, 40, 80, 103과 105위 중 하나 또는 그 이상.

바람직하게는, CDR-이식된 L사슬 가변성 영역의 항원 결합부위는 CDR1(잔기 24-34), CDR2(잔기 50-56)과 CDR3(잔기 89-97)에서 kabat CDR에 상응하는 CDR를 함유하는 상술된 두번째 및 세번째의 바람직한 양태를 포함한다.

네번째 양태에서 본 발명의 또다른 제공은, CDR-이식된 항체분자는 본 발명의 바람직한 첫번째 및 두번째나 또는 첫번째 및 세번째 양태에 따라서 적어도 하나의 CDR-이식된 H사슬을 포함하고, CDR-이식된 L사슬을 포함한다는 것이다.

그러나, 특별히 바람직한 첫번째 양태에 있어서, 본 발명은 인간 수용체 골격(특히 EU인간 수용체 골격)과 hTNF1 공여체 항원결합부위를 포함하는 가변부 영역이 있는 CDR-이식된 인간형화된 항체 H 사슬을 제공하는데, 여기서 골격은 12, 27, 30, 38, 46, 48, 66, 67, 69, 71, 73, 76, 83, 89, 91과 94위에서 hTNF1 공여체 잔기를 포함한다.

EU H사슬 골격은 인간 H사슬 골격에 대해 변태적인 H사슬의 골격4(FR4)내에 잔기를 가진다. 따라서, 바람직하게 인간의 일치 잔기 트레오닌(T)은 108위에서 사용될 것이다. 우연히도 108위의 뮤린 hTNF1 잔기도 역시 트레오닌이다.

특별히 바람직한 두번째 양태에서, 본 발명은 인간의 수요아체 골격(특별히 EU 인간 수용체 골격)과 hTNF1 공여체 항원 결합부를 포함하는 가변영역을 가지는 CDR-이식된 인간형화된 항체 L사슬을 제공하는데, 여기서 골격은 3, 42 및 49위에서 hTNF1 공여체 잔기를 포함한다.

EU 인간골격이 L사슬에 대해 사용될때, 48, 83, 106과 108위의 EU 잔기는 인간항체에 대해 변태적이기 때문이다. 따라서 인간 일치 서열은 이러한 위치의 몇몇 또는 바람직하게는 모든 위치에 사용될 것인바, 즉 48위에서 이소로이신(I), 83위에서 발린(V), 106위에서 이소로이신(I)과 108위에 아르기닌(R)이 사용될 것이다. 우연하게도, 뮤린 hTNF1 잔기는 48(I)위, 106(I)위, 108위(R)에서 인간 일치 잔기와 동일하다. 그러나, 83위의 인간 일치 발린(V)잔기는 이 위치에서 EU 잔기(F)와 hTNF 1 잔기(L)와 서로 다른다.

특별히, 본 발명은 첫번째의 바람직한 양태에 따른 적어도 하나의 CDR-이식된 인간형화된 H사슬과 두번째의 바람직한 양태에 따른 적어도 하나의 CDR-이식된 인간형화된 L사슬을 포함하는 CDR-이식된 인간형화된 항체분자를 포함한다.

또한, 특별히 바람직한 세번째의 양태에 있어서, 본 발명은 인간 수용체 골격(특히 KOL 인간 수용체 골격)과 101.4 공여체 항원 결합부를 포함하는 가변부 영역을 갖는 CDR-이식된 인간형화된 항체 H 사슬을 제공하는데, 여기서 골격은 4, 11, 23, 24, 28, 73, 77, 78, 79, 91, 93과 94위에서 101.4 공여체 잔기를 포함한다.

H 사슬의 108위에서의 KOL 잔기 프롤린(P)은 인간항체에 대해 변태적이다. 따라서, 바람직하게는, 인간 일치 잔기 루신(L)은 KOL이 만약 인간 수용체 골격으로 사용될 경우 이 위치에서 있게 된다. 유연하게도, 뮤린 101.4 항체는 이 위치에서 인간 일치 잔기(L)을 갖는다.

더우기, 특별히 바람직한 네번째 양태에 있어서, 본 발명은 인간 수용체 골격(특히 REI 인간 수용체 골격)과 1, 3, 4와 73위에의 101.4 공여체 잔기를 포함하는 가변부 영역을 갖는 CDR-이식된 인간형화된 항체 L 사슬을 제공한다.

REI L사슬 인간골격은 39위(트레오닌, T), 103위(루신, L), 105위(글루타민, Q)와 107위(트레오닌, T)에서의 인간항체에 대해 변태적인 잔기를 갖는다. 따라서, REI가 L사슬 골격으로 사용될때, 인간일치 잔기는 39위(라이신, K) 104위(발린, V), 105위(글루탐산, E)과 107위(라이신, K)에서 사용된다. 우연히도, 뮤린 101.4잔기는 39위(K), 105위(E)와 107위(K)에서의 인간 일치 서열과 동일하다. 그러나, 104(V)위에서의 인간 일치 잔기는 이 위치에서의 뮤린 101.4 잔기와 루신(L) REI과 서로 다르다.

또한, 특별히, 본발명은 특별히 바람직한 세번째 양태에 따른 적어도 하나의 CDR-이식된 인간형화된 H사슬과 특별히 바람직한 네번째 양태에 따른 적어도 하나의 CDR-이식된 인간형화된 L사슬을 포함하는 CDR이식된 인간형화된 항체분자를 포함한다.

특별히 Kabat CDR은 상술된 첫번째, 두번째, 세번째 및 네번째의 바람직한 양태의 H와 L사슬 모두의 CDR(CDR1, CDR2와 CDR3) 모두에 대해 사용된다.

본 발명의 재조합되고 인간형화된 항체분자와 사슬은 아마도 다음사항을 포함할 것이다: 충분한 길이의 H사슬과 L 사슬; Fab,(Fab') 또는 FV단편과 같은 단편들; L 사슬 또는 H사슬의 모노머 도는 다이머; 또는 단일 사슬항체, 즉 H사슬과 L사슬 가변성 영역이 펩타이드 린커(Peptide linker)에 의해 결합된 단일 사슬 FV; 또는 원래의 공여체 항체와 같은 특이성을 가진 임의의 재조합, 키메라 또는 CDR-이식된 분자. 마찬가지로 H사슬과 L 사슬 가변성 부위는 적당하게 다른 항체부위와 결합된다.

또한 본 발명의 H 또는 L사슬 또는 재조합되거나 인간형화된 완전한 항체 분자는 효과기(effector)나 보고기(Reporter)분자를 부착할 수 있을 것이다. 예를들어, 그것은 중금속원소나 라이신(ricin)과 같은 독소를 킬레이팅 시키기 위해 공유성 교량 구조(covalent bridging structure)에 의해 부착되어 있는 거대

환을 가지고 있다. 양자택일적으로, 완전한 면역 글로부린 분자의 Fc 단편이나 또는 CH 영역이 효소나 독소분자와 같은 기능적 비-면역 글로부린 단백질로 대치되거나 또는 펩타이드 연결에 의해 부착된 면역 글로부린 분자의 생산에 재조합 DNA 기술과정이 이용될 것이다.

CB0010, 101.4, CB0006 및 hTNF3 뮤린 MAb, 이의 CDR-이식된 변형체와 인간 수용체 항체의 H와 L 사슬 가변부의 아미노산 서열은 각각 제1, 2, 3, 4도에 도면으로 첨부되어 있다. 본 발명의 재조합되고 인간형화된 항체산물은, 예를들면 근본적으로 WO91/09967에 기술된 것처럼, 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 것이다.

어떤 적당한 인간 수여체 가변성 부위 골격 서열은 항원 결합부위가 유도된 공여체 항체의 부류/타입으로 여겨졌다. 바람직하게는, 사용된 수여체 골격의 타입은 공여체 항체와 같은/비슷한 부류/타입이다. 편리하게, 골격은 바람직하게는 CDR에 인접하거나 가까운 위치에서 공여체 항체 서열과의 상동성을 최대화/최적화 하기 위해 취해진다. 그러나, 공여체와 수여체 서열사이의 상동 정도의 고례벨은 본 발명의 출원에 대해 중요하지 않다. 본 발명은 만족할만한 결합특징을 지닌 CDR-이식된 항체 제품을 얻기 위해 공여체 잔기가 중요하거나 또는 바람직한 골격 잔기 위치의 단계를 확인한다.

바람직하게는, 본 발명의 CDR-이식된 항체 제품은 보통 적어도 10^{5} M^{-1}, 바람직하게는 적어도 약 10^{8} M^{-1}의 결합친화력을 가지거나, 특별하게는 10^{8}-10^{12} M^{-1}의 범위 내의 결합친화력을 가지고 있다. 원칙상, 본 발명은 그들 각각의 서열간 상동레벨에 개의치 않고 항-hTNFα 공여체와 인간 수여체 항체의 어떤 조합에도 적용될 수 있다.

사용될 수 있는 인간 골격의 실시예는 KOL, NEWM, REI, EU, LAY와 POM(참고문헌 7와 8)등이다; 예를 들어 H사슬에 대한 KOL과 NEWM, L사슬에 대한 REI, H사슬과 L사슬 양자에 대한 EU, LAY과 POM.

또한 본 발명의 제품의 불변성 부위 영역은 요구되는 특정 효과기 기능에서 항체의 제안된 기능으로 여겨질 것이다. 예를 들어, 불변성 영역은 인간 IgA, IgE, IgG 또는 IgM 부위일 것이다. 특히 인간형화된 항체분자가 치료용도로 사용될 때와 항체 효과기 기능이 요구되어질때, 특별히 IgG 1과 IgG 3 아이소 타입(isotype)으로 IgG 인간 불변성 부위 영역이 사용될 것이다. 양자택일적으로, IgG 2와 IgG 4 아이소타입은 인간형화된 항체분자가 치료목적용이고 항체효과기 기능이 필요하지 않을때, 즉 다시말하면 TNF 효과의 단순차단을 하려고 할 때에 사용될 것이다.

그러나, 항체분자의 잔여분은 단지 면역 글로부린으로 부터의 단백질 서열 함유를 필요로 하지 않는다. 예를 들어, 인간면역 글로부린 사슬의 DNA 서열 암호화 부분이 폴리펩타이드 효과기 또는 보고기 분자의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열에 융합된 유전자가 제조될 수 있을 것이다.

따라서, 본 발명의 또 다른 외관은 재조합되고 인간형화된 항체 즉, CDR-이식된 H와 L 사슬을 암호화하는 DNA 서열, DNA 서열을 함유하는 벡터의 클로닝과 발현, DNA 서열에 의해 형질전환된 숙주세포와 형질전환된 숙주세포에서의 DNA 서열 발현을 포함하는 재조합되고 인간형화된, 즉 CDR-이식된 사슬과 항체분자를 생산하는 방법을 포함한다.

벡터가 제조(construction)되는 일반적인 방법, 형질감염(transfection)방법과 배양방법은 그 자체로 공지이다. 그러한 방법은 예를 들어 참고문헌 12와 13에 실려있다.

항-hTNFα 항체분자 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열은 당 기술분야에서는 공지인 방법에 의해 얻어진다. 예를 들어 항-TNF 암호화 서열은 유전자 클로닝 또는 적당한 항hTNFα 생산 하이브리도마 세포주로부터의 cDNA 클로닝에 의해 얻어질 것이다. 양성클론은 논의되는 문제에서 H와 L사슬 유전자에 대한 적당한 프로우브를 사용하여 스크린 할 수 있을 것이다. 또한 PCR 클로닝도 사용될 것이다. 항체의 H 및 L사슬의 일부분이나 전체를 암호화하는 DNA 서열은 결정된 DNA나 상응하는 아미노산 서열을 기초로해서 원하는 만큼 합성될 것이다.

수여체, 즉 인간수여체에 대한 DNA 암호화 서열은 다른 적당한 방법으로 얻을 수 있을 것이다. 예를 들면 KOL, REI, EU와 NEWM과 같은 인간 수여체 골격에 대한 DNA 서열 암호화는 광범위하게 당 기술분야의 기술자에게 유용하거나 공지의 아미노산 서열을 기초로하여 쉽게 합성될 것이다(참고문헌 7과 8참조).

키메라화 되고 CDR-이식된 제품을 암호화 하는 DNA 서열을 제조하기 위해 분자생물학의 표준기술이 사용될 것이다. 바람직한 DNA 서열은 올리고 핵산 염합성기술을 전부 사용하여 또는 부분적으로 사용하여 합성될 것이다. 부위-직접적 변이와 폴리머레이즈 사슬 반응(PCR)기술이 적당하게 사용될 것이다. 예를 들어 죤스 등(참고문헌 14)에 설명되어 있는 것처럼 올리고 핵산염 직접 합성이 사용될 것이다. 또한 예를 들면 Verhoeyen 등 (참고문헌 5)이나 Riechmann 등 (참고문헌 6)에 의해 설명되어 있는 것처럼 선-존재 가변성 영역이 사용될 것이다. 또한 예를 들어 Queen 등 (참고문헌 9)에 의해 설명되어 있는 것처럼 T DNA 폴리머 레이즈를 사용하여 올리고, 핵산염의 부족된 부분을 효소적으로 채우는 방법이 사용될 것이다.

어떠한 적당한 숙주세포/벡터 시스템이 재조합디고, 키메라화 및 CDR-이식된 인간형화된 H와 L사슬을 암호화하는 DNA 서열의 발현을 위해 사용될 것이다. 세균적, 즉 E-loli와 다른 미생물적인 시스템이 특히 Fab와 (Fab') 단편, 그리고 특별히 FV 단편과 단일 사슬 항체 단편, 즉 단일 사슬 FVs와 같은 항체 단편의 발현을 위해 사용될 것이다. 유핵적 발현 시스템, 즉 포유동물의 숙주세포 발현 시스템이 완전한 분자를 포함하여 특히 더 큰 CDR-이식된 항체 제품의 생산을 위해 사용될 것이다. 적당한 포유동물 숙주세포는 CHO 세포와 골수종 또는 하이브리도마 세포주를 포함한다.

따라서, 본 발명의 또 다른 양태에 따라 본 발명은 다음 사항을 포함하는 재조합되거나 또는 인간형화된 항-hTNFα 항체의 생산방법을 제공한다.

(a) 항-hTNFα 항체 H사슬을 암호화하는 DNA 서열을 갖는 오페론을 발현 벡터내에서 생산하며/또는 (b) 상보성 항-hTNFα 항체 L사슬을 암호화하는 DNA 서열을 갖는 오페론을 발현 벡터내에서 생산; (c) 숙주

세포를 해당 벡터나 각각의 벡터로 형질감염시키고; (d) 형질감염된 세포주를, 재조합 항-hTNFα 항체를 생산하기 위한 배양.

재조합 되었거나 또는 인간형화된 항-hTNFα 산물은 단지 폴리펩타이드에서 유도된 H 또는 L사슬만을 포함할 것이고, 이 경우 단지 H 사슬 또는 L 사슬 폴리펩타이드 암호화 서열이 숙주세포를 형질감염시키기 위해 사용된다. 양자의 H와 L사슬 양자를 포함하는 산물의 생산을 위해, 세포주는 2개의 벡터로 형질감염될 것인데, 첫번째 벡터는 L사슬에서 유도된 폴리펩타이드를 암호화 하는 오페론을 함유할 것이고, 두번째 벡터는 H사슬에서 유도된 폴리펩타이드를 암호화하는 오페론을 함유할 것이다. 바람직하게는 서열과 선별 마커가 관련될때만은 예외이나 가능한 한 각 폴리펩타이드 사슬이 똑같이 발현되는 것을 확실히 하기 위하여 벡터는 동등하다. 양자 택일적으로, 단일 벡터가 사용될 수 있는데, 그 벡터는 양자의 즉 L사슬과 H사슬에서 유도된 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함한다.

L과 H사슬에 대한 암호화서열에 있어서 DNA는 cDNA 또는 게놈 유전자 또는 둘다를 포함할 것이다.

본 발명은 또한 본 발명의 재조합되고 인간형화된 항체산물을 함유하는 치료학적이고 진단학적인 조성물을 포함하고, 치료와 진단에 있어서 그러한 조성물의 이용을 포함한다.

따라서 또 다른 양태에 있어서 본 발명은 제약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와의 조합에 있어서 본 발명의 앞선 양태에 따르는 재조합되고 인간형화된 항체분자를 함유하는 치료나 또는 진단 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 본 발명에 따르는 재조합되거나 인간형화된 항체와 제약학적으로 허용가능한 부형제, 희석제나 또는 담체와의 혼합물을 포함하는 치료나 진단조성물의 제조방법을 제공한다.

재조합되거나 인간형화된 항체는 치료나 진단 조성물내의 유일한 활성성분이거나 다른 항체 성분, 즉 항-T세포, 항-TNFα나 항-LPS 항체와 같은 다른 항체 성분이나 크산틴 같은 비-항체 성분을 포함하는 하나나 그 이상의 다른 활성성분을 수반할 것이다. 치료와 진단 조성물은 1회 사용용 제형을 취할 것인바, 여기서 각각의 1회 용량은 본발명의 재조합되거나 인간형화된 항체를 효과량으로 포함한다.

더우기, 본발명은 또한 본 발명의 재조합되거나 인간형화된 항체를 효과적인 양으로 인간이나 동물에게 투여함을 포함하는 치료와 진단방법을 제공한다.

항체와 조성물은 인간이나 동물체에 존재하는 TNF 레벨을 감소시키는 것이 요구되어질 경우 치료를 위해 유용하게 사용될 것이다. TNF는 체내의 순환계에 있거나 바람직하지 않게도 체내의 특정부위에 높은 레벨로 존재한다.

예를들면, TNF의 상승된 레벨은 면역조절장애와 염증장액와 패혈증이나 내독소 및 심혈관계 쇼크에서 발생한다. 항체나 조성물은 패혈증, 패혈증성 또는 내독소성 쇼크, 악액질, 성인성 호흡기 디스트레스 증후군, AIDS, 알러지, 건선, T.B., 감염성 골 장애, 혈응집장애, 화상, 갑상선염과 같은 장기 특이적 장애나 류마토미드와 골-관절염과 같은 비-특이적 장기 장애와 같은 자가면역질환과 장기나 조직이식후의 거부반응을 치료하는데 유용할 것이다.

덧붙여서, 항체나 조성물은 신생물적 치료동안 TNF 발생에 의한 부작용을 억제하고 또한 항임파구 항체의 사용으로 인한 이식거부의 치료나 예방과 관련한 쇼크를 억제하는데 사용되거나, 다-장기 부전증(MOF)을 치료하는데 사용될 것이다.

본 발명의 재조합되고 인간형화된 항체와 조성물은 바람직하게는 패혈증이나 패혈증성/내독소성 쇼크의 치료에 바람직하다.

항체와 조성물은 이들이 사용되는 치료에 따라 적당한 형태와 양으로 투여될 것이다. 이것은 예를 들면, TNF 레벨이 상승되는 것이 기대되는 상황에서 예방을 위해 사용되거나, 아니면 바람직하지 않을 정도로 TNF 레벨이 고레벨에 도달한후나 그 레벨이 상승할때 TNF의 레벨을 감소하는데 사용될 것이다.

치료나 진단조성물은 투여하기에 적당한 형태를 취할 것이고, 바람직하게는, 예를들면, 볼루스 주사나 연속주입과 같은 주사나 주입의 비경구 투여하기에 적합한 형태로 있게 된다. 주사나 주입될 경우, 산물은 오일이나 수성 비히클 내의 현탁액 용액이나 에멀션 형태를 취하고, 이 산물은 현탁화제, 보존제, 안정제 및/또는 분산제를 포함할 것이다.

또 달리, 항체나 조성물은 적당한 멸균수와 함께 사용하기 전 재조성하기 위해 건조된 형태로 있게 될 것이다.

항체나 조성물이 경구 투여하기에 적합하다면, 즉 항체 단편의 경우에 있어서, 제제는 활성성분과 함께 감자, 옥수수나 밀전분이나 셀룰로오스와 같은 전분이나 마이크로크리스탈린 셀룰로오스 같은 전분 유도체; 실리카; 락토스 같은 다양한 당류; 마그네슘 카보네이트 및/칼슘 포스페이트와 같은 첨가제를 포함할 것이다. 제제가 경구투여될 경우 제제가 환자의 소화계에 의해 허용된다면 바람직하다. 끝부분에 가서, 제제가 제제내에 점액성 성형제 및 수지를 포함하는 것이 또한 바람직하다. 위산에 불용성인 캡슐내의 항체나 조성물을 제제화 함으로써 내성을 증진시키는 것이 또한 바람직하다. 방출조절 제제내에 항체나 조성물을 포함하는 것이 또한 바람직할 것이다.

본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 바람직하지 않을 정도로 매우 높은 레벨의 TNF로 인한 장애나 이의 위험으로부터 고통받는 사람이나 동물의 치료방법이 제공되는데, 이 방법은 본 발명의 항체나 조성물을 효과적인 양으로 피검자에게 투여하는 것을 포함한다. 특히, 인간이나 동물 피검자는 패혈증이나 패혈증성 쇼크나 내독소성 쇼크로부터 고통을 받을 것이다.

투여되는 항체의 양은 치료상태의 특성, 중화되어야 하는 TNF의 정도나, 바람직한 레벨 이상으로 상승되는 것이 기대되는 TNF의 정도 및 항체가 현상황에서 예방목적으로 사용되는냐 아니면 치료목적으로 사용되는냐에 따라 달라진다. 그 양은 환자의 나이나 상태에 따라 선택되어질 것이다.

따라서, 예를들면, 산물이 패혈증성 쇼크의 치료나 예방을 위해 사용될 경우, TNF에 대한 항체의 적당한 양은 0.001-30mg/kg/day, 바람직하게는 0.01-10mg/kg/day와 특히 바람직하게는 0.1-2mg/kg/day의 범위내에 있게 된다.

항체산물은 진단 즉, 생체내 진단 및 상승된 TNF 레벨을 포함하는 질병상태의 추측에 사용될 것이다.

본 발명은 또한 제1-6도의 첨부도면을 참고로하여 다음의 실시예에서 단지 설명의 방편으로 기술된다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 인간 수용체 항체 EU(1EU), 뮤린 MAb(B0010(htnf1)의 H 및 L 사슬과 인간형화된 CDR 이식된 L사슬(gEU) 및 H 사슬(2hEUg)의 가변부에 대한 아미노산 서열이다.

제2도는 L 사슬에 대한 인간 수용체 항체 REI(1rei)와 H 사슬에 대한 KOL(KOL)의 가변부, 뮤린 MAb 101.4(101/4)의 H 및 L 사슬의 가변부와 인간형화된 이식된 L 및 H 사슬(둘 모두 g1014로 지정됨)의 가변부에 대한 아미노산 서열이다.

제3도는 L 사슬에 대한 인간수용체 항체 REI(REI)과 H 사슬에 대한 KOL(KOL)의 가변부, 뮤린 MAb(B0006(CB6)의 H 및 L 사슬의 가변부와 인간형화된 이식된 L 및 H사슬(둘 모두 gCH6으로 지정)의 가변부에 대한 아미노산 서열이다.

제4도는 L 사슬에 대한 인간수용체 항체 REI(REI)과 H 사슬에 대한 KOL(KOL)의 가변부, 뮤린 MAb HTNF3의 L사슬(hTNF3)와 인간형화된 이식된 L 사슬(gHTNF3) 및 H사슬(ghTNF3)의 가변부에 대한 아미노산 서열이다.

제5도는 뮤린 CB0010(hTNF1)과 CDR-이식된 CB0010(GrhTNF1; CDR 571)의 재조합 인간 TNFα에 결합하기 위해 HRP-컨쥬게이트된 뮤린 HTNF1과 경쟁하는 능력을 비교한 그래프이다.

제6도는 L929 생검정에서 뮤린 hTNF1(CB0010)과 CDR-이식된 hTNF1(CP571)의 재조합 TNFα를 중화시키는 능력의 비교그래프이다.

[본 발명의 양태의 상세한 설명]

[실시예]

뮬린 항-TNFα 항체의 CDR-이식

몇몇 항-인간 TNFα MAb은 뮤린항-CD3 항체 OKT3의 CDR-이식을 위해 WO91-09967에 상세히 설명된 대로 본질적으로 CDR-이식 되었다. 본 실시예 및 다음의 실시예에서, 키메라화되고, CDR-이식된 인간형화된 항체는 WO91/09967의 4 키메라화되고 CDR-이식된 OKT3 항체를 제조하기 위해 서술된 대로 인간 IgG나 불변부를 사용하여 제조되었다. 그러나, 서술된 공정을 크게 변경하지 않고서 다른 타입 및 이소타입의 인간 불변부, 즉 IgG1, IgG2와 IgG3이 사용될 수 있을 것이다.

이러한 항-hTNFα 항체는 CB0006(61E71 이라고도 알려져 있다), CB0010(hTNF1 이라고도 알려져 있다), hTNF3 및 101.4로 지정된 뮤린 MAb를 포함한다.

CB0006

WO 9109967의 12.1부의 실시예 1에 서술된 것과 비슷한 분석을 CB0006과 잠재적으로 뮤린으로 유지되는 잔기인 23, 24, 48, 49, 68, 69, 71, 73, 75, 88위로 확인된 H사슬의 10개 골격에 대해 수행하였다. 이 항체와, hTNF3 및 101.4 항체의 CDR-이식을 위해 선택된 인간 골격은 L 사슬에 대해서는 REI이고 H 사슬에 대해서는 KOL이였다. 뮤린 CB0006(CB6)(H 및 L) REI(REI) L 및 KOL(KOL) H 사슬 가변부의 아미노산 서열은 제3도에 나타냈다.

3개의 유전자가 설정되었는데, 이것의 첫번째는 뮤린 잔기로서 23, 24, 48, 49, 71, 73위의 아미노산 잔기(gH 341(6)암호화 한다. 첫번째 유전자에 의해 암호화된 가변부의 아미노산 서열은 제3도의 H 사슬 개략도의 gCB6으로 나타낸다. 두번째 유전자 또한 뮤린잔기로서 아미노산 잔기 75와 88을 갖는 (gH 341(8)) 반면, 세번째 유전자는 뮤린잔기로서 부가적으로 아미노산 잔기 68, 69, 75와 88을 갖는다 (gH 341(10)). 각각은 gL 221로 공동 발현되고, 최소의 이식된 L 사슬(단지 CDR)은 제3도의 H사슬 개략도에서 gCB6으로 나타나 있다. gL 221/gH 341(6)과 gL221/gH341(8) 항체는 모두 뮤린 61E71 만큼 TNF에 잘 결합했다. gL221/gH341(10) 항체는 발현하지 않아서 이 결합물을 더이상 취하지 않았다.

그후에, gL 221/gH 341(6) 항체는 항체가 용액내의 TNF에 결합하기 위한 L929 세포상의 TNF 수용체에 대해 경쟁하는 L 929 세포 경쟁 검정으로 평가되었다.

CB0010(hTNF1 이라도도 알려짐)

CB0010은 인간 TNF-α의 에피토프를 인식하는 모노클로날 항체이다. EU인간골격이 H 및 L 가변부의 CDR-이식을 위해 사용되었다. EU(EU), CB0010(htnf1)의 아미노산 서열과 CB0010의 이식된 버션(gEU, L; 2hEUg, H)은 제1도에 나타냈다.

H 사슬

CDR-이식된 H사슬 마우스 CDR은 26-35위(CDR1), 50-65위(CDR2)와 95-102위(CDR3)에서 사용되었다. 마우스 잔기는 또한 48, 67, 69, 71, 73, 76, 89, 91, 94, 108위에서 골격내에 사용되었다. TNF1 마우스 H 사슬 잔기와 EU인간 H사슬 잔기를 비교해 보면 23, 24, 29, 78위에서 서로 같음을 알 수 있다.

L 사슬

CDR-이식된 L 사슬에 있어서, 마우스 CDR은 24-34위(CDR1), 50-56위(CDR2) 및 89-97(CDR3)에서 사용되었

다. 덧붙여서, 마우스 잔기는 3, 42, 48, 49, 83, 106, 108위에서 골격내에 사용되었다. hTNF1 마우스 L 사슬과 EU인간 L 사슬의 잔기를 비교해 보면 46, 58, 71위에서 서로 동일함을 알 수 있다.

이식된 CB0010 H 사슬을 키메라 L사슬과 공동발현시켜서 그 산물의 결합능을 TNF 결합검정에서 키메라 L 사슬/키메라 H사슬 산물의 결합능과 비교하였다. 이식된 H사슬 산물이 완전히 키메라화된 산물보다 TNF에 대한 결합능이 약간 더 나은 것으로 나타났다.

마찬가지로, 이식된 H사슬/이식된 L사슬 산물을 공동발현시켜서 완전히 키메라화된 산물과 비교하고 그 결과 후자의 산물과 매우 유사한 결합특성을 가지고 있음을 알아 냈다. 그러나, 이식된 H사슬/이식된 L 사슬 산물을 L929 검정에서 검정했을때(실시예 4를 참조), 그것은 키메라화된 산물의 단지 1/2에 해당하는 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 따라서 CDR-이식 실험을 실시예 2에 서술된 대로 더 실행하였다.

hTNF3

hTNF3은 인간 TNF-α상의 에피토프를 인식한다. hTNF3의 서열은 L 및 H 사슬 가변부의 CB0006과 비교할 시 단지 21개의 차이점을 나타내고, L사슬에 대해서는 10개(1, 19, 40, 45, 46, 76, 103, 106위의 골격내에서 8개와 50, 96위에서의 CDR내에서 2개) 및 H 사슬에서는 11개(52, 60, 95위의 CDR 부에서 3개, 1, 10, 38, 40, 67, 73, 87, 105위에서의 골격에서 8개)의 차이점을 나타낸다.

hTNF3(htnf3, L;hTNF3, H) CDR-이식된 hTNF3(gH TNF3, L; ghTNF3, H) 및 REI(REI, L)과 KOL(KOL, H)의 L 및 H 사슬 가변보 아미노산 서열은 제4도에 나타냈다. CB0006과 hTNF3 키메라 항체의 L 및 H 사슬을 직접적인 결합 검정에서 활성의 손실없이 변화될 수 있다. 그러나, CB0006은 hTNF3과 비교하여 TNF-α에 대한 L929 세포상의 TNF 수용체와 경쟁하는 능력이 훨씬 덜하다. CB0006 CDR 이식 데이타를 기초로 하여, gL 221과 gH 341(마우스로서 +23, 24, 48, 49, 71, 73) 유전자를 hTNF3을 위해 설정하고 테스트하며 결과로서 나온 이식된 항체는 TNF-α에 잘 결합하나, L929 검정에서는 매우 약하게 경쟁한다. ghTNF3을 암호화하는 gL 221 유전자와 gH341등의 유전자는 제4도에 나타냈듯이 ghTNF3 가변부 서열을 암호화 한다. 이 경우에 있어서, 이 항체의 경쟁적인 결합능을 증진시키기 위해 다른 골격잔기를 변화시킬 필요가 있는 것 같다.

101.4

101.4는 인간 TNF-α를 인식할 수 있는 또다른 뮤린 MAb이다. 이 항체의 H사슬은 KOL과 매우 큰 상동성을 보여주고 따라서 CDR-이식은 L사슬에 대해서는 RE1을 H 사슬에 대해서는 KOL을 기초로 하였다. 101.4(101/4)와 101.4의 CDR-이식된 버션의 H 및 L가변부 아미노산 서열과 REI L사슬(1rei)와 KOL H사슬(KOL)의 가변부는 제2도에 나타냈다. 몇개의 이시기된 H사슬 유전자를 CDR'(gH341)에 대해서 보존적 선별로써 제조하고 이것은 73,78이나 77-79 포함 위치에서 마우스 아미노산으로서 소수의 비-CDR 잔기를 가진다. 이들은 키메라 L사슬이나 Kabar CDR-이식된 L사슬과 함께 공동발현시켰다. 모든 경우에 있어서, 키메라 항체와 동등한 TNF에 대한 결합이 관찰되고 CL과 동동발현시킬 경우, 결과로서 나온 항체는 L929 검정에서 잘 경쟁할 수 있다. 그러나, gL221로써는, 결과로서 나온 항체는 적어도 L929 세포상의 TNF 수용체에 대해 TNF를 대상으로 경쟁력이 훨씬 덜하게 된다.

H사슬에서 다른 위치에서 예를들면, 23과 24의 위치나 또는 76위치에서의 마우스 잔기는 L929 검정에서 이식된 항체의 경쟁능을 증진시키지 못함이 증명되었다.

[실시예 2]

뮤린 항-인간 TNFα 항체 CH0010과 101.4의 또다른 CDR-이식

뮤린 항-인간 TNFα 모노클로날 항체 CB0010과 101.4는 W091/09967에 서술된 대로 본질적으로 CDR-이식되었다.

CB0010

CB0010은 인간 TNF-α상의 에피토프를 인식하는 모노클로날 항체이다. EU 인간 골격이 H 및 L사슬 가변부의 CDR-이식을 위해 사용되었다.

EU 수용체의 H 및 L사슬 가변부, CB0010(htnf1) 뮤린 수여체 및 CDR-이식된(gEU, L 사슬과 2hEUg, H사슬)항체의 아미노산 서열은 제1도에 나타냈다.

H 사슬

CDR-이식된 H사슬(2hEUg)에 있어서, 마우스 CDR이 31-35위(CDR1), 50-65위(CDR2)와 95-102위(CDR3)에서 사용되었다.

마우스 잔기가 또한 12, 27, 30, 38, 46, 48, 66, 67, 69, 71, 73, 76, 83, 89, 91, 94와 108 위치에서 골격내에 사용되었다. CB0010 마우스 H사슬과 EU 인간 H사슬 잔기를 비교하였을때, 이들은 2, 3, 24, 29, 78위에서 서로 동일하였다.

L 사슬

CDR-이식된 L 사슬(gEU)에 있어서, 마우스 CDR이 24-34(CDR1), 50-65(CDR2)와 89-97(CDR3)위에서 사용되었다. 덧붙여, 마우스 잔기가 3, 42, 48, 49, 106과 108 위치에서 골격내에 사용되었다. 인간 일치 서열(발린)이 83위에서 사용되었다. CB0010 마우스 L사슬과 EU 인간 L사슬 잔기를 비교하였을때 이들은 46, 58과 71위치에서 동일하였다.

이식된 CB0010 H사슬을 키메라 L사슬과 공동발현시켜서 산물의 결합능을 TNF 결합검정에서 키메라 L 사슬, 키메라 H사슬 산물의 결합능과 비교하였다. 이식된 H사슬 산물은 완전한 키메라 산물보다 TNF에 대

한 결합능이 약간 덜하였다.

마찬가지로, 이식된 H사슬/이식된 L사슬산물은 공동발현시켜서 완전히 키메라화한 산물과 비교하고 그 결과 후자의 산물과 매우 유사한 결합 특성을 나타내었다. 이식된 L사슬(gEU)와 이식된 H사슬(2hEUg)의 특이적 결합물은, 제1도에 나타냈듯이, CDP571로 알려진 항체를 제공한다. 뮤린 CB0010(CB0010), 키메라(B0010)과 이식된 H사슬/이식된 L사슬 산물(CDP571)을 표준검정에서 인간 TNFα에 대해 결합능에 대해 서로 비교하였다. 최종적으로 얻어진 결과는 아래 표 1에서 각 항체에 대해 측정된 K (pM)로 나타냈다.

항 체	K (pM)
CB0010	80
키메라 CB0010	81
CDP571	87

완전히 이식된 항체 산물(CDP571)은 패혈 증후군과 급성 이식 거부증의 치료를 위해 선-임상적 개발하에 있다.

101.4

101.4는 인간 TNF-α를 인식할 수 있는 또다른 뮤린 MAb 이다. 이 항체의 H사슬은 KOL과 매우 큰 상동성을 보여주며, 따라서 CDR-이식은 L사슬에 대해서는 REI, H사슬에 대해서는 KOL을 기초로 하였다. 개량된 CDR-이식된 산물이 제조되었다. REI(rei, L사슬), KOL(KOL, H사슬), 뮤린 101.4(101/4, H 및 L 사슬)과 완전히 이식된 항체(g1014, H 및 L 사슬)의 가변부 아미노산 서열은 제2도에 나타냈다.

H 사슬

CDR-이식된 H사슬(g1014)에 있어서, 마우스 CDR이 31-35위(CDR1), 50-65위(CDR2)위, 95-102위(CDR3)에서 사용되었다. 마우스 잔기가 또한 4, 11, 23, 24, 28, 73, 77, 78, 79, 91, 93, 94와 108 위치에서 골격내에 사용되었다.

L 사슬

CDR-이식된 L사슬(g1014)에 있어서, 마우스 CDR이 24-34위(CDR1), 50-56위(CDR2)와 89-97위(CDR3)에 사용되었다. 덧붙여, 마우스 잔기가 1, 3, 4, 39, 73, 105와 107위에서 골격내에 사용되었다. 인간 일치 잔기(발린)은 104 위에서 사용되었다.

완전히 이식된 H 및 L사슬(g1014)를 공동발현시켜서 TNF에 대한 이의 결합을 뮤린항체와 키메라 101.4 및 또한 완전히 이시된 (gEU/2hEUg, CDP571), CB0010 항체를 서로 비교하였다. 완전히 이식된 101.4 항체는 뮤린, 키메라 및 이식된 CB 0010 항체와 유사한 인간 TNFα에 대한 결합특성을 가지고 있음이 밝혀졌다.

[실시예 3]

뮤린항체와 CDR-이식된 항체의 시험관내 비교

뮤린 CB0010과 CDP571에 대한 친화력 측정

물질과 방법

물질 :

PBS/BSA : 둘베코스 PBS + 1%(W/V) 소혈정 알부민

TNF : 50nM rec. 인간 TNF-알파(Bissendorf Biochemicals), PBS/BSA 내의 0.85㎍/ml.

쇼크 ^{125}I-TNF : 5μci, 185KBq(Amersham International) 50 μl 물에 용해시켜서 -70℃에서 저장.

작동용액 ^{125}I-TNF : 적정곡선을 위한 -62pM과 스캣챠드 분석을 위한 124pM, PBS/BSA 내에서 항체 : 정제한 뮤린 CB0010(mHTNF1)과 CDP571을 A280nm에 의해 정량하고(1mg/ml, 280nm=1.4), 직경을 위해 1㎍/ml의 농도로 스켓챠드 분석을 위해 200ng/ml로 희석하였다.

면역비드 : 고우트 항-뮤린 IgG 전체 분자-아가로스나, 고우트 항-인간 IgG 전체 분자-아가로스(Sigma)를 희석하여 사용하였다.

방법 :

항체적정 : mHTNF1과 CDP571을 2배로 희석하여 적정하여(각각 100μl)총 16개 샘플을 만들고 ^{125}I-TNF(100μl, 62pM)을 첨가하였다. 항체의 최종 상층 농도는 500ng/ml이고 ^{125}I-TNF는 31pM 이였다. 대조 균튜브(8)은 ^{125}I-TNF와 PBS/BSA만을 포함하였다. 샘플을 평행에 도달하도록 실온에서 교반하면서 밤새 방치해 두었다. 평형후, 25μl의 고우트 항-마우스-아가로스를 mHTNF1 샘플에 첨가하고, 50μl의 고우트-항-인간 비드를 총 ^{125}I-TNF 대조군만 제외하고 CDP 571에 첨가하였다. 아가로스비드에 대한 ^{125}I-TNF의 비-특이적 흡수는 대조군 4에 비드를 첨가하고 이 샘플에 대한 상등액 계산치와 비드 대신 PBS/BSA를

포함하고 있는 것을 비교하므로써 수정된다. 실온에서 1시간의 평형후 PBS/BSA(0.5ml)을 첨가하고 샘플을 20℃에서 10분 동안 1500rpm으로 원심분리시켰다. 상등액(0.5ml)을 제거하고 방사능을 감마 카운터로 카운트했다. 이 검정에서 동일한 총농도의 ^{125}I-TNF와 비표식된 TNF(25%와 76%의 ^{125}I-TNF에서)의 혼합물의 존재하에서 항체적정을 수행하여 ^{125}I-TNF가 비표식된 물질과 유사하게 행동한다는 확인을 하였다.

소캣챠드 분석 : 2개의 항체에 대해, 비표식된 TNF(100μl, 50nM)를 13개의 2배로 희석한 액에서 2회 반복 적정하였다. TNF 대신에 PBS/BSA를 포함하고 있는 하나의 샘플을 각각의 샘플에 첨가하였다. 그런다음 적정곡선(50μl, 200ng/ml)에서 결정된 항체의 함량을 첨가하였다.

이것은 다음의 최종농도를 제공한다 : 항체 150ng/ml ; TNF, 25nM 상층농도; ^{125}I-TNF, 31pM 샘플을 평형에 도달하도록 밤새 방치한 다음 항체적정 샘플에 대해서 정확하게 적정하였다.

계산

적정곡선

결합된 I-TNF cpm=NSB cpm-상등액 cpm

$$\frac{\text{결합된 I-TNF cpm}}{\text{총 I-TNF}} = B/T$$

NSB = 비-특이적 흡수 블랭크, 상등액 cpm

총 합 = I-TNF 만의 총 계산치

B/T를 항체농도에 대해 플롯을 하여 스캣챠드 분석에 사용되는 적당한 항체농도를 B/T=0.6에서 선택하였다.

스캣챠드 분석

2회 반복한 결정치의 평균값을 사용하였다.

NSB = 총 cpm - NSB 상등액 cpm

유리 cpm = 샘플 cpm + NSB

유리 TNF의 비율 = 유리/총(F/T) =

$$\frac{\text{샘플 cpm + NSB cpm}}{\text{총 cpm}} = B/F = \frac{1-F/T}{F/T}$$

B/F를 결합된 TNF에 대해 플롯하여 계산된 Kd로 부터 -1/Kd의 기울기를 얻었다.

결 과

뮤린 CB0010과 CDP571에 대한 분리항수

뮤린 CB0010과 CDP571에 대한 분리항수

항 체	Kd.M
뮤린 HTNF 1	1.3 X 10
CDP571	1.4 X 10

B 뮤린 CB0010에서 컨쥬게이트된 HRP로 실시한 rhuTNF에 대한 결합에 있어서의 뮤린 CB0010(Muhtnf1)과 CDP571(Gr hTNF1)의 경쟁

방 법

96웰 마이크로정정 플레이트(Nunc, Maxisorb)를 0.5㎍/ml에서 100μl웰 로 코팅시켰다. 일련의 뮤틴 항체나 이식 항체의 희석액을 200㎍/ml에서 0.01㎍/ml로, PBS/1% BSA 희석제를 사용하여 제조하였다. 50μl의 항체를 각각의 웰에 첨가하고, 그 다음 3개의 농도(0.625, 0.315 및 0.16㎍/ml)의 HRP-뮤린 CB0010 50μl을 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 교반하면서 2시간 동안 배양하여, PBS로 4번 세척한 다은 TMB 기질 100μl를 첨가하였다. 흡광도를 측정하여 항체농도에 대해 OC를 플롯하였다.

결 론

뮤린 항체(MuhTNF1)와 이식항체(GrhTNF1)에 대한 곡선은 충적형이고, 이는 두항체가 TNF에 대한 결합에

있어서 유사한 친화력으로 경쟁한다는 것을 나타낸다(제5도).

[실시예 4]

생검정과 동물모델실험에 있어서의 뮤린 CB0010 항체와 CDR-이식된 CDP571 항체의 비교

A. L929 검정에 있어서 CB0010과 COP571에 의한 TNF의 중화

모(母) 뮤린 항체 CB0010(hTNF1)과 COR-이식된 항체 CDP571의 재조합 인간 TNF를 중화시키는 능력은 L929 생검정을 이용하여 결정되었다. 검정은 TNF에 의해 사멸되는 L929 마우스 섬유아세포종 세포주를 사용하였다. 검정은 세포가 TNF에 더욱 민감하게 감응하도록 하는 1㎍/ml의 액티노마이신의 존재하에 수행되었다. 그 항체의 일련의 희석액을 재조합 인간 TNF의 일정량(100pg/ml)과 혼합하여 96웰의 편평한 바닥의 플레이트에서 L929 단층에 첨가하였다. 16시간의 배양후, TNF에 의해 사멸되지 않은 세포는 크리스탈 바이올렛 염색에 의해 모습을 드러냈다. 중화되지 않은 TNF의 겉보기양(잔여 TNF)은 재조합 TNF 표준곡선과 비교하여 결정되었다. 잔여 TNF를 항체 농도에 대해 플롯하는 각각의 실험으로부터 나온 결과를 제6도에 나타냈다. CB0010과 CDP571은 비슷한 중화활성을 가지고 있음을 알 수 있다.

B. 비비패혈증 모델에서의 CDP571의 효과

본 연구에서는 매우 심한 패혈증의 생리학적인 결과(사망을 포함)에 대한 CDP571 전처리의 효과를 평가하였다. CDP571이 비비TNF를 중화시키는 것으로 알려져 있기 때문에 연구를 위한 비교종으로 비비(baboon)를 선택하였다.

20-25kg 중량의 성체 웅성의 비비, Papio ursinus를 케타민 염산염과 소듐 펜타바비톤으로 마취시키고 혈압측정, 심장인덱스(열적희석에 의해), ECG 및 우측 치명점 충전압을 위해 장치시켰다.

단지 염류액이나 또는 항체를 2.5ml/kg/h 비율로 120분 동안 주입시키고, 뒤이어서, 똑같은 주입율로 살아있는 E.Coli를 120분 동안 주입시켰다. 사용한 미생물 균주는 Hinshaw의 균주 B7((086a:61), ATCC 33985였고, 주입의 말에 가서 2 - 2.5 X 10^5 CFU/ml의 혈장농도를 제공하는 2 X 10^9 CFU/kg의 양으로 로그성장기에 투여되었다. 또다시 120분후, 동물을 그들의 우리로 되돌려서, 먹이와 물을 자유로이 공급하고, 3일동안 하루에 2번 심혈관계 변화를 모니터하였다. 모든 동물들에게 필요시, 적당한 우측 심장충전압을 유지하도록 조정된 5ml/kg/h의 일정 유체 대체물을 주입하였다. 처리기간 동안에 죽었거나 72시간의 실험 기간동안에 생존해 있다가 살상된 비비를 시검하였다. 주요한 모든 장기는 세미-정량법(+++은 가장 심각한 정도임)에 따라 총 마크로-병리학적 손상으로 평가하였다.

동물을 무작위로 4개의 처리구 중의 하나를 부여하였다;

- 염류액만
- CDP571 1.0mg/kg
- CDP571 1.0mg/kg
- CB0010 0.1mg/kg(모 뮤린 항체)

생존 및 누적 장기 손상 스코아를 표 1에 나타냈다.

1.0mg/kg의 CDP571은 이 모델에서 사망을 방지하고 장기손상의 발생율을 현저하게 감소시킨다(P<0.005); 더우기, 이러한 효과는 용량과 관계가 있다(P<0.005). 덧붙여서, CB0010으로 관찰되는 생존율과 장기 손상 스코아는 똑같은 용량에서 CDP571로 관찰되는 것들과 유사하고, 이는 모 뮤린 항체와 비교하여 CDP571의 생체내 효능을 유지함을 나타낸다.

[표 1]

염류나 CDP571 투여 후 2시간 동안 IV로 주어진 2X10^9 CFU E.Coli의 투여에 따른 생존

처 리	번 호	사 망	생 존	생 존 율	장기 병리
염 류	8	7	1	13	+++
CDP571 0.1mg/Kg	6	2	4	67	++
CDP571 1.0mg/Kg	6	0	6	100	+/-
CB0010 0.1mg/Kg	4	1	3	75	++

[참고문헌]

1. Kohler & Milstein, Nature, 265, 295-497, 1975.

2. Chatenoud et al, (1986), J. Immunol. 137, 830-838.

3. Jeffers et al, (1986), Transplantation, 41, 572-578.

4. Begent et al, Br. J. Cancer 62 : 487 (1990).

5. Verhoeyen et al, Science, 239, 1534-1536, 1988.

6. Riechmann et al, Nature, 332, 323-324, 1988.

7. Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M., Gottesman, K.S., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA.

8. Wu, T.T., and Kabat, E.A., 1970, J. Exp. Med. 132 211-250.

9. Queen et al, (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 10029-10033 and WO 90/07861

10. Tempest et al, (1991), Biotechnology, 9, 266-271

11. Beutler et al, (1985), Science, 234, 470-474

12. Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

13. Primrose and Old, Principles of Gene Manipulation, Blackwell, Oxford, 1980.

14. Jones et al, (1986), Nature, 321, 522.

(57) 청구의 범위

청구항 1

복합적인 H사슬과 상보적인 L사슬을 포함하고, 상기 복합적인 H사슬은 인간 수용체 항체 H사슬 골격잔기와 공여체 항체 H사슬 항원-결합잔기로 이루어진 가변성 영역을 포함하며, 상기 공여체 항체는 인간 TNFα에 특이성을 가지며, 상기 복합적인 H사슬내에서 카바(Kabat) 넘버링 시스템에 의한 적어도 23, 24, 31 내지 35, 49 내지 65 및 95 내지 100 위의 아미노산 잔기가 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 인간 TNFα에 특이성을 갖는 항체 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 추가적으로 상기 복합적인 H사슬내의 71, 73 및 78 위 아미노산 잔기가 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 항체 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 2, 4, 6, 25, 36, 37, 39, 47, 48, 93, 94, 103, 104, 106 및 107위의 아미노산 잔기들중의 적어도 하나가 추가적으로 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 항체 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, 9, 11, 41, 67, 69(48위가 공여체와 수용체 사이에서 서로 다른 경우), 87, 88, 91, 108, 110 및 112 위의 아미노산 잔기들중 적어도 하나, 또는 1과 3, 18과 82(67 위가 공여체잔기인 경우), 20과 80(69위가 공여체 잔기인 경우), 38과 46(48위가 공여체 잔기인 경우) 및 72와 76위의 잔기들의 쌍중에서 적어도 한쌍의 두 잔기가 추가적으로 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 항체 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 26 내지 30위의 아미노산 잔기들이 추가적으로 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 항체 분자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 L사슬은 인간 수용체 항체 L사슬 골격잔기와 공여체 항체 L사슬 항원-결합잔기로 이루어진 가변성 영역을 포함하는 복합적인 L사슬로서, 상기 공여체 항체는 인간 TNFα에 특이성을 가지며, 카바 넘버링 시스템에 의한 적어도 24 내지 34, 46, 47, 50 내지 56 및 89 내지 97위의 아미노산 잔기들이 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 항체 분자.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 L사슬은 인간 수용체 항체 L사슬 골격잔기와 공여체 항체 L사슬 항원-결합잔기들로 이루어진 가변성 영역을 포함하는 복합적인 L사슬로서, 상기 공여체 항체는 인간 TNFα에 대해 특이성을 가지며, 상기 복합적인 L사슬내에서 카바 넘버링 시스템에 의한 적어도 24 내지 34, 46, 48, 50 내지 56, 58, 71 및 89 내지 97위의 아미노산 잔기들이 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 항체 분자.

청구항 8

복합적인 L사슬과 상보적인 H사슬을 포함하고, 상기 복합적인 L사슬은 인간 수용체 항체 L사슬 골격잔기와 공여체 항체 L사슬 항원-결합잔기들로 이루어진 가변성영역을 포함하며, 상기 공여체 항체는 인간 TNFα에 특이성을 가지며, 상기 복합적인 L사슬내에서 카바 넘버링 시스템에 의한 적어도 24 내지 34, 46, 47, 50 내지 56 및 89 내지 97위의 아미노산 잔기들이 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 인간 TNF

α에 특이성을 갖는 항체 분자.

청구항 9

복합적인 L사슬과 상보적인 H사슬을 포함하고, 상기 복합적인 L사슬은 인간 수용체 항체 L사슬 골격잔기와 공여체 항체 L사슬 항원-결합잔기들로 이루어진 가변성영역을 포함하며, 상기 공여체 항체는 인간 TNFα에 특이성을 가지며, 상기 복합적인 L사슬내에서 카바 넘버링 시스템에 의한 적어도 24 내지 34, 46, 48, 50 내지 56, 58, 71 및 89 내지 97위의 아미노산 잔기들이 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 인간 TNFα에 특이성을 갖는 항체 분자.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 복합적인 L사슬내에서 적어도 2, 4, 6, 35, 36, 38, 44, 47, 49, 62, 64 내지 69, 85, 87, 98, 99, 101 및 102 위의 아미노산 잔기들이 추가적으로 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 항체 분자.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 복합적인 L사슬내에서 10, 12, 40, 60(60과 54위가 잠재적인 염브릿지를 형성할 수 있는 경우), 63, 70(70과 24위가 잠재적인 염브릿지를 형성할 수 있는 경우), 80, 103 및 105 위의 아미노산 잔기들 중의 적어도 하나, 또는 1과 3, 21과 73(47위가 공여체와 수용체 사이에서 서로 다른 경우) 및 37과 45위(47 위가 공여체와 수용체 사이에서 서로 다른 경우)의 잔기들 쌍중에서 적어도 한 쌍의 두 잔기가 추가적으로 공여체 잔기인 것을 특징으로 하는 항체 분자.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 공여체 항체는 CB0006(61E71로도 알려져 있음); CB0010(hTNF1로도 알려져 있음); hTNF3 및 101.4로 이루어진 그룹으로 부터 선택된 뮤린 모노클로날 항체중의 하나인 것을 특징으로 하는 항체 분자.

청구항 13

제1도, 제2도, 제3도 또는 제4도에 나타낸 복합적인 H사슬 또는 L사슬을 암호화하는 DNA 서열.

청구항 14

제13항에 따른 DNA 서열을 함유하는 클로닝 벡터 또는 발현벡터.

청구항 15

제13항에 따른 하나 이상의 DNA 서열로 형질전환된 포유동물 숙주세포.

청구항 16

패혈증 또는 패혈성/내독소성 충격의 치료용도로 이용되는 제1항 내지 제7항 및 제12항중 어느 한 항에 따른 항체분자.

청구항 17

패혈증 또는 패혈성/내독서성 충격의 치료용도로 이용되는 제1항 내지 제7항 및 제12항중 어느 한 항에 다른 항체 분자와 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 치료조성물.

청구항 18

패혈증 또는 패혈성/내독소성 충격의 치료용도로 이용되는 제8항에 따른 항체분자.

청구항 19

패혈증 또는 패혈성/내독소성 충격의 치료용도로 이용되는 제9항 내지 제11항중 어느 한 항에 따른 항체분자.

청구항 20

패혈증 또는 패혈성/내독소성 충격의 치료용도로 이용되는 제8항에 따른 항체 분자와 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 치료조성물.

청구항 21

패혈증 또는 패혈성/내독소성 충격의 치료용도로 이용되는 제9항 내지 제11항중 어느 한 항에 다른 항체 분자와 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 치료조성물.

도면

도면1

hTNF-1의 CDR예식

L 사슬데이타

```
1 Eu    DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCRASQSI. ....NTWLA WYQQKPGKAPK
htnf1   DIMMSQSPSS LAVSVGEKVTMS CKSSQSLLYSNNQKNYLA WYQQKPGQSPK
g Eu    DIMMTQSPST LSASVGDRVTIT CKSSQSLLYSNNQKNYLA WYQQKPGQAPK

Eu      LLMYKASSLE SGVPSRFIGS GSGTEFTLTI SSLQPDDFAT YYCQQYNSDS
htnf1   LLISWASTRES GVPDRFTGS GSGTDFTLTI SSVKAEDLAV YYCQQYYDYP
gEu     LLISWASTRES GVPSRFIGS GSGTEFTLTI SSLQPDDVAT YYCQQYYDYP

3 Eu    KMFGQG TKVEVKG..(KAPPA)
htnf1   WTFGGG SKLEIK..... 항연관 TNF서열
g Eu    WTFGQG TKVEIKR..(KAPPA)
```

변화된 골격잔기 (# = Xabat)

```
chgs 3/42/48/49/83/106/108
```

H사슬데이타

```
Eu      QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFSRSAII WVRQA PGQGLEWMGG
htnf1   EVLLQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFTDYNVD WVKQS HGKSLQWIGN
2hEug   QVQLVQSGAE VVKPGSSVKV SCKASGYTFTDYNVD WVKQA PGQGLQWIGN

Eu      IVPMFGPPNYAQKFQG  RVTITADESTNTAYMELSSLRSED  TAFYFCAGGY
htnf1   INPNNGGTIYNQKFKG  KGTLTVDKSSSTAYMELRSLTSED  TAVYYCARSA
2hEug   INPNNGGTIYNQKFKG  KGTLTVDKSTSTAYMELSSLTSED  TAVYYCARSA

Eu      GIYSPE           WGQGTLVTV8S.grp 1kabat cdr chg frwk4
htnf1   FYNNYEYFDV       WGAGTTVTVSS
2hEug   FYNNYEYFDV       WGQGTTVTVSS
```

변화된 골격잔기 (# = xabat)

```
chgs 12/27/30/38/46/48/66/67/69/71/73/76/83/89/91/94/108
```

도면2

10년4 의 CDR 예식

L 사슬 개략도

```
1 rei   DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDI. ....IKYLNW YQQTPGKAPK
101/4   QIVLTQSPPI MSASPGEKVT MTCSASSSVSFMY       W YQQKPGSSPR
g1014   QIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASSSVSFMY       W YQQKPGKAPK


2 rei   LLIYEASNLQA GVPSRFSGS GSGTDYTFTI SSLQPEDIAT YYCQQYQSLP
101/4   LLIYDASILAS GVPVRFSGS GSGTSYSLTI SRMEAEDVAT YYCQQWSDYS
g1014   LLIYDASILAS GVPSRFSGS GSGTDYTLTI SSLQPEDIAT YYCQQWSDYS


3 rei    YTFGQGTKLQ ITR..celltech rei
101/4   PRTFGGGTKLE IKR..... 아트 마우스 ( CDR 3 내에 삽입 )        JSE
g1014   PRTFGQGTKVE IKR..celltech rei
```

변화된 골격잔기 (# = Kabat)

```
1/3/4/39/73/104/105/107
```

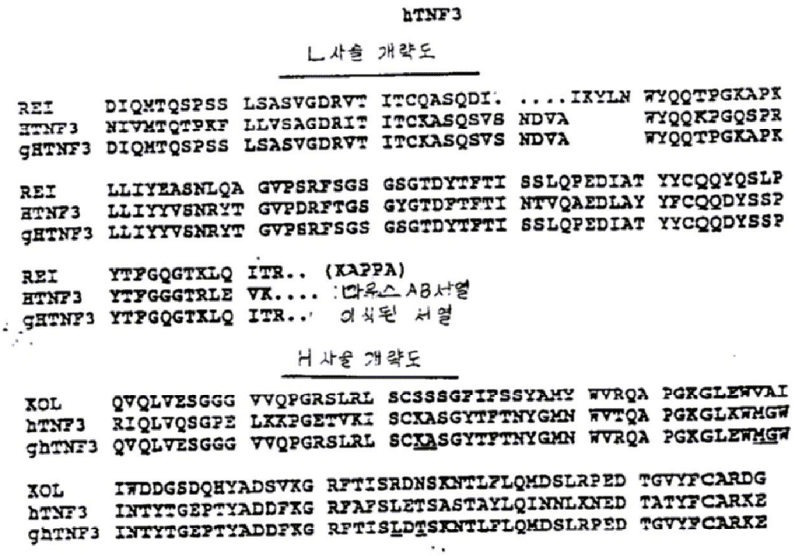
H사슬 개략도 ---

```
                              23                              48
XOL     QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSSSGFIFSSYAMY WVRQA PGKGLEWVAI
101/4   EVKIEESGGG WVQPGGSMKL SCIASGFTFSNYWMN WVRQS PEKGLEWVAE
g1014   QVQIVESGGG WVQPGRSLRL SCIASGFTFSNYWMN WVRQA PGKGLEWVAE

                              71                          88
XOL     IWDDGSDQHYADSVKG  RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCARDG
101/4   VRLQSDNFTTHYAESVKGRFTISRDDSKSGVYLQMNNLGAED TGIYYCTPFA
g1014   VRLQSDNFTTHYAESVKGRFTISRDDSKNGVYLQMDSLRPED TGVYYCTPFA

XOL     GHGFCSSASCFGPDY WGQGTPVTVSS.... 인 간(kabat CDR defn)
101/4                Y WGQGTLVTVSP...  마우스서열
g1014                Y WGQGTLVTVSS
```

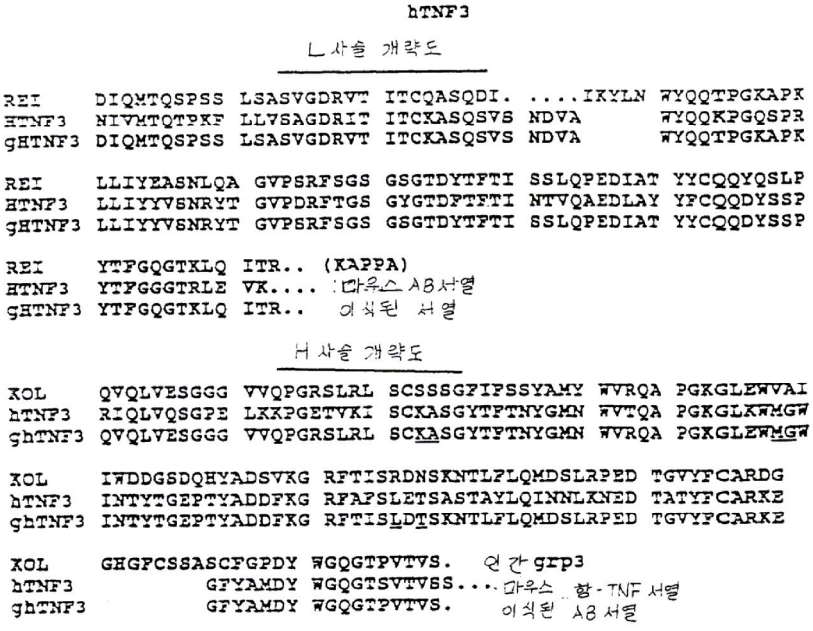
변화된 골격잔기 (# = Xabat)

```
4/11/23/24/28/73/77/78/79/91/93/94/108
```

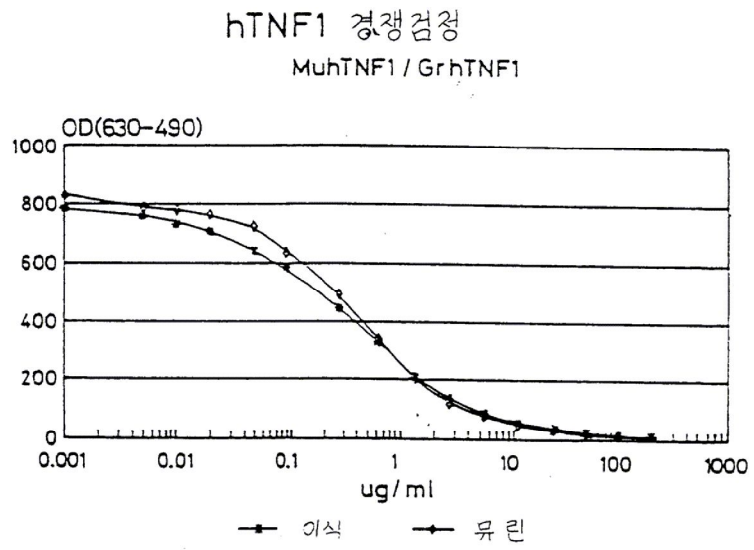
도면3


hTNF3
L사슬 개략도
REI DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDI. ....IKYLN WYQQTPGKAPK
HTNF3 NIVMTQTPKF LLVSAGDRIT ITCKASQSVS NDVA WYQQKPGQSPR
gHTNF3 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVS NDVA WYQQTPGKAPK
REI LLIYEASNLQA GVPSRFSGS GSGTDYTFTI SSLQPEDIAT YYCQQYQSLP
HTNF3 LLIYYVSNRYT GVPDRFTGS GYGTDFTFTI NTVQAEDLAY YFCQQDYSSP
gHTNF3 LLIYYVSNRYT GVPSRFSGS GSGTDYTFTI SSLQPEDIAT YYCQQDYSSP
REI YTFGQGTKLQ ITR.. (KAPPA)
HTNF3 YTFGGGTRLE VK.... :마우스 AB서열
gHTNF3 YTFGQGTKLQ ITR.. 이식된 서열
H사슬 개략도
XOL QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSSSGFIFSSYAMY WVRQA PGKGLEWVAI
hTNF3 RIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFTNYGMN WVTQA PGKGLKWMGW
gHTNF3 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFTNYGMN WVRQA PGKGLEWMGW
XOL IWDDGSDQHYADSVKG RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCARDG
hTNF3 INTYTGEPTYADDFKG RFAFSLETSASTAYLQINNLKNED TATYFCARKE
gHTNF3 INTYTGEPTYADDFKG RFTISLDTSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCARKE

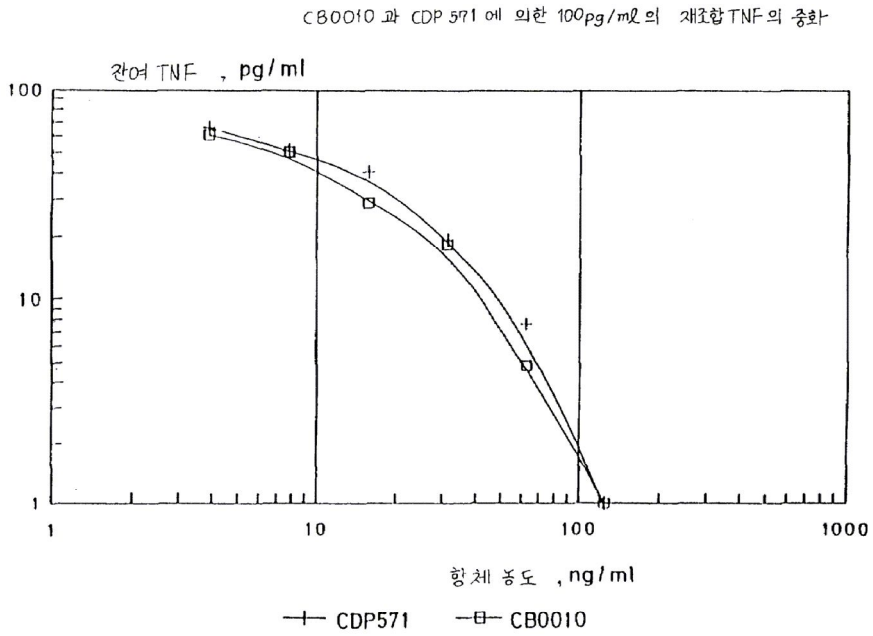
도면4


hTNF3
L사슬 개략도
REI DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDI. ....IKYLN WYQQTPGKAPK
HTNF3 NIVMTQTPKF LLVSAGDRIT ITCKASQSVS NDVA WYQQKPGQSPR
gHTNF3 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQSVS NDVA WYQQTPGKAPK
REI LLIYEASNLQA GVPSRFSGS GSGTDYTFTI SSLQPEDIAT YYCQQYQSLP
HTNF3 LLIYYVSNRYT GVPDRFTGS GYGTDFTFTI NTVQAEDLAY YFCQQDYSSP
gHTNF3 LLIYYVSNRYT GVPSRFSGS GSGTDYTFTI SSLQPEDIAT YYCQQDYSSP
REI YTFGQGTKLQ ITR.. (KAPPA)
HTNF3 YTFGGGTRLE VK.... :마우스 AB서열
gHTNF3 YTFGQGTKLQ ITR.. 이식된 서열
H사슬 개략도
XOL QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSSSGFIFSSYAMY WVRQA PGKGLEWVAI
hTNF3 RIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFTNYGMN WVTQA PGKGLKWMGW
gHTNF3 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFTNYGMN WVRQA PGKGLEWMGW
XOL IWDDGSDQHYADSVKG RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCARDG
hTNF3 INTYTGEPTYADDFKG RFAFSLETSASTAYLQINNLKNED TATYFCARKE
gHTNF3 INTYTGEPTYADDFKG RFTISLDTSKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCARKE
XOL GHGFCSSASCFGPDY WGQGTPVTVS. 인간 gHP3
hTNF3 GFYAMDY WGQGTSVTVSS.... 마우스 항-TNF 서열
gHTNF3 GFYAMDY WGQGTPVTVS. 이식된 AB 서열

도면5


hTNF1 경쟁검정
MuhTNF1 / GrhTNF1
OD(630-490)
1000
800
600
400
200
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
ug/ml
이식
뮤린

도면6


CB0010 과 CDP 571 에 의한 100pg/ml 의 재조합 TNF 의 중화
잔여 TNF , pg/ml
100
10
1
1
10
100
1000
항체 농도 , ng/ml
CDP571
CB0010