



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0052358
(43) 공개일자 2009년05월25일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)
 <i>A61P 31/18</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7005224
 (22) 출원일자 2009년03월13일
 심사청구일자 2009년03월13일
 번역문제출일자 2009년03월13일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/008312
 국제출원일자 2007년09월25일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2008/037419
 국제공개일자 2008년04월03일</p> <p>(30) 우선권주장
 06020646.3 2006년09월29일
 유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인
 에프. 호프만-라 로슈 아게
 스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124</p> <p>(72) 발명자
 아우어 요하네스
 독일 82445 슈바이겐 안게르슈트라쎄 7
 베너 모니카
 독일 81379 뮌헨 슬레폭트슈트라쎄 24
 브란트 미하엘
 독일 82393 이펠도르프 팔터가터 29</p> <p>(74) 대리인
 특허법인코리아나</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) C C R 5 에 대한 항체 및 이의 용도

(57) 요약

CCR5 에 결합하는 항체는 이의 중쇄 가변 도메인이 SEQ ID NO: 1 의 아미노산 서열을 포함하고, 면역억제 질환 치료에 유익한 특성을 지닌 것을 특징으로 한다.

특허청구의 범위

청구항 1

중쇄 가변 도메인이 하기인 SEQ ID NO: 1 의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, CCR5 에 결합하는 항체:

Gln-Val-Gln-Leu-X01-X02-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-X03-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Ile-Thr-Cys-Thr-Val-Ser-Gly-Phe-Pro-Leu-Gly-Ala-Phe-Gly-Val-His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-Pro-Gly-Lys-Gly-X04-Glu-Trp-Leu-Gly-Val-Ile-Trp-Lys-Gly-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-X05-Ser-Arg-Leu-Arg-Ile-Thr-Lys-Asp-Asn-Ser-Lys-Ser-Gln-Val-Phe-Phe-Arg-Met-Asn-Ser-Leu-Gln-Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-X06-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-Val-Asn-Leu-Ala-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-X07-Val-X08-Val-Ser-Ser,

여기서, X01 은 Lys 또는 Gln, X02 은 Gln 또는 Glu, X03 은 Arg 또는 Lys, X04 은 Leu 또는 Pro, X05 은 Met 또는 Lys, X06 은 Ile 또는 Thr, X07 은 Ser 또는 Thr, X08 은 Ile 또는 Thr 임.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 경쇄 가변 도메인이 하기인 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 CCR5 에 결합하는 항체:

Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Ile-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Gly-Asn-X10-His-Gly-Tyr-Leu-Ala-Trp-X11-Gln-Gln-Lys-X12-Gly-Lys-X13-Pro-X14-Leu-Leu-X15-Tyr-Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-X16-Phe-X17-X18-X19-Ile-X20-Ser-X21-Gln-Pro-Glu-Asp-Phe-X22-X23-Tyr-Tyr-Cys-Gln-His-His-Tyr-Asp-Leu-Pro-Arg-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-X24-Glu-Ile-Lys,

여기서, X10 은 Ile 또는 Ala, X11 은 Phe 또는 Tyr, X12 은 Gln 또는 Pro, X13 은 Ser 또는 Ala, X14 은 Gln 또는 Lys, X15 은 Val 또는 Ile, X16 은 Gln 또는 Asp, X17 은 Ser 또는 Thr, X18 은 Leu 또는 Ala, X19 은 Lys 또는 Thr, X20 은 Asn 또는 Ser, X21 은 Leu 또는 Ala, X22 은 Gly 또는 Ala, X23 은 Asn 또는 Thr, X24 은 Leu 또는 Val 임.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 6, 7, 또는 8 의 중쇄 가변 도메인, 또는 이의 CCR5-결합 분절로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 CCR5 에 결합하는 항체.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 9, 또는 10 의 경쇄 가변 도메인, 또는 이의 CCR5-결합 분절로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 CCR5 에 결합하는 항체.

청구항 5

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 6, 7, 또는 8, 또는 이의 CCR5-결합 분절로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, SEQ ID NO: 9, 또는 10, 또는 이의 CCR5-결합 분절로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 상기 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 서로 독립적으로 선택되는 것을 특징으로 하는 CCR5 에 결합하는 항체.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 인간 기원의 불변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 CCR5 에 결합하는 항체.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 중쇄 불변 부위가, 인간 IgG4 아이소타입의 것, 또는 C_H1 와 C_H2 사이 아미노산 위치 216-240 의 경첩 부위에서 및/또는 C_H2 와 C_H3 사이 아미노산 위치 327-331 의 제 2 상호-도메인 영역에서 개질 된 인간 IgG1 아이소타입의 것인 것을 특징으로 하는 CCR5 에 결합하는 항체.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 3 또는 4 의 중쇄 불변 부위 및 SEQ ID NO: 5 의 경쇄 불변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 9

제 6 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 IgG1 아이소타입의 것이고, 돌연변이 L234A 및 L235A 를 포함하거나, 또는 항체가 돌연변이 S228P 를 포함하는 인간 IgG4 아이소타입인 것을 특징으로 하는 CCR5 에 결합하는 항체.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 항체를 약학적 유효량으로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 11

약학적 유효량의 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 항체를 포함하는 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 12

약학적 조성물의 제조를 위한, 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 항체의 용도.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한 항체.

청구항 14

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 면역억제 질환 치료에 사용하기 위한 항체.

청구항 15

면역억제 질환 치료용 약제 제조를 위한 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 항체의 용도.

청구항 16

면역억제 질환을 앓고 있는 환자의 치료 방법으로, 치료적 유효량의 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 항체를 상기 환자에게 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 2 의 폴리펩타이드와 함께 어셈블링이 가능한 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산으로, 상기 제 2 의 폴리펩타이드가 SEQ ID NO: 2, 5 의 폴리펩타이드 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드를 포함하고, 상기 폴리펩타이드가 SEQ ID NO: 1, 6, 7, 또는 8 의 아미노산 서열을 포함되게 하는 핵산.

청구항 18

CCR5 에 결합하는 항체의쇄를 코딩하는 핵산으로, 상기 코딩된쇄는 각각의 기타 항체쇄와 함께 어셈블링이 가능하여 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 CCR5 에 결합하는 항체 분자를 생성하게 하는 것을 특징으로 하는 핵산.

청구항 19

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 CCR5 에 결합하는 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 20

제 19 항에 따른 핵산을 포함하는 진핵 세포.

청구항 21

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 재조합 인간 또는 인간화 항체의 제조 방법으로, 제 19 항에 따른 핵산을 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현시키고, 상기 재조합 항체를 상기 세포 또는 세포 배양 상청액에서 회수하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 CCR5 에 대한 항체, 이의 제조 방법, 상기 항체를 함유하는 약학적 조성물, 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

<2> 지난 수 년 사이에, HIV-1 이 표적 세포에 진입하는데 사용하는 특이적인 메카니즘에 대한 과학이 증진적으로 이루어졌다. 이러한 과학으로 인해 상기의 프로세스의 각 단계를 공격하는 약물을 개발하려는 시도가 조장되었다. 상기 진입을 타겟팅하는 제 1 의 약물이 최근에 임상용으로 승인되었다 (enfuvirtide, T20; Lazzarin, A., et al., N. Engl. J. Med. 348 (2003) 2186-2195). Enfuvirtide 는 케모카인 수용체 결합 후의 단계에서 융합을 차단하는 펩타이드 약물이다.

<3> HIV-1 감염은 바이러스성 외피 당단백질 (viral envelope glycoprotein; Env) 과 CD4 + 케모카인 수용체로 이루어진 세포성 수용체 복합체 간의 상호 작용에 의해 개시된다 (Pierson, T.C. 및 Doms, R. W., Immuno. Lett. 85 (2003) 113-118; Kilby, J.M. 및 Eron, J.J., N. Engl. J. Med. 348 (2003) 2228-2238). Env 는 2 개의 서브유닛, 즉 바이러스성 횡단막 (transmembrane) 서브유닛 gp41, 및 이와 비(非)공유결합으로 결합되고 세포 CD4-수용체와 상호작용하는 표면 당단백질 gp 120 이다. Gp 41 는 gp 120 를 바이러스 막에 고정시키고, 또한 융합도 담당한다. gp 120 의 세포 상 CD4 와의 결합으로 인해, gp 120 이 세포 표면 케모카인 수용체, 즉 "공-수용체 (co-receptor)" 와 상호 작용을 가능하게 하는 결합 부위를 노출 또는 형성시키는 입체형태 (conformation) 의 변화를 유발한다. 케모카인 수용체는, 통상, 화학주성, 염증성 및 기타 기능을 갖는 소형의 사이토카인인 케모카인에 응답하여 신호를 전달하는 7 개의 횡단막 G-단백질 커플링된 수용체 (7 TM GPCRs) 이다.

<4> 대부분의 임상용 약물은 그 밖의 7 TM GPCRs 에 대한 것이어서, 바이러스의 진입을 차단하기 위해서는, 상기 분자를 목표로 하는 것이야말로, 과거에 가장 성공한 유형의 신약 개발 프로그램을 연장하는 것이다. HIV-1 단리체가 세포에 진입하여 감염시키기 위해서는 CD4 및 공수용체를 필요로 한다. 인간 CC 케모카인 수용체인 CCR5 은 대식세포-영양성 (tropic) (R5) 균주에 대한 공-수용체이며, HIV-1 의 성적 접촉에 있어서 중요한 역할을 한다 (Berger, E.A., AIDS 11 (Suppl. A) (1997) 3-16; Bieniasz, P.D. 및 Cullen, B. R., Frontiers in Bioscience 3 (1998) d44-d58; Littman, D.R., Cell 93 (1998) 677-680).

<5> 대부분의 HIV-1 의 1 차 단리체는 인간 CCR5 (또한 "CCR5" 로도 명명됨) 을 사용하는데, 이러한 인간 CCR5 는 감염의 확립 및 유지에 있어서 중요하다. 게다가, CCR5 의 기능은 인간 건강 측면에서 없어도 된다. 돌연변이 CCR5 대립유전자인 "CCR5 Δ 32" 은 끝이 잘린 (truncated), 기능이 없는 단백질을 코딩한다 (Samson, M., et al., Nature 382 (1996) 722-725; Dean, M., et al., Science 273 (1996) 1856-1862). 돌연변이체와 동종접합인 개체들은 CCR5 발현이 없으며, HIV-1 감염을 강하게 예방한다. 이들은 어떠한 명백한 표현형 결과도 나타내지 않으며, M 영양성 HIV 감염에 대해 매우 내성이 큰 반면에, 이형접합체 개체들은 지연된 질병 진행을 보인다 (Schwarz, M. K. 및 Wells, T.N., Nat. Rev. Drug Discov. 1 (2002) 347-358). CCR5 이 부족해도 외견상 부작용은 없는데, 아마도 그 이유는 CCR5 가, 다수의 겹쳐지는 기능을 공유하고, 이들 대부분이 대안 수용체를 갖는 α 케모카인 MIP-1α, MIP-1β, 및 RANTES 에 대한 수용체로서 매우 풍부한 케모카인 네트

워크의 일부이기 때문이다 (Rossi, D. 및 Zlotnik, A., Annu. Rev. Immunol. 18 (2000) 217-242). HIV-1 공-수용체로서 CCR5 를 동정하는 것은 이의 리간드인, MIP-1 α , MIP-1 β , 및 RANTES 의, R5X4 또는 X4 단리체가 아닌 R5 에 의한 감염 차단능을 기반으로 한 것이었다 (Cocchi, F., et al., Science 270 (1995) 1811-1815).

<6> CCR5 은 또한 주로 염증 반응 동안 생성되고, 중성구, 대식세포 및 T 세포의 아집단 (subset) (T 헬퍼인 Th1 및 Th2 세포) 의 채용을 제어하는 "무리" 케모카인의 수용체이다. Th1 반응은 전형적으로는 예를 들어 바이러스 및 종양에 대해 유효한 세포-매개 면역을 수반하는 것이며, 한편으로 Th2 반응은 알레르기에 있어서 중추적인 것으로 여겨진다. 따라서, 이들 케모카인 수용체의 억제제는 면역조절물질로서 유용할 수 있다. Th1 반응에 있어서는, 과활동적인 반응이 예를 들어 류마티스 관절염을 포함하는 자가면역에서 위축되거나, 또는 Th2 반응에 있어서는, 아토피 피부염을 포함하는 알레르기성 반응 또는 천식 발작이 감소된다 (예를 들어, Schols, D., Curr. Top. Med. Chem. 4 (2004) 883-893; Mueller, A. 및 Strange, P.G., Int. J. Biochem. Cell Biol. 36 (2004) 35-38; Kazmierski, W.M., et al., Curr. Drug Targets Infect. Disord. 2 (2002) 265-278; Lehner, T., Trends Immunol. 23 (2002) 347-351 참조).

<7> CCR5 에 대한 항체는 예를 들어, PRO 140 (Olson, W.C., et al., J. Virol. 73 (1999) 4145-4155) 및 2D7 (Samson, M., et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 24934-24941) 이다. 추가의 항체가 하기 문헌에 언급되어 있다: WO 2006/103100, US 2004/0043033, US 6,610,834, US 2003/0228306, US 2003/0195348, US 2003/0166870, US 2003/0166024, US 2003/0165988, US 2003/0152913, US 2003/0100058, US 2003/0099645, US 2003/0049251, US 2003/0044411, US 2003/0003440, US 6,528,625, US 2002/0147147, US 2002/0146415, US 2002/0106374, US 2002/0061834, US 2002/0048786, US 2001/0000241, EP 1 322 332, EP 1 263 791, EP 1 207 202, EP 1 161 456, EP 1 144 006, WO 2003/072766, WO 2003/066830, WO 2003/033666, WO 2002/083172, WO 02/22077, WO 01/58916, WO 01/58915, WO 01/43779, WO 01/42308.

<8> 본 발명의 목적은 AIDS 의 치료제로 주로 사용되는 CCR5 에 대한 신규한 항체를 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

<9> 본 발명의 개요

<10> 본 발명은, 중쇄 가변 도메인이 하기 식의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, CCR5 에 결합하는 항체를 포함한다:

Gln-Val-Gln-Leu-X01-X02-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Val-X03-Pro-Ser-Gln-Ser-Leu-Ser-Ile-Thr-Cys-Thr-Val-Ser-Gly-Phe-Pro-Leu-Gly-Ala-Phe-Gly-Val-His-Trp-Val-Arg-Gln-Ser-Pro-Gly-Lys-Gly-X04-Glu-Trp-Leu-Gly-Val-Ile-Trp-Lys-Gly-Gly-Asn-Thr-Asp-Tyr-Asn-Ala-Ala-Phe-X05-Ser-Arg-Leu-Arg-Ile-Thr-Lys-Asp-Asn-Ser-Lys-Ser-Gln-Val-Phe-Phe-Arg-Met-Asn-Ser-Leu-Gln-Thr-Asp-Asp-Thr-Ala-X06-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Lys-Val-Asn-Leu-Ala-Asp-Ala-Met-Asp-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-X07-Val-X08-Val-Ser-Ser,

<11>

<12> 여기서,

<13> X01 은 Lys 또는 Gln,

<14> X02 은 Gln 또는 Glu,

<15> X03 은 Arg 또는 Lys,

<16> X04 은 Leu 또는 Pro,

<17> X05 은 Met 또는 Lys,

<18> X06 은 Ile 또는 Thr,

<19> X07 은 Ser 또는 Thr,

<20> X08 은 Ile 또는 Thr 임

- <21> (SEQ ID NO:1).
- <22> 상기 항체의 경쇄 가변 도메인이 하기 식의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체가 바람직하다.
- Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Glu-Thr-Val-Thr-Ile-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Gly-Asn-X10-His-Gly-Tyr-Leu-Ala-Trp-X11-Gln-Gln-Lys-X12-Gly-Lys-X13-Pro-X14-Leu-Leu-X15-Tyr-Asn-Thr-Lys-Thr-Leu-Ala-Glu-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-X16-Phe-X17-X18-X19-Ile-X20-Ser-X21-Gln-Pro-Glu-Asp-Phe-X22-X23-Tyr-Tyr-Cys-Gln-His-His-Tyr-Asp-Leu-Pro-Arg-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-X24-Glu-Ile-Lys,**
- <23>
- <24> 여기서,
- <25> X10 은 Ile 또는 Ala,
- <26> X11 은 Phe 또는 Tyr,
- <27> X12 은 Gln 또는 Pro,
- <28> X13 은 Ser 또는 Ala,
- <29> X14 는 Gln 또는 Lys,
- <30> X15 는 Val 또는 Ile,
- <31> X16 은 Gln 또는 Asp,
- <32> X17 은 Ser 또는 Thr,
- <33> X18 은 Leu 또는 Ala,
- <34> X19 는 Lys 또는 Thr,
- <35> X20 은 Asn 또는 Ser,
- <36> X21 은 Leu 또는 Ala,
- <37> X22 은 Gly 또는 Ala,
- <38> X23 은 Asn 또는 Thr,
- <39> X24 은 Leu 또는 Val 임
- <40> (SEQ ID NO: 2).
- <41> 항체가, 인간 IgG4 아이소타입 또는 인간 IgG1 아이소타입의 것으로, 상기 IgG1 아이소타입이 C_H1 와 C_H2 사이 아미노산 위치 216-240 의 경첩 부위에서 뿔/또는 C_H2 와 C_H3 사이 아미노산 위치 327-331 의 제 2 상호-도메인 (inter-domain) 영역에서 임의 개질되는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다.
- <42> 본 발명의 바람직한 구현에는 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학적 조성물이다.
- <43> 본 발명의 바람직한 구현에는 약학적 조성물 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다.
- <44> 본 발명의 바람직한 구현에는 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학적 조성물의 제조 방법이다.
- <45> 본 발명의 바람직한 구현에는, 제 2 의 폴리펩타이드와 함께 어셈블링 (assembling) 가능한 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산으로, 이에 의해 상기 제 2 의 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 2, 5 의 폴리펩타이드 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드를 포함하는 한편, 상기 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 1, 6, 7, 또는 8 의 아미노산 서열을 포함한다.
- <46> 본 발명의 바람직한 구현에는 면역억제 질환을 앓는 환자의 치료 방법으로, 이는 상기 환자에게 치료적 유효량의 본 발명에 따른 항체를 투여하는 것을 특징으로 한다.

- <47> 본 발명에 따른 항체는 하기를 특징으로 하는 것이 바람직하다: 상기 항체가 CCR5 에 결합하고, SEQ ID NO: 6, 7, 8 의 중쇄 가변 도메인, SEQ ID NO: 9, 10 의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 가변 도메인, 또는 이의 CCR5-결합 분질의 군으로부터 선택되는 중쇄 또는 경쇄의 가변 도메인을 포함함.
- <48> 본 발명에 따른 항체는 하기를 특징으로 하는 것이 바람직하다: SEQ ID NO: 6, 7, 또는 8 의 중쇄 가변 도메인, 또는 이의 CCR5-결합 분질의 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인을 중쇄 가변 도메인으로서 포함하고, SEQ ID NO: 9 또는 10 의 경쇄 가변 도메인, 또는 이의 CCR5-결합 분질의 군으로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인을 경쇄 가변 도메인으로서 포함하며, 여기서 상기 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 서로 독립적으로 선택됨.
- <49> 본 발명에 따른 항체는 바람직하게, 중쇄 가변 도메인이 SEQ ID NO: 6, 7, 8 의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는데, 더욱 명확하게는 상기 항체는 SEQ ID NO: 6, 7, 또는 8 의 중쇄 가변 도메인, 또는 이의 CCR5-결합 분질로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- <50> 본 발명에 따른 항체는 바람직하게, 경쇄 가변 도메인이 SEQ ID NO: 9, 10 의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는데, 더욱 명확하게는 상기 항체가 SEQ ID NO: 9, 또는 10 의 경쇄 가변 도메인, 또는 이의 CCR5-결합 분질로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- <51> 본 발명에 따른 항체가 (경쇄 및 중쇄) 불변 부위가 인간 기원인 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다. 이러한 불변 부위 (쇄) 는 당기술, 예를 들어 Kabat 이 기술한 것 (예를 들어, Johnson, G. 및 Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218 참조) 에 익히 공지되어 있다. 예를 들어, 유용한 인간 중쇄 불변 부위는 SEQ ID NO: 3, 4 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 유용한 인간 경쇄 불변 부위는 SEQ ID NO: 5 의 카파-경쇄 불변 부위의 아미노산 서열을 포함한다. 항체가 마우스 기원인 것이고, Kabat 에 따른 마우스 항체의 항체 가변 서열 프레임을 포함하는 것이 또한 바람직하다 (예를 들어, Johnson, G. 및 Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218 참고).
- <52> 항체는 인간 CCR5 의 하나 이상의 기능, 예컨대, CCR5 에 대한 리간드 결합, 신호전달 활성화 (예를 들어, 포유동물 G 단백질의 활성화, 세포질의 자유 Ca^{2+} 농도가 신속하면서 순식간으로 증가하는 것을 유도, 및/또는 세포 반응 자극 (예를 들어, 화학주성, 세포외유출 또는 백혈구에 의한 염증 매개체 방출, 인테그린 활성화의 자극)) 을 억제한다. 항체는 RANTES, MIP-1 알파, MIP-1 베타, 및/또는 HIV 의 인간 CCR5 으로의 결합을 억제하고, 백혈구 수송 (trafficking), 세포로의 HIV 진입, T 세포 활성화, 염증 매개체 방출 및/또는 백혈구 탈과립과 같이 인간 CCR5 에 의해 매개되는 기능을 억제한다.
- <53> 본 발명에 따른 항체는, 어세이에서 인간 CCR5 에 특이적으로 결합하여, 표적 세포와의 HIV 융합을 억제시키는데, 상기 어세이는 IC_{50} 값을 $4.0 \mu g/ml$ 이하로 하는 상기 세포와 바이러스 간의 막 융합을 억제하기에 유효한 항체 농도로, 바이러스의 존재하에서 항체와 표적 세포를 접촉시키는 것을 포함한다.
- <54> 본 발명에 따른 항체는 CCR5 에 특이적으로 결합하여, CCR5 및 CD4 폴리펩타이드를 공동-발현하는 제 1 의 세포 및 HIV 외피 (env) 단백질을 발현하는 제 2 의 세포 간의 막 융합을, IC_{50} 값을 $1.5 \mu g/ml$ 이하, 바람직하게는 $0.3 \mu g/ml$ 이하로 하여 억제한다.
- <55> 본 발명에 따른 항체는 IC_{50} 값을 $1.5 \mu g/ml$ 이하로 하여 RANTES, MIP-1 알파, 및/또는 MIP-1 베타의 존재하에서 상기 항체와 표적 세포를 접촉시키는 어세이에서, 특이적으로 CCR5 에 결합하여 상기 표적 세포 내 세포 반응의 자극을 억제, 바람직하게는 이동을 억제시킨다.
- <56> 본 발명에 따른 항체는, 바람직하게, $100 \mu g/ml$ 이하의 항체 농도로 하는 CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR6, 및 CXCR4 로의 결합 어세이 내에서, 케모카인 결합을 억제하지 않는다.
- <57> 본 발명에 따른 항체는, 바람직하게, $50 \mu g/ml$ 이하의 항체 농도로 하여 CCR5 및 G 알파 16 를 발현하는 CHO 세포내에서 검출시, 세포내 Ca^{2+} 증가를 조장하지 않는다.
- <58> 본 발명에 따른 항체는 바람직하게 인간 아이소타입 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 의 것인데, IgG1 또는 IgG4 이 바람직하다.
- <59> 본 발명에 따른 항체는 바람직하게 IgG4 아이소타입의 것이다. 본 발명에 따른 항체는 바람직하게 IgG1 아

이소타입의 것이다. 본 발명에 따른 항체는 바람직하게, 돌연변이 S228P 를 갖는 IgG4 아이소타입의 것이다. 본 발명에 따른 항체는, 즉, 중쇄 및 경쇄 불변 부위가 C_H1 와 C_H2 사이 대략 아미노산 위치 216-240, 바람직하게는 대략 아미노산 위치 220-240 의 경첩 부위에서 (Angal, S., et al., Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108), 및/또는 C_H2 와 C_H3 사이 대략 아미노산 위치 327-331 의 제 2 의 상호-도메인 영역에서 개질된 IgG1 또는 IgG4 아이소타입의 것이다 (Kabat 에 따른 넘버링임, 예를 들어, 문헌 [Johnson, G. 및 Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218] 참조). 이러한 개질은 효과기 (effector) 기능 (ADCC 및/또는 CDC) 을 감소시키거나 또는 막는다. IgG 부류의 전환 (switching) 은, 항체의 중쇄 불변 부위 및 경쇄 불변 도메인의, 원하는 부류, 예컨대 IgG1 돌연변이 또는 IgG4 의 항체로부터의 것으로 교환함으로써 수행가능하다. 이러한 방법은 최신 당기술에 공지되어 있다.

<60> 본 발명에 따른 항체는 바람직하게, L234 (아미노산 위치 234 에서의 류신), L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 및/또는 P329 (EU 지침에 따라 넘버링) 에서 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 인간 하위부류 IgG1 의 것인 것을 특징으로 한다. 바람직하게, 상기 항체는 돌연변이 L234A (아미노산 위치 234 에 류신 대신 알라닌) 및 L235A 를 포함하는 인간 IgG1 아이소타입의 것이다. 본 발명에 따른 항체는 바람직하게, 위치 S228 에 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 아이소타입의 것인 것을 특징으로 한다.

<61> 따라서, 본 발명은 항체가 CCR5 에 결합하고, 인간 기원의 Fc 부분을 함유하고, 인간 보체 인자 C1q 를 결합하지 않고 및/또는 보체 인자 C3 를 활성화하지 않는 것을 특징으로 하는 항체의 한 국면에 관한 것이다. 바람직하게, 상기 항체는 인간 Fc γ 수용체로의 감소된 결합을 보이거나 또는 이에 결합하지 않는다.

<62> 본 발명은 추가로 본 발명에 따른 항체 쇄, 가변 도메인 또는 이의 CDR 을 코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 코딩된 폴리펩타이드는 각각의 다른 항체 쇄와 함께 어셈블링하여 본 발명에 따른 CCR5 에 대한 항체 분자를 생성할 수 있다.

<63> 본 발명은 또한 원핵 또는 진핵 숙주 세포 내 상기 핵산을 발현할 수 있는 본 발명에 따른 상기 핵산을 함유하는 발현 벡터, 및 이러한 항체의 재조합체 생성을 위한 상기 벡터를 함유하는 숙주 세포를 제공한다.

<64> 본 발명은 또한 본 발명에 따른 벡터를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주 세포를 포함한다.

<65> 본 발명은 추가로, 본 발명에 따른 재조합 인간 또는 인간화 항체의 제조 방법을 포함하는데, 이 방법은 원핵 또는 진핵 숙주 세포 내에서 본 발명에 따른 핵산을 발현하고, 상기 항체를 상기 세포 또는 세포 배양 상정액으로부터 회수하는 것을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 그러한 재조합 방법으로 수득가능한 항체를 포함한다.

<66> 본 발명에 따른 항체는 CCR5 타겟팅 요법을 필요로 하는 환자에 이롭다. 본 발명에 따른 항체는 상기 질환, 특히 면역억제, 특히 HIV 감염을 앓고 있는 환자에게 이로운, 신규성 및 진보성을 지닌다.

<67> 본 발명은 추가로 면역억제, 특히 HIV 감염을 앓고 있는 환자의 치료 방법을 제공하는데, 이는 상기 질환으로 진단받은 환자 (그리하여, 이러한 치료를 필요로 하는 환자) 에게 유효량의 본 발명에 따른 CCR5 에 결합하는 항체를 투여하는 것을 포함한다. 약학적 조성물로 항체를 투여하는 것이 바람직하다.

<68> 본 발명은 추가로, 면역억제 질환 치료, 바람직하게는 HIV 감염 치료, 면역억제를 앓고 있는 환자 치료, 및 본 발명에 따른 약학적 조성물 제조를 위한 약제로서의 본 발명에 따른 항체의 용도를 포함한다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 제조 방법을 포함한다.

<69> 본 발명은 추가로, 약학적 유효량의 본 발명에 따른 항체를 임의로는 약학 목적의 항체 제형에 유용한 완충액 및/또는 애드juvant (adjuvant) 와 함께 함유하는 약학적 조성물을 포함한다.

<70> 본 발명은 또한 약학적으로 허용가능한 담체 내 이러한 항체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 한 구현예에서, 약학적 조성물은 제조 성형물 또는 키트 내에 포함될 수 있다.

<71> 따라서, 본 발명의 한 국면은 약제로서 사용되기 위한 본 발명에 따른 항체이다. 본 발명의 또 다른 국면은, 면역억제 질환 치료에 사용되기 위한 본 발명에 따른 항체이다. 또한, 한 국면은 본 발명에 따른 항체의 면역억제 질환 치료용 약제 제조를 위한 용도이다.

<72> 본 발명의 상세한 설명

<73> 용어 "항체" 는 전체 항체에 제한되지 않고, 항체 분절을 포함하는 다양한 형태의 항체 구조를 포함한다.

본 발명에 따른 항체는, 본 발명에 따른 특징적인 특성이 보유되는 한, 인간화 항체, 키메라 항체 또는 나아가 유전자 조작 항체가 바람직하다.

<74> "항체 분절" 은 전장 항체의 일부, 바람직하게는 그의 가변 도메인, 또는 적어도 그의 항원 결합 부위를 포함한다. 항체 분절의 예에는 항체 분절로부터 형성된 디아바디 (diabody), 단일-쇄 항체 분자, 면역독소 및 다중특이성 항체가 포함된다. scFv 항체가, 예를 들어, 문헌 [Huston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-88] 에 기술되어 있다. 또한, 항체 분절은, V_H 도메인의 특성, 즉 V_L 도메인과 함께 어셈블링 가능한 특성, 또는 CCR5 에 결합하는 V_L 도메인의 특성, 즉 V_H 도메인과 함께 기능적 항원 결합 부위에 어셈블링 가능한 특성을 가져, 이로 인해 표적 세포와의 막 융합 또는 HIV 융합을 억제하는 특성을 제공하는 단일 쇠 폴리펩타이드를 포함한다.

<75> 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "단일클론성 항체" 또는 "단일클론성 항체 조성물" 은 단일 아미노산 조성물의 항체 분자 제조물을 지칭한다. 용어 "키메라 항체" 란, 통상적으로는 재조합 DNA 기법으로 제조되는, 마우스 유래의 가변 도메인, 즉 결합 부위, 및 적어도 상이한 공급원 또는 종에서 유래된 불변 부위의 일부를 포함하는 단일클론성 항체를 지칭한다. 마우스의 가변 도메인 및 인간의 불변 부위를 포함하는 키메라 항체가 특히 바람직하다. 그러한 마우스/인간 키메라 항체는, 마우스 면역글로불린 가변 도메인을 코딩하는 DNA 단편 및 인간 면역글로불린 불변 부위를 코딩하는 DNA 단편을 포함하는 발현된 면역글로불린 유전자의 생성물이다. 본 발명에 포함되는 기타 형태의 "키메라 항체" 는 그 부류 또는 하위부류가 원 항체의 것에서 개질되어 있거나 또는 변형되어 있는 것이다. 이러한 "키메라" 항체는 또한 "부류-전환 항체" 라고도 지칭된다. 키메라 항체 제조 방법에는, 당업계에서 익히 공지되어 있는 통상적인 재조합 DNA 및 유전자 트랜스펙션 (transfection) 기법이 포함된다. 예를 들어, 문헌 [Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US Patent Nos. 5,202,238 및 5,204,244] 을 참조한다.

<76> 용어 "인간화 항체" 란, 골격부 (framework) 및/또는 "상보성 결정 부위" (CDR) 가 모 면역글로불린의 것과 비교했을 때 상이한 종의 면역글로불린의 CDR 을 포함하도록 개질된 항체를 지칭한다. 바람직한 구현예에서, 마우스 CDR 을 인간 항체의 골격부에 이식시켜 "인간화 항체" 를 제조한다. 예를 들어, 문헌 [Riechmann, L, et al., Nature 332 (1988) 323-327; 및 Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270] 을 참조한다. 특히 바람직한 CDR 은 키메라 및 2기능성 항체에 대해 상기에서 언급된 항원을 인식하는 서열을 나타내는 CDR 에 상응한다.

<77> 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "CCR5 로의 결합" 이란, 시험관 내 (in vitro) ELISA 어세이 기반 세포 (CCR5 발현 세포, 예를 들어, 형질전환된 CHO 세포, L1.2 세포) 내 CCR5 와의 항체의 결합을 의미한다. 결합은, 항체가 항체 농도 100 ng/ml 에서, 5 이상, 바람직하게는 10 이상의 S/N (신호/잡음) 비를 일으킬 때 발견된다.

<78> 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "7 횡단막 케모카인 분자 구조" 란, 세포 막 2중층에 위치할 때 CCR5 가 나타내는 천연 구조를 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Oppermann, M., Cell. Sig. 16 (2004) 1201-1210] 참조). 기타 G 단백질-커플링된 수용체 (예를 들어, G 단백질-커플링된 수용체 1b) 와 같이, CCR5 는 세포의 N-말단 도메인, 횡단막 도메인 및 세포질 C-말단 도메인으로 이루어진다. 상기 횡단막 도메인은, 3 개의 세포질 단편 및 3 개의 세포외 단편에 의해 연결된 7 개의 소수성 횡단막 단편들로 이루어진다. 본 발명에 따른 항체는 7 개의 횡단막 케모카인 분자 구조로 하는 CCR5 에 결합한다.

<79> 용어 "에피토프" 란, 특이적으로 항체에 결합할 수 있는 단백질 결정인자를 의미한다. 에피토프는 통상 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자들의 화학적으로 활성인 표면 그룹으로 이루어지며, 통상 에피토프는 특이적인 3 가지의 3 차 구조 특성 및 특이적인 전하 특성을 지닌다. 입체형태적 및 비(非)입체형태적 에피토프는 후자가 아닌 전자로의 결합이 변성 용매의 존재하에서 사라지는 점으로 인해 구별된다. 바람직하게도, 본 발명에 따른 항체는 변성 CCR5 이 아닌 천연 CCR5 에 특이적으로 결합한다.

<80> 용어 "막 융합" 이란, CCR5 및 CD4 폴리펩타이드를 공동발현하는 제 1 의 세포와 HIV 외피 단백질을 발현하는 제 2 의 세포 사이의 융합을 지칭한다. 막 융합은 루시페라아제 정보제공 유전자 어세이로 측정한다.

<81> 용어 "표적 세포와의 HIV 융합 억제" 란, 표적 세포를 항체와 상기 바이러스의 존재하에서 바이러스 및 상기 세포와의 막 융합을 억제하기에 유효한 항체 농도로 하여 접촉시키고, 루시페라아제 정보제공 유전자 활성을 측정하는 것을 포함하는 어세이 내에서 측정된 표적 세포와의 HIV 융합을 억제하는 것을 의미한다.

- <82> 본원에서 사용되는 바와 같은 "가변 도메인" (경쇄의 가변 도메인 (V_L), 중쇄의 가변 도메인 (V_H)) 은, 항원에 대한 항체 결합에 직접적으로 관련되는 각각의 경쇄 및 중쇄 도메인 한 쌍을 말한다. 가변의 경쇄 및 중쇄 도메인은 동일한 일반적인 구조를 가지며, 각 도메인은 서열이 광범위하게 보존되어 있으면서 3 개의 "고가변 영역" (또는 상보성 결정 부위, CDR) 에 의해 연결되는 4 개의 골격부 (FR) 를 포함한다. 골격부는 β -시트 입체형태를 취하고, CDR은 β -시트 구조를 연결하는 루프를 형성할 수 있다. 각 체에서의 CDR은 그의 3 차원 구조로 골격부에 의해 유지되며, 다른 체에 있는 CDR 과 함께 항원 결합 부위를 형성한다. 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR3 부위는 본 발명에 따른 항체의 결합 특이성/친화성에 특히 중요한 역할을 하므로 이는 본 발명의 추가적인 대상이다.
- <83> 본 발명에 따른 항체는, 그 항체가 하기로 이루어진 조합들의 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다:
- <84> a) SEQ ID NO: 6 의 아미노산 서열로 정의되는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 9 의 아미노산 서열로 정의되는 경쇄 가변 도메인;
- <85> b) SEQ ID NO: 6 의 아미노산 서열로 정의되는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 10 의 아미노산 서열로 정의되는 경쇄 가변 도메인;
- <86> c) SEQ ID NO: 7 의 아미노산 서열로 정의되는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 9 의 아미노산 서열로 정의되는 경쇄 가변 도메인;
- <87> d) SEQ ID NO: 7 의 아미노산 서열로 정의되는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 10 의 아미노산 서열로 정의되는 경쇄 가변 도메인;
- <88> e) SEQ ID NO: 8 의 아미노산 서열로 정의되는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 9 의 아미노산 서열로 정의되는 경쇄 가변 도메인;
- <89> f) SEQ ID NO: 8 의 아미노산 서열로 정의되는 중쇄 가변 도메인, 및 SEQ ID NO: 10 의 아미노산 서열로 정의되는 경쇄 가변 도메인.
- <90> 본원에서 사용되는 경우, 용어 "항체의 항원-결합부" 란, 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 항체의 항원-결합부는 "상보성 결정 부위" 또는 "CDR" 의 아미노산 잔기를 포함한다. "골격부" 또는 "FR" 은, 본원에서 정의된 바와 같은 고가변부 잔기 외의 상기 가변 도메인 부위이다. 따라서, 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인은 N- 내지 C-말단 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4 를 포함한다. 특히, 중쇄의 CDR3 는 항원 결합에 가장 많이 기여하고, 항체의 특성을 한정짓는 부위이다. CDR 및 FR 부위는 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Publication No. 91-3242 (1991)] 의 표준 정의 및/또는 "고가변 루프" 유래의 잔기에 따라 결정된다.
- <91> 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "핵산" 또는 "핵산 분자" 는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산 분자는 외가닥 또는 이중가닥일 수 있으나, 이중가닥 DNA 인 것이 바람직하다.
- <92> 본 출원에서 사용되는 바와 같은 용어 "아미노산" 은, 알라닌 (3 자리 문자 코드: ala, 1 자리 문자 코드: A), 아르기닌 (arg, R), 아스파라긴 (asn, N), 아스파르트산 (asp, D), 시스테인 (cys, C), 글루타민 (gln, Q), 글루탐산 (glu, E), 글리신 (gly, G), 히스티딘 (his, H), 이소류신 (ile, I), 류신 (leu, L), 리신 (lys, K), 메티오닌 (met, M), 페닐알라닌 (phe, F), 프롤린 (pro, P), 세린 (ser, S), 트레오닌 (thr, T), 트립토판 (trp, W), 티로신 (tyr, Y), 및 발린 (val, V) 을 포함하는 천연 발생 카르복시 α -아미노산의 군을 의미한다.
- <93> 핵산은 이것이 또 다른 핵산과 작용 관계에 처하게 되는 경우, "작동적으로 (operably) 연결"된다. 예를 들어, 예비-서열 또는 분비 리더 (secretory leader) 용 DNA 는 이것이 폴리펩타이드의 분비에 관여하는 예비-단백질로서 발현되는 경우, 상기 폴리펩타이드를 위한 DNA 에 작동적으로 연결되거나; 프로모터 또는 증강자 (enhancer) 는 이것이 서열의 전사에 영향을 미치는 경우, 코딩 서열에 작동적으로 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는, 이것이 번역을 촉진시키도록 위치되는 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로 "작동적으로 연결된" 이란, 연결되어 있는 DNA 서열들이 상호 선형 상에 있고, 분비 리더의 경우, 인접하면서도 리딩 프레임 내에 있음을 의미한다. 그러나, 증강자는 인접되어 있을 필요는 없다. 가까운 제한 부위에서의 결찰로써 연결이 이루어진다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우에는, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터

또는 링커가 통상적인 절차에 따라 사용된다.

- <94> 본원에서 사용되는 바와 같이, "세포", "세포주" 및 "세포 배양물" 이라는 표현들은 상호교환하여 사용할 수 있고, 이러한 모든 지명은 자손을 포함한다. 따라서, 단어 "형질전환주" 및 "형질전환된 세포" 에는, 는 원래의 주체 세포, 및 이전 (transfer) 의 수에 상관없이 그로부터 유래된 배양물을 포함한다. 계획적 또는 우연적인 돌연변이로 인해, 모든 자손은 DNA 함량에 있어서 정확하게 동일하지 않을 수 있음이 또한 자명하다. 원래 형질전환된 세포내에서 스크리닝된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손이 포함된다.
- <95> 항체의 "Fc 부분" 은 항체의 항원으로의 결합에 직접적으로 관여하지 않으나, 다양한 효과기 기능을 나타낸다. 중쇄의 불변 부위 아미노산 서열에 따라, 항체 또는 면역글로불린은 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM 으로 나뉘어지고, 이들 중 몇몇은 하위부류 (아이스타입), 예를 들어, IgG 는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, IgA 는 IgA1 및 IgA2 로 추가 나뉘어질 수 있다. 중쇄 불변 부위에 따라, 상이한 부류의 면역글로불린은 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 각각 불리운다. 본 발명에 따른 항체는 IgG 형이 바람직하다.
- <96> 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "인간 기원 유래의 Fc 부분" 은, 하위부류 IgG4 의 인간 항체의 Fc 부분 또는 하위 부류 IgG1, IgG2, 또는 IgG3 의 인간 항체의 Fc 부분인, Fc 부분을 의미하는데, 이는 이들의 돌연변이 정도 포함한다. 하기에 정의되는 바와 같은, 감소된 또는 아예 없는 Fc γ 수용체 (Fc γ R, 즉, Fc γ RIIIa) 결합 및/또는 감소된 또는 아예 없는 C1q 결합이 비개질된 Fc 부분에 대해서 검출될 수 있는 방식으로, 하위부류 IgG1, IgG2, 또는 IgG3 의 인간 항체의 Fc 부분이 개질되는 것이 바람직하다. "항체의 Fc 부분" 은 당업자에게 익히 공지되어 있는 용어이며, 항체의 파파인 절단을 바탕으로 하여 정의된다. 본 발명에 따른 항체는 Fc 부분으로서 인간 기원 유래의 Fc 부분을 포함하며, 바람직하게는 인간 불변 부위의 기타 모든 부분을 포함한다. 바람직하게는, Fc 부분은 인간 Fc 부분이고, 특히 바람직한 것은 인간 IgG4 하위부류의 Fc 부분, 또는 인간 IgG1 하위부류의 Fc 부분, 또는 인간 IgG1 하위부류 유래 돌연변이된 Fc 부분이다. 가장 바람직한 것은, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, 돌연변이 L234A 및 L235A 를 갖는 SEQ ID NO: 3, 돌연변이 S228P 를 갖는 SEQ ID NO: 4 에 나타난 중쇄 불변 부위 및 Fc 부분이다.
- <97> IgG4 가 감소된 Fc γ 수용체 (Fc γ RIIIa) 결합을 보이는 반면에, 기타 IgG 하위부류의 항체는 강한 결합을 나타낸다. 그러나, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (Fc 탄수화물 소실), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, 및 His435 는, 변경되는 경우에, 이 역시도 감소된 Fc 수용체 결합을 제공하는 잔기들이다 (Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591- 6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; EP 0 307 434). 바람직하게, 본 발명에 따른 항체는, S228, L234, L235, 및/또는 D265 에서 돌연변이를 갖는 IgG1 또는 IgG2 하위부류의, 또는 IgG4 하위부류의 Fc γ 수용체 결합에 관한 것으로, PVA236 돌연변이를 포함한다. 돌연변이 S228P, L234A, L235A, L235E, 및/또는 PVA236 (PVA236 이란, IgG1 의 아미노산 위치 233 내지 236 으로부터의 아미노산 서열 ELLG (1 자리수 문자 아미노산 코드로 나타냄) 또는 IgG4 의 EFLG 가 PVA 로 대체됨을 의미함) 가 바람직하다. IgG4 의 돌연변이 S228P 및 IgG1 의 L234A, L235A 가 특히 바람직하다.
- <98> 항체의 Fc 부분은 ADCC (항체-의존 세포-매개 세포독성) 및 CDC (보체-의존 세포독성) 에 직접 관여한다. 보체 활성화 (CDC) 는 보체 인자 C1q 의 대부분의 IgG 항체 하위부류의 Fc 부분과의 결합에 의해 개시된다. C1q 의 항체와의 결합은 소위 결합 부위라는 곳에서 한정된 단백질-단백질 상호작용에 의해 야기된다. 이러한 Fc 부분 결합 부위는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R. 및 Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161- 12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; 및 EP 0 307 434] 에 기술되어 있다. 이러한 Fc 부분 결합 부위는 예를 들어 아미노산 L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331, 및 P329 (Kabat 의 EU 지침에 따라 넘버링) 으로 특징지어진다. 하위 부류 IgG1, IgG2, 및 IgG3 의 항체는 통상적으로 C1q 및 C3 결합을 포함하는 보체 활성화를 나타내는 반면에, IgG4 는 보체계를 활성화하지 않으며, C1q 및 C3 을 결합하지 않는다.
- <99> 즉, ADCC 및/또는 CDC 가 요구되는 경우에는, IgG1 하위부류의 Fc 부분이 바람직하고, 감소되거나 또는 아예 없는 ADCC 및/또는 CDC 가 요구되는 경우에는, IgG4 하위부류의 Fc 부분, 또는 개질/돌연변이된 IgG1 하위부류가 바람직하다. 본 발명은 한 측면에 있어서 CCR5 에 결합하는 항체에 관한 것으로, Fc γ 수용체 및/또는 보체

인자 C1q 과의 결합이 감소한 것을 나타내거나 결합하지 않는다. Fc 수용체 및/또는 보체 인자 C1q 에 결합하지 않는 항-CCR5 항체는 항체-의존 세포성 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존 세포독성 (CDC) 를 유도해내지 않는 반면에, Fc 수용체 및/또는 보체 인자 C1q 과의 감소된 결합을 나타내는 항-CCR5 항체는 ADCC 및/또는 CDC 가 감소되었음을 보인다. 바람직하게는, 이러한 항체는, 이것이 CCR5 과 결합하고, 인간 기원 유래의 Fc 부분을 함유하며, Fc 수용체 및/또는 보체 인자 C1q 의 감소된 결합을 나타내거나 결합하지 않는 것을 특징으로 한다. 더욱 바람직하게는, 상기 항체는 인간 또는 인간화 항체, 또는 T-세포 항원 제거 항체이다. C1q 결합은 [Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184] 에 따라 측정가능하다. 상기 어레이에서 492-405 nm 에서의 광학 밀도 (OD) 가 8 µg/ml 의 항체 농도로 할 때, 비개질된 야생형 항체 Fc 부분이 인간 C1q 에 결합하는 값보다 시험 항체에서 15% 더 낮은 경우, 어떠한 "C1q 결합" 도 발견되지 않는다. 감소된 "C1q 결합" 이란, 동일한 조건으로 하는 경우 비개질된 야생형 항체 Fc 부분의 인간 C1q 에 결합하는 값의 15% 내지 30% 의 범위인 것이다. ADCC 는 인간 NK 세포 상 인간 FcγRIIIa 에 대한 항체의 결합으로써 측정 가능하다. 상기 결합은 20 µg/ml 의 항체 농도에서 결정된다. "Fcγ 수용체 결합 없음" 또는 "ADCC 없음" 이란, 항체 농도 20 µg/ml 에서 인간 NK 세포 상 인간 FcγRIIIa 에의 결합이 인간 IgG1 과 동일한 항체 (SEQ ID NO: 3) 의 결합과 비교했을 때, 30% 이하인 것을 의미한다. "감소된 Fcγ 수용체 결합" 또는 "감소된 ADCC" 란, 인간 NK 세포 상 인간 FcγRIIIa 에 대한 결합이 인간 IgG1 과 동일한 항체 (SEQ ID NO: 3) 의 결합과 비교했을 때, 30% 내지 60% 인 것을 의미한다.

<100>

본 발명의 또 다른 측면은, CCR5 에 결합하는 항체 및 나아가 Fcγ 수용체 및/또는 보체 인자 C1q 에 결합하는 항체에 관한 것이다. Fc 수용체 및/또는 보체 인자 C1q 를 결합하는 항-CCR5 항체는 항체-의존 세포성 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체 의존 세포독성 (CDC) 를 도출해낸다. 바람직하게는, 상기 항체는, 이것이 CCR5 를 결합하고, 인간 기원 유래의 Fc 부분을 함유하며, 또한 Fc 수용체 및/또는 보체 인자 C1q 도 결합하는 것을 특징으로 한다. 더욱 바람직하게는, 상기 항체는 인간 또는 인간화 항체 또는 T-세포 항원 제거 항체이다. C1q 결합은 문헌 [Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184] 에 따라 측정가능하다. ADCC 는 인간 NK 세포 상 인간 FcγRIIIa 에 대한 항체의 결합으로서 측정가능하다. 상기 결합은 20 µg/ml 의 항체 농도에서 결정된다.

<101>

본 발명에 따른 항체는 또한 본 발명에 따른 항체의 상-언급된 특징에 영향을 끼치거나 또는 변경시키지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열 개질인 "보존적 서열 개질" 을 갖는 항체 (변이체 항체) 를 포함한다. 상기 개질은 위치-특이적 돌연변이 유발 (site directed mutagenesis) 및 PCR-매개 돌연변이 유발과 같은 당업계 에 공지된 표준 기술로 도입가능하다. 보존적 아미노산 치환은, 상기 아미노산 잔기를 유사 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것을 포함한다. 유사 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 무전하 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘) 를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, 인간 항-CCR5 항체 내 예측된 비필수 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 또다른 아미노산 잔기로 대체할 수 있는 것이 바람직하다. 이에 따라 본원에서 "변이체" 항-CCR5 항체란, "모" 항-CCR5 항체의 아미노산 서열과, 그 모 항체의 하나 이상의 가변 영역에서, 10 개 이하, 바람직하게는 약 2 내지 약 5 개의 부가, 결손 및/또는 치환을 통해, 아미노산 서열에서 차이를 보이는 분자를 지칭한다. 아미노산 치환이란, 문헌 [Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327 및 Queen, C, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033] 에 기술된 바와 같은 분자 모델링에 기초한 돌연변이 유발로 수행될 수 있다.

<102>

본 발명의 추가 구현에는, Fcγ 수용체 및/또는 C1q 에 결합하지 않거나 또는 감소된 결합을 나타내는, CCR5 에 대한 항체의 제조 방법인데, 이는 CCR5 에 결합하는 인간 IgG1 형 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 서열을, 상기 개질된 항체가 C1q 및/또는 Fcγ 수용체에 결합하지 않거나 또는 감소된 결합을 나타내는 방식으로 개질시키고, 상기 개질된 핵산 및 상기 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산을 발현 벡터에 삽입시킨 후, 상기 벡터를 진행 숙주 세포에 삽입하여, 코딩된 단백질이 발현된 숙주 세포 또는 그 상청액에서 회수하는 것을 특징으로 하는 방법이다. 바람직하게는, 항체는 "부류 전환", 즉, Fc 부분의 변경 또는 돌연변이 (예를 들어, IgG1 에서 IgG4 로, 및/또는 IgG1/IgG4 돌연변이), 바람직하게는 IgG1v1 (PVA-236; GLPSS331), IgG1v2 (L234A; L235A), IgG1v3 (S228P; L235E), IgG1x (S228P), IgG4v1 (PVA- 236) 로서 정의되는 Fc 부분의 변경 또는 돌연변이에 의해 개질된다. GLPSS331 이란, 돌연변이 E233P, L234V, L235A, 델타 G236, A327G, A330S, P331S 를 의미한다.

- <103> 서열에 대한 동질성 또는 상동성이란, 본원에서는, 최대% 의 서열 동질성을 획득하기 위해, 필요하다면, 서열을 배열하고 간극을 도입한 후, 모 서열과 동일한 후보 서열 내 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 항체 서열로의 N-말단, C-말단 또는 내부 확대, 결손 또는 삽입 중 어떤 것도 서열 동질성 또는 상동성에 영향을 미치는 것으로 해석되어서는 안된다. 변이체는 인간 CCR5 에 결합하는 능력을 보유하며, 바람직하게는, 모 항체의 것보다 우수한 특성을 가진다. 예를 들어, 변이체는 처리 동안 부작용이 감소될 수 있다.
- <104> 본원에서 "모" 항체란, 변이체 제조에 사용되는 아미노산 서열로 코딩된 것이다. 바람직하게는, 모 항체는 인간 골격부를 가지며, 존재한다면, 인간 항체 불변 부위 또는 인간 항체 불변 도메인을 가진다. 예를 들어, 모 항체는 인간화 또는 인간 항체일 수 있다.
- <105> 본 발명에 따른 항체는 재조합 수단으로 제조되는 것이 바람직하다. 이러한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 이는 원핵 또는 진핵 세포내에서 단백질을 발현시키고 후속하여 항체 폴리펩타이드를 단리하고 통상의 약학적으로 허용가능한 순도로 정제하는 것을 포함한다. 상기 단백질 발현을 위해서는, 경쇄 및 중쇄 또는 이의 분절을 코딩하는 핵산을 표준 방법으로 발현 벡터에 삽입한다. 발현은, CHO 세포, BHK 세포, PER.C6® 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, 효모, 또는 E. coli 세포와 같은 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 수행되며, 항체는 상기 세포 (상청액 또는 세포 분해 후) 에서 회수된다.
- <106> 항체의 재조합체 제조는 당업계에 익히 공지되어 있으며, 예를 들어, [Makrides, S. C, Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160; Werner, R.G., Arzneimittelforschung-Drug Res. 48 (1998) 870-880] 의 종설에 기술되어 있다.
- <107> 항체는 전 세포, 세포 용균물, 또는 부분적으로 정제되거나 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 정제는 기타 세포 성분 또는 기타 오염물, 예를 들어 기타 세포성 핵산 또는 단백질을 제거하기 위해, 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동, 및 기타 당업계에 익히 공지된 것을 포함하는 표준 기법을 통해 수행된다. 문헌 [Ausubel, F., et al., (ed.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing 및 Wiley Interscience, New York (1987)] 을 참조한다.
- <108> NSO 세포 내 발현은 예를 들어 문헌 [Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270] 에 기술되어 있다. 일과성 발현은 예를 들어, 문헌 [Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9] 에 기술되어 있다. 가변 도메인의 클로닝은 문헌 [Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87] 에 기술되어 있다. 바람직한 일과성 발현 시스템 (HEK 293) 은 문헌 [Schlaeger, E.-J. 및 Christensen, K., Cytotechnology 30 (1999) 71-83] 및 [Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199] 에 기술되어 있다.
- <109> 단일클론성 항체는 예를 들어, 단백질 A-세파로오스, 수산화인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화 크로마토그래피와 같은 통상의 면역글로불린 정제 절차를 통해 배양 배지에서 적절하게 분리한다. 단일클론성 항체를 코딩하는 DNA 및 RNA 는 통상의 절차를 이용하여 용이하게 단리 및 서열화한다. 하이브리도마 세포가 이러한 DNA 및 RNA 의 공급원으로서 역할을 할 수 있다. 일단 단리된다면, DNA 를 발현 벡터에 삽입할 수 있고, 그 다음, 면역글로불린 단백질을 달리 생성하지 않는 HEK 293 세포, CHO 세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포에 상기를 트랜스펙션할 수 있어, 숙주 세포 내 재조합 단일클론성 항체를 합성할 수 있다.
- <110> 인간 CCR5 항체의 아미노산 서열 변이체는, DNA 를 코딩하는 항체로 적절히 변경한 뉴클레오티드를 도입하거나, 또는 펩타이드 합성으로 제조된다. 그러나, 그러한 개질은 예컨대 상술한 바와 같이 매우 제한된 범위 내에서 서만 수행가능하다. 예를 들어, 개질은 IgG 아이소타입 및 에피토프 결합과 같은 상술한 항체의 특성을 바꾸지 않으나, 재조합체 생산율, 단백질 안정성을 개선할 수 있거나 또는 정제를 용이하게 할 수 있다.
- <111> 항-CCR5 항체의 적절한 입체형태를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스템인 잔기는 또한 일반적으로 세린으로 치환되어 분자의 산화 안정성을 개선할 수 있고, 비정상적 가교결합을 방지할 수 있다. 반대로, 시스템인 결합(들) 이 항체에 부가되어 이의 안정성을 개선할 수 있다 (특히 항체가 Fv 분절과 같은 항체 분절인 경우).
- <112> 또 다른 유형의 항체의 아미노산 변이체는 그 항체의 본래 글리코실화 패턴을 변경한다. "변경" 함으로써의 의미란, 항체 내에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 부분을 제거함 및/또는 항체 내에 존재하지 않는 하나 이

상의 글리코실화 부위를 부가함이다. 항체의 글리코실화는 통상 N-연결된다. 용어 "N-연결된" 이란, 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 부분이 부착함을 의미한다. 트리펩타이드 서열인 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X 는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임) 은 아스파라긴 측쇄에 대한 탄수화물 부분의 효소적 부착의 인지 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드 내 이들 트리펩타이드 서열들 중 어느 하나의 존재가 잠재적인 글리코실화 부위를 형성한다. 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 하나 이상의 상술한 트리펩타이드 서열 (N-연결된 글리코실화 부위) 을 포함하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 알맞게 달성된다.

<113> 항-CCR5 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법들로 제조된다. 이들 방법에는, 이에 제한되는 것은 아니나, (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 천연원으로부터의 단리, 또는 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 위치-특이적) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발, 및 미리 제조된 변이체 또는 인간화 항-CCR5 항체의 비변이체 버전의 카세트 돌연변이 유발에 의한 제조가 포함된다.

<114> 다른 유형의 공유결합 개질에는, 항체와의 화학적 또는 효소적 커플링 글리코사이드가 포함된다. 이러한 절차는 이들이 N- 또는 O-연결된 글리코실화가 가능한 숙주 세포 내에서 항체의 생성을 요구하지 않는다는 점에서 유리하다. 사용되는 커플링 방식에 따라, 당(들) 이 (a) 아르기닌 및/또는 히스티딘, (b) 자유 카르복실기, (c) 자유 술폰히드릴기, 예컨대 시스테인의 것, (d) 자유 히드록실기, 예컨대 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린의 것, (e) 방향족 잔기, 예컨대 페닐알라닌, 티로신, 또는 트립토판의 것, 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착될 수 있다. 이러한 방법은 WO 87/05330, 및 문헌 [Aplin, J.D. 및 Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. 10 (1981) 259-306] 에 기술되어 있다.

<115> 항체에 존재하는 임의의 탄수화물 부분의 제거는 화학적으로 또는 효소에 의해 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는, 항체의 화합물 트리플루오로 메탄술폰산 또는 이와 동등한 화합물로의 노출을 요구한다. 이러한 처리로 인해, 항체를 온전히 남기면서, 연결 당 (N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸 갈락토사민) 을 제외한 대부분 또는 모든 당이 절단된다. 화학적 탈글리코실화는, 문헌 [Sojar, H.T. 및 Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57; Edge, A.S., et al. Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137] 에 기술되어 있다. 항체 상의 탄수화물 부분의 효소에 의한 절단은, 문헌 [Thotakura, N.R. 및 Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359] 에 기술된 바와 같은 다양한 엔도- 및 엑소글리코시다아제를 사용함으로써 달성될 수 있다.

<116> 항체의 또 다른 유형의 공유결합 개질은, US 특허 제 4,640,835 호; 제 4,496,689 호; 제 4,301,144 호; 제 4,670,417 호; 제 4,791,192 호; 제 4,179,337 호에 기술된 방식으로 다양한 비(非)단백질계 중합체 중 하나, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌에 항체를 연결시키는 것을 포함한다.

<117> 본 발명에 따른 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 프로모터, 번역 개시부, 불변 부위, 3' 미번역부, 폴리아데닐화 및 전사 종료의 서열과 조합되어 발현 벡터 구축물을 형성한다. 중쇄 및 경쇄 발현 구축물은 단일 벡터로 조합, 숙주 세포로 공동-트랜스펙션, 연속 트랜스펙션 또는 부분 트랜스펙션된 다음, 융합되어, 상기 양 쇄를 발현하는 단일 숙주 세포를 형성할 수 있다.

<118> 본 발명은, 바람직하게는 본 발명에 따른 항체 및 인간 혈장 샘플의 가용성 CCR5 간의 결합을 결정하는 면역 어세이 (Tsimanis, T., Immunology Letters 96 (2005) 55-61) 에 의한, 시험관 내 (in vitro) AIDS 취약성의 진단을 위한, 본 발명에 따른 항체의 용도를 추가로 포함한다. CCR5 의 발현은 질병 진행과 연관이 있어, 이는 AIDS 취약성에 대한 고위험 인 또는 저 위험인을 동정하는데 사용될 수 있다. 진단 목적으로, 항체 또는 항원 결합 분절을 라벨링하거나 또는 라벨링하지 않을 수 있다. 전형적으로는, 진단용 어세이에는 항체 또는 항체 분절의 CCR5 에 대한 결합에서 발생하는 착물 형성의 검출이 포함된다.

<119> 또 다른 측면에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어 본 발명의 단일클론 항체, 또는 그의 항원-결합 부분 중 하나 또는 조합물을 함유하고 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제형되는 약학적 조성물을 제공한다.

<120> 본원에서 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용가능한 담체" 에는, 생리학적으로 상용성인 임의의 그리고 모든 용매, 분산액 배지, 코팅제, 항박테리아제 및 항균제, 등장성 및 흡수/재흡수 지연제 등이 포함된다. 바람직하게는, 담체는 주사 또는 주입에 적합하다.

<121> 본 발명에 따른 조성물은 당업계에 공지된 각종 방법으로 투여될 수 있다. 당업자가 잘 알다시피, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 다양할 것이다.

- <122> 약학적으로 허용가능한 담체에는 멸균 주사용액 또는 분산액의 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말이 포함된다. 약학적 활성 물질을 위한 상기 매질 및 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 담체는 물 뿐 아니라, 예를 들어, 등장 완충 식염수일 수 있다.
- <123> 선택되는 투여 경로와 관계없이, 적절한 수화 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물, 및/또는 본 발명의 약학적 조성물은 당업자에게 공지된 통상의 방법으로 약학적으로 허용가능한 투여 형태로 제형화된다.
- <124> 본 발명의 약학적 조성물 내 활성 성분의 실제 투여량 수준은, 환자에게 독성을 나타내지 않게 하면서, 특정한 환자, 조성물 및 투여 방식에 대해서 원하는 치료적 반응을 얻게 하는데 유효한 활성 성분의 양 (유효량) 을 수득하도록 다양할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 활용되는 본 발명의 특정 조성물, 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성도, 투여 경로, 투여 시간, 활용되는 특정 화합물의 배출률, 활용되는 특정 조성물과 조합되어 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 나이, 성별, 체중, 병태, 일반 건강 상태, 이전의 병력, 의학 분야에 익히 공지된 유사한 인자들을 포함하는 각종 약물동력학적 인자에 좌우될 것이다.
- <125> 본 발명은 면역억제를 앓고 있는 환자, 예컨대 AIDS 와 같은 면역결핍증후군을 앓고 있는 환자, 면역억제를 야기하는, 방사선 치료, 화학요법, 자가면역 질환용 요법 또는 기타 약물 요법 (예를 들어, 코르티코스테로이드 요법) 을 하고 있는 환자, 또는 GvHD 또는 HvGD (예를 들어, 이식 후) 를 앓고 있는 환자의 치료를 위한, 본 발명에 따른 항체의 용도를 포함한다. 본 발명은 또한 이러한 면역억제를 앓고 있는 환자의 치료 방법을 포함한다.
- <126> 본 발명은 추가로 유효량의 본 발명에 따른 항체를 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약학적 조성물의 제조 방법, 및 상기 방법을 위한 본 발명에 따른 항체의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 약제로서 사용되기 위한 본 발명에 따른 항체를 제공한다. 또한, 면역억제 질환 치료를 위한 본 발명에 따른 항체도 제공한다.
- <127> 본 발명은 추가로 면역억제를 앓고 있는 환자 치료용의, 약학적 제제, 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께하는 약학적 제제의 제조를 위해, 유효량의 본 발명에 따른 화합물의 용도를 제공한다.
- <128> 본 발명은 또한 CCR5 로 매개되는 염증 매개체 방출을 앓고 있는 환자의 치료용, 약학적 제제, 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께하는 약학적 제제의 제조를 위한, 유효량의 본 발명에 따른 항체의 용도도 제공한다.
- <129> 하기 실시예 및 서열 목록은 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공된 것으로, 이의 진정한 범위는 첨부된 청구항에 기재되어 있다. 본 발명의 취지를 벗어나지 않고, 기재된 절차를 변형할 수 있음은 자명하다.

<130> 서열의 설명

- <131> SEQ ID NO: 1 식 I, 중쇄, 가변 도메인
- <132> SEQ ID NO: 2 식 II, 경쇄, 가변 도메인
- <133> SEQ ID NO: 3 γ 1 중쇄 불변 부위
- <134> SEQ ID NO: 4 γ 4 중쇄 불변 부위
- <135> SEQ ID NO: 5 κ 경쇄 불변 부위
- <136> SEQ ID NO: 6 중쇄 가변 도메인
- <137> SEQ ID NO: 7 중쇄 가변 도메인
- <138> SEQ ID NO: 8 중쇄 가변 도메인
- <139> SEQ ID NO: 9 경쇄 가변 도메인
- <140> SEQ ID NO: 10 경쇄 가변 도메인

실시예

<141> 실시예 1

<142> 항체의 제조합체 생산

<143> 본 발명에 따른 항체의 발현용 벡터를 하기와 같이 구축하였다. 중쇄 발현 벡터를, 중쇄 가변 도메인을 발현 벡터 pSVgpt 내 인간 IgG1 (SEQ ID NO: 3) 불변 부위에 연결함으로써 구축하였다. 경쇄 발현 벡터를, 발현 벡터 pSVhyg 내 인간 Kappa 경쇄 불변 부위 (SEQ ID NO: 5) 에 경쇄 가변 도메인을 연결함으로써 구축하였다. 리더 시그널 펩타이드, 리더 인트론 및 마우스의 면역글로불린 프로모터를 포함하는, 5' 인접 서열 (flanking sequence), 및 스플라이스 부위 및 인트론 서열을 포함하는 3' 인접 서열을, 주형으로서 벡터인 VH-PCR1 및 VK-PCR1 을 이용해 도입했다. 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 NSO 세포 (ECACC No 85110503, 마우스 골수종을 생산하는 비-면역글로불린) 에 공동-트랜스펙션하였다. 트랜스펙션된 세포 클론을, 인간 IgG 에 대한 ELISA 를 통해 인간 항체의 제조를 위해 스크리닝하였다.

<144> **실시예 2**

<145> **돌연변이 (변이체) 항-CCR5 항체에 대한 발현 플라스미드의 구축**

<146> 돌연변이 항-CCR5 항체 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 발현 플라스미드를, QuickChange™ Site-Directed mutagenesis Kit (Stratagene) 를 이용하여, 발현 플라스미드의 위치-특이적 돌연변이 유발로써 제조하였고, 이를 표 1 에 기술한다. 아미노산을 EU 넘버링에 따라 넘버링하였다 (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD, Publication No. 91-3242 (1991)).

<147> 표 1 은 불변 쇄 (Fc) 의 돌연변이를 나타낸다.

표 1

아이소타입	약어	돌연변이	기술
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A	인간 $\gamma 1$ -중쇄의 아미노산 서열 Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ 는 아미노산 서열 Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅ 로 치환된다.

<149> 돌연변이의 설명: L234A 이란, Kabat 아미노산 위치 234 에서 류신이 알라닌으로 변경된 것을 의미한다.

<150> **실시예 3**

<151> **세포-세포 융합 어세이**

<152> 제 1 일에, gp160-발현 HeLa 세포 (2×10^4 세포 / 50 μ l / 웰) 을, 10 % (v/v) FCS 및 2 μ g/ml 독시사이클린 으로 보충된 DMEM 배지 내에서 백색 96 마이크로타이터 플레이트에서 시딩하였다. 제 2 일에, 웰 당 상청액 샘플 또는 항체 대조군 100 μ l 를 투명한 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 첨가하였다. 이어서, 배지에 8×10^4 CEM-NKr-Luc 현탁액 세포를 함유하는 100 μ l 를 첨가하고, 37°C 에서 30 분 동안 인큐베이션시켰다. HeLa 세포 배양 배지를 96 웰 플레이트로부터 흡인하고, 200 μ l 항체/CEM-NKr-Luc 혼합물 중 100 μ l 를 첨가하고, 37°C 에서 하룻밤 인큐베이션시켰다. 제 3 일에, 100 μ l/웰 Bright-Glo™ 루시페라아제 어세이 기질 (1,4-디티오프레이틀 및 나트륨 디티오나이트 ; Promega Corp., USA) 을 첨가하고, 실온에서 최소 15 분 인큐베이션시킨 후 발광을 측정하였다.

<153> **재료 :**

<154> HeLa-R5-16 세포 (독시사이클린 유도 시 HIV gp160 을 발현하기 위한 세포주) 를, 400 μ g/ml G418 및 200 μ g/ml 하이그로마이신 B 가 있는 10% (v/v) FCS 및 영양분을 함유하는 DMEM 배지에서 배양하였다.

<155> CEM.NKR-CCR5-Luc (카탈로그 번호 : 5198) 은 NIH AIDS Research & Reference Reagent Program McKesson BioServices Corporation Germantown, MD 20874, USA 에서 구입가능한 T-세포주이다. 세포 유형 : CEM.NKR-CCR5 (Cat. #4376) 를 트랜스펙션시켜 (전기천공법), HIV-2 LTR 의 전사 조건 하에 루시페라아제 유전자를 발현시키고, 10% 송아지 태아 혈청, 4 mM 글루타민, 페니실린/스트렙토마이신, 및 0.8 mg/ml 제네타신 숄페이트 (G418) 가 든 RPMI 1640 에서 증식시켰다. 성장 특징 : 둥근 림프구 세포, 모양이 매우 다양하지는 않다. 세포는 단일 세포로서 현탁액 내에서 성장하고, 소형의 덩어리를 형성할 수 있다. 매주 2 회 1 : 10 으로 분열 (split) 한다. 특별한 특징 : HIV-2 LTR 의 상호활성화 후에 루시페라아제 활성을 발현한다. 중성화 및 약물-민감도 어세이를 위해 1 차 HIV 단리체로 감염시키기에 적합하다 (Spennlehauser, C, et al., Virology 280 (2001) 292-300; Trkola, A., et al., J. Virol. 73 (1999) 8966- 8974). 세포주를 [NIH

AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIH from Drs. John Moore 및 Catherine Spenlehauer]를 통해 수득하였다.

Bright-Glo™ 루시페라아제 어세이 완충액 (Promega Corp. USA, Part No E2264B),

Bright-Glo™, 루시페라아제 어세이 기질 (Promega Corp. USA, part No EE26B).

결과:

결과를 표 2 에 나타낸다. IC₅₀ 값은 46 내지 399 ng/ml 이다. 항체의 불변 부위는 돌연변이된 IgG1 (IgG1v2) 이다.

표 2

중쇄 가변 도메인	경쇄 가변 도메인	IC ₅₀ [ng/ml]
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 9	108
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 10	399
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	46
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	152
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	132
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 10	76

실시예 4

생 바이러스를 이용한 항바이러스 어세이

PBMC 를 Lymphoprep™ (Nycomed Pharma AG, Oslo, Norway) 를 이용하여 밀도-구배 원심분리로 분리된 백혈구원 층으로부터 제조했다. 4 개의 상이한 공여체 유래의 세포들을 혼합하고, 1 일 동안 PHA 와 함께 자극시킨 다음, 1 % (w/v) 페니실린/스트렙토마이신, 1 % GlutaMAX™ (Invitrogen Corp., USA, Cat. No. 35050-038), 1 % 나트륨 피루베이트, 1 % (w/v) 비필수 아미노산 및 10 % FBS 를 함유하는 RPMI 배지에서 2 일 동안, 5 U/ml IL-2 (인터루킨-2) 의 존재하에서 배양했다.

50 µl 중 100,000 개의 PBMC (말초 혈액 단핵 세포) 를 100 µl 의 항체 용액 (0.006-17.5 µg/ml 범위의 계단 희석, 보충된 RPMI 배지 내, 및 250 TCID₅₀ (50% 조직 배양 감염량) 의 NLBaL (BaL (gp120) 의 env 를 갖는 NL4.3 균주 (Adachi, A., et al., J. Virol. 59 (1986) 284- 291)) 또는 대안적으로 JRCSF (O'Brien, W.A., et al., Nature 348 (1990) 69-73) 를 50 µl 부피로 해 감염시킴) 에 첨가했다. 혼합물을 CO₂ 인큐베이터 내에서 6 일 동안 37 °C 에서 인큐베이션했다. 상청액을 수집한 후 5 U/ml IL-2 가 보충된 RPMI 배지를 이용해 1 : 50 희석했다.

HIV-1 p24 ELISA (Perkin-Elmer, USA) 으로 p24 의 측정을 수행했다. 다음에, 샘플을 중화시키고 HIV-1 p24 에 고특이성인 마우스 단일클론성 항체로 코팅된 마이크로플레이트 웰에 옮겼다. 고정된 단일클론성 항체가 HIV-1 p24 를 포획한다. 세포 배양 샘플은 분쇄를 요하지 않아, 직접 단일클론성 항체가 코팅된 마이크로플레이트 웰에 첨가했다. 포획된 항원을, HIV-1 p24 에 대한 바이오티닐화 다클론성 항체에 이어, Streptavidin-HRP (양고추냉이 과산화효소) 콘주게이트와 복합체를 형성시킨다. 생성된 복합체를, HIV-1 p24 의 포획량과 직접적으로 비례하여 황색을 나타내는 오르토-페닐렌디아민-HCl (OPD) 과 인큐베이션함으로써 검출했다. 각 마이크로플레이트 웰의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기를 이용해 측정하고, HIV-1 p24 항체 표준의 흡광도 또는 표준 커브에 대해 보정 (calibration) 했다.

결과:

인간 PBMC 내 HIV 성장 억제에 대해서, 중쇄 (SEQ ID NO: 6, 7, 8) 및 경쇄 (SEQ ID NO: 9, 10) 의 가변 도메인 및 IgG1 아이소타입의 상이한 조합물을 포함하는 항-CCR5 항체에 대한 2.27 ng/ml 내지 14.21 ng/ml 범위에서의 IC₅₀ 값을 측정했다. 이들 조합물에서는, IC₉₀ 값은 9.77 ng/ml 내지 74.06 ng/ml 의 범위이다.

돌연변이된 IgG1 불변 부위 (IgG1v2) 를 포함하는 항-CCR5 항체에 있어서, 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인의 상이한 조합물의 IC₅₀ 값은 8.22 ng/ml 내지 43.11 ng/ml 범위로 측정된 반면에, IC₉₀ 값은 51.95 ng/ml 내지

311.38 ng/ml 의 범위로 측정되었다.

<169> 실시예 5

<170> CCR5 세포 ELISA

<171> 재조합적으로 CCR5 를 발현하는 20,000 개의 CHO 세포를 96 웰 플레이트 당 시딩하고, 37℃ 에서 하룻밤 인큐베이션했다. 그 이후, 배지를 흡인시키고, 40 μ l 신선한 배지를 첨가했다. 배지 중 희석된 제 1 의 항체 10 μ l 를 첨가하고, 2 시간 동안 4℃ 에서 인큐베이션했다. 배지를 흡인하고, 100 μ l 글루타르디알데히드 (glutardialdehyde; c = 인산염 완충 식염수 (PBS) 중 0.05 %) 를 첨가하고, 10 분 동안 실온에서 인큐베이션했다. 3 회 200 μ l PBS 로 세정한 후, 50 μ l 검출 항체 (ELISA 블로킹 버퍼 중 1:1,000 내지 1:2,000 희석) 를 첨가하고, 2 시간 실온에서 인큐베이션했다. 50 μ l 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) 을 첨가하고, 반응을 7 분 후에 멈췄다. 광학 밀도를 450 nm (대 620 nm) 에서 측정했다.

<172> 제 1 의 항체: 실험될 항체

<173> 제 2 의 (검출) 항체: 면양 항-인간-IgG-감마 특이적 퍼옥시다아제-콘주게이션된 항체 (The Binding Site, Cat. # AP004), PBS 10 % 블로킹 버퍼 중에 1:2,000 (6 μ l/12 ml) 희석됨

<174> 배지: GlutaMAX™, 10 % FCS, 200 μ g/ml 하이그로마이신 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) 가 든 GIBCO 또는 HAM's F-12

<175> ELISA-블로킹: Roche Diagnostics GmbH, Germany, #1112589, 수 중 10 % (v/v) 용액, PBS 중 1:10 희석

<176> TMB: Roche Diagnostics GmbH, Germany, #1432559, 사용 용액

<177> 결과:

<178> CCR5 세포 ELISA 의 결과는, 중쇄 (SEQ ID NO:6, 7, 8) 및 경쇄 (SEQ ID NO:9, 10) 의 가변 도메인의 상이한 조합을 포함하는 항-CCR5 항체의 인간 CCR5 에 대한 결합이, 1000 ng/ml 농도에서 2.71 내지 3.13 (OD 450/620) 범위인 것을 보여준다.

<179> 실시예 6

<180> NK 세포 상 Fc γ RIIIa 에 결합하는 CCR5 MAbs 의 잠재성

<181> 자연 살상 (NK) 세포 상 Fc γ RIIIa (CD16) 에 결합하는 본 발명의 항체의 능력을 측정하기 위해, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs) 를 분리하고, 20 μ g/ml 의 항체 및 대조군 항체와, 20 μ g/ml 의 Fc γ RIIIa 에 대한 블로킹 마우스 항체 (항-CD16, 클론 3G8, RDI, Flanders, NJ) 의 존재 또는 부재하에서 인큐베이션하여, Fc γ RIIIa 를 통한 결합을 확인하였다. 네거티브 대조군으로서, Fc γ RIIIa 를 결합하지 않는 인간 IgG2 및 IgG4 (The Binding Site) 를 이용한다. 인간 IgG1 및 IgG3 (The Binding Site) 를 Fc γ RIIIa 결합에 대한 포지티브 대조군으로 포함한다. NK 세포 상 결합된 항체를, FITC-라벨링된 염소 F(ab)₂ 항-인간 IgG (Fc) 항체 (Protos Immunoresearch, Burlingame, USA) 와 조합된 PE-라벨링된 마우스 항-인간 CD56 (NK-세포 표면 마커) 항체 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) 를 이용해 FACS 분석으로 검출한다. 최대 결합 (B_{max}) 은 20 μ g/ml 의 항체 농도에서 결정한다. 대조군 항체 (인간 IgG4) 는, 인간 IgG1 에 대한 100 % B_{max} 과 비교했을 때 30% 이하의 B_{max} 를 나타낸다. 따라서, "Fc γ RIIIa 결합 없음 또는 ADCC 없음" 이란, 20 μ g/ml 의 항체 농도에서, 인간 IgG1 에 비해 B_{max} 값이 30% 이하인 것을 의미한다.

<182> 실시예 7

<183> CCR5 화학주성 어세이

<184> L1.2hCCR5 세포를 10 % 송아지 태아 혈청, 1 x 페니실린/스트렙토마이신, 1 x 글루타민, 1 x 나트륨 피루베이트, 1 x β -메르캅토에탄올, 및 250 μ g/ml G418 (모두 Invitrogen Inc., USA) 를 함유하는 RPMI 1640 에서 배양했다. 화학주성 어세이를 시작하기 바로 직전에, 세포를 스핀다운 (spin down) 하고, 0.1 % BSA 및 10 mM HEPES 함유 화학주성 버퍼 (Hank's Balanced Salt Solution HBSS (Invitrogen)) 중에서 재현탁하였다. 상기 세포를 5 x 10⁶ 세포/ml 의 최종 농도로 하여 화학주성 어세이에서 사용했다. CCR5 리간드인 인간 MIP1 α , 인간 MIP1 β 또는 인간 RANTES (R&D Systems, USA) 를 화학주성 버퍼 중에서 희석하고,

20 nM 의 최종 농도에서 사용했다. 시험 항체 또는 적절한 아이소타입 대조군 항체를 HBSS 중에서 희석했다. 화학주성 어세이를 0.5 μ m 중공 96-웰 ChemoTx® 시스템 (Neuroprobe Inc., USA) 에서 개시했다. 각각의 항체를 CCR5 리간드 중 하나와 혼합하고, 30 μ l 의 상기 혼합물을 ChemoTx® 시스템의 하부 (bottom) 웰에 놓았다. 필터 스크린을 하부 웰 상부에 놓았다. 각 항체를 L1.2hCCR5 세포와 함께 혼합하고, 20 μ l 의 상기 혼합물을 필터 상에 놓았다. 그 다음 플레이트를 습기가 찬 챔버 내에 놓고, 37°C 및 5% CO₂ 에서 3 시간 동안 인큐베이션했다. 인큐베이션 후, 세포를 필터에서 긁어내고 플레이트를 2,000 rpm 에서 10 분 동안 탁상형 원심분리기에서 돌렸다. 그 다음 필터를 제거하고, 하부 웰로 이동한 세포의 밀도를 CyQUANT® Cell 정제 어세이 키트 (Invitrogen) 및 Spectra MAX GeminiXS 플레이트 판독기 (Molecular Devices, Wokingham, UK) 를 이용해 제조 지침에 따라 검출했다. IC₅₀ 값을 Prism 4 (GraphPad Inc., USA) 을 이용해 산출했다.

<185> IgG1 아이소타입 불변 부위와 함께 가진 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 상이한 조합에 대한 인간 MIP-1 α , 인간 MIP-1 β , 및 인간 RANTES 의 IC₅₀ 값은 각각 0.80 nM 내지 0.91 nM, 0.72 nM 내지 1.08 nM, 및 0.85 nM 내지 2.69 nM 이다.

<186> 돌연변이된 IgG1 아이소타입 (IgG1v2) 의 경우, 인간 MIP-1 α , 인간 MIP-1 β , 및 인간 RANTES 의 IC₅₀ 값은 각각 2.21 nM 내지 6.28 nM, 2.16 nM 내지 6.87 nM, 및 3.59 nM 내지 5.03 nM 이다.

서 열 목 록

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
<120> Antibodies against CCR5 and uses thereof

<130> 23961 WO

<150> EP 06020646.3
<151> 2006-09-29

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 117
<212> PRT
<213> mouse

<220>
<221> SITE
<222> (5)
<223> Xaa is X01 is Lys or Gln

<220>
<221> SITE
<222> (6)
<223> Xaa is X02 is Gln or Glu

<220>
 <221> SITE
 <222> (13)
 <223> Xaa is X03 is Arg or Lys

<220>
 <221> SITE
 <222> (45)
 <223> Xaa is X04 is Leu or Pro

<220>
 <221> SITE
 <222> (64)
 <223> Xaa is X05 is Met or Lys

<220>
 <221> SITE
 <222> (92)
 <223> Xaa is X06 is Ile or Thr

<220>
 <221> SITE
 <222> (112)
 <223> Xaa is X07 is Ser or Thr

<220>
 <221> SITE
 <222> (114)
 <223> Xaa is X08 is Ile or Thr

<400> 1
 Gln Val Gln Leu Xaa Xaa Ser Gly Pro Gly Leu Val Xaa Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Ala Phe
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Xaa Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Xaa
50 55 60

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

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Xaa
100 105 110

Val Xaa Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> mouse

<220>
<221> SITE
<222> (29)
<223> Xaa is X10 is Ile or Ala

<220>
<221> SITE
<222> (36)
<223> Xaa is X11 is Phe or Tyr

<220>
<221> SITE
<222> (40)
<223> Xaa is X12 is Gln or Pro

<220>
<221> SITE
<222> (43)
<223> Xaa is X13 is Ser or Ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (45)
 <223> Xaa is X14 is Gln or Lys

<220>
 <221> SITE
 <222> (48)
 <223> Xaa is X15 is Val or Ile

<220>
 <221> SITE
 <222> (70)
 <223> Xaa is X16 is Gln or Asp

<220>
 <221> SITE
 <222> (72)
 <223> Xaa is X17 is Ser or Thr

<220>
 <221> SITE
 <222> (73)
 <223> Xaa is X18 is Leu or Ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (74)
 <223> Xaa is X19 is Lys or Thr

<220>
 <221> SITE
 <222> (76)
 <223> Xaa is X20 is Asn or Ser

<220>
 <221> SITE
 <222> (78)
 <223> Xaa is X21 is Leu or Ala

<220>

<221> SITE
 <222> (84)
 <223> Xaa is X22 is Gly or Ala

<220>
 <221> SITE
 <222> (85)
 <223> Xaa is X23 is Asn or Thr

<220>
 <221> SITE
 <222> (104)
 <223> Xaa is X24 is Leu or Val

<400> 2
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Xaa His Gly Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Xaa Gln Gln Lys Xaa Gly Lys Xaa Pro Xaa Leu Leu Xaa
 35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ser Xaa Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Xaa Xaa Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Leu Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Xaa Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 4
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 6
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> heavy chain variable domain

<400> 6
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Ala Phe

20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Lys
50 55 60

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

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> heavy chain variable domain

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Ala Phe
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Lys
50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

 85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210>	8
<211>	117
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence

<220>
<223> heavy chain variable domain

<400> 8
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Gly Ala Phe
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Lys Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Lys
50 55 60

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

Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Val Asn Leu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> light chain variable domain

<400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ala His Gly Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Ala Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Leu Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> light chain variable domain

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ala His Gly Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Ala Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Asp Leu Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105