

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0141760

(43) 공개일자 2024년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 47/68 (2017.01)

A61P 29/00 (2023.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/283 (2013.01)

A61K 47/68 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2024-7026506

(22) 출원일자(국제) 2023년02월09일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년08월07일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/004346

(87) 국제공개번호 WO 2023/153471

국제공개일자 2023년08월17일

(30) 우선권주장

JP-P-2022-019051 2022년02월09일 일본(JP)

(71) 출원인

고쿠리츠 켄큐 카이하츠 호진 이야쿠 키반 켄코
에이요 켄큐쇼일본 오사카후 이바라키시 사이토아사기 7쵸메
6-8

교와 기린 가부시카가이사

일본국 도쿄도 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방 2고

(72) 발명자

나가타, 사토시

일본 5670085 오사카후 이바라키시 사이토아사기
7쵸메 6방 8고 고쿠리츠 켄큐 카이하츠 호진 이야
쿠 키반 켄코 에이요 켄큐쇼 내

이세, 도모코

일본 5670085 오사카후 이바라키시 사이토아사기
7쵸메 6방 8고 고쿠리츠 켄큐 카이하츠 호진 이야
쿠 키반 켄코 에이요 켄큐쇼 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장수길, 이유리, 이석재

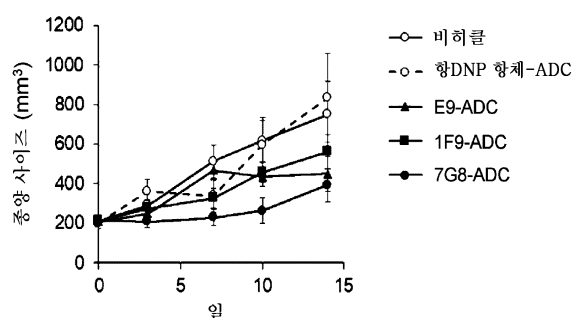
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 FCRL1에 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편

(57) 요약

본 발명은, FCRL1의 세포 외 영역에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편, 해당 항체를 생성하는 하이브리도마, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 염기 서열을 갖는 핵산, 해당 핵산을 포함하는 벡터에 의해 형질 전환된 세포, 해당 하이브리도마 또는 해당 형질 전환 세포를 사용하는 해당 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 항체 약물 복합체, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 치료약 및 진단약, 그리고 해당 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 해당 항체 혹은 해당 항체 단편을 포함하는 항체 약물 복합체를 사용한 FCRL1 관련 질환의 치료 방법 및 진단 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

G01N 33/68 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

(72) 발명자

가마다, 하루히코

일본 5670085 오사카후 이바라키시 사이토아사기
7쵸메 6방 8고 고쿠리츠 켄큐 카이하즈 호진 이야
쿠 키반 켄코 에이요 켄큐쇼 내

사토, 히데타카

일본 1000004 도쿄토 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방
2고 료와 기린 가부시키키가이샤 혼샤 내

도쿠나가, 아키히로

일본 1000004 도쿄토 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방
2고 료와 기린 가부시키키가이샤 혼샤 내

마츠바라, 마사히로

일본 1000004 도쿄토 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방
2고 료와 기린 가부시키키가이샤 혼샤 내

나미사키, 히로시

일본 1000004 도쿄토 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방
2고 료와 기린 가부시키키가이샤 혼샤 내

야마다, 다케나오

일본 1000004 도쿄토 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방
2고 료와 기린 가부시키키가이샤 혼샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

Fc 수용체-유사 단백질 1(Fc receptor-like protein 1)(이하, FCRL1이라 약기함)에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편이며, 해당 항체가 하기 (a) 내지 (g)에서 선택되는 어느 하나의 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

(a) 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region; 이하 VH라 약기함)의 상보성 결정 영역(complementarity determining region; 이하 CDR이라 약기함) 1 내지 3이, 각각 서열 번호 20 내지 22에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 경쇄 가변 영역(light chain variable region; 이하 VL이라 약기함)의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 24 내지 26에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,

(b) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 28 내지 30에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 32 내지 34에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,

(c) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 36 내지 38에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 40 내지 42에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,

(d) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 44 내지 46에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 48 내지 50에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,

(e) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 52 내지 54에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 56 내지 58에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체, 및

(f) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 60 내지 62에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 64 내지 66에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

(g) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 36 내지 38에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 40, 71 및 42에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 2

FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편이며, 해당 항체가 하기 (2b-1) 내지 (2b-4), (2c-1), (2c-2) 및 (2g-1)에서 선택되는 어느 하나의 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

(2b-1) VH가 서열 번호 72에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 68에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

(2b-2) VH가 서열 번호 73에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 74에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

(2b-3) VH가 서열 번호 72에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 74에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

(2b-4) VH가 서열 번호 73에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 68에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

(2c-1) VH가 서열 번호 75에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 76에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

(2c-2) VH가 서열 번호 77에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 76에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

(2g-1) VH가 서열 번호 77에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 78에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체의 중쇄 정상 영역이 IgG의 중쇄 정상 영역인, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체의 중쇄 정상 영역이 서열 번호 79 또는 80에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 유전자 재조합 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 6

제5항에 있어서, 유전자 재조합 항체가, 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체로 이루어지는 군에서 선택되는 하나인, 항체 또는 해당 항체 단편.

청구항 7

상기 항체 단편이 Fab, Fab', F(ab')₂, 단일쇄 항체(scFv), 2량체화 V 영역(디아바디(Diabody)), 디솔피드 안정화 V 영역(dsFv) 및 CDR을 포함하는 펩티드에서 선택되는 하나인 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 항체 단편.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 항체를 산생하는, 하이브리도마.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 염기 서열을 갖는, 핵산.

청구항 10

제9항에 기재된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 11

제10항에 기재된 벡터를 숙주 세포에 도입하여 얻어지는, 형질 전환 세포.

청구항 12

제8항에 기재된 하이브리도마 또는 제11항에 기재된 형질 전환 세포를 배지 중에서 배양하고, 배양물로부터 항체 또는 항체 단편을 채취하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는, 항체 약물 복합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 항체 약물 복합체가, 링커를 통해 약제와 연결된 상기 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는, 항체 약물 복합체.

청구항 15

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체를 포함하는, 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체를 포함하는, FCRL1의 검출 또는 측정용 시약.

청구항 17

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체를 포함하는, FCRL1 관련 질환의 진단약.

청구항 18

제17항에 있어서, FCRL1 관련 질환이 암, 자기 면역 질환 또는 염증성 질환인, 진단약.

청구항 19

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체를 포함하는, FCRL1 관련 질환의 치료약.

청구항 20

제19항에 있어서, FCRL1 관련 질환이 암, 자기 면역 질환 또는 염증성 질환인, 치료약.

청구항 21

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체를 사용한, FCRL1 관련 질환의 진단 방법.

청구항 22

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체를 투여하는 것을 포함하는, FCRL1 관련 질환의 치료 방법.

청구항 23

FCRL1 관련 질환의 진단약을 제조하기 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체의 사용.

청구항 24

FCRL1 관련 질환의 치료약을 제조하기 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체의 사용.

청구항 25

FCRL1 관련 질환의 진단약으로서의 사용을 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체.

청구항 26

FCRL1 관련 질환의 치료약으로서의 사용을 위한, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 제13항 또는 제14항에 기재된 항체 약물 복합체.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은, Fc 수용체-유사 단백질 1(Fc receptor-like protein 1)의 세포 외 영역에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편, 해당 항체를 산생하는 하이브리도마, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 염기 서

[0001]

열을 갖는 핵산, 해당 핵산을 포함하는 벡터를 숙주 세포에 도입하여 얻어지는 형질 전환 세포, 해당 하이브리도마 또는 해당 형질 전환 세포를 사용하는 해당 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 항체 약물 복합체, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 치료약 및 진단약, 그리고 해당 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 해당 항체 혹은 해당 항체 단편을 포함하는 항체 약물 복합체를 사용한 Fc 수용체-유사 단백질 1 관련 질환의 치료 방법 및 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] Fc 수용체-유사 단백질 1(이하, FCRL1이라 기재하는 경우도 있음)은 CD307a, FCRH1, IFGP1, IRTA5 등의 별명으로도 알려져 있는 면역 글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 막 단백질이다. 인간 FCRL1의 아미노산 서열은 2001년에 동정되었다(비특허문헌 1).
- [0003] FCRL1은 B 세포에 발현되는 I형 막관통 단백질이다. 3개의 세포 외 면역 글로불린형 도메인, 2개의 세포 내 면역 수용체 티로신 활성화 모티프 및 막관통 영역을 갖는 단백질이다(비특허문헌 1). FCRL1의 내재성 리간드는 현재까지의 결과, 동정되지 않았다.
- [0004] FCRL1은 정상 B 세포에 더하여, 만성 림프성 백혈병, 여포성 림프종, 유모세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종 등의 암 세포에 발현되어 있는 것이 보고되어 있다(비특허문헌 2, 3). 추가로 근년, FCRL1이 암의 증식에 기여하고 있는 것이 보고되어 있다(비특허문헌 4).
- [0005] FCRL1에 대한 모노클로날 항체로서 E3, E9(비특허문헌 2), 2G5, 7G8, 5A2(특허문헌 1), 1F9, 2A10(특허문헌 2), 5A3(특허문헌 3)이 알려져 있다. 또한, 항FCRL1 항체에 이뮤노톡신을 결합시키면 암 세포주에 대하여 세포상해 활성을 발휘하는 것이 알려져 있다(비특허문헌 4).

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2005/097185호
- (특허문헌 0002) 미국 특허 출원 공개 제2006/0216232호 명세서
- (특허문헌 0003) 국제 공개 제2006/037048호

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Davis RS., et al. "Identification of a family of Fc receptor homologs with preferential B cell expression" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98. 17(2001): 9772-9777.
- (비특허문헌 0002) Du X., et al. "FCRL1 on chronic lymphocytic leukemia, hairy cell leukemia, and B-cell non-Hodgkin lymphoma as a target of immunotoxins" Blood 111. 1(2008): 338-343.
- (비특허문헌 0003) Auat M., et al. "Evaluation of CD307a expression patterns during normal B-cell maturation and in B-cell malignancies by flow cytometry" Cytometry Part B: Clinical Cytometry 94. 4(2018): 588-595.
- (비특허문헌 0004) Yousefi Z., et al. "Fc Receptor-Like 1 as a Promising Target for Immunotherapeutic Interventions of B-Cell-Related Disorders" Biomarker Insights 14(2018): 1-9.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은, FCRL1의 세포 외 영역에 결합하는 신규 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편, 해당 항체를 산생하는 하이브리도마, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 염기 서열을 갖는 핵산, 해당 핵산을 포함하는 벡

터를 숙주 세포에 도입하여 얻어지는 형질 전환 세포, 해당 하이브리도마 또는 해당 형질 전환 세포를 사용하는 해당 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 항체 약물 복합체, 해당 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 치료약 및 진단약, 그리고 해당 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 해당 항체 혹은 해당 항체 단편을 포함하는 항체 약물 복합체를 사용한 FCRL1 관련 질환의 치료 방법 및 진단 방법의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은, 이하에 1 내지 26에 관한 것이다.
- [0010] 1. Fc 수용체-유사 단백질 1(Fc receptor-like protein 1)(이하, FCRL1이라 약기함)에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편이며, 해당 항체가 하기 (a) 내지 (g)에서 선택되는 어느 하나의 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0011] (a) 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region; 이하 VH라 약기함)의 상보성 결정 영역(complementarity determining region; 이하 CDR이라 약기함) 1 내지 3이, 각각 서열 번호 20 내지 22에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 경쇄 가변 영역(light chain variable region; 이하 VL이라 약기함)의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 24 내지 26에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0012] (b) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 28 내지 30에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 32 내지 34에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0013] (c) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 36 내지 38에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 40 내지 42에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0014] (d) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 44 내지 46에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 48 내지 50에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0015] (e) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 52 내지 54에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 56 내지 58에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체, 및
- [0016] (f) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 60 내지 62에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 64 내지 66에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0017] (g) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 36 내지 38에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 40, 71 및 42에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0018] 2. FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편이며, 해당 항체가 하기 (2b-1) 내지 (2b-4), (2c-1), (2c-2) 및 (2g-1)에서 선택되는 어느 하나의 항체인, 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0019] (2b-1) VH가 서열 번호 72에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 68에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0020] (2b-2) VH가 서열 번호 73에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 74에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0021] (2b-3) VH가 서열 번호 72에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 74에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0022] (2b-4) VH가 서열 번호 73에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 68에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0023] (2c-1) VH가 서열 번호 75에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 76에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0024] (2c-2) VH가 서열 번호 77에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 76에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0025] (2g-1) VH가 서열 번호 77에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 78에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.

- [0026] 3. 상기 항체의 중쇄 정상 영역이 IgG의 중쇄 정상 영역인, 상기 1 또는 2에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0027] 4. 상기 항체의 중쇄 정상 영역이 서열 번호 79 또는 80에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는, 상기 3에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0028] 5. 항체가 유전자 재조합 항체인, 상기 1 내지 4 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0029] 6. 유전자 재조합 항체가, 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체로 이루어지는 군에서 선택되는 하나인, 상기 5에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편.
- [0030] 7. 상기 항체 단편이 Fab, Fab', F(ab')₂, 단일쇄 항체(scFv), 2량체화 V 영역(디아바디(Diabody)), 디술피드 안정화 V 영역(dsFv) 및 CDR을 포함하는 펩티드에서 선택되는 하나인, 상기 1 내지 6 중 어느 하나에 기재된 항체 단편.
- [0031] 8. 상기 1 내지 6 중 어느 하나에 기재된 항체를 산생하는 하이브리도마.
- [0032] 9. 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 염기 서열을 갖는 핵산.
- [0033] 10. 상기 9에 기재된 핵산을 포함하는 벡터.
- [0034] 11. 상기 10에 기재된 벡터를 숙주 세포에 도입하여 얻어지는 형질 전환 세포.
- [0035] 12. 상기 8에 기재된 하이브리도마 또는 상기 11에 기재된 형질 전환 세포를 배지 중에서 배양하고, 배양물로부터 항체 또는 항체 단편을 채취하는 것을 포함하는, 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편의 제조 방법.
- [0036] 13. 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 항체 약물 복합체.
- [0037] 14. 상기 항체 약물 복합체가, 링커를 통해 약제와 연결된 상기 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는, 상기 13에 기재된 항체 약물 복합체.
- [0038] 15. 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체를 포함하는, 조성물.
- [0039] 16. 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체를 포함하는, FCRL1의 검출 또는 측정용 시약.
- [0040] 17. 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체를 포함하는, FCRL1 관련 질환의 진단약.
- [0041] 18. FCRL1 관련 질환이 암, 자기 면역 질환 또는 염증성 질환인, 상기 17에 기재된 진단약.
- [0042] 19. 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체를 포함하는, FCRL1 관련 질환의 치료약.
- [0043] 20. FCRL1 관련 질환이 암, 자기 면역 질환 또는 염증성 질환인, 상기 19에 기재된 치료약.
- [0044] 21. 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체를 사용한, FCRL1 관련 질환의 진단 방법.
- [0045] 22. 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체를 투여하는 것을 포함하는, FCRL1 관련 질환의 치료 방법.
- [0046] 23. FCRL1 관련 질환의 진단약을 제조하기 위한, 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체의 사용.
- [0047] 24. FCRL1 관련 질환의 치료약을 제조하기 위한, 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체의 사용.
- [0048] 25. FCRL1 관련 질환의 진단약으로서의 사용을 위한, 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체.
- [0049] 26. FCRL1 관련 질환의 치료약으로서의 사용을 위한, 상기 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 항체 혹은 해당 항

체 단편 또는 상기 13 혹은 14에 기재된 항체 약물 복합체.

발명의 효과

[0050]

본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편은, 인간 FCRL1의 세포 외 영역에 선택적으로 결합한다. 특히 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편은, 기존의 FCRL1 항체에 비해, 항체 약물 복합체(Antibody-Drug Conjugate; 이하 ADC라고도 기재함)에 사용했을 때에 우수한 효과를 발휘한다. 그 때문에, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편은, 인간 FCRL1 관련 질환의 치료약 및 진단약으로서 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051]

도 1은, 공지 항인간 FCRL1 항체에 페이로드 링커인 SG3249를 결합시킨 항체 약물 복합체에 대해서, SU-DHL-6 세포 피하 이식 마우스 모델에 있어서의 항종양 효과를 측정한 결과이다. 도 1의 종축은, 종양 사이즈(mm³)를 나타낸다. 도 1의 횡축은, SU-DHL-6 세포 피하 이식 마우스 모델에 ADC를 투여한 후의 일수를 나타낸다. 공지 항인간 FCRL1 항체로서는, E9, 1F9 및 7G8을 사용하였다. 음성 항체로서는, 항2,4-디니트로페놀(DNP) IgG1 항체를 사용하였다.

도 2a는, 신규 항인간 FCRL1 항체에 페이로드 링커인 SG3249를 결합시킨 ADC에 대해서, SU-DHL-6 세포의 생존에 끼치는 영향을 측정한 결과이다. 도 2a의 종축은, 세포 생존율(%)을 나타내고, ADC를 처치하지 않은 조건에서의 세포수를 100%로 하였다. 도 2a의 횡축은, SU-DHL-6 세포에 첨가한 ADC의 농도를 나타낸다. 신규 항인간 FCRL1 항체로서는, DK1142, DK1164, DK681, DK1166 및 DK1141을 사용하였다. 공지 항인간 FCRL1 항체로서는, 7G8을 사용하였다.

도 2b는, 상기 도 2a와 마찬가지로의 측정에 있어서, 신규 항인간 FCRL1 항체로서 DK610을 사용한 결과를 나타낸다.

도 3a는, 신규 항인간 FCRL1 항체에 페이로드 링커인 SG3249를 결합시킨 ADC에 대해서, Ramos 세포의 생존에 끼치는 영향을 측정한 결과이다. 도 3a의 종축은, 세포 생존율(%)을 나타내고, ADC를 처치하지 않은 조건에서의 세포수를 100%로 하였다. 도 3a의 횡축은, Ramos 세포에 첨가한 ADC의 농도를 나타낸다. 신규 항인간 FCRL1 항체로서는, DK1142, DK1164, DK681, DK1166 및 DK1141을 사용하였다. 공지 항인간 FCRL1 항체로서는, 7G8을 사용하였다.

도 3b는, 상기 도 3a와 마찬가지로의 측정에 있어서, 신규 항인간 FCRL1 항체로서 DK610을 사용한 결과를 나타낸다.

도 4는, 신규 항인간 FCRL1 항체에 페이로드 링커인 SG3249를 결합시킨 ADC에 대해서, SU-DHL-6 세포 피하 이식 마우스 모델 및 Ramos 세포 피하 이식 마우스 모델에 있어서의 항종양 효과를 측정한 결과이다. 약제 투여 후 10일째의 결과를 나타낸다. 도 4의 종축은, 7G8을 투여한 마우스의 종양 사이즈를 1로 했을 때의 상대적인 종양 사이즈를 나타낸다. 신규 항인간 FCRL1 항체로서는, DK1142, DK1164, DK681, DK1166, DK1141 및 DK610을 사용하였다. 공지 항인간 FCRL1 항체로서는, 7G8을 사용하였다.

도 5는, 신규 항인간 FCRL1 항체에 페이로드 링커인 SG3249를 결합시킨 ADC에 대해서, Ramos 세포 피하 이식 마우스 모델에 있어서의 항종양 효과를 측정한 결과이다. 약제 투여 후 42일째의 결과를 나타낸다. 도 5의 종축은, 종양 사이즈(mm³)를 나타낸다. 신규 항인간 FCRL1 항체로서는, DK1142, DK1164, DK681, DK1166, DK1141 및 DK610을 사용하였다. 공지 항인간 FCRL1 항체로서는, 7G8을 사용하였다.

도 6은, 신규 항인간 FCRL1 항체에 대해서, Ramos 세포에 있어서의 항체의 내재화를 측정한 결과이다. 도 6의 종축은, 형광 강도를 나타낸다. 신규 항인간 FCRL1 항체로서는, DK1142, DK1164, DK681, DK1166, DK1141 및 DK610을 사용하였다. 공지 항인간 FCRL1 항체로서는, 7G8을 사용하였다.

도 7a는, 신규 항인간 FCRL1 항체에 페이로드 링커인 SG3249를 결합시킨 ADC에 대해서, SU-DHL-6 세포의 생존에 끼치는 영향을 측정한 결과이다. 도 7a의 종축은, 세포 생존율(%)을 나타내고, ADC를 처치하지 않은 조건에서의 세포수를 100%로 하였다. 도 7a의 횡축은, SU-DHL-6 세포에 첨가한 ADC의 농도를 나타낸다. 신규 항FCRL1 키메라 항체로서는, DK681, 신규 항FCRL1 인간화 항체로서는, DK681 F11, DK681 F12, DK681 F13 및 DK681 F14를 사용하였다. 공지 항인간 FCRL1 항체로서는, 7G8을 사용하였다.

도 7b는, 상기 도 7a와 마찬가지로의 측정에 있어서, 신규 항FCRL1 키메라 항체로서, DK1142, 신규 항FCRL1 인간

화 항체로서, DK1142 F21, DK1142 F22 및 DK1142 F24를 사용한 결과를 나타낸다.

도 8a는, 신규 항인간 FCRL1 항체에 페이로드 링커인 SG3249를 결합시킨 ADC에 대해서, Ramos 세포의 생존에 끼치는 영향을 측정된 결과이다. 도 8a의 종축은, 세포 생존율(%)을 나타내고, ADC를 처리하지 않은 조건에서의 세포수를 100%로 하였다. 도 8a의 횡축은, Ramos 세포에 첨가한 ADC의 농도를 나타낸다. 신규 항FCRL1 키메라 항체로서는, DK681, 신규 항FCRL1 인간화 항체로서는, DK681 F11, DK681 F12, DK681 F13 및 DK681 F14를 사용하였다. 공지 항인간 FCRL1 항체로서는, 7G8을 사용하였다.

도 8b는, 상기 도 8a와 마찬가지로의 측정에 있어서, 신규 항FCRL1 키메라 항체로서, DK1142, 신규 항FCRL1 인간화 항체로서, DK1142 F21, DK1142 F22 및 DK1142 F24를 사용한 결과를 나타낸다.

도 9는, 신규 항인간 FCRL1 항체에 페이로드 링커인 SG3249를 결합시킨 ADC에 대해서, SU-DHL-6 세포 피하 이식 마우스 모델 및 Ramos 세포 피하 이식 마우스 모델에 있어서의 항종양 효과를 측정된 결과이다. 약제 투여 후 7일째의 결과를 나타낸다. 도 9의 종축은, 7G8을 투여한 마우스의 종양 사이즈를 1로 했을 때의 상대적인 종양 사이즈를 나타낸다. 신규 항인간 FCRL1 항체로서는, DK681 F11, DK681 F12, DK681 F13, DK681 F14, DK1142 F21, DK1142 F22 및 DK1142 F24를 사용하였다. 공지 항인간 FCRL1 항체로서는, 7G8을 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 본 발명은, 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편에 관한 것이다.
- [0053] FCRL1은 CD307a, FCRH1, IFGP1 및 IRTA5라고도 한다. FCRL1은 면역 글로불린 슈퍼패밀리에 속하고, 413아미노산을 포함하는 1형 막 단백질이다.
- [0054] FCRL1은 세포 내에 2개의 면역 수용체 티로신 활성 모티프(ITAM)를 갖고 있다. 그 때문에, 리간드의 결합에 의해 세포 내에 활성화 시그널이 전달될 것이 예상되지만, 현시점에서 FCRL1의 내재성 리간드는 동정되지 않았고, FCRL1의 기능은 명확해지지 않았다. 근년의 암 세포주를 사용한 실험에서는, FCRL1이 아포토시스 관련 분자의 발현을 제어함으로써, 암 세포의 증식에 관여하는 것이 보고되어 있다.
- [0055] 본 발명에 있어서 인간 FCRL1로서는, 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열 혹은 NCBI 엑세션 번호 NP_443170의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열 혹은 NCBI 엑세션 번호 NP_443170의 아미노산 서열에 있어서 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드, 혹은 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열 혹은 NCBI 엑세션 번호 NP_443170의 아미노산 서열과 60% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 인간 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드 등을 들 수 있다.
- [0056] 서열 번호 3에 기재된 아미노산 서열 또는 NCBI 엑세션 번호 NP_443170으로 나타내지는 아미노산 서열에 있어서 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 부위 특이적 변이 도입법 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997), Nucleic acids Research, 10, 6487(1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982), Gene, 34, 315(1985), Nucleic Acids Research, 13, 4431(1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488(1985)] 등을 사용하여, 예를 들어 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에, 부위 특이적 변이를 도입함으로써 얻을 수 있다.
- [0057] 결실, 치환 또는 부가되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 1개 내지 수십개, 예를 들어 1 내지 20개, 보다 바람직하게는 1개 내지 수개, 예를 들어 1 내지 5개의 아미노산이다.
- [0058] 인간 FCRL1을 코딩하는 유전자로서는, 서열 번호 1에 기재된 염기 서열, 및 NCBI 엑세션 번호 NM_052938의 염기 서열을 들 수 있다. 서열 번호 1에 기재된 염기 서열 혹은 NM_052938의 염기 서열에 있어서, 1 이상의 염기가 결실, 치환 또는 부가된 염기 서열을 포함하고, 또한 인간 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자, 서열 번호 1에 기재된 염기 서열 혹은 NM_052938의 염기 서열과 적어도 60% 이상의 유사성을 갖는 염기 서열, 바람직하게는 80% 이상의 유사성을 갖는 염기 서열, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 유사성을 갖는 염기 서열을 포함하고, 또한 인간 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자 또는 서열 번호 1에 기재된 염기 서열, 혹은 NM_052938의 염기 서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건 하에서 하이브리다이징하는 DNA를 포함하고, 또한 인간 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 등도 본 발명의 인간 FCRL1을 코딩하는 유전자에 함유된다.

- [0059] 엄격한 조건 하에서 하이브리다이징하는 DNA로서는, 서열 번호 1에 기재된 염기 서열 또는 NM_052938의 염기 서열을 포함하는 DNA를 프로브에 사용한, 콜로니·하이브리다이제이션법, 플라크·하이브리다이제이션법, 서던 블롯·하이브리다이제이션법 또는 DNA 마이크로어레이법 등에 의해 얻어지는 하이브리다이징 가능한 DNA를 말한다.
- [0060] 구체적으로는, 하이브리다이징한 콜로니 혹은 플라크 유래의 DNA, 또는 해당 서열을 갖는 PCR산물 혹은 올리고 DNA를 고정화한 필터 혹은 슬라이드 글래스를 사용하여, 0.7 내지 1.0mol/L의 염화나트륨 존재 하, 65℃에서 하이브리다이제이션법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997), DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1995)]을 행한 후, 0.1 내지 2배 농도의 SSC 용액(1배 농도의 SSC 용액의 조성은, 150mmol/L 염화나트륨, 15mmol/L 시트르산 나트륨을 포함함)을 사용하여, 65℃ 조건 하에서 필터 또는 슬라이드 글래스를 세정함으로써 동정할 수 있는 DNA를 들 수 있다.
- [0061] 하이브리다이징 가능한 DNA로서는 서열 번호 1에 기재된 염기 서열 또는 NM_052938의 염기 서열과 적어도 60% 이상의 유사성을 갖는 DNA, 바람직하게는 80% 이상의 유사성을 갖는 DNA, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 유사성을 갖는 DNA를 들 수 있다.
- [0062] 진핵 생물의 단백질을 코딩하는 유전자의 염기 서열에는, 종종 유전자의 다형이 확인된다. 본 발명에 있어서 사용되는 유전자에, 이러한 다형에 의해 염기 서열에 소규모인 변이를 발생한 유전자도 본 발명의 인간 FCRL1을 코딩하는 유전자에 함유된다.
- [0063] 본 발명의 항체로서는, 인간 FCRL1과 원숭이 FCRL1 중 어느 것에도 결합하는 항체를 들 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서 원숭이 FCRL1로서는, 서열 번호 4에 기재된 아미노산 서열 혹은 NCBI 액세스 번호 XP_015310712의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열 번호 4에 기재된 아미노산 서열 혹은 NCBI 액세스 번호 XP_015310712의 아미노산 서열에 있어서 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하고, 또한 원숭이 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드, 혹은 서열 번호 4에 기재된 아미노산 서열 혹은 NCBI 액세스 번호 XP_015310712의 아미노산 서열과 60% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 또한 원숭이 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드 등을 들 수 있다.
- [0065] 서열 번호 4에 기재된 아미노산 서열 또는 NCBI 액세스 번호 XP_015310712로 나타내지는 아미노산 서열에 있어서 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 부위 특이적 변이 도입법 등을 사용하여, 예를 들어 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에, 부위 특이적 변이를 도입함으로써 얻을 수 있다.
- [0066] 결실, 치환 또는 부가되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 1개 내지 수십개, 예를 들어 1 내지 20개, 보다 바람직하게는 1개 내지 수개, 예를 들어 1 내지 5개의 아미노산이다.
- [0067] 원숭이 FCRL1을 코딩하는 유전자로서는, 서열 번호 2에 기재된 염기 서열, 및 NCBI 액세스 번호 XM_005541349의 염기 서열을 들 수 있다. 서열 번호 2에 기재된 염기 서열 혹은 XM_005541349의 염기 서열에 있어서, 1 이상의 염기가 결실, 치환 또는 부가된 염기 서열을 포함하고, 또한 원숭이 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자, 서열 번호 2에 기재된 염기 서열 혹은 XM_005541349의 염기 서열과 적어도 60% 이상의 유사성을 갖는 염기 서열, 바람직하게는 80% 이상의 유사성을 갖는 염기 서열, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 유사성을 갖는 염기 서열을 포함하고, 또한 원숭이 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 유전자 또는 서열 번호 2에 기재된 염기 서열, 혹은 XM_005541349의 염기 서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건 하에서 하이브리다이징하는 DNA를 포함하고, 또한 원숭이 FCRL1의 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 등도 본 발명의 원숭이 FCRL1을 코딩하는 유전자에 함유된다.
- [0068] 본 발명에 있어서의 아미노산 서열 또는 염기 서열의 유사성이란, 2개의 아미노산 서열 또는 염기 서열을 비교하여, 특정한 조건에서 산출한 수치를 말한다. 구체적으로는, 유사성은 2개의 서열의 얼라인먼트를 취득하고, 해당 얼라인먼트 내에서 일치 또는 유사한 잔기 페어가 차지하는 비율을 산출함으로써 얻어진다. 얼라인먼트 취득에는, 예를 들어 Needleman-Wunsch법, Smith-Waterman법, FASTA법 및 BLAST법 등의 알고리즘이 사용된다. 각 알고리즘에서 사용되는 파라미터로서는, 잔기 페어 단위에서의 유사성 평가 지표(아미노산 서열의 경우, 예를 들어 BLOSUM62, BLOSUM50 및 PAM30 등의 치환 행렬이 사용되고, 염기 서열의 경우, 예를 들어 match

reward, mismatch penalty 등이 사용된다.), 갭 부분의 정량적 평가 지표(예를 들어 아핀형 갭 비용 함수) 등을 들 수 있다. 본 발명에 있어서의 아미노산 서열 또는 염기 서열의 유사성의 일례로서는, BLAST법의 대표적 실장인 NCBI BLAST에 의해 디폴트의 파라미터를 사용하여 취득된 얼라인먼트에 부대하여 출력되는 아이덴티티즈(identities) 또는 포지티브즈(positives)의 값을 들 수 있다.

[0069] 본 발명의 항체가 인간 FCRL1의 세포 외 영역에 결합하는 것은, 인간 FCRL1 발현 세포에 대한 본 발명의 항체의 결합성을, ELISA, 플로 사이토메트리 및 표면 플라즈몬 공명법 등을 사용하여 측정함으로써 확인할 수 있다. 또한, 공지된 면역학적 검출법[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단사 사이언티픽(1987)] 등을 조합하여 확인할 수도 있다.

[0070] 항체 분자는 이뮤노글로불린(이하, Ig라 표기함)이라고도 칭해지고, 인간 항체는, 분자 구조의 차이에 따라서 IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgM의 아이소타입으로 분류된다. 아미노산 서열의 유사성이 비교적 높은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 총칭하여 IgG라고도 한다.

[0071] 항체 분자는 중쇄(Heavy chain, 이하 H쇄라 기재함) 및 경쇄(Light chain, 이하 L쇄라 기재함)라고 불리는 폴리펩티드로 구성된다. 또한, H쇄는 N 말단측에서 H쇄 가변 영역(VH라고도 표기됨) 및 H쇄 정상 영역(CH라고도 표기됨), L쇄는 N 말단측에서 L쇄 가변 영역(VL라고도 표기됨) 및 L쇄 정상 영역(CL라고도 표기됨)의 각 영역에 의해, 각각 구성된다. CH는 각 Ig 아이소타입마다, α , δ , ϵ , γ 및 μ 쇄가 각각 알려져 있다. CH는 추가로, N 말단측에서 CH1 도메인, 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인의 각 도메인에 의해 구성된다. 도메인이란, 항체 분자의 각 폴리펩티드를 구성하는 기능적인 구조 단위를 말한다. 또한, CH2 도메인과 CH3 도메인을 모두 Fc 영역 또는 간단히 Fc라고 한다. CL은, C λ 쇄 및 C κ 쇄가 알려져 있다.

[0072] 본 발명에 있어서의 CH1 도메인, 힌지 영역, CH2 도메인, CH3 도메인 및 Fc 영역은, EU 인덱스(EU 넘버링이라고도 함)[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]에 의해, N 말단으로부터의 아미노산 잔기의 번호로 특정할 수 있다. 구체적으로는, CH1은 EU 인덱스 118 내지 215번의 아미노산 서열, 힌지는 EU 인덱스 216 내지 230번의 아미노산 서열, CH2는 EU 인덱스 231 내지 340번의 아미노산 서열, CH3은 EU 인덱스 341 내지 447번의 아미노산 서열로 각각 특정된다.

[0073] 본 발명에 있어서의 모노클로날 항체로서는, 하이브리도마에 의해 생성되는 항체, 또는 항체 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환한 형질 전환 세포에 의해 생성되는 유전자 재조합 항체를 들 수 있다.

[0074] 하이브리도마란, 비인간 동물에 항원을 면역하여 취득된 B 세포와, 마우스 등에서 유래하는 미엘로마 세포를 세포 융합시켜 얻어지는, 원하는 항원 특이성을 갖는 모노클로날 항체를 생성하는 세포를 말한다. 따라서, 하이브리도마가 생성하는 항체를 구성하는 가변 영역은, 비인간 동물 항체의 아미노산 서열을 포함한다.

[0075] 본 발명의 항체로서는, 특히 유전자 공학적으로 제작된 재조합 마우스 항체, 재조합 래트 항체, 재조합 래빗 항체, 인간형 키메라 항체(이하, 간단히 키메라 항체라고도 약기함), 인간화 항체(인간형 상보성 결정 영역 CDR 이식 항체라고도 함) 및 인간 항체 등의 유전자 재조합 항체도 포함된다.

[0076] 키메라 항체란, 인간 이외의 동물(비인간 동물)의 항체의 VH 및 VL과, 인간 항체의 CH 및 CL를 포함하는 항체를 의미한다. 비인간 동물로서는, 마우스, 래트, 햄스터, 래빗 등, 하이브리도마를 제작하는 것이 가능하면, 어떠한 것도 사용할 수 있다.

[0077] 인간형 키메라 항체는, 모노클로날 항체를 생산하는 비인간 동물 세포 유래의 하이브리도마로부터, 해당 모노클로날 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 cDNA를 취득하고, 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA를 갖는 동물 세포용 발현 벡터에 각각 삽입하여 인간형 키메라 항체 발현 벡터를 구축하고, 동물 세포에 도입함으로써 발현시켜, 제조할 수 있다.

[0078] 인간화 항체란, 비인간 동물 항체의 VH 및 VL의 CDR의 아미노산 서열을 인간 항체의 VH 및 VL이 대응하는 CDR에 이식한 항체를 말한다. VH 및 VL의 CDR 이외의 영역은 프레임워크 영역(이하, FR라 표기함)이라고 칭해진다.

[0079] 인간화 항체는, 비인간 동물 항체의 VH의 CDR의 아미노산 서열과 임의의 인간 항체의 VH의 FR의 아미노산 서열을 포함하는 VH의 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA와, 비인간 동물 항체의 VL의 CDR의 아미노산 서열과 임의의 인간 항체의 VL의 FR의 아미노산 서열을 포함하는 VL의 아미노산 서열을 코딩하는 cDNA를 구축하고, 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA를 갖는 동물 세포용 발현 벡터에 각각 삽입하여 인간화 항체 발현 벡터를 구축하고, 동물 세포에 도입함으로써 발현시켜, 제조할 수 있다.

- [0080] 인간 항체는 원래, 인간 체 내에 천연에 존재하는 항체를 말하지만, 최근의 유전자 공학적, 세포 공학적, 발생 공학적인 기술의 진보에 의해 제작된 인간 항체 파지 라이브러리 및 인간 항체 산생 트랜스제닉 동물로부터 얻어지는 항체 등도 포함된다.
- [0081] 인간 항체는, 인간 이뮤노글로불린 유전자를 유지하는 마우스(Tomizuka K. et. al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 722-7, 2000)에 원하는 항원을 면역함으로써, 취득할 수 있다. 또한, 인간 유래의 B 세포로부터 항체 유전자를 증폭시킨 파지 디스플레이(phage display) 라이브러리를 사용함으로써, 원하는 결합 활성을 갖는 인간 항체를 선택함으로써, 면역을 행하지 않고 인간 항체를 취득할 수 있다(Winter G. et. al., Annu Rev Immunol. 12: 433-55. 1994). 또한, EB 바이러스를 사용하여 인간 B 세포를 불사화함으로써, 원하는 결합 활성을 갖는 인간 항체를 생산하는 세포를 제작하여, 인간 항체를 취득할 수 있다(Rosen A. et. al., Nature 267, 52-54.1977).
- [0082] 인간체 내에 존재하는 항체는, 예를 들어 인간 말초혈로부터 단리한 림프구를, EB 바이러스 등을 감염시킴으로써 불사화한 후, 클로닝함으로써, 해당 항체를 산생하는 림프구를 얻을 수 있고, 해당 림프구를 배양한 배양물 중에서 해당 항체를 정제할 수 있다.
- [0083] 인간 항체 파지 라이브러리는, 인간 B 세포로부터 조제한 항체 유전자를 파지 유전자에 삽입함으로써 Fab, scFv 등의 항체 단편을 표면에 발현시킨 파지의 라이브러리이다. 해당 라이브러리로부터, 항원을 고정화한 기질에 대한 결합 활성을 지표로 하여 원하는 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편을 발현하고 있는 파지를 회수할 수 있다. 해당 항체 단편은, 추가로 유전자 공학적 방법에 의해, 2개의 완전한 H쇄 및 2개의 완전한 L쇄를 포함하는 인간 항체 분자로도 변환할 수 있다.
- [0084] 인간 항체 산생 트랜스제닉 동물은, 인간 항체 유전자가 숙주 동물의 염색체 내에 도입된 동물을 말한다. 구체적으로는, 마우스 ES 세포에 인간 항체 유전자를 도입하고, 해당 ES 세포를 다른 마우스의 초기 배에 이식 후, 발생시킴으로써 인간 항체 산생 트랜스제닉 동물을 제작할 수 있다. 인간 항체 산생 트랜스제닉 동물로부터의 인간 항체의 제작 방법은, 통상의 인간 이외의 포유 동물에서 행해지고 있는 하이브리도마 제작 방법에 의해 인간 항체 산생 하이브리도마를 취득하고, 배양함으로써 배양물 중에 인간 항체를 산생 축적시킬 수 있다.
- [0085] 본 발명의 항체의 VH 및 VL의 아미노산 서열로서는, 인간 항체의 VH 및 VL의 아미노산 서열, 비인간 동물 항체의 VH 및 VL의 아미노산 서열 또는 비인간 동물 항체의 CDR을, 임의의 인간 항체의 프레임워크에 이식한 인간화 항체의 VH 및 VL의 아미노산 서열 중 어느 것이어도 된다.
- [0086] 본 발명의 항체에 있어서의 CL의 아미노산 서열로서는, 인간 항체의 아미노산 서열 또는 비인간 동물 항체의 아미노산 서열 중 어느 것이어도 되지만, 인간 항체의 아미노산 서열 C_k 또는 C_λ가 바람직하다.
- [0087] 본 발명의 항체의 CH로서는, 이뮤노글로불린에 속하는 어떠한 분자 종의 CH여도 되지만, 바람직하게는 IgG 클래스에 속하는 서브클래스, γ 1(IgG1; 예를 들어 액세스 번호 AAA02914.1), γ 2(IgG2; 예를 들어 액세스 번호 AAG00910.2), γ 3(IgG3; 예를 들어 액세스 번호 P01860.2) 및 γ 4(IgG4; 예를 들어 액세스 번호 P01861.1) 모두 사용할 수 있다. 또한, CH를 구성하는 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 CH여도 된다. 결실, 치환 또는 부가되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 1개 내지 수십개, 예를 들어 1 내지 20개, 보다 바람직하게는 1개 내지 수개, 예를 들어 1 내지 5개의 아미노산이다. CH를 구성하는 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 CH로서, 인간 IgG1의 CH의, EU 넘버링에 의한 239번째의 세린을 시스테인으로 치환한 IgG1 CH 개변체를 들 수 있다. 보다 구체적으로는, 예를 들어 서열 번호 79에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 IgG1의 CH의 EU 넘버링에 의한 239번째의 세린을 시스테인으로 치환한 아미노산 서열(서열 번호 80)을 포함하는 IgG1 CH 개변체를 들 수 있다.
- [0088] 본 발명의 항체로서는, Fc와 항체 단편이 결합된 Fc 융합 단백질, Fc와 천연에 존재하는 리간드 또는 수용체가 결합된 Fc 융합 단백질(이뮤노아드헤신이라고도 함), 복수의 Fc 영역을 융합시킨 Fc 융합 단백질 등도 본 발명에 포함된다. 또한, 항체를 안정화시키기 위해 및 혈중 반감기를 제어하기 위해서, 아미노산 잔기를 개변한 Fc 영역 등도 본 발명의 항체에 사용할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편은, 번역 후 수식된 어떠한 아미노산 잔기를 포함하는 항체도 포함한다. 번역 후 수식으로서, 예를 들어 H쇄의 C 말단에 있어서의 리신 잔기의 결실[리신·클리핑(lysine clipping)] 또는 폴리펩티드의 N 말단에 있어서의 글루타민 잔기의 피로글루타민(pyroGlu)으로의 변환 등을 들 수 있다 [Beck et al, Analytical Chemistry, 85, 715-736(2013)].

- [0090] 본 발명에 있어서, 항체 단편이란, 인간 FCRL1의 세포 외 영역에 결합하는, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. 본 발명에 있어서 항체 단편으로서는, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 디아바디, dsFv 또는 CDR을 포함하는 펩티드 등을 들 수 있다. Fab는, IgG 항체를 단백질 분해 효소 파파인으로 처리하여 얻어지는 단편 중(H쇄의 224번째의 아미노산 잔기로 절단됨), H쇄의 N 말단측 약 절반과 L쇄 전체가 디설피드 결합(S-S 결합)으로 결합된, 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. 본 발명의 항체 단편으로서는, FCRL1의 세포 외 영역에 결합하고, FCRL1의 내재화를 유도하는 항체 단편이 바람직하다.
- [0091] F(ab')₂는, IgG를 단백질 분해 효소 펩신으로 처리하여 얻어지는 단편 중(H쇄의 234번째의 아미노산 잔기로 절단됨), Fab가 힌지 영역의 S-S 결합을 통해 결합된 것보다 약간 큰, 분자량 약 10만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다. Fab'는, 상기 F(ab')₂의 힌지 영역의 S-S 결합을 절단한 분자량 약 5만의 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0092] scFv는, 1개의 VH와 1개의 VL을 4개의 Gly 및 1개의 Ser 잔기를 포함하는 링커(G4S)를 임의의 개수 연결시킨 링커 펩티드 등의 적당한 펩티드 링커(P)를 사용하여 연결한, VH-P-VL 내지는 VL-P-VH 폴리펩티드로, 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0093] 디아바디는, 항원 결합 특이성의 동일하거나 또는 다른 scFv가 2량체를 형성한 항체 단편으로, 동일한 항원에 대한 2가의 항원 결합 활성 또는 다른 항원에 대한 특이적인 항원 결합 활성을 갖는 항체 단편이다.
- [0094] dsFv는, VH 및 VL 중 각각 1 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 폴리펩티드를 해당 시스테인 잔기간의 S-S 결합을 통해 결합시킨 것을 말한다.
- [0095] CDR을 포함하는 펩티드는, VH 또는 VL의 CDR의 적어도 1 영역 이상을 포함하여 구성된다. 복수의 CDR을 포함하는 펩티드는, CDR끼리를 직접 또는 적당한 펩티드 링커를 통해 결합시킬 수 있다. 본 발명의 개변 항체의 VH 및 VL의 CDR을 코딩하는 DNA를 구축하고, 해당 DNA를 원핵 생물용 발현 벡터 또는 진핵 생물용 발현 벡터에 삽입하고, 해당 발현 벡터를 원핵 생물 또는 진핵 생물에 도입함으로써 발현시켜, 제조할 수 있다. 또한, CDR을 포함하는 펩티드는, Fmoc법 또는 tBoc법 등의 화학 합성법에 의해 제조할 수도 있다.
- [0096] 본 발명의 항체의 일 양태로서는, 하기 (a) 내지 (g)에서 선택되는 어느 하나를 들 수 있다.
- [0097] (a) 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region; 이하 VH라 약기함)의 상보성 결정 영역(complementarity determining region; 이하 CDR이라 약기함) 1 내지 3이, 각각 서열 번호 20 내지 22에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 경쇄 가변 영역(light chain variable region; 이하 VL이라 약기함)의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 24 내지 26에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0098] (b) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 28 내지 30에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 32 내지 34에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0099] (c) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 36 내지 38에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 40 내지 42에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0100] (d) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 44 내지 46에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 48 내지 50에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0101] (e) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 52 내지 54에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 56 내지 58에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체, 및
- [0102] (f) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 60 내지 62에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 64 내지 66에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0103] (g) VH의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 36 내지 38에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL의 CDR1 내지 3이, 각각 서열 번호 40, 71 및 42에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0104] 본 발명의 항체의 일 양태로서는, 하기 (1a) 내지 (1f)에서 선택되는 어느 하나를 들 수 있다.
- [0105] (1a) VH가 서열 번호 19에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 23에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0106] (1b) VH가 서열 번호 27에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 31에 기재되는 아미노산

서열을 포함하는 항체,

- [0107] (1c) VH가 서열 번호 35에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 39에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0108] (1d) VH가 서열 번호 43에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 47에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체,
- [0109] (1e) VH가 서열 번호 51에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 55에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체, 및
- [0110] (1f) VH가 서열 번호 59에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 63에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체
- [0111] 본 발명의 항체의 일 양태로서는, 실시예에 있어서 후술하는, 항인간 FCRL1 마우스 모노클로날 항체 DK610, DK681, DK1142, DK1141, DK1166 및 DK1164를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 항체의 일 양태로서, DK610, DK681, DK1142, DK1141, DK1166 및 DK1164 중 어느 하나의 항체 가변 영역을 포함하는 항체를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 항체의 일 양태로서, DK610, DK681, DK1142, DK1141, DK1166 및 DK1164 중 어느 하나의 항체의 VH의 CDR1 내지 3 및 VL의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열을 갖는 항체 등을 들 수 있다.
- [0112] 본 발명의 항체의 일 양태로서는, 하기 (2b-1) 내지 (2b-4), (2c-1), (2c-2) 및 (2g-1)에서 선택되는 어느 하나를 들 수 있다.
- [0113] (2b-1) VH가 서열 번호 72에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 68에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0114] (2b-2) VH가 서열 번호 73에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 74에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0115] (2b-3) VH가 서열 번호 72에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 74에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0116] (2b-4) VH가 서열 번호 73에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 68에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0117] (2c-1) VH가 서열 번호 75에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 76에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0118] (2c-2) VH가 서열 번호 77에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 76에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0119] (2g-1) VH가 서열 번호 77에 기재되는 아미노산 서열을 포함하며, 또한 VL이 서열 번호 78에 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 항체.
- [0120] 본 발명의 항체의 일 양태로서, DK681 항체 또는 DK1142 항체의 VH의 CDR1 내지 3 및 VL의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열을 인간 항체의 FR에 이식한 인간화 항체를 들 수 있다. 그러한 항체로서는, 예를 들어 실시예에 있어서 후술하는, DK681 F11, DK681 F12, DK681 F13, DK681 F14, DK1142 F21 및 DK1142 F22를 들 수 있다. 또한, DK1142 항체의 VH의 CDR1 내지 3 그리고 VL의 CDR1 및 3의 아미노산 서열과, DK1142 항체의 VL의 CDR2를 개변한 아미노산 서열을, 인간 항체의 FR에 이식한 인간화 항체로서, 실시예에 있어서 후술하는, DK1142 F24를 들 수 있다.
- [0121] 본 발명의 항체로서는, 세포 표면에 발현되는 FCRL1에 선택적으로 결합하고, FCRL1의 내재화(internalization)를 야기하는 항체를 들 수 있다. 또한 본 발명의 항체로서는, 항체에 약물을 결합하여 ADC로 했을 때, 강한 약효를 나타내는 항체를 들 수 있다.
- [0122] 본 발명의 항체가 FCRL1의 내재화를 야기하고 있는 것은, 예를 들어 세포 내의 리소좀과 같은 저pH 환경에서 형광을 발하는 시약을 항체에 결합시켜 세포에 첨가하고, 형광 강도를 측정함으로써 확인할 수 있다.
- [0123] 본 발명의 항체는, 약물 또는 링커와 반응하여 결합을 형성할 수 있는 화학 구조를 도입한 항체도 포함한다. 예를 들어, α , β 불포화 카르보닐기, α , β 불포화 술피닐기, α , β 불포화 술폰닐기, 티올기, 수산기, 아미노기, 아미드기, 포르밀기, 카르복실기, 아지드기, 알킬닐기, 알케닐기, 할로알킬기, 카르보닐기 등의 관능기를

갖는 천연 또는 비천연 아미노산 잔기를 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N 말단, C 말단 또는 아미노산 서열의 도중에 부가, 삽입 또는 치환한 항체, 항체가 갖는 당쇄에 α, β 불포화 카르보닐기, α, β 불포화 술폰닐기, α, β 불포화 술폰닐기, 티올기, 수산기, 아미노기, 아미드기, 포르밀기, 카르복실기, 아지드기, 알킬닐기, 알케닐기, 할로알킬기, 카르보닐기 등의 관능기를 갖는 당쇄를 도입한 항체 등을 들 수 있다.

[0124] 예를 들어, 항체의 특정한 위치의 아미노산 잔기를 시스테인으로 치환한 항체를 들 수 있다. IgG 항체에 있어서 시스테인과의 치환에 적합한 중쇄의 아미노산 잔기로서는, 예를 들어 EU 넘버링에 의한 239번째의 세린(Dimasi, N. et. al., Molecular Pharmaceutics. 14, 1501-1516, 2017), 442번째의 세린(Stimmel, JB. et. al., The Journal of Biological Chemistry. 275, 30445-50, 2000), 290번째의 리신(Graziani, EI. et. al., Molecular Cancer Therapeutics. 19, 2068-2078, 2020), 114번째의 트레오닌, 140번째의 알라닌, 174번째의 류신, 179번째의 류신, 187번째의 트레오닌, 209번째의 트레오닌, 262번째의 발린, 371번째의 글리신, 373번째의 티로신, 382번째의 글루탐산, 424번째의 세린, 434번째의 아스파라긴 및 438번째의 글루타민(국제 공개 제 2016/040856호) 중 적어도 어느 1개를 들 수 있다. 또한, 시스테인과의 치환에 적합한 κ 경쇄의 아미노산 잔기로서는, 예를 들어 EU 넘버링에 의한 183번째의 리신(Graziani, EI. et. al., Molecular Cancer Therapeutics. 19, 2068-2078, 2020), 124번째의 글루타민(Shinmi, D. et. al., Bioconjugate Chemistry. 27, 1324-31, 2016), 106번째의 류신 또는 이소류신, 108번째의 아르기닌, 142번째의 아르기닌 및 149번째의 리신(국제 공개 제 2016/040856호) 중 적어도 어느 1개를 들 수 있다.

[0125] 또한 예를 들어 파라아세틸페닐알라닌이 도입된 항체(Skidmore, L. et. al., Molecular Cancer Therapeutics 19(9), 1833-1843, 2020), 시스테인 잔기의 티올기를 효소적으로 포르밀기로 변환한 항체(미국 특허 출원 공개 제 2012/0183566호 명세서), EU 넘버링에 의한 중쇄 정상 영역의 239번째의 세린과 240번째의 발린 사이에 시스테인을 삽입한 항체(미국 특허 제 10744204호 명세서) 등을 들 수 있다.

[0126] 본 발명의 항체를 포함하는 ADC는, 항체와 약물을, 직접 또는 링커를 통해, 화학적으로 또는 유전자 공학적으로 결합한 분자가 포함된다. 이러한 ADC 분자 중의 항체 부분도 본 발명의 항체에 포함된다.

[0127] 본 발명의 ADC에 포함되는 약물(본 명세서에 있어서 페이로드라고도 기재함)로서는, 생리 활성을 갖는 분자라면 어떠한 것이어도 되고, 예를 들어 방사성 동위 원소, 저분자의 약제, 고분자의 약제, 단백질, 항체 의약 또는 핵산 의약 등을 들 수 있다.

[0128] ADC는, 본 발명의 인간 FCRL1에 결합하는 항체 또는 해당 항체 단편의 H쇄 혹은 L쇄의 N 말단, C 말단, 항체 분자 중의 적당한 관능기 또는 측쇄 혹은 당쇄 등과, 약물 또는 링커를 화학적 방법[항체 공학 입문, 치진 쇼칸(1994)]에 의해 결합시킴으로써 제조할 수 있다.

[0129] 본 발명의 항체 또한 해당 항체 단편은, 공지된 방법(예를 들어, S. J. Walsh et al. Chem. Soc. Rev. 2021, 50, 1305-1353; Tumey, L. Nathan(2020). Antibody-Drug Conjugates-Methods and Protocols: New York, Springer; 및 Laurent Ducry(2013). Antibody-Drug Conjugate: New York, Springer 등에 기재된 방법)에 의해 링커 또는 약제와 결합시킬 수 있다. 예를 들어 항체 분자(항체에 결합하는 당쇄도 포함함)에 도입한 α, β 불포화 카르보닐기, α, β 불포화 술폰닐기, α, β 불포화 술폰닐기, 티올기, 수산기, 아미노기, 아미드기, 포르밀기, 카르복실기, 아지드기, 알킬닐기, 알케닐기, 할로알킬기, 카르보닐기 등의 관능기를, 약제 또는 링커에 포함되는 관능기와 적절한 조건에서 반응시키는 방법을 들 수 있다. 항체에 포함되는 관능기와 약제 또는 링커에 포함되는 관능기의 조합은 공지 정보에 의해 적절하게 선택할 수 있다. 예를 들어 항체 분자 중의 티올기 등의 친핵성 관능기와, 약물 또는 링커에 포함되는 α, β 불포화 카르복실산 등의 마이클 억셉터를 친핵 반응시킴으로써 결합을 형성할 수도 있다. 또한 예를 들어 항체 분자 중의 아지드기와 약물 또는 링커에 포함되는 알킬닐기를, 촉매의 존재 하 또는 비존재 하에서 환화 반응시킴으로써 결합을 형성할 수도 있다.

[0130] 또한, 본 발명의 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 코딩하는 DNA와, 결합시키고자 하는 단백질 또는 항체 의약을 코딩하는 DNA를, 연결시켜 발현 벡터에 삽입하고, 해당 발현 벡터를 적당한 숙주 세포에 도입하여, 발현시키는 유전자 공학적 방법으로부터 제조할 수 있다.

[0131] 방사성 동위 원소로서는, 예를 들어 ^{111}In , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu 또는 ^{211}At 등을 들 수 있다. 방사성 동위 원소는, 클로라민 T법 등에 의해 항체에 직접 결합시킬 수 있다. 또한, 방사성 동위 원소를 킬레이트팅하는 물질을 항체에 결합시켜도 된다. 킬레이트제로서는, 예를 들어 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌트리아민펜타아세트산(MX-DTPA) 등을 들 수 있다.

[0132] 저분자의 약제로서는, 예를 들어 알킬화제, 니트로소우레아제, 대사 길항제, 항생 물질, 식물 알칼로이드, 토포

이소머라아제 저해제, 호르몬 요법제, 호르몬 길항제, 아로마타아제 저해제, P당 단백 저해제, 백금 착체 유도제, M기 저해제 혹은 키나아제 저해제 등의 항암제[임상 종양학, 암과 화학 요법사(1996)], 하이드로코르티손 혹은 프레드니손 등의 스테로이드제, 아스피린 혹은 인도메타신 등의 비스테로이드제, 금티오말레이트 혹은 페니실라민 등의 면역 조절제, 시클로포스파미드 혹은 아자티오프린 등의 면역 제어제 또는 말레산클로르페니라민 혹은 클레마스틴과 같은 항히스타민제 등의 항염증제[염증과 항염증 요법, 이시야쿠 슛판 가부시기가이샤(192)] 등을 들 수 있다.

[0133] 항암제로서는, 예를 들어 아미포스틴(에티올), 시스플라틴, 다카르바진(DTIC), 닥티노마이신, 메클로레타민(질소 머스터드), 스트렙토조신, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 카르무스틴(BCNU), 로무스틴(CCNU), 독소루비신(아드리아마이신), 에피루비신, 겐시타빈(겐자르), 다우노루비신, 프로카르바진, 마이토마이신, 시타라빈, 에토포시드, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실, 플루오로우라실, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 블레오마이신, 다우노마이신, 페플로마이신, 에스트라무스틴, 파클리탁셀(탁솔), 도세탁셀(탁소텔), 알테스류킨, 아스파라기나아제, 부솔판, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 네다플라틴, 클라드리빈, 캄토테신, 10-히드록시-7-에틸-캄토테신(SN38), 플록스우리딘, 플루다라빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 메스나, 이리노테칸(CPT-11), 노기테칸, 미톡산트론, 토포테칸, 류프롤리드, 메게스트롤, 멜팔란, 머캄토피린, 히드록시카르바미드, 플리카마이신, 미토탄, 페가스파르가제, 펜토스타틴, 피포브로만, 타목시펜, 고세렐린, 류프로렐린, 플루타미드, 테니포시드, 테스토락톤, 티오구아닌, 티오테파, 우라실머스타드, 비노렐빈, 클로람부실, 하이드로코르티손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 빈데신, 니무스틴, 세무스틴, 카페시타빈, 토뮤텍스, 아자시티딘, 옥살로플라틴, 피롤로벤조디아제핀(PBD) 유도제, 오리스타틴류(모노메틸아우리스타틴 E, 모노메틸아우리스타틴 F 등), 아마니틴, 캄토테신 유도제(테루스테칸, 엑사테칸, SN-38 등), 게피티닙(이렛사), 이마티닙(STI571), 에를로티닙, FMS-like 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 3(Flt3) 저해제, 혈관 내피 성장 인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor)(VEGFR) 저해제, 섬유아세포 성장 인자 수용체(fibroblast growth factor receptor)(FGFR) 저해제, 이렛사 혹은 타세바 등의 상피 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor)(EGFR) 저해제, 라디시콜, 17-알릴아미노-17-데메톡시겔다나마이신, 라파마이신, 암사크린, 올-트랜스레티노산, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 아나스트로졸, 파드로졸, 레트로졸, 엑세메스탄, 금티오말레이트, D-페니실라민, 부실라민, 아자티오프린, 미조리빈, 시클로스포린, 히드로코르티손, 백사로텐(타그레틴), 타목시펜, 텍사메타손, 프로게스틴류, 에스트로겐류, 아나스트로졸(아리미텍스), 류프린, 아스피린, 인도메타신, 셀레콕시브, 페니실라민, 금티오말레이트, 말레산클로르페니라민, 클로로페니라민, 클레마스틴, 트레티노인, 백사로텐, 비소, 보르테조미브, 알로푸리놀, 이브리투모맙티옥세탄, 타르그레틴, 오조가민, 클라리트로마이신, 류코보린, 케토코나졸, 아미노글루테티미드, 수라민 또는 메이탄시노이드, 드라마스타틴 10, 액티노마이신, 안트라사이클린, 듀오카르마이신, 듀오카르마이신의 2량체(CPI-dimer 등), 에리블린 혹은 그의 유도제 등을 들 수 있다.

[0134] 고분자의 약제로서는, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜(이하, PEG라 표기함), 알부민, 텍스트란, 폴리옥시에틸렌, 스티렌말레산 코폴리머, 폴리비닐피롤리돈, 피란 코폴리머 또는 히드록시프로필메타크릴아미드 등을 들 수 있다. 이들 고분자 화합물을 항체 또는 해당 항체 단편에 결합시킴으로써, (1) 화학적, 물리적 혹은 생물적인 각종 인자에 대한 안정성의 향상, (2) 혈중 반감기의 현저한 연장, 또는 (3) 면역원성의 소실 혹은 항체 산생의 억제 등의 효과가 기대된다[바이오 콘쥬게이트 의약품, 히로카와 쇼텐(1993)].

[0135] 예를 들어, PEG와 항체를 결합시키는 방법으로서, PEG화 수식 시약과 반응시키는 방법 등을 들 수 있다[바이오 콘쥬게이트 의약품, 히로카와 쇼텐(1993)]. PEG화 수식 시약으로서, 리신의 ε-아미노기에의 수식제(일본 특허 공개 소61-178926호 공보), 아스파르트산 및 글루탐산의 카르복실기에의 수식제(일본 특허 공개 소56-23587호 공보), 또는 아르기닌의 구아니디노기에의 수식제(일본 특허 공개 평2-117920호 공보) 등을 들 수 있다.

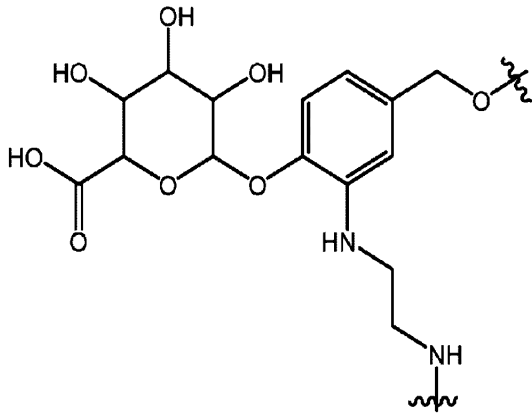
[0136] 면역 부활제로서는, 이뮤노아주반트로서 알려져 있는 천연물이어도 되고, 구체예로서는, 면역을 항진하는 약제가, β(1→3)글루칸(예를 들어, 렌티난 또는 시조피란) 또는 α 갈락토실세라마이드(KRN7000) 등을 들 수 있다.

[0137] 단백질로서는, 예를 들어 NK 세포, 마크로파지 또는 호중구 등의 면역 담당 세포를 활성화하는 사이토카인 혹은 증식 인자 또는 독소 단백질 등을 들 수 있다.

[0138] 사이토카인 또는 증식 인자로서는, 예를 들어 인터페론(이하, IFN라 기재함)-α, IFN-β, IFN-γ, 인터류킨(이하, IL라 기재함)-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 과립구/마크로파지 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 또는 마크로파지 콜로니 자극 인자(M-CSF) 등을 들 수 있다. 독소 단백질로서는, 예를 들어 리신 또는 디프테리아 독소 등을 들 수 있고, 독성을 조절하기 위해 단백질에 변이를 도입한 단백질

소도 포함된다.

- [0139] 항체 의약으로서, 예를 들어 항체의 결합에 의해 아포토시스가 유도되는 항원, 종양의 병태 형성에 관계되는 항원, 면역 기능을 조절하는 항원 또는 병변 부위의 혈관 신생에 관여하는 항원에 대한 항체를 들 수 있다.
- [0140] 항체의 결합에 의해 아포토시스가 유도되는 항원으로서, 예를 들어 분화 클러스터(cluster of differentiation)(이하, CD라 기재함) 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80(B7.1), CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86(B7.2), 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen)(HLA)-Class II 또는 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 등을 들 수 있다.
- [0141] 종양의 병태 형성에 관계되는 항원 또는 면역 기능을 조절하는 항체의 항원으로서, 예를 들어 CD4, CD40, CD40 리간드, B7 패밀리 분자(예를 들어, CD80, CD86, CD274, B7-DC, B7-H2, B7-H3 또는 B7-H4), B7 패밀리 분자의 리간드(예를 들어, CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 또는 BTLA), OX-40, OX-40 리간드, CD137, 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor)(TNF) 수용체 패밀리 분자(예를 들어, DR4, DR5, TNFR1 또는 TNFR2), TNF-관련 아포토시스 유도 리간드 수용체(TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor)(TRAIL) 패밀리 분자, TRAIL 패밀리 분자의 수용체 패밀리(예를 들어, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 또는 TRAIL-R4), 뉴클리어 인자 카파 B 리간드의 수용체 활성화자(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)(RANK), RANK 리간드, CD25, 엽산 수용체, 사이토카인[예를 들어, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, 전환 성장 인자(transforming growth factor)(TGF) β 또는 TNF α 등] 혹은 이들 사이토카인의 수용체, 또는 케모카인(예를 들어, SLC, ELC, I-309, TARC, MDC 또는 CTACK 등) 혹은 이들 케모카인의 수용체를 들 수 있다.
- [0142] 병변 부위의 혈관 신생을 저해하는 항체의 항원으로서, 예를 들어 혈관 내피 세포 성장 인자(vascular endothelial growth factor)(VEGF), 양기오포이에틴(angiopoietin), 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor)(FGF), EGF, 간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor)(HGF), 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor)(PDGF), 인슐린 유사 성장 인자(insulin-like growth factor)(IGF), 에리트로포이에틴(erythropoietin)(EPO), TGF β , IL-8, 에프린(ephlin) 또는 SDF-1 혹은 이들의 수용체 등을 들 수 있다.
- [0143] 단백질 또는 항체 의약과의 융합 항체는, 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 cDNA에 단백질 또는 항체 의약에 포함되는 항체를 코딩하는 cDNA를 연결시켜, 융합 항체를 코딩하는 DNA를 구축하고, 해당 DNA를 원핵 생물 또는 진핵 생물용 발현 벡터에 삽입하고, 해당 발현 벡터를 원핵 생물 또는 진핵 생물에 도입함으로써 발현시켜, 융합 항체를 제조할 수 있다.
- [0144] 핵산 의약으로서, 예를 들어 유전자의 기능을 제어함으로써 생체에 작용하는 작은 간섭 리보핵산(small interference ribonucleic acid)(siRNA) 또는 microRNA 등의 핵산을 포함하는 의약품을 들 수 있다. 예를 들어, Th17 세포의 마스터 전사 인자 ROR γ t를 억제하는 핵산 의약과의 콘주게이트를 생각할 수 있다.
- [0145] 본 발명의 ADC에 포함되는 링커로서는, 항체와 약제를 결합하는 기능을 갖는 것이면 어떤 구조여도 된다. 예를 들어 표적의 세포나 조직의 근방 또는 내부에서 절단되는 등의 특별한 기능을 갖는 구조나, 복수의 약물을 결합할 수 있도록 분지된 구조 등을 갖고 있어도 된다. 본 발명의 ADC에는 예를 들어, 공지된 링커(예를 들어, S. J. Walsh et al. Chem. Soc. Rev. 2021, 50, 1305-1353; Tumey, L. Nathan(2020). Antibody-Drug Conjugates-Methods and Protocols: New York, Springer; 및 Laurent Ducry(2013). Antibody-Drug Conjugate: New York, Springer 등에 기재된 링커)를 사용할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어 펩티드, 올리고당, -(CH₂)-, 산소 원자, 황 원자, -NH-, -(CH₂CH₂O)-, -CO-, -PO-, 아미노산, 파라아미노벤질(PAB), 탄소수가 3 내지 10인 환상 알킬, 및 하기 식으로 나타내지는 구조로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 1를 포함하는 링커, 또는 상기 군에서 선택되는 2 이상의 단위를 연결하여 이루어지는 구조를 포함하는 링커를 들 수 있다.



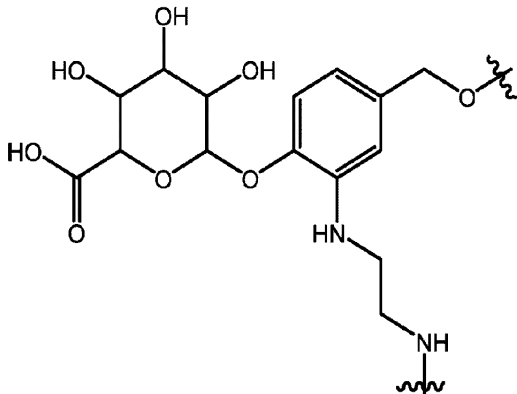
[0146]

[0147]

링커를 구성하는 아미노산으로서는, 예를 들어 발린(Val), 시트룰린(Cit), 페닐알라닌(Phe), 리신(Lys), D-발린(D-Val), 류신(Leu), 글리신(Gly), 알라닌(Ala), 아스파라긴(Asn) 등을 들 수 있다.

[0148]

링커의 일 양태로서, 예를 들어 펩티드, 올리고당, $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2CH_2O)_n-$, $-CO-$, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, Ala-PAB, PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Gly-Gly-Phe-Gly-PAB, $-Gly-Gly-Phe-Gly-CH_2-O-CH_2-CO-$, 및 하기 식으로 나타내지는 구조로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나를 포함하는 링커, 및 상기 군에서 선택되는 2 이상의 단위를 연결한 구조를 포함하는 링커를 들 수 있다.



[0149]

[0150]

여기서, n 은 1 내지 1000의 정수, 바람직하게는 1 내지 100의 정수, 보다 바람직하게는 1 내지 50의 정수, 더욱 바람직하게는 1 내지 20의 정수, 가장 바람직하게는 1 내지 15의 정수를 나타낸다. 또한 Ac는 아세틸기를 나타낸다. Lys(Ac)는 리신의 측쇄의 아미노기가 아세틸화되어 있는 것을 나타낸다.

[0151]

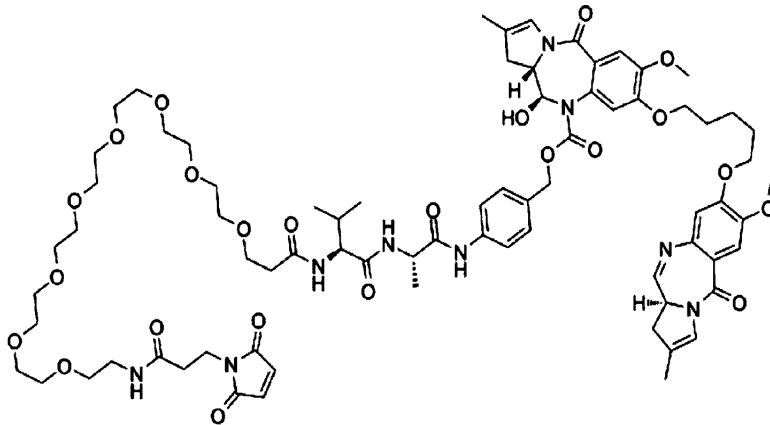
링커의 일 양태로서, 예를 들어 $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Val-Cit-PAB$, $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Val-Ala-PAB$, $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Val-Lys(Ac)-PAB$, $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Phe-Lys-PAB$, $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Phe-Lys(Ac)-PAB$, $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Ala-PAB$, $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-D-Val-Leu-Lys$, $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Gly-Gly-Arg$, $-(CH_2)_m-CO-NH-(CH_2CH_2O)_n-Ala-Ala-Asn-PAB$, $-(CH_2)_m-NH-CO-cBu-CO-Cit-PAB$, $-(CH_2)_m-Gly-Gly-Phe-Gly-CH_2-O-CH_2-CO-$ 중 어느 하나를 포함하는 링커를 들 수 있다. 여기서, m 은 1 내지 10의 정수를 나타내고, 바람직하게는 1이다. n 은 각각 1 내지 1000의 정수, 바람직하게는 1 내지 100의 정수, 보다 바람직하게는 1 내지 50의 정수, 더욱 바람직하게는 1 내지 20의 정수, 가장 바람직하게는 1 내지 15의 정수를 나타낸다. 또한 Ac는 아세틸기를 나타낸다. Lys(Ac)는 리신의 측쇄의 아미노기가 아세틸화되어 있는 것을 나타낸다.

[0152]

항체와 결합하기 전의 링커는 항체 및 약물과 결합할 수 있는 관능기를 갖고 있는 것이 바람직하다. 이러한 관능기의 예로서 α, β 불포화 카르보닐기, α, β 불포화 술피닐기, α, β 불포화 술폰닐기, 티올기, 아미노기, 히드록시아미노기, 히드라지드기, 히드라질기, 아미드기, 포르밀기, 카르복실기, 아지드기, 알킬닐기,

알케닐기, 할로알킬기 등을 들 수 있다. α, β 불포화 카르보닐기, 아미드기, 카르복실기의 카르보닐 탄소 원자에 인접하는 원자 그리고 α, β 불포화 카르보닐기 및 α, β 불포화 술폰닐기의 황 원자에 인접하는 분자로서는 탄소, 산소, 질소, 황 원자 등을 들 수 있다. 상기 α, β 불포화 카르보닐기로서는, 예를 들어 말레이미드기를 들 수 있다. 상기 알케닐기로서는, 예를 들어 비닐피리딜기를 들 수 있다. 상기 알킬닐기로서는, 예를 들어 BCN기(Bicyclo「6.1.0」non-4-yne) 및 DBCO기(Dibenzocyclooctyne)를 들 수 있다.

[0153] 본 발명의 ADC에 있어서의, 항체를 제외한 링커 약물 부분을 링커 페이로드라고도 칭한다. 본 발명의 링커 페이로드로서는, 예를 들어 하기 식으로 표시되는 SG3249(Med. Chem. Lett. 2016, 7, 983-987) 등의, PBD 다이머 페이로드 링커를 들 수 있다.



[0154]

[0155] 본 발명의 항체 유도체를 인간 FCRL1의 검출 및 측정 그리고 인간 FCRL1 관련 질환의 진단에 사용하는 경우에, 당해 항체에 결합하는 약제로서는, 통상의 면역학적 검출 또는 측정법에서 사용되는 표지체를 들 수 있다. 표지체로서는, 예를 들어 알칼리 포스파타아제, 퍼옥시다아제 혹은 루시페라아제 등의 효소, 아크리디늄에스테르 혹은 로핀 등의 발광 물질, 또는 플루오레세인이소티오시아네이트(FITC) 혹은 테트라메틸로다민이소티오시아네이트(RITC) 등의 형광 물질 등을 들 수 있다.

[0156] 또한, 본 발명은, 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는 조성물을 포함한다.

[0157] 또한, 본 발명은, 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 유효 성분으로서 함유하는, 인간 FCRL1 관련 질환의 치료약에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 투여하는 것을 포함하는, 인간 FCRL1 관련 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[0158] 인간 FCRL1 관련 질환으로서, 인간 FCRL1 또는 인간 FCRL1의 리간드가 관여하는 질환이면 어떠한 것이어도 되고, 예를 들어 암, 자기 면역 질환 및 염증성 질환을 들 수 있다. 암 질환으로서, 예를 들어 비만성 대세포형 B 세포성 림프종, 여포성 림프종, B 세포 림프종, 호지킨 림프종, 만성 림프성 백혈병, 유모세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, 여포 변연대 림프종, 소림프구성 림프종 등을 들 수 있다. 자기 면역 질환 또는 염증성 질환으로서, 예를 들어 관절 류머티즘, 다발성 경화증, 만성 폐색 폐질환, 전신성 에리테마토데스, 루푸스신염, 천식, 아토피성 피부 염증성 대장염, 크론병 또는 베체트병 등을 들 수 있다.

[0159] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 함유하는 치료제는, 유효 성분으로서의 해당 항체 또는 해당 항체 단편만을 포함하는 것이어도 되지만, 통상은 약리학적으로 허용되는 1 이상의 담체와 함께 혼합하여, 제제학의 기술 분야에 있어서 공지된 임의의 방법에 의해 제조한 의약 제제로서 제공하는 것이 바람직하다.

[0160] 투여 경로는, 치료 시에 가장 효과적인 것을 사용하는 것이 바람직하고, 경구 투여 또는 구강 내, 기도 내, 직장 내, 피하, 근육 내 혹은 정맥 내 등의 비경구 투여를 들 수 있고, 바람직하게는 정맥 내 투여를 들 수 있다. 투여 형태로서는, 예를 들어 분무제, 캡슐제, 정제, 산제, 과립제, 시럽제, 유제, 좌제, 주사제, 연고 또는 테이프제 등을 들 수 있다.

[0161] 투여량 또는 투여 횟수는, 목적으로 하는 치료 효과, 투여 방법, 치료 기간, 연령 및 체중 등에 따라서 다르지만, 통상 성인 1일당 10 μ g/kg 내지 10mg/kg이다.

- [0162] 본 발명은, 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 함유하는, FCRL1의 검출 또는 측정용 시약에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용한 FCRL1의 검출 또는 측정 방법에 관한 것이다. 본 발명에 있어서 인간 FCRL1을 검출 또는 측정하는 방법으로서, 임의의 공지된 방법을 들 수 있다. 예를 들어, 면역학적 검출 또는 측정 방법 등을 들 수 있다.
- [0163] 면역학적 검출 또는 측정 방법이란, 표지를 실시한 항원 또는 항체를 사용하여, 항체량 또는 항원량을 검출 또는 측정하는 방법이다. 면역학적 검출 또는 측정 방법으로서, 예를 들어 방사성 물질 표지 면역 항체법(RIA), 효소 면역 측정법(EIA 또는 ELISA), 형광 면역 측정법(FIA), 발광 면역 측정법(luminescent immunoassay), 웨스턴 블롯법 또는 물리 화학적 방법 등을 들 수 있다.
- [0164] 본 발명은, 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는, FCRL1 관련 질환의 진단약, 또는 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용하여 FCRL1의 검출 또는 측정하는 것을 포함하는, FCRL1 관련 질환의 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용하여, 상기 방법에 따라서 인간 FCRL1이 발현된 세포를 검출 또는 측정함으로써, 인간 FCRL1이 관련되는 질환을 진단할 수 있다.
- [0165] 본 발명에 있어서 인간 FCRL1을 검출 또는 측정하는 대상이 되는 생체 시료로서는, 예를 들어 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 체액, 오줌, 분변, 조직액 또는 배양액 등, 인간 FCRL1 또는 인간 FCRL1이 발현되고 있는 세포를 포함할 가능성이 있는 것이면 특별히 한정되지 않는다.
- [0166] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 함유하는 진단약은, 목적으로 하는 진단법에 따라서, 항원 항체 반응을 행하기 위한 시약, 해당 반응의 검출용 시약을 포함해도 된다. 항원 항체 반응을 행하기 위한 시약으로서, 완충제, 염 등을 들 수 있다. 검출용 시약으로서, 해당 모노클로날 항체 혹은 해당 항체 단편을 인식하는 표지된 2차 항체, 또는 표지에 대응한 기질 등의 통상의 면역학적 검출 또는 측정법에 사용되는 시약을 들 수 있다.
- [0167] 또한, 본 발명은, FCRL1 관련 질환의 치료약 혹은 진단약의 제조를 위한, 항인간 FCRL1 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편의 사용에 관한 것이다.
- [0168] 이하에, 본 발명의 항체 제조 방법, 질환의 치료 방법, 및 질환의 진단 방법에 대해서, 구체적으로 설명한다.
- [0169] 1. 항체의 제조 방법
- [0170] (1) 항원의 조제
- [0171] 항원이 되는 인간 FCRL1 또는 인간 FCRL1 발현 세포는, 인간 FCRL1 전체 길이 또는 그 부분 길이를 코딩하는 cDNA를 포함하는 발현 벡터를, 대장균, 효모, 곤충 세포 또는 동물 세포 등에 도입함으로써 얻을 수 있다. 또한, 인간 FCRL1은, 인간 FCRL1을 다량으로 발현하고 있는 각종 인간 세포주, 인간 세포 및 인간 조직 등으로부터 인간 FCRL1을 정제함으로써 얻을 수 있다. 또한, 이들 인간 세포주, 인간 세포 및 인간 조직 등을 그대로 항원으로서 사용할 수도 있다. 추가로, Fmoc법 또는 tBoc법 등의 화학 합성법에 의해 인간 FCRL1의 부분 서열을 갖는 합성 펩티드를 조제하여, 항원에 사용할 수도 있다. 인간 FCRL1 또는 인간 FCRL1의 부분 서열을 갖는 합성 펩티드에는, C 말단 또는 N 말단에 FLAG 또는 His 등의 공지된 태그가 부가되어 있어도 된다.
- [0172] 본 발명에서 사용되는 인간 FCRL1은, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)나 Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997) 등에 기재된 방법 등을 사용하여, 예를 들어 이하의 방법에 의해, 해당 인간 FCRL1을 코딩하는 DNA를 숙주 세포 중에서 발현시켜, 제조할 수 있다.
- [0173] 먼저, 인간 FCRL1을 코딩하는 부분을 포함하는 완전 길이 cDNA를 적당한 발현 벡터의 프로모터 하류에 삽입함으로써, 재조합 벡터를 제작한다. 상기 완전 길이 cDNA 대신에, 완전 길이 cDNA를 바탕으로 하여 조제된, 폴리펩티드를 코딩하는 부분을 포함하는 적당한 길이의 DNA 단편을 사용해도 된다. 이어서, 얻어진 해당 재조합 벡터를, 해당 발현 벡터에 적합한 숙주 세포에 도입함으로써, 폴리펩티드를 생산하는 형질 전환체를 얻을 수 있다.
- [0174] 발현 벡터로서는, 사용하는 숙주 세포에 있어서의 자율 복제 또는 염색체 증으로의 도입이 가능하며, 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 전사할 수 있는 위치에, 적당한 프로모터를 함유하고 있는 것이면 모두 사용할 수 있다. 숙주 세포로서는, 대장균 등의 에스케리키아속 등에 속하는 미생물, 효모, 곤충 세포 또는 동물 세포 등, 목적으로 하는 유전자를 발현할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있다.

- [0175] 대장균 등의 원핵 생물을 숙주 세포로서 사용하는 경우, 재조합 벡터는, 원핵 생물 중에서 자율 복제가 가능한 동시에, 프로모터, 리보솜 결합 서열, 인간 FCRL1을 코딩하는 부분을 포함하는 DNA, 및 전사 종결 서열을 포함하는 벡터인 것이 바람직하다. 또한, 해당 재조합 벡터에는, 전사 종결 서열은 반드시 필요하지는 않지만, 구조 유전자의 바로 아래에 전사 종결 서열을 배치하는 것이 바람직하다. 또한, 해당 재조합 벡터에는, 프로모터를 제어하는 유전자를 포함하고 있어도 된다.
- [0176] 해당 재조합 벡터로서는, 리보솜 결합 서열인 샤인·달가노 서열(SD 서열이라고도 함)과 개시 코돈 사이를 적당한 거리(예를 들어 6 내지 18 염기)로 조절한 플라스미드를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0177] 또한, 해당 인간 FCRL1을 코딩하는 DNA의 염기 서열로서는, 숙주 내에서의 발현에 최적의 코돈이 되도록 염기를 치환할 수 있고, 이것에 의해 목적으로 하는 인간 FCRL1의 생산율을 향상시킬 수 있다.
- [0178] 발현 벡터로서는, 사용하는 숙주 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 pBTrp2, pBTac1, pBTac2(이상, 로슈·다이아그노스틱스사제), pKK233-2(파머시아사제), pSE280(인비트로젠사제), pGEMEX-1(프로메가사제), pQE-8(퀴아젠사제), pKYP10(일본 특허 공개 소58-110600호 공보), pKYP200[Agricultural Biological Chemistry, 48, 669(1984)], pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277(1989)], pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306(1985)], pBluescript II SK(-)(스트라타진사제), pTrs30[대장균 JM109/pTrs30(FERM BP-5407)으로부터 조제], pTrs32[대장균 JM109/pTrs32(FERM BP-5408)로부터 조제], pGHA2[대장균 IGHA2(FERM BP-400)로부터 조제, 일본 특허 공개 소60-221091호 공보], pGKA2[대장균 IGKA2(FERM BP-6798)으로부터 조제, 일본 특허 공개 소60-221091호 공보], pTerm2(미국 특허 제4,686,191호 명세서, 미국 특허 제4,939,094호 명세서, 미국 특허 제160,735호 명세서), pSupex, pUB110, pTP5, pC194, pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392(1990)], pGEX(파머시아사제), pET 시스템(노바젠사제) 또는 pME18SFL3 등을 들 수 있다.
- [0179] 프로모터로서는, 사용하는 숙주 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 어떠한 것이어도 된다. 예를 들어, trp 프로모터(Ptrp), lac 프로모터, PL 프로모터, PR 프로모터 또는 T7 프로모터 등의, 대장균 또는 파지 등에서 유래하는 프로모터를 들 수 있다. 또한, 예를 들어 Ptrp를 2개 직렬시킨 탠덤 프로모터, tac 프로모터, lacT7 프로모터 또는 let I 프로모터 등의 인위적으로 설계 개변된 프로모터 등을 들 수 있다.
- [0180] 숙주 세포로서는, 예를 들어 대장균 XL1-Blue, 대장균 XL2-Blue, 대장균 DH1, 대장균 MC1000, 대장균 KY3276, 대장균 W1485, 대장균 JM109, 대장균 HB101, 대장균 No.49, 대장균 W3110, 대장균 NY49 또는 대장균 DH5 α 등을 들 수 있다.
- [0181] 숙주 세포에의 재조합 벡터의 도입 방법으로서, 사용하는 숙주 세포에 DNA를 도입하는 방법이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 칼슘 이온을 사용하는 방법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110(1972), Gene, 17, 107(1982), Molecular & General Genetics, 168, 111(1979)]을 들 수 있다.
- [0182] 동물 세포를 숙주로서 사용하는 경우, 발현 벡터로서는, 동물 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 pcDNA1, pCDM8(후나코시사제), pAGE107[일본 특허 공개 평 3-22979호 공보; Cytotechnology, 3, 133(1990)], pAS3-3(일본 특허 공개 평2-227075호 공보), pCDM8[Nature, 329, 840(1987)], pcDNA1/Amp(인비트로젠사제), pcDNA3.1(인비트로젠사제), pREP4(인비트로젠사제), pAGE103[J. Biochemistry, 101, 1307(1987)], pAGE210, pME18SFL3, pKANTEX93(국제 공개 제97/10354호), N5KG1val(미국 특허 제6,001,358호 명세서), INPEP4(Biogen-IDEC사제) 및 트랜스포존 벡터(국제 공개 제2010/143698호) 등을 들 수 있다.
- [0183] 프로모터로서는, 동물 세포 중에서 기능을 발휘할 수 있는 것이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 사이토메갈로바이러스(CMV)의 즉각적인 초기(immediate early)(IE) 유전자의 프로모터, SV40의 초기 프로모터, 레트로바이러스의 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 히트 쇼크 프로모터, SRα 프로모터 또는 몰로니 마우스 백혈병 바이러스의 프로모터 혹은 인헨서를 들 수 있다. 또한, 인간 CMV의 IE 유전자의 인헨서를 프로모터와 함께 사용해도 된다.
- [0184] 숙주 세포로서는, 예를 들어 인간 백혈병 세포 Namalwa 세포, 원숭이 세포 COS 세포, 차이니즈·햄스터 난소 세포 CHO 세포[Journal of Experimental Medicine, 108, 945(1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275(1968); Genetics, 55, 513(1968); Chromosoma, 41, 129(1973); Methods in Cell Science, 18, 115(1996); Radiation Research, 148, 260(1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275(1968); Cell, 6, 121(1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, II(pp. 883-900)];

디히드로엽산 환원 효소 유전자(이하, dhfr이라 표기함)가 결손된 CHO 세포(CHO/DG44 세포)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)], CHO-K1(ATCC CCL-61), DUKXB11(ATCC CCL-9096), Pro-5(ATCC CCL-1781), CHO-S(Life Technologies, Cat#11619), Pro-3, 래트 미엘로마 세포 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(또는 YB2/0이라고도 함), 마우스 미엘로마 세포 NS0, 마우스 미엘로마 세포 SP2/0-Ag14, 시리안 햄스터 세포 BHK 또는 HBT5637(일본 특허 공개 소63-000299호 공보) 등을 들 수 있다.

[0185] 숙주 세포에의 재조합 벡터의 도입 방법으로서, 동물 세포에 DNA를 도입하는 방법이면 모두 사용할 수 있지만, 예를 들어 일렉트로포레이션법[Cytotechnology, 3, 133(1990)], 인산칼슘법(일본 특허 공개 평2-227075호 공보) 또는 리포펙션법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)] 등을 들 수 있다.

[0186] 이상과 같이 하여 얻어지는 인간 FCRL1을 코딩하는 DNA를 조립한 재조합 벡터를 보유하는 미생물 또는 동물 세포 등의 유래의 형질 전환체를 배지 중에서 배양하고, 배양액 중에 해당 인간 FCRL1을 생성 축적시켜, 해당 배양액으로부터 채취함으로써, 인간 FCRL1을 제조할 수 있다. 해당 형질 전환체를 배지 중에서 배양하는 방법은, 숙주의 배양에 사용되는 통상의 방법에 따라서 행할 수 있다.

[0187] 진핵 생물 유래의 세포에서 발현시켰을 경우에는, 당 또는 당쇄가 부가된 인간 FCRL1을 얻을 수 있다.

[0188] 유도성의 프로모터를 사용한 재조합 벡터로 형질 전환한 미생물을 배양할 때에는, 필요에 따라서 인두서를 배지에 첨가해도 된다. 예를 들어, lac 프로모터를 사용한 재조합 벡터로 형질 전환한 미생물을 배양하는 경우에는 이소프로필-β-D-티오갈락토포라노시드 등을, trp 프로모터를 사용한 재조합 벡터로 형질 전환한 미생물을 배양하는 경우에는 인돌아크릴산 등을 배지에 첨가해도 된다.

[0189] 동물 세포를 숙주로 하여 얻어진 형질 전환체를 배양하는 배지로서는, 예를 들어 일반적으로 사용되고 있는 RPMI1640 배지[The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)], Eagle의 MEM 배지[Science, 122, 501(1952)], 돌베코 개변 MEM 배지[Virology, 8, 396(1959)], 199 배지[Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1(1950)] 혹은 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM) 배지 또는 이들 배지에 소태아 혈청(FBS) 등을 첨가한 배지 등을 들 수 있다. 배양은, 통상 pH 6 내지 8, 30 내지 40°C, 5% CO₂ 존재 하 등의 조건 하에서 1 내지 7일간 행한다. 또한, 배양중에 필요에 따라서, 카나마이신 또는 페니실린 등의 항생 물질을 배지에 첨가해도 된다.

[0190] 인간 FCRL1을 코딩하는 유전자의 발현 방법으로서, 예를 들어 직접 발현 이외에도, 분비 생산 또는 융합 단백질 발현 등의 방법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]을 들 수 있다.

[0191] 인간 FCRL1의 생산 방법으로서, 예를 들어 숙주 세포 내에 생산시키는 방법, 숙주 세포 외에 분비시키는 방법, 또는 숙주 세포 외막 상에 생산시키는 방법을 들 수 있고, 사용하는 숙주 세포 또는 생산시키는 인간 FCRL1의 구조를 바꿈으로써, 적절한 방법을 선택할 수 있다.

[0192] 인간 FCRL1이 숙주 세포 내 또는 숙주 세포 외막 상에 생산되는 경우, 폴슨 등의 방법[J. Biol. Chem., 264, 17619(1989)], 로우 등의 방법[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227(1989), Genes Develop., 4, 1288(1990)], 일본 특허 공개 평 05-336963호 공보 또는 국제 공개 제94/23021호 등에 기재된 방법을 사용함으로써, 인간 FCRL1을 숙주 세포 외에 적극적으로 분비시킬 수 있다. 또한, 디히드로엽산 환원 효소 유전자 등을 사용한 유전자 증폭제(일본 특허 공개 평2-227075호 공보)를 이용하여 인간 FCRL1의 생산량을 상승시킬 수도 있다.

[0193] 얻어진 인간 FCRL1은, 예를 들어 이하와 같이 하여 단리, 정제할 수 있다. 인간 FCRL1이 세포 내에 용해 상태로 발현된 경우에는, 배양 종료 후에 세포를 원심 분리에 의해 회수하고, 수계 완충액에 현탁 후, 초음파 파쇄기, 프렌치 프레스, 만톤 가울린 호모게나이저 또는 다이노 밀 등을 사용하여 세포를 파쇄하여, 무세포 추출액을 얻는다. 해당 무세포 추출액을 원심 분리함으로써 얻어지는 상청으로부터, 통상의 단백질 단리 정제법, 즉, 용매 추출법, 황산암모늄 등에 의한 염석법, 탈염법, 유기 용매에 의한 침전법, 디에틸아미노에틸(DEAE)-세파로스, DIAION HPA-75(미쯔비시 가가꾸사제) 등의 레진을 사용한 음이온 교환 크로마토그래피법, S-세파로스 FF(파머시아사제) 등의 레진을 사용한 양이온 교환 크로마토그래피법, 부틸세파로스, 페닐세파로스 등의 레진을 사용한 소수성 크로마토그래피법, 분자체를 사용한 겔 여과법, 친화성 크로마토그래피법, 크로마토그래피 포커싱법, 또는 등전점 전기 영동 등의 전기 영동법 등의 방법을 단독 또는 조합하여 사용하고, 정제 표품을 얻을 수 있다.

- [0194] 인간 FCRL1이 세포 내에 불용체를 형성하여 발현된 경우에는, 상기와 마찬가지로 세포를 회수 후 파쇄하고, 원심 분리를 행함으로써, 침전 분획으로서 해당 인간 FCRL1의 불용체를 회수한다. 회수한 해당 인간 FCRL1의 불용체를 단백질 변성제로 가용화한다. 해당 가용화액을 회석 또는 투석함으로써, 해당 인간 FCRL1을 정상적인 입체 구조로 되돌린 후, 상기와 마찬가지로의 단리 정제법에 의해 폴리펩티드의 정제 표품을 얻을 수 있다.
- [0195] 인간 FCRL1 또는 그 당 수식체 등의 유도체가 세포 외에 분비되었을 경우에는, 배양 상청에 있어서 해당 인간 FCRL1 또는 그 당 수식체 등의 유도체를 회수할 수 있다. 해당 배양물을 상기와 마찬가지로 원심 분리 등의 방법에 의해 처리함으로써 가용성 분획을 취득하고, 해당 가용성 분획으로부터, 상기와 마찬가지로의 단리 정제법을 사용함으로써, 정제 표품을 얻을 수 있다.
- [0196] 본 발명에 있어서 사용되는 인간 FCRL1의 아미노산 서열 부분 서열을 포함하는 폴리펩티드는, 당업자에게 공지된 방법에 의해 제작할 수 있다. 구체적으로는, 인간 FCRL1의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA의 일부를 결실시켜, 이것을 포함하는 발현 벡터를 도입한 형질 전환체를 배양함으로써 제작할 수 있다. 또한, 상기 방법에 준하여, 인간 FCRL1의 아미노산 서열에 있어서 1 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 얻을 수 있다.
- [0197] 또한, 본 발명에 있어서 사용되는 인간 FCRL1은, Fmoc법 또는 tBoc법 등의 화학 합성법에 의해서도 제조할 수 있다. 또한, 어드밴스드 캠텍사제, 퍼킨·엘머사제, 파머시아사제, 프로테인 테크놀로지 인스트루먼트사제, 신세셀-베가사제, 퍼셉티브사제 또는 시마즈 세이사쿠쇼사제 등의 펩티드 합성기를 이용하여 화학 합성할 수도 있다.
- [0198] (2) 동물의 면역과 융합용 항체 산생 세포의 조제
- [0199] 3 내지 20주령의 마우스, 래트 또는 햄스터 등의 동물에, (1)에서 얻어지는 항원을 면역시켜, 그 동물의 비장, 림프절, 말초혈 중의 항체 산생 세포를 채취한다. 또한, 마우스 FCRL1 녹아웃 마우스를 피면역 동물로서 사용할 수도 있다.
- [0200] 면역은, 동물의 피하, 정맥 내 또는 복강 내에, 예를 들어 프로인드의 완전 아쥬반트, 또는 수산화알루미늄염과 백일해균 백신 등의 적당한 아쥬반트와 함께 항원을 투여함으로써 행한다. 항원이 부분 펩티드일 경우에는, BSA(소혈청 알부민) 또는 KLH(Keyhole Limpet hemocyanin) 등의 캐리어 단백질과 콘주게이트를 제작하여, 이것을 면역원으로서 사용한다.
- [0201] 항원의 투여는 1회째의 투여 후, 1 내지 2주일 간격으로 5 내지 10회 행한다. 각 투여 후 3 내지 7일째에 채혈하고, 그 혈청의 항체값을 효소 면역 측정법[Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 등을 사용하여 측정한다. 면역에 사용한 항원에 대하여, 그 혈청이 충분한 항체값을 나타낸 동물을 융합용 항체 산생 세포의 공급원으로 한다.
- [0202] 항원의 최종 투여 후 3 내지 7일째에, 면역한 동물로부터 비장 등의 항체 산생 세포를 포함하는 조직을 적출하고, 항체 산생 세포를 채취한다. 비장 세포를 사용하는 경우에는, 비장을 세단하여 쪼른 후, 원심 분리하고, 추가로 적혈구를 제거하여 융합용 항체 산생 세포를 취득한다.
- [0203] (3) 골수종 세포의 조제
- [0204] 골수종 세포로서는, 마우스로부터 얻어진 주화 세포를 사용하여, 예를 들어 8-아자구아닌 내성 마우스(BALB/c 유래) 골수종 세포주 P3-X63Ag8-U1(P3-U1)[Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1(1978)], P3-NS1/1-Ag41(NS-1)[European J. Immunology, 6, 511(1976)], SP2/0-Ag14(SP-2)[Nature, 276, 269(1978)], P3-X63-Ag8653(653)[J. Immunology, 123, 1548(1979)] 또는 P3-X63-Ag8(X63)[Nature, 256, 495(1975)] 등이 사용된다.
- [0205] 해당 골수종 세포는 정상 배지[글루타민, 2-머캅토에탄올, 젠타마이신, FBS 및 8-아자구아닌을 첨가한 RPMI1640 배지]로 계대하고, 세포 융합의 3 내지 4일 전에 정상 배지에 계대하여, 융합 당일 2×10^7 개 이상의 세포수를 확보한다.
- [0206] (4) 세포 융합과 모노클로날 항체 산생 하이브리도마의 조제
- [0207] (2)에서 얻어지는 융합용 항체 산생 세포와 (3)에서 얻어지는 골수종 세포를 최소 필수 배지(Minimum Essential Medium)(MEM) 배지 또는 PBS(인산2나트륨 1.83g, 인산1칼륨 0.21g, 식염 7.65g, 증류수 1리터, pH 7.2)로 잘 세정하고, 세포수가, 융합용 항체 산생 세포:골수종 세포=5 내지 10:1이 되도록 혼합하고, 원심 분리한 후, 상

청을 제거한다. 침전된 세포군을 잘 쏜 후, 폴리에틸렌글리콜-1000(PEG-1000), MEM 배지 및 디메틸설폭시드의 혼합액을 37℃에서, 교반하면서 첨가한다. 또한 1 내지 2분간마다 MEM 배지 1 내지 2mL를 수회 첨가한 후, MEM 배지를 첨가하여 전량이 50mL가 되도록 한다. 원심 분리 후, 상청을 제거한다. 침전된 세포군을 서서히 쏜 후, 융합용 항체 산생 세포에 HAT 배지[히포크산틴, 티미딘 및 아미노프테린을 첨가한 정상 배지] 중에 서서히 세포를 현탁시킨다. 이 현탁액을 5% CO₂ 인큐베이터 중, 37℃에서 7 내지 14일간 배양한다.

[0208] 배양 후, 배양 상청의 일부를 발취하고, 후술하는 바인딩 어세이 등의 하이브리도마의 선택 방법에 의해, 인간 FCRL1을 포함하는 항원에 반응하고, 인간 FCRL1을 포함하지 않는 항원에 반응하지 않는 세포군을 선택한다. 이어서, 한계 희석법에 의해 클로닝을 행하여, 안정하며 강한 항체값이 확인된 것을 모노클로날 항체 산생 하이브리도마로서 선택한다.

[0209] (5) 정제 모노클로날 항체의 조제

[0210] 프리스탄 처리[2,6,10,14-테트라메틸펜타데칸(Pristane) 0.5mL를 복강 내 투여하고, 2주일 사육함]한 8 내지 10 주령의 마우스 또는 누드 마우스에, (4)에서 얻어지는 모노클로날 항체 산생 하이브리도마를 복강 내에 주사한다. 10 내지 21일에 하이브리도마는 복수암화한다. 이 마우스로부터 복수를 채취하고, 원심 분리하여 고형분을 제거 후, 40 내지 50% 황산암모늄으로 염석하고, 카프릴산 침전법, DEAE-세파로스 칼럼, 프로테인 A-칼럼 또는 겔 여과 칼럼에 의한 정제를 행하고, IgG 또는 IgM 분획을 모아, 정제 모노클로날 항체로 한다.

[0211] 또한, (4)에서 얻어지는 모노클로날 항체 산생 하이브리도마를, 10% FBS를 첨가한 RPMI1640 배지 등에서 배양한 후, 원심 분리에 의해 상청을 제거하여, 하이브리도마 SFM 배지에 현탁시키고, 3 내지 7일간 배양한다. 얻어진 세포 현탁액을 원심 분리하여, 얻어진 상청으로부터 프로테인 A-칼럼 또는 프로테인 G-칼럼에 의한 정제를 행하고, IgG 분획을 모아, 정제 모노클로날 항체를 얻을 수도 있다. 또한, 하이브리도마 SFM 배지에는 5% 다이고 GF21을 첨가할 수도 있다.

[0212] 항체의 서브클래스 결정은, 서브클래스 타이핑 키트를 사용하여 효소 면역 측정법에 의해 행한다. 단백질량의 정량은 로리법 또는 280nm에서의 흡광도로부터 산출한다.

[0213] (6) 모노클로날 항체의 선택

[0214] 모노클로날 항체의 선택은 이하에 기재한 바와 같이, 플로 사이토메트리를 사용하여, 인간 FCRL1 발현 세포에의 항체의 결합성을 측정하는 것 등에 의해 행한다. 인간 FCRL1 발현 세포는, 세포 표면 상에 인간 FCRL1이 발현되고 있으면 어느 세포여도 되고, 예를 들어 인간 세포, 인간 세포주 및 (1)에서 얻어지는 인간 FCRL1 강제 발현 세포주 등을 들 수 있다.

[0215] 인간 FCRL1 발현 세포를 96웰 플레이트 등의 플레이트에 분주한 후, 제1 항체로서 혈청, 하이브리도마의 배양 상청 또는 정제 모노클로날 항체 등의 피험 물질을 분주하여, 반응시킨다. 반응 후의 세포를 1 내지 10% 소테아 혈청 알부민(BSA)을 포함하는 PBS(이하, BSA-PBS라 기재함) 등으로, 잘 세정한 후, 제2 항체로서 형광 시약 등으로 표지한 항이뮤노글로불린 항체를 분주하여 반응시킨다. BSA-PBS 등으로 잘 세정한 후, 플로 사이토미터를 사용하여 표지화 항체의 형광량을 측정함으로써, 인간 FCRL1 발현 세포에 대하여 특이적으로 반응하는 모노클로날 항체를 선택한다.

[0216] 또한, 본 발명의 항체와 경합하여 인간 FCRL1에 결합하는 항체는, 상술한 플로 사이토메트리를 사용한 측정계에, 피험 항체를 첨가하여 반응시킴으로써 취득할 수 있다. 즉, 피험 항체를 첨가했을 때에 본 발명의 항체와 인간 FCRL1의 결합이 저해되는 항체를 스크리닝함으로써, 인간 FCRL1의 아미노산 서열, 또는 그 입체 구조에의 결합에 대해서, 본 발명의 항체와 경합하는 모노클로날 항체를 취득할 수 있다.

[0217] 또한, 본 발명의 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체가 결합하는 에피토프를 포함하는 에피토프에 결합하는 항체는, 상술한 스크리닝 방법으로 취득된 항체의 에피토프를 공지된 방법으로 동정하고, 동정한 에피토프를 포함하는 합성 펩티드, 또는 에피토프의 입체 구조에 의대시킨 합성 펩티드 등을 제작하여, 면역함으로써 취득할 수 있다.

[0218] 추가로, 본 발명의 인간 FCRL1에 결합하는 모노클로날 항체가 결합하는 에피토프와, 동일한 에피토프에 결합하는 항체는, 상술한 스크리닝 방법으로 취득된 항체의 에피토프를 동정하고, 동정한 에피토프의 부분적인 합성 펩티드, 또는 에피토프의 입체 구조에 의대시킨 합성 펩티드 등을 제작하여, 면역함으로써 취득할 수 있다.

[0219] 2. 유전자 재조합 항체의 제작

- [0220] 유전자 재조합 항체의 제작예로서, 이하에 인간형 키메라 항체 및 인간화 항체의 제작 방법을 나타낸다. 유전자 재조합의 마우스 항체, 래트 항체 및 래빗 항체 등도 마찬가지로 방법으로 제작할 수 있다.
- [0221] (1) 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 구축
- [0222] 유전자 재조합 항체 발현용 벡터는, 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA가 조립된 동물 세포용 발현 벡터이며, 동물 세포용 발현 벡터에 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA를 각각 클로닝함으로써 구축할 수 있다.
- [0223] 인간 항체의 C 영역은 임의의 인간 항체의 CH 및 CL을 사용할 수 있다. 예를 들어, 인간 항체의 $\gamma 1$ 서브클래스의 CH 및 κ 클래스의 CL 등을 사용한다. 인간 항체의 CH 및 CL을 코딩하는 DNA에는, cDNA를 사용하지만, 엑손과 인트론을 포함하는 염색체 DNA를 사용할 수도 있다. 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 DNA에, 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈을 부가, 삽입 또는 치환함으로써, 해당하는 위치에 아미노산 잔기를 부가, 삽입 또는 치환할 수 있다. 동물 세포용 발현 벡터에는, 인간 항체의 C 영역을 코딩하는 유전자를 도입하여 발현할 수 있는 것이라면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, pAGE107[Cytotechnol., 3, 133(1990)], pAGE103[J. Biochem., 101, 1307(1987)], pHSG274[Gene, 27, 223(1984)], pKCR[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527(1981)], pSG1bd2-4[Cytotechnol., 4, 173(1990)] 또는 pSE1UK1Sed1-3[Cytotechnol., 13, 79(1993)] 등을 사용한다. 동물 세포용 발현 벡터 중 프로모터와 인핸서에는, SV40의 초기 프로모터[J. Biochem., 101, 1307(1987)], 모로니 마우스 백혈병 바이러스 LTR[Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960(1987)] 또는 먼역 글로불린 H쇄의 프로모터[Cell, 41, 479(1985)]와 인핸서 [Cell, 33, 717(1983)] 등을 들 수 있다.
- [0224] 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에는, 유전자 재조합 항체 발현 벡터의 구축 용이함, 동물 세포로의 도입의 용이함, 동물 세포 내에서의 항체 H쇄 및 L쇄의 발현량의 밸런스가 균형되는 등의 점에서, 항체 H쇄 및 L쇄가 동일한 벡터 상에 존재하는 타입(탠덤형)의 유전자 재조합 항체 발현용 벡터[J. Immunol. Methods, 167, 271(1994)]를 사용하지만, 항체 H쇄 및 L쇄가 개개의 벡터 상에 존재하는 타입을 사용할 수도 있다. 탠덤형의 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에는, pKANTEX93(국제 공개 제97/10354호 공보), pEE18[하이브리도마, 17, 559(1998)] 등을 사용한다.
- [0225] (2) 인간 이외의 동물 유래의 항체의 V 영역을 코딩하는 cDNA의 취득 및 아미노산 서열의 해석
- [0226] 비인간 항체의 VH 및 VL을 코딩하는 cDNA의 취득 및 아미노산 서열의 해석은 이하와 같이 하여 행할 수 있다.
- [0227] 비인간 항체를 산생하는 하이브리도마 세포로부터 mRNA를 추출하여, cDNA를 합성한다. 합성한 cDNA를 파지 또는 플라스미드 등의 벡터에 클로닝하여 cDNA 라이브러리를 제작한다. 해당 라이브러리로부터, 마우스 항체의 C 영역 부분 또는 V 영역 부분을 코딩하는 DNA를 프로브로서 사용하고, VH 혹은 VL을 코딩하는 cDNA를 갖는 재조합 파지 또는 재조합 플라스미드를 각각 단리한다. 재조합 파지 또는 재조합 플라스미드 상의 목적으로 하는 마우스 항체의 VH 또는 VL의 전체 염기 서열을 각각 결정하고, 염기 서열로부터 VH 또는 VL의 전체 아미노산 서열을 각각 추정한다.
- [0228] 비인간 항체를 산생하는 하이브리도마 세포를 제작하는 인간 이외의 동물에는, 마우스, 래트, 햄스터 또는 래빗 등을 사용하지만, 하이브리도마 세포를 제작하는 것이 가능하면, 어떠한 동물도 사용할 수 있다.
- [0229] 하이브리도마 세포로부터의 전체 RNA의 조제에는, 티오시안산구아니딘-트리플루오로아세트산세습법[Methods in Enzymol., 154, 3(1987)], 또는 RNA easy kit(키아젠사제) 등의 키트 등을 사용한다.
- [0230] 전체 RNA로부터의 mRNA의 조제에는, 올리고(dT) 고정화 셀룰로오스 칼럼법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)], 또는 Oligo-dT30<Super>mRNA Purification(등록 상표) Kit(다카라 바이오사제) 등의 키트 등을 사용한다. 또한, Fast Track mRNA Isolation(등록 상표) Kit(인비트로젠사제), 또는 QuickPrep mRNA Purification(등록 상표) Kit(파머시아사제) 등의 키트를 사용하여 하이브리도마 세포로부터 mRNA를 조제할 수도 있다.
- [0231] cDNA의 합성 및 cDNA 라이브러리의 제작에는, 공지된 방법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons(1987-1997)], 또는 SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(인비트로젠사제) 혹은 ZAP-cDNA Synthesis(등록 상표) Kit(스트라타진사제) 등의 키트 등을 사용한다.
- [0232] cDNA 라이브러리의 제작 시, 하이브리도마 세포로부터 추출한 mRNA를 주형으로 하여 합성한 cDNA를 도입하는 벡터에는, 해당 cDNA를 도입하는 벡터라면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, ZAP

Express[Strategies, 5, 58(1992)], pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)], λ ZAPII(Stratagene사제), λ gt10, λ gt11[DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49(1985)], Lambda BlueMid (클론테크사제), λ ExCell, pT7T3-18U(파머시아사제), pCD2[Mol. Cell. Biol., 3, 280(1983)] 또는 pUC18[Gene, 33, 103(1985)] 등을 사용한다.

[0233] 파지 또는 플라스미드 벡터에 의해 구축되는 cDNA 라이브러리를 도입하는 대장균에는, 해당 cDNA 라이브러리를 도입, 발현 및 유지할 수 있는 것이면 어떠한 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, XL1-Blue MRF'[Strategies, 5, 81(1992)], C600[Genetics, 39, 440(1954)], Y1088, Y1090[Science, 222, 778(1983)], NM522[J. Mol. Biol., 166, 1(1983)], K802[J. Mol. Biol., 16, 118(1966)] 또는 JM105[Gene, 38, 275(1985)] 등을 사용한다.

[0234] cDNA 라이브러리로부터의 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA 클론의 선택에는, 동위 원소 혹은 형광 표지한 프로브를 사용한 콜로니·하이브리다이제이션법, 또는 플라크·하이브리다이제이션법[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)] 등을 사용한다.

[0235] 또한, 프라이머를 조제하고, mRNA로부터 합성한 cDNA 또는 cDNA 라이브러리를 주형으로 하여, Polymerase Chain Reaction법[이하, PCR법이라 표기함, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons(1987-1997)]을 행함으로써 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 조제할 수도 있다.

[0236] 선택된 cDNA를, 적당한 제한 효소 등으로 절단 후, pBluescript SK(-)(스트라타진사제) 등의 플라스미드에 클로닝하고, 통상 사용되는 염기 서열 해석 방법 등에 의해 해당 cDNA의 염기 서열을 결정한다. 염기 서열 해석 방법에는, 예를 들어 디데옥시법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977)] 등의 반응을 행한 후, ABI PRISM3700(PE 바이오 시스템즈사제) 또는 A.L.F.DNA 시퀀서(파머시아사제) 등의 염기 서열 자동 분석 장치 등을 사용한다.

[0237] 결정한 염기 서열로부터 VH 및 VL의 전체 아미노산 서열을 각각 추정하고, 기지의 항체의 VH 및 VL의 전체 아미노산 서열[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]과 비교함으로써, 취득한 cDNA가 분비 시그널 서열을 포함하는 항체의 VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열을 코딩하고 있는지를 각각 확인한다. 분비 시그널 서열을 포함하는 항체의 VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열에 대해서는, 기지의 항체의 VH 및 VL의 전체 아미노산 서열[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]과 비교함으로써, 분비 시그널 서열의 길이 및 N 말단 아미노산 서열을 추정할 수 있고, 나아가 그들이 속하는 서브그룹을 알 수 있다. 또한, VH 및 VL의 각 CDR의 아미노산 서열에 대해서도, 기지의 항체의 VH 및 VL의 아미노산 서열[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]과 비교함으로써 알아낼 수 있다.

[0238] 또한, 얻어진 VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열을 사용하여, 예를 들어 SWISS-PROT 또는 PIR-Protein 등의 임의의 데이터베이스에 대하여 BLAST법[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)] 등의 유사성 검색을 행하여, VH 및 VL의 완전한 아미노산 서열이 신규의 것인지를 확인할 수 있다.

[0239] (3) 인간형 키메라 항체 발현 벡터의 구축

[0240] (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에, 각각 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 각각 클로닝함으로써, 인간형 키메라 항체 발현 벡터를 구축할 수 있다.

[0241] 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA의 3' 말단측과, 인간 항체의 CH 또는 CL의 5' 말단측을 연결하기 위해서, 연결 부분의 염기 서열이 적절한 아미노산을 코딩하며, 또한 적당한 제한 효소 인식 서열이 되도록 설계한 VH 및 VL의 cDNA를 제작한다. 제작된 VH 및 VL의 cDNA를, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에 그들이 적절한 형태로 발현하도록 각각 클로닝하여, 인간형 키메라 항체 발현 벡터를 구축한다.

[0242] 또한, 비인간 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를, 적당한 제한 효소의 인식 서열을 양단에 갖는 합성 DNA를 사용하여 PCR법에 의해 각각 증폭시키고, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에 클로닝할 수도 있다.

[0243] (4) 인간화 항체의 V 영역을 코딩하는 cDNA의 구축

- [0244] 인간화 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA는, 이하와 같이 하여 구축할 수 있다.
- [0245] 비인간 항체의 VH 또는 VL의 CDR의 아미노산 서열을 이식하기 위한, 인간 항체의 VH 또는 VL의 FR의 아미노산 서열을 각각 선택한다. 선택하는 FR의 아미노산 서열에는, 인간 항체 유래의 것이면, 어느 것이라도 사용할 수 있다. 예를 들어, Protein Data Bank 등의 데이터베이스에 등록되어 있는 인간 항체의 FR의 아미노산 서열, 또는 인간 항체의 FR의 각 서브그룹의 공통 아미노산 서열[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)] 등을 사용한다. 항체의 결합 활성의 저하를 억제하기 위해서, 원래의 항체의 VH 또는 VL의 FR의 아미노산 서열과 가능한 한 높은 유사성(적어도 60% 이상)의 FR의 아미노산 서열을 선택한다.
- [0246] 이어서, 선택한 인간 항체의 VH 또는 VL의 FR의 아미노산 서열에, 원래의 항체 CDR의 아미노산 서열을 각각 이식하고, 인간화 항체의 VH 또는 VL의 아미노산 서열을 각각 설계한다. 설계한 아미노산 서열을 항체의 유전자 염기 서열에 보이는 코돈의 사용 빈도[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]를 고려하여 DNA 서열로 변환하고, 인간화 항체의 VH 또는 VL의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열을 각각 설계한다.
- [0247] 설계한 DNA 서열에 기초하여, 100 염기 전후의 길이를 포함하는 수개의 합성 DNA를 합성하고, 그들을 사용하여 PCR 반응을 행한다. 이 경우, PCR 반응에서의 반응 효율 및 합성 가능한 DNA의 길이로부터, 바람직하게는 VH, VL 각각에 대하여 각 6개의 합성 DNA를 설계한다. 추가로, 양단에 위치하는 합성 DNA의 5' 또는 3' 말단에 적당한 제한 효소의 인식 서열을 도입함으로써, 인간화 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에 용이하게 클로닝할 수 있다.
- [0248] PCR 반응 후, 증폭 산물을 pBluescript SK(-)(스트라타진사제) 등의 플라스미드에 각각 클로닝하고, (2)에 기재된 방법과 마찬가지로의 방법에 의해, 염기 서열을 결정하고, 원하는 인간화 항체의 VH 또는 VL의 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열을 갖는 플라스미드를 취득한다.
- [0249] 또는, 설계한 DNA 서열에 기초하여, VH 전체 길이 및 VL 전체 길이를 각각 1개의 장쇄 DNA로서 합성한 것을, 상기 PCR 증폭 산물 대신에 사용할 수도 있다. 또한, 합성 장쇄 DNA의 양단에 적당한 제한 효소의 인식 서열을 도입함으로써, 인간화 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를, (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터에 용이하게 클로닝할 수 있다.
- [0250] (5) 인간화 항체의 V 영역의 아미노산 서열의 개변
- [0251] 인간화 항체는, 비인간 항체의 VH 및 VL의 CDR만을 인간 항체의 VH 및 VL의 FR로 이식하는 것만으로는, 그 항원 결합 활성은 원래의 비인간 항체에 비해 저하된다[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266(1991)]. 인간화 항체에서는, 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 아미노산 서열 중에서, 직접 항원과의 결합에 관여하고 있는 아미노산 잔기, CDR의 아미노산 잔기와 상호 작용하는 아미노산 잔기, 및 항체의 입체 구조를 유지하고, 간접적으로 항원과의 결합에 관여하고 있는 아미노산 잔기를 동정하고, 그들 아미노산 잔기를 원래의 비인간 항체의 아미노산 잔기로 치환함으로써, 저하된 항원 결합 활성을 상승시킬 수 있다.
- [0252] 항원 결합 활성에 관계되는 FR의 아미노산 잔기를 동정하기 위해서, X선 결정 해석[J. Mol. Biol., 112, 535(1977)] 또는 컴퓨터 모델링[Protein Engineering, 7, 1501(1994)] 등을 사용함으로써, 항체의 입체 구조의 구축 및 해석을 행할 수 있다. 또한, 각각의 항체에 대하여 수종의 개변체를 제작하고, 각각의 항원 결합 활성과의 상관을 검토하는 것을 반복하여, 시행 착오함으로써, 필요한 항원 결합 활성을 갖는 인간화 항체를 취득할 수 있다.
- [0253] 인간 항체의 VH 및 VL의 FR의 아미노산 잔기는, 개변용 합성 DNA를 사용하여 (4)에 기재된 PCR 반응을 행함으로써, 개변시킬 수 있다. PCR 반응 후의 증폭 산물에 대해서 (2)에 기재된 방법에 의해, 염기 서열을 결정하고, 목적으로 하는 개변이 실시된 것을 확인한다.
- [0254] (6) 인간화 항체 발현 벡터의 구축
- [0255] (1)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에, 구축한 유전자 재조합 항체의 VH 또는 VL을 코딩하는 cDNA를 각각 클로닝하여, 인간화 항체 발현 벡터를 구축할 수 있다.
- [0256] 예를 들어, (4) 및 (5)에서 얻어지는 인간화 항체의 VH 또는 VL을 구축할 때에 사용하는 합성 DNA 중, 양단에 위치하는 합성 DNA의 5' 또는 3' 말단에 적당한 제한 효소의 인식 서열을 도입함으로써, (1)에서 얻어지는 유전

자 재조합 항체 발현용 벡터의 인간 항체의 CH 또는 CL을 코딩하는 각각의 유전자의 상류에 그들의 적절한 형태로 발현되도록 각각 클로닝한다.

- [0257] (7) 유전자 재조합 항체의 일과성 발현
- [0258] (3) 및 (6)에서 얻어지는 유전자 재조합 항체 발현 벡터, 또는 그들을 개변한 발현 벡터를 사용하여 유전자 재조합 항체의 일과성 발현을 행하고, 제작한 다종류의 인간형 키메라 항체, 인간화 항체의 항원 결합 활성을 효율적으로 평가할 수 있다.
- [0259] 발현 벡터를 도입하는 숙주 세포에는, 유전자 재조합 항체를 발현할 수 있는 숙주 세포라면, 어떠한 세포라도 사용할 수 있지만, 예를 들어 COS-7 세포[American Type Culture Collection(ATCC) 번호: CRL1651]를 사용한다[Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283(1991)].
- [0260] COS-7 세포에의 발현 벡터의 도입에는, DEAE-텍스트란법[Methods in Nucleic Acids Res., CRC press(1991)] 또는 리포펙션법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)] 등을 사용한다.
- [0261] 발현 벡터의 도입 후, 배양 상청 중의 유전자 재조합 항체의 발현량 및 항원 결합 활성은 효소 면역 항체법[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단샤 사이언티픽(1987)] 등을 사용하여 측정한다.
- [0262] (8) 유전자 재조합 항체를 안정적으로 발현하는 형질 전환주의 취득과 유전자 재조합 항체의 조제
- [0263] (3) 및 (6)에서 얻어진 유전자 재조합 항체 발현 벡터를 적당한 숙주 세포에 도입함으로써 유전자 재조합 항체를 안정적으로 발현하는 형질 전환주를 얻을 수 있다. 숙주 세포에의 발현 벡터의 도입에는, 일렉트로포레이션법[일본 특허 공개평 2-257891호 공보, Cytotechnology, 3, 133(1990)] 등을 사용한다.
- [0264] 유전자 재조합 항체 발현 벡터를 도입하는 숙주 세포에는, 유전자 재조합 항체를 발현시킬 수 있는 숙주 세포라면, 어떠한 세포라도 사용할 수 있다. 예를 들어, CHO-K1(ATCC CCL-61), DUKXB11(ATCC CCL-9096), Pro-5(ATCC CCL-1781), CHO-S(Life Technologies, Cat#11619), 래트 미엘로마 세포 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20(ATCC 번호: CRL1662 또는 YB2/0이라고도 함), 마우스 미엘로마 세포 NS0, 마우스 미엘로마 세포 SP2/0-Ag14(ATCC 번호: CRL1581), 마우스 P3X63-Ag8.653 세포(ATCC 번호: CRL1580), 디히드로엽산 환원 효소 유전자(Dihydroforate Reductase, 이하, dhfr이라 표기함)가 결손된 CHO 세포(CHO/DG44 세포)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)] 등을 사용한다.
- [0265] 또한, 세포 내 당뉴클레오타이드 GDP-푸코오스의 합성에 관여하는 효소 등의 단백질, N-글리코시드 결합 복합형 당쇄의 환원 말단의 N-아세틸글루코사민의 6위에 푸코오스의 1위가 α 결합하는 당쇄 수식에 관여하는 효소 등의 단백질 혹은 세포 내 당뉴클레오타이드 GDP-푸코오스의 골지체에서의 수송에 관여하는 단백질 등의 활성이 저하 또는 결실된 숙주 세포, 예를 들어 α 1,6-푸코오스 전이 효소 유전자가 결손된 CHO 세포(국제 공개 제 2005/035586호 공보, 국제 공개 제02/31140호 공보), 렉틴 내성을 획득한 Lec13[Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55(1986)] 등을 사용할 수도 있다.
- [0266] 발현 벡터의 도입 후, 유전자 재조합 항체를 안정적으로 발현하는 형질 전환주는, G418 황산염(이하, G418이라 표기함) 등의 약제를 포함하는 동물 세포 배양용 배지로 배양함으로써 선택한다(일본 특허 공개 평2-257891호 공보).
- [0267] 동물 세포 배양용 배지에는, RPMI1640 배지(인비트로젠사제), GIT 배지(니혼 세이야쿠사제), EX-CELL301 배지(JRH사제), IMDM 배지(인비트로젠사제) 혹은 하이브리도마 SFM 배지(인비트로젠사제), 또는 이들 배지에 FBS 등의 각종 첨가물을 첨가한 배지 등을 사용한다. 얻어진 형질 전환주를 배지 중에서 배양함으로써 배양 상청 중에 유전자 재조합 항체를 발현 측정시킨다. 배양 상청 중의 유전자 재조합 항체의 발현량 및 항원 결합 활성은 ELISA법 등에 의해 측정할 수 있다. 또한, dhfr 유전자 증폭제(일본 특허 공개 평2-257891호 공보) 등을 이용하여, 형질 전환주가 산생하는 유전자 재조합 항체의 발현량을 향상시킬 수 있다.
- [0268] 유전자 재조합 항체는, 형질 전환주의 배양 상청으로부터 단백질 A-칼럼을 사용하여 정제한다[Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]. 또한, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피 및 한외 여과 등의 단백질의 정제에서 사용되는 방법을 조합할 수도 있다.

- [0269] 정제한 유전자 재조합 항체의 H쇄, L쇄 혹은 항체 분자 전체의 분자량은, 폴리아크릴아미드겔 전기 영동법[Nature, 227, 680(1970)] 또는 웨스턴 블로팅법[Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 등 사용하여 측정할 수 있다.
- [0270] 3. 정제 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편의 활성 평가
- [0271] 정제한 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편의 활성 평가는, 이하와 같이 행할 수 있다.
- [0272] 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편의 인간 FCRL1에 대한 결합 활성은, 전술한 1-(6) 기재의 플로 사이토메트리를 사용하여 측정한다. 또한, 형광 항체법[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)] 등을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0273] 인간 FCRL1 발현 세포에 대한 CDC 활성, 또는 ADCC 활성은 공지된 측정 방법[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993); Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., (1993)]에 의해 측정할 수 있다.
- [0274] 4. 항체의 이펙터 활성을 제어하는 방법
- [0275] 본 발명의 모노클로날 항체 이펙터 활성을 제어하는 방법으로서, 항체의 Fc 영역의 297번째의 아스파라긴(Asn)에 결합하는 N 결합 복합형 당쇄의 환원 말단에 존재하는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)에 α 1,6 결합하는 푸코오스(코어 푸코오스라고도 함)의 양을 제어하는 방법(국제 공개 제2005/035586호 공보, 국제 공개 제2002/31140호 공보, 국제 공개 제00/61739호 공보), 또는 항체의 Fc 영역의 아미노산 잔기를 개변함으로써 제어하는 방법 등이 알려져 있다. 본 발명의 모노클로날 항체에는 어느 방법을 사용해도, 이펙터 활성을 제어할 수 있다.
- [0276] 이펙터 활성이란, 항체의 Fc 영역을 통해 야기되는 항체 의존성의 활성을 말하고, ADCC 활성, CDC 활성, 또는 마크로파지 혹은 수지상 세포 등의 식세포에 의한 항체 의존성 과다사이토시스(Antibody-dependent phagocytosis, ADP 활성) 등이 알려져 있다.
- [0277] 이펙터 활성의 측정법으로서, 예를 들어 표적으로서 염증성 세포, 이펙터로서 인간 말초혈 단핵구(PBMC), 그리고 염증성 세포 특이적인 항체를 혼합하여, 4시간 정도 인큐베이션한 후, 세포 상해의 지표로서 유리된 락트산 탈수소 효소(LDH)를 측정할 수 있다. 혹은, 인간 전혈에, 예를 들어 CD20의 같은 혈액 세포 특이적인 항원을 인식하는 항체를 첨가하여, 인큐베이션한 후, 표적이 되는 혈액 세포수의 감소를 이펙터 활성으로서 측정할 수 있다. 또는, 예를 들어 인간 전혈에 다른 표적 세포를 혼합하고, 추가로 표적 세포에 특이적인 항체를 첨가하여 인큐베이션한 후, 표적 세포수의 감소를 이펙터 활성으로서 측정할 수 있다. 어느 경우에 있어서도 이펙터 활성은, 유리 LDH법, 유리 51Cr법 또는 플로 사이토메트리법 등에 의해 측정할 수 있다.
- [0278] 항체의 Fc의 N 결합 복합형 당쇄의 코어 푸코오스의 함량을 제어함으로써, 항체의 이펙터 활성을 증가 또는 저하시킬 수 있다. 항체의 Fc에 결합되어 있는 N 결합 복합형 당쇄에 결합하는 푸코오스의 함량을 저하시키는 방법으로서, α 1,6-푸코오스 전이 효소 유전자가 결손된 CHO 세포를 사용하여 항체를 발현함으로써, 푸코오스가 결합되지 않은 항체를 취득할 수 있다. 푸코오스가 결합되지 않은 항체는 높은 ADCC 활성을 갖는다.
- [0279] 한편, 항체의 Fc에 결합되어 있는 N 결합 복합형 당쇄에 결합하는 푸코오스의 함량을 증가시키는 방법으로서, α 1,6-푸코오스 전이 효소 유전자를 도입한 숙주 세포를 사용하여 항체를 발현시킴으로써, 푸코오스가 결합되어 있는 항체를 취득할 수 있다. 푸코오스가 결합되어 있는 항체는, 푸코오스가 결합되지 않은 항체보다도 낮은 ADCC 활성을 갖는다.
- [0280] 또한, 항체의 Fc 영역의 아미노산 잔기를 개변함으로써 ADCC 활성 또는 CDC 활성을 증가 또는 저하시킬 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2007/0148165호 명세서에 기재된 Fc 영역의 아미노산 서열을 사용함으로써, 항체의 CDC 활성을 증가시킬 수 있다.
- [0281] 또한, 미국 특허 제6,737,056호 명세서, 미국 특허 제7,297,775호 명세서 또는 미국 특허 제7,317,091호 명세서에 기재된 아미노산 개변을 행함으로써, ADCC 활성 또는 CDC 활성을, 증가시키는 것도 저하시킬 수도 있다. 또한 본 발명의 항체에는, 상술한 항체 정상 영역에 있어서의 아미노산 개변 또는 당쇄 개변에 따라서, 예를 들어 일본 특허 공개 제2013-165716호 공보 또는 일본 특허 공개 제2012-021004호 공보 등에 기재된 아미노산 개변을 행함으로써, Fc 수용체와의 반응성을 제어함으로써 혈중 반감기를 제어한 항체도 포함된다.

- [0282] 추가로, 상술한 방법을 조합하여, 하나의 항체에 사용함으로써, 항체의 이펙터 활성이나 혈중 반감기가 제어된 항체를 취득할 수 있다.
- [0283] 5. 본 발명의 항FCRL1 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 항체 약물 복합체의 제작 방법
- [0284] 본 발명의 항FCRL1 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 포함하는 항체 약물 복합체는, 모노클로날 항체와 약물을 화학적, 효소적 또는 유전자 공학적 방법으로 결합함으로써 제작할 수 있다.
- [0285] (1) 화학적인 방법으로 모노클로날 항체와 약물을 결합하는 방법
- [0286] 2. (1)에 기재된 방법으로 임의의 위치에 적절한 치환기를 갖는 아미노산 잔기를 부가, 삽입 또는 치환함으로써, 항체에 반응성 치환기를 도입한다. 또한, 항체에 대하여 환원, 가수 분해 또는 효소 분해 등에 의해 임의의 위치의 결합을 개열하여, 반응성 치환기로 할 수도 있다. 추가로 항체 분자에 포함되는 당쇄에 대하여, 글리코시다아제나 당전이 효소 등의 효소를 사용하여 반응성 치환기를 갖는 당을 도입할 수도 있다. 이러한 반응성 치환기로서는, 예를 들어 α, β 불포화 카르보닐기, α, β 불포화 술폰닐기, α, β 불포화 술폰기, 티올기, 아미노기, 아미드기, 포르밀기, 카르복실기, 아지드기, 알킬닐기, 알케닐기, 할로알킬기, 카르보닐기 등을 들 수 있다.
- [0287] 항체에 도입된 반응성 관능기와 반응 가능한 화학 구조를 약물 또는 링커에 도입하고, 적절한 반응 조건에서 반응시킴으로써 항체와 약물 또는 링커를 결합한다. 링커는, 항체와 반응 하기 전에 약물과 결합시켜도, 항체와 반응 후에 약물과 결합시켜도 된다. 링커와 약물은 공지된 방법(예를 들어, S. J. Walsh et al. Chem. Soc. Rev. 2021, 50, 1305-1353; Tumej, L. Nathan(2020). Antibody-Drug Conjugates-Methods and Protocols: New York, Springer; 및 Laurent Ducry(2013). Antibody-Drug Conjugate: New York, Springer 등에 기재된 방법)에 의해 결합시킬 수 있다.
- [0288] (2) 효소적인 방법으로 모노클로날 항체와 약물을 결합하는 방법
- [0289] 2. (1)에 기재된 방법으로 예를 들어 항체의 C 말단에, 특정한 효소에 의해 인식되는 아미노산 서열을 부가 또는 치환한다. 이러한 아미노산 서열로서, 예를 들어 파르네실 트랜스퍼라아제나 게라닐 트랜스퍼라아제 등에 의해 인식되는 CaaX 태그(C는 시스테인, a는 임의의 지방족 아미노산, X는 C 말단 아미노산을 나타냄)를 들 수 있다.
- [0290] 항체에 도입된 아미노산 서열을 인식하는 효소에 의해 전이되는 관능기를, 약물 또는 링커에 도입하고, 적절한 조건에서, 상기 아미노산 서열과 효소 반응함으로써 항체와 약물 또는 링커를 결합한다. 예를 들어, 상기 CaaX 태그에 대응하는 관능기로서는, 게라닐기나 파르네실기 등의 프레닐기를 들 수 있다. 링커는, 항체와 반응하기 전에 약물과 결합시켜도, 항체와 반응 후에 약물과 결합시켜도 된다. 링커와 약물은 공지된 방법에 의해 결합시킬 수 있다.
- [0291] (3) 유전자 공학적인 방법으로 모노클로날 항체와 약물을 결합하는 방법
- [0292] 약물이 단백질 또는 펩티드인 경우, 해당 단백질 또는 펩티드를 코딩하는 DNA를 설계하고, 항체 유전자의 임의의 위치에 부가, 삽입 또는 치환하여 2와 마찬가지로의 방법에 의해 발현시킴으로써 모노클로날 항체와 약물을 결합할 수 있다.
- [0293] 6. 본 발명의 항인간 FCRL1 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용한 질환의 치료 방법
- [0294] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편은, FCRL1이 발현하는 질환이면, 어느 인간 FCRL1 관련 질환의 치료에 사용할 수 있다.
- [0295] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 함유하는 치료제는, 유효 성분으로서의 해당 항체 또는 해당 항체 단편만을 포함하는 것이어도 되지만, 통상은 약리학적으로 허용되는 1 이상의 담체와 함께 혼합하여, 제제학의 기술 분야에 있어서 공지된 방법에 의해 제조한 의약 제제로서 제공된다.
- [0296] 투여 경로로서는, 예를 들어 경구 투여 또는 구강 내, 기도 내, 직장 내, 피하, 근육 내 혹은 정맥 내 등의 비경구 투여를 들 수 있다. 투여 형태로서는, 예를 들어 분무제, 캡슐제, 정제, 산제, 과립제, 시럽제, 유제, 좌제, 주사제, 연고 또는 테이프제 등을 들 수 있다.
- [0297] 경구 투여에 적당한 제제로서는, 유제, 시럽제, 캡슐제, 정제, 산제 또는 과립제 등을 들 수 있다.
- [0298] 유제 또는 시럽제와 같은 액체 조제물은, 물, 자당, 소르비톨 혹은 과당 등의 당류, 폴리에틸렌글리콜 혹은 프

로필렌글리콜 등의 글리콜류, 호마유, 올리브유 혹은 대두유 등의 유류, p-히드록시벤조산에스테르류 등의 방부제 또는 스트로베리 플레이버 혹은 페퍼민트 등의 플레이버류 등을 첨가제로서 사용하여 제조한다.

[0299] 캡슐제, 정제, 산제 또는 과립제 등은, 유당, 포도당, 자당 혹은 만니톨 등의 부형제, 전분 혹은 알긴산나트륨 등의 붕괴제, 스테아르산마그네슘 혹은 탈크 등의 활택제, 폴리비닐알코올, 히드록시프로필셀룰로오스 혹은 젤라틴 등의 결합제, 지방산에스테르 등의 계면 활성제 또는 글리세린 등의 가소제 등을 첨가제로서 사용하여 제조한다.

[0300] 비경구 투여에 적당한 제제로서는, 주사제, 좌제 또는 분무제 등이다. 주사제는, 염용액 혹은 포도당 용액, 또는 그 양자가 혼합물을 포함하는 담체 등을 사용하여 제조한다. 좌제는 카카오 버터, 수소화지방 또는 카르복실산 등의 담체를 사용하여 제조한다.

[0301] 분무제는 수용자의 구강 및 기도 점막을 자극하지 않고, 또한 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 미세한 입자로서 분산시켜, 흡수를 용이하게 한 담체 등을 사용하여 제조한다. 담체로서는, 예를 들어 유당 또는 글리세린 등을 사용한다. 또한, 에어로졸 또는 드라이 파우더로서 제조할 수도 있다. 또한, 상기 비경구제에 있어서도, 경구 투여에 적당한 제제에서 첨가제로서 예시한 성분을 첨가할 수도 있다.

[0302] 7. 본 발명의 항인간 FCRL1 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용한 질환의 진단 방법

[0303] 본 발명의 모노클로날 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 항체 약물 복합체를 사용하여, 인간 FCRL1 또는 인간 FCRL1이 발현된 세포를 검출 또는 측정함으로써, 인간 FCRL1 관련 질환을 진단할 수 있다.

[0304] 인간 FCRL1 관련 질환인 암 질환, 자기 면역 질환 및 염증성 질환의 진단은, 예를 들어 환자체 내에 존재하는 인간 FCRL1을 면역학적 방법에 의해 검출 또는 측정하여 행할 수 있다. 또한, 환자 체 내의 세포에 발현되고 있는 인간 FCRL1을 플로 사이토메트리 등의 면역학적 방법을 사용하여 검출함으로써 진단을 행할 수 있다.

[0305] 면역학적 방법이란, 표지를 실시한 항원 또는 항체를 사용하여, 항체량 또는 항원량을 검출 또는 측정하는 방법이다. 예를 들어, 방사성 물질 표지 면역 항체법, 효소 면역 측정법, 형광 면역 측정법, 발광 면역 측정법, 웨스턴 블롯법 또는 물리 화학적 방법 등을 사용한다.

[0306] 방사성 물질 표지 면역 항체법은, 예를 들어 항원 또는 항원을 발현한 세포 등에, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 반응시키고, 추가로 방사선 표지를 실시한 항이뮤노글로불린 항체 또는 해당 항체 단편을 반응시킨 후, 신틸레이션 카운터 등으로 측정한다.

[0307] 효소 면역 측정법은, 예를 들어 항원 또는 항원을 발현한 세포 등에, 본 발명의 항체 또는 해당 항체 단편을 반응시키고, 추가로 효소 등으로 표지를 실시한 항이뮤노글로불린 항체 또는 결합 단편을 반응시킨 후, 기질을 첨가하여 반응액의 흡광도를 흡광 광도계로 측정한다. 예를 들어 샌드위치 ELISA법 등을 사용한다. 효소 면역 측정법에서 사용하는 표지체로서는, 공지[효소 면역 측정법, 이가쿠쇼인(1987)]된 효소 표지를 사용할 수 있다.

[0308] 예를 들어, 알칼리 포스파타아제 표지, 퍼옥시다아제 표지, 루시페라아제 표지 또는 비오틴 표지 등을 사용한다. 샌드위치 ELISA법은, 고상에 항체를 결합시킨 후, 검출 또는 측정 대상인 항원을 포획시키고, 포획된 항원에 제2 항체를 반응시키는 방법이다. 해당 ELISA법에서는, 검출 또는 측정하고자 하는 항원을 인식하는 항체 또는 항체 단편이며, 항원 인식 부위의 다른 2종류의 항체를 준비하고, 그 중, 제1 항체 또는 항체 단편을 미리 플레이트(예를 들어, 96웰 플레이트)에 흡착시키고, 다음에 제2 항체 또는 항체 단편을 FITC 등의 형광 물질, 퍼옥시다아제 등의 효소 또는 비오틴 등으로 표지해둔다. 상기 항체가 흡착한 플레이트에, 생체 내에서 분리된, 세포 또는 그 파쇄액, 조직 또는 그 파쇄액, 세포 배양 상청, 혈청, 홍수, 복수 또는 안액 등을 반응시킨 후, 표지한 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 반응시켜, 표지 물질에 따른 검출 반응을 행한다. 농도 기지의 항원을 단계적으로 희석하여 제작한 검량선으로부터, 피험 샘플 중의 항원 농도를 산출한다. 샌드위치 ELISA법에 사용하는 항체로서는, 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체 중 어느 것을 사용해도 되고, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂ 등의 항체 프래그먼트를 사용해도 된다. 샌드위치 ELISA법에서 사용하는 2종류의 항체의 조합으로서, 다른 에피토프를 인식하는 모노클로날 항체 또는 항체 단편의 조합이어도 되고, 폴리클로날 항체와 모노클로날 항체 또는 항체 단편의 조합이어도 된다.

[0309] 형광 면역 측정법은 문헌[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단샤 사이언티픽(1987)] 등에 기재된 방법으로 측정한다. 형광 면역 측정법에서 사용하는 표지체로서는, 공지[형광 항체법, 소프트 사이언스사(1983)]된 형광 표지를 사용할 수 있다. 예를 들어, FITC 또는 RITC 등을 사용한다.

- [0310] 발광 면역 측정법은 문헌[생물 발광과 화학 발광 임상 검사 42, 히로카와 쇼텐(1998)] 등에 기재된 방법으로 측정한다. 발광 면역 측정법에서 사용하는 표지체로서는, 공지된 발광체 표지를 들 수 있고, 아크리디늄에스테르 또는 로핀 등을 사용한다.
- [0311] 웨스턴 블로팅법은, 항원 또는 항원을 발현한 세포 등을 SDS(도데실황산나트륨)-PAGE(폴리아크릴아미드 겔)[Antibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]로 분획한 후, 해당 겔을 폴리비닐리덴(PVDF)막 또는 니트로셀룰로오스막에 블로팅하고, 해당 막에 항원을 인식하는 항체 또는 항체 단편을 반응시키고, 추가로 FITC 등의 형광 물질, 퍼옥시다아제 등의 효소 표지 또는 비오틴 표지 등을 실시한 항마우스 IgG 항체 또는 결합 단편을 반응시킨 후, 해당 표지를 가시화함으로써 측정한다.
- [0312] 일례를 이하에 나타낸다. 서열 번호 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 발현하고 있는 세포나 조직을 용해시키고, 환원 조건 하에서 레인당 단백질로서 0.1 내지 30 μ g를 SDS-PAGE법에 의해 영동한다. 영동된 단백질을 PVDF막에 트랜스퍼하여 1 내지 10% BSA를 포함하는 PBS(이하, BSA-PBS라 표기함)에 실온에서 30분간 반응시켜 블로킹 조작을 행한다. 여기서 본 발명의 모노클로날 항체를 반응시켜, 0.05 내지 0.1%의 Tween-20을 포함하는 PBS(이하, Tween-PBS라 표기함)로 세정하고, 퍼옥시다아제 표지한 염소 항마우스 IgG를 실온에서 2시간 반응시킨다. Tween-PBS로 세정하고, ECL Western Blotting Detection Reagents(아머삼사제) 등을 사용하여 모노클로날 항체가 결합된 밴드를 검출함으로써, 서열 번호 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 검출한다. 웨스턴 블로팅에서의 검출에 사용되는 항체로서는, 천연형의 입체 구조를 유지하지 않은 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체가 사용된다.
- [0313] 물리 화학적 방법은, 예를 들어 항원인 인간 FCRL1과 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 결합시킴으로써 응집체를 형성시키고, 이 응집체를 검출함으로써 행한다. 이 밖에도 물리 화학적 방법으로서, 모세관법, 일차원 면역 확산법, 면역 비탁법 또는 라텍스 면역 비탁법[임상 검사법 제요, 가네하라 슌판(1998)] 등을 사용할 수도 있다. 라텍스 면역 비탁법은, 항체 또는 항원을 감작시킨 입경 0.1 내지 1 μ m 정도의 폴리스티렌 라텍스 등의 담체를 사용하고, 대응하는 항원 또는 항체에 의해 항원 항체 반응을 발생시키면, 반응액 중의 산란광은 증가하고, 투과광은 감소한다. 이 변화를 흡광도 또는 적분구 탁도로서 검출함으로써 피험 샘플 중의 항원 농도 등을 측정한다.
- [0314] 인간 FCRL1이 발현되고 있는 세포의 검출 또는 측정, 공지된 면역학적 검출법을 사용할 수 있지만, 그 중에서도 면역 침강법, 면역 세포 염색법, 면역 조직 염색법 또는 형광 항체 염색법 등을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0315] 면역 침강법은, 인간 FCRL1을 발현한 세포 등을 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편과 반응시킨 후, 프로테인 G-세파로스 등의 이뮤노글로불린에 특이적인 결합능을 갖는 담체를 첨가하여 항원 항체 복합체를 침강시킨다. 또는 이하와 같은 방법에 의해서도 행할 수 있다. ELISA용 96웰 플레이트에 상술한 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 고정화한 후, BSA-PBS에 의해 블로킹한다. 항체가, 예를 들어 하이브리도마 배양 상청 등의 정제되지 않은 상태일 경우에는, 항마우스 이뮤노글로불린, 항랫 이뮤노글로불린, 프로테인-A 또는 프로테인-G 등을 미리 ELISA용 96웰 플레이트에 고정화하고, BSA-PBS로 블로킹한 후, 하이브리도마 배양 상청을 분주하여 결합시킨다. 이어서, BSA-PBS를 버리고 PBS로 잘 세정한 후, 인간 FCRL1을 발현하고 있는 세포나 조직의 용해액을 반응시킨다. 잘 세정한 후의 플레이트로부터 면역 침강물을 SDS-PAGE용 샘플 버퍼로 추출하여, 상기 웨스턴 블로팅에 의해 검출한다.
- [0316] 면역 세포 염색법 또는 면역 조직 염색법은, 항원을 발현한 세포 또는 조직 등을, 경우에 따라서는 항체의 통과성을 양호하게 하기 위해 계면 활성제나 메탄올 등으로 처리한 후, 본 발명의 모노클로날 항체와 반응시키고, 추가로 FITC 등의 형광 표지, 퍼옥시다아제 등의 효소 표지 또는 비오틴 표지 등을 실시한 항이뮤노글로불린 항체 또는 그 결합 단편과 반응시킨 후, 해당 표지를 가시화하고, 현미경으로 현경(顯鏡)하는 방법이다. 또한, 형광 표지의 항체와 세포를 반응시켜, 플로 사이토미터로 해석하는 형광 항체 염색법[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996), 단일 클론 항체 실험 매뉴얼, 고단사 사이언티픽(1987)]에 의해 검출을 행할 수 있다. 특히, 인간 FCRL1에 결합하는, 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편은, 형광 항체 염색법에 의해 천연형의 입체 구조를 유지하여 발현되고 있는 세포의 검출을 할 수 있다.
- [0317] 또한, 형광 항체 염색법 중, FMAT8100HTS 시스템(어플라이드 바이오시스템사제) 등을 사용한 경우에는, 형성된 항체-항원 복합체와, 항체-항원 복합체의 형성에 관여하지 않은 유리의 항체 또는 항원을 분리하지 않고, 항원량 또는 항체량을 측정할 수 있다.

- [0318] 8. 본 발명의 항인간 FCRL1 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 사용한 질환의 치료 방법
- [0319] 본 발명의 모노클로날 항체 혹은 해당 항체 단편 또는 항체 약물 복합체는, 인간 FCRL1이 관련되는 질환이면, 어느 인간 FCRL1 관련 질환의 치료에 사용할 수 있다.
- [0320] 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 함유하는 치료제는, 유효 성분으로서의 해당 항체 또는 해당 항체 단편만을 포함하는 것이어도 되지만, 통상은 약리학적으로 허용되는 1 이상의 담체와 함께 혼합하여, 제제학의 기술 분야에 있어서 공지된 방법에 의해 제조한 의약 제제로서 제공된다.
- [0321] 투여 경로로서는, 예를 들어 경구 투여 또는 구강 내, 기도 내, 직장 내, 피하, 근육 내 혹은 정맥 내 등의 비경구 투여를 들 수 있다. 투여 형태로서는, 예를 들어 분무제, 캡슐제, 정제, 산제, 과립제, 시럽제, 유제, 좌제, 주사제, 연고 또는 테이프제 등을 들 수 있다.
- [0322] 경구 투여에 적당한 제제로서는, 유제, 시럽제, 캡슐제, 정제, 산제 또는 과립제 등을 들 수 있다.
- [0323] 유제 또는 시럽제와 같은 액체 조제물은, 물, 자당, 소르비톨 혹은 과당 등의 당류, 폴리에틸렌글리콜 혹은 프로필렌글리콜 등의 글리콜류, 호마유, 올리브유 혹은 대두유 등의 유류, p-히드록시벤조산에스테르류 등의 방부제 또는 스트로베리 플레이버 혹은 페퍼민트 등의 플레이버류 등을 첨가제로서 사용하여 제조한다.
- [0324] 캡슐제, 정제, 산제 또는 과립제 등은, 유당, 포도당, 자당 혹은 만니톨 등의 부형제, 전분 혹은 알긴산나트륨 등의 붕괴제, 스테아르산마그네슘 혹은 탈크 등의 활택제, 폴리비닐알코올, 히드록시프로필셀룰로오스 혹은 젤라틴 등의 결합제, 지방산에스테르 등의 계면 활성제 또는 글리세린 등의 가소제 등을 첨가제로서 사용하여 제조한다.
- [0325] 비경구 투여에 적당한 제제로서는, 주사제, 좌제 또는 분무제 등이다. 주사제는, 염용액 혹은 포도당 용액, 또는 그 양자의 혼합물을 포함하는 담체 등을 사용하여 제조한다. 좌제는 카카오 버터, 수소화지방 또는 카르복실산 등의 담체를 사용하여 제조한다.
- [0326] 분무제는 수용자의 구강 및 기도 점막을 자극하지 않고, 또한 본 발명의 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편을 미세한 입자로서 분산시키고, 흡수를 용이하게 한 담체 등을 사용하여 제조한다. 담체로서는, 예를 들어 유당 또는 글리세린 등을 사용한다. 또한, 에어로졸 또는 드라이 파우더로서 제조할 수도 있다. 또한, 상기 비경구제에 있어서도, 경구 투여에 적당한 제제에서 첨가제로서 예시한 성분을 첨가할 수도 있다.
- [0327] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명하지만, 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0328] **실시예**
- [0329] [실시예 1] 공지 항FCRL1 키메라 항체의 제작
- [0330] 공지된 E3 및 E9(Blood. 2008, 111, 338-43), 1F9 및 2A10(국제 공개 제2005/063299호), 그리고 7G8, 2G5 및 5A2(국제 공개 제2005/097185호)의 가변 영역의 아미노산 서열 정보를 바탕으로 키메라 항체를 제작하였다. 각각의 항체의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)의 아미노산 서열을 표 1에 나타낸다.
- [0331] [표 1]

클론명	VH	VL
E 3	서열 번호 5	서열 번호 6
E 9	서열 번호 7	서열 번호 8
1 F 9	서열 번호 9	서열 번호 10
2 A 10	서열 번호 11	서열 번호 12
7 G 8	서열 번호 13	서열 번호 14
2 G 5	서열 번호 15	서열 번호 16
5 A 2	서열 번호 17	서열 번호 18

- [0332]
- [0333] 키메라 항체의 발현 벡터는, VH 영역을 pFUSE-CHlg-hG1 플라스미드 벡터, VL 영역을 pFUSE2-CLlg-hk 플라스미드 벡터에 각각 삽입하여 구축하였다. 중쇄의 정상 영역의 239번(EU 넘버링)의 세린을 시스테인으로 변환한 벡터를 사용하였다. 이들 벡터와 Expi293 Expression System(Life Technologies사)을 사용하여, 인간형 키메라 항체를 산생하였다. 수순은 부속 매뉴얼을 따라서 이하와 같이 행하였다.
- [0334] 1 반응당 7.5×10^8 개의 Expi293F 세포(Thermo Fisher Scientific사)를 255mL의 Expi293 Expression

Medium(Thermo Fisher Scientific사)에 첨가하였다. Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific사)에 200 μ g의 pFUSE-CHlg-hG1 플라스미드 벡터, 100 μ g의 pFUSE2-CLlg-hk 플라스미드 벡터 및 ExpiFectamin 293 Reagent(Thermo Fisher Scientific사)를 첨가하여, 20분간 정치한 후에, 해당 플라스미드 용액을 상기 세포 함유액에 첨가하였다. 또한 밤새의 배양 후에, 해당 세포 함유액에 ExpiFectamin 293 Transfection Enhancer를 첨가하였다(배양 볼륨은 토탈로 300mL). 해당 세포 함유액을 추가로 2일간 배양한 후에, 배양 상청을 회수하였다.

[0335] 항체의 정제에는, MabSelect SuRe(GE Healthcare사)를 사용하였다. 회수한 배양 상청을 원심 분리하고, 얻어진 배양 상청을 필터로 여과하였다. 칼럼에 1mL의 담체를 충전하고, DPBS로 버퍼를 치환하였다. 해당 칼럼에 배양 상청을 첨가하고, 담체에 항체를 흡착시킨 후에, 해당 칼럼을 10mL의 DPBS로 2회 세정하였다. 해당 칼럼에 2.5mL의 Arg-Antibody Elution Buffer(나카라이테스크 사)를 첨가하여 항체를 용출시켰다. NAP 칼럼(GE Healthcare사)를 사용하여 해당 항체 용액을 탈염하고, 이후의 해석에 사용하였다.

[0336] 얻어진 항체는 중쇄의 239번째(EU 넘버링)의 세린이 시스테인으로 치환된 IgG1 항체(이하 S239C 변이라고도 함)이다. S239C 변이를 포함하는 중쇄 정상 영역은 서열 번호 80에 기재되는 아미노산 서열을 포함한다. 또한, E3, 2G5 및 5A2는 제작한 바 응집체가 검출되기 때문에, ADC화에 제공하지 않았다.

[0337] [실시예 2] 공지 항FCRL1 키메라 항체의 ADC의 제작

[0338] ADC는 Bioconjug Chem 2013, 24(7), 1256-1263에 기재된 방법 등에 의해 제작할 수 있다. 실시예 1에 의해 제작한, S239C 변이를 갖는 FCRL1 키메라 항체에 PBD 다이머 페이로드 링커인 SG3249(Med. Chem. Lett. 2016, 7, 983-987)를 반응시킴으로써 ADC를 제작하였다.

[0339] 약물 항체비(Drug-to-antibody ratio; DAR)의 분석은, 환원제에 의한 전처리에 의해, ADC를 경쇄 프래그먼트와 중쇄 프래그먼트로 변환한 다음에, 고속 액체 크로마토그래피 장치 및 역상 칼럼(역상 HPLC)을 사용하여 행할 수 있다. 미반응된 경쇄, 약물이 결합된 경쇄, 미반응된 중쇄, 약물이 결합된 중쇄의 피크 면적비로부터 DAR을 산출한다. 제작한 모든 ADC의 약물 항체비는 1.8 내지 1.9였다. 또한, 2A10은 DAR을 컨트롤한 ADC를 제작하는 것이 곤란하였기 때문에, 평가로부터 제외하였다.

[0340] 또한, Clin Cancer Res 2005, 11(8), 3126-3135에 기재된 항2,4-디니트로페놀(DNP) IgG1 항체(S239C 변이)를 코딩하는 벡터를 사용하고, 실시예 1에 기재된 방법에 준하여 제작한 DNP 항체에 대해서, 마찬가지로의 방법에 의해 ADC(항DNP 항체-ADC)를 제작하고, 이하의 시험에서는 네거티브 컨트롤로서 사용하였다.

[0341] [실시예 3] 공지 항FCRL1 키메라 항체의 ADC의 생체내 약효 평가

[0342] 5주령의 웅성 SCID 마우스의 복측 피하에 50vol% Matrigel(Corning)을 포함하는 인산 완충 생리 식염수(Phosphate Buffered Saline)(PBS)에 현탁시킨 SU-DHL-6 세포를 1×10^7 개/0.1mL/head로 이식하였다. 이식 후 21일째에 종양 체적이 120mm³ 이상인 개체를 선택하여, 군 분류하였다.

[0343] 군 분류일을 day0으로 하여, day0에 0.3mg/kg body weight의 희석한 공지 FCRL1 키메라 항체-ADC 또는 0.4mg/kg body weight의 항DNP 항체-ADC를 꼬리 정맥 내에 투여하였다. 비히클의 조성은 10mmol/L L-글루탐산 나트륨, 262mmol/L D-소르비톨, 0.05mg/mL 폴리소르베이트 80, pH 5.5이다. 마우스의 종양 체적 및 체중은 주 2회 측정하였다. 결과를 도 1에 나타낸다. 또한, 공지 항인간 FCRL1 키메라 항체의 ADC는, 실시예 2에서 제작한 ADC를 사용하였다.

[0344] 도 1에 나타내는 바와 같이 공지 항인간 FCRL1 항체의 ADC로서 7G8-ADC가 가장 강한 항종양 활성을 나타냈다. Ramos 세포 피하 이식 마우스 모델에서도 마찬가지로 7G8-ADC가 가장 강한 항종양 활성을 나타냈다(상세한 것은 생략).

[0345] [실시예 4] 신규 항인간 FCRL1 마우스 항체의 취득

[0346] 면역 호스트로서 A/J, BALB/c 또는 C57BL/6 마우스(모두 닛본 SLC)를 사용하고, 면역원으로서, 인간 FCRL1(NP_443170.1)의 전체 길이, 게잡이 원숭이 FCRL1(XP_015310712.1)의 전체 길이, 혹은 그 변이체를 발현하는 플라스미드 벡터(15-50 μ g), 인간 FCRL1 세포 외 도메인과 C말단 His Tag 또는 Rabbit IgG1-Fc의 융합 단백질(10-25 μ g), 또는 인간 FCRL1, 게잡이 원숭이 FCRL1 혹은 그 변이체를 일과성으로 발현시킨 293T 세포($0.5 - 2.0 \times 10^7$ 개)를 사용하였다.

[0347] 이들 중 어느 하나 또는 복수의 면역원을 각종 레지멘에 기초하여 10-50일 간격으로 3-8회, 근육 주사, 피내 투여, 복강 내 투여 또는 정맥 주사하였다. 아쥘반트를 사용한 경우에는, 시그마 아쥘반트 시스템(Sigma adjuvant system)(Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 항혈청의 각종 항원 발현 세포에 대한 반응성 평가에 기초하여, 마우스를 선택하여, 최종 면역으로부터 3일 후에 비장 세포와 마우스 미엘로마 세포 P3U1의 세포 융합을 행하여, 모노클로날 항체 산생 하이브리도마를 제작하였다.

[0348] 취득한 신규 항FCRL1 마우스 항체 중, 세컨드 이뮤노독신을 사용한 시험관 내 항세포 활성, 및 게잡이 원숭이 FCRL1에의 교차 반응성에 기초하는 스크리닝을 행하고, 추가로 ADC화를 위한 항체 공학적 개변에 적합한 아미노산 서열인지 여부의 관점에서, ADC화하는 항체를 선발하였다. 선발된 6 항체(DK610, DK681, DK1142, DK1141, DK1166 및 DK1164)의 VH 및 VL, 그리고 중쇄 CDR1 내지 3(HCDR1 내지 3) 및 경쇄 CDR1 내지 3(LCDR1 내지 3)의 아미노산 서열을 표 2에 나타낸다.

[0349] [표 2]

클론명	VH	HCD R1	HCD R2	HCD R3	VL	LCD R1	LCD R2	LCD R3
DK610	서열 번호 19	서열 번호 20	서열 번호 21	서열 번호 22	서열 번호 23	서열 번호 24	서열 번호 25	서열 번호 26
DK681	서열 번호 27	서열 번호 28	서열 번호 29	서열 번호 30	서열 번호 31	서열 번호 32	서열 번호 33	서열 번호 34
DK1142	서열 번호 35	서열 번호 36	서열 번호 37	서열 번호 38	서열 번호 39	서열 번호 40	서열 번호 41	서열 번호 42
DK1141	서열 번호 43	서열 번호 44	서열 번호 45	서열 번호 46	서열 번호 47	서열 번호 48	서열 번호 49	서열 번호 50
DK1166	서열 번호 51	서열 번호 52	서열 번호 53	서열 번호 54	서열 번호 55	서열 번호 56	서열 번호 57	서열 번호 58
DK1164	서열 번호 59	서열 번호 60	서열 번호 61	서열 번호 62	서열 번호 63	서열 번호 64	서열 번호 65	서열 번호 66

[0350] [실시예 5] 신규 항인간 FCRL1 마우스 항체의 FCRL1 결합성

[0351] 실시예 4에서 얻어진 신규 항인간 FCRL1 마우스 항체의 항원 특이적 반응성을, 플로우 사이토메트리(Flow Cytometry)(FCM)로 평가하였다. FCRL1 항원 발현 세포는, 293T 세포 상에 재조합 FCRL1 항원을 일과성으로 발현시켜 조제하였다. 인간 FCRL1(NCBI accession number: NP_443170.1) 또는 게잡이 원숭이 FCRL1(XP_015310712)의 아미노산 서열을 바탕으로 코돈을 최적화한 cDNA를 합성하고, 그 하류에 돼지뇌심근염 바이러스(encephalomyocarditis virus)(EMCV) 유래의 내부 리보솜 유입점(internal ribosome entry site)(IRES) 서열과, TagBFP의 서열을 탠덤으로 배치한 프래그먼트를 pcDNA3.1hygro에 클로닝하여 인간 FCRL1 또는 게잡이 원숭이 FCRL1의 발현 플라스미드 벡터를 구축하였다. 정제한 발현 벡터를 293T 세포에 형질 감염하고, 형질 감염 후 2일째의 세포를 회수하여, 각 항체와의 결합을 FCM에서 확인하였다.

[0352] FCM은 이하의 조건에서 행하였다. 회수한 세포를, 5% FBS, 25% DMEM 및 0.1% 아지드화나트륨(sodium azide)을 포함하는 Dulbecco's PBS(FCM 버퍼)로 2×10^6 개/mL가 되도록 현탁하였다. 이 세포 현탁액 25 μ L와, 각 항체를 1 μ g/mL로 PBS로 희석한 항체 용액 25 μ L를, 96-well V plate의 각 well 중에서 혼합하여(5×10^4 cells/well, 500ng/mL of each MAb), 4°C에서 30분간 반응시켰다.

[0353] 플레이트를 원심하여, 상청을 제거한 후, 200 μ L/well의 FCM 버퍼를 첨가하여 현탁시키고, 재원심하는 방법으로 1회 세정하였다. 세정한 세포는, 2차 항체의 FCM 버퍼 희석액을 25 μ L/well 첨가하여 재현탁시키고, 4°C에서 30분간 반응시켰다.

[0354] 2차 항체로서는, 샘플이 마우스 항체인 경우에는, R-피코에리트린(PE) F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch)를 사용하고, 샘플이 인간 항체 또는 인간형 키메라 항체인 경우에는, R-피코에리트린(PE) F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific(Jackson ImmunoResearch)을 사용하였다. 각 2차 항체의 용액은, 원액을 FCM 버퍼로 200배로 희석하여 조제하였다. 1회의 세정 후, 각 well의 세포를 100 μ L의 FCM 버퍼로 현탁시키고, 각 항체와의 결합을 플로우 사이토메트리(FCM)로 확인하였다.

[0355] 항체의 결합 친화성은 FCM에 있어서의 FCRL1 발현 세포에 대한 겔보기의 친화성(Apparent affinity)으로서 해리상수(K_d)를 산출하였다.

[0356] 인간 FCRL1 또는 게잡이 원숭이 FCRL1을 일과성 발현한 세포에, 각 항체의, 100nM(15 μ g/ml)으로부터의 3배 희

석 계열을 12점 반응시켰다. FCM에 의해 취득된 데이터를 해석하고, 세포에 결합한 각 항체의 결합량을, PE-라벨 2차 항체 유래의 형광량 MFI로서 산출하였다. 항체 농도와 측정된 MFI를 항체 농도의 대수에 대하여 플롯하여, 각각의 항체의 포화 결합 곡선을 얻고, 4-파라미터 로지스틱 모델로 회귀하였다. 피팅에는 Prism 5 software(GraphPad Software Inc.)를 사용하여, 얻어진 50% 효과 농도(EC 50)로부터 해리 상수(K_D)를 산출하였다. 인간 또는 게잡이 원숭이 FCRL1에 대한 결합 활성을 표 3에 나타낸다.

[표 3]

클론명	DK610	DK681	DK1142	DK1141	DK1166	DK1164
인간 FCRL1(nM)	0.4	1.0	1.4	1.6	1.5	2.3
인간 게잡이 원숭이 FCRL1(nM)	결합 없음	0.8	1.1	0.8	1.0	1.4

[실시예 6] 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체의 ADC의 제작

실시예 4에서 얻어진 신규 항인간 FCRL1 마우스 항체의 가변 영역의 아미노산 서열 정보를 바탕으로, 실시예 1 및 2의 방법에 준하여, S239C 변이를 갖는 신규 항FCRL1 항체, 및 이들 항체 변이 부위에 특이적으로 SG3249를 부가한 ADC를 제작하였다. 모든 ADC의 약물 항체비는 1.8 내지 1.9였다.

[실시예 7] 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체의 ADC의 항세포 시험

SU-DHL-6 세포는 384well 플레이트(Greiner-Bio)에 5000개/well이 되도록 40 μ L/well로 파종하였다. Ramos 세포는 96well 플레이트(Thermo fisher scientific)에 4000개/well이 되도록 80 μ L/well로 파종하였다. ADC의 희석 배율은 $\sqrt{10}$ 배로 하고, 10000ng/mL를 최고 농도로 하여 9 또는 10점으로 조제하였다(최종 농도: 10 내지 10000ng/mL). 목적으로 하는 최종 농도가 되도록 희석한 ADC를, 384well 플레이트에는 10 μ L/well, 96well 플레이트에는 20 μ L/well로 첨가하였다.

ADC 첨가 후, 37°C 설정의 탄산 가스 인큐베이터 내에서 약 4일간 배양하였다. 배양 종료 후, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay(Promega)를, 384well 플레이트에는 20 μ L/well, 96well 플레이트에는 100 μ L/well로 첨가하고, 약 15분 반응시킨 후, 발광값을 측정함으로써 생세포를 측정하였다. 또한, 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체의 ADC는, 실시예 6에서 제작한 ADC를 사용하고, 7G8-ADC는 실시예 2에서 제작한 ADC를 사용하였다.

SU-DHL-6 세포에 대한 항세포 시험의 결과를 도 2a 및 도 2b, Ramos 세포에 대한 항세포 시험의 결과를 도 3a 및 도 3b에 나타낸다. 도 2a, 도 2b, 도 3a 및 도 3b에 나타내는 바와 같이, SU-DHL-6 세포 및 Ramos 세포에 대하여, 어느 신규 항FCRL1 항체의 ADC도 공지 항FCRL1 항체와 비교하여 강한 항세포 효과가 확인되었다.

[실시예 8] 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체의 ADC 항종양 시험

Ramos 세포 피하 이식 마우스 모델을 이하의 방법에 의해 제작하였다. Ramos 세포는 PBS에 현탁시키고, 5×10^6 개/0.05mL/head로 SCID 마우스의 복측 피하에 이식하였다. 이식 후 7일째에 종양 체적이 85mm³ 이상인 개체를 선택하여, 군 분류하였다.

이와 같이 하여 제작한 Ramos 세포 피하 이식 마우스 모델, 및 실시예 3의 방법으로 제작한 SU-DHL-6 세포 피하 이식 마우스 모델을 이하의 항종양 시험에서 사용하였다.

군 분류일(day0)에 0.3mg/kg body weight의 희석한 신규 항FCRL1 키메라 항체의 ADC 또는 7G8-ADC를 꼬리 정맥 내에 투여하였다. 비히클의 조성은 10mmol/L L-글루탐산나트륨, 262mmol/L D-소르비톨, 0.05mg/mL 폴리소르베이트 80, pH 5.5이다. Day10에 있어서의 7G8-ADC 투여군의 평균 종양 체적을 1로 하고, 각각의 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체-ADC 투여군의 평균 종양 체적의 상대값을 도 4에 나타낸다. 또한, 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체의 ADC는, 실시예 6에서 제작한 ADC를 사용하고, 7G8-ADC는 실시예 2에서 제작한 ADC를 사용하였다.

도 4에 나타내는 대로, 어느 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체의 ADC도, 7G8-ADC보다도 강한 항종양 활성을 갖고 있었다. 또한, 도 5에는 Ramos 세포 피하 이식 마우스 모델의 day42에 있어서의 종양 사이즈를 나타낸다. 도 5에 나타내는 대로 7G8-ADC는 종양의 증식이 확인되어 있는 것에 대해서, 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체의 ADC는 모두 지속적으로 강력한 약효를 나타내는 것이 명확해졌다. 이들 결과로부터, 신규 항FCRL1 항체의 ADC는

공지 항FCRL1 항체의 ADC보다도 우수한 항종양 효과가 있는 것이 나타내졌다.

[0371] [실시예 9] 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체의 내재화

[0372] 실시예 6에서 제작한 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체에 IncuCyte Human FabFluor-pH Red Antibody Labeling Reagent(Sartorius)를, 첨부된 설명서를 따라서 라벨하였다. Ramos 세포에 최종 농도가 200ng/mL가 되도록 희석한 라벨화 항체를 처리하였다. 37℃ 설정의 탄산 가스 인큐베이터 내에서 약 4시간 또는 24시간 배양 후, FCM에 의해 평균 형광 강도(Mean Fluorescence Intensity)(MFI)를 측정하였다. 또한, 항체가 내재화되어 있을수록 MFI가 높아진다.

[0373] 내재화의 결과를 도 6에 나타낸다. 도 6에 나타내는 바와 같이, 어느 신규 항인간 FCRL1 키메라 항체도 공지 항인간 FCRL1 키메라 항체와 비교하여 높은 내재화능을 갖고 있었다.

[0374] [실시예 10] 신규 항인간 FCRL1 인간화 항체의 제작

[0375] (1) DK681 인간화 항체 및 DK1142 인간화 항체의 VH 및 VL의 아미노산 서열의 설계

[0376] 이하에 기재하는 방법으로, DK681 인간화 항체 및 DK1142 인간화 항체의 각종 VH 및 VL의 아미노산 서열을 설계하였다. 이후의 기술에서는 다양한 VH 및 VL의 아미노산 서열을 갖는 DK681 인간화 항체 및 DK1142 인간화 항체의 총칭으로서, hzDK681 항체 및 hzDK1142 항체를 기재한다. 실시예 4에서 얻어진 DK681 마우스 항체 및 DK1142 마우스 항체의 가변 영역의 CDR의 아미노산 서열의 이식에 적합한 기지의 인간 항체의 프레임워크(이하, FR라 기재함)의 아미노산 서열로서, Kabat 등[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]에서 보고되어 있는 인간 FR 콘센서스 서열, 인간 항체 잠 라인 서열, 및 BLAST법[J. Mol. Biol., 215, 403(1990)] 등의 유사성 검색에 의해 얻어진 인간 항체 가변 영역 유래의 FR 서열의 검색 중에서 각각 다음과 같이 선택하였다. DK681에 대해서는 Genbank Accession Number: AKU38660.1 및 Genbank Accession Number: AAW69164.1을, DK1142에 대해서는 Kabat 등[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]에서 보고되어 있는 human subgroup H chain I(이하, hSGHI라고도 칭한다.) 및 Genbank Accession Number: ABG38363.1을 각각 선택하여, 이들의 FR에 CDR을 이식하였다.

[0377] DK681에 대해서는 AKU38660.1의 FR의 아미노산 서열의 적절한 위치에, 각각 서열 번호 28, 29 및 30으로 나타내지는 DK681 VH의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열을 이식하여, hzDK681 HV0(서열 번호 67)을 설계하였다. 또한, AAW69164.1의 FR(FR4로서는 DK681 키메라 항체의 FR을 그대로 사용)의 아미노산 서열의 적절한 위치에, 각각 서열 번호 32, 33 및 34로 나타내지는 DK681 VL의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열을 이식하여, hzDK681 LV0(서열 번호 68)을 설계하였다.

[0378] 상기한 바와 같이 설계한 hzDK681 HV0 및 hzDK681 LV0의 컴퓨터 모델링에 의해, 항체의 결합 활성에 영향을 준다고 생각되는 FR의 아미노산 잔기를 동정하였다. 그 결과, hzDK681 HV0 및 hzDK681 LV0의 가변 영역의 FR의 아미노산 잔기 중에서, 항원 결합 부위의 3차원 구조를 변화시켜, 항체의 결합 활성에 영향을 준다고 생각되는 아미노산 잔기로서, VH에서는, 서열 번호 67로 표시되는 아미노산 서열의 11번째의 Val, 12번째의 Lys, 38번째의 Arg, 48번째의 Met, 67번째의 Arg, 68번째의 Val, 70번째의 Ile, 72번째의 Ala, 74번째의 Thr 및 97번째의 Ala를 선택하고, VL에서는, 서열 번호 68로 표시되는 아미노산 서열에 21번째의 Ile, 49번째의 Pro 및 91번째의 Val을 선택하였다. 이들 선택한 아미노산 잔기 중 적어도 1개 이상의 아미노산 잔기를, DK681 항체의 동일 부위에 존재하는 아미노산 잔기로 치환하고, 각종 개변을 갖는 인간화 항체의 VH(서열 번호 72 및 서열 번호 73) 및 VL(서열 번호 74)을 설계하였다.

[0379] DK1142에 대해서는 hSGHI의 FR의 아미노산 서열의 적절한 위치에, 각각 서열 번호 36, 37 및 38로 표시되는 DK1142 VH의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열을 이식하여, hzDK1142 HV0(서열 번호 69)을 설계하였다. 또한, ABG38363.1의 FR(FR4로서는 DK1142 키메라 항체의 FR을 그대로 사용)의 아미노산 서열의 적절한 위치에, 각각 서열 번호 40, 41 및 42로 표시되는 DK1142 VL의 CDR1 내지 3의 아미노산 서열을 이식하여, hzDK1142 LV0(서열 번호 70)을 설계하였다.

[0380] 상기한 바와 같이 설계한 hzDK1142 HV0 및 hzDK1142 LV0의 컴퓨터 모델링에 의해, 항체의 결합 활성에 영향을 준다고 생각되는 FR의 아미노산 잔기를 동정하였다. 그 결과, hzDK1142 HV0 및 hzDK1142 LV0의 가변 영역의 FR의 아미노산 잔기 중에서, 항원 결합 부위의 3차원 구조를 변화시켜, 항체의 결합 활성에 영향을 준다고 생각되는 아미노산 잔기로서, VH에서는, 서열 번호 69에 기재되는 아미노산 서열의 11번째의 Val, 12번째의 Lys, 38번째의 Arg, 48번째의 Met, 67번째의 Arg, 68번째의 Val, 70번째의 Ile, 74번째의 Thr 및 95번째의 Thy를 선택하

고, VL에서는, 서열 번호 70에 기재되는 아미노산 서열의 2번째의 Ile, 15번째의 Pro 및 50번째의 Gln을 선택하였다. 이들 선택한 아미노산 잔기 중 적어도 1개 이상의 아미노산 잔기를, DK1142 항체의 동일 부위에 존재하는 아미노산 잔기로 치환하고, 각종 개변을 갖는 인간화 항체의 VH(서열 번호 75 및 서열 번호 77) 및 VL(서열 번호 76)을 설계하였다.

[0381] 상기와 같은 표준적인 CDR 이식의 설계에 더하여, 일부의 hzDK1142 항체의 VL에는, VL CDR의 개변을 함께 행하였다. 구체적으로는, 서열 번호 41에 기재되는 VL의 CDR2의 아미노산 서열 중의 2번째의 Val을 Ile로 치환한, 서열 번호 71에 기재되는 VL의 CDR2를 도입하였다. 또한, 서열 번호 71에 기재되는 VL의 CDR2를 포함하는, 인간화 항체의 VL(서열 번호 78)을 설계하였다.

[0382] (2) 인간화 항체의 가변 영역 유전자의 설계

[0383] 이와 같이 하여 설계한 DK681 인간화 항체는 각각 DK681 F11, DK681 F12, DK681 F13 및 DK681 F14로 명명하고, DK1142 인간화 항체는 각각 DK1142 F21, DK1142 F22 및 DK1142 F24로 명명하였다. 이들 인간화 항체의 가변 영역 및 CDR을 표 4에 나타낸다. 이들 인간화 항체의 가변 영역의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열은, 동물 세포에서 고빈도로 사용되는 코돈을 사용하여 설계하였다.

[0384] [표 4]

클론명	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
DK681 F11	서열 번호 7 2	서열 번호 2 8	서열 번호 2 9	서열 번호 3 0	서열 번호 6 8	서열 번호 3 2	서열 번호 3 3	서열 번호 3 4
DK681 F12	서열 번호 7 3	서열 번호 2 8	서열 번호 2 9	서열 번호 3 0	서열 번호 7 4	서열 번호 3 2	서열 번호 3 3	서열 번호 3 4
DK681 F13	서열 번호 7 2	서열 번호 2 8	서열 번호 2 9	서열 번호 3 0	서열 번호 7 4	서열 번호 3 2	서열 번호 3 3	서열 번호 3 4
DK681 F14	서열 번호 7 3	서열 번호 2 8	서열 번호 2 9	서열 번호 3 0	서열 번호 6 8	서열 번호 3 2	서열 번호 3 3	서열 번호 3 4
DK1142 F21	서열 번호 7 5	서열 번호 3 6	서열 번호 3 7	서열 번호 3 8	서열 번호 7 6	서열 번호 4 0	서열 번호 4 1	서열 번호 4 2
DK1142 F22	서열 번호 7 7	서열 번호 3 6	서열 번호 3 7	서열 번호 3 8	서열 번호 7 6	서열 번호 4 0	서열 번호 4 1	서열 번호 4 2
DK1142 F24	서열 번호 7 7	서열 번호 3 6	서열 번호 3 7	서열 번호 3 8	서열 번호 7 8	서열 번호 4 0	서열 번호 7 1	서열 번호 4 2

[0385]

[0386] (3) 인간화 항체의 제작

[0387] (2)에서 설계한 염기 서열에 대응하는 유전자 단편을, 심리스 클로닝법을 사용하여 발현 벡터에 도입하여 필요한 플라스미드를 제작하였다. VL 발현 벡터로서는 시그널 서열 및 인간 κ 쇄 정상 영역 서열을 갖는 pCI-OtCMV_hK 벡터를, VH 발현 벡터로서는 시그널 서열 및 인간 γ 쇄 정상 영역 서열을 갖는 pCI-OtCAG_hG1(S239C) 벡터를 사용하였다. pCI-OtCAG_hG1(S239C) 벡터가 갖는 정상 영역 서열은, 인간 IgG1에 S239C의 변이를 도입한 중쇄 정상 영역이다. 또한, 이들 벡터는, Promega사 pCI 벡터를 공통 주골격으로 하여 인간 항체 유전자를 발현시키기 위해 필요한 제한 효소 사이트를 도입하고, 전합성에 의해 제작된 벡터이다. 완성한 플라스미드는, QIAGEN Plasmid Plus Maxi kit(QIAGEN)를 사용하여 대량 조제하였다. 이어서, 목적으로 하는 인간화 항체를, Expi293 Expression System Kit(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 일과성으로 발현시켰다. 플라스미드의 도입 방법은 첨부 서류를 따랐다.

[0388] 경쇄의 발현 벡터와 중쇄의 발현 벡터는, 2:1의 비율로 혼합하여 도입하였다. 플라스미드 도입 후의 세포를, 37°C, 8% CO₂, 125rpm의 조건 하에, 2 내지 4일간 배양하였다. 그 후, 세포 배양 현탁액의 원심 분리를 행하고, 0.2 μ m 필터를 통하여 배양 상청을 회수하였다. 배양 상청으로부터 MabSelect SuRe(Cytiva사)를 사용한 어피니티 정제에 의해, 정제 항체를 취득하였다.

[0389] 구체적으로는, 칼럼에 충전한 레진을 PBS로 평형화한 후, 당해 칼럼에 배양 상청을 첨가하여, PBS로 세정하고, 용출 버퍼(20mM 시트르산, 50mM NaCl, pH 3.4)를 사용하여 항체를 용출시켰다. 얻어진 항체 용액에 중화 버퍼(1M 인산-NaOH, pH 7.0)를 1/10양 첨가하여 중화하고, NAP25(Cytiva사제)를 사용하여 항체 용액의 용매를 PBS로 치환하였다. 버퍼 치환 후의 항체 용액에 대해서, Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units(밀리 포어)를

사용하여 한외 여과에 의한 농축을 행하고, Nanodrop(Thermo Fisher Scientific사)를 사용하여 흡광도 A280을 측정하고, 항체 용액의 농도 측정과 조제를 행하였다. 흡광 계수는, C.N.Pace 등의 방법에 따라서(1995, Prot. Sci.4: 2411-2423) 각각의 인간화 항체의 아미노산 서열로부터 산출하였다. 정제된 항체는, 분석용 겔 여과 크로마토그래피(도소 가부시키가이샤제 칼럼 TSKgel SuperSW3000을 사용) 및 SDS-PAGE에 의한 품질 확인을 행하였다.

[0390] [실시예 11] 신규 항인간 FCRL1 인간화 항체의 FCRL1 결합성

[0391] 실시예 4에서 얻어진 DK681 및 DK1142 마우스 항체의 정상 영역을 인간 IgG1(S239C) 정상 영역에 접속한 DK681 키메라 항체(chDK681) 및 DK1142 키메라 항체(chDK1142)와, 실시예 10에서 얻어진 항FCRL1 인간화 항체의 인간 FCRL1에 대한 결합 활성을 비교하는 것을 목적으로 하여, hFCRL1/FcRH1-His(R&D Systems사제)에 대한 결합 활성을 Biacore8K+(Cytiva사제)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명법(SPR법)에 의해 측정하였다.

[0392] 항FCRL1 항체의 결합 활성은 이하와 같이 측정하였다. Anti-human IgG antibody를, Human Antibody Capture Kit(Cytiva사제)를 사용하여, 첨부의 프로토콜에 따라서, CM5 센서 칩(Cytiva사제)에 고정화하였다. Anti-human IgG antibody를 고정화한 플로 셀에, 5 µg/mL로 조제한 항FCRL1 항체를 10 µL/분의 유속으로 30초간 첨가하였다.

[0393] 이어서, 10000ng/mL로부터 3배 희석으로 단계적으로 5 농도로 조제한 hFCRL1/FcRH1-His를 30 µL/분의 유속으로, 결합 반응을 180초간, 해리 반응을 400초간 모니터링하였다. 취득한 센서 그래프는, Bia Evaluation Software(Cytiva사제)를 사용하여, 정상 상태 친화성 모델(Steady state affinity model) 또는 1:1 결합 모델(Binding model)에 의해 피팅(fitting)에 의해 각 항체의 속도론 상수를 산출하였다. 산출된 각 항체의 결합 속도 상수(ka), 해리 속도 상수(kd) 및 해리 상수[KD]를 표 5에 나타낸다. 또한, chDK681을 DK681 F01, chDK1142를 DK 1142 F02라 기재한다.

[0394] [표 5]

트러그명	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	피팅 모델
DK681 F01	4.47×10^5	1.05×10^{-3}	6.65×10^{-9}	정상 상태 친화성 모델
DK681 F11	4.41×10^5	6.06×10^{-3}	1.76×10^{-8}	정상 상태 친화성 모델
DK681 F12	3.85×10^5	2.59×10^{-3}	9.15×10^{-9}	정상 상태 친화성 모델
DK681 F13	3.87×10^5	2.97×10^{-3}	9.84×10^{-9}	정상 상태 친화성 모델
DK681 F14	4.01×10^5	5.08×10^{-3}	1.61×10^{-8}	정상 상태 친화성 모델
DK1142 F02	4.55×10^6	5.18×10^{-2}	1.14×10^{-8}	1:1 결합 모델
DK1142 F21	5.36×10^6	6.86×10^{-2}	1.28×10^{-8}	1:1 결합 모델
DK1142 F22	3.85×10^6	4.28×10^{-2}	1.11×10^{-8}	1:1 결합 모델
DK1142 F24	2.24×10^6	2.74×10^{-2}	1.22×10^{-8}	1:1 결합 모델

[0395]

[0396] 이상의 결과로부터, 실시예 10에서 제작한 항인간 FCRL1 인간화 항체는, chDK681 항체 및 chDK1142 항체와 동등한 결합 활성을 갖는 것이 명확해졌다.

[0397] [실시예 12] 신규 항인간 FCRL1 인간화 항체의 ADC의 제작

[0398] 실시예 1 및 2의 방법에 준하여, S239C 변이를 갖는 신규 항FCRL1 항체, 및 이들 항체 변이 부위에 특이적으로 SG3249를 부가한 ADC를 제작하였다. 또한, 신규 항인간 FCRL1 인간화 항체의 가변 영역의 서열은 표 4에 나타낸 것을 사용하였다. 모든 ADC의 약물 항체비는 1.7 내지 1.8이었다.

[0399] [실시예 13] 신규 항인간 FCRL1 인간화 항체의 ADC의 항세포 시험

[0400] 실시예 7의 방법에 준하여, 실시예 12에서 제작한 신규 항FCRL1 인간화 항체의 ADC SU-DHL-6 세포 및 Ramos 세포에 대한 항세포 효과를 확인하였다.

[0401] SU-DHL-6 세포에 대한 항세포 시험의 결과를 도 7a 및 도 7b, Ramos 세포에 대한 항세포 시험의 결과를 도 8a 및 도 8b에 나타낸다. 도 7a, 도 7b, 도 8a 및 도 8b에 나타내는 바와 같이, SU-DHL-6 세포 및 Ramos 세포에 대하여, 어느 신규 항FCRL1 항체의 ADC도 공지 항FCRL1 항체의 ADC와 비교하여 강한 항세포 효과가 확인되었다.

[0402] [실시예 14] 신규 항인간 FCRL1 인간화 항체의 ADC 항종양 시험

- [0403] 실시예 3 및 8의 방법에 준하여, 제작한 SU-DHL-6 세포 피하 이식 마우스 모델 및 Ramos 세포 피하 이식 마우스 모델을 사용하여 이하의 항종양 시험에서 사용하였다.
- [0404] 군 분류일(day0)에 0.3mg/kg body weight의 희석한 신규 항인간 FCRL1 인간화 항체의 ADC 또는 7G8-ADC를 꼬리 정맥 내에 투여하였다. 비히클의 조성은 10mmol/L L-글루탐산나트륨, 262mmol/L D-소르비톨, 0.05mg/mL 폴리소르베이트 80, pH 5.5이다. Day7에 있어서의 7G8-ADC 투여군의 평균 종양 체적을 1로 하고, 각각의 신규 항인간 FCRL1 인간화 항체의 ADC 투여군의 평균 종양 체적의 상대값을 도 9에 나타낸다. 또한, 신규 항인간 FCRL1 인간화 항체의 ADC는 실시예 12에서 제작한 ADC를 사용하고, 7G8-ADC는 실시예 2에서 제작한 ADC를 사용하였다.
- [0405] 도 9에 나타내는 대로, 어느 신규 항FCRL1 인간화 항체의 ADC는, 7G8-ADC보다도 강한 항종양 활성을 갖고 있었다. 이 결과로부터, 신규 항FCRL1 인간화 항체의 ADC는 공지 항FCRL1 항체의 ADC보다도 우수한 항종양 효과가 있는 것이 나타내졌다.

산업상 이용가능성

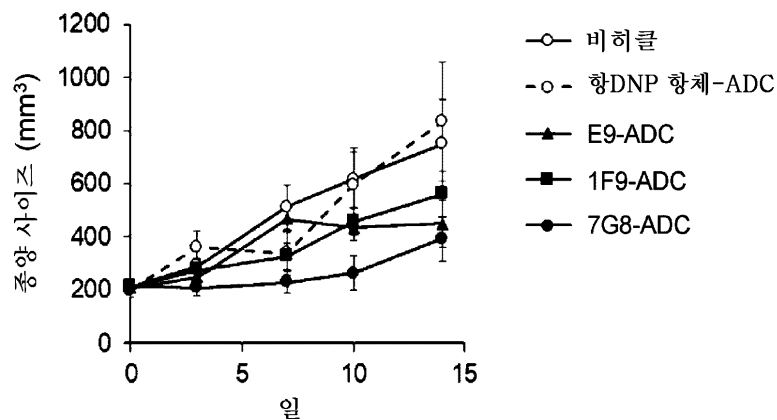
- [0406] 본 발명에 의해, FCRL1의 세포 외 영역에 결합하는 신규 모노클로날 항체 또는 해당 항체 단편 등이 제공된다.
- [0407] 본 발명을 특정한 양태를 참조하여 상세하게 설명했지만, 본 발명의 정신과 범위를 벗어나지 않고 각종 변경 및 수정이 가능한 것은, 당업자에 있어서 명확하다. 또한, 본 출원은, 2022년 2월 9일자로 출원된 일본 특허 출원(일본 특허 출원 제2022-019051호)에 기초하고 있으며, 그 전체가 인용에 의해 원용된다. 또한, 여기에 인용되는 모든 참조는 전체로서 도입된다.
- [0408] 서열 번호 1: 인간 FCRL1의 유전자 서열
- [0409] 서열 번호 2: 원숭이 FCRL1의 유전자 서열
- [0410] 서열 번호 3: 인간 FCRL1의 아미노산 서열
- [0411] 서열 번호 4: 원숭이 FCRL1의 아미노산 서열
- [0412] 서열 번호 5: E3의 VH의 아미노산 서열
- [0413] 서열 번호 6: E3의 VL의 아미노산 서열
- [0414] 서열 번호 7: E9의 VH의 아미노산 서열
- [0415] 서열 번호 8: E9의 VL의 아미노산 서열
- [0416] 서열 번호 9: 1F9의 VH의 아미노산 서열
- [0417] 서열 번호 10: 1F9의 VL의 아미노산 서열
- [0418] 서열 번호 11: 2A10의 VH의 아미노산 서열
- [0419] 서열 번호 12: 2A10의 VL의 아미노산 서열
- [0420] 서열 번호 13: 7G8의 VH의 아미노산 서열
- [0421] 서열 번호 14: 7G8의 VL의 아미노산 서열
- [0422] 서열 번호 15: 2G5의 VH의 아미노산 서열
- [0423] 서열 번호 16: 2G5의 VL의 아미노산 서열
- [0424] 서열 번호 17: 5A2의 VH의 아미노산 서열
- [0425] 서열 번호 18: 5A2의 VL의 아미노산 서열
- [0426] 서열 번호 19: DK610의 VH의 아미노산 서열
- [0427] 서열 번호 20: DK610의 HCDR1의 아미노산 서열
- [0428] 서열 번호 21: DK610의 HCDR2의 아미노산 서열
- [0429] 서열 번호 22: DK610의 HCDR3의 아미노산 서열

- [0430] 서열 번호 23: DK610의 VL의 아미노산 서열
- [0431] 서열 번호 24: DK610의 LCDR1의 아미노산 서열
- [0432] 서열 번호 25: DK610의 LCDR2의 아미노산 서열
- [0433] 서열 번호 26: DK610의 LCDR3의 아미노산 서열
- [0434] 서열 번호 27: DK681의 VH의 아미노산 서열
- [0435] 서열 번호 28: DK681의 HCDR1의 아미노산 서열
- [0436] 서열 번호 29: DK681의 HCDR2의 아미노산 서열
- [0437] 서열 번호 30: DK681의 HCDR3의 아미노산 서열
- [0438] 서열 번호 31: DK681의 VL의 아미노산 서열
- [0439] 서열 번호 32: DK681의 LCDR1의 아미노산 서열
- [0440] 서열 번호 33: DK681의 LCDR2의 아미노산 서열
- [0441] 서열 번호 34: DK681의 LCDR3의 아미노산 서열
- [0442] 서열 번호 35: DK1142의 VH의 아미노산 서열
- [0443] 서열 번호 36: DK1142의 HCDR1의 아미노산 서열
- [0444] 서열 번호 37: DK1142의 HCDR2의 아미노산 서열
- [0445] 서열 번호 38: DK1142의 HCDR3의 아미노산 서열
- [0446] 서열 번호 39: DK1142의 VL의 아미노산 서열
- [0447] 서열 번호 40: DK1142의 LCDR1의 아미노산 서열
- [0448] 서열 번호 41: DK1142의 LCDR2의 아미노산 서열
- [0449] 서열 번호 42: DK1142의 LCDR3의 아미노산 서열
- [0450] 서열 번호 43: DK1141의 VH의 아미노산 서열
- [0451] 서열 번호 44: DK1141의 HCDR1의 아미노산 서열
- [0452] 서열 번호 45: DK1141의 HCDR2의 아미노산 서열
- [0453] 서열 번호 46: DK1141의 HCDR3의 아미노산 서열
- [0454] 서열 번호 47: DK1141의 VL의 아미노산 서열
- [0455] 서열 번호 48: DK1141의 LCDR1의 아미노산 서열
- [0456] 서열 번호 49: DK1141의 LCDR2의 아미노산 서열
- [0457] 서열 번호 50: DK1141의 LCDR3의 아미노산 서열
- [0458] 서열 번호 51: DK1166의 VH의 아미노산 서열
- [0459] 서열 번호 52: DK1166의 HCDR1의 아미노산 서열
- [0460] 서열 번호 53: DK1166의 HCDR2의 아미노산 서열
- [0461] 서열 번호 54: DK1166의 HCDR3의 아미노산 서열
- [0462] 서열 번호 55: DK1166의 VL의 아미노산 서열
- [0463] 서열 번호 56: DK1166의 LCDR1의 아미노산 서열
- [0464] 서열 번호 57: DK1166의 LCDR2의 아미노산 서열
- [0465] 서열 번호 58: DK1166의 LCDR3의 아미노산 서열

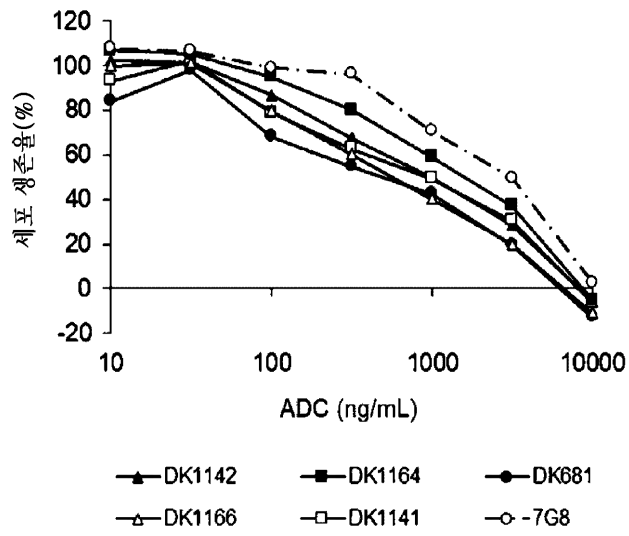
- [0466] 서열 번호 59: DK1164의 VH의 아미노산 서열
- [0467] 서열 번호 60: DK1164의 HCDR1의 아미노산 서열
- [0468] 서열 번호 61: DK1164의 HCDR2의 아미노산 서열
- [0469] 서열 번호 62: DK1164의 HCDR3의 아미노산 서열
- [0470] 서열 번호 63: DK1164의 VL의 아미노산 서열
- [0471] 서열 번호 64: DK1164의 LCDR1의 아미노산 서열
- [0472] 서열 번호 65: DK1164의 LCDR2의 아미노산 서열
- [0473] 서열 번호 66: DK1164의 LCDR3의 아미노산 서열
- [0474] 서열 번호 67: hzDK681 HV0의 아미노산 서열
- [0475] 서열 번호 68: hzDK681 LV0의 아미노산 서열, DK681 F11 및 DK681 F14의 VL의 아미노산 서열
- [0476] 서열 번호 69: hzDK1142 HV0의 아미노산 서열
- [0477] 서열 번호 70: hzDK1142 LV0의 아미노산 서열
- [0478] 서열 번호 71: DK1142 F24의 LCDR2의 아미노산 서열
- [0479] 서열 번호 72: DK681 F11 및 DK681 F13의 VH의 아미노산 서열
- [0480] 서열 번호 73: DK681 F12 및 DK681 F14의 VH의 아미노산 서열
- [0481] 서열 번호 74: DK681 F12 및 DK681 F13의 VL의 아미노산 서열
- [0482] 서열 번호 75: DK1142 F21의 VH의 아미노산 서열
- [0483] 서열 번호 76: DK1142 F21 및 DK1142 F22의 VL의 아미노산 서열
- [0484] 서열 번호 77: DK1142 F22 및 DK1142 F24의 VH의 아미노산 서열
- [0485] 서열 번호 78: DK1142 F24의 VL의 아미노산 서열
- [0486] 서열 번호 79: 인간 IgG1의 CH의 아미노산 서열
- [0487] 서열 번호 80: IgG1(S239C)의 CH의 아미노산 서열

도면

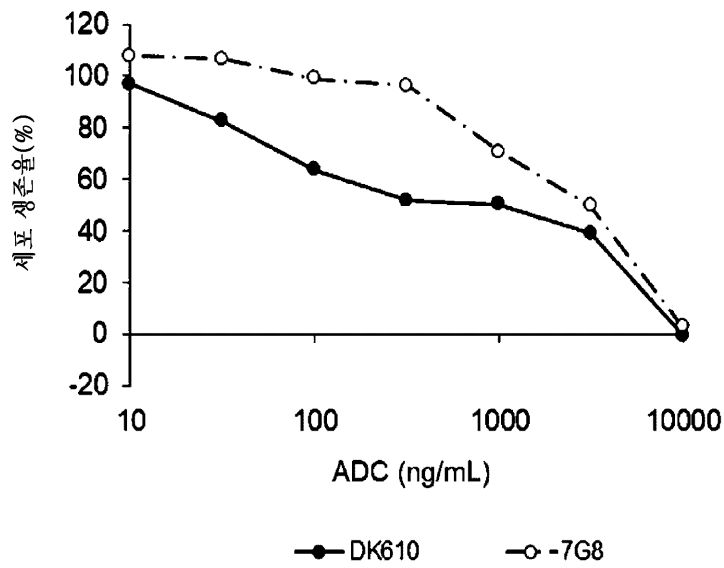
도면1



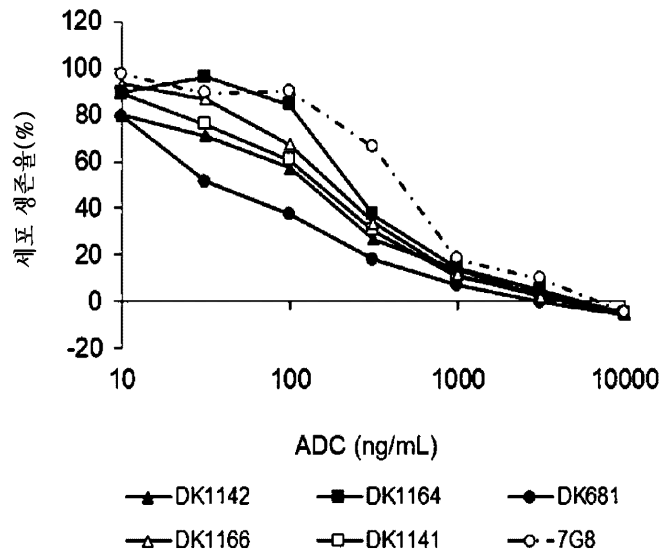
도면2a



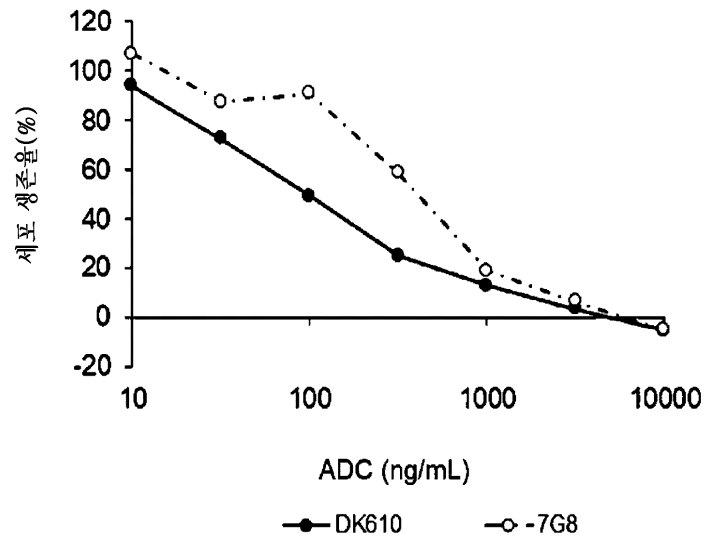
도면2b



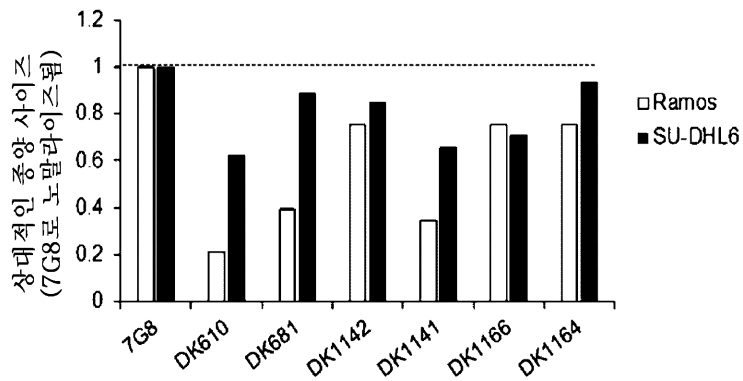
도면3a



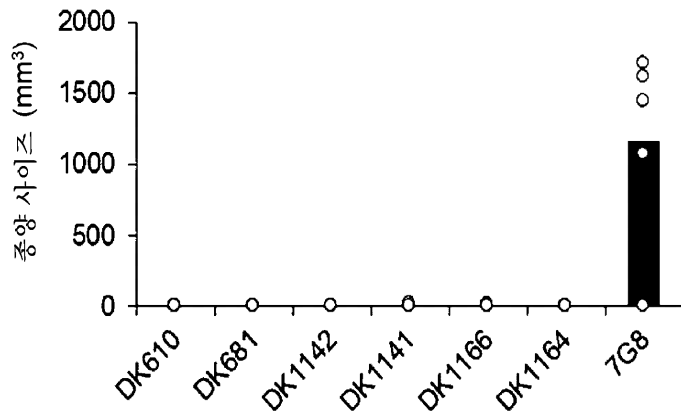
도면3b



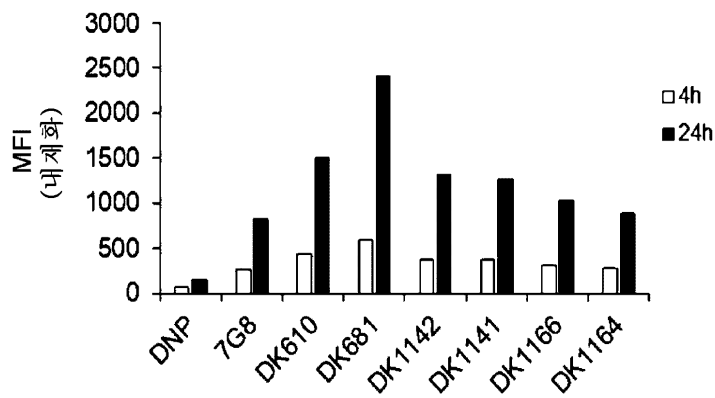
도면4



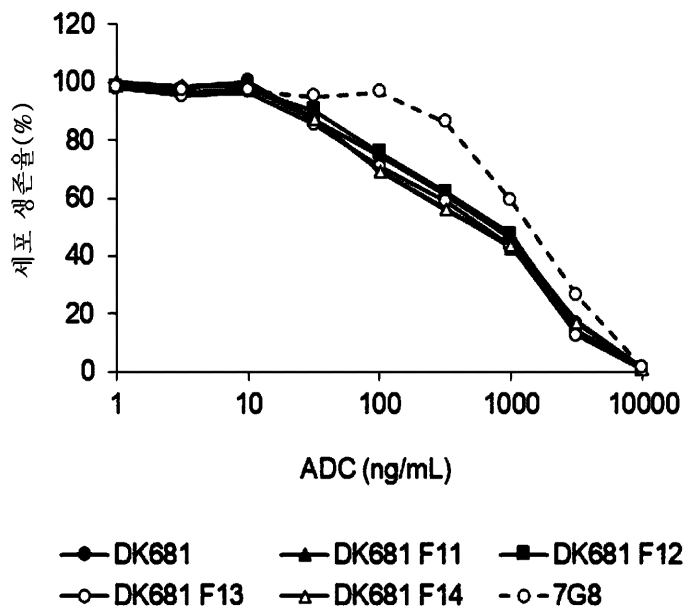
도면5



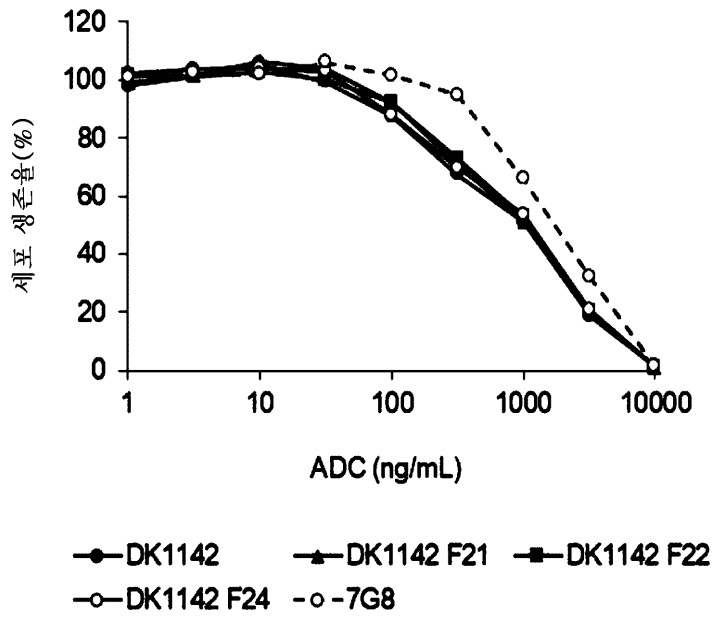
도면6



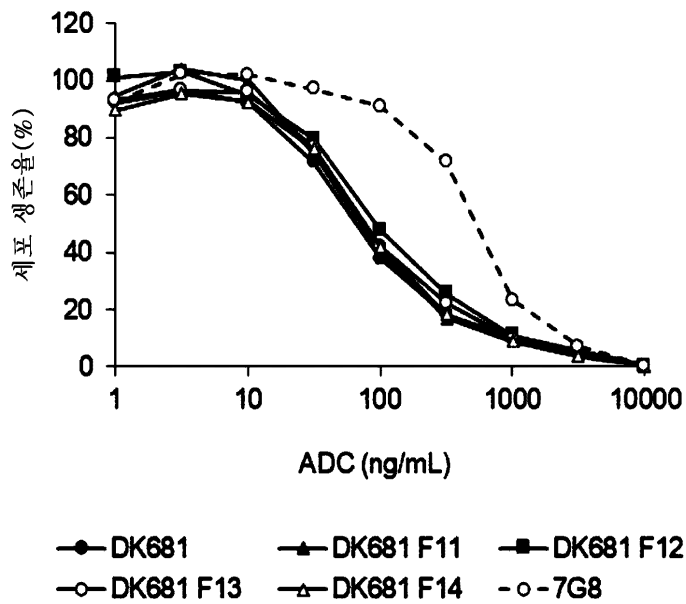
도면7a



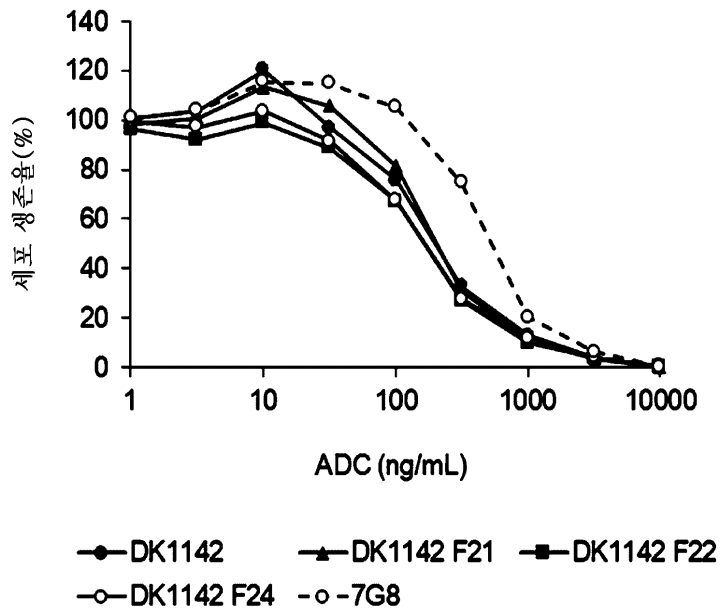
도면7b



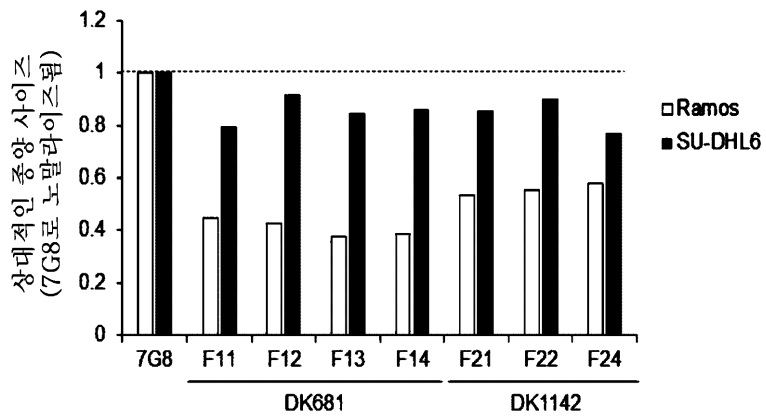
도면8a



도면8b



도면9



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.