



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0042654
 (43) 공개일자 2013년04월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7007946(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2004년03월19일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2005-7016180
 원출원일자(국제) 2004년03월19일
 심사청구일자 2009년03월17일
- (85) 번역문제출일자 2013년03월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2004/002888
- (87) 국제공개번호 WO 2004/083247
 국제공개일자 2004년09월30일
- (30) 우선권주장
 03290725.5 2003년03월21일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 03290942.6 2003년04월16일
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
바이오테스트 아게
 독일 데-63303 드라이이흐 란트스타이네르슈트라
 세 5
- (72) 발명자
비데네 중
 프랑스 에프-25720 라르노 케멩 드 라 그라데
요누라이트 헬무트
 독일 65462 긴스하임-구스타프스부르크 헬렌-
 켈러-슈트라세 11
- (74) 대리인
유미특허법인

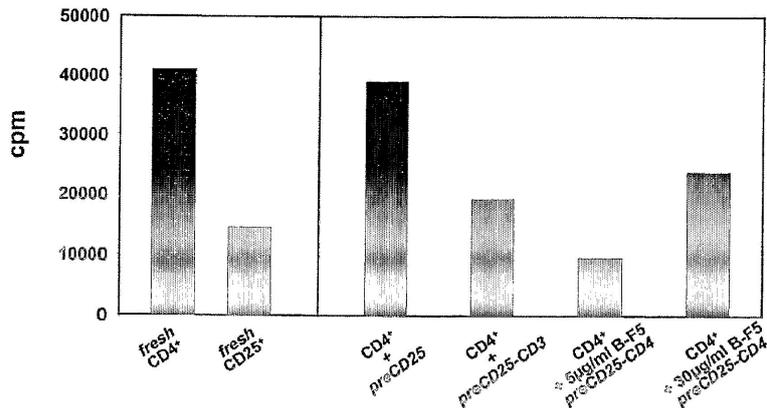
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **면역억제 특성을 가진 인간화 항-CD4 항체**

(57) 요약

본 발명은 마우스 단클론 항-CD4 항체 B-F5로부터 유래한 인간화 항체(humanized antibody)에 관한 것이다. 상기 항체는 CD25⁺CD4⁺ 조절성 T 세포를 활성화시킬 수 있으며 면역억제성 조성물 제조에 유용하다.

대표도 - 도9



특허청구의 범위

청구항 1

마우스 단클론 항-CD4 항체 B-F5로부터 유래된 것으로 아래 폴리펩타이드 서열로 규정되는 V 도메인을 갖는, 인간화된 항체(hB-F5):

- H 체인 V 도메인:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLMNSLKTEDTAVYYCSASY
YRYDVGAWFAYWGQGLTVVSS(서열번호 1)

- L 체인 V 도메인:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQKPGQPPELLIYLASILESGVPDRFSGSGSGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQHSRELPWTF
GQGTKVEIK(서열번호 2).

청구항 2

서열번호 1의 도메인 및 서열번호 2의 V 도메인을 포함하는, 제 1항에 기재된 hB-F5 항체의 단편.

청구항 3

아래 폴리뉴클레오티드들로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드:

- 서열번호 1의 H 체인의 V 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- 서열번호 2의 L 체인의 V 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 아래 폴리뉴클레오티드들로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드:

- 서열번호 3의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드;
- 서열번호 4의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제 1항에 기재된 인간화된 항체 또는 제 2항에 기재된 단편을 포함하는 치료학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 기재된 인간화된 항체 또는 제 2항에 기재된 단편의, 면역억제 조성물을 제조하기 위한 용도.

청구항 7

제 1항에 기재된 인간화된 항체의, CD25⁺CD4⁺ 조절성 T 세포를 생체외에서 활성화시키기 위한 용도.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간화 항-CD4 항체 및 그것의 면역조절 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 자가면역 질환은 이식 거부 반응과 더불어 조직 항원들: 첫번째는 자가 항원이고 두번째는 동종이식 항원에 대한 부적합한 면역 반응으로부터 발생된다.

[0003] 자가면역 질환에는 예컨대 류마티스 관절염, 1형 당뇨병, 다발성 경화증, 크론씨병, 궤양성 결장염, 아토피 피

부염 등이 포함된다.

- [0004] 이러한 면역 질환들에 대한 기존 치료법에는 면역억제성 약물이 관련되어 있다. 그러나 이러한 약물들은 일반적인 면역억제를 유발하여, 면역체계의 해로운 기능 뿐만 아니라 유익한 기능들을 억제하는 결과를 초래한다. 따라서, 그것은 기회 감염과 같은 부작용을 발생시킨다.
- [0005] 다른 접근방법으로서, 특히 림프구 일부(항체 고갈성)를 제거하거나 또는 표적 표면 분자를 가진 세포를 사멸시키지 않으면서 표적 표면 분자의 기능을 억제(항체 비고갈성)하기 위해, 세포 표면 분자들에 대한 면역억제성 단클론 항체 사용이 제안되었다.
- [0006] CD4⁺ T 세포가 자가면역의 개시와 유지에 중요한 역할을 한다는 사실은 일반적으로 합의된 것이다. 이에, CD4⁺ T 세포의 표면 분자에 대한 mAb, 특히 항-CD4 mAb를 면역억제제로 사용하는 방안이 제안되고 있다. 수많은 임상 연구들을 통하여 상기한 방법의 잠재적인 중요성이 확인되고 있지만, 일상적인 임상 실무에 사용하기에 보다 적합한 항 CD4 mAb를 제조하기 위하여 몇 가지 해결되어야 하는 문제점들이 제시되고 있다.
- [0007] 예컨대, B-F5 항체(뮤린 IgG1 항-인간 CD4)는 여러가지 자가면역 질환들에 대해 테스트되었다.
- [0008] - 류마티스 관절염 환자의 경우, 몇몇 공개 실험들에서 1일 투여량 최소 20 mg에서 B-F5의 임상적으로 긍정적인 효과가 확인되었다(Racadot et al. Clin Exp Rheumatol 10(4):365-74, 1992; Wendling et al., Clin Rheumatol, 11(4): 542-7, 1992). 그러나 매일 20 mg으로 10일간 투여한 위약 대조 실험에서는 현저한 개선이 관찰되지 않았다(Wendling et al. J Rheumatol ; 25(8):1457-61, 1998);
- [0009] - 건선의 경우, 7 또는 8일간 0.2 mg/kg/day 내지 0.8 mg/kg/day로 투약시 건선 환부의 개선이 관찰되었다 (Morel et al., J Autoimmun., 5(4): 465-77, 1992);
- [0010] - 다발성 경화증(MS) 환자의 경우, 재발-이장성(relapsing-remitting) 형 환자에서 10일간 치료후 일부 양성 효과가 관찰되었으며, 일부는 치료요법 후 6달째에 재발되지 않았고(Racadot et al., J Autoimmun, 6(6):771-86, 1993); 유사한 효과가 Rumbach 등(MultScler ; 1(4): 207-12, 1996)에 의해 관찰되었다;
- [0011] - 중증 크론씨 병의 경우, B-F5를 7일간 연속하여 0.5 mg/kg/day으로 투여받거나 또는 첫날(0일)엔 0.5 mg/kg/day로 그 이후 1일에서 6일까지 1 mg/kg/day로 투여받은 환자에서 유의할만한 개선이 관찰되지 않았다 (Canva-Delcambre et al., Aliment Pharmacol Ther 10(5):721-7, 1996);
- [0012] - 동종이식 거부반응의 예방으로, 1일 30 mg 투약시 생체내 B-F5의 작용을 나타내는 생물학적 파라미터의 변화가 보고되었다. 그러나, B-F5의 생물학적 이용성은 동종이식 거부반응의 예방 용도로 사용하기엔 불충분한 것으로 개시되었다(Dantal et al. Transplantation, 27; 62(10): 1502-6, 1996).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 전술한 바로 부터, 해결하여야 하는 첫번째 논의는 임상적인 개선을 이루기 위해 다량의 투여량을 사용할 필요가 있다는 것이다. 이는 특히 표적 조직에서 림프구 mAb에 불충분한 접근성에 기인될 수 있다. 다량의 투여량을 사용하면 혈액 림프구에 대한 과도한 작용을 초래하게 되어 원치않는 부작용을 유발할 수 있다.
- [0014] 단클론성 항체를 이용한 인간을 대상으로 한 치료요법의 다른 문제점은, 이러한 항체들은 마우스 세포에서 일반적으로 수득되고 있으며, 인간 수용체에 항마우스 반응을 유발한다는 것이다. 이는, 치료 효능 감소와 마우스 단클론 항체를 이용한 보다 많은 향후 치료 뿐만 아니라 아나필락시스(anaphylaxis)의 위험 증가로 귀착된다.
- [0015] 이러한 문제점은, 원칙적으로 항원 결합 특이성을 결정하는 마우스 단클론 항체의 상보성 결정 부위(complementarity-determining region)(CDRs)를 인간의 면역글로블린 분자의 프레임워크 부위(framework region)(FRs)에 이식하여 수득한 인간화 항체를 이용함으로써 피할 수 있다. 인간화의 목적은, CDR로부터 유래된 마우스 단클론 항체와 같이 동일한 항원 결합 특성을 가지며 인간에 대해 면역원성이 거의 없는 재조합 항체를 수득하는 것이다.
- [0016] 일부, 인간 프레임워크에서 인간 CDRs를 마우스 항체로부터 유래된 CDRs로 치환하는 것은 항원 결합 특성(단지 특이성 뿐만 아니라 항원에 대한 친화성을 포함함)을 전이하기에 충분하다. 그러나, 다수의 항체들에서, 일부 FR 잔기들이 항원 결합에 중요한데, 이는 이들이 항체-항원 복합체에서 직접적으로 항원에 접촉하거나 또는 이

들은 CDRs의 배위에 영향을 미쳐 항원 결합에 참여하기 때문이다.

[0017] 따라서, 대다수의 경우들에서, 마우스 항체로부터 유래된 하나 또는 몇개의 프레임워크 잔기를 대응하는 인간 FR 잔기에 치환하는 것이 또한 필수적이다. 항-마우스 반응을 예방하기 위해 치환된 잔기의 갯수는 가능한 적어야 하므로, 항원 결합 특성 유지에 중요한 아미노산 잔기를 결정하는 것이 논의되고 있다. 다양한 방법들이 치환에 보다 적합한 위치를 예측하기 위해 제시되고 있다. 이들은 첫번째 인간화 단계를 일부 보조할 수 있는 일반적인 원칙을 제시하지만, 최종 결과는 항체마다 다양하다. 따라서 특정 항체에서 치환으로 목적인 결과를 제공할 수 있을 지를 예측하긴 매우 어려운 실정이다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명자들은 그러나 마우스 B-F5의 인간화를 시도하였으며, 모체 마우스 B-F5와 동일한 CD4 결합 특성을 가진 인간화된 B-F5(이하 hB-F5라 함)를 생산하는데 성공하였다.

[0019] 또한, 본 발명자들은 놀랍게도 hB-F5가 기존에 모체 B-F5를 이용한 방법과 및 그의 항-CD4 단클론 항체를 이용한 현재 방법에 비해 더 낮은 투여량에서 생체내 최적의 면역억제 효과를 가짐을 확인하였다.

[0020] 실제 본 발명자들은 hB-F5를 10일간 1/mg/day의 낮은 투여량 또는 2일마다 5 mg으로 투여하는 경우, 류마티스 관절염 환자에서 긍정적인 임상 효과를 보인 바와 같이, 효과적인 면역억제성을 제공함을 확인하였다.

[0021] 본 발명은 마우스 B-F5 mAb로부터 유래된 인간화된 항체(hB-F5)를 제공하며, 상기 hB-F5는 하기 폴리펩타이드 서열로 규정되는 V 도메인을 갖는다:

[0022] - H 체인 V 도메인: EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLOMNSLKTEDTAVYYCSASYRYRVDVGAWFAYWGQGLTVTVSS(서열번호 1)

[0023] - L 체인 V 도메인: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQKPGQPPELLIYLASILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIK(서열번호 2).

[0024] 일반적으로, 본 발명의 hB-F5 항체는 인간 불변 부위(human constant region)(Fc)를 추가적으로 포함한다. 상기 불변 부위는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함한 면역글로불린 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한 동형 타입의 모든 클래스로부터 유래된 불변 도메인들 중에서 선택될 수 있다. 바람직한 불변 부위는 IgG, 특히 IgG1의 불변 도메인들 중에서 선택된다.

[0025] 또한 본 발명은 hB-F5의 V 부위를 포함하여 임의의 hB-F5 항체 단편을 포함한다. 상기 단편은 특히 Fab, Fab', F(ab)'₂, Fv 및 scFv 단편을 포함한다.

[0026] 또한 본 발명은 아래 기재된 폴리뉴클레오티드들 중에서 선택된 폴리뉴클레오티드를 포함한다:

[0027] - 서열번호 1에 기재된 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[0028] - 서열번호 2에 기재된 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

[0029] 바람직하기로는, 상기 뉴클레오티드는 하기로부터 선택된다:

[0030] - 서열번호 3에 기재된 폴리뉴클레오티드;

[0031] - 서열번호 4에 기재된 폴리뉴클레오티드.

[0032] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 재조합 DNA 기법 및/또는 DNA 화학 합성의 공지 방법들에 의해 용이하게 획득할 수 있다.

[0033] 이러한 방법으로 획득한 완전한 H 및 L 체인을 발현하기 위해, hB-F5 항체의 H 체인 또는 L 체인의 V 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 인간의 H 또는 L 체인의 불변 부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 융합될 수 있다; 단백질 분비를 허용하는 신호 펩타이드를 코딩하는 서열 역시 부가될 수 있다. 이러한 재조합 폴리뉴클레오티드 역시 본 발명의 일부분이다.

[0034] 또한 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 선택한 숙주세포에서 전사 및 번역 조절이 가능한 적절한 조절 서열에 연결되어 있는 발현 카세트 및 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0035] 이런 재조합 DNA 구조체는 재조합 DNA 및 유전공학의 널리 알려진 기법을 통하여 획득되고 숙주 세포내로 도입

될 수 있다.

- [0036] 또한 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드로 형질전환되는 숙주세포를 포함한다.
- [0037] 본 발명의 범위내에서 사용가능한 숙주세포는, 원핵 세포 또는 진핵세포일 수 있다. 적합한 진핵세포들 중, 예컨대 식물세포, 사카로마이세스(*Saccharomyces*)와 같은 효모 세포, 초파리(*Drosophila*) 또는 스포도프테라(*Spodoptera*)와 같은 곤충 세포 및 HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS 등의 포유류 세포들이 언급될 수 있을 것이다.
- [0038] 본 발명의 발현 벡터의 구축 및 숙주세포의 형질전환은 분자생물학의 표준적인 기법에 의해 수행될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 hB-F5 항체는, 상기 항체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터 함유성 숙주세포를, 상기 항체 발현에 적합한 조건하에서 배양하고 숙주세포 배양물로부터 상기 항체를 회수함으로써 획득할 수 있다.
- [0040] 또한 본 발명은 전술한 바와 같이 본 발명의 hB-F5 항체 또는 그의 단편을 포함하는 치료학적 조성물을 포함한다.

발명의 효과

- [0041] 상기 조성물은 투여량 0.1 mg 내지 10 mg으로, 보다 좋게는 1 내지 5 mg의 투여량으로 투여가능하도록 제형화된 비경구 투여용 조성물이 바람직하다. 상기 면역억제성 조성물은 특히 이식 거부반응, 이식편-숙주반응(graft-versus-host reaction) 또는 숙주편대 이식반응(host-versus-graft reaction)과 같은 질환, 또는 예컨대 심근염, 당뇨병, 건선, 홍반성 루푸스, 크론씨병, 다발 경화증, 류마티스 관절염 등을 포함한 자가면역 질환들의 치료 또는 예방에 유용하다.
- [0042] 또한, 본 발명자들은 hB-F5가 T CD4⁺ 세포, 즉 CD4⁺CD25⁺ 세포의 특정 부분을 활성화시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0043] CD25⁺CD4⁺ 조절성 T 세포(Treg 세포)는 말초 CD4⁺ T 세포 5-10%로 이루어져 있다. 이들은 1995년에 Sakaguchi 등(J. Immunol., 155: 1151-1164)에 의해 마우스의 조절성 세포로서 처음 개시되었다. 상기 세포가 활성화되면, 이는 활성화되면, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 모두의 활성화 및 증식을 억제할 수 있다. 이후 CD25⁺CD4⁺ 억제성 T 세포는 인간에서도 발견되었다(Jonuleit et al. J. Exp. Med. 193, 1285-1294, 2001; Levings et al., J. Exp. Med. 193, 1295-1302, 2001; Dieckmann et al., J. Exp. Med. 193, 1303-1310 2001). 여러가지 자가면역질환 모델과 생체의 시스템에서 상기 세포의 면역억제성 역할을 기재하는 수많은 문헌들이 공개되었다(리뷰로서, 예컨대 Shevach, J. Exp. Med., 193, 11, 41-46, 2001 참조). *Ex vivo* 활성화된 CD4⁺CD25⁺ Treg 세포는 또한 이식편-숙주반응 질환을 예방하는데 효과적인 것으로 확인되었다(Taylor et al., Blood, 99, 3493-3499, 2002; Cohen et al., J. Exp. Med. 196, 401-406, 2002; Hoffmann et al., J. Exp. Med. 196, 389-399, 2002). 따라서, CD4⁺CD25⁺ Treg 세포를 활성화하기 위한 수단을 제공하는 것이 매우 중요한 것이다.
- [0044] 또한 본 발명은 본 발명의 hB-F5 항체 또는 모항체 B-F5의 생체의 CD25⁺CD4⁺ 조절성 T 세포를 활성화하기 위한 용도에 관한 것이다.

- [0045] 본 발명의 hB-F5 항체는 1 μg/ml 내지 10 μg/ml 농도로 CD25⁺CD4⁺ 조절성 T 세포에 첨가되는 것이 바람직하다.

도면의 간단한 설명

- [0046] .

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 본 발명은 본 발명의 hB-F5 항체 특성을 예시하는 실시예를 언급하고 있는 아래 부가적인 설명에 의해 더 예시될 것이다. 그러나, 실시예들은 본 발명의 예시하기 위한 것일 뿐 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0048] **실시예 1: 인간화된 B-F5의 구축**

- [0049] **인간화된 B-F5 V_H 및 V_K 부위 설계**

- [0050] 마우스 B-F5 V_H 및 V_K를 코딩하는 DNA 서열은 각각 도 1 및 도 2와 서열 식별기호인 서열번호 5 및 서열번호 6에

나타내었다. 마우스 CDR가 이식되는 위치의 인간 V_H 및 V_K 는, 마우스의 고유 B-F5 V_H 및 V_K 와 가장 유사한 인간 V_H 에 대한 데이터베이스 검색으로 선별하였다. 인간 항체의 V_H 부위(M26; Accession Number A36006)가 B-F5 V_H 와 가장 높은 상동성이 있었다. 다른 인간 항체의 V_K 부위(FK-001; NAKATANI et al., Biotechnology, 7 (1989), 805-810))가 B-F5 V_K 와 가장 높은 상동성이 있었다.

[0051] 4번째 잔기가 루신 또는 메티오닌으로 구성된 차이가 있는 두 가지 V_K 타입을 구축하였고 각각 L4L 및 L4M로 표시하였다. 37번째 잔기가 루신 또는 발린으로 구성된 차이가 있는 두 가지 V_H 타입을 구축하였고, H37L 및 H37V으로 표시하였다. B-F5, FK-001, L4L, 및 L4M의 폴리펩타이드 서열 배열은 도 3에 나타나 있다. B-F5, M26, H37L, 및 H37V의 폴리펩타이드 서열 배열은 도 4에 나타나 있다. CDR 패킹(packaging)에 중요한 것으로 이미 보고된 바 있는, FR 잔기들은 박스로 표시하였다(Chothia et al., Nature, 342(1989), 877; Foote et al., J. Mol. Biol., 224 (1992), 487).

[0052] V_H 및 V_K 를 조합하여, 4가지 버전의 V 부위를 고안하였다.

[0053] **인간화된 B-F5의 발현**

[0054] 인간화된 B-F5를 생산하기 위한 이후 단계들은, 인간화된 B-B10에 대한 미국 특허 제 5,886,152호에 개시되어 단계와 동일하였다.

[0055] 간략하게 설명하면, 인간화된 B-F5의 H 체인(인간 γ -1 체인의 불변 부위와 융합된 V_H 인간화 부위)과 L 체인(FK-001 κ 체인의 불변 부위와 융합된 V_K 인간화 부위)에 대한 발현 플라스미드를 각각 구축하였다. 상기 플라스미드들에서, 인간화된 B-F5의 발현은 인간 단클론성 IgM, FK-001 유전자의 프로모터/인핸서에 의해 수행된다. 도 5 및 6 각각은 인간화된 BF-5의 V_H 및 V_K 부위를 코딩하는 플라스미드 절편을 나타낸다. V 부위를 코딩하는 서열은 밑줄 친 부분이며, 폴리펩타이드 서열에 대응되는 핵산 서열은 상위에 기재되어 있다. 플라스미드 및 pSV2neo 모두 동시에 마우스 골수종 Sp2/0(ATCC CRL-1581) 세포에 리포펙틴™을 이용하여 도입되었다. 항-인간 IgG(γ 체인) 항체 및 항-인간 Ig κ 체인을 이용한 ELISA로 인간 IgG를 발현하는 형질전환체를 선별하였다.

[0056] **실시예 2: 인간화된 B-F5의 여러가지 버전들의 특징화**

[0057] **CD4 결합 활성 측정**

[0058] 4가지 버전의 hB-F5를 생산하는 형질전환체의 배양 상등액을 모아 농축하였다. 단백질 A 세파로스를 이용한 친화성 크로마토그래피로 배양 상등액으로부터 여러가지 항체를 정제하였고, 경쟁적 ELISA 방법에 의해 수용성 CD4가 코팅된 마이크로플레이트에서의 바이오틴화된 mB-F5의 결합에 대한 이들의 저해 활성을 측정함으로써 이들의 CD4 결합 활성을 분석하였다. 배양 시간은 37 °C에서 2시간 및 4 °C에서 하룻밤이다.

[0059] 하기 표 1에 hB-F5s의 상대적인 결합 활성이 기재되어 있다.

[0060] 표 1

항체	온도 (°C)	상대적인 결합 활성 (mB-F5%)
H37L/L4L	4	80
	37	30
H37L/L4M	4	80
	37	30
H37V/L4L	4	10-20
	37	10
H37V/L4M	4	10-20
	37	10

[0061]

[0062] 표 1의 결과들로부터, CD4 결합 활성이 ^{37}Leu 에서 ^{37}Val 으로의 변환에 의해 수배 감소되므로, V_H 의 37번째 잔기 루신이 hB-F5의 CD4 결합 활성 유지에 결정적인 것으로 보인다. 이와는 반대로, V_K 의 4번째 잔기는 CD4 결합

활성에 중요하지 않을 것으로 확인되었다. V_H 의 ^{37}Leu 과 ^{37}Val 간의 구조적 차이점이 분자 모델링에 의해 명확하게 규명되지 않았으므로, CD4 결합 활성에서 H37V에 대한 H37L의 우수성은 예측되지 않았다.

[0063] H37L/L4L 및 H37L/L4M은 생체의 생물학적 활성 평가를 위해 선택되었다.

[0064] **인간화된 B-F5의 생체의 생물학적 활성 조사**

[0065] 마우스 B-F5 및 인간화된 B-F5(H37L/L4M IgG1 및 H37L/L4L IgG1)의 생체의 생물학적 활성을 평가하였다. 또한 IgG2 타입의 인간화된 B-F5(H37L/L4M IgG2 및 H37L/L4L IgG2)도 테스트하였다.

[0066] mB-F5와 4가지 타입의 hB-F5의 생체의 생물학적 활성은, 건강한 공여체로부터 받은 말초 혈액의 단핵구 세포(PBMCs)를 이용하여 평가하였다. PBMCs를 무린 B-F5 또는 hB-F5 존재하에 ConA($2.5 \mu\text{g/ml}$, 3일) 또는 PPD($10 \mu\text{g/ml}$, 4일)로 활성화시키고, ^3H -티미딘 통합(incorporation)으로 이들의 증식 반응을 관찰하였다.

[0067] 그 결과는 도 7 및 8에 기재되어 있다. 무린 B-F5 또는 hB-F5는 ConA-유발성 증식을 적당하게 억제하였으며, 그 활성은 항체 및/또는 공여체에 따라 다양하였다(도 7). 또한 무린 B-F5 또는 hB-F5는 PPD에 의해 유발되는 Ag-특이적 PBMC 증식을 저해할 수 있었다(도 8).

[0068] hB-F5의 IgG1 타입은 mB-F5에 비해 보다 더 효과적으로 PPD-유발성 증식을 억제하였다(70% 억제와 같이 높게 저해함, 도 7 및 8). IgG1 타입은, 저해 활성이 거의 mB-F5와 동일한 IgG2에 비해 보다 더 효과적인 것으로 보였다. IgG1 타입에서, H37L/L4M이 H37L/L4L보다 효과적이었다. H37L/L4M 및 H37L/L4L의 IgG2 타입은 저해 활성이 거의 동일하였다. 즉, PPD-유발성 PBMC 증식에 대한 B-F5의 저해 활성은 다음과 같다: H37L/L4M IgG1 > H37L/L4L IgG1 > H37L/L4M IgG2 = H37L/L4L IgG2 = mB-F5

[0069] 생체의 생물 활성 효능과 마우스 아미노산의 보다 적은 갯수를 고려하여, H37L/L4M IgG1를 추후 평가를 위해 선택하였다.

[0070] **실시예 3: 류마티스 관절염(RA) 환자에서의 hB-F5 의 효과 예비 평가**

[0071] hB-F5(H37L/L4M IgG1) 효능을 RA 환자들에 대해 테스트하였다.

[0072] 분석 조건은 다음과 같다:

[0073] 각 환자에 hB-F5 5 mg을 5회 주사하는 치료를 10일간 실시하였다(주사는 2일마다).

[0074] 3명의 환자들에서의 결과는 하기 표 2 내지 4에 나타내었다

[0075] 환자 1(표 2)

[0076] 진단: 류마티스 관절염, 활성2

[0077] 류마티스 인자: 2, 단계: 2

[0078] 성: 여성, 나이: 65, 질병 발병일: 1965

[0079] 부가적인 치료요법: 디클로페낙 150 mg/day

[0080] 표 2

임상 조사	치료전	치료중					치료후(주)
		2	4	6	8	10	
관절 통증 평가(0-10)	4.5	2	2	1.5	3	2.2	3.5
조조강직 시간(분)	360	0	0	90	90	120	20
용태 심각도(1-5)	의사	3	3	3	2.5	3	3
	환자	3	3	3	3	3	3
관절 붓는 횟수	6	6	4	3	2	2	7
통증성 관절 수	25	12	6	7	13	13	23
붓기정도(0-30)	8	6	4		2	3	9
손 힘	오른손	17	15	20	22	12	20
	왼손	10	10	10	15	12	19
피곤성 평가(0-10)	7.7	4	2.3	2	2.3	3.1	3
치료효과 평가	환자		3	3	4	3	5
	의사		3	3	4	3	5
적혈구 침강율	35					34	25
C-반응성 단백질	4.0					2	2.5

[0081]

[0082] 환자 2(표 3):

[0083] 진단: 류마티스 관절염, 활성3

[0084] 류마티스 인자: 2, 단계: 2

[0085] 성: 여성, 나이: 48, 질병 발병일: 2000

[0086] 부가적인 치료요법: 디클로페낙 150 mg/day

[0087] 표 3

임상 조사	치료전	치료중					치료후(주)
		2	4	6	8	10	
관절 통증 평가(0-10)	8.2		8.2	5	2.9	2.2	0.6
조조 강직 시간(분)	240		120	120	60	20	10
용태 심각도(1-5)	의사	4	3	3	3	3	2
	환자	4	4	3	3	3	2
관절 붓는 횟수	13		12	11	11	5	5
통증성 관절 수	22		22	16	15	13	7
붓기정도(0-30)	15		14	12	11	5	5
손 힘	오른손	30		30	28	34	36
	왼손	22		20	18	18	22
피곤성 평가(0-10)	8.7		5.1	2.2	2.2	1.1	0.7
치료효과 평가	환자		2	4	4	4/5	5
	의사		2	2	3	4/5	5
적혈구 침강율	35					38	35
C-반응성 단백질	1.2					0.2	0.8

[0088]

[0089] 환자 3(표 4):

[0090] 진단: 류마티스 관절염, 활성3

[0091] 류마티스 인자: 3, 단계: 2

[0092] 성: 여성, 나이: 49, 질병 발병일: 1989

[0093] 부가적인 치료요법: 디클로페낙 150 mg/day

[0094] 표 4

임상 조사	치료전	치료중						치료후(주)	
		2	4	6	8	10	1		
관절 통증 평가(0-10)	7.9	7.6	7.6	7.2	5.0	3.0	1.5	1.3	
조조 강직 시간(분)	360	0	0	0	0	0	0		
용태 심각도(1-5)	의사 환자	4	3	3	3	3	2	2	
		5	4	4	3	3	2	2	
관절 붓는 횟수	10	7	7	6	5	5	5	5	
통증성 관절 수	30	24	24	15	11	11	10	9	
붓기정도(0-30)	15	12	12	9	7	7	6		
손 힘	오른손 왼손	24	30	30	38	48	48	50	50
		24	30	30	38	10	34	40	42
피곤성 평가(0-10)	8.5	7.2	5.2	0	0	0	0	0	
치료효과 평가	환자 의사	3	3	3		5	5	5	
		3	4/3	4	4	5	5	5	
적혈구 침강율	61		53	42	45			41	
C-반응성 단백질	8				3.7			3.3	

[0095]

[0096] 실시예 4: hB-F5에 의한 CD4⁺CD25⁺ Treg 세포의 활성화

[0097] T 세포 분리

[0098] 1) T 조절성 세포(Tregs) :

- [0099] - CD25⁺ 세포를 CD25 마이크로비드를 이용하여 분리하였다;
- [0100] - 혼성물의 소거: CD14⁻, CD8⁻, CD19⁻양성 세포 소거는 CD14/CD8/CD19 DYNAL비드로 행하였다;
- [0101] - CD45RA⁺ 세포의 소거는 CD45RA mAb + 항-마우스 DYNAL비드로 행하였다: 순도: >95% CD4⁺CD25⁺ Tregs

[0102] 2) 작용 세포(Effector cell)

- [0103] - CD4⁺ T 세포를 CD4 마이크로비드를 이용하여 분리하였다.
- [0104] - CD45RO⁺ 세포의 소거는 CD45RO⁺ mAb + 항-마우스 DYNAL비드로 행하였다: 순도: > 98%CD4/CD45RA⁺, CD25-작용 세포

[0105] 3) 테스트 시스템:

[0106] 공여체 A의 CD25⁺ Treg는 첨가없이(음성대조군 = 무활성 = 억제활성 없음) 또는 항-CD3 0.5 µg/ml 존재하에 (OKT-3 = 양성 대조군 = Treg의 충분한 활성화) 또는 hB-F5 5 µg/ml 또는 30 µg/ml 존재하에, 동계의 D2-고갈된 PBMC와 함께 2일간 공동 배양하였다.

[0107] 전배양 세포를 대규모로 세척한 후, CD25⁺ Treg 세포를 분리하여 γ-방사선(3000 rad)으로 처리하였다.

[0108] 4) 억제 활성 테스트:

[0109] 전배양한 CD25⁺ Treg 세포를, T 작용 세포와 동종인(= 동종 혼합성 림프구 반응) 공여체 A(전배양한 T 세포와 동종, 추가적인 활성화 없음)의 APC's(CD2-소거된 PBMC) 존재 하에, 공여체 B로부터 새로이 분리한 CD4⁺ T 작용 세포와 (1:1)로 4일간 공동 배양하였다. 이후, 세포는 ³H 티미딘과 함께 16시간 배양하고 T 작용 세포의 증식을 검정하였다.

[0110] 그 결과는 도 9에 나타내었다.

[0111] 도 9의 설명:

- [0112] - 음성 대조군(무활성화) = preCD25;
- [0113] - 0.5 µg/ml OKT-3(양성 대조군, 충분한 활성화) = preCD25-CD3;
- [0114] - 5 µg/ml hB-F5(Test-1) = preCD25-CD4;

[0115] - 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hB-F5 (Test-2) = preCD25-CD4.

도면

도면1

mB-F5 V_H :

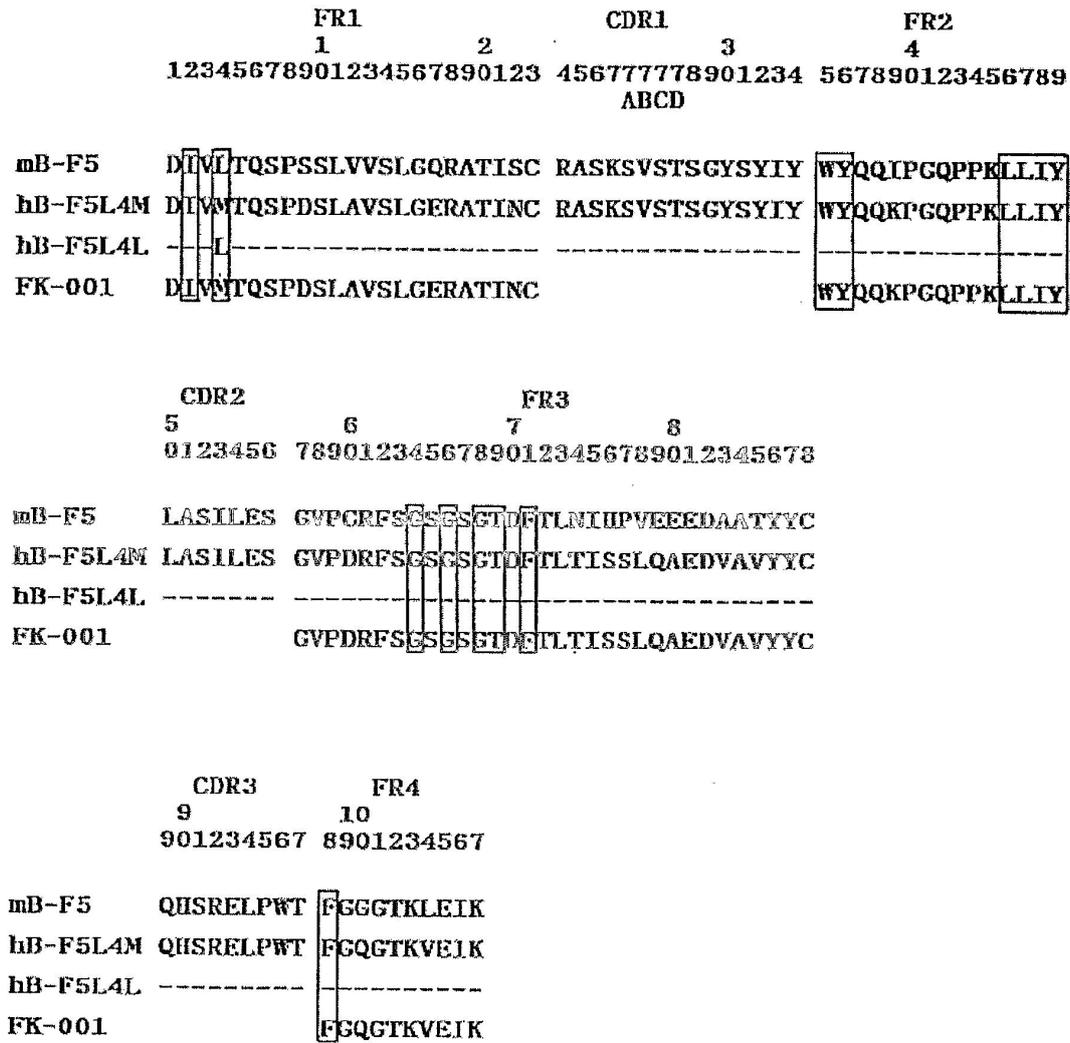
CAG GAA TAC CTT GTG GAG ACC GGG GGA GGC TTG GTG AGG CCT GGA AAT TCT CTG AAA
 CTC TCC TGT GTC ACC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC CGG ATG TAC TGG CTT CGC
 CAG CCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT
 TAT GGA GCA AAT TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT
 TCA AAA AGC AGT GTC TAT CTG CAG ATG AGC AGA TTG AGA GAG GAA GAC ACT GCC ACT
 TAT TAT TGT AGT GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG
 GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA

도면2

mB-F5 V_K :

GAC ATT GTG CTG ACA CAG TCT CCT TCT TCC TTA GTT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC
 ACC ATC TCA TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT
 TGG TAC CAA CAG ATC CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT GCA TCC ATC
 CTA GAA TCT GGG GTC CCT GGC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC
 CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAC AGT
 AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGG GCT GAT
 GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT GAG CA

도면3



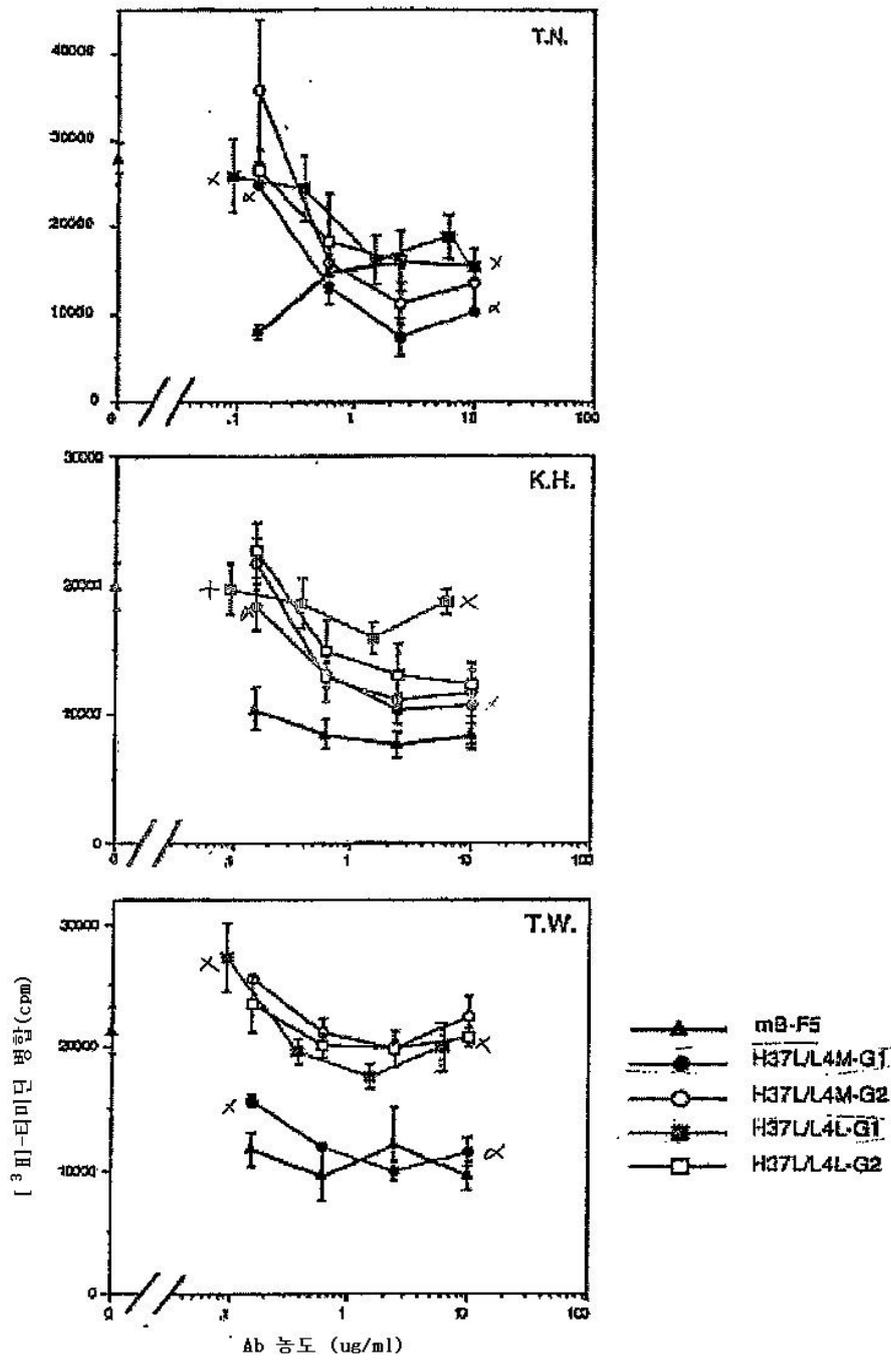
도면5

GA GGA GCT CCA GAC AAT GTC TGT CTC CTT CCT CAT CTT CCT GCC CGT GCT GGG CCT
 CCC ATG GGG TCA GTG TCA GGG AGA TGC CGT ATT CAC AGC AGC ATT CAC AGA CTG AGG
 GGT GTT TCA CTT TGC TGT TTC CTT TTG TCT CCA GGT GTC CTG TCA GAG GAA CAG CTT
 E E Q L
GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTG AAA CCC GGA GGT TCT CTG AGG CTC TCC TGT GCA
 V E S G G G L V K P G G S L R L S C A
GCC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC CGG ATG TAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGG
 A S G F S F S D C R M Y W V R Q A P G
AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT TAT GGA GCA AAT
 K G L E W I G V I S V K S E N Y G A N
TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG
 Y A E S V R G R F T I S R D D S K N T
GTC TAT CTG CAG ATG AAC AGC TTG AAG ACC GAA GAC ACT GCC GTT TAT TAT TGT AGT
 V Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C S
GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT
 A S Y Y R Y D V G A W F A Y W G Q G T
CTG GTC ACT GTC TCT TCA GGT AAG AAT GGC CAA GCT TG
 L V T V S S

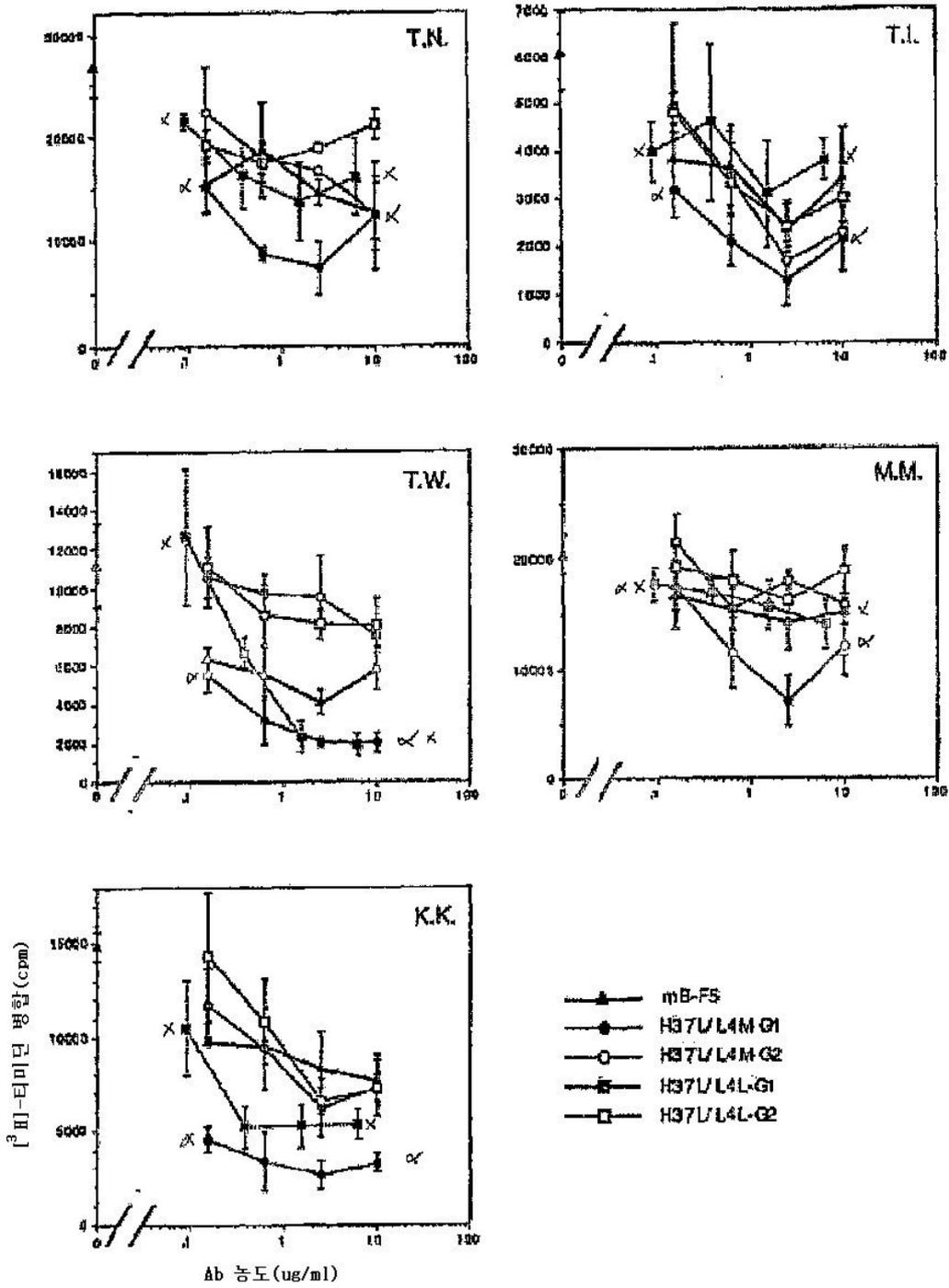
도면6

GGA GGA TCC AAT TAT CTG CTG ACT TAT AAT ACT ACT AGA AAG CAA ATT TAA ATG ACA
 TAT TTC AAT TAT ATC TGA GAC AGC GTG TAT AAG TTT ATG TAT AAT CAT TGT CCA TTC
CTG ACT ACA GGT GCC TAC GGG GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT
 D I V M T Q S P D S L A
GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA
 V S L G E R A T I N C R A S K S V S T
TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG
 S G Y S Y I Y W Y Q Q K P G Q P P K L
CTC ATT TAC CTT GCA TCC ATC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC
 L I Y L A S I L E S G V P D R F S G S
GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA
 G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A
GTT TAT TAC TGT CAG CAC AGT AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG
 V Y Y C Q H S R E L P W T F G Q G T K
GTG GAA ATC AAA CGT GAG TAG AAT TTA AAT TTT AAG CTT CTT
 V E I K

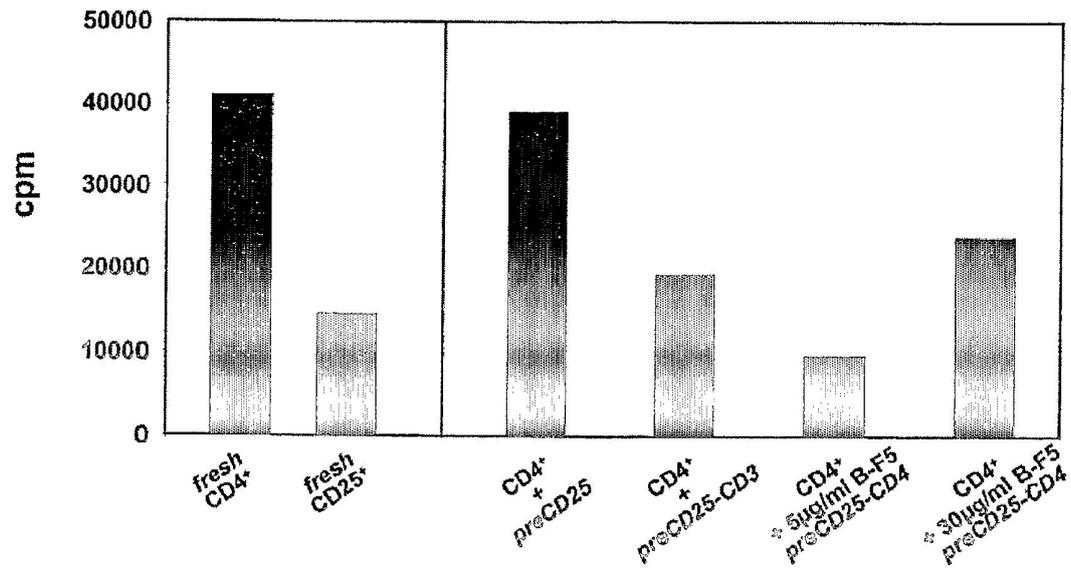
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DIACLONE

WIJDENES, John

<120> HUMANIZED ANTI-CD4 ANTIBODY WITH IMMUNOSUPPRESSIVE PROPERTIES

<130> MJP/ah-884/5EP

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V domain of H chain of humanized antibody hBF-5

<400> 1

Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys

20

25

30

Arg Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> V domain of K chain of humanized antibody hBF-5

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 3

<211> 372

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> V domain of H chain of humanized antibody hBF-5

<400> 3

```

gaggaacagc ttgtggagtc tgggggaggc ttggtgaaac cgggaggttc tctgaggctc      60
tcctgtgcag cctcgggttt cagtttcagt gactgcccga tgtactgggt tcgccaggct      120

ccaggaagg ggctggagtg gattggtgtg atttcagtca aatctgagaa ttatggagca      180
aattatgcag agtctgtgag gggcagattc actatttcaa gagatgattc aaaaaacacg      240
gtctatctgc agatgaacag cttgaagacc gaagacactg ccgtttatta ttgtagtgcc      300
tcctattata ggtacgacgt gggggcctgg ttgcttact ggggccaagg gactctggtc      360
actgtctctt ca                                                                372
    
```

<210> 4

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> V domain of K chain of humanized antibody hBF-5

<400> 4

```

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc      60
atcaactgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct acagttatat atattggtac      120
cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacc ttgcatccat cctagaatct      180
ggggtccctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag attcactct caccatcagc      240
agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcagc acagtaggga acttccgtgg      300
acgttcggcc aagggaccaa ggtggaatc aaacgt                                     336
    
```

<210> 5

<211> 372

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400>

> 5

```

caggaatacc ttgtggagac cgggggaggc ttggtgaggc ctggaattc tctgaaactc      60
tcctgtgtca cctcgggttt cagtttcagt gactgcccga tgtactggct tcgccagcct      120
ccaggaagg ggctggagtg gattggtgtg atttcagtca aatctgagaa ttatggagca      180
aattatgcag agtctgtgag gggcagattc actatttcaa gagatgattc aaaaagcagt      240
    
```

gtctatctgc agatgagcag attgagagag gaagacactg ccacttatta ttgtagtgcc 300
 tcctattata ggtacgacgt gggggcctgg tttgcttact ggggccaagg gactctggtc 360
 actgtctctg ca 372

<210> 6

<211> 383

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

gacattgtgc tgacacagtc tccttcttcc ttagttgtat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct acagttatat atattggtac 120
 caacagatcc caggacagcc acccaaaactc ctcatctatc ttgcatccat cctagaatct 180
 ggggtccctg gcaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga acttccgtgg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggagatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 360

 atcttccac catccagtga gca 383