

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 39/395

(11) 공개번호 특2001-0015817
(43) 공개일자 2001년02월26일

(21) 출원번호	10-2000-7005263		
(22) 출원일자	2000년05월 15일		
번역문제출일자	2000년05월 15일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/24303	(87) 국제공개번호	WO 1999/25379
(86) 국제출원출원일자	1998년11월 13일	(87) 국제공개일자	1999년05월27일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베키스탄 베트남		
(30) 우선권주장	60/065,716	1997년11월14일	미국(US)
	60/081,403	1998년04월10일	미국(US)
(71) 출원인	유로-셀티큐 에스.에이. 룩셈부르크 엘-2330, 보울레바르 드 라 페트러세 122		
(72) 발명자	버치, 로날드 엠. 미국, 코네티컷06897, 윌튼, 파우더호른힐 12		
(74) 대리인	강명구		

심사청구 : 없음

(54) 항-이디오타입 반응을 유도하는 능력이 강화된 변형된 항체

요약

본 발명은 변형된 면역글로불린 분자에 관하고, 여기서 사슬사이 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수 변이영역을 SH(sulfhydryl)기를 보유하지 않은 아미노산 잔기로 대체하여, 사슬사이 이황화결합이 형성되지 않도록 한다. 이런 면역글로불린 분자는 향상된 항-유전자형반응 유도능력을 갖는다. 본 발명은 또한 본 발명의 변형된 면역글로불린을 사용하여 암 및 감염성 질병의 예방 및 치료방법을 제공한다.

대표도

도1

명세서

기술분야

관련된 출원

본 출원은 1997년 11월 14일 출원된 예비 출원 60/065,716 및 1998년 4월 10일 출원된 예비출원 60/081,403의 장점을 청구한다.

1. 발명의 분야

본 발명은 변형된 면역글로불린 및 이의 백신 조성물에 관계하는데, 변형된 면역글로불린에서는 사슬내에

이황화결합을 형성하는 한가지 이상의 가변 부분 시스테인 잔기가 SH기를 포함하지 않는 아미노산 잔기로 치환되어, 이황화결합형성하지 않는다. 또한, 본 발명은 특정 질환 특히 암과 감염성 질환을 치료 및 예방하기 위해 본 발명의 백신 조성물을 이용하는 것에 관계한다.

배경기술

2. 발명의 배경

2.1. 면역글로블린 구조

면역글로블린 구조의 기본 단위는 네 개 폴리펩티드 복합체로써, 이는 두 개의 동일한 분자량이 적은 또는 'light'(L) 쇠와 두 개의 동일한 분자량이 큰 또는 'heavy'(H) 쇠가 비공유 연합 및 이황화결합에 의해 연결되어 있다. 항체의 각 L 및 H에는 각 이의 아미노산 말단에 가변 부분을 가지고 이의 C말단에는 항상부분을 가진다(도 1참고). 가변 부분은 각 항체마다 독특한 것으로 항체 항원 결합 부위를 포함한다. 각 가변 도메인은 4개의 관련된 보존 구조로 된 부분과 상보성 결정 부분 또는 CDR이라고 불리는 추가변성 서열로 된 3 부분으로 구성된다(도 2). 대부분의 경우에 항원 결합 부위를 형성하고, 항원 특이성을 제공하는 것이 CDR이다. 항상 부분은 가변 도메인에 비해 매우 보존성이 큰데, 반수체형의 차이로 인해 어느 정도의 다양성은 가진다.

이들의 아미노산 서열을 기초로 하여, L쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 항상부분의 H쇄는 다중 도메인(CH1, CH2, CH3 ... CHx)으로 구성되는데, 그 수는 특정 항체 종류에 따라 달라진다. CH1 부분은 항체에 유연성을 제공하는 힌지 부분을 사이에 두고 CH2와 분리되어 있다. 각 L 쇠의 가변 부분은 각 H 쇠의 가변 부분과 일직선상에 배열되어 있고, 각 L쇄의 항상 부분은 각 H쇄의 제 1 항상 부분과 일직선 상에 배열되어 있다. H쇄의 항상 부분의 CH2-CHx 도메인은 'Fc 부분'을 만드는데, 이는 상보성 결합, 임파세포, 과립세포, 단세포 계통 세포, 킬러 세포, 비만세포 및 다른 면역 효과 세포에 의해 발현되는 Fc 수용체에 결합하는 등의 효과물질 기능을 담당하고 있다.

도 3에서 볼 수 있는 것과 같이, IgG 분자의 각 L 및 H 쇠는 가변 부분 도메인 및 항상 부분 도메인을 만든다. 각 도메인은 길이가 약 100인 아미노산으로 된 두개 단백질 층이 샌드위치형으로 배열되고, 이 층은 한 개의 이황화결합에 의해 연결되어 있다(Roitt et al., Immunology, 3rd Edition, London: Mosby, 1993, p 4.4). 두 개의 단백질 층으로 된 각 도메인에는 두 개의 'anti-paralle' 인접 가닥을 포함하여, 베타-쉬트 모양을 만들 수 있다(e.g., Stryer, 1975, Biochemistry, WH Freeman and Co., p. 950). 각 도메인은 면역글로블린 폴드에 기초한 유사한 3차 구조를 가진다.

2.2. 면역치료 및 항-이디오타입 항체

현대 의학에 따르면, 면역치료 또는 백신화반응으로 실제 소아마비, 파상풍, 결핵, 수두, 홍역 및 간염 등의 질병을 제거하였다. 백신화반응을 이용하여, 감염성 질환을 예방하기 위한 면역계의 능력에 대해 조사하였다.

암 치료를 위해 면역치료법을 이용하여 연구하였다. 종양 면역학 분야는 Prehn and Main에 의해 시작되었는데, 이들은 메틸콜로란트렌(MCA)에 의해 유도된 육종에 항원이 종양 특이적이라는 것을 보여주었는데, 이식 검사에서 이들 항원이 쥐의 정상 조직에서는 감지되지 않았다(Prehn et al., 1957, J. Natl. Cancer Inst. 18:79-778). 이는 MCA-유도된 종양에 대해 종양 특이적인 저항성이 자발 숙주 즉, 종양의 기원이 되는 쥐에서 유도되었다는 것을 설명하는 추가 실험에 의해 확인된 바 있다(Klein et al., 1990, cancer Res. 20:151-1572).

암 환자를 치료하는데 면역요법을 이용하는 것이 왜 바람직한 것인지에 대해서는 몇 가지 이유가 있다. 우선, 마취 및 연속적인 화학요법을 하는 외과술에서 암 환자가 면역억제된 경우에, 면역억제를 약화시킬 수 있고, 그다음 수술전 기간동안에 적절한 면역요법을 하면, 이와 같은 면역억제는 억제되거나 또는 역전될 수 있다. 이로써 감염 복합증을 줄이고, 상처 치료를 가속시킨다. 둘째, 종양 크기는 외과술후에 작아지고, 면역요법은 이 상황에서 가장 효과적이다. 셋째는 종양 세포가 외과술에서 순환계로 들어가지기 때문에 이 시기에 효과적인 면역요법을 실시하면 이들 세포를 제거할 수 있다.

면역요법에는 두가지 종류가 있는데, '능동적인 면역요법'과 '수동적인 면역요법'이 있다. '능동적인 면역요법'에서, 항원은 환장[백신형으로 투여되어 보호성 면역 반응을 유도한다. '수동적인 면역요법'은 동시에 면역 반응을 유도하지 않고 환자에 항체를 투여하는 것이다. 한 동물에서 취한 특정 항체를 적절한 제 2 동물로 이뮤노겐으로 주사하였을 경우에, 주사된 항체는 면역 반응을 유도하게 된다. 항체 요법은 환자가 항체의 소스가 아니기 때문에 수동적이라고 할 수 있다. 그러나, 환자가 항-이디오타입 제 2 항체를 만들고, 이는 고유 항원과 교차 반응성을 가지는 면역 반응을 일으키기 때문에 수동적이라는 용어는 잘못된 것이다. 제 2 항체를 환자에서 만들게 하는 면역 요법은 항체의 최초 주입후에 특정 항원을 보유하는 세포와 환자의 고유 면역계가 지속적으로 투쟁하기 때문에 수동적인 면역요법보다는 치료요법적으로 더 효과적이다.

항-이디오타입 반응에서, 면역 반응 동안에 처음에 만들어진 또는 유기체로 도입된 항체는 유기체가 이에 대해 내성을 가지지 않는 독특한 신규한 에피토프를 가지고, 제2 항체 생산('Ab2')을 유도하고, 이들 중 일부는 외부에서 초기에 도입되거나 생산된 항체인 제1 항체('Ab1')의 이디오타입(항원 결합 부위)에 대항하게 된다. 이와 같은 제 2 항체 또는 Ab2는 제3항체('Ab3')를 유도할 수 있는 이디오타입을 가지고, 이들중 일부는 Ab2의 항원 결합 부위를 인지할 수 있다. 이는 소위 '네트워크' 이론으로 알려져 있다. 제 2 항체의 일부는 고유 항원과 유사한 결합 부분을 가지고, 따라서, 고유 항원의 '내부 이미지'를 다시 만들 수 있다. 따라서, Ab2 항체의 항원 결합 부위를 인지하는 제3 또는 Ab3 항체 또한 고유 항원을 인지할 수 있다(도 4).

따라서, 항-이디오타입 항체는 항원의 모양 및 전하와 유사한 결합 부위를 가지고, 암 항원자체와 동일한 또는 더 큰 반응을 유도할 수 있다. 강력한 항-이디오타입 반응을 유도할 수 있는 외생 항체를 투여하면, 일정한 면역 반응을 유도하여 효과적인 백신으로 작용한다.

현재까지, 항-이디오타입 백신은 항-이디오타입 반응이 전형적인 사람 항-쥐 항체(HAMA) 반응의 일부로 발생되기 때문에 유린 항체로 구성된다. Ab1을 구조적으로 파괴하여(Madiyalakan et al., 1995, Hybridoma 14:199-203), 항체에 더 이질성을 부여할 경우에 강력한 항-이디오타입 단계가 관찰되었다. 개체에 항-중양 항체의 이디오타입에 대해 발생한 항-이디오타입 항체를 외생적으로 직접 투여한다(U.S. Patent No. 4,918,14). 투여후에, 개체의 몸에서 항-항체가 만들어지는데, 이는 이들 항-이디오타입 항체를 인지할 뿐만 아니라 고유 중양 에피토프도 인지하여, 상보적인 활성화반응 및 이물질에 대한 다른 면역계 반응에 관계하여, 중양 에피토프를 발현시키는 중양 세포를 공격한다.

그러나, 항-이디오타입 백신이 바람직한 표적이고, 몇가지가 확인되었지만, 이와 같은 항-이디오타입 반응을 반복적으로 들 수 있는 항체를 운반하는 능력이 현재는 불가능하다(foon et al., 1995, J. Clin. Invest. 9:334-342; Madiyalakan et al., 1995, Hybridoma 14:199-203). 이와 같은 항-이디오타입 반응을 만들지 못하는 이유중에 한가지는 외생적인 Ab1이 모든 항체가 가지는 매우 유사한 구조와 매우 유사하여, 자체에 대한 항-이디오타입 반응이 매우 한정되기 때문이다. 따라서, 특정 항체에 대한 항-이디오타입 반응을 신뢰성있게 만들 수 있는 방법이 당분야에서는 필요하다.

3. 발명의 요약

본 발명은 한 개 이상의 사슬간 이황화결합을 만들 수 있는 항체의 한가지 이상의 가변 부분 시스테인 잔기를 SH기를 가지지 않는 아미노산 잔기로 치환하여, 특정 이황화결합을 만들지 않는 항체가 고유한 가변성 부분에 이황화결합을 가지는 항체보다 더 강력한 항-이디오타입 반응을 유도할 수 있다는 발명자의 발견에 기초한다.

따라서, 본 발명은 변형된 면역글로블린 분자 또는 항체(및 기능적으로 활성 단편, 이의 유도체 및 이의 유사체) 및 이와 같은 면역글로블린 분자를 포함하는 백신 조성물을 제공하는데, 이때 면역글로블린의 가변성 부위는 한 가지 이상의 사슬간 또는 사슬내에 이황화결합이 파괴됨으로써 모양으로 인한 구속이 감소된 것이다. 특히, 본 발명은 제2 면역글로블린 분자에 대해 가변성 부분에서 한가지 이상의 아미노산 치환된 부분을 가지는 것을 제외하고는 동일한 가변성 부분으로 구성된 변형된 면역글로블린을 제공하는데, 이때 제 2 면역글로블린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있는데(예를 들면, 항체-항원 결합을 결정하기 위해 당분야에 공지된 임의 방법으로 결정된 것과 같은 항원에 면역글로블린이 특이적으로 결합하는 등, 이때 비-특이적인 결합은 배제되고, 다른 항원과 교차 반응성 없는), 이때 한가지 이상의 아미노산 치환체는 제2 면역글로블린 분자에서 이황화결합을 만드는 한가지 이상의 시스테인 잔기에 상응하는 한가지 이상의 위치에서 SH기를 가지지 않는 한가지 이상의 아미노산 잔기로 치환된 것이다. 적절한 구체예에서, 제2면역글로블린 분자는 암 항원에 면역 특이적으로 결합할 수 있고; 또 다른 적절한 구체예에서, 제 2 면역글로블린 분자는 감염성 질환 매체 또는 감염성 질환 매체의 세포 수용체의 항원에 면역 특이적으로 결합할 수 있다.

또한 본 발명은 개체에 본 발명의 변형된 면역글로블린을 투여함으로써 개체에서 항-이디오타입 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 변형된 면역글로블린 분자를 투여하여 암을 치료하고 예방하는데 이용되는데, 이때 면역글로블린 분자는 특정 암 환자에 관련하여 발현되는 암 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있는 면역글로블린 분자로부터 가령, 본 발명에 따라 SH기를 포함하지 않은 아미노산 잔기를 사슬내에 이황화결합을 만드는 한가지 이상의 가변성 부분의 시스테인 잔기에 대체하는 등의 방법으로 변형되어 유도된다. 또한, 다른 구체예에서, 본 발명의 변형된 면역글로블린 분자는 감염성 질환을 치료하거나 예방하는데 이용되는데, 예를 들면, 감염성 질환의 원인이 되는 감염성 질환 매체 때한 세포 수용체 또는 항원에 면역 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로블린 분자에서 유도된 면역글로블린 분자를 투여하면 된다.

본 발명은 또한 본 발명의 변형된 면역글로블린 분자를 생산하는 방법 및 본 발명의 변형된 면역글로블린 분자를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 면역글로블린 분자의 L 및 H쇄의 구조를 나타내는 도면으로 각 쇠는 아미노 말단 부분(H_2N -)에 있는 가변 부분 및 카르복시 말단 부분($-COOH$)에 있는 항상 부분으로 구성된다.

도 2는 IgG의 구조를 나타내는데, 각 L 및 H 쇠의 가변 부분(V_L, V_H)에 4개의 기본 부분(FR1, FR2, FR3, FR4) 및 3개의 상보성 결정 부분(CDR1, CDR2, CDR3)이 있음을 나타낸다. 항상 부분 도메인은 L쇄 항상 부분은 C_L 으로 나타내고, H쇄 항상 부분의 세 개 도메인은 CH_1, CH_2, CH_3 으로 나타낸다. FAb는 항체 단편의 일부분으로 나타내는데, 여기에는 L 및 H쇄의 가변성 부분 도메인과 C_L 및 CH_1 도메인을 포함한다. Fc는 CH_2 및 CH_3 도메인을 포함하는 항상 부분 단편을 나타낸다.

도 3은 도 2에 나타난 항체 구조의 도면을 나타내는데, 이는 각 도메인(루프 구조에 각각 $V_L, V_H, C_L, CH_1, CH_2, CH_3$ 을 표시하였다)이 이황화결합(검게 나타난 선)에 의해 구조적으로 한정되어, 3차 구조를 유지하고 있다는 것을 강조한 것이다(Roitt et al., Immunology, Second Edition, London: Gower Medical Publishig, 1989, p 5.3).

도 4는 항-이디오타입 계단에서 리간드에 대해 발생한 이디오타입 항체(Ab1)로부터 항-이디오타입 항체(Ab2)와 항-항-이디오타입 항체(Ab3)를 가지는 내무 이미지의 발생 과정을 나타내는 도면이다.

도 5는 가변 부분 사슬내에 이황화결합을 파괴하기 위해 가변 부분에 있는 시스테인 잔기를 알라닌 잔기로 치환하여 면역글로블린의 가변 부분의 변형을 나타낸 것이다. CH_1, CH_2, CH_3 은 항상 부분이다. V_H 은 H 쇠 가변 부분이 되고, V_L 은 L쇄 가변 부분을 나타낸다.

도 6A-C(A)에서 (A)는 사람 카파 L쇄 항상 부분 서열을 포함하는 발현 벡터 pMRR010.1의 구조를

나타낸다. (B)는 사람 IgG1 항상 부분(CH1,CH2,CH3) H쇄 및 힌지 부분 서열을 인코드하는 서열을 포함하는 발현벡터 pGamma1의 구조를 나타낸다. (C)는 L쇄의 카파 항상 도메인 및 H쇄의 항상 도메인 및 힌지 부분을 인코드하는 서열을 포함하는 발현벡터 pNEPuDGV의 구조를 나타낸다. 이들 세가지 벡터는 Bebbington et al., 1991, Methods in Enzymology 2:136-145을 참고한다.

도 7A 및 B에서 (A)는 콘센션스 L쇄 가변성 부분 ConVL1의 리더 서열을 포함하는 아미노산 서열 및 이에 상응하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. (B)는 리더 서열을 포함하는 콘센션스 H쇄 가변성 부분 CONVL1에 대한 아미노산 서열 및 이에 상응하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.

도 8A-B에서 (A)는 2CAVLCOL1의 아미노산 및 이에 상응하는 뉴클레오티드 서열로써, mAb31.1에서 유도된 항체의 L쇄 가변성 부분 서열로써, 이때 알라닌 잔기는 23 및 88 위치에서 시스테인 잔기 대신에 치환된 것으로 상자로 표시가 되어있다. (B)는 2CAVHCOL1의 아미노산 및 이에 상응하는 뉴클레오티드 서열로써, mAb31.1에서 유도된 항체의 H쇄 가변성 부분 서열로써, 이때 알라닌 잔기는 23 및 88 위치에서 시스테인 잔기 대신에 치환된 것으로 상자로 표시가 되어있다.

도 9A-D에서는 (A)는 2CAVHCOL1을 어셈블리하는데 이용되는 올리고뉴클레오티드의 올리고뉴클레오티드 서열을 나타내는데, 사람 결장 암 항원에 특이적인 H쇄 가변성 부분 유전자이다. (B)는 2CAVHCOL1을 어셈블리하는데 이용되는 올리고뉴클레오티드의 올리고뉴클레오티드 서열을 나타내는데, 사람 결장 암 항원에 특이적인 L쇄 가변성 부분 유전자이다. (C) ConVL1으로 언급된 L쇄 콘센션스 부분을 어셈블리하는데 이용된 올리고뉴클레오티드에 대한 올리고뉴클레오티드 서열을 나타낸다. (D)는 ConVL1으로 언급된 H쇄 콘센션스 부분을 어셈블리하는데 이용된 올리고뉴클레오티드에 대한 올리고뉴클레오티드 서열을 나타낸다.

도 10은 사람 결장 암 항원에 특이적인 합성된 변형 항체를 인코드하는 조작된 유전자를 어셈블리하는 전반적인 단계를 나타낸다.

도 11은 mAb31.1에서 유도된 시스테인이 알라닌으로 변형되지 않은 항체와 LS-174 T-세포에서 유도된 항원 분비물에 바이오틴 라벨된 동일한 항체의 결합 경쟁을 검사한 결과를 나타내는 도트 블랏을 나타낸다. 라벨안된 항체의 농도는 nM 라벨안된 항체로 나타낸다. 'bik'라인은 항원이 없다.

도 12A-D에서 (A)는 운반체만으로 백신화된 생쥐의 항-혈청종재하에 LS-174T에 대한 바이오틴-라벨된 항-결장 암종 세포 항체와 변형되지 않은 결장 암종 세포 항체에 결합하는 기준 항체 및 LS-174T 세포에 기준 결합 비율로 나타내는 브래지키닌 수용체 결합 부위를 포함하는 CDR 서열을 가지는 CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5, CDR6 펩티드의 경쟁 결합 검사 결과를 나타낸다. (B)는 운반체 단독으로 백신화된 생쥐의 항-혈청 종재하에 LS-174T 세포에 바이오틴-라벨된 항-결장 암종 세포 항체와 변형안된 2CAVHCOL1 및 2CAVLCOL1의 결장 암 세포 항체에 결합하는 기준 항체의 경쟁 결합 검사의 결과를 나타낸다. (C)는 항원 (질은 삼각형)에 바이오틴-라벨된('b'로 나타냄) 항체(역Y자 모양)의 결합을 나타내는 도면. (D)는 항원 (질은 삼각형)에 바이오틴-라벨된('b'로 나타냄) 항체(역Y자 모양)가 항-이디오타입 항체(화살표)에 의해 결합이 방해되는 것을 나타낸 도면.

도 13은 HNF61에 대한 결합 서열을 포함하는 CDR을 가지는 L쇄 가변성 부분의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 변형안된 면역글로블린에 비하여, 강력한 면역 반응 특히, 강력한 항-이디오타입 반응을 유도할 수 있는 변형된 면역글로블린(특히, 항체, 기능적으로 활성 단편, 유도체, 이의 유사체)을 제공한다. 특히, 본 발명의 변형된 면역글로블린은 변형되지 않았을 경우에, 항원에 면역 특이적으로 결합하고, 면역글로블린 분자의 한가지 가변 부분에 모양으로 인한 구속이 감소되도록 변형되는데, 바람직하게는 면역글로블린의 가변성 부분에 있는 사슬내 이황화결합을 형성하는데 관여하는 시스테인중 적어도 한 개가 SH기를 가지지 않는 아미노산 잔기로 치환되어, 이황화결합을 만들지 못함으로써, 면역글로블린의 가변성 부분의 적어도 한 부분에서 모양으로 인한 구속을 감소시키는 것이다(도 5). 본 발명의 적절한 구체예에서, 변형된 면역글로블린 분자는 암 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있는 면역글로블린 분자에서 유도되고, 또 다른 적절한 구체예에서, 변형된 면역글로블린 분자는 감염성 질환 매체 또는 감염성 질환 물질에 세포 수용체에 면역특이적으로 결합할 수 있는 면역글로블린에서 유도된다.

본 발명은 또한 발명의 변형된 면역글로블린 분자를 포함하는 백신 조성을 제공한다. 또한, 본 발명은 발명의 변형된 면역글로블린 분자를 개체에 투여하여 항-이디오타입 반응을 생성시키는 방법을 제공한다.

특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 변형된 면역글로블린 분자를 투여하여 암을 치료하거나 예방하는 방법을 제공하는데, 변형안된 상태에서는 특정 암과 연합되어 발현되는 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 변형된 면역글로블린을 투여하면, 개체에서 항-이디오타입 반응을 유도하여, 개체에서 암 항원에 특이적인 항체를 생산하도록 한다. 또 다른 특정 구체예에서, 변형된 면역글로블린은 변형안된 상태에서, 감염성 질환 매체 또는 감염성 질환 매체에 대한 세포 수용체의 항원에 결합할 수 있다. 이와 같은 면역글로블린을 이용하여 감염성 질환 매체로 인한 감염성 질환을 치료하거나 예방한다.

설명을 명확하게 하기 위해 다음에는 본 발명의 여러 소단락으로 설명하나 본 발명을 이에 국한시키고자 함은 아니다.

5.1. 변형된 항체

본 발명의 변형된 면역글로블린 특히 항체는 적어도 변형안된 항체에서 항원에 특이적으로 결합하는 면역글로블린으로써, 항-이디오타입 반응을 유도하는 이들의 능력을 강화시키는 방향으로 변형시킨다. 이와 같은 면역글로블린을 변형시켜, 면역글로블린의 가변성 부분에 있는 모양으로 인한 구속을 감소시키는데 예를 들면, 사슬간 또는 사슬내 이황화결합을 제거하거나 감소시키거나 화학적으로 변형시키거나 당분야에 공지된 임의 방법을 이용한다. 특이적으로는 본 발명은 제 2 면역글로블린의 가변성 부분에 한가지 이상의 아미노산 치환을 제외하고는 이와 동일한 가변성 부분으로 구성된 제 1 면역글로블린 분자를 제공

하는데, 제 2 면역글로블린 분자는 항원에 면역 특이적으로 결합할 수 있고, 아미노산 치환은 제 2 면역글로블린 분자에 이황화결합을 형성하는 한가지 이상의 시스테인 잔지에 상응하는 위치에서 SH기를 가지지 않은 한가지 이상의 아미노산 잔기로 치환되는 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 변형된 면역글로블린을 인코드하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.

당분야에 공지의 방법을 이용하여 특정 항체의 가변성 부분에서 이황화결합을 형성할 수 있는 시스테인 잔기를 확인할 수 있다. 예를 들면, 사슬내 이황화결합을 형성하는 시스테인 잔기는 항체 종류간에 그리고 종간에 상당히 보존되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이황화결합을 형성하는데 참여하는 시스테인 잔기는 이황화결합을 하는 잔기로 알려진 다른 항체 분가와 서열을 비교함으로써 확인할 수 있다.

표 1에서는 많은 수의 항체 분자에서 이황화결합을 형성할 수 있는 시스테인 잔기의 위치를 제공한다 (Kabat et al, 1991, sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda, Maryland)

표 1

Species	Variable domain	Subgroup	Disulfide bond-forming cysteines (positions)
Human	kappa light	I	23,88
Human	kappa light	II	23,88
Human	kappa light	III	23,88
Human	kappa light	IV	23,88
Human	lambda light	I	23,88
Human	lambda light	II	23,88
Human	lambda light	III	23,88
Human	lambda light	IV	23,88
Human	lambda light	V	23,88
Human	lambda light	VI	23,88
Mouse	kappa light	I	23,88
Mouse	kappa light	II	23,88
Mouse	kappa light	III	23,88
Mouse	kappa light	IV	23,88
Mouse	kappa light	V	23,88
Mouse	kappa light	VI	23,88
Mouse	kappa light	VII	23,88
Mouse	kappa light	Miscellaneous	23,88

Species	Variable domain	Subgroup	Disulfide bond-forming cysteines (positions)
Mouse	lambda light		23,88
Chimpanzee	lambda light		23,88
Rat	kappa light		23,88
Rat	lambda light		23,88
Rabbit	kappa light		23,88
Rabbit	lambda light		23,88
Dog	kappa light		23,88
Pig	kappa light		23 (88)
Pig	lambda light		23,88
Guinea pig	lambda light		23 (88)
Sheep	lambda light		23,88
Chicken	lambda light		23,88
Turkey	lambda light		23 (88)
Ratfish	lambda light		23 (88)
Shark	kappa light		23,88
Human	heavy	I	22,92
Human	heavy	II	22,92
Human	heavy	III	22,92
Mouse	heavy	I (A)	22,92
Mouse	heavy	I (B)	22,92
Mouse	heavy	II (A)	22,92
Mouse	heavy	II (B)	22,92
Mouse	heavy	II (C)	22,92
Mouse	heavy	III (A)	22,92
Mouse	heavy	III(B)	22,92
Mouse	heavy	III (C)	22,92
Mouse	heavy	III (D)	22,92
Mouse	heavy	V (A)	22,92
Mouse	heavy	V (B)	22,92
Mouse	heavy	Miscellaneous	22,92
Rat	heavy		22,92
Rabbit	heavy		22,92
Guinea pig	heavy		22,92
Cat	heavy		22 (92)
Dog	heavy		22,92
Pig	heavy		22 (92)
Mink	heavy		22 (92)
Sea lion	heavy		22 (92)
Seal	heavy		22 (92)
Chicken	heavy		22,92
Duck	heavy		22 (92)
Goose	heavy		22 (92)
Pigeon	heavy		22 (92)
Turkey	heavy		22 (92)

Species	Variable domain	Subgroup	Disulfide bond-forming cysteines (positions)
Caiman	heavy		22, 92
Xenopus frog	heavy		22,92
Elops	heavy		22,92
Goldfish	heavy		22,92
Ratfish	heavy		22 (92)
Shark	heavy		22,92

()안에 있는 위치를 나타내는 숫자는 이 위치에서 서열이 확인되지 않은 것으로 단지 공지의 서열과 비교하여 추정된 잔기이다.

주목할 만한 것으로, 표 1에 나열된 모든 항체 분자에서, 사슬내 이황화결합을 형성하는 시스테인 잔기는 L쇄 가변 도메인의 22 및 88 위치와 H쇄 가변 도메인의 22 및 92위치가 된다. 위치를 나타내는 숫자는 Kabat(1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed, U.S. Department of Health and

Human Services, Bethesda, Maryland)에서 설명하는 콘센션스 서열에 있는 잔기에 대응하는 잔기를 말하거나 또는 도 7A 및 B에서 설명한 H 및 L쇄 가변 부분 서열에 나타난 것과 같은 잔기를 말한다('상응하는'의 의미는 도 7A 또는 B에서 나타난 것과 같은 H 및 L쇄 가변성 부분의 서열 또는 콘센션스 서열의 특정 항체 서열과 나란하게 배열하여 결정된 이란 의미를 가진다).

따라서, 본 발명의 한 구체예에서, 변형된 면역글로블린 분자는 L쇄의 23 또는 88위치에 있는 잔기가 SH기를 가지지 않은 아미노산 잔기로 치환되었거나 H쇄의 22 또는 92 위치에 있는 잔기가 SH기를 가지지 않은 아미노산 잔기로 치환된 항체를 말한다.

본 발명의 변형된 면역글로블린에서, 이황화결합을 형성하는 시스테인 잔기에 대체하는 아미노산은 SH기를 가지지 않는 임의 아미노산 잔기가 되는데 예를 들면, 알라닌, 아르기닌, 아스파라진, 아스파라테이트 (또는 아스파라딕산), 글루타민, 글루타메이트(또는 글루타민산), 글리신, 히스티딘, 이소류이신, 루이신, 리신, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 또는 발린이 된다. 특정 구체예에서, 시스테인 잔기는 글리신, 세린, 트레오닌, 티로신, 아스파라진, 글루타민 잔기로 치환되는데, 가장 바람직하게는 알라닌 잔기로 치환된다.

추가로, 이황화결합을 형성하는 시스테인은 SH기를 포함하지 않는 가령, 일상적인 단백질 합성 방법에 의해 만들어진 비-전통적인 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체에 의해 치환될 수 있는데, 이에 국한시키지는 않는다. 비-전통적인 아미노산에는 통상적인 아미노산의 D-이성체, α -아미노산 이소부틸산, 4-아미노부틸산, Abu, r-Abu, 2-아미노부틸산, γ -Abu, ϵ -Ahx, 아미노 헥사논산, Aib, 2-아미노 이소부틸산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르류이산, 노르발린, 하이드록시프롤린, 사르코신, 시투롤린, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌, β -알라닌, 플로오르-아미노산, β -메틸 아미노산, C α -메틸 아미노산, N α -메틸 아미노산과 같은 디자인어 아미노산, 일반적인 아미노산 유도체 등이 포함되나, 이에 국한시키지는 않는다. 또한, 아미노산은 D 또는 L형이 될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 이황화결합을 형성하는 잔기를 제거할 수도 있다.

특정 구체예에서, 이황화결합을 형성하는 잔기 치환은 H쇄 가변성 부분 또는 L쇄 가변성 부분에서 이루어지거나 또는 H 및 L쇄 가변성 부분 모두에서 이루어질 수 있다. 다른 특정 구체예에서, 특정 이황화결합을 형성하는 잔기중에 하나는 치환되거나(또는 결손되거나) 특정 이황화결합을 형성하는 잔기 모두 치환(결손)된다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 가변성 부분에 이황화결합을 형성하는 제 2 면역글로블린 분자에 관련하여, SH기를 포함하지 않는 아미노산으로 치환되고, 추가로, 한가지 이상의 다른 아미노산 치환체(가령, 이황화결합을 형성하는 잔기가 SH기를 포함하지 않는 잔기로 치환되지 않은)을 가질 수 있다.

특히, 본 발명은 제 2 면역글로블린 분자에 대해 가변성 부분에 한가지 이상의 아미노산 치환체를 가지는 것을 제외하고는 제2면역글로블린 분자와 동일한 것으로 구성된 가변성 부분을 가지는 제 1 면역글로블린 분자를 제공하는데, 이때 제 2 면역글로블린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 이때 한가지 이상의 아미노산 치환체중 적어도 하나는 제 2 면역글로블린 분자에서 이황화결합을 형성하는 한가지 이상의 시스테인 잔기에 상응하는 위치에서 SH기를 가지지 않는 아미노산 잔기로 치환된 것이 된다.

바람직한 구체예에서, 이황화결합을 형성하는 시스테인 잔기가 SH기를 가지지 않는 잔기로 치환되지 않은 아미노산 치환체는 안정적인 변화가 아니다. 안정적인 변화는 항체 분자의 안정성을 증가시키는 아미노산 변화로 정의된다. 이와 같은 아미노산 변화는 특정 항체 분자에 특정 위치에 통상적이지 않는 아미노산(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda Maryland,에서 제공된 것과 같은 다수의 항체 분자에 대한 콘센션스 서열로 정의된)이 특정 위치에서 흔한 잔기로 치환되는 치환되는 변화가 된다(PCT Publication WO96/02574, data February 1, 1996 by Steipe et al.).

이와 같은 다른 아미노산 치환은 변형된 면역글로블린이 항-항-이디오타입 항체 형성을 유도하도록 변형시키지 않는 임의 아미노산 치환으로 이는 5.5에서 설명하는 방법으로 결정할 수 있다. 예를 들면, 이와 같은 다른 아미노산 치환체에는 기능적으로 등가의 아미노산 잔기 치환체를 포함한다. 예를 들면, 한 개 이상의 아미노산 잔기는 기능적으로 등가로 작용하는 유사한 극성을 가지는 또다른 아미노산 잔기로 치환된 것이다. 서열내에 아미노산 치환은 아미노산이 속하는 류别的 다른 구성원에서 선택된다. 예를 들면, 비극성(소수성) 아미노산에는 알라닌, 루이신, 이소류이신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌등이 포함된다. 극성 중성 아미노산에는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라진, 글루타민등이 포함된다. 양전하(염기성) 아미노산에는 아르기닌, 리신, 히스티딘이 포함된다. 음전하(산성) 아미노산에는 아스파라딕산, 글루타민산이 포함된다.

본 발명의 변형된 항체는 면역특이적으로 임의 항원에 결합할 수 있는 항체에서 유도될 수 있다. 특정 구체예에서, 변형된 항체는 암 항원 중더 적절하게는 종양 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있는 항체에서 유도된다. 특정 구체예에서, 변형된 항체는 다형성 상피 점소 항원, 사람 결장 암종-연합된 단백질 항원, 사람 결장 암종-연합된 탄수화물 항원, 사람 유지방 구에 결합할 수 있는 항체 또는 유방암, 난소암, 자궁암, 방광암, 폐암, 피부암, 결장암, 췌장암, 위장관암, B 임파세포암 또는 T 임파세포암의 항원 또는 단락 5.2.1에서 설명하는 특정 항원을 발현하는 임의 다른 암의 항원에 결합할 수 있는 항체에서 유도된다. 적절한 구체예에서, 변형된 항체는 MAb31.1(the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2201의 기탁번호 No. 12314), Mab 33.28(기탁번호 12315), Mab HMF-1(see PCT Publication WO90/05142 and PCT Publication WO92/04380)에서 유도될 수 있다.

또 다른 특정 구체예에서, 본 발명의 감염성 질병 매체의 항원 또는 감염성 질병 매체의 세포 수용체에 면역특이적으로 결합할 수 있는 항체에서 유도된다. 적절한 구체예에서, 감염성 질환의 매체에 대한 항원은 박테리아성 항원, 바이러스 항원 또는 기생충 항원 또는 5.2.2에서 설명하는 감염성 질병 매체들의 임의 다른 항원이 된다.

본 발명의 면역글로블린 분자는 면역글로블린의 임의 종류, 분류 또는 아류가 될 수 있다. 적절한 구체

에에서, 면역글로블린 분자는 항체 분자 정도 적절하게는 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA에서 선택된 타입으로, 가장 적절하게는 IgG 분자가 된다. 또는 면역글로블린 분자는 T 세포 수용체 또는 B 세포 수용체, 세포 표면 흡착 분자 가령, 공-수용체 CD4, CD8, CD19 또는 MHC 분자의 비변성-도메인이 된다.

변형된 면역글로블린은 임의 자연발생 항체 적절하게는 단클론 항체에서 유도되고, 또는 합성 또는 조작된 항체에서 유도될 수 있다. 본 발명의 한 측면에서 변형된 면역글로블린 분자는 결합쌍의 구성원에 대한 결합 부위 또는 항원의 일부분에 대한 결합 부위가 가변부분에 있는 CDRs중 한 부분 또는 모든 부분에 합입된 항체로부터 유도될 수 있다(이는 공동계류중인 미국 특허 출원 'Immunoglobulin Molecules Having A Synthetic Variable Region And Modified Specificity', and Burch, Filed November 13, 1998(attorney docket no. 6750-016)에서 볼 수 있다).

특히, 합성 항체는 결합쌍의 제 1 멤버에 면역특이적으로 결합할 수 있는 항체로, 결합쌍에서 항체의 CDRs중 적어도 한 개에는 결합쌍의 제 1 멤버의 결합 부위를 포함하고, 이때 결합부위는 결합쌍의 또 다른 멤버의 아미노산 서열에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, 결합 부위의 아미노산 서열은 CDR내에 자연상태에서는 없는 것이다. 또한, CDR의 적어도 한 개는 항원의 일부분 특히 에피토프를 포함한다.

결합 부위의 아미노산 서열은 당분야에 공지된 임의 방법으로 확인할 수 있다. 예를 들면, 일부 경우에서, 결합쌍의 멤버의 서열은 결합쌍의 다른 멤버의 결합에 직접적으로 관련이 된다는 것이 이미 확인되었다. 이와 같은 경우에, 이러한 서열을 이용하여, 결합쌍의 다른 멤버를 특이적으로 인지하는 합성 항체의 CDR을 작제할 수 있다. 결합쌍의 다른 멤버에 대해 결합쌍의 한 멤버에 결합 부위에 대한 아미노산 서열이 알려지지 않은 경우에, 당분야에 임의 방법을 이용하여 가령, 분자 모델링 방법 또는 경험적인 방법 가령, 다른 멤버에 결합하는 멤버의 부분(가령, 펩티드)를 검사하거나 또는 멤버에 돌연변이를 만들고, 돌연변이가 결합을 방해하는 지를 측정하는 등으로 서열을 결정할 수 있다.

결합쌍은 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질등의 서로 상호작용할 수 있는 임의 두 개 분자가 되는데, 적절하게는 결합부위가 유도되는 결합쌍은 단백질 분자이다. 적절한 구체예에서, 변형된 면역글로블린에는 암 항원, 감염성 질환 항원, 병인물질에 대한 세포 수용체, 수용체-리간드 결합쌍에 참여하는 수용체 또는 리간드에 대한 세포 수용체에 대한 결합 서열을 포함한다.

특정 구체예에서, 결합쌍은 단백질-단백질 상호작용 쌍으로 동질성 상호작용(가령, 동일한 두 개 단백질 간에 상호작용) 또는 이형성 상호작용(가령 두 개의 다른 단백질사이에 상호작용)이 된다.

특정 구체예에서, 제1 멤버는 리간드-수용체 결합쌍의 멤버로써, 적절하게는 수용체-리간드 결합쌍의 멤버로 이때 리간드는 수용체에 결합하여 세포내 시그널발생과 같은 생리학적 반응을 유도한다. 예를 들면, 리간드 또는 수용체는 호르몬, 오토코이드, 성장인자, 사이토킨, 신경전달물질 또는 호르몬, 오토코이드, 성장인자, 사이토킨, 신경전달물질의 수용체 또는 시그널 전달에 관계하는 임의 수용체 또는 리간드가 될 수 있으나 이에 국한시키지는 않는다(signal transduction pathways, see, e.g., Campbell, 1997, J. Pediat, 131:S42-S44; Hamilton, 1997, J. Leukoc. Biol. 62:145-155; Soede-Bobok & Touw, 1997, J. Mol. Med. 75:47-477; Heldin, 1995, Cell 80:213-223; Kishimoto et al., 1994, Cell 76:253-262; Miyajima et al., 1992, Annu. Rev. Immunol. 10:295-331; and Cantley et al, 1991, Cell 64:281-302). 특정 구체예에서, 결합쌍의 한가지 멤버는 콜레사이토키닌, 갈라닌, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 케모킨, 렙틴, 프로테아제, 신경펩티드 Y, 뉴로키닌-1, 뉴로키닌-2, 뉴로키닌-3, 붐베신, 카스트린, 코르티코트로핀 방출 호르몬, 엔도테린, 메탈토닌, 스마토스타틴, 혈관활성 내장 펩티드, 상피 성장 인자, 중양 괴사 인자, 도파민, 엔도테린등과 같은 리간드 또는 이들 이간드의 임의 수용체가 되나 이에 국한시키지는 않는다. 한 구체예에서, 결합쌍의 한 멤버에는 오피오이드 수용체, 포도당 운반물질, 글루타메이트 수용체, 오르파닌 수용체, 이리트로포에틴 수용체, 인슐린 수용체, 티로신 카이나제(TK)-수용체, KIT 간 세포 인자 수용체, 신경 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 과립세포-콜로니 자극 인자 수용체, 소마토트로핀 수용체, 신경교-유도 신경성 인자 수용체 또는 gp39 수용체, G-단백질 수용체 또는 β 2-아드레네린 수용체와 같은 수용체 또는 이들 수용체에 결합하는 임의 리간드등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 또 다른 구체예에서, 결합쌍의 멤버중에 하나는 리간드 게이트 이온 채널 가령, 칼슘 채널, 나트륨 채널, 칼륨 채널등이 되나 이에 한정시키지는 않는다. 특정 구체예에서, 본 발명은 수용체에 면역특이적으로 결합하는 변형된 면역글로블린을 제공하는데, 이는 수용체에 결합하는 리간드의 길항물질로써 예를 들면, 엔도르핀, 엔케팔린, 노시세핀의 길항물질이 되나 이에 국한시키지는 않는다. 다른 구체예에서, 본 발명은 수용체에 면역특이적으로 결합하는 변형된 항체로 수용체에 길항물질인데, 예를 들면, 엔도르핀, 엔케팔린, 노시세핀의 길항물질이 되나 이에 국한시키지는 않는다. 적절한 구체예에서, 변형된 면역글로블린은 피브로넥틴 수용체에는 결합하지 않는다. 또 다른 적절한 구체예에서는 결합 서열은 Arg-Gly-Asp이 아니고, 다중 결합 서열로 아니고, 바람직하게는 결합 서열은 Arg-Gly-Asp이 아니다.

다른 특정 구체예에서, 변형된 면역글로블린은 전사 인자의 결합 부위를 포함하는 CDR을 가진다. 적절한 측면에서, 변형된 면역글로블린은 특이적인 DNA 서열에는 결합되지 않는데, 특히 전사 결합 인지에 결합하지 않는다.

적절한 구체예에서는 변형된 면역글로블린에는 암 항원 또는 종양 항원에 결합 부위의 아미노산 서열을 포함하는 적어도 한 개의 CDR을 가지고(5.2.1의 설명 참고), 좀더 적절하게는 항원은 사람 결장 암종-관련된 항원 또는 상피 점막 항원이 된다. 또 다른 구체예에서, 변형된 면역글로블린의 적어도 한 개의 CDR에는 사람 유지방 구 수용체의 결합 부위에 대한 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 변형된 면역글로블린에는 유방, 난소, 자궁, 전립선, 방광, 폐, 피부, 체장, 결장, 위장관, B-림파세포, T-림파세포의 종양 항원의 결합 부위의 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 또 다른 적절한 구체예에서, 변형된 항체의 적어도 한 개의 CDR에는 감염성 질환 매체의 항원에 대한 결합 부위(5.2.2. 단락의 설명 참고) 또는 감염성 질환 매체의 세포 수용체의 결합 부위, 적절하게는 결합 부위가 플라즈모디움(Plasmodium) 항원의 아미노산 서열이 아니고, 또는 Asn-Ala-Asn-Pro 또는 Asn-Val-Asp-Pro이 아닌 결합 부위의 아미노산 서열을 가진다. 추가 구체예에서, 변형된 항체는 세균성 또는 바이러스성 효소에 대한 결합 부위를 포함하는 CDR을 가진다.

합성 항체는 기존에 존재하는 항체 또는 자연 발생적인 항체의 서열에 기초하여 만들거나(가령, 이러한 항체의 CDR에 결합 부위 서열을 삽입함) 또는 공지의 항체 콘센션스 서열에서 합성할 수 있는데, 이는 도 7A 및 B에서 L 및 H 항체 콘센션스 서열에서 합성하거나 또는 임의 다른 항체 콘센션스 또는 생식세포계열 서열로부터 합성할 수 있다(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, NIH Publication No. 91-3242, pp 2147-2172).

각 항체 분자는 6개의 CDR 서열을 가지는데, 세 개는 L쇄에 세 개는 H쇄에 있고, 이들 CDRs중 5개는 생식세포계열 CDRs(가령, 임의 재조합없이 동물의 게놈 서열에서 바로 유도된)이고, CDRs의 하나는 non-생식세포계열 CDR(가령, 동물의 생식세포계열 게놈 서열과는 다르고, 생식세포계열 서열의 재조합에 의해 발생됨)이다. CDR이 생식세포계열 또는 non-생식세포계열 서열인지는 CDR의 서열을 조사하고, 공지의 생식세포계열 서열과 비교하여 결정한다(Kabat et al., (1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, NIH Publication No. 91-3242, pp 147-2172)). 공지의 생식세포계열 서열에서 상당한 변화가 있다는 것은 CDR이 non-생식세포계열 CDR이라는 것을 말한다. 따라서, 결합 부위 또는 항원의 아미노산 서열을 포함하는 CDR은 생식세포계열 CDR이고, 그렇지 않으면, non-생식세포계열 CDR이다.

항체의 임의 CDRs에 결합 부위 또는 항원 서열을 삽입하고, 항체의 상이한 CDRsd[결합 부위를 삽입하는 것은 당분야에 공지된 것이고, 그 다음 결합쌍의 특정 멤버에 결합하는 능력에 대해 생성된 변형 항체(달락 5.5)를 선별하거나 또는 항원 부위에 대해 면역 반응을 유도하는 능력에 대해 생성된 변형 항체(달락 5.5)를 선별한다. 따라서, 당업자는 CDR에 선택적으로 결합 부위 또는 항원을 포함하는지를 결정할 수 있다. 특정 구체예에서, H쇄 또는 L쇄의 CDR을 변형시켜, 결합 부위 또는 항원의 아미노산 서열을 포함하도록 한다. 또 다른 특정 구체예에서, 변형된 항체에는 가변성 도메인을 포함하는데, H쇄의 가변성 부분의 제1, 제2, 제3 CDR 또는 L쇄의 가변성 부분의 제1, 제2, 제3 CDR에는 결합 부위 또는 항원의 아미노산 부분을 포함한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 한가지 이상의 CDR에 결합 부위 또는 항원의 아미노산 서열을 포함하고, 또는 한가지 이상의 CDR에 각각 동일한 분자의 상이한 결합 부위를 포함하거나 또는 다른 분자의 다른 결합 부위를 포함한다. 특히, 2, 3, 4, 5, 6개 CDRs을 조작하여, 결합쌍의 제 1 멤버의 결합부위를 가지도록 한다. 적절한 구체예에서, 한 개 또는 그이상의 CDRs이 결합쌍의 제1멤버에 대한 결합부위를 포함하고, 한 개 또는 그이상의 CDRs에 면역 세포, 가령, T 세포, B 세포, NK 세포, K 세포, TIL 세포의 표면에 있는 분자의 결합 부위를 포함한다. 예를 들면, 암 항원 또는 감염성 질환 항원에 대한 결합 부위 및 면역 세포의 표면에 있는 분자의 결합부위를 가지는 변형된 항체를 이용하여, 면역세포가 암 항원을 가지는 암 세포 또는 감염성 질환 매체를 표적으로 할 수 있도록 한다.

본 발명의 특정 구체예에서, 결합 부위 또는 항원 아미노산 서열은 CDR 자체의 아미노산 서열에 임의 변화없이 CDR내에 삽입시키거나 결합 부위 또는 항원 아미노산 서열을 CDR의 모두 또는 전부에 대신한다. 특정 구체예에서, 결합 부위 아미노산은 CDR 서열의 1,2,5,8,10,15, 20 아미노산에 대신한다.

CDR에 있는 결합 부위 또는 항원의 아미노산 서열은 결합쌍의 멤버에 결합에 필수적인 또는 항원에 대해 면역반응을 유도 할 수 있는데(임의 공지의 방법으로 결정할 수 있음) 필수적인 최소 결합 부위로써; 또는 서열은 결합 부위 또는 항원의 아미노산 서열은 결합쌍의 멤버에 결합에 필수적인 또는 항원에 대해 면역반응을 유도 할 수 있는데 필요한 최소 결합 부위 또는 항원 서열보다는 크다. 특정 구체예에서, 결합 부위 또는 항원 아미노산 서열은 길이가 적어도 4개 아미노산 또는 길이가 적어도 6,8,10,15, 20개 아미노산이 된다. 다른 구체예에서, 결합 부위 아미노산 서열은 길이가 10,15,20, 25개 아미노산 또는 길이가 5-10,5-15,5-20,10-15,10-20,10-25 아미노산이 된다.

또한, CDR의 총 길이(가령, 결합 부위 서열과 나머지 CDR 서열을 합한 길이)는 항체가 항원에 결합할 수 있도록 적정수의 아미노산이 되어야 한다. CDR은 특정 범위의 아미노산 잔기를 가지는 것을 볼 수 있는데, 파악된 CDRs의 크기(도 2에 액어도 표시됨)는 표 2에 나타난다.

표 2

<u>CDR</u>	<u>Number of residues</u>
L1	10-17
L2	7
L3	7-11
H1	5-7
H2	9-12
H3	2-25

(compiled from data in Kabat and Wu, 1971, *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93)

많은 CDR H3 부분은 길이가 5-9개의 잔기인데 반해, 특정 CDR H3 부분은 훨씬 더 긴것도 관찰되었다. 특히, 상당수의 항-바이러스 항체는 길이가 17-24개 잔기인 H쇄 CDR H3 부분을 가진다.

따라서, 본 발명의 특정 구체예에서, 결합 부위 또는 항원 부분을 포함하는 CDR은 표 2의 특정 CDR에 제공된 크기 범위에 있는데, 예를 들면, L쇄의 처음 CDR 즉, L1의 경우에 CDR은 10 내지 17개 아미노산 잔기를 가지고, L쇄의 두 번째 CDR 즉 L2의 경우에, CDR은 7개 아미노산 잔기를 가지고, L쇄의 세 번째 CDR 즉 L3의 경우에, CDR은 7 내지 11개의 아미노산 잔기를 가진다. H쇄의 처음 CDR 즉, H1의 경우에 CDR은 5 내지 7개 아미노산 잔기를 가지고, H쇄의 두 번째 CDR 즉 H2의 경우에, CDR은 9 내지 12개 아미노산 잔기를 가지고, H쇄의 세 번째 CDR 즉 H3의 경우에, CDR은 2 내지 25개의 아미노산 잔기를 가진다. 다른 특정 구체예에서, 결합 부위를 포함하는 CDR은 길이가 5-10,5-15,5-20,11-15,11-20,11-25, 16-25인 아미노산을 가진다. 다른 구체예에서, 결합 부위를 가지는 CDR의 경우에 적어도 5, 10, 15, 20개 아미노산 또는

길이가 10, 15, 20, 25, 30개 아미노산을 가진다.

변형된 CDRs을 포함하는 항체를 작제한 후에, 변형된 항체는 추가 변경시키고, 더 큰 친화력 또는 특이성을 가지는 항체를 선별한다. 표적 항원에 대해 더 큰 친화력 또는 특이성을 가지는 항체가 만들어지고, 이는 당분야에 임의 공지된 방법으로 선별된다. 예를 들면 합성된 변형 항체를 인코딩하는 핵산이 무작위로 또는 화학적 또는 부위-직접적인 돌연변이생성에 의해 돌연변이되거나 또는 변형된 항체를 인코딩하는 핵산에 특정 위치에 특정 돌연변이생성시키고, 표적이 되는 항원에 결합 친화성을 가지는 돌연변이된 핵산 분자에 노출된 항체를 선별한다. 선별은 발현된 항체 분자를 개별적으로 테스트하거나 또는 상 디스플레이 기술등과 같은 돌연변이된 서열의 라이브러리를 스크린하여 실시한다(U.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484; and 5,571,698 all by Ladner et al; PCT Publication WO 92/01047 by McCafferty et al.).

특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 변형된 면역글로블린 분자의 기능적으로 활성이 있는 단편, 유도체 또는 유사체를 제공한다. 기능적으로 활성이 있다는 것은 단편, 유도체, 유사체가 이들이 유도된 항체가 인지하는 동일한 항원을 인지할 수 있는 항-항-이디오타입 항체(가령, 3차 항체 또는 Ab3 항체)를 유도할 수 있다는 것을 의미한다(이는 단락 5.5에서 설명하는 방법으로 확인할 수 있다). 특히, 적절한 구체예에서, 항원을 특이적으로 인지하는 특정 CDR 서열의 N-말단이 되는 CDR 서열과 구조를 제거하면, 면역글로블린 분자의 이디오타입의 항원성이 강화된다. CDR 서열이 항원에 결합하는지를 결정하기 위해, CDR 서열을 포함하는 합성 펩티드를 항원 결합 검사에 이용하는데, 이는 당분야에 공지된 임의 결합 검사를 이용한다. 따라서, 적절한 구체예에서, 본 발명은 가변성 부분 도메인에 있는 한 개 이항화결합을 형성하는 시스템인 잔기를 SH기를 포함하지 않는 아미노산 잔기로 치환되고, 이의 가변성 부분의 일부분이 결손된 변형 면역글로블린 분자를 포함한다.

본 발명의 다른 구체예에는 본 발명의 변형 항체의 단편을 포함하는데, 가령, 가변성 부분을 포함하는 F(ab')₂, L쇄 항상 부분 및 H쇄의 CH1 도메인이 항체 분자의 펩신 처리로 만들어진 것이고, F(ab')₂의 이항화결합 다리를 환원시켜 만들어지는 Fab 단편 등이 있으나 이에 한정하지는 않는다. 또한, 본 발명은 본 발명의 변형 분자의 H쇄 및 L쇄 이량체 또는 Fvs 또는 단일 쇄 항체(SCAs)와 같은 임의 최소 단편 또는 본 발명의 변형 항체와 동일한 특이성을 가지는 임의 다른 분자를 제공한다(e.g., as described in U.S. Patent 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54).

'키메라 항체'를 생산하는 기술도 개발되어왔는데(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608, Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454), 적절한 항원 특이성을 가진 생쥐 항체 분자의 유전자와 적절한 생물학적 활성을 가지는 사람 항체 분자의 유전자를 접합시키는 것이다. 키메라 항체는 유린 단클론 항체에서 유도된 가변성 부분을 가지는 것과 사람의 면역글로블린의 항상부분을 가지는 것과 같은 상이한 동물종에서 유도된 상이한 부분을 가지는 분자로 예를 들면, 사람화된 항체를 말한다.

특정 구체예에서, 본 발명의 변형 면역글로블린은 사람화된 항체, 좀더 적절하게는 구조 부분은 사람 항체의 것이고, CDRs은 사람이 아닌 동물 적절하게는 생쥐의 항체에서 유도된 가변 도메인을 가지는 것이다(International Patent Application No. PCT/GB8500392 by Neuberger et al. and Celltech Limited).

CDR 접합은 사람화 항체의 또 다른 방법이다. 이는 유린 항체를 다시 만드는 것으로 사람 구조에 전체적인 항원 특이성 및 결합 친화성을 전달하는 것이다(Winter et al. U.S. Patent No. 5,225,539). CDR-접합된 항체는 다양한 항원에 대해 성공적으로 만들어졌는데, 예를 들면, IL-2 수용체에 대한 항체(Queen et al., 1989(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029); 세포 표면 수용체-CAMPATH에 대한 항체(Riechmann et al.(1988, Nature, 332:323)); 간염 B에 대한 항체(Cole et al.(1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869)); 항원-호흡기 합체 바이러스에 대한 항체(Tempest et al.(1991, Bio-Technology 9:267)) 등이 있다. CDRs-접합된 항체는 유린 단클론 항체의 CDR을 사람 항체에 접합시켜 만든다. 접합후에, 구조 부분에 있는 추가 아미노산 변화로부터 이익을 얻어, 친화력을 유지하는데, 그 이유는 골격구조 잔기가 CDR 모양을 유지하는데 필수적이고, 일부 골격구조잔기는 항원 결합 부위의 일부분인 것으로 알려졌기 때문이다. 그러나, 임의 항원성 부위를 도입시키기 않기 위해 골격구조를 보존할 수 있기위하여, 정립된 생식 세포계열 서열과 비교하고, 컴퓨터 모델링한다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 변형 면역글로블린의 융합 단백질을 제공하는데(또는 이의 기능적으로 활성이 있는 단편), 예를 들면 변형 면역글로블린을 공유결합을 통하여, 변형된 면역글로블린이 아닌 또 다른 단백질(또는 이의 일부분, 적어도 단백질의 10, 20, 50개 아미노산으로된 부분)의 아미노산 서열의 N- 또는 C-말단에 융합된 것이다. 적절하게는 변형 면역글로블린 또는 이의 단편은 항상 부분의 N-말단에서 다른 단백질에 공유결합된다. 적절한 구체예에서, 본 발명은 변형된 면역글로블린이 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, γ -인터페론, MCH 유도된 펩티드, G-CSF, TNF, 포린, NK 세포 항원 또는 세포 엔도사이토시스 수용체에 공유적으로 연결된 융합 단백질이다.

본 발명의 변형 면역글로블린에는 변형된 유사체 및 유도체가 포함되는데, 예를 들면, 임의 형태의 분자에 공유결합된 것으로 단, 이와같은 공유적으로 결합되는 것이 항-이디오타입 반응을 유도하는데 있어서, 변형 면역글로블린을 방해하지 않아야 한다(이는 단락 5.5에서 설명하는 임의 방법으로 결정함). 예를 들면, 본 발명의 변형 면역글로블린의 유도체 및 유사체에는 추가 변형된 것들이 포함되는데, 예를 들면, 글리코실화반응, 아세틸화반응, 페질화반응(pegylation), 포스포릴화반응, 아미데이션, 공지의 보호 및 차단기, 단백질분해성 절단, 세포 리간드 또는 임의 부분에 연결되는 등의 방법으로 유도된 것들이 포함된다. 임의 다양한 화학적인 변형도 공지 기술을 이용하여 이루어질 수 있는데, 가령, 특정 화학물질을 이용한 절단, 아세틸화반응, 포밀화반응, 튜니카마이신(tunicamycin)의 대사적 합성등이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 추가로, 유사체 또는 유도체에는 이 단락에서 나열한 것과 같은 한 개이상의 비-공유적인 아미노산을 포함할 수 있다.

변형 면역글로블린, 이의 단편, 유사체, 유도체를 만드는 방법은 5.4에서 설명한다.

5.2. 치료요법상의 용도

본 발명은 개체에 치료제를 투여함으로써 항-이디오타입 항체 및 항-항-이디오타입 항체 생산을 유도하는 방법을 제공한다. 이와 같은 치료제에는 본 발명의 변형 면역글로블린, 기능적으로 활성이 있는 단편, 이의 유사체 및 이의 유도체(단락 5.1참고), 본 발명의 변형 항체를 인코딩하는 핵산, 이의 기능적으로 활성을 가진 단편, 이의 유도체(단락 5.1참고)를 포함한다.

일반적으로, 개체와 동일한 종인 종기원 또는 종 반응성을 가진 생성물을 투여하는 것이 바람직하다. 따라서, 적절한 구체예에서는 본 발명의 방법은 사람 항체에서 유도된 변형 항체를 이용하고, 또 다른 구체예에서는 키메라 또는 사람화된 항체에서 유도된 변형 항체를 이용한다.

특히, 본 발명의 변형 항체를 포함하는 백신 조성물(단락 5.3)을 개체에 투여하여, 변형 항체 Ab2의 이디오타입을 특이적으로 인지하는 항체(가령, 항-이디오타입 항체 또는 Ab2)를 생산하도록 유도하고, 다시, 이는 Ab2의 이디오타입을 특이적으로 인지하는 항-항-이디오타입 항체(Ab3)의 생산을 유도하여, 이와 같은 Ab3 항체는 변형된 항체와 동일한 또는 유사한 특이성을 가진다.

본 발명은 항-이디오타입 반응을 유도하기 위해, 가령, Ab2 및 Ab3 타입 항체를 만들기 위해 본 발명의 변형 항체를 투여하는 방법을 제공한다. 또는, 본 발명은 한 개체에서 Ab2 항체를 생산하기 위해 본 발명의 변형된 항체를 투여하고, Ab2 항체를 분리시키고, 그 다음 제 2 개체에 Ab2 항체를 투여하여, 제2개체에서 Ab3타입 항체를 만드는 방법을 제공한다.

따라서, 본 발명은 개체에 항-이디오타입 반응을 유도하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 항-이디오타입 반응을 유도하는데 충분한 제1 면역글로블린 분자(또는 이의 기능적으로 활성이 있는 단편 또는 이의 유도체)의 일정량을 투여하고, 제1면역글로블린은 제2면역글로블린 분자와는 가변 부분에 한 개이상의 아미노산 잔기 치환체가 있는 것을 제외하고는 동일한 가변 부분을 가지고, 제2 면역글로블린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있고, 이때 제 2 면역글로블린 분자에서 이항화결합을 형성하는 한 개 이상의 시스템 잔기에 상응하는 한 개 이상의 위치에 SH기를 포함하지 않는 아미노산 잔기로 치환된 한 개 이상의 치환체를 가진다. 또 다른 구체예에서, 제2면역글로블린 분자의 이디오타입을 인지하는 항-이디오타입 항체를 분리하고, 항-이디오타입 항체를 제2개체에 투여하는 방법을 추가로 제공한다.

하기 단락에서 더 상세하게 논의될 특정 구체예에서, 본 발명의 변형된 항체를 이용하여 감염성 매개물, 질병이 있는 또는 비정상적인 세포 가령, 세균, 기생충, 곰팡이, 바이러스, 종양 및 암등을 포함하나 이에 국한하지 않는 물질에 대해 항-이디오타입 반응을 유도한다. 본 발명의 변형 항체를 이용하여, 특정 항원에 대해 항-항-이디오타입 반응을 유도하여, 치료 또는 예방할 수 있는 임의 질환을 치료하거나 예방할 수 있다.

또 다른 구체예에서, 변형 항체를 이용하여, 류마티스 관절염, 낭창, 궤양성 대장염, 건선 또는 알레르기 치료등을 포함하나 이에 국한되지 않는 자가면역 질환을 치료한다. 한 특정 구체예에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 개체에서 체액 반응을 유도한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 개체에서 세포-중개된 반응을 유도한다. 적절한 구체예에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 체액 및 세포-중개된 반응을 유도한다.

본 발명을 이용할 수 있는 개체는 임의 포유류 종 또는 척추동물종이 되는데, 예를 들면, 소, 말, 양, 돼지, 가금류(닭), 염소, 고양이, 개, 햄스터, 생쥐, 들쥐, 원숭이, 토끼, 침팬지 및 사람이 포함되나 이에 국한시키지는 않는다. 적절한 구체예에서는 개체는 사람이 된다. 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여, 질병을 예방하거나, 특정 질병을 치료하고, 이때 특정 면역글로블린 분자에 대한 항-이디오타입 반응이 질병을 치료하거나 예방하는데 효과적이다.

5.2.1. 암의 치료 및 예방

신형성, 종양, 전이 또는 조절이 안되는 세포 성장을 특징으로 하는 임의 질병을 포함하는 암은 본 발명의 변형 면역글로블린(또는 이의 활성 단편, 유도체 및 유사체) 또는 변형 면역글로블린을 인코딩하는 핵산 또는 이의 기능적으로 활성 단편, 유도체 및 유사체를 투여함으로써 치료 및 예방할 수 있는데,

이런 변형된 면역글로블린은 하나 또는 복수의 항원을 특이적으로 인식하는 면역글로블린에서 유도하고, 상기 항원은 치료 또는 예방할 암의 암세포와 관계한다. 특정 치료요법이 일정형태의 암의 예방 또는 치료에 효과가 있는가의 여부는 당분야에 공지된 임의의 방법으로 결정할 수 있는데, 이런 방법의 예는 섹션 5.5에 제시하였지만, 이들 예에 한정하지 않는다.

가령, 다음의 암항원과 관련된 암은 이들 암항원을 인식하는 항체로부터 유도한 본 발명의 변형항체를 투여하여 치료 또는 예방한다: KS1/4 범-암(중)항원(Perez and Walker, 1990, J. Immunol. 142:32-37; buma1, 1988 Hybridoma7(4):407-415), 난소암 항원(CA125)(Yu et al., 1991, Cancer Res. 51(2):48-475), 전립선암 인산염(Taylor et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18(1):4928), 전립선특이적 항원(Henttu and Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli et al., 1993, Cancer Res. 53:227-230), 흑색종-관련 항원p97(Estin et al., 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-44), 흑색종 항원 gp75(vijayasardahl et al., 1990, J. Exp. Med. 171(4):1375-1380), 고분자량 흑색종 항원(HMW-MAA)(Natali et al., 1987, Cancer 59:55-3; Mittelman et al., 1990, j. Chin. invest 86:2136-2133). 전립선 특이적 막 항원, 태아성 암(중) 항원(CEA)(Foon et al., 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13:294), 다형성 내피 무친 항원, 사람 유지방 구체항원, 결장직장암-관련 항원(예, CEA, TAG-72(Yokata et al., 1992, Cancer Res. 52:3402-3408), C017-1A(Ragnhammar et al., 1993, Int. J. Cancer 53:751-758); G1CA 19-9(Herlyn et al., 1982, J. Clin. Immunol. 2:135), CTA-1, LEA), 벌키트 림프종 항원 38.13, CD19(Ghetie et al., 1994, Blood 83:1329-1336), 사람 b-림프종 항원-CD20(Reff et al., 1994, Blood 83:435-445), CD33(Sgouros et al., 1993, J. Nucl. Med. 34:422-430), 흑색종 특이적 항원(예, 강글리시드 GD2(Saleh et al., 1993, J. Immunol. 151,3390-3398), 강글리시드 GD3(Shitara et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother, 36:373-380), 강글리시드 GM2(Livingston et al., 1994, J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), 강글리시드 GM3(Hoon et al., 1993, Cancer Res. 53:5244-5250)), 종양-특이적 이식 형태

의 세포-표면 항원(TSTA)(예, T-항원 DNA 종양 바이러스와 RNA 종양 바이러스의 외피항원을 비롯한 바이러스-유도 종양항원), 신생종양 항원-알파-태아단백질(예, 결장의 CEA), 방광 종양 신생종양 항원(Hellstrom et al., 1985, Cancer. Res. 45:2210-2218), 분화항원(예, 사람 폐암(종) 항원 L6,L20(Hellstrom et al., 1986, Cancer Res. 46:3917-3923)), 섬유육종의 항원, 사람 백혈병 T 세포 항원-Gp37(Bhattacharya-Chatterjee et al., 1988, J. of Immun. 141:1398-1403), 신당단백질, 스팅고지질, 유방암 항원(예, EGFR(상피 성장인자 수용체)), HER2 항원(p185^{HER2}), 다형성 내피 무친(PEM)(Hilkens et al., 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359), 악성 사람 림프구 항원-AP0-1(Bernhard et al., 1989, Science 245:301-304), 분화항원(Feizi, 1985, Nature 314:53-57)(예, 신생 적혈구 및 일차 내배엽에서 발견되는 I 항원), 위 선암종에서 발견되는 I(Ma), 유방 내피에서 발견되는 M18 및 M39, 골수성세포에서 발견되는 SSEA-1, VEP8, VEP9, My1, VIM-D5, 결장직장암에서 발견되는 D₁56-22, TRA-1-85(혈액 그룹 H), 결장 선암(종)에서 발견된 C14, 폐 선암(종)에서 발견된 F3, 위암에서 발견된 AH6, Y 합텐, 태아 암(종) 세포에서 발견된 Le^y, TL5(혈액 그룹 A), A431 세포에서 발견된 EGF, 체장암에서 발견된 E₁ 시리즈(혈액 그룹 B), 태아 암(종)세포에서 발견된 FC10.2, 위 선암종, 선암(종)에서 발견된 CO-514(혈액 그룹 Le^u), 선암(종)에서 발견된 NS-10, CO-43(혈액 그룹 Le^b), G49, 결장 선암(종)에서 발견된 EGF 수용체(혈액 그룹 Ale^b/Le^y), 결장암에서 발견된 19.9, 위암 무친, 골수세포에서 발견된 T₅A₇, 흑색종에서 발견된 R₂₄, 4.2, G₀₃, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G₀₂, 태아 암(종)세포에서 발견된 M1:22:25:8, 4-8-세포단계 태아에서 발견된 SSEA-3, SSEA-4. 또 다른 구체예에서, 항원은 피부 T 세포 림프종에서 얻은 T 세포 수용체유도 펩티드이다(Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62 참조).

본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 변형항체로 치료하는 대상은 선택적으로 수술, 방사선치료 또는 화학치료와 같은 다른 암치료법으로 치료한다. 특히, 암을 예방하거나 치료하기 위해 사용하는 본 발명의 치료물질은 하나의 화학치료요법 물질 또는 이런 물질의 화합물과 결합하여 투여하는데, 화학치료요법 물질의 예로는 메토트렉세이트, 탁솔, 멀캅토포린, 티오구아닌, 수산화요소, 시타라빈, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, 니트로소우레아, 시스플라틴, 카르보플라틴, 미토마이신, 다카르바진, 프로카비진, 에도포시드, 캄파테신, 블레오마이신, 독소루비신, 이다루비신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 필리카마이신, 미톡산트론, 아스파라기나제, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 비노렐빈, 팔실리탁셀, 도체탁셀등을 들 수 있지만, 이들 예에 한정하지 않는다.

5.2.1.1. 악성(종)암

본 발명의 투여로 치료하거나 예방할 수 있는 악성암이나 다른 관련질환은 표3에 제시한 것들을 들 수 있지만, 이들에 한정하지 않는다(fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia 참조)

표 3

악성암 및 관련 질환

백혈병

급성 백혈병

급성 림프구성 백혈병

급성 골수성 백혈병

골수아구성

전골수성

골수성단구

단구성

적백혈병

만성 백혈병

만성 골수성 백혈병

만성 림프구성 백혈병

진성 적혈구 증가증

림프종

흡킨스병

비-흡킨스병

다발성 골수종

발렌스트림의 매크로글로불린 혈증

H 사슬 질병

고형암

육종 및 암(종)

섬유육종
 점액육종
 지방육종
 연골육종
 골육종
 척(수)삭종
 맥관 육종
 내피 육종
 림프관 육종
 림프관내피 육종
 활막종
 중피종
 유잉종양
 평활 근육종
 결장암(종)
 췌장암
 유방암
 난소암
 전립선암
 편평 세포암(종)
 기저 세포암(종)
 선암(종)
 한선 육종
 피(지)선 육종
 유두상암(종)
 유두상 선암(종)
 낭종암(종)
 수양암(종)
 기관지 암(종)
 직장세포 암종
 간(세포)암
 담관암(종)
 용모암(종)
 정상피종
 태생암(종)
 율름 종양
 경부암
 자궁암
 고환종양
 폐암(종)
 소세포폐암(종)
 방광암(종)
 상피암(종)
 신경교종
 신경(교) 세포종

수아세포종
 두 개 인두(관)종
 상의 세포종
 송과체종
 현관아(세포)종
 청신경초종
 희<뾰>돌기 교종
 수막종
 흑색종
 신경아세포종
 망막아세포종

특정 구체에에서, 악성암 또는 이상증식변화(전이 및 형성이상), 또는 초 증식질환은 난소, 방광, 유방, 결장, 폐, 피부, 췌장 또는 자궁에서 치료하고 예방한다. 또 다른 구체에에서, 육종, 흑색종 또는 백혈병을 치료하고 예방한다.

5.2.1.2. 전암 상태

본 발명의 치료물질은 전암 상태를 치료하고, 신생종양 또는 악성암상태로 진전되는 것을 예방하기 위하여 투여하는데, 이런 악성암의 예는 표3에 제시하지만, 이들에 예에 한정하지 않는다. 이런 예방 또는 치료요법적 용도는 신생종양 또는 암으로의 진전되는 것으로 공지된 또는 추측되는 질환, 특히, 비-신생종양 세포생장이 과형성, 이형성으로 이루어지는 경우, 이 중에서도 특히 형성장애가 발생하는 경우에 처방된다(비정상적 성장상태의 검토를 위해서는 Robbins and Angell, 197, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp.8-79 참조). 과형성은 조직 또는 장기에서 세포수의 증가를 포함하여 통제된 형태의 세포증식으로 구조 또는 기능에 별다른 변화가 없다. 한가지 예를 제외하고, 자궁내막 과형성은 종종 자궁내막암을 선행한다. 이형성은 통제된 형태의 세포생장으로, 일형의 성숙 또는 완전분화된 세포가 다른 형태의 성숙세포로 치환된다. 과형성은 내피 또는 연결조직세포에 발생할 수 있다. 일반적인 과형성에는 다소의 무질서한 과성 내피세포가 관계한다. 형성장애는 암을 빈번하게 전조하고, 주로 내피에서 발견된다; 이것은 가장 무질서한 형태의 비-신생종양세포 성장으로, 여기에는 개별 세포의 통일성 및 세포의 조직적 방향성 상실이 일어난다. 형성장애 세포는 종종 비정상적으로 크고, 진하게 착색된 핵을 갖고, 다형성을 보인다. 형성장애는 특이적으로 만성적 발적 또는 염증이 있는 곳에 발생하고, 주로 경부, 호흡기, 구강, 담낭에서 발견된다.

과형성, 이형성 또는 형성장애로 특징지어지는 비정상적 세포생장의 존재에 더하여, 환자의 세포샘플에 의해 생체내 및 시험관내에서 드러나는 형질전환된 표현형 또는 악성 표현형의 하나 또는 복수 특징의 존재는 백신조성물의 예방/치료 필요정도의 척도가 된다. 앞에서 언급한 바와 같이, 이런 형질전환된 표현형의 특성에는 형태변화, 느슨해진 기증부착, 접촉억제의 상실, 유지의존의 상실, 프로테아제 kdcnf, 당전달증가, 혈청필요의 감소, 태아항원의 발현, 250,000 달톤의 세포 표면 단백질의 소멸등이 포함된다(형질전환된 또는 악성표현형과 관련된 특성을 검토하려면 상기 동일 자료 pp. 84-90 참조).

특정 구체에에서, 백반증, 내피의 양성-과형성 또는 형성장애 병소, 또는 보우인병(in situ 암종)은 예방 개입 필요성의 기준이 되는 선-종양 병소다.

다른 구체에에서, 섬유세포 질환(포낭 과형성, 유방 형성장애, 특정 선증(양성 내피 과형성)은 예방 개입 필요성의 기준이 된다.

또 다른 구체에에서, 악성암에 대한 하나 또는 복수의 근원인자를 보이는 환자는 본 발명의 치료약물 효과량을 투여하여 치료하는데, 이런 인자에는 악성암과 관련된 크로모솨 전좌(예, 만성 골육종 백혈병에 대한 필라델피아 크로모솨, 여포성 림프종에 대한 t(14;18)), 가족특유의 폴리포시스 또는 가드너 증후군(결장암의 전조), 양성 단클론 갠모패시(다중 흑색종의 전조), 멘델의 유전패턴(예, 가족특유의 결장암 폴리포시스, 가드너 증후군, 유전적 엑소스토시스, 다내분비 선종증, 아밀로이드 생산 및 크롬친화세포종을 가진 골수홍선암(종), 포이츠-제이어 증후군, 본 렉클링하우젠의 신경교종증, 망막아세포종, 경동맥체암, 피부 흑색암(종), 망막내 흑색암(종), 피부건조증 색소성, 운동실조 모세관확장증, 체디아크-히가시 신드롬, 피부백변증, 프랑코니 재생불량성빈혈, 불륨증후군)을 보이는 암 또는 전암성 질환에 걸린 사람과의 일차관계가 있다(Robbins and Angell, 197, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 112-113 참조).

또 다른 특정 구체에에서, 본 발명의 치료약물을 사람환자에게 투여하여 난소, 유방, 결장, 폐, 췌장, 피부, 전립선, 위장, B 림프구 또는 자궁의 암, 흑색종 또는 육종으로의 진전을 예방한다.

5.2.2. 감염성 질환의 치료

본 발명은 또한 본 발명의 치료약물, 특히, 변형된 면역글로불린 분자(또는 이의 기능적 활성단편, 유도체 또는 유사체, 또는 변형된 면역글로불린을 인코딩한 핵산, 이의 기능적 활성 단편, 유사체 또는 유도체)를 투여하여 감염성 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것으로, 상기 면역글로불린 분자는 감염성 질환을 유발하는 병인의 항원 또는 감염성 질환병인에 대한 세포 수용체에 면역특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자로부터 유도한 것이다. 후술한 바와 같이 감염성병인에는 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 원생동물, 기생균이 포함되는데, 이들에 한정하지 않는다.

특정 구체예에서, 감염성 질환은 본 발명의 변형된 면역글로불린 분자(또는 이의 기능적 활성단편, 유도체 또는 유사체, 또는 변형된 면역글로불린을 인코딩한 핵산)를 투여하여 감염성 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것으로, 상기 면역글로불린 분자는 다음의 감염성 질환병인의 항원중 하나를 특이적으로 인식하는 면역글로불린으로부터 유도한 것이다: 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(Genbank accession no. J02132; Air, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:739-743; Newton et al., 1983, Virology 128:495-501), 사람 호흡기 합포체성 바이러스 G 당단백질(Genbank accessionno. Z33429; Garcia et al., 1994, J. Virol.; Collins et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:783), 탕그바이러스의 심부 단백질, 모체 단백질 또는 다른 단백질(Genbank accession no. M19197; Hahn et al., 1988, Virology 12:17-180), 홍역바이러스 헤마글루티닌(Genbank accession no. M81899; Rota et al., 1992, Virology 188:135-142), 단수포진바이러스 2형 당단백질 gB(Genbank accession no. M14923; Bzik et al., 198, Virology 155:322-333), 폴리오바이러스 I VP1(Emini et al., 1983, Nature 304:99), HIV I의 외피 당단백질(예, gp120, Putney et al., 198, Science 234:1392-1395), B형 간염 표면항원(Itoh et al., 1981, Nature 308:19; Neurath et al., 198, Vaccine 4:34), 디프테리아 독소(Audibert et al., 1981, Nature 289:543), 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 24M 에피토포프(Beachey, 1985, Adv. Exp. Med. Biol. 185:193), 고노코커스 필린(*Gonococcal pilin*)(Rothbard and Schoolnik, 1985, Adv. Exp. Med. Biol. 185:247), 슈도라비즈(*Pseudorabies*) 바이러스 g50(gpD), 슈도라비즈(*Pseudorabies*) 바이러스 당단백질 H, 슈도라비즈(*Pseudorabies*) 바이러스 당단백질 gII(gpC), 전파가능 위장염 당단백질 195, 전파가능 위장염 모체단백질, 돼지 로타바이러스 당단백질 38, 돼지 파르보바이러스 캡시드 단백질, 셸푸리나 히도디센테리아(*Serpulina hydodysenteriae*)보호 항원, 소 바이러스성 설사 당단백질 55, 뉴캐슬 질환 바이러스 헤마글루티닌-뉴우라미니다제, 돼지 감기 헤마글루티닌, 돼지 감기 뉴우라미니다제, 구제역 바이러스, 돼지 콜레라 바이러스, 돼지 인플루엔자 바이러스, 아프리카 돼지 열병 바이러스, 미코플라스마 히포프뉴모니아(*Mycoplasma hypopneumoniae*), 감염성 소 비강기관염 바이러스(예, 감염성 소 비강기관염 바이러스 당단백질 E 또는 당단백질 G), 감염성 후두기관염 바이러스(예, 감염성 후두기관염 바이러스 당단백질 G 또는 당단백질 I), 라 크로제(*La Crosse*)바이러스의 당단백질(Gonzales-scarano et al., 1982, virology 120:42), 태아소 설사 바이러스(Matsuno and Inouye, 1983, Infection and Immunity 39:155), 베네주엘라 말 뇌척수염 바이러스(Mathews and Roehrig, 1982, J. Immunol. 129:273), 폰타 토로 바이러스(Dalrymple et al., 1981, in Replication of Negative Strand Viruses, Bishop and Compans(eds.), Elsevier, NY, p.17), 유린 백혈병 바이러스(Steeves et al., 1974, J. Virol. 14:187), 생쥐 유방 종양 바이러스(Massey and Schochetman, 1981, Virology 115:20), B형 간염바이러스 심부 단백질 또는 B형 간염바이러스 표면항원(U.K. Patent Publication No. GB 2034323A published June 4, 1980; Ganerm and Varmus, 1987, Ann. Rev. Biochem. 5:51-93; Tiollais et al., 1985, Nature 317:489-495 참조), 말 인플루엔자 바이러스 또는 말 헤르페스바이러스의 항원(예, A형(말 인플루엔자 바이러스/알래스카 91 뉴우라미니다제, 말 인플루엔자 바이러스 A형/마이애미 63 뉴우라미니다제, 말 인플루엔자 바이러스 A형/켄터키 81 뉴우라미니다제, 말 헤르페스바이러스 1형 당단백질 B, 말 헤르페스바이러스 1형 당단백질 D), 소 호흡기 합포체성 바이러스 또는 소 파라인플루엔자 바이러스(예, 소 호흡기 합포체성 바이러스 부착단백질(BRSV G), 소 호흡기 합포체성 바이러스 융합단백질(BRSV F), 소 호흡기 합포체성 바이러스 뉴클레오캡시드 단백질(BRSV N), 소 파라인플루엔자 바이러스 3형 융합 단백질, 소 파라인플루엔자 바이러스 3형 헤마글루티닌 뉴우라미니다제), 소 바이러스성 설사 바이러스 당단백질 48, 소 설사바이러스 당단백질 53. 또 다른 특정구체예에서, 감염성 질병은 변형된 면역글로불린(또는 이의 기능적 활성 단편, 유도체 또는 유사체, 또는 이들을 인코딩한 핵산)을 투여하여 치료 또는 예방하는데, 상기 변형 면역글로불린은 상응하는 병원균 및 세포 수용체를 통해 감염질환 병인에 대한 세포 수용체를 인식하는데, 병원균과 세포 수용체의 목록은 표4에서 제시한다.

표 4

병원균	세포 수용체
B- 림프 영양성 파포 바이러스 (LPV)	LPV 수용체 (B- 세포)
<i>Bordetella pertussis</i> (보르데텔라 퍼투시스)	아데닐레이드 사이클라제
보르나병 바이러스 (BDV)	BDV 표면 당단백질
소 코로나 바이러스	N-아세틸-9-O- 아세틸 뉴우라실산 수용체
백작수막염 바이러스	CD4*
팅그 바이러스	고도 환산염화형 헤라진 환산염 p65
<i>E. coli</i> (대장균)	Gal- 알파 -1-4Gal- 포함 수용체
에볼라	CD16b
에코 바이러스 1	인테그린 VLA-2 수용체
에코 바이러스-11 (EV)	EV 수용체
내독소 (LPS)	CD14
장관 바이러스	당 접합 수용체
장관 오르판 바이러스	알파/베타I- 세포 수용체
잠 바이러스	핵심-기혹화 인자 수용체
고양이 백혈병 바이러스	세포외피 당 단백질 (Env-SU) 수용체
구제역 바이러스	면역 글로불린 Fc 수용체
기원 원숭이 백혈병 바이러스 (GALV)	GALV 수용체
그람- 음성 박테리아	CD14 수용체
<i>Helicobacter pylori</i> (헬리코박터 필로리)	류이스 (b) 혈액 그룹 항원 수용체
B형 간염 바이러스 (HBV)	T- 세포 수용체

병원균	수용체
단순 포진 바이러스	헤피린, 환산화염 크리코사이노글리칸 수용체 섬유아세포종 생장인자 수용체
HIV-1	CC- 케모킨 수용체 CCR5 CD11a CD2 G- 당백질 결합 수용체 CD4
사람 시트메갈로 바이러스	헤피린 환산화염 Annexin II (안넥신 II) CD13 (아미노 펩티다제 N)
사람 코르나 바이러스	Human aminopeptidase N receptor(사람 아미노 펩티다제 N 수용체)
인플루엔자 A, B & C	Hemagglutinin receptor (헤마글루티닌 수용체)
레지오넬라	CR3 수용체 당백질 키나아제 수용체 갈락토스 N- 아세틸 갈락토사민 (Gal/GalNAc)- 여제가능 렉틴 수용체 케모틴 수용체
Leishmania mexicana(멕시코 리슈마니아)	안넥신 I
Listeria monocytogenes(당성 리스테리아)	ActA 당백질
홍역 바이러스	CD46 수용체
Meningococcus (수막염균)	수막염 특령 관련 Opa 수용체
Morbilliviruses (홍역 바이러스)	CD46 수용체
생쥐 간염 바이러스	태아성 암(종) 항원 페밀리 수용체 태아성 암(종) 항원 페밀리 Bgla 수용체
유인 백혈병 바이러스	외피 당당백질
유인 감마 포진 바이러스	gamma interferon receptor(감마 인터페론 수용체)
유인 레트로 바이러스	당당백질 gp70 Rmc-1 수용체
유인 코로나 바이러스 생쥐 간염 바이러스	태아성 암(종) 항원 페밀리 수용체

Pathogen (병원균)	Cellular Receptor (세포 수용체)
Mycobacterium avium-M(지혈핵산기)	사람 인테그린 수용체 알파 V 베타 3
Neisseria gonorrhoeae (임균)	헤파린 화산염 프로테오글리칸 수용체 CD66 수용체 인테그린 수용체 막 보조인자 당백질 CD46 GM1 GM2 GM3 CD3 세라미드
뉴캐슬병 바이러스	헤마글루티닌-뉴우라미다제 당백질 올림 당백질
파르보바이러스 B19	적혈구 P 항원 수용체
Plasmodium falciparum (말라리아 원충)	CD36 수용체 글리코포린 A 수용체
팍스 바이러스	인테페론 감마 수용체
Pseudomonas (슈도모나스(속))	KDEL 수용체
포타 바이러스	혈액 희면 알파 4 베타 1 수용체
Salmonella typhiurium(사황변과 티파우름)	사람 생장인자 수용체
Shigella (시겔라(속))	알파 5 베타 인테그린 당백질
Streptococci (연쇄구균)	비당복가된 J774 수용체
T- 보조세포 I형	케르킨 수용체 6. CXCR1-4 7. CCR1-5 8. CXCR3 9. CCR5
T- 세포 림프영양성 바이러스 I	gp46 표면 당당백질

Pathogen (병원균)	Cellular 수용체
우두 바이러스	TNFRp55 수용체 TNFRp75 수용체 용해성 인티루킨 -1 베타 수용체

본 발명 방법으로 치료 또는 예방할 수 있는 바이러스 질병에는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 수두, 아데노바이러스, 단순포진바이러스 1형(HSV-1), 단순포진 11형(HSV-1), 우역, 코감기바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스, 호흡기 합포체성 바이러스, 파필로마 바이러스, 파포바 바이러스, 시토메갈로바이러스, 에치노 바이러스, 아르보바이러스, 한탄바이러스, 콕사키 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 루벨라 바이러스, 폴리오바이러스, 사람 면역결핍 바이러스 1형(HIV-1), 사람 면역결핍 바이러스 11형(HIV-1), 피코르나바이러스, 엔테로바이러스, 칼리시비리드아(caliciviridae), 노르워크 바이러스 그룹, 토가바이러스(에, 덩그바이러스), 알파바이러스, 플라비바이러스, 코로나바이러스, 라비즈 바이러스, 마르버그 바이러스, 에볼라바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 오르토믹소바이러스, 분야 바이러스, 아레나바이러스, 레오바이러스, 로타바이러스, 오르비바이러스, 사람 T 세포 백혈병 바이러스 1형, 사람 T 세포 백혈병 바이러스 11형, 유인원 면역결핍 바이러스, 렌티바이러스, 플로오마바이러스, 파르보바이러스, 엠스테인-바르 바이러스, 사람 헤르페스바이러스-6, 원숭이 헤르페스바이러스 1, 팍스바이러스, 뇌염에 의해 유발된 질병이 포함되지만, 이들에 한정하지 않는다.

본 발명의 방법으로 치료 또는 예방할 수 있는 박테리아 질병에는 그람음성 및 그람양성 박테리아, 미코 박테리아 리케차(Mycobacteria rickettsia), 미코플라스마(Mycoplasma), 네이세리아종(예, Neisseria

mennigitidis, neisseria gonorrhoeae), 레지오넬라(*legionella*), 시겔라종(*Shigella* spp.), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 스트렙토코커스속(예, *Streptococcus pneumoniae*), 코르넬박테리아 디프테리아(*Cornebacteria diphtheriae*), 파상풍균(*Clostridium tetani*), 보르데텔라 팄투스시(*Bordetella pertussis*), 해모필러스종(*Haemophilus* spp.), 클라미디아종(*Chlamydia* spp.), 장관 독원성 대장균(*Escherichia coli*)을 포함하나 이들에 한정하지 않는 박테리아에 의해 유발되거나, 또는 매독 또는 라임 병과 박테리아 질병이다.

본 발명의 방법에 의해 예방 또는 치료할 수 있는 원생동물 질환에는 말라리아, 아이메리아, 레시마니아, 코크지디오아, 트리마노소마, 곰팡이(예, 칸디다)를 포함하나 이에 한정하지 않는 원생동물에 의해 야기된다.

본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 치료약물은 적당한 항생제, 항-진균제, 항-바이러스제 또는 감염의 질병의 치료 또는 예방에 유용한 다른 약물과 결합하여 투여한다.

5.3. 유전자 치료법

유전자 치료법은 항원의 발현과 관련된 질환을 가진 개체에 핵산을 투여하여 이루어지는 질병의 예방 또는 치료를 의미하는데, 상기 항원은 변형된 글로불린 분자가 유도된 면역글로불린에 의해 인식된다. 가령, 질병 또는 질환은 특정 암 또는 종양항원의 발현과 관련된 암, 또는 감염성질환의 특정항원의 발현과 관련된 감염성 질환 또는 감염성 질환병인이 특정 세포 수용체와 결합하는 감염성 질환이다. 본 발명의 특정 구체예에서, 치료핵산은 세포내(리드 서열없음) 또는 세포내(리드 서열있음) 변형된 면역글로불린을 생산하는 서열을 인코딩한다.

유전자 치료방법의 일반적 검토를 위해, Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217을 참조한다. 사용할 수 있는 재조합 DNA 기술분야에서 일반적으로 공지된 방법은 Ausubel et al., 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY에서 제시한다.

또 다른 측면에서, 치료핵산은 변형된 면역글로불린 분자를 발현하는 발현벡터를 포함한다.

핵산의 환자로의 전달은 직접적일 수도 있고, 이 경우, 환자는 핵산 또는 핵산-전달 벡터, 또는 전달복합체에 직접 노출되고, 간접적일 수도 있는데, 이 경우 세포는 먼저 시험관내에서 핵산으로 형질전환되고, 이후 환자로 이식된다. 이들 두 방식은 각각, 공지된 생체내 또는 탈체 유전자치료법이다.

특정 구체예에서, 핵산은 집적 생체내로 투여하는데, 이 경우, 이것은 발현되어 항체를 생산한다. 이것은 당분야에 공지된 수많은 방법중 임의의 방법으로 성취할 수 있는데, 예를 들면, 이것을 적당한 핵산 발현벡터의 일부로 작제하고 이를 투여하여 세포내에 위치하도록 하여, 결합성 또는 약독화된 레트로바이러스 또는 다른 바이러스 벡터를 사용하여(U.S.Patent No. 4,980,286 참조), 나체 DNA를 직접주사하여, 미세입자 폭발(예, 유전자 총: Biolistic, Dupont)을 사용하여, 지질, 세포-표면 수용체 또는 트랜스펙션 약물로 코팅하여, 생중합체(예, poly- β -1->4-N-아세틸글로코사민 폴리사카라이드; U.S. Patent No. 5,635,493 참조)형태의 캡슐화, 리포솜형태의 캡슐화, 미세입자, 미세캡슐, 핵에 들어가는 것으로 알려진 펩티드에 이것을 연결하여 투여하거나, 또는 수용체-매개의 엔도사이토시스의 표적리간드에 이것을 연결하여 투여한다(Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). 또 다른 구체예에서, 핵산-리간드 복합체를 만들 수 있는데, 여기서 리간드는 엔도솜을 교란하는 융합원성 바이러스 펩티드를 포함하여 핵산이 리포솜 분해를 피하도록 한다. 또 다른 구체예에서, 핵산은 특정 수용체를 사용하여 세포 특이적 흡착 및 발현에 대한 생체내 표적화 할 수 있다(PCT Publications W092/06180 dated April 16, 1992(Wu et al.); W0 92/22635 dated December 23, 1992(Wilson et al.); W092/20316 dated November 26, 1992(Findeis et al.); W093/14188 dated July 22, 1993(Young) 참조). 다른 방법으로, 핵산은 상동성 재조합으로, 세포내에 도입하고 발현용 숙주 세포 DNA 사이에 삽입할 수 있다(Koller and Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342:435-438).

다른 방법으로, 세포내 에피토프에 결합하는 중화항체와 같은 단일사슬항체를 또한 투여할 수 있다. 이런 단일사슬항체는 당분야에 공지된 기술을 사용하여 표적세포내에 단일사슬항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 발현하여 투여할 수 있다(Marasco et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893

Kozarsky and Wilson, 1993, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503). 아데노바이러스는 유전자치료법에 사용할 수 있는 다른 바이러스 벡터다. 아데노바이러스는 특히 호흡기 에피텔리아에 유전자를 전달할 수 있는 매력적인 운반체로, 이들은 호흡기 상피에서 경미한 질병을 유발한다. 아데노바이러스-기초 전달계에 대한 다른 표적은 간, 중추신경계, 내피 세포, 근육이 된다. 아데노바이러스는 비-분열세포를 감염시킬 수 있다는 장점이 있다. Kozarsky 및 Wilson (1993, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503)은 아데노바이러스-기초 유전자 치료법의 개관을 제시한다. Bout등 (1994, *Human Gene Therapy* 5:3-10)은 레서스 원숭이의 호흡기 에피텔리아로 유전자를 전달하는 방법을 밝힌다. 유전자치료법에 아데노바이러스의 다른 사용예는 Rosenfeld et al., 1991, *Science* 252:432-434; Rosenfeld et al., 1992, *Cell* 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, *J. Clin. Invest.* 91:225-234에서 발견할 수 있다. 아데노-관련 바이러스(AAV) 또한 유전자치료법에 사용이 고려되고 있다(Walsh et al., 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 204:289-300).

사용하기 위한 치료핵산의 형태와 양은 질병의 형태, 원하는 효과의 정도, 환자상태에 따라 달라지며, 당업자가 결정할 수 있다.

5.3. 백신 조성물 및 투여

본 발명은 또한 본 발명의 치료약물을 함유한 백신조성물을 제공하는데, 상기 백신조성물은 특정 항원에 대한 보호면역(체액 및/또는 세포 매개)반응을 유도하기 위한 투여에 적절하다.

이런 백신의 적당한 제제는 주사가능물질(액체용액 또는 현탁액)이 포함된다; 주사하기 전에 용해 또는 현탁에 적당한 고형형태로 만들 수도 있다. 제제는 유화시키거나 또는 펩티드는 리포솜형태로 캡슐로 만든다. 활성면역원성 성분은 종종 부형제와 혼합하는데, 상기 부형제는 제약학적으로 수용가능하고, 활성 성분과 상보적이다. 적당한 담체에는 물, 식염수, 완충식염수, 포도당, 글리세롤, 에탄올, 멸균 등장 수용성버퍼, 이들의 화합물이 있다. 또한, 원하는 경우, 백신제제에는 또한 소량의 첨가물질, 예를 들면, 습윤제 또는 유제, pH 완화제, 백신의 효능을 증가시키는 항항원체가 포함된다.

효과적인 항항원체의 예로는 수산화알루미늄, N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸-nor-무라밀-L-알라닐-D-이소글루타민, N-아세틸무라밀-L-알라닐-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-뉴-글리세로-3-이드록시포스포릴옥시)-에틸아민을 들 수 있는데, 이들 예에 한정하지 않는다.

항항원체의 효능은 특정 항항원체로 만들어진 주사 면역글로불린에 대한 항-유전형 항체의 유도를 측정하여 결정한다.

조성물은 액체용액, 현탁액, 유제, 정제, 알약, 캡슐, 지속방출 제제 또는 분말이 될 수 있다. 경구 조성물에는 제약학적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘, 스테아르산염, 소듐 사카라이드, 셀룰로오스, 탄산마그네슘과 같은 표준 담체가 포함될 수 있다.

일반적으로, 성분은 단위약량형태로 개별적으로 또는 혼합하여 제공하는데, 이들의 형태는 밀봉된 용기상의 동결건조 분말 또는 무수 농축물이 되고, 상기 용기의 예로는 활성성분의 양을 지시하는 앰플 또는 사키트를 들 수 있다. 조성물을 주사투여하는 경우, 멸균희석액의 앰플을 제공하여 투여전 성분을 혼합한다.

특정 구체예에서, 동결건조된 본 발명의 변형 면역글로불린은 제 1 용기로 제공하고; 제 2 용기에는 50% 글리세린, 0.25% 페놀, 방부제(예, 0.005% 브릴렌트 그린)의 수용성 용액으로 이루어진 희석액이 담겨진다.

본 발명은 또한 제약학적 팩 또는 키트를 제공하는데, 이들은 하나 또는 복수의 본 발명 백신조성물 성분으로 채워진 하나 또는 복수용기로 이루어진다. 이런 용기는 제약물 또는 생물학적 산물의 제조, 사용 또는 판매를 조절에 관한 정부당국의 지침을 따르며, 사람에게 투여시 제조, 사용 또는 판매를 주관하는 당국의 승인을 받아야 한다.

원하는 경우, 조성물은 팩 또는 자동판매장치로 제공하는데, 이들은 활성성분을 함유한 하나 또는 복수 단위약량을 보유한다. 팩은 블리스터 팩과 같은 금속 또는 플라스틱 조각으로 이루어진다. 팩 또는 자동판매장치는 투여지침을 따른다. 상보적인 제약학적 담체형태로 만들어진 본 발명화합물을 포함한 조성물을 또한 만들어, 적당한 용기에 담고, 지정된 질량치료용 표지한다.

백신을 투여하는 개체는 가급적 포유동물, 가장 적절하게는 사람이지만, 사람이외의 동물이 될 수 있는데, 예로는 소, 말, 양, 돼지, 닭(예, 병아리), 염소, 고양이, 강아지, 햄스터, 생쥐 또는 쥐를 들 수 있는데, 이들 예에 한정하지 않는다.

많은 방법을 사용하여 본 발명의 백신조성물을 도입할 수 있다; 이런 방법의 예로는 경구, 대뇌내, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내 경로, 방혈(두 갈래로 나뉜 바늘을 사용하여 피부 최상층 긁기), 또는 다른 임의의 면역화 경로를 들 수 있지만, 이들 예에 한정하지 않는다. 특정 구체예에서, 방혈을 사용한다.

조성물 형태로 사용하는 변형 면역글로불린 분자의 정확한 일일약량은 투여의 경로, 환자의 상태에 따라 달라지는데, 표준임상기술에 따라 의사 및 각 환자의 여건을 고려하여 결정한다. 효과적인 면역량은 백신제제를 투여할 속주에 변형면역글로불린에 대해 면역반응을 유발하기에 충분한 양이 된다. 효과적 일일약량은 동물모델시험장치에서 얻은 약량-반응곡선으로부터 추정할 수도 있다.

5.4. 변형면역글로불린을 생산하는 방법.

본 발명의 변형 면역글로불린은 면역글로불린합성을 위해 당분야에 공지된 임의의 방법으로 만들고, 특히 화학합성 또는 재조합발현으로 만들 수 있는데, 가급적 재조합 발현기술로 만든다.

본 발명의 변형면역글로불린, 이의 단편, 유사체 또는 유도체의 재조합 발현은 변형면역글로불린을 인코딩한 핵산의 작제를 필요로 한다. 변형면역글로불린의 뉴클레오티드 서열이 공지된 것이라면, 변형면역글로불린을 인코딩한 핵산은 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드로부터 합성하며(Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242), 여기에는 간단히 말하면, 변형면역글로불린을 인코딩한 서열의 일부분을 보유한 중복 올리고뉴클레오티드의 합성, 이들 올리고뉴클레오티드를 어닐링하고 결합하고, 이후 결합된 올리고뉴클레오티드를 PCR로 증폭하는 단계가 포함된다.

다른 방법으로, 변형면역글로불린을 인코딩한 핵산은 변형면역글로불린이 유도된 면역글로불린을 인코딩한 핵산에서 만든다. 특정 면역글로불린을 인코딩한 핵산을 보유한 클론은 얻을 수 없지만, 면역글로불린 분자서열이 공지된 경우, 면역글로불린을 인코딩한 핵산은 적당한 출처(항체 cDNA 라이브러리 또는 면역글로불린을 발현하는 임의의 조직 또는 세포로부터 만든 cDNA 라이브러리)에서 얻을 수 있는데, 이때 서열의 3' 및 5' 말단과 혼성화되는 합성 프라이머를 사용한 PCR 증폭 또는 특정 유전자 서열에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용한 혼성화 방법을 이용한다.

특이적으로 특정항원을 인식하는 면역글로불린 분자를 입수할 수 없는 경우(또는 이런 면역글로불린을 인코딩한 핵산을 클로닝할 cDNA 라이브러리 소스가 없는 경우), 특정 항원에 특이적인 면역글로불린은 당분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들면, 토끼와 같은 동물을 면역화시키는 방법, 다클론항체를 만드는 방법, 좀더 바람직하게는 다클론항체를 만드는 방법으로 만든다(Kohler and Milstein, 1975, Nature

256:495-497; Kozbon et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al.(1985 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96). 다른 방법으로, 면역글로불린의 적어도 Fab부분을 인코딩한 클론은 특정 항원에 결합하는 Fab 단편의 클론에 대한 Fab 발현 라이버러리를 선별하여(Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281) 또는 항체 라이버러리를 선별하여(Clackson et al., 1991, Nature 352:624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937) 얻을 수 있다.

일단 면역글로불린의 적어도 변이도메인을 인코딩한 핵산은 얻은 후에는, 이들 임의의 적당한 클로닝 벡터로 도입하고, 면역글로불린 분자의 일정영역을 인코딩한 뉴클레오티드를 보유한 벡터로 도입한다(PCT Publication WO 86/05807; PCT Publication WO 89/01036; U.S. Patent No. 5,122,464; and Bebbington, 1991, Methods in Enzymology 2:136-145). 완전항체분자의 발현을 가능하게 하는 핵산과의 공동발현용 완전 L 또는 H사슬을 보유한 벡터 또한 사용가능하다. 이후, 면역글로불린을 인코딩한 핵산은 변형하여 뉴클레오티드 치환 또는 결손을 도입하는데, 이것은 임의 다른 원하는 아미노산의 치환, 결손 또는 삽입과 함께, 사슬사이 이황화결합에 참여하는 하나 또는 복수 변이영역 시스테인 잔기를 SH기를 갖지 않는 아미노산잔기로 치환하기 위하여 필요하다. 이런 변형은 뉴클레오티드에 특정 돌연변이 또는 결손의 도입을 위해 당분야에 공지된 임의의 방법으로 실시할 수 있는데, 이런 방법의 예로 화학돌연변이, 시험관내 특정부위 돌연변이유발(Hutchinson et al., 1979, J. Biol. Chem. 253:6551), PCR 기초한 방법을 들 수 있지만, 이들 예에 한정하지 않는다.

또한, 적당한 생리활성의 사람항체분자에서 얻은 유전자와 적당한 항원특이성의 생쥐 항체 분자로부터 얻은 유전자를 결합시켜 키메라 항체를 생산하는 기술(Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454)을 또한 이용할 수 있다. 전술한 바와 같이, 키메라 항체는 다른 부분이 상이한 동물종에서 유도된 분자로, 예로는 유린 단클론항체에서 유도한 변이영역 및 사람면역글로불린으로부터 유도한 일정영역(예, 인체에 적응한 항체)을 갖는 것을 들 수 있다.

다른 방법으로, 단일사슬항체 생산을 위한 기술(U.S. Patent 4,694,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54)을 변형하여 단일사슬항체를 만들 수 있다. 단일사슬항체는 아미노산 브릿지를 통해 Fv 영역의 H사슬과 L사슬을 연결시켜 만들고, 이를 통해, 단일사슬 폴리펩티드가 생성된다. 대장균(*E. coli*)에서 기능적 Fv 단편의 조합기술을 또한 사용할 수 있다(Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041).

특정 에피토포프를 인식하는 항체 단편은 공지의 기술로 만든다. 가령, 이런 단편에는 항체분자의 펩신 절단에 의해 만들어 질 수 있는 F(ab')₂단편, F(ab')₂단편의 이황화결합을 환원시켜 만들어지는 Fab 단편이 있지만, 이들에 한정하지 않는다.

일단 본 발명의 변형 면역글로불린분자를 인코딩한 핵산이 얻어지면, 면역글로불린분자 생산용 벡터는 당분야에 공지된 기술을 이용한 재조합 DNA기술로 만든다. 변형 면역글로불린 분자는 이후 재조합발현하고 당분야에 공지된 임의의 방법(예, 섹션 6에서 밝힌 방법)으로 분리한다(Bebbington, 1991, Methods in Enzymology 2:136-145, 참조). 간단히 말하면, COS 세포 또는 다른 임의의 적당한 배양세포는 변형면역글로불린을 인코딩한 발현벡터로 일시적으로 또는 비-일시적으로 트랜스펙션시키고, 적당한 기간동안 배양하여 면역글로불린을 발현시키고, 이후 상청액을 COS 세포에서 수거하는데, 이때 상청액은 분비된, 발현변형된 면역글로불린을 보유한다.

당업자에게 공지된 방법을 이용하여 면역글로불린 분자 코딩서열, 적당한 전사 및 해독조절시그널을 보유한 발현벡터를 작제할 수 있다. 이들 방법에는 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성기술, 생체내 유전자조합이 포함된다. Sambrook등(1990, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) and Ausubel et al.(eds, 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY)이 제시한 기술을 참고한다.

발현벡터는 통상적인 기술로 숙주세포로 이전하고, 트랜스펙션된 세포는 통상적인 방법으로 배양하여 본 발명의 면역글로불린을 만든다.

본 발명의 재조합 항체를 발현하기 위하여 사용한 숙주세포는 대장균(*Escherichia coli*)과 같은 박테리아 세포, 또는 가금적 진핵세포, 특히 전체 재조합 면역글로불린분자의 발현을 위한 세포가 된다. 특히, 중국 햄스터 난소세포(CHO)와 같은 포유동물세포는 사람시토크로마바이러스의 주요 중간단계 초기유전자 프로모터 인자와 같은 벡터와 결합시키는데, 면역글로불린에 대한 유용한 발현계가 된다(Foecking et al., 198, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2).

다양한 숙주-발현벡터계를 사용하여 본 발명의 변형면역글로불린분자를 발현한다. 이런 숙주-발현계는 관심있는 코딩서열을 생산되고 연이어 정제되는 담체를 나타내지만, 또한 적당한 뉴클레오티드 코딩서열로 형질전환되거나 또는 트랜스펙션된 경우에 *in situ*에서 본 발명의 면역글로불린분자를 발현하는 세포를 나타내기도 한다. 이들에는 면역글로불린 코딩서열을 보유한 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현벡터에 의해 형질전환된 박테리아(*E. coli*, *B. subtilis*); 면역글로불린 코딩서열을 보유한 재조합 효모 발현벡터에 의해 형질전환된 효모(*Saccharomyces*, *Pichia*); 면역글로불린 코딩서열을 보유한 재조합 바이러스 발현벡터(예, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충세포; 재조합 바이러스 발현벡터(예, 카롤리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 또는 면역글로불린 코딩서열을 보유한 재조합 플라스미드 발현벡터(예, Ti 플라스미드)로 감염된 식물세포계; 또는 포유동물세포의 계통에서 유도한 프로모터(예, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스에서 유도한 프로모터(예, 아데노바이러스 후프로모터, 두진 바이러스 7.5K 프로모터)를 보유한 재조합 발현 구성체를 갖는 포유동물세포계(예, COS, CHO, BHK, 293, 3T3 세포)가 있다.

박테리아계에서, 다수의 발현벡터는 발현될 면역글로불린 분자에 대한 사용목적에 따라 우선적으로 선택된다. 가령, 면역글로불린 분자의 제약학적 조성물의 생산을 위해 이런 단백질을 대량으로 생산하는 경우, 쉽게 정제되는 융합 단백질산물의 고수준발현을 조절하는 벡터가 바람직하다. 이런 벡터에는 대장균 발현벡터 pUR278(Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791)을 예를 들 수 있는데, 여기서 면역글로불린 코딩

서열은 lac Z 코딩영역을 통해 개별로 벡터프레임으로 결합되어 융합 단백질이 만들어진다: PIN 벡터 (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509. pGEX 벡터를 사용하여 외래 폴리펩티드를 글루타티온 S-전이효소(GST)를 가진 융합 단백질로 발현한다. 일반적으로, 이런 융합 단백질은 수용성이고, 용해된 세포로부터 쉽게 정제할 수 있는데, 이때, 흡수하고 메트릭스 글루타티온-아가로즈 비드에 결합시키고 자유 글루타티온의 존재하에 용출과정을 거친다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 Xa 인자 프로테아제 절단부위를 포함하도록 고안하여, 클론된 표적유전자산물이 GST 부분에서 떨어지도록 한다.

곤충계에서, 오토그래파 칼리포르니카(Autographa californica) 핵 다면체 바이러스(AcNPV)를 벡터로 사용하여 외래 유전자를 발현시킨다. 바이러스는 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)에 키운다. 면역글로불린 코딩 서열은 바이러스의 비-필수 부위로 개별클론하고, AcNPV 프로모터(예, 다면체 프로모터)의 조절하에 둔다.

포유동물 세포에서, 다수의 바이러스-기초 발현계를 사용한다. 아데노바이러스를 발현벡터로 사용하는 경우, 관심있는 면역글로불린 코딩서열은 아데노바이러스 전사/해독 컨트롤 복합체(예, 후프로모터, 삼자리드서열)에 결합시킨다. 이 키메라 유전자는 시험관내 또는 생체내 재조합으로 이후 아데노바이러스 게놈에 삽입한다. 바이러스 게놈의 비-필수영역(예, E1 또는 E2 영역)에 삽입하면, 생존하고, 감염된 숙주에서 면역글로불린분자를 발현할 수 있는 재조합 바이러스가 만들어진다(Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). 특정 개시시그널은 삽입된 면역글로불린 코딩서열의 효율적인 해독을 위해 필요하다. 이들 시그널에는 ATG 개시코돈 및 인접서열이 포함된다. 또한 개시코돈은 원하는 코딩서열의 해독률과 보조를 맞추어 전체 삽입체의 해독이 일어나도록 한다. 이들 외인성 해독컨트롤 시그널은 몇 개시 코돈은 다양한 출처(자연, 인공)에서 얻을 수 있다. 발현의 효율은 적당한 전사강화인자, 전사종결체등의 삽입으로 강화할 수 있다(Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544 참조).

또한, 숙주세포계통은 삽입된 서열의 발현하고, 원하는 특정형식으로 유전자산물을 변형하고 조절하는 것으로 선택한다. 단백질산물의 이런 변형(예, 당부가) 및 가공(예, 절단)은 단백질의 기능에 중요하다. 상이한 숙주세포는 해독후 과정 및 단백질 및 유전자산물의 변형에 대한 특징적이고 특이적인 기작을 갖는다. 적당한 세포계 또는 숙주계를 선택하여 외래 발현단백질의 정확한 변형 및 가공을 가능하게 한다. 이런 목적을 위하여, 일차 전사체의 적절한 가공, 당부가, 유전자산물의 인산화를 위한 세포기작을 보유한 진핵숙주세포를 사용한다. 이런 포유동물숙주세포에는 CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38이 포함되나, 이들에 한정하지 않는다.

재조합 단백질의 장기간, 고-산출물의 생산을 위해, 적당한 발현이 선호된다. 가령, 안정적으로 면역글로불린 분자를 발현하는 세포계는 가공한다. 바이러스 기원의 복제를 보유한 발현벡터를 사용하기보다는 숙주세포는 적당한 발현조절인자(예, 프로모터, 증강체, 서열, 전사종결체, 폴리아데닐화 부위등) 및 선택성 마크로 조절한 DNA로 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA의 도입후, 가공한 세포는 완전배지에서 1-2 일 성장시키고, 이후 선택성 배지로 옮긴다. 재조합 플라스미드상의 선택성 마크는 선택성에 대한 저항력을 제공하고 세포가 안정적으로 플라스미드를 크로모솜으로 통합하게 하여 병소를 형성하게 하고, 상기 병소는 이후에 클론하고 세포계로 확대할 수 있다. 이 방법은 면역글로불린 분자를 발현하는 세포계를 가공하기 위하여 우선적으로 사용한다. 이렇게 가공된 세포계는 특히 면역글로불린 분자와 직간접적으로 상호작용하는 화합물의 선별 및 평가에 유용하다.

다수의 선별계를 사용하는데, 이들의 예로 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제(Wigler et al., 1977, Cell 11:223), 히포산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Szybalska & Szybalski, 192, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202), 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Lowy et al., 1980, Cell 22:817) 유전자는 각각 tk⁻, hgrpt⁻ 또는 aprt⁻ 세포에 사용할 수 있다. 또한, 대사길항물질 저항성은 다음 유전자들의 선별기초로 사용할 수 있다: 메토프렉세이트에 대한 저항성을 공여하는 경우, dhfr(Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); 미코피놀산에 대한 저항성을 공여하는 경우, gpt(Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); 아미노글리코시드 G-418에 대한 저항성을 공여하는 경우, neo(Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215). 사용할 수 있는 재조합 DNA 기술에 공지된 방법은 Ausubel et al.(eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1에서 제시한다.

다른 방법으로, 임의의 융합 단백질은 발현되는 융합단백질에 특이적인 항체를 사용하여 쉽게 정제한다. 가령, Janknecht등이 밝힌 시스템을 통해 사람 세포계에서 발현된 비-변성된 융합단백질의 쉽게 정제할 수 있다(Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897). 이 시스템에서, 관심있는 유전자는 우두 재조합 플라스미드로 소클론시켜 유전자의 개방 해독률이 6개의 히스티딘 잔기로 이루어진 아미노-말단태그에 해독융합하도록 한다. 상기 태그는 융합 단백질에 대한 결합도메인모체 역할을 한다. 재조합 우두 바이러스로 감염된 세포에서 얻은 추출물은 Ni²⁺ 니트릴로아세트산-아가로즈 칼럼으로 적하하고, 히스티딘-태그 단백질은 이미다졸-포함 버퍼로 선택적 용출한다.

면역글로불린 분자의 발현수준은 벡터증폭으로 증가시킬 수 있다(Bebbington and Hentschel, the Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning, Vol.3.(Academic Press, New York, 1987)참조). 면역글로불린을 발현하는 벡터계상의 마크가 증폭가능한 경우, 숙주 세포의 배양시 존재하는 억제물질의 수준증가로 의해 마크 유전자의 사본수가 증가한다. 증폭된 영역은 면역글로불린 유전자와 연관하기 때문에, 면역글로불린의 생산 또한 증가한다(Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

숙주세포는 본 발명의 두 개의 발현벡터, H 사슬 유도의 폴리펩티드를 인코딩한 제 1 벡터 및 L 사슬 유

도 폴리펩티드를 인코드한 제 2 서열로 공동트랜스펙션시킨다. 두 개의 벡터는 H 및 L 사슬 폴리펩티드의 동등하게 발현시키는 동일한 선택성 마크를 보유한다. 다른 방법으로, H 및 L 사슬 폴리펩티드를 모두 인코드한 단일벡터를 사용한다. 이런 경우에서, L 사슬은 H 사슬앞에 위치하여 독성 자유 H사슬의 과도하게 많아지는 것을 피한다(Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). H 및 L 사슬에 대한 코딩서열은 cDNA 또는 게놈 DNA로 이루어진다.

일단 본 발명의 변형면역글로불린이 재조합발현되면, 이것은 면역글로불린 정제를 위해 당분야에 공지된 임의의 방법으로 정제하는데, 이런 방법에는 크로마토그래피(예, 이온 교환, 친화도, 특히 단백질 A와 유사한 특정 항원에 대한 친화도, 칼럼크기 크로마토그래피), 원심분리, 용해도 차이 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준기술이 있다.

5.5. 치료요법적 용도의 입증

본 발명의 변형항체는 특정질환의 치료 또는 예방에서 다양한 효능으로 선별하고 분석할 수 있다.

먼저, 본 발명의 변형항체를 함유한 백신조성물의 면역능력은 백신면역화후 실험동물의 항-유전형반응을 모니터하여 결정할 수 있다. 체액반응의 발생은 전신적인 면역반응의 징후로 받아들인데, 이의 다른 요th, 특히 세포-매개의 면역은 질병으로부터의 보호에 중요하다. 실험동물에는 생쥐, 토끼, 침팬지, 종국적으로는 사람개체가 포함된다. 본 발명에서 만들어진 백신은 실험적으로 침팬지를 감염시키도록 만들 수 있다. 하지만, 침팬지는 보호 동물종이기 때문에, 침팬지 효능연구에 사용할 하나 또는 복수의 최적 면역글로불린 분자 또는 면역글로불린 분자의 최적화합물을 발견할 목적으로, 본 발명 백신에 대한 항체 반응은 먼저 다수의 더 작고 값싼 동물에 연구할 수 있다.

실험개체의 면역반응은 공지된 기술, 예를 들면, 효소-면역흡착법(ELISA), 면역블랏, 방사성면역침전, 또는 감염으로부터 보호 또는 면역화된 숙주에서 질병증상의 약독화를 사용하여, 항체에 대한 생성 면역형성의 반응성과 같은 다양한 방식으로 분석한다.

적당한 동물실험의 한 예로서, 본 발명의 백신조성물은 변형면역글로불린분자에 대한 항-유전형 반응의 유도능력을 토끼에서 시험한다. 가령, 수컷 특이적-병원균-무(無)(SPF) 어린 뉴질랜드 백색 어른 토끼를 사용한다. 토끼 실험그룹은 각각 백신효과량을 섭취하였다. 토끼 컨트를 그룹에 자연발생 항체를 함유한 백신의 1 mM Tris-HCl(pH 9.0)를 주사한다. 혈액샘플은 1주 또는 2주 단위로 토끼로부터 채취하고, 혈청은 변형면역글로불린에 대한 항-유전형 항체 및 방사성면역분석(Abbort Laboratories)을 사용하여 변형항체를 직접 유도된 항원에 특이적인 항-항-유전형항체에 대해 분석한다. 항-유전형 항체의 존재는 ELISA를 이용하여 분석한다. 토끼는 비근교계 성질로 인해 다양한 반응을 보이기 때문에, 생쥐에서 백신을 시험하는 것이 유용하다.

또한, 본 발명의 변형항체는 먼저 실험개체(동물 또는 사람)에 변형항체를 투여하고, 이후 주사된 변형된 항체에 대한 항-유전형 반응의 일부로서 만들어진 항-항-유전형 항체(즉, Ab3 항체)를 분리하여 시험한다. 분리된 Ab3은 이후 당분야에 공지된 임의의 면역분석으로 특정항원(예, 종양항원, 감염성 질병병인의 항원)에 대한 결합능력을 시험하였는데, 이런 면역분석의 예로는 방사성면역분석, ELISA, '샌드위치'면역분석, 겔 확산 침전반응, 면역확산분석, 웨스턴블랏, 침강반응, 응집반응분석, 보체고정분석, 면역형광분석, 단백질 A 분석, 면역전기영동 분석을 들 수 있지만, 이들 예에 한정하지 않는다.

변형항체가 암 또는 종양에 직접 투여되는 경우에, 분리된 Ab3의 암, 종양 또는 다른 신생종양 질병에 대한 치료효능은 환자로부터 암 또는 종양을 배양하고, 세포를 실험할 Ab3 항체와 접촉시키고, Ab3 항체와 접촉시킨 세포의 증식 또는 생장과 Ab3 항체와 접촉시키지 않은 세포의 증식 또는 생장을 비교하여 선별하고, 여기서 접촉시킨 세포의 훨씬 낮은 수준의 증식 또는 생장은 Ab3 항체(본 발명의 변형항체 면역화에 의해 유도됨)가 환자의 암치료에 효과적임을 암시한다. 당분야에 많은 표준분석을 이용하여 이러 생존 또는 생장을 평가하였다; 가령, 세포 증식은

³H-티미딘 삽입의 평가, 직접 세포계수, 프로토-종양유전자와 같은 공지된 유전자의 전사활성변화의 감지 또는 세포 사이클 마크로 평가할 수 있다; 세포 생존은 트리판 블루 염색으로 평가할 수 있고, 분화는 형태변화에 기초하여 평가할 수 있다. 변형된 항체가 감염성 질병병인의 항원에 대하여 직접 유도되는 경우, 분리된 Ab3은 특정 병원균에 대한 임의의 시험관내 활성검사에서 활성을 시험한다.

또한, 본 발명의 변형항체는 생체내에서 직접 시험한다. 본 발명의 치료약물의 효과를 모니터하기 위하여, 변형된 항체가 목표로 하는 항원의 수준은 치료 전, 동안, 후에 적당한 시간간격을 두고 측정한다. 항원양의 변화 또는 변화부재는 확인할 수 있고, 개체에 대한 치료효과와 연관한다.

특히, 암치료의 경우에, 항원의 혈청수준은 암(에 유방암)의 정도, 서투른 예후와 직접 상관관계를 갖는다. 일반적으로, 항원수준의 감소는 효과적인 치료와 연관한다.

변형항체가 감염성 질병병인의 항원을 목표로 하여 만들어지는 경우, 변형항체의 효능은 감염성 질환병인의 항원수준을 치료 전, 동안, 후에 적당한 시간간격을 두고 측정하여 모니터할 수 있는데, 여기서 항원수준의 감소 변형항원이 효과적임을 암시한다.

적절한 측면에서, 취할 수 있는 방법은 상이한 시점에서 항원의 수준을 결정하여 기저수준과 이들 수준을 비교하는 것이다. 기저 수준은 정상적인 질병없는 개체에서 존재하는 마크수준이 될 것이다; 치료전 존재수준, 질병의 호전동안 또는 안정기간동안. 이들 수준은 질병과정 또는 치료결과와 상관관계를 갖질 수 있다.

항원수준은 당분야에 공지된 임의의 방법으로 결정할 수 있다. 가령, 특정 항원은 웨스턴 블라딩 면역침강과 같은 공지된 면역진단방법으로 정량화할 수 있는, 상기 방법에서는 특정 항원에 대한 항체를 사용한다.

변형 면역글로불린에 대한 생체내 면역반응의 강도는 당분야에 공지된 임의의 방법으로 결정하는데, 이런 방법에는 지체성 초민감성 피부시험, 시험관내 세포용해 T-림프구의 활성분석이 포함되는데, 이들에 한정

하지 않는다.

지체성 초민감성 피부 시험은 항원에 대한 전체 면역능력 및 세포면역의 실험에서 매우 중요하다. 피부 시험에서 적당한 기술에서는 항원을 4℃에 멸균보관하고, 광을 차단하고, 사용하기직전 재구성해야 한다. 25- 또는 27-게이지 바늘을 이용해 피하가 아닌 경피로 항원을 투여한다. 항원의 경피투여 24시간, 48시간후, 가장 큰 홍진 및 경화를 자로 측정한다. 임의의 항원 또는 항원그룹에 대한 저활성은 유사한 환경에서 더 높은 농도의 항원실험 또는 중간단계 실험의 반복으로 확인한다.

세포용해 T-림프구활성을 시험하기 위하여, 원심분리 농도차 기술을 이용하여 면역화된 개체에서 분리한 T-림프구는 10% 태아 소 혈청을 함유한 3ml RPMI 배지에서, 변형항체가 목표로 하는 항원을 보유한 세포로 재자극한다. 몇몇 실험에서 33% 이차 혼성 림프구 배양상청액 또는 IL-2는 T 세포 성장인자로서 배양 배지에 포함된다. 면역화후 세포용해 T-림프구의 일차반응을 측정하기 위하여, 분리된 T 세포는 항원을 보유한 세포 유무하에 배양한다. 6일후, 배양물은 4시간 ⁵¹Cr-방출분석에서 세포독성에 대해 시험한다. 자발적인 표적의 ⁵¹Cr-방출은 면역화가 효과적일 경우 20% 미만 수준이 된다(Heike et al., J. Immunotherapy 15:15-174).

다른 측면에서, 변형 면역글로불린은 변형항체가 목표로 하는 항원과 관련된 특정 질병 또는 질환으로부터 호전 또는 회복에 대해 개체를 모니터링함으로써 효능을 시험한다. 변형항체가 종양 또는 암항원을 목표로 하는 경우, 특정 종양 또는 암의 진단은 암 또는 종양을 모니터링하기 위한 공지된 임의의 진단 또는 선별방법으로 추적한다. 가령, 암 또는 종양진전은 개체의 혈청에서 특정 암 또는 종양항원(또는 특정 종양 또는 암과 관련된 또 다른 항원)의 수준을 분석하여 또는 항원에 특이적인 표지된 항체를 주사하여 모니터링한다. 또한 컴퓨터 X선단층사진(CT) 스캔 또는 소노그래프와 같은 다른 화상기술을 이용하여 암 또는 종양의 진전을 모니터링한다. 생검을 또한 실시한다. 사람에서 이런 시험을 실시하기 전에, 변형면역글로불린의 효능검사는 특정 암 또는 종양의 동물모델에서 실시할 수 있다.

감염성 질병의 경우에, 변형된 항체의 효능은 변형항체를 개체(사람 개체 또는 동물 질병모델)에 투여하고, 이후 특정 감염성 질병병인 또는 특정감염성 질병의 증상을 모니터링하여 분석할 수 있다. 감염성 질병병인의 수준은 감염성 질병병인의 분석을 위한 당분야에 공지된 임의의 방법으로 결정하는데, 바이러스 또는 박테리아수준의 경우에, 바이러스 적정농도를 예로 들 수 있다. 감염성 질병병인의 수준 또한 변형면역글로불린이 표적으로 하는 항원 또는 감염성 질병병인의 또 다른 항원수준을 측정하여 결정한다. 감염성 질병병인 수준의 감소 또는 감염성 질병증상의 완화는 변형항체가 효과적임을 암시한다.

실시에

6. 실시예: 결장암에 대한 항-유전형 백신 유도물질

이 실시예는 단일클론 항체 Mab31.1(하이브리도마 분비 Mab31.1은 American Type Tissue Collection as accession No. HB12314에서 얻을 수 있다)에서 유도한 변형항체의 작제를 설명한다. Mab31.1은 사라 결장암(종)에 의해 발현된 항원을 인식한다. Mab31.1에 기초한 본 발명의 변형항체를 가공하여 H 및 L 사슬 변이영역의 시스템인 잔기를 알라닌으로 치환한다. 따라서, 생성된 변형 항체는 H 및 L 사슬 변이영역에서 사슬사이 이황화결합이 없다.

6.1. 변형항체의 작제

변형항체를 작제하는 방법은 H 및 L 사슬변이영역을 인코딩한 두 개의 가공유전자를 작제하는 것으로, 여기서 사슬사이 이황화결합에 중요한 것으로 알려진 특정 시스템인 잔기를 알라닌으로 변형한다. 알라닌 잔기는 Mab31.1에서 유도한 항체의 H 사슬변이영역의 22 및 92위치의 시스템인 잔기 또는 Mab31.1에서 유도한 항체의 L 사슬변이영역의 23 및 88 위치의 시스템인 잔기가 치환된 것이다. 이들 가공유전자를 작제하기 위하여, 올리고뉴클레오타이드 그룹은 조합하여(후술한 바와 같이), 일정영역을 제공하는 적당한 벡터로 삽입하였다.

사슬사이 이황화결합이 없는 CDR을 인코딩한 변이영역 유전자를 작제하기 위하여, 다음의 과정을 실시하였다.

먼저, 제 1 올리고뉴클레오타이드는 어닐링하여 정착성 두가닥 DNA 단편을 만든다(도10에서 도면제시, 단계 1). 특히, 20개 염기 중복 영역을 가진 서열에 상응하는 80개정도 염기길이의 올리고뉴클레오타이드는 GenoSys Biotech Inc.의 자동화기술을 이용하여 합성하였다. 이들 올리고뉴클레오타이드 각각의 특이서열은 도 9A 및 9B에 제시한다. 도9A는 2CAVHCOL1라고 하는 H 사슬 변이영역 유전자의 가공에 사용한 10개 올리고 그룹의 목록을 나타낸다. 2CAVHCOL1은 공통 H 사슬 변이유전자에 비교할 때 두 개의 시스템인 잔기가 없다. 도 9B는 2CAVLCOL1라고 하는 L사슬변이 영역유전자의 가공에 사용한 12개 올리고 그룹의 목록을 나타낸다. 2CAVLCOL1은 공통 L 사슬 변이유전자에 비교할 때 두 개의 시스템인 잔기가 없다. 원하는 유전자로 올리고를 결합하기 위하여, 10 내지 12 올리고 그룹은 후술한 바와 같이 결합하고 도 10에 제시하였는데, 이때, 도 10에서 지정한 1 내지 10개 올리고의 본질은 표5에 제시하였다. 결합하기에 앞서, 각 올리고뉴클레오타이드는 다음과 같이 5'인산화하였다: 25 μ l의 각 올리고는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제, 50mM ATP 존재하에서 37℃로 1시간동안 배양하였다. 반응은 70℃에서 5분동안 가열하여 중단시키고 이후 에탄올침전시켰다. 일단 인산화된 상보성 올리고뉴클레오타이드(올리고1 + 올리고10, 올리고2 + 올리고9, 올리고3 + 올리고8, 올리고4 + 올리고7, 올리고5 + 올리고6)(도 10)은 이후 멸균원심분리튜브에서 혼합하고 5분동안 65℃로 수조에서 튜브를 가열하여 어닐링하고 이후 30분동안 실온에서 냉각한다, 어닐링하면, 정착말단을 지닌 짧은 두 가닥 DNA 단편이 만들어진다.

그 다음, 정착성 두 가닥 DNA 단편은 가공된 변이영역 유전자가 조합될 때까지, 좀더 긴 가닥으로 결합한다(도10, 단계 2-4). 특히, 정착성 두 가닥 DNA 단편은 T4 DNA 리가아제, 10mM ATP 존재하에서 2시간동안 16℃로 유지한 수조에서 결합하였다. 어닐링된 올리고 1/10은 어닐링된 올리고 2/9와 혼합하고, 어닐링된 올리고 3/8은 어닐링된 올리고 4/7과 혼합하였다. 생성된 올리고는 올리고 1/10/2/9 및 올리고 3/8/4/7로 기록하였다. 그런후, 올리고 3/8/4/7은 올리고 5/6에 결합하였다. 생성된 올리고

3/8/4/7/5/6은 이후 올리고 1/10/2/9와 결합하여 전장변이영역 유전자를 만들었다.

다른 방법으로, 12 올리고 그룹을 사용하는 경우, 첨가의 순서는 다음과 같다: 1+12=1/12, 2+11=2/11, 3+10=3/10, 4+9=4/9, 5+8=5/8, 6+7=6/7, 1/12+2/11=1/12/1/11, 3/10+4/9=3/10/4/9, 5/8+6/7=5/8/6/7, 1/12/11+3/10/4/9=1/12/2/11/3/10/4/9, 1/12/2/11/3/10/4/9+5/8/6/7=전장 변이영역 유전자. 가공유전자의 작제에 사용한 올리고뉴클레오타이드의 이름은 표5에 제시한다. 변형된 H 사슬변이영역은 2CAVHCOL10이라 하였다. 변형된 L 사슬변이영역은 2CAVLCOL10이라 하였다.

생성된 변형영역 유전자는 이후 겔전기영동으로 정제하였다. 결합되지 않은 과도한 올리고 및 다른 불완전 DNA 단편을 제거하기 위하여, 결합된 산물은 2시간동안 직류 100V에서 1% 저용해 아가로즈 겔에 걸었다. 전장 DNA 산물을 보유한 중요 밴드는 절단하여 평균 1.5ml 원심분리튜브에 위치시켰다. 아가로즈로부터 DNA를 방출시키기 위하여, 겔 조각은 40°C에서 f3-아가라제 I로 절단하였다. DNA는 -20°C에서 1시간동안 0.3M NaOAc 및 이소프로판올로 침전시켜 수거하고, 이후 15분동안 12,000rpm으로 원심분리하였다. 정제된 DNA 펄렛은 50µl의 TE 버퍼(pH 8.0)에 재현탁시켰다. 가공된 변이영역 유전자는 이후 PCR로 증폭하였다. 특히, 100ng의 가공된 변이영역 유전자는 버퍼에서 25mM dNTPs, 200ng 프라이머, 5U 고순도 열안정성 Pfu DNA 폴리메라제와 혼합하였다. 생성된 PCR 산물은 1% 아가로즈 겔에서 분석하였다.

가공 변이영역 유전자에 해당하는 각 정제된 DNA는 연속적으로 pUC 19 박테리아 벡터에 삽입하였다. pUC19는 2686 염기쌍이고, lacZ 및 Amp 선택마크상에 54개 염기쌍 폴리링크를 보유한 다수의 대장균(E. coli) 플라스미드 벡터다. 가공된 변이영역 유전자의 삽입용 벡터를 만들기 위하여, 10µg의 pUC19는 3시간동안 37°C에서 Hinc II (50U)로 선형화시켜, 불린트 말단서열 5'GTC를 가진 벡터를 만들었다. 자가-결합을 예방하기 위하여, 선형 벡터 DNA는 1시간동안 37°C에서 25U의 소 내장 알칼린 포스파타제(CIP)로 탈인산화시켰다. 가공된 변이영역 유전자를 pUC19 벡터로 삽입하기 위하여, 대략 0.5µg의 탈인산화된 선형 벡터 DNA는 T4 DNA 리가아제(1000U)의 존재하에서 3µg의 인산화된 변이영역 유전자와 혼합하고, 12시간동안 16°C에서 배양하였다.

가공된 변이영역 유전자를 보유한 박테리아 벡터를 이후 사용하여 박테리아 세포를 형질전환시켰다. 특히, 새로 만든 강력한 DH-5α 세포, 50µl는 가공된 변이영역 유전자를 보유한 1µg의 pUC19와 혼합하고 에렉트로포레이션 큐벳트(0.2cm gap; Bio-Rad)로 옮겼다. 각 큐벳트에 에렉트로포레이션 장치((Bio-Rad Gene Pulser)를 이용해 2.5kV/200ohm/25µF로 펄스를 보냈다. 이후, 1ml의 SOC 배지를 각 큐벳트에 첨가하고, 세포는 원심분리 튜브에서 1시간동안 37°C에서 회수하였다. 각 형질전환세포에서 일정부분을 떼어내어 1:100으로 희석하고, 이후 앰피실린(Amp 40µg/ml)을 함유한 LB 평판에 100µl 도말하였다. 평판은 Amp 마크의 존재로 인해 37°C에서 하룻밤동안 배양하였다. pUC19벡터를 보유한 형질전환체만이 LB/Amp 평판에서 성장한다.

단일형질전환체 집락을 선택하고, 3ml LB/amp 멸균 유리튜브에서 하룻밤동안 배양하면서, 37°C에서 연속 진탕하였다. 플라스미드 DNA는 Easy Prep 칼럼(Pharmacia Biotech)을 사용하여 분리하고, 100µl의 TE 버퍼(pH7.5)에서 현탁하였다. pUC19상에 유전자삽입의 존재를 확인하기 위하여, 각 집락에서 얻은 25µl의 플라스미드 DNA는 제한 효소로 1시간동안 37°C에서 절단하고, 1% 아가로즈 겔에서 분석하였다. 이런 방법으로, 플라스미드 DNA 유전자 삽입체는 제한 위치(5'..GTCGAC..3')의 상실로 인해 효소 절단에 저항성을 나타내고 닫힌 원형(CC) DNA로 되지만, 삽입없는 플라스미드는 절단되고, 겔상에 선형(L) 두 가닥 DNA 단편이 된다.

가공된 변이영역 유전자의 정확한 유전자 서열을 확인하고, 작제과정동안 이루어진 원하지 않는 돌연변이 가능성을 없애기 위하여, DNA 서열화는 자동화 ABI 377 DNA 서열화 장치에서, 상기 클론에 대해 M13/pUC 역상 프라이머(5' AACAGCTATGACCATG3')를 사용하고, 또한 PCR 유전자 산물은 5'말단 20염기 쌍 프라이머(5' GAATT CATGGCTTG GGTGTG 3')를 사용하여 실시한다.

표 5

Mab 31.1에서 나온 CDR을 보유한 변형항체를 인코딩한 유전자의 작제

2CAVHC	Oligo1	Oligo2	Oligo3	Oligo4	Oligo5	Oligo	Oligo7	Oligo8	Oligo9	Oligo10
OLI	VHC1	VHC2	VHC3	VHC4	VHC5	VHC	VHC7	VHC8	VHC9	VHC10
2CAVLC	VLC1	VLC2	VLC3	VLC4	VLC5	VLC	VLC7	VLC8	VLC9	VLC10
OLI										

6.3. 포유동물 발현벡터로의 가공된 변이영역 유전자의 삽입

완전 항체 L 사슬은 변이영역 및 일정영역 모두를 보유한다. 완전항체 H 사슬은 변이영역, 일정영역, 힌지(hinge) 영역을 보유한다. 변형 변이영역 유전자 2CAVHCOL1 또는 2CAVLCOL1은 적당한 일정영역을 보유한 벡터로 삽입하였다. L 사슬에 시스테인 잔기가 결핍된 가공된 변이영역 유전자는 pMRRO10.1 벡터로 삽입하였다(도 6A). pMRRO10.1 벡터는 사람 Kappa L 사슬 일정영역을 보유했다. 가공된 L 사슬변이영역의 이 벡터로의 삽입에서 완전 L 사슬서열이 만들어졌다. 다른 방법으로, H 사슬상의 시스테인 잔기가 결핍된 가공된 변이영역 유전자는 pGAMMA1 벡터로 삽입하였다(도 6B). The pGAMMA1 벡터는 사람 및 IgG1 일정영역, 힌지 영역서열을 보유했다. 가공된 H 사슬변이영역 유전자의 이 벡터로의 삽입에서 완전 H 사슬 서열이 만들어졌다.

H 사슬 및 L 사슬 유전자로 이루어진 포유동물 벡터를 가공하기 위하여, 완전 L 사슬 서열 및 완전 H 사슬 서열은 포유동물 발현벡터 pNEPuDGV로 삽입하였다(도6C)(Bebington, C.R., 1991, In METHODS: A

Companion to Methods in Enzymology, vol.2, pp. 136-145). 생성된 벡터는 변형항체의 H 사슬 및 L 사슬 모두를 인코딩한다.

6.4. 포유동물 세포에서 인공 변형항체의 발현

조합된 항체의 생산을 검사하기 위하여, 포유동물 발현 벡터는 COS 세포로 트랜스펙션시켰다. COS 세포 (아프리카 그린 원숭이 신장세포계, CV-1, 기원-결핍 SV40 바이러스로 형질전환됨)는 인공 항체의 단기간 일시발현을 위해 사용하는데, 그 이유는 이들이 SV40 기원의 복제를 보유한 원형 플라스미드를 다수의 사본으로 복제할 수 있기 때문이다. 항체 발현 벡터는 COS7 세포(American Type Culture Collection)로 이 전시켰다. 옮겨진 벡터는 돌베코(Dulbecco) 변형 이이글 배지에서 성장시키고, 칼슘침전을 이용하여 발현 벡터로 트랜스펙션시켰다(Sullivan et al., FEBS Lett. 285:120-123, 1991). 트랜스펙션된 세포는 상청액 수거 72시간후에 배양하였다. 트랜스펙션된 COS의 상청액은 조합된 IgG에 대해 ELISA 방법으로 분석하였다. ELISA에는 샘플 및 기준물의 96-웰 평판으로의 포획이 포함되고, 상기 평판은 항-사람 IgG Fc 로 피막된 것이다. 결합된 조합IgG는 말 라디시 페폭시타제(HRP) 및 테트라메틸벤지딘 기질(TMB)에 결합된 항-사람 Kappa 사슬로 검출하였다. 색깔 변화는 샘플상에 존재하는 조합항체의 양에 비례하였다.

6.5. 사람 결장암(종)세포에 면역특이적으로 결합하는 변형항체 및 이들 세포에 의해 생성된 항원

변형항체는 섹션 6.4에서 지적한 바와 같이 발현하고 분리하였다. 결합능력 및 특이도는 이후 LS-174T 세포 WiDR 세포(사람 결장암 세포계) 및 이들 세포에서 유도한 항원을 이용하여 분석하였다.

MA31.1 결합 특이성 및 결합능력을 검사하기 위하여, 닷 블랏 분석을 실시하였다(도11). LS-174T 세포에 얻은 막 조성물은 Bio-Blot 장치(Bio-Rad)를 이용하여 니트로셀룰로즈 막에 도포하였다. 웰은 짜기 우유를 이용하여 비-특이적 결합을 봉쇄하였다. Mab31.1에서 유도한 생리소형화 항체는 모든 웰에서 배양하였다. 0.003 내지 20nM 농도의 비표지된 항체는 이후 니트로셀룰로즈 막에 도포하고 배양하였다. 결합되지 않은 항체는 세척하여 막으로부터 제거하고, 제 2 항체인 알칼린 포스파타제 표지된 항-사람 IgG를 첨가하였다. 최종적으로, 알칼린 포스파타제 기질을 첨가하면 짙은 자줏빛 침전이 만들어지는데, 이것은 결합된 표지항체의 존재를 암시한다. 도11은 닷 블랏 분석의 결과를 제공한다. 수치는 표지된 항체가 LS-174T 세포에 결합함을 입증하였다. 또한, 비표지된 항체는 생리소형화 항체와 경쟁하는데, 이것은 Mab31.1에서 유도한 항체의 종양 세포 항원에 대한 특이성을 암시한다.

6.6. 항-유전형 반응

변형항체의 LS-174T 세포에 대한 결합효과는 경쟁 결합 분석에서 검사하였다. LS-174T 세포는 사람 결장암(종)세포인데, 이것은 Mab31.1 항체에 의해 인식된 항체를 발현한다. Mab31.1항체의 CDR중 한 서열을 보유한 펩티드를 만들었다. 이들 펩티드, 변형항체, Mab31.1에서 유도한 컨트롤 항체는 생쥐에 투여하여 Mab31.1의 CDR에 반한 항혈청 및 항체를 만들었다. 생쥐의 혈액샘플은 주사후 2주 및 42에 뽑았다. 면역화된 생쥐의 항혈청을 결합경쟁분석에 사용하였다(도 12A, B).

항혈청 및 생리소형화 항체는 LS-174T 세포에 결합할 수 있는 능력에 대해 분석하였다. 도 12A, B에서 보인 바와 같이, CDR3, CDR4 펩티드에 대해 생성된 항혈청은 LS-174T 세포에 결합하는 컨트롤 항체(Mab31.1에서 유도한 항체)와 격렬한 경쟁을 벌였다. CDR1, CDR2에 대해 생성된 항혈청 또한 LS-174T 세포에 결합하는 컨트롤 항체와 상당한 경쟁을 벌였다(도 12B). 또한, 2CAVHCOL1, 2CAVLCOL1 항체(즉, 변이영역에 시스테인이 알라닌으로 변환된 항체)를 주사한 쥐의 항혈청은 Mab31.1로부터 유도한 항체를 주사한 생쥐의 항혈청보다는 더 효과적으로 Mab31.1로부터 유도한 생리소형화 항체와 경쟁하였다. 이 결과에서, 변이영역에서 시스테인이 알라닌으로 변환된 항체를 투여하면, 변이영역에 사슬-사이 이황화결합을 지닌 항체보다 더 효과적으로, 결장암(종)세포 항원을 인식하는 항-유전형 항체를 유도할 수 있다는 것을 알 수 있다.

표 6

Mab 31.1 CDR 서열로부터 유도한 비오틴-표지 펩티드

펩티드 ID 서열

COL311 L1 비오틴-N-Thr-Ala-Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Ser-Asn-Asp-Val-Ala

COL311 L2 비오틴-N-Ile-Tyr-Tyr-Ala-Ser-Asn-Arg-Tyr-Thr

COL311 L3 비오틴-N-Phe-Ala-Gln-Gln-Asp-Tyr-Ser-Ser-Pro-Leu-Thr

COL311 H1 비오틴-N-Phe-Thr-Asn-Tyr-Gly-Met-Asn

COL311H2 비오틴-N-Ala-Gly-Trp-Ile-Asn-Thr-Tyr-Thr-Gly-Glu-Pro-Thr-Tyr-

Ala-Asp-Asp-Phe-Lys-Gly

COL311 H3 비오틴-N-Ala-Arg-Ala-Tyr-Tyr-Gly-Lys-Tyr-Phe-Asp-Tyr

실시에 7: HMF-1 서열을 보유한 인공 변형항체의 생산

면역특이적으로 HMF-1 항체에 결합하는 항-유전형 항체를 작제하였다. HMF-1는 다형성 상피 무친(PEM)에 결합하는 것으로 공지된 항체다(Stewart et al., 1990, J Clin Oncol 8:1941-50; Kosmas et al., 1994, Cancer 73:3000-3010). ProAspThrArgPro서열을 가진 PEM의 항원성 결정부를 본 발명의 방법으로 변형사슬영역으로 삽입하였다. 이 짧은 서열은 사람 다형성 상피 무친의 고도 면역원성 영역이다(Gendler et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:12820-12823). HMF-1의 잔기 27A-27E(SerLeuLeuTyrSer)(표 6)는 섹션6에서 밝힌 올리고뉴클레오티드 방법을 이용하여 ProAspThrArgPro로 치환하였다(도10). HMF-1에 면역특이적으로 결합하는 항-유전형 인공 HMF-1 항체는 HMF-1의 L 및 H 사슬의 변이영역의 공지된

서열을 이용하여 만들었다. 올리고는 다음과 같은 순서로 첨가하였다: 1+8=1/8, 2+7=2/7, 3+6=3/6, 4+5=4/5, 1/8+2/7=1/8/2/7, 3/6+4/5=3/6/4/5, 1/8/2/7+3/6/4/5=1/8/2/7/3/6/4/5. 표7은 HMFG-1과 다양한 공통 CDR 서열사이의 서열비교를 보여준다. HMFG-1 및 관련 단클론항체에 관한 정보는 WO 09/05142(Imperial Cancer Research Technology, Ltd)에서 제시하며, 면역화된 HMFG-1은 WO 92/04380(Unilever)에서 제시한다.

폴리메라제 연속반응(PCR)을 사용하여 조합된 서열(도13)을 증폭하였다. HMFG-1를 인코딩한 뉴클레오티드 서열을 보유하도록 작제한 가공 변이영역은 도13에서 보여준다. 가공된 변이영역 유전자는 pNEFuDGV 벡터와 같은 항체생산에 적당한 벡터로 삽입하였다(섹션 6). 가공된 유전자를 작제하는 다른 방법을 사용할 수 있는데, 이런 방법들은 Jayaraman et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17:4403; Sandhu et al., 1992, BioTechniques 12:14; Barnett and Erfie, 1990, H. Nucleic Acids Res 18:3094; Ciccarelli et al., 1991, Nucleic Acids Res 19:6007; Michaels et al., 1992, BioTechniques 12:45에서 제시하고 있지만, 이들에 한정하지 않는다.

표 7

HMFG-1 항체와 다양한 공돌 CDR 서열사이의 서열 비교

VH1 CDRI 서열	31	32	33	34	35	35A	35B
Human I	Ser	Tyr	Ala	Ile	Ser		
Human II	Ser	Tyr	Ser/Tyr	Trp	Ser	Trp	Asn
Human III	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser		
Mouse IA	Ser	Gly	Tyr	Trp	Asn	Asn	Ser
Mouse IB	Ser	Tyr	Gly	Val	His	Val	Ser
Mouse IIA	Asp/Ser	Tyr	Tyr	Met	Asn	Asn	
Mouse IIB	Ser	Tyr	Trp	Met	His		
Mouse IIC	Asp/Ser	Thr	Tyr	Met	His		
Mouse IIIA	Asp/Ser	Phe/Tyr	Tyr	Met	Glu		
Mouse IIIB	Arg	Tyr	Trp	Met	Ser		
Mouse IIIC	Am	Tyr	Trp	Met	Asn		
Mouse IIID	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser		
Mouse VA	Ser	Tyr	Gly	Ile	Asn		
Mouse VB	Ser	Tyr	Gly	Leu	Tyr		
HMFG-1	Ala	Tyr	Trp	Ile	Glu		

서열
장기

VH1 CDR2

Human I	50	Tyr	51	Ile	52	Asn	52A	Pro	52B	Tyr	52C	Ala	53	Gly	54	Asn	55	Gly	56	Asp	57	Thr	58	Asn	59	Tyr	60	Ala	61	Gln	62	Lys	63	Phe	64	Gln	65	Gly
Human II	Arg	Ile	Ile	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Arg	Lys	Thr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Asp/Asn	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Asn	Pro	Asp	Ser	Ser	Leu	Phe	Leu	Ser	Gly	
Human III	Val	Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	+	Gly	+	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Asn	Pro	Asp	Ser	Ser	Leu	Val	Lys	Gly		
Mouse IA	Tyr	Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	+	Ser	+	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Asn	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Leu	Leu	Lys	Ser		
Mouse IB	Val	Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	+	Gly	+	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Asn	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Leu	Leu	Met	Ser		
Mouse IIA	Asp	Ile	Ile	Asn	Asp	Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Gly	Asn	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Ser	Ser	Tyr	Asn	Asn	Gln	Gln	Lys	Lys	Phe	Phe	Lys	Gly	Ser		
Mouse IIB	Arg	Ile	Ile	Asp	Asp	Pro	Pro	Asn	Pro	Gly	Asn	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Lys	Lys	Tyr	Asn	Asn	Glu	Glu	Lys	Lys	Phe	Phe	Lys	Ser	Ser		
Mouse IIC	Arg	Ile	Ile	Asp	Asp	Pro	Pro	Asn	Pro	Gly	Asn	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Lys	Lys	Tyr	Asn	Asn	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Val	Lys	Gly	Gly	
Mouse IIID	Ala	Ser	Ser	Arg	Arg	Asn	Asn	Asn	Asn	Lys	Ala	Asn	Asn	Ala	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Val	Val	Lys	Gly	Gly
Mouse VA	Glu	Ile	Ile	Asn	Asn	Pro	Pro	Pro	Pro	Lys	Ala	Asp	Asp	Asp	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Thr	Ala	Glu	Glu	Ser	Ser	Leu	Leu	Lys	Lys	Asp	
Mouse VB	Tyr	Ile	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Pro	Asn	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Gln	Gln	Lys	Lys	Phe	Phe	Lys	Gly	Gly	
HMFG-1	Glu	Ile	Ile	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Asn	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Asn	Asn	Asn	Ser	Ser	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Asn	Glu	Glu	Lys	Lys	Phe	Phe	Lys	Gly	Gly		

서열
장기

VH1 CDR3

Human I	95	Ala	96	Pro	97	Gly	98	Tyr	99	Gly	100	Ser	100A	Gly	100B	Gly	100C	Gly	100D	Cys	100E	Tyr	100F	Arg	100G	Gly	100H	Asp	100I	Tyr	100J	+	100K	Phe	101	Asp	102	Tyr	
Human II	Glu	Leu	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Tyr	Tyr	+	+	Gly	Gly	Asp	Asp	Asp	+	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Human III	+	Arg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mouse IA	Gly	Arg	Tyr	Gly	Arg	Tyr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr																					
Mouse IB	Asp	Arg	Gly	Arg	Tyr	Gly	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
Mouse IIA	Gly	+	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr										

Mouse IIB	95	Tyr	96	Tyr	97	Gly	98	Gly	99	Gly	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I	100J	100K	101	102
Mouse IIC		Gly	Tyr	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Tyr	+	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr							
Mouse IIIA		Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Pro	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
Mouse IIIB		Leu	Gly	Ser	Phe	Gly	Gly	Ser	Ser	+	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr							
Mouse IIIC		Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Arg	Arg	Ser	Ala	Pro	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Ala	Tyr
Mouse IIID		Gly	Gly	Tyr	Leu	+	Gly	Ser	Ala	Pro	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Met	Asp	Tyr						
Mouse VA		Ser	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	+	Phe	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
Mouse VB		Arg	Val	Ile	Ser	Arg	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Tyr	+	Phe	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Gly
HMFG-1		Ser	Tyr	Asp	Phe	Ala	Trp	Ala	Trp	Ala	Trp	Phe	Phe									Ala	Tyr	

VL CDRI	24	Arg	25	Ala	26	Ser	27	Gln	27A	Ser	27B	Leu	27C	Val	27D	+	27E	+	27F	+	28	Ser	29	Ile	30	Ser	31	Asn/Ser	32	Tyr	33	Leu	34	Ala	
Human kappa I		Arg	Ala	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Val	Leu	Val	His	Ser	Ser	Asp	Val	Asp	Ile	Gly	Ser	Ser	Asn/Asp	Asn/Thr	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala		
Human kappa II		Arg	Ser	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	His	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn/Asp	Asn/Thr	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala		
Human kappa III		Arg	Ala	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	His	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala		
Human kappa IV		Lys	Ser	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	His	Ser	Ser	Asn	Tyr	Asn	Gln	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala		
Mouse kappa I		Lys	Ser	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	His	Ser	Ser	Asn	Tyr	Asn	Gln	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala		
Mouse kappa II		Arg	Ser	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	His	Ser	Ser	Asn	Tyr	Asn	Gln	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala		
Mouse kappa III		Arg	Ser	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	His	Ser	Ser	Asn	Tyr	Asn	Gln	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala		
Mouse kappa IV		Arg	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Phe	Tyr	Met	Met	His	His	
Mouse kappa V		Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Tyr	Leu	Leu	Asn	Asn	His	His
Mouse kappa VI		Arg	Ala	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Tyr	Leu	Leu	Asn	Asn	His	His
Mouse kappa VII		Ser	Ala	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Gly	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Tyr	Leu	Leu	Asn	Asn	His	His
HMFG-1		Lys	Ser	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Asn	Gln	Lys	Lys	Lys	Lys	Ile	Ile	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala

VL CDR2 서열

장기

Human kappa I	50	51	52	53	54	55	56
Human kappa II	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
Human kappa III	Leu	Val	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser
Human kappa IV	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr
Mouse kappa I	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser
Mouse kappa II	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser
Mouse kappa III	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
Mouse kappa IV	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
Mouse kappa V	Arg	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
Mouse kappa VI	Tyr	Ala	Ser	Arg	Leu	His	Ser
Mouse kappa VII	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser
HMFG-1	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser

VL CDR3 서열

장기

Human kappa I	89	90	91	92	93	94	95	95A	95B	95C	95D	95E	95F	96	97
Human kappa II	Gln	Gln	Tyr	+	Ser	Leu	Leu	Pro	Glu	Pro	Pro	Pro	Pro	Trp	Thr
Human kappa III	Met	Gln	Ala	Leu	Gln	+	Pro	Arg	+	Pro	Pro	Pro	Leu	+	Thr
Human kappa IV	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	+	Pro	Pro	Pro	Leu	+	Thr
Mouse kappa I	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Leu	+	Thr
Mouse kappa II	Phe	Gln	Asp	Tyr	Ser	Val	Tyr	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Tyr	Pro	Thr
Mouse kappa III	Gln	Gln	Ser	Asn	Glu	Asp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Trp	Pro	Thr
Mouse kappa IV	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	+	Gly	Pro	Pro	Pro	Leu	Arg	Thr
Mouse kappa V	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Thr
Mouse kappa VI	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Pro	Met	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Thr
Mouse kappa VII	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Thr

97	Thr	Thr
96	Tyr	Arg
95F		
95E		
95D		
95C		
95B		
95A		
95	Ala	Pro
94	Phe	Tyr
93	Glu	Arg
92	Asp	Tyr
91	Tyr	Tyr
90	Gln	Gln
89	Leu	Gln
상기		
Mouse kappa VII		
HMFg-1		

본 발명은 이 글에서 제시한 특정 구체예로 범위를 한정하지 않는다. 실제로, 이 글에서 제시한 것들을 비롯하여 다양한 본 발명의 변형은 앞서 밝힌 명세서와 첨부한 도면을 보면 당업자에게 명확한 것이다. 이런 변형은 아래의 청구항 범위에 속한다.

이 글에서 인용한 다양한 자료는 여기에 순전히 참고문헌으로 한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

항-유전형반응을 유도하기 위한 제 1 면역글로불린 분자의 총분양과 제약학적으로 수용가능한 담체로 이루어진 백신조성물에 있어서, 상기 제 1 면역글로불린 분자는 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자와 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환은 하나 또는

복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 항원은 종양항원인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 항원은 암항원인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 항원은 다형성 내피 무친(mucin) 항원인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 항원은 사람 결장암-관련 단백질항원인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 6

제 3항에 있어서, 항원은 사람 결장암-관련 탄수화물항원인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 변이영역은 L(light)사슬 변이영역이고, SH기를 갖지 않는 아미노산 잔기는 제 2 면역글로불린 분자의 L사슬 변이영역의 23 또는 88 위치에 해당하는 위치에 존재하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 변이영역은 H(heavy)사슬 변이영역이고, SH기를 갖지 않는 아미노산 잔기는 제 2 면역글로불린 분자의 H사슬 변이영역의 22 또는 92 위치에 해당하는 위치에 존재하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 9

제 1항, 7항 또는 8항에 있어서, SH기를 갖지 않는 아미노산 잔기는 알라닌인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 제 2 면역글로불린 분자는 Mab 31.1, Mab 33.28 또는 Mab HMF-10이고, 하나 또는 복수아미노산 치환에는 L사슬 변이영역의 23 또는 88 위치에서 알라닌으로의 치환이 포함되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 제 2 면역글로불린 분자는 Mab 31.1, Mab 33.28 또는 Mab HMF-10이고, 하나 또는 복수아미노산 치환에는 H사슬 변이영역의 22 또는 92 위치에서 알라닌으로의 치환이 포함되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 12

제 3항에 있어서, 항원은 사람 유지방 구체 항원인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 13

제 3항에 있어서, 항원은 유방, 난소, 자궁, 전립선, 방광, 폐, 피부, 결장, 체장, 위장관, B 세포 또는 T 세포의 암항원인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 14

제 3항에 있어서, 항원은 KS 1/4 범-암종항원, 난소 암종항원, 전립선산 인산염, 전립선 특이적 항원, 흑색종-관련 항원 P97, 흑색종 항원 GP75, 고분자량 흑색종 항원, 전립선 특이적 막항원, 태아성 암종항원, 다형성 내피 무친 항원, 사람 유지방 구체항원, 결장직장종양-관련 항원 TAG-72, C017-1A, GICA 19-9, CTA-1, LEA, 벌키트(Burkitt) 림프종 항원-38.13, CD19, 사람 B-림프종 항원-CD20, CD33, 강글리오시드 GD2, 강글리오시드 GD3, 강글리오시드 GM2, 강글리오시드GM3, 종양-특이적 이식형 세포-표면항원, 신생종양 항원-알파-태아단백질 L6, 사람 폐 암종항원 L20, 사람 백혈병 T 세포항원-GP37, 신당단백질, 스피고지질, EGFR, HER2 항원, 다형성 내피 무친, 악성 사람 림프구 항원-AP0-1, 항원 M18, M39, SSEA-1, VEP8, VEP9, My1, VIM-D5, D56-22, TRA-1-85, C14, F3, AH6, Y 합텐, Le^y, TL5, FC10.2, 위 선암종항원, CO-514, NS-10, CO-43, MH2, 결장암에서 발견된 19.9, 위암 무친, T5A7, R24, 4.2, GP3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, G_{p2}, M1:22:25:8, SSEA-3, SSEA-4, T-세포 수용체 유도펩티드에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 15

제 1항에 있어서, 항원은 감염성 질병병인의 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 항원은 인플루엔자바이러스 헤마글루티닌, 사람 호흡기 합포체성 바이러스 G 당단백질, 덩그바이러스의 심부 단백질, 덩그바이러스의 모체 단백질, 홍역바이러스 헤마글루티닌, 단수포진바이러스 2형 당단백질 gB, 폴리오바이러스 1 VP1, HIV 1의 외피 당단백질, B형 간염 표면항원, 디프테리아 독소, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 24M 에피토프, 고노코커스 필린(*Gonococcal pilin*), 슈도라비즈(*Pseudorabies*) 바이러스 g50, 슈도라비즈 바이러스 당단백질 H, 슈도라비즈 바이러스 당단백질 E, 전파가능 위장염 당단백질 195, 전파가능 위장염 모체단백질, 돼지 로타바이러스 당단백질 38, 돼지 파르보바이러스 캡시드 단백질, 설푸릴나 히도디센테리아(*Serpulina hydodysenteriae*)보호 항원, 소 바이러스성 설사 당단백질 55, 뉴캐슬 질한 바이러스 헤마글루티닌-뉴우라미니다제, 돼지 감기 헤마글루티닌, 돼지 감기 뉴우라미니다제, 감염성 소 비강기관염 바이러스 당단백질 E, 감염성 후두기관염 바이러스 당단백질 G 또는 당단백질 I, 라 크로제(*La Crosse*)바이러스의 당단백질, 태아소 설사 바이러스, B형 간염바이러스 심부 단백질, B형 간염바이러스 표면항원, 말 인플루엔자 바이러스 A형/알래스카 91 뉴우라미니다제, 말 인플루엔자 바이러스 A형/마이애미 63 뉴우라미니다제, 말 인플루엔자 바이러스 A형/켄터키 81 뉴우라미니다제, 말 헤르페스바이러스 1형 당단백질 B, 말 헤르페스바이러스 1형 당단백질 D, 소 호흡기 합포체성 바이러스 부착단백질, 소 호흡기 합포체성 바이러스 융합단백질, 소 호흡기 합포체성 바이러스 뉴글레오캡시드 단백질, 소 파라인플루엔자 바이러스 3형 융합 단백질, 소 파라인플루엔자 바이러스 3형 헤마글루티닌 뉴우라미니다제, 소 바이러스성 설사 바이러스 당단백질 48, 소 설사바이러스 당단백질 53에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 17

제 1항에 있어서, 항원은 감염성 질병병인에 대한 세포수용체인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서, 세포수용체는 LPV 수용체, 아데닐에이트 사일클라제, BDV 표면 당단백질, N-아세틸-9-O-아세틸뉴라민산 수용체, CD4+, 고도 황산염화형 헤파린 황산염, p65, Gal 알파 1-4-Gal-포함 등수용체, CD16b, 인테그린 VIM-2 수용체, EV 수용체, CD14, 당접합 수용체, 알파/베타 T-세포 수용체, 부식-가속화 인자 수용체, 세포외 외피 당단백질 수용체, 면역글로블린 Fc 수용체 팩스바이러스 M-77, GALV 수용체, CD14 수용체, 루이스(b) 혈액그룹항원 수용체, T-세포 수용체, 헤파린 황산염 당아미노글리칸 수용체, 섬유아세포 성장인자 수용체, CD11a, CD2, G-단백질 결합 수용체, CD4, 헤파린 황산염 프로테오글리칸, 아빅신 11, CD13(아미노펩티다제 N), 사람 아미노펩티다제 N 수용체, 헤마글루티닌 수용체, CR3 수용체, 단백질 키나아제 수용체, 갈락토즈 N-아세틸갈락토사민-저해성 렉틴 수용체, 케모킨 수용체, 아빅신 1, actA 단백질, CD46 수용체, 메닝고코커스 독성 관련 opa 수용체, CD46 수용체, 태아성 암종항원 페밀리 수용체, 태아성 암종항원 페밀리 Bg1a 수용체, 감마 인터페론 수용체, 당단백질 gp70, rmc-1 수용체, 사람 인테그린 수용체 알파 v 베타 3, 헤파린 황산염 플로테오글리칸 수용체, CD66 수용체, 인테그린 수용체, 막 보조인자 단백질, CD46, GM1, GM2, GM3, CD3, 세라미드, 헤마글루티닌-뉴우라미니다제 단백질, 적혈구 P 항원 수용체, CD36 수용체, 글리코포린 A 수용체, 인터페론 감마 수용체, KDE1 수용체, 정막 호밍 알파4베타7 수용체, 내피성장인자 수용체, 알파5베타1 인테그린 단백질, 비-당부가된 J774 수용체, CXCR1-4 수용체, CCR1-5 수용체, CXCR3 수용체, CCR5 수용체, 헤46 표면 당단백질, TNFR P55 수용체, TNFp75 수용체, 수용성 인터루킨-1 베타 수용체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 19

제 15항 또는 17항에 있어서, 감염성 질병병인은 박테리아인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서, 박테리아는 미코박테리아 릭케차(*Mycobacteria rickettsia*), 미코플라스마(*Mycoplasma*), 네이세리아종(*Neisseria spp.*) 레지오넬라(*Legionella*), 시겔라종(*Shigella spp.*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 스트렙토코커스(*Streptococci*), 코르네박테리아 디프테리아(*Cornibacteria diphtheriae*), 파상풍균(*Clostridium tetani*), 보르데텔라 펠투시스(*Bordetella pertussis*), 해모필러스종(*Haemophilus spp.*), 클라미디아종(*Chlamydia spp.*), 대장균(*Escherichia coli*)에서 선택되거나, 또는 매독 또는 라임병을 유발하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 21

제 15항 또는 17항에 있어서, 감염성 질병병인은 바이러스인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 22

제 21항에 있어서, 바이러스는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 수두, 아데노바이러스, 단수포진바이러스 1형, 단수포진 11형, 우역, 코감기바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스, 호흡기 합포체성 바이러스, 파필로마 바이러스, 파포바 바이러스, 시토메갈로바이러스, 에치노 바이러스, 아르보바이러스, 한탄바이러스, 콕사키 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 루벨라 바이러스, 폴리오바이러스, 사람 면역결핍 바이러스 1형, 사람 면역결핍 바이러스 11형, 피코르나바이러스, 엔테로바이러스, 칼리시비리디아, 노르윅 바이러스 그룹, 토가바이러스, 알파바이러스, 플라비바이러스, 코로나바이러스, 라비즈 바이러스, 마르버그 바이러스, 에볼라바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 오르토믹소바이러스, 분야바이러스, 아레나바이러스, 레오바이러스, 로타바이러스, 오르비바이러스, 사람 T 세포 백혈병 바이러스 1형, 사람 T 세포 백혈병 바이러스 11형, 유인원 면역결핍 바이러스, 렌티바이러스, 플로모마바이러스, 파르보바이러스, 엡스테인-바르 바이러스, 사람 헤르페스바이러스-6, 원숭이 헤르페스바이러스 1, 팩스바이러스에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 23

제 15항 또는 17항에 있어서, 감염성 질병병인은 기생균인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 24

제 23항에 있어서, 기생균은 말라리아, 아이메리아, 레시마니아, 코크지디오아, 트리마노소마, 곰팡이에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 25

제 1항에 있어서, 제 1 면역글로불린은 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 26

항-유전형반응을 유도하기 위한 제 1 면역글로불린 분자단편의 총분양과 제약학적으로 수용가능한 담체로 이루어진 백신조성물에 있어서, 상기 제 1 면역글로불린 분자단편은 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자의 상응단편과 동일하며, 제 2 면역글로불린 분자의 상기 단편은 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환은 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 27

제 26항에 있어서, 단편은 단일사슬면역글로불린인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 28

제 26항에 있어서, 단편은 Fab 단편, (Fab')₂ 단편, H사슬 이합체, L사슬 이합체 또는 Fv 단편인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 29

제 26항에 있어서, 단편은 또한 일정영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 30

제 26항에 있어서, 변이영역은 생쥐면역글로불린에서 얻고, 일정영역은 사람면역글로불린에서 얻는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 31

제 1항에 있어서, 변이영역은 사람항체로부터 골격영역을, 생쥐면역글로불린으로부터 상보적 결정영역(CDR)을 갖는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 32

제 1항에 있어서, 제 1 면역글로불린 분자는 공유결합을 통하여 단백질의 아미노산서열과 결합하고, 상기 단백질은 11-2, 11-4, 11-5, 11-, 11-7, 11-10, γ -인터페론이나 MHC-유도펩티드, G-CSF, TNF, 포린, NK 세포항원 또는 세포 엔도사이토시스 수용체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 33

제 26항에 있어서, 제 1 면역글로불린 분자의 단편은 공유결합을 통하여 단백질의 아미노산서열과 결합하고, 상기 단백질은 11-2, 11-4, 11-5, 11-, 11-7, 11-10, γ -인터페론이나 MHC-유도펩티드, G-CSF, TNF, 포린, NK 세포항원 또는 세포 엔도사이토시스 수용체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 34

개체에서 항-유전형반응을 유발하는 방법에 있어서, 상기 방법은 항-유전형 반응을 유도하기 위한 제 1 면역글로불린 분자의 총분양을 상기 개체에 투여하는 것으로 이루어지고, 상기 제 1 면역글로불린 분자는 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자와 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환은 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제 34항에 있어서, 상기 방법은 개체에서 항체를 분리하고, 상기 항원은 제 2 면역글로불린 분자의 유전형을 인식하고, 상기 항원을 제 2 개체에 투여하는 것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제 34항에 있어서, 항원은 종양항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제 34항에 있어서, 항원은 암항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제 36항에 있어서, 항원은 다형성 내피 무친 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제 36항에 있어서, 항원은 사람 결장암(종)-관련 단백질항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제 36항에 있어서, 항원은 사람 결장암(종)-관련 탄수화물항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제 35항에 있어서, 변이영역은 L(light)사슬 변이영역이고, SH기를 갖지 않는 아미노산 잔기는 제 2 면 역글로불린 분자의 L사슬 변이영역의 23 또는 88 위치에 해당하는 위치에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제 35항에 있어서, 변이영역은 H(heavy)사슬 변이영역이고, SH기를 갖지 않는 아미노산 잔기는 제 2 면 역글로불린 분자의 H사슬 변이영역의 22 또는 92 위치에 해당하는 위치에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

제 34항에 있어서, SH기를 갖지 않는 아미노산 잔기는 알라닌인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제 34항에 있어서, 제 2 면역글로불린 분자는 Mab 31.1, Mab 33.28 또는 Mab HMF6-10이고, 아미노산 치환에는 L사슬 변이영역의 23 또는 88 위치에서 알라닌으로의 치환이 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제 34항에 있어서, 제 2 면역글로불린 분자는 Mab 31.1, Mab 33.28 또는 Mab HMF6-10이고, 아미노산 치환에는 H사슬 변이영역의 22 또는 92 위치에서 알라닌으로의 치환이 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제 34항에 있어서, 항원은 사람 유지방 구체 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제 34항에 있어서, 항원은 유방, 난소, 자궁, 전립선, 방광, 폐, 피부, 결장, 췌장, 위장관, B 세포 또는 T 세포의 암에 대한 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제 36항에 있어서, 항원은 KS 1/4 범-암종항원, 난소 암종항원, 전립선산 인산염, 전립선 특이적 항원, 흑색종-관련 항원 P97, 흑색종 항원 GP75, 고분자량 흑색종 항원, 질립선 특이적 막항원, 태아성 암종항원, 다형성 내피 무친항원, 사람 유지방 구체항원, 결장직장종양-관련 항원 TAG-72, C017-1A, G1CA 19-9, CTA-1, LEA, 벌키트(Burkitt) 림프종 항원-38.13, CD19, 사람 B-림프종 항원-CD20, CD33, 강글리오시드 GD2, 강글리오시드 GD3, 강글리오시드 GM2, 강글리오시드GM3, 종양-특이적 이식형 세포-표면항원, 신생종양 항원-알파-페포단백질 L6, 사람 폐 암종항원 L20, 사람 백혈병 T 세포항원-GP37, 네오당단백질, 스팅 고지질, EGFR, HER2 항원, 다형성 내피 무친, 악성 사람 림프구 항원-AP0-1, 항원 M18, M39, SSEA-1, VEP8, VEP9, My1, VIM-D5, D56-22, TRA-1-85, C14, F3, AH6, Y 함텐, Le^y, TL5, FC10.2, 위 선암종항원, C0-514, NS-10, C0-43, MH2, 결장암에서 발견된 19.9, 위암 무친, T5A7, R24, 4.2, GP3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, G_{p2}, M1:22:25:8, SSEA-3, SSEA-4, T-세포 수용체 유도펩티드에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

제 34항에 있어서, 항원은 감염성 질병병인의 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제 49항에 있어서, 항원은 인플루엔자바이러스 헤마글루티닌, 사람 호흡기 합포체성 바이러스 G 당단백질, 뎅기바이러스의 심부 단백질, 뎅기바이러스의 모체 단백질, 홍역바이러스 헤마글루티닌, 단수포진바이러스 2형 당단백질 gB, 폴리오바이러스 I VP1, HIV 1의 외피 당단백질, B형 간염 표면항원, 디프테리아 독소, 스트렙토코커스(Streptococcus) 24M 에피토포프, 고노코컬 필린(Gonococcal pilin), 슈도라비즈(Pseudorabies) 바이러스 g50, 슈도라비즈 바이러스 당단백질 H, 슈도라비즈 바이러스 당단백질 E, 전파 가능 위장염 모체 단백질, 돼지 로타바이러스 당단백질 38, 돼지 파르보바이러스 캡시드 단백질, 셉푸릴 나 히도디센테리아(Serpulina hydodysenteriae)보호 항원, 소 바이러스 설사 당단백질, 돼지 감기 뉴우라미니다제, 감염성 소 비강기관염 바이러스 당단백질 E, 감염성 후두기관염 바이러스 당단백질 G 또는 당단백질 I, 라 크로제(La Crosse)바이러스의 당단백질, 태아소 설사 바이러스, B형 간염바이러스 심부 단백질, B형 간염바이러스 표면항원, 말 인플루엔자 바이러스 A형/알래스카 91 뉴우라미니다제, 말 인플루엔자 바이러스 A형/마이애미 63 뉴우라미니다제, 말 인플루엔자 바이러스 A형/켄터키 81 뉴우라미니다제, 말 헤

르페스바이러스 1형 당단백질 B, 말 헤르페스바이러스 1형 당단백질 D, 소 호흡기 합포체성 바이러스 융합단백질, 소 호흡기 합포체성 바이러스 뉴클레오텍시드 단백질, 소 프라핀인플루엔자 바이러스 3형 융합단백질, 소 파라핀인플루엔자 바이러스 3형 헤마글루티닌 뉴우라미니다제, 소 바이러스성 설사 바이러스 당단백질 48, 소 설사바이러스 당단백질 53에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제 34항에 있어서, 항원은 감염성 질병병인에 대한 세포수용체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제 51항에 있어서, 세포수용체는 LPV 수용체, 아데닐레이트 사일클라제, BDV 표면 당단백질, N-아세틸-9-0-아세틸뉴라민산 수용체, CD4+, 고도 황산염화형 헤파린 황산염, p65, Gal 알파 1-4-Gal-포함 등수용체, CD16b, 인테그린 VLA-2 수용체, EV 수용체, CD14, 당접합 수용체, 알파/베타 T-세포 수용체, 부식-가속화 인자 수용체, 세포외 외피 당단백질 수용체, 면역글로불린 Fc 수용체, 팩스바이러스 M-77, GALV 수용체, CD14 수용체, 루이스(b) 혈액그룹항원 수용체, T-세포 수용체, 헤파린 황산염 당아미노글리칸 수용체, 섬유아세포 성장인자 수용체, CD11a, CD2, G-단백질 결합 수용체, CD4, 헤파린 황산염 프로테오글리칸, 아빅신 II, CD13(아미노펩티다제 N), 사람 아미노펩티다제 N 수용체, 헤마글루티닌 수용체, CR3 수용체, 단백질 키나아제 수용체, 갈락토즈 N-아세틸갈락토사민-저해성 렉틴 수용체, 케모킨 수용체, 아빅신 I, actA 단백질, CD46 수용체, 메닝고코커스 독성 관련 opa 수용체, CD46 수용체, 태아성 암종항원 페밀리 수용체, 태아성 암종항원 페밀리 Bgla 수용체, 감마 인터페론 수용체, 당단백질 gp70, rmc-1 수용체, 사람 인테그린 수용체 알파 v 베타 3, 헤파린 황산염 플로테오글리칸 수용체, CD66 수용체, 인테그린 수용체, 막 보조인자 단백질, CD46, GM1, GM2, GM3, CD3, 세라미드, 헤마글루티닌-뉴우라미니다제 단백질, 적혈구 P 항원 수용체, CD36 수용체, 글리코포린 A 수용체, 인터페론 감마 수용체, KDEL 수용체, 짐막 호미 알파4베타7 수용체, 내피 성장인자 수용체, 알파5베타1 인테그린 단백질, 비-당부가된 J774 수용체, CXCR1-4 수용체, CCR1-5 수용체, CXCR3 수용체, CCR5 수용체, 헤46 포면 당단백질, TNFR P55 수용체, TNFp75 수용체, 수용성 인터루킨-1 베타 수용체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제 49항 또는 51항에 있어서, 감염성 질병병인은 박테리아인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제 53항에 있어서, 박테리아는 미코박테리아 릭케차(*Mycobacteria rickettsia*), 미코플라스마 (*Mycoplasma*), 네이세리아종(*Neisseria spp.*) 레지오넬라(*Legionella*), 시겔라종(*Shigella spp.*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 스트렙토코커스(*Streptococci*), 코르네박테리아 디프테리아(*Cornebacteria diphtheriae*), 파상풍균(*Clostridium tetani*), 보르데텔라 펠투스시(*Bordetella pertussis*), 해모필러스종(*Haemophilus spp.*), 클라미디아종(*Chlamydia spp.*), 대장균(*Escherichia coli*)에서 선택되거나, 또는 매독 또는 라임병을 유발하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제 49항 또는 51항에 있어서, 감염성 질병병인은 바이러스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

제53항에 있어서, 바이러스는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 수두, 아데노바이러스, 단순포진바이러스 I형, 단순포진 II형, 우역, 코감기바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스, 호흡기 합포체성 바이러스, 파필로마 바이러스, 파포마 바이러스, 시토메갈로바이러스, 에치노바이러스, 아르보바이러스, 한탄바이러스, 콕사키 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 루벨라 바이러스, 폴리오바이러스, 사람 면역결핍 바이러스 I형, 사람 면역결핍 바이러스 II형, 피코르나바이러스, 엔테로바이러스, 칼리시비리디아, 노르워크 바이러스 그룹, 토가바이러스, 알파바이러스, 플라비바이러스, 코로나바이러스, 라비즈 바이러스, 마르버그 바이러스, 에볼라바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 오르토믹소바이러스, 분야바이러스, 아레나바이러스, 레오바이러스, 로타바이러스, 오르비바이러스, 사람 T 세포 백혈병 바이러스 I형, 사람 T 세포 백혈병 바이러스 II형, 유인원 면역결핍 바이러스, 렌티바이러스, 플로모마바이러스, 파르보바이러스, 앵스테인-바르 바이러스, 사람 헤르페스바이러스-6, 원숭이 헤르페스바이러스 1, 팩스바이러스에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

제 49항 또는 51항에 있어서, 감염성 질병병인은 기생균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

제 57항에 있어서, 기생균은 말라리아, 아이메리아, 레시마니아, 코크지디오아, 트리마노소마, 곰팡이에 서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제 34항에 있어서, 제 1 면역글로불린은 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

개체에서 항-유전형반응을 유발하는 방법에 있어서, 상기 방법은 상기 개체에 항-유전형 반응을 유도하기 위한 제 1면역글로불린 분자 단편의 충분한양을 투여하는 것으로 이루어지고, 상기 단편은 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자의

단편과 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자의 단편은 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환은 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61

제 60항에 있어서, 상기 방법은 개체에서 항체를 분리하고, 상기 항원은 제 2 면역글로불린 분자의 유전형을 인식하고, 상기 항원을 제 2 개체에 투여하는 것으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62

제 60항에 있어서, 항원은 중앙항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 63

제 60항에 있어서, 항원은 암항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 64

제 60항에 있어서, 항원은 다형성 내피 무친 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 65

제 62항에 있어서, 항원은 사람 결장암(종)-관련 단백질항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 66

제 62항에 있어서, 항원은 사람 결장암(종)-관련 탄수화물항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67

제 60항에 있어서, 변이영역은 L(light)사슬 변이영역이고, SH기를 갖지 않는 아미노산 잔기는 제 2 면역글로불린 분자의 L사슬 변이영역의 23 또는 88 위치에 해당하는 위치에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 68

제 60항에 있어서, 변이영역은 H(heavy)사슬 변이영역이고, SH기를 갖지 않는 아미노산 잔기는 제 2 면역글로불린 분자의 H사슬 변이영역의 22 또는 92 위치에 해당하는 위치에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69

제 60항, 67항 또는 68항에 있어서, SH기를 갖지 않는 아미노산 잔기는 알라닌인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 70

제 63항에 있어서, 항원은 사람 유지방 구체 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 71

제 63항에 있어서, 항원은 유방, 난소, 자궁, 전립선, 방광, 폐, 피부, 결장, 췌장, 위장관, B 세포 또는 T 세포의 암에 대한 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 72

제 60항에 있어서, 항원은 감염성 질병병인의 항원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73

제 72항에 있어서, 항원은 인플루엔자바이러스 헤마글루티닌, 사람 호흡기 합포체성 바이러스 G 당단백질, 뎅기바이러스의 심부 단백질, 뎅기바이러스의 모체 단백질, 홍역바이러스 헤마글루티닌, 단수포진바이러스 2형 당단백질 gB, 폴리오바이러스 1 VP1, HIV 1의 외피 당단백질, B형 간염 표면항원, 디프테리아 독소, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 24M 에피토프, 고노코커스 필린(*Gonococcal pilin*), 슈도라비즈(*Pseudorabies*) 바이러스 g50, 슈도라비즈 바이러스 당단백질 H, 슈도라비즈 바이러스 당단백질 E, 전파가능 위장염 당단백질 195, 전파가능 위장염 모체단백질, 돼지 로타바이러스 당단백질 38, 돼지 파르보바이러스 캡시드 단백질, 설푸릴나 히도디센테리아(*Serpulina hydodysenteriae*)보호 항원, 소 바이러스성 설사 당단백질 55, 뉴캐슬 질환 바이러스 헤마글루티닌-뉴우라미니다제, 돼지 감기 헤마글루티닌, 돼지 감기 뉴우라미니다제, 감염성 소 비강기관염 바이러스 당단백질 E, 감염성 후두기관염 바이러스 당단백질 G 또는 당단백질 1, 라 크로제(*La Crosse*)바이러스의 당단백질, 태아소 설사 바이러스, B형 간염바이러스 심부 단백질, B형 간염바이러스 표면항원, 말 인플루엔자 바이러스 A형/알래스카 91 뉴우라미니다제, 말 인플루엔자 바이러스 A형/마이애미 63 뉴우라미니다제, 말 인플루엔자 바이러스 A형/켄터키 81 뉴우라미니다제, 말 헤르페스바이러스 1형 당단백질 B, 말 헤르페스바이러스 1형 당단백질 D, 소 호흡기 합포체성 바이러스 부착단백질, 소 호흡기 합포체성 바이러스 융합단백질, 소 호흡기 합포체성 바이러스 뉴클레오캡시드 단백질, 소 파라인플루엔자 바이러스 3형 융합 단백질, 소 파라인플루엔자 바이러스 3형 헤마글루티닌 뉴우라미니다제, 소 바이러스성 설사 바이러스 당단백질 48, 소 설사바이러스 당단백질 53에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 74

제 60항에 있어서, 항원은 감염성 질병병인에 대한 세포수용체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 75

제 74항에 있어서, 세포수용체는 LPV 수용체, 아데닐에이트 사일클라제, BDV 표면 당단백질, N-아세틸-9-O-아세틸뉴라민산 수용체, CD4+, 고도 황산화형 헤파린 황산염, p65, Gal 알파 1-4-Gal-포함 등수용체, CD16b, 인테그린 VIM-2 수용체, EV 수용체, CD14, 당접합 수용체, 알파/베타 T-세포 수용체, 부식-가속화 인자 수용체, 세포외 외피 당단백질 수용체, 면역글로불린 Fc 수용체 팩스바이러스 M-77, GALV 수용체, CD14 수용체, 루이스(b) 혈액그룹항원 수용체, T-세포 수용체, 헤파린 황산염 당아미노글리칸 수용체, 섬유아세포 성장인자 수용체, CD11a, CD2, G-단백질 결합 수용체, CD4, 헤파린 황산염 프로테오글리칸, 아빅신 II, CD13(아미노펩티다제 N), 사람 아미노펩티다제 N 수용체, 헤마글루티닌 수용체, CR3 수용체, 단백질 키나아제 수용체, 갈락토즈 N-아세틸갈락토사민-저해성 렉틴 수용체, 케코킨 수용체, 아빅신 I, actA 단백질, CD46 수용체, 메닝고코커스(Meningococcal) 독성 관련 opa 수용체, CD46 수용체, 태아성 암종항원 페밀리 수용체, 태아성 암종항원 페밀리 Bgl1 수용체, 감마 인터페론 수용체, 당단백질 gp70, rmc-1 수용체, 사람 인테그린 수용체 알파 v 베타 3, 헤파린 황산염 플로테오글리칸 수용체, CD66 수용체, 인테그린 수용체, 막 보조인자 단백질, CD46, GM1, GM2, GM3, CD3, 세라미드, 헤마글루티닌-뉴우라미니다제 단백질, 적혈구 P 항원 수용체, CD36 수용체, 글리코포린 A 수용체, 인터페론 감마 수용체, KDEL 수용체, 점막 호밍 알파4베타7 수용체, 내피성장인자 수용체, 알파5베타1 인테그린 단백질, 비-당부 가진 J774 수용체, CXCR1-4 수용체, CCR1-5 수용체, CXCR3 수용체, CCR5 수용체, 헤46 표면 당단백질, TNFR P55 수용체, TNFp75 수용체, 수용성 인터루킨-1 베타 수용체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 76

제 72항 또는 74항에 있어서, 감염성 질병병인은 박테리아인 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 77

제 76항에 있어서, 박테리아는 미코박테리아 릭케차(Mycobacteria rickettsia), 미코플라스마(Mycoplasma), 네이세리아종(Neisseria spp.), 레지오넬라(Legionella), 시겔라종(Shigella spp.), 비브리오 콜레라(Vibrio cholerae), 스트렙토코커스(Streptococci), 코르네박테리아 디프테리아(Cornebacteria diphtheriae), 파상풍균(Clostridium tetani), 보르데텔라 펠투스시(Bordetella pertussis), 해모필러스종(Haemophilus spp.), 클라미디아종(Chlamydia spp.), 대장균(Escherichia coli)에서 선택되거나, 또는 매독 또는 라임병을 유발하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 78

제 72항 또는 74항에 있어서, 감염성 질병병인은 바이러스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 79

제 78항에 있어서, 바이러스는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 수두, 아데노바이러스, 단순포진바이러스 I형, 단순포진 II형, 우역, 코강기바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스, 호흡기 합포체성 바이러스, 파필로마 바이러스, 파포바 바이러스, 시토메갈로바이러스, 에치노 바이러스, 아르보바이러스, 한탄바이러스, 콕사키 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 루벨라 바이러스, 폴리오바이러스, 사람 면역결핍 바이러스 I형, 사람 면역결핍 바이러스 II형, 피코르나바이러스, 엔테로바이러스, 칼리시비리디아, 노르윅 바이러스 그룹, 토가바이러스, 알파바이러스, 플라비바이러스, 코로나바이러스, 라비즈 바이러스, 마르버그 바이러스, 에볼라바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 오르토믹소바이러스, 분야바이러스, 아레나바이러스, 레오바이러스, 로타바이러스, 오르비바이러스, 사람 T 세포 백혈병 바이러스 I형, 사람 T 세포 백혈병 바이러스 II형, 유인원 면역결핍 바이러스, 렌티바이러스, 플로모마바이러스, 파르보바이러스, 엠스테인-바르 바이러스, 사람 헤르페스바이러스-6, 원숭이 헤르페스바이러스 1, 팩스바이러스에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 80

제 72항 또는 74항에 있어서, 감염성 질병병인은 기생균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 81

제 80항에 있어서, 기생균은 말라리아, 아이메리아, 레시마니아, 코크지디오아, 트리마노소마, 곰팡이에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 82

제 60항에 있어서, 단편은 단일사슬면역글로불린인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 83

제 82항에 있어서, 단편은 Fab 단편, (Fab')₂ 단편, H사슬 이합체, L사슬 이합체 또는 Fv 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 84

제 60항에 있어서, 단편은 또한 일정역역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 85

제 84항에 있어서, 변이영역은 생쥐면역글로불린에서 얻고, 일정영역은 사람면역글로불린에서 얻는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 86

제 60항에 있어서, 변이영역은 사람항체로부터 골격영역을, 생쥐면역글로불린으로부터 상보적 결정영역(CDR)을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 87

암의 예방 또는 치료가 필요한 개체에서 암을 예방하고 치료하는 방법에 있어서, 상기 방법은 항-유전형 반응을 유도하기 위한 제 1면역글로불린 분자의 총분양과 제약학적 수용가능한 담체로 이루어지는 백신조성물을 상기 개체에 투여하는 것으로 이루어지고, 상기 제 1 면역글로불린 분자는 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자와 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 감염성 질병병인의 항원과 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환은 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 88

감염성 질병의 예방 또는 치료가 필요한 개체에서 감염성 질환을 예방하고 치료하는 방법에 있어서, 상기 방법은 항-유전형 반응을 유도하기 위한 제 1면역글로불린 분자의 총분양과 제약학적 수용가능한 담체로 이루어지는 백신조성물을 상기 개체에 투여하는 것으로 이루어지고, 상기 제 1 면역글로불린 분자는 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자와 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 감염성 질병병인의 항원과 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환은 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 89

감염성 질병의 예방 또는 치료가 필요한 개체에서 감염성 질환을 예방하고 치료하는 방법에 있어서, 상기 방법은 항-유전형 반응을 유도하기 위한 제 1면역글로불린 분자의 총분양과 제약학적 수용가능한 담체로 이루어지는 백신조성물을 상기 개체에 투여하는 것으로 이루어지고, 상기 제 1 면역글로불린 분자는 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자와 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 감염성 질병병인에 대한 세포 수용체와 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환은 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 90

제 88항 또는 89항에 있어서, 감염성 질환은 매독, 임질, AIDS, 말라리아, 시겔라, 살모넬라, A형 간염, C형 간염, 라임관절염, 뇌염, 헤르페스, 그람음성 박테리아 감염, 그람양성 박테리아 감염, 뉴우모코커스(Pneumococcus)감염에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 91

항-유전형반응을 충분히 유도할 수 있는 제 1 면역글로불린 분자를 만드는 방법에 있어서, 상기 제 1 면역글로불린 분자는 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자와 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환은 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하고, 상기 방법은

(a) 제 2 면역글로불린을 인코딩한 핵산에서, 상기 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기를 인코딩한 뉴클레오티드를 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기를 인코딩한 뉴클레오티드로 치환하여, 제 1 면역글로불린 분자를 인코딩한 핵산을 작제하고;

(b) (a)단계에서 작제한 핵산을 세포에 도입하여, 제 1 면역글로불린분자가 세포에 의해 발현되도록 하고;

(c) 발현된 제 1 면역글로불린분자를 회수하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 92

제 91항에 있어서, 뉴클레오티드는 특정부위 돌연변이유발에 의해 치환되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 93

항-유전형반응을 충분히 유도할 수 있는 제 1 면역글로불린 분자를 만드는 방법에 있어서, 상기 제 1 면역글로불린 분자는 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자와 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환은 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하고, 상기 방법은

- (a) 상기 제 1 면역글로불린 분자를 인코드한 인공 유전자를 보유한 핵산을 합성하고;
 (b) (a)단계에서 합성된 핵산 핵산을 세포에 도입하여, 인코드된 제 1 면역글로불린분자가 세포에 의해 발현되도록 하고;
 (c) 발현된 제 1 면역글로불린분자를 회수하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 94

제 91항 또는 93항에 있어서, 제 2 면역글로불린 분자는 Mab 31.1 또는 Mab 33.28인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 95

제 91항 또는 93항에 있어서, 제 2 면역글로불린 분자는 HMFg-1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 96

항-유전형반응을 유도하기 위한 제 1 면역글로불린 분자의 총분양과 제약학적으로 수용가능한 담체로 이루어진 백신조성물에 있어서, 상기 제 1 면역글로불린 분자는 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자와 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 여기서, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환중 적어도 일부는 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 제 2 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하고, 이때, 상기 제 2 면역글로불린 분자에서 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 하나 또는 복수위치에서, SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기치환이 아닌 아미노산치환은 변화를 안정화시키지 못하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 97

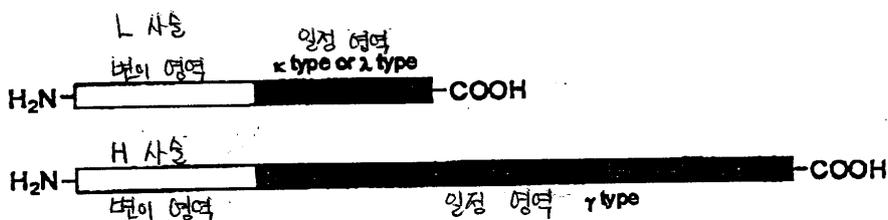
개체에서 항-유전형반응을 유발하는 방법에 있어서, 상기 방법은 상기 개체에 항-유전형 반응을 유도하기 위한 제 1면역글로불린 분자의 총분양을 투여하는 것으로 이루어지고, 상기 제 1 면역글로불린 분자는 변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자의 단편과 동일하며, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 여기서, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환중 적어도 일부는 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 제 2 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하고, 이때, 상기 제 2 면역글로불린 분자에서 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 하나 또는 복수위치에서, SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수 아미노산 잔기의 치환이 아닌 아미노산치환은 변화를 안정화시키지 못하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

청구항 98

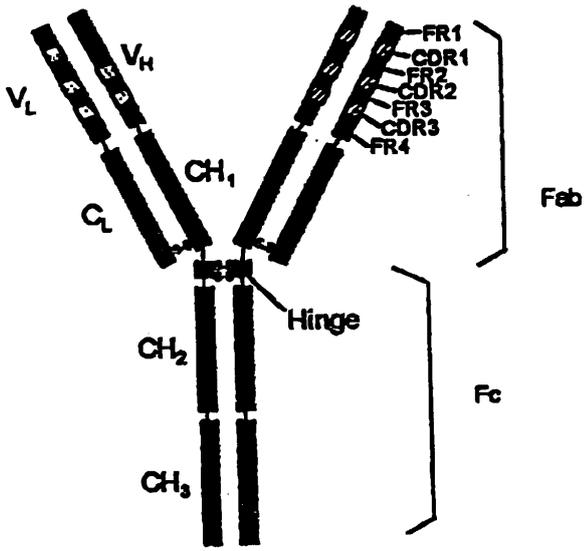
변이영역을 포함하고, 상기 변이영역에 하나 또는 복수아미노산이 치환된 것을 제외하고는 제 2 면역글로불린 분자의 단편과 동일한 것을 특징으로 하는 제 1 면역글로불린에 있어서, 상기 제 2 면역글로불린 분자는 항원에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 여기서, 상기 하나 또는 복수아미노산 치환중 적어도 일부는 하나 또는 복수위치에서 SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수아미노산 잔기의 치환이고, 상기 위치는 상기 제 2 면역글로불린 분자에 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하고, 이때, 상기 제 2 면역글로불린 분자에서 이황화결합을 형성하는 하나 또는 복수시스테인 잔기에 해당하는 하나 또는 복수위치에서, SH기를 갖지 않는 하나 또는 복수 아미노산 잔기의 치환이 아닌 아미노산치환은 변화를 안정화시키지 못하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.

도면

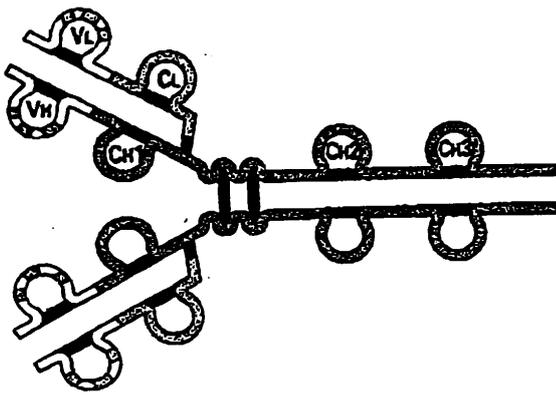
도면1



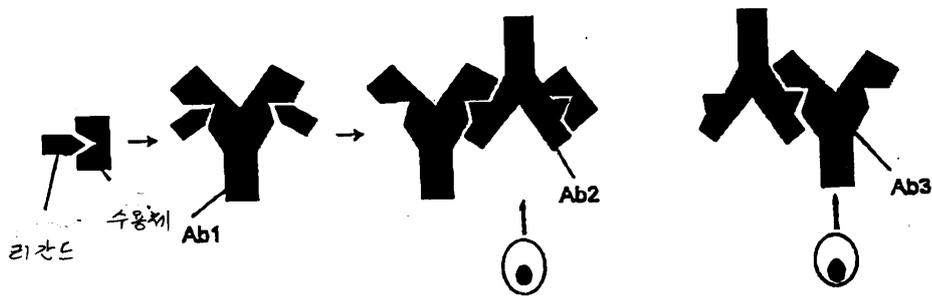
도면2



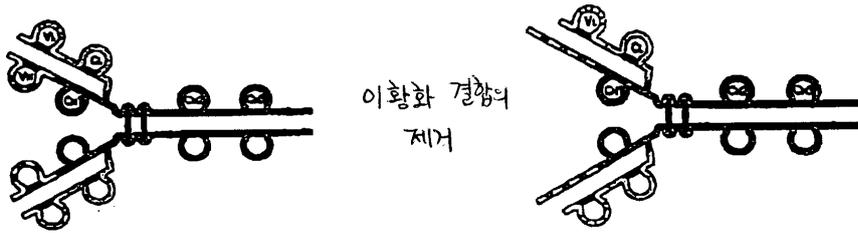
도면3



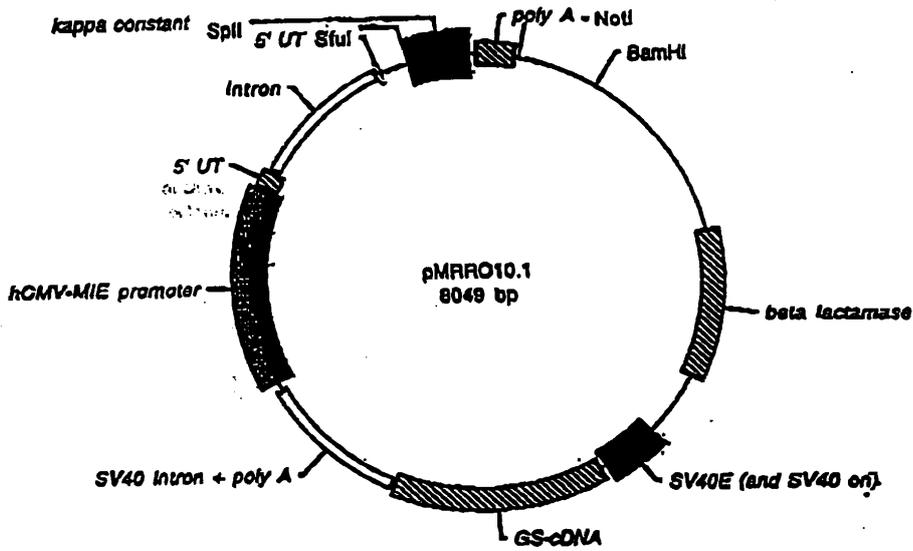
도면4



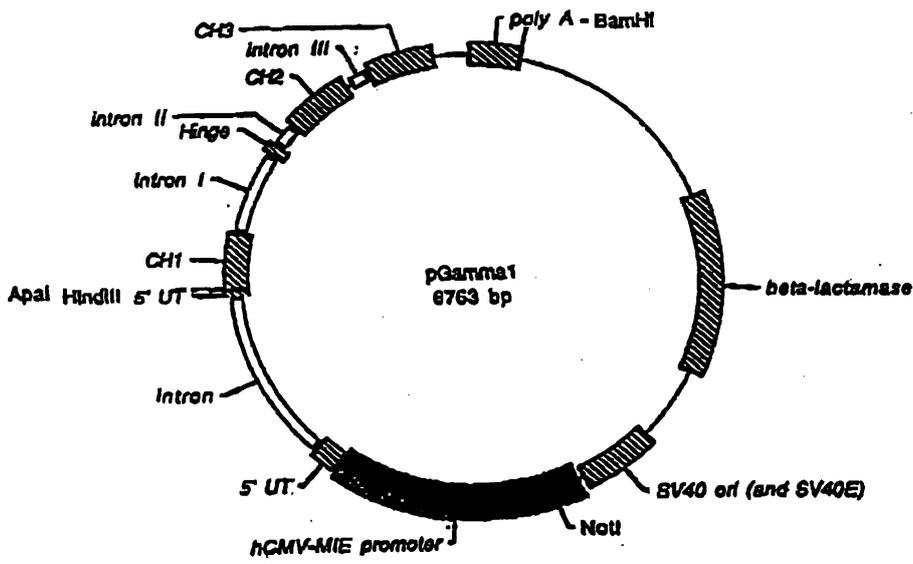
도면5



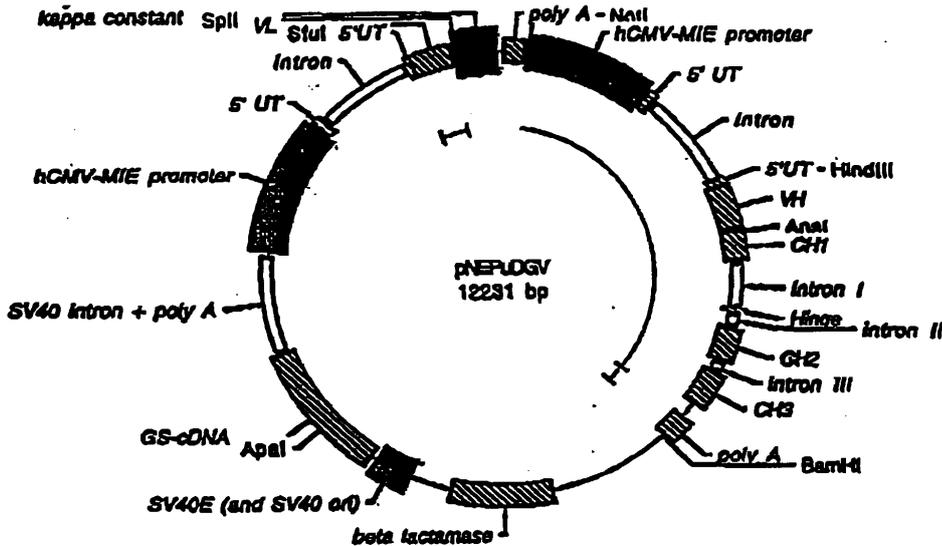
도면6a



도면6b



도면6c



도면7a

GenVL1

EcoRI
GAA TTC

6

-19 (Leader) Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser Ala Gln Ala
ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTC GTA TTC CTC ATC GCA GCT GCC CAA AGT GCC CAA GCA
63 -1

VL:

1 10 20
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
Thr
GAT ATC CAA ATG ACA CAA AGT CCT AGT AGT TTG AGT GCT AGT GTG GGA GAT CCG GTG
ACA 123

21 30 40
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
Pro
ATC ACA TGT CCG GCT AGT CAA AGT ATC AGT AAC TGT TTG GCT TGG TAT CAA CAA AAG
CCT 183

41 50 60
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro
Ser
GGA AAG GCT CCT AAG TTG TTG ATC TAT GCT GCT AGT AGT TTG GAG AGT GGA GTG CCT
AGT 243

61 70 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Arg Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
Pro
CGG TTC AGT GGA AGT GGA AGT GCA ACA CCG TTC ACC TTG ACC ATC AGT AGT TTG CAA
CCT 303

81 90 100
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly
Gln
GAG GAT TTC GCT ACC TAT TAT TGT CAA CAA TAT AAC AGT TTG COT TGG ACC TTC GGA
CAA 363

101
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
GGA ACC AAG GTG GAG ATC AAG GAA TTC 390
Eco RI

도면7b

ConvR1

EcoR1
GAA TTC

6

-19 (Leader)

Met Ala trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala -1
 Gln Ser Ala Gln Ala
 ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG CTA TTC CTG ATG GCA GCT GCC
 CAA AGT GGC CAA GCA 63

VL:

1 10 20
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 Gly Ala Ser Val Lys Val
 CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGC GCT CAG GTG AAG AAG CCT
 GGC GCT TCT GTG AAG GTG 123

21-

30

35A 35B

40

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Ala Ile
 Ser Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala
 TCT TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTC ACA TCT TAC GCT ATA
 TCT TGG AAT TGG GTG AGG CAG GCT 189

41

50

60

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Gly Asn
 Gly Asp Thr Asn Tyr Ala
 CCT GCC CAG GCC CTG GAG TCG ATG GGC TGG ATA AAT GGA AAT
 GGA GAT ACA AAT TAC GCC 249

61

70

80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser
 Thr Ser Thr Ala Tyr Met
 CAG AAG TTC CAG GGA AGG GTC ACT ATA ACT GCT GAT ACT TCT
 ACT TCT ACT GCT TAC ATG 309

81

82A 82B 82C

90

Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys Ala Arg Ala Pro Gly Tyr Gly Ser
 GAG CTG TCT TCT CTG AGG TCT CAG GAT ACT GCT GTT TAC TAC
 TCC GCT AGG GCT COT GGC TAC GGC TCT 378

101

110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 GAT TAT TGG GGA CAG GGA ACA CTG GTT ACA GTT TCT TCT GAA TTC
 423

588b

2CAVHC011
 BCOR1
 GAA TTC

6

-19 (Leader)
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser Ala Gln Ala
 ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG CTA TTC CTG ATG GCA GCT GCC CAA AGT GCC CAA GCA 63

1
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gln Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile
 CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCA GAG ACA GTC AAG ATC 20

10
 21
 Ser Ala Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala
 TCC GCT AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT 183

30
 41
 Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
 CCA GGA AAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAG ACC TAC ACT GGA GAG CCA ACA TAT 243

50
 61
 Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCC TAT 303

70
 81
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Ala Ala Arg Ala Tyr
 TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC GCT GCA AGA GCC TAC 100

90
 101
 Tyr Gly Lys Tyr Phe Asp Tyr
 TAT GGT AAA TAC TTT GAC TAC GAA TTC 390

도면9a

2CAVHCOL1

VHC1 5'GAATTCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGCCC
AAGCACAGATCCAGTTGGTGCA 3'

VHC2 5'GTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCGCTAAGGCTTC
TGGGTATACCTTCACAAACTAG 3'

VHC3 5'GAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGAT
AAACACCTACACTGGAGAGCCAACA 3'

VHC4 5'TATGCTGATGACTTCAAGGGACGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACT
GOCTATTTGCAGATCAACACCT 3'

VHC5 5'CAAAAATGAGGACACGGCTACATATTCGCTGCAAGAGCCTACTATGGTAAATAC
TTTGACTACGAATTC 3'

VHC6 5'GAATTCGTAGTCAAAGTATTTACCATAGTAGGCTCTTGCAGCAAATATG 3'

VHC7 5'TAGCCGTGTCTCATTTTTGAGGTTGTTGATCTGCAAATAGGCAGTCTGGCAGA
GGTTTCCAAAGAGAAGGCCAAACCGT 3'

VHC8 5'CCCTTGAAGTCATCAGCATATGTTGGCTCTCCAGTGTAGGTGTTTATCCAGCCAT
CCACTTTAAACCCCTTCTGGAGC 3,

VHC9 5'CTGCTTCAACCAGTTCATTCCATAGTTTGTGAAGGTATACCCAGAAGCCTTAGCGG
AGATCTTGACTGTCTCTCCAGGCT 3'

VHC10 5'TCTTCAGCTCAGGTCCAGACTGCACCAACTGGATCTGTGCTTGGGCACTTTG GGC
AGCTGCCATCAGGAATAGCAAGGTCCACACCCAAGCCATGAATTC 3'

도면9b

2CAVLCOL1

VLC1 5'AGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTATCAGCAGGAGACAGGGTT
AOCATA 3'

VLC2 5'ACCTGCAAGGCCAGTCCAGAGTGTGAGTAATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAAAACC
AGGGCAG 3'

VLC3 5'TCTCTAAACTGCTGATATACTATGCATCCAATCGCTACACTGGAGTCCCTGATCGCT
TCACTGGCAGT 3'

VLC4 5'GGATATGGGACGGATTTCACCTTTCACCATCAGCACTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCA
GTTTAT 3'

VLC5 5'TTCTGYCAGCAGGATTATAGCTCTCCGCTCACGTTCCGGTGTGGACCAAGCTGGAG
CTGAAAGAATTC 3'

VLC6 5'GAATCTTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCAGCACCCGAACGTGAGCGGAGAGCTATAATC
CTGCTGACAGAAATAAACTGC 3'

VLC7 5'CAGGTCTTCAGCCTGCACAGTCTGATGGTGAAAGTGAAATCCGTCCCATATCCA
CTGCCAGT 3'

VLC8 5'GAAGCGATCAGGGACTCCAGTGTAGCGATTGGATGCATAGTATATCAGCAGTTTAG
GAGACTGCCCTGG 3'

VLC9 5'TTCTGTGTGGTAACCAAGCTACATCATTACTCACACTCTGACTGGCCTTGCAGGTTA
TGGTAAC 3'

VLC10 5'OCTGTCTCTGCTGATACAAGCAGGAATTTGGGAGTCTGGGTCATCACAATACTT
GCTTGGGC 3'

VLC11 5'TTCGCTCAGCAGGATTATAGCTCTCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGG
AGCTGAAAGAATC 3'

VLC12 5'GAATCTTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCAGCACCCGAACGTGAGCGGAGAGCTATAA
TCTGCTGAGCGAAATAAACTGC 3'

도면9c

ConVL1**Leader Sequence**

L1 5'GAATTCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCAAAAGTGOCC
 AAGCA 3'
L2 5'ACTTTGGGCAGCTGCCATCAGGAATAGCAAAGTCCACACCCAAGCCATGAATTC 3'
BKLC1 5'GATATCCAAAATGACACAAAAGTCCTAGTAGTTTGAGTGCTAGTGTGGGAGATCG
 GGTGATCACA 3'
BKLC2 5'TGTCGGGCTAGTCAAAGTATCAGTAACTATTTGGCTTGGTATCAACAAAAGCCT
 GGAAAGGCTCCTAAGTTGTTGATC 3'
BKLC3 5'TATGCTGCTAGTAGTTTGGAGAGTGGAGTGCCTAGTCGGTTCAGTGGA 3'
BKLC4 5'AGTGGAAAGTGGAAACACGGTTCACCTTGACCATCAGTAGTTTGCAACCTGAGGA
 TTCGTAOCTATTAT 3'
BKLC5 5'TGTCAACAATATAACAGTTTGCCTTGGACCTTCGGACAAGGAACCAAGGTGGA
 GATCAAGGAATTC3'
BKLC6 5'GAATTCCTTGATCTCCACCTTGGTTCTTGTCCGAAGGTCCAAGGCAAAGTGTTA
 TATTGTTGACAATAATAGGT3'
BKLC7 5'AGCGAAATCCTCAGGTTGCAAACACTACTGATGGTCAAGGTGAACCGTGTTCACCT
 CCACCTCCACTGAA3'
BKLC8 5'CCGACTAGGCACTCCACTCTCCAAACTACTAGCAGCATAGATCAACAA 3'
BKLC9 5'CTTAGGAGCCTTCCAGGCTTTTGTGATAOCCAAGCCAAATAGTTACTGATACT
 TTGACTAGCCCGACATGTGATTGT 3'
BKLC10 5'CACCCGATCTCCACACTAGCACTCAAACACTACTAGGACTTTGTGTCATTGGA
 TATCTTGCTTGGGC3'
BKLCDR12 5'TGTGGGCTCCTGGCTTCTCTCTTTCAGGTTGGCTTGGTATCAACAAAAGC
 CTGGAAAGGCTCCTAAGTTGTTGATC 3'
BKLCDR19 5'CTTAGGAGCCTTCCAGGCTTTTGTGATAOCCAAGCCAACTGAAAAGGAGA
 GAAGCCAGGAGGCCGACATGTGATTGT3'
BKLCDR23 5'TATCCTGGCTTCTCTCTTTCAGGGGAGTGCCTAGTCGGTTCAGTGGA 3'
BKLCDR28 5'CCGACTAGGCACTCCCTGAAAGGAGAGAAGCCAGGATAGATCAACAA 3'
BKLCDR35 5'TGTAGGCCTCCTGGCTTCTCTCTTTCAGGTTCCGACAAGGAACCAAGGTGG
 AGATCAAG 3'
BKLCDR36 5'GAATTCCTTGATCTCCACCTTGGTTCTTGTCCGAACCTGAAAAGGAGAGAA
 GCCAGGAGGCTACAATAATAGGT 3'

도면9d

ConVH1

BKHC1 5'GAATTTCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTG
CCCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTG 3'

BKHC2 5'GCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCTTCTGTGAAGGTGTCTTGCAAGGCTTCT
GGCTACATTCACATCTTACGCTATATCTTG 3'

BKHC3 5'GAATTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATAAAT
GGAAATGGAGATACAATTACGCCAGAAG 3'

BKHC4 5'TTCCAGGGAAGGGTTACTATAAAGTGTGATACTTCTACTTCTACTGCTTACATGG
AGCTGTCTTCTCTGAGGTCTGAGGATACT 3'

BKHC5 5'GCTGTTTACTACTGCGCTAGGGCTCCTGGCTACGGCTCTGATTATTGGGGACA
GGAAACACTGGTTACAGTTTCTTTCTGAATTC 3'

BKHC6 5'GAATTCAGAAGAACTGTAACCAGTGTCCCTGTCCCAATAATCAGAGCCGTA
- GCCAGGAGCC 3'

BKHC7 5'CTAGCCAGTAGTAAACAGCAGTATCCTCAGACCTCAGAGAAGACAGCTCCAT
GTAAGCAGTAGAAGTAGAAGTATCAGCAGTT 3'

BKHC8 5'ATAGTAAACCTTCCCTGGAACTTCTGGGCGTAATTTGTATCTCCATTTCCATTT
ATCCAGCCCATCCACTCCAGGCCCTGGCCAG 3'

BKHC9 5'GAGCCTGCCTCACCAATTCCAAGATATAGCGTAAGATGTGAATGTGTAGCCA
GAAGCCTTGCAAGACACCTTCACAGAAGCGCC 3'

BKHC10 5'AGGCTTCTTCACCTCAGCGCCAGACTGCAOCAGCTGAACCTGTGCTTGGGCACT
TTGGGCAGCTGCCATCAGGAATAGCAAGGTCCACACCCAAGCCATGAATTC 3'

BKHCDR42 5'GCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCTTCTGTGAAGGTGTCTTGCAAGGC
TTCTGGCTACACATTCACA 3'

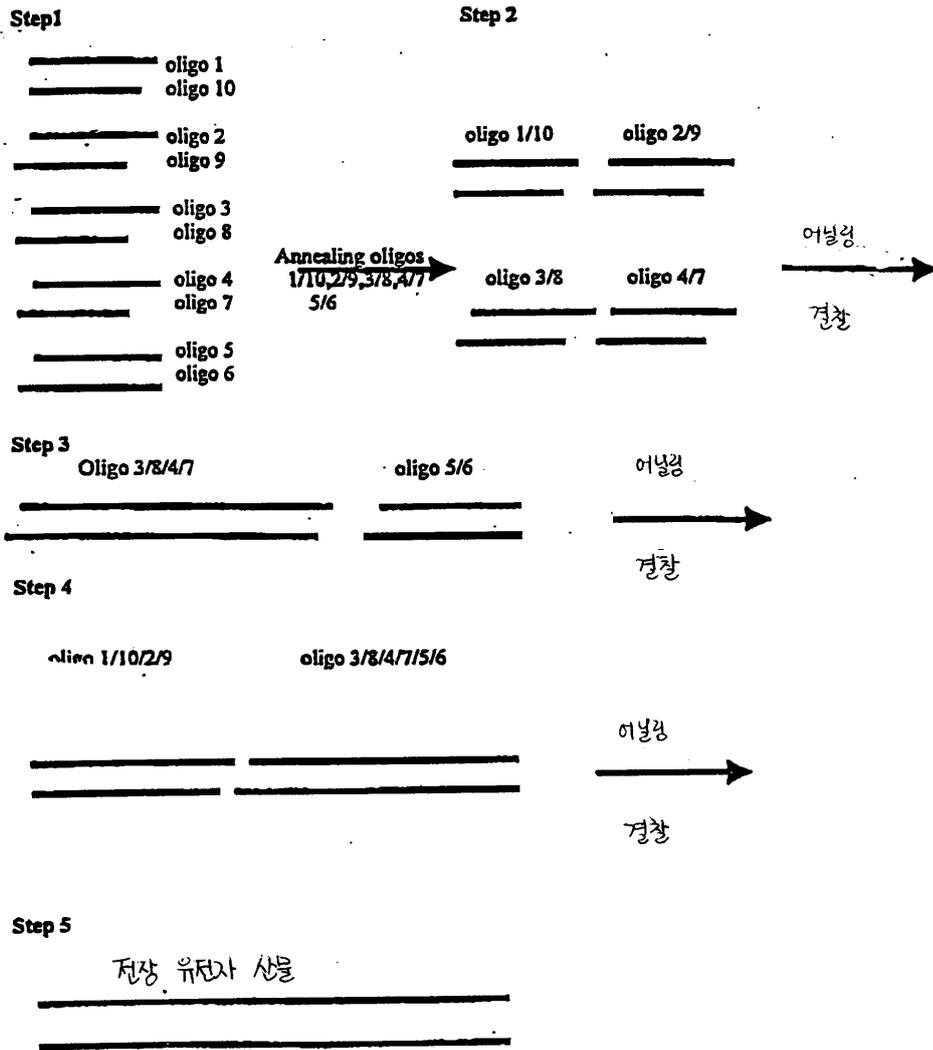
BKHDR43 5'CAGGTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGAT
AAATGGAGATACAAATTACGCCAGAAG 3'

BKHDR49 5'GAGCCTGCTCACCACTGAAAGGAGAGAAGCCAGGTGTGAATGTGTA
GCCAGAAGCCTTGCAAGACACCTTCACAGAAGCGCC 3'

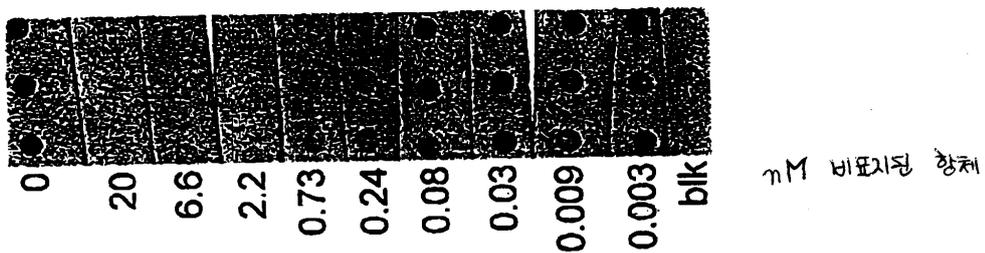
BKHDR53 5'GAATTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATA
AATGGAAGGCCTCCTGGCTTCTCTCCTTTCAGG 3'

BKHDR58 5'ATAGTAAACCTTCCCTGGAACTGAAAGGAGAGAAGCCAGGAGGCCTTC
CATTTATCCAGCCCATCCACTCCAGGCCCTGGCCAG 3'

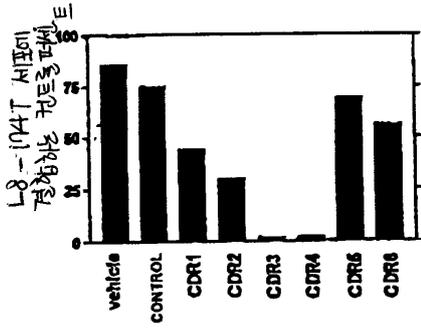
도면10



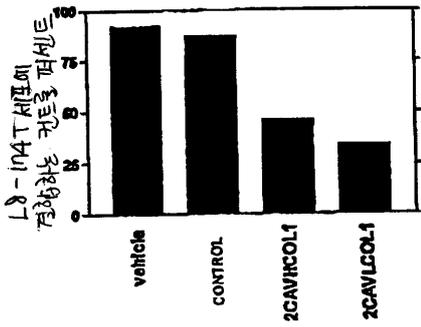
도면11



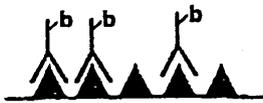
도면 12a



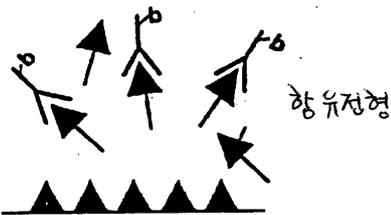
도면 12b



도면 12c



도면 12d



도면 13

oligo 1
 1 GACATTGTGA TGTCACAGTC TCCATCGTCC CTAGCTGTGT CAGTTGGAGA

oligo 2
 51 GAAGGTACT ATGAGCTGCA AGTCCAGTCA GAGGTTTTA TATAGTAGCA
 oligo 8

101 ATCAAAAGAT CTAGTTGGCC TGGTACCAGC AGAAACCAGG GCAGTCTCCT

oligo 3
 151 AAAGTCTGA TTTACTGGG ATCCACTAGG GAATCTGGG TCCGTGATCG
 oligo 7

oligo 4
 201 CTTACAGGC GGTGGATCTG GGACAGATT CACTCTCACC ATCAGCAGTG

251 TGAAGGCTGA AGACCTGGCA GTTTATTACT GTCAGCAATA TTATAGATAT
 oligo 6

oligo 6
 301 CCTCGGACGT TCGGTGGAGG CACCAGCTG GAAATCAAAC GG