



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년03월18일
 (11) 등록번호 10-1375153
 (24) 등록일자 2014년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
 C12N 5/12 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2006-7000109
 (22) 출원일자(국제) 2004년07월01일
 심사청구일자 2009년05월07일
 (85) 번역문제출일자 2006년01월02일
 (65) 공개번호 10-2006-0111440
 (43) 공개일자 2006년10월27일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2004/002464
 (87) 국제공개번호 WO 2005/003172
 국제공개일자 2005년01월13일
 (30) 우선권주장
 60/483,894 2003년07월02일 미국(US)
 60/545,471 2004년02월19일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 Blood, 100, 12. 4098-4107(2002.12.01.)
 전체 청구항 수 : 총 44 항

(73) 특허권자
위니베르시따 디 제노바
 이탈리아공화국, 이-16132 제노바, 비아 엘.베. 알베르띠, 2
이나뜨 파르마
 프랑스공화국, 에프-13009 마르세이유, 앙쉴앵 슈 멩 드 까쎌스, 121, 이퇴블르 그랑 프레
 (72) 발명자
모레따, 알레썬드로
 이탈리아공화국, 이-16133 제노바, 비아 니짜 18/8
델라 키에자, 마리엘라
 이탈리아공화국, 이-16038 산타 마르게리따 리구레, 비아 리오모르떼로 6아
 (74) 대리인
특허법인오리진

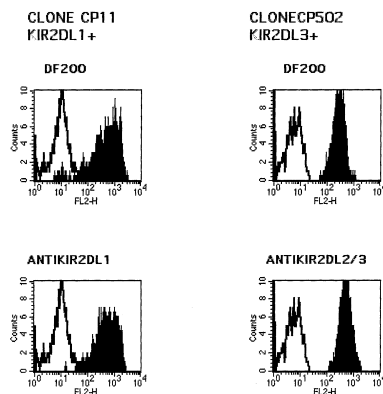
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **PAN-KIR2DL NK-수용체 항체 및 진단 및치료에서의 그 사용 방법**

(57) 요약

본 발명은 개체에서 면역 반응을 조절하기 위한 신규한 조성물 및 그 조절 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 포유류 개체에서 NK 세포의 활성을 조절하고 NK 세포 독성을 상승시키는 특성의 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 항체의 단편 및 유도체 뿐만 아니라 특히 치료에 있어서 개체에서 NK 세포 활성 또는 세포 독성을 증가시키기 위한 그 항체의 단편 및 유도체를 포함하는 약제 조성물 및 그 사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR(Killer Ig-Like Receptor: 살해세포 면역글로불린-유사 수용체) 수용체 유전자 생성물의 공통 에피토프에 결합하는 항체로서,

상기 항체는, KIR2DL1 및 KIR2DL2/3의 공통 에피토프에 결합하며; 상기 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 중 적어도 하나를 발현시키는 NK 세포에서 KIR이 중개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있으며; NKVSF1이 아니며; KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 결합하는 것에 대해 등록번호 CNM I-3224로 기탁된 세포에 의해 생산되는 단클론 항체 DF200과 경쟁하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

80 위치에 Lys 잔기를 갖는 HLA-C 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL1 수용체에 대한 결합, 및 80 위치에 Asn 잔기를 갖는 HLA-C 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL2/3 수용체에 대한 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

단클론 항체 또는 단클론 항체의 단편이며, 상기 단편이 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 다이어바디(diabody), 단일 체인(single-chain) 항체 단편 또는 다수의 다른 항체 단편을 포함하는 복합특이성(multispecific) 항체 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 5

제4항에 있어서,

등록번호 CNM I-3224로 기탁된 세포에 의해 생산되는 단클론 항체 DF200 또는 이의 단편이며, 상기 단편이 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 다이어바디(diabody), 단일 체인(single-chain) 항체 단편 또는 다수의 다른 항체 단편을 포함하는 복합특이성(multispecific) 항체 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서,

Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 다이어바디(diabody), 단일 체인(single-chain) 항체 단편 또는 다수의 다른 항체 단편을 포함하는 복합특이성(multispecific) 항체 중에서 선택되는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 7

제4항에 있어서,

인간화(humanized) 항체 또는 키메라 항체인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 8

a) 불멸화 세포; 및

b) 비활성화 KIR 폴리펩티드에 존재하는 에피토프를 포함하는 항원으로 면역화되고, 상기 불멸화 세포에 융합되는, 비-인간 포유류 숙주의 B 세포;를 포함하는 융합 세포로서,

상기 융합 세포는, KIR2DL1 및 KIR2DL2/3의 공통 에피토프에 결합하고 상기 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR이 중개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있는 단클론 항체를 생산하고; 단클

론 항체 NKVSF1을 생산하지 않으며,

상기 항체는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 결합하는 것에 대해 등록번호 CNM I-3224로 기탁된 세포에 의해 생산되는 단클론 항체 DF200과 경쟁하는 것을 특징으로 하는, 융합 세포.

청구항 9

제8항에 있어서,

80 위치에 Lys 잔기를 갖는 HLA-c 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL1 수용체에 대한 결합, 및 80 위치에 Asn 잔기를 갖는 HLA-C 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL2/3 수용체에 대한 결합을 억제하는 항체를 생산하는 것을 특징으로 하는 융합 세포.

청구항 10

삭제

청구항 11

제8항에 있어서,

등록번호 CNM I-3224로 기탁된 세포인 것을 특징으로 하는 융합 세포.

청구항 12

적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물의 공통 에피토프에 결합하는 항체를 생산하는 방법으로서, 상기 항체는 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR이 중개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있으며, 상기 방법은 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) 비-인간 포유류를 비활성화 KIR2DL 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로 면역화시키는 단계;
- b) 상기 면역화된 포유류로부터 상기 KIR2DL 폴리펩티드에 결합하는 항체를 제조하는 단계;
- c) 적어도 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3과 교차 반응하는 상기 b)의 항체를 선택하는 단계; 및
- d) 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포의 집단에서 KIR이 중개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있는 상기 c)의 항체를 선택하는 단계;

상기 c) 단계와 d) 단계의 순서는 임의적으로 역전될 수 있으며, 상기 항체는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 결합하는 것에 대해 등록번호 CNM I-3224로 기탁된 세포에 의해 생산되는 단클론 항체 DF200과 경쟁함.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 c) 단계 또는 d) 단계에서 선택되는 항체가 NKVSF1이 아닌 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 b) 단계에서 제조된 항체가 단클론 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 c) 단계에서 선택된 항체는, 80 위치에 Lys 잔기를 갖는 HLA-c 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL1 수용체에 대한 결합 및 80 위치에 Asn 잔기를 갖는 HLA-C 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL2/3 수용체에 대한 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 d) 단계에서 선택된 항체는 NK 세포 독성을 50% 이상 상승시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

제12항에 있어서,

상기 선택된 단클론 항체의 단편을 만드는 부가 단계를 포함하며, 상기 단편이 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 다이어바디(diabody), 단일 체인(single-chain) 항체 단편 또는 다수의 다른 항체 단편을 포함하는 복합특 이성(multispecific) 항체 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물의 공통 에피토프에 결합하는 항체를 생산하는 방법으로서, 상기 항체는 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR이 중개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있고, 상기 방법은 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

a) 라이브러리(library) 또는 레퍼토리오로부터, KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 결합하는 단클론 항체 또는 항체 단편을 선택하는 단계, 및

b) 상기 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR에 의해 중개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있는 상기 a)의 항체를 선택하는 단계;

상기 항체는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 결합하는 것에 대해 등록번호 CNCM I-3224로 기탁된 세포에 의해 생산되는 단클론 항체 DF200과 경쟁함.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 b) 단계에서 선택된 항체는 NKVSF1이 아닌 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 b) 단계에서 선택된 항체는, 80 위치에 Lys 잔기를 갖는 HLA-c 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL1 수용체에 대한 결합 및 80 위치에 Asn 잔기를 갖는 HLA-C 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL2/3 수용체에 대한 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 b) 단계에서 선택된 항체는 NK 세포 독성을 50% 이상 상승시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

삭제

청구항 24

제19항에 있어서,

상기 선택된 단클론 항체의 단편을 만드는 부가 단계를 포함하며, 상기 단편이 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 다이어바디(diabody), 단일 체인(single-chain) 항체 단편 또는 다수의 다른 항체 단편을 포함하는 복합특 이성(multispecific) 항체 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물의 공통 에피토프에 결합하는 항체를 생산하는 방법으로서, 상기 항체는 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR이 중개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있고, 상기 방법은 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) 상기 단클론 항체의 발현을 유발하는 조건하에서, 제8항, 제9항 또는 제11항에 따른 융합 세포를 배양하는 단계; 및
- b) 상기 융합 세포로부터 상기 단클론 항체를 분리하는 단계.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 단클론 항체의 단편을 만드는 부가 단계를 포함하며, 상기 단편이 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 다이어바디(diabody), 단일 체인(single-chain) 항체 단편 또는 다수의 다른 항체 단편을 포함하는 복합특이성(multispecific) 항체 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물의 공통 에피토프에 결합하는 항체를 생산하는 방법으로서, 상기 항체는 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR이 중개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있고, 상기 방법은 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) 제8항, 제9항 또는 제11항에 따른 융합 세포로부터 상기 단클론 항체를 인코딩하는 DNA를 분리하는 단계;
- b) 인간화 항체, 키메라 항체, 단일 체인 항체 또는 항체의 면역반응성 단편 중에서 선택되는 변형된 또는 유도된 항체를 인코딩할 수 있도록 상기 DNA를 임의적으로 변형하는 단계, 여기서 상기 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 다이어바디(diabody), 단일 체인(single-chain) 항체 단편 또는 다수의 다른 항체 단편을 포함하는 복합특이성(multispecific) 항체 중에서 선택되는 것임;
- c) 상기 항체 또는 항체 단편이 상기 발현 벡터가 자라는 숙주 세포 내에 존재할 때 발현될 수 있도록, 상기 DNA 또는 변형된 DNA를 발현 벡터에 삽입하는 단계;
- d) 다른 경우에는 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포를 상기 발현 벡터로 감염시키는 단계;
- e) 상기 항체 또는 항체 단편의 발현을 유발하는 조건하에서 상기 감염된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- f) 상기 감염된 숙주 세포에 의해 생산된 항체 또는 항체 단편을 분리하는 단계.

청구항 28

적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물의 공통 에피토프에 결합하고, 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포에서 KIR이 중개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있으며, 환자 또는 NK 세포 함유 생물학적 샘플에서 NK 세포 독성을 검출가능하게 상승시킬 수 있는 분량으로 존재하며, KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 결합하며, KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 결합하는 것에 대해 등록번호 CNCM I-3224로 기탁된 세포에 의해 생산되는 단클론 항체 DF200과 경쟁하는 항체; 및 약제학적으로 수용할 수 있는 캐리어 또는 첨가제;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 암, 다른 증식성 장애, 전염성 질병 또는 면역 장애 치료용 약제 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서,

면역 조절제, 호르몬제, 화학 요법제, 항-혈관형성제(anti-angiogenic agent), 사멸제(apoptotic agent), 비활성화 KIR 수용체에 결합하여 그것을 비활성화시키는 제2 항체, 항감염제, 타겟팅제(targeting agent) 또는 부가 화합물에서 선택되는 치료제를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 30

제28항에 있어서,

상기 면역 조절제는 IL-1(interleukin-1) 알파, IL-1 베타, IL-2(interleukin-2), IL-3(interleukin-3), IL-4(interleukin-4), IL-5(interleukin-5), IL-6(interleukin-6), IL-7(interleukin-7), IL-8(interleukin-8), IL-9(interleukin-9), IL-10(interleukin-10), IL-11(interleukin-11), IL-12(interleukin-12), IL-13(interleukin-13), IL-15(interleukin-15), IL-21(interleukin-21), TGF(transforming growth factor)-베타, GM-CSF(granulocyte macrophage colony-stimulating factor), M-CSF(macrophage colony-stimulating factor), G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor), TNF(tumor necrosis factor)-알파, TNF-베타, LAF(leukocyte activating factor), TCGF(T cell growth factor), BCGF(B cell growth factor), TRF(T cell replacing factor), BAF(B cell activating factor), BDG(beta-D-glucan), MP(microparticle), LIF(leukemia inhibitory factor), OSM(oncostatin M), TMF(thymocyte mitogenic factor), PDGF(platelet-derived growth factor), IFN(interferon)-알파, IFN-베타 또는 IFN-감마에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 31

제29항에 있어서,

상기 화학 요법제는 알킬화제제(Alkylating agent), 대사길항제(antimetabolites), 세포 독성 항생제, 아드리아마이신, 닥티노마이신, 미토마이신, 카르미오마이신, 다우노마이신, 독소루비신, 타목시펜, 탁솔, 텍소티어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈(vinorelbine), 에토포사이드(VP-16), 5-플루오르우라실(5FU), 시토신 아라비노사이드, 시클로포스파미드, 티오테파, 메토티렉사트, 캄포테신, 악티노마이신-D, 미토마이신 C, 시스플라틴(CDDP), 아미노프테린, 컴브레테스테틴(combretastatin(s)), 다른 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid) 및 이의 프로드러그(prodrug)에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 32

제29항에 있어서,

상기 호르몬제는 루프로렐린(leuprorelin), 고세렐린(goserelin), 트립토펠린(triptorelin), 부세렐린(buserelin), 타목시펜(tamoxifen), 토레미펜(toremifene), 플루타미드(flutamide), 닐루타미드(nilutamide), 시프로테론(cyproterone), 비칼루타미드(bicalutamid), 애너스트로졸(anastrozole), 엑스메스탄(exemestane), 레트로졸(letrozole), 파드로졸(fadrozole), 메드록시(medroxy), 클로르마디논(chlormadinone), 메게스트롤(megestrol), 다른 LHRH(luteinizing hormone-releasing hormone) 촉진제, 다른 항-에스트로젠, 다른 항-안드로젠, 다른 아로마테이즈(aromatase) 억제제 및 다른 프로게스타젠에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 33

제29항에 있어서,

상기 부가 화합물은 페노티아진계 약제(phenothiazines), 치환된 벤즈아미드, 항히스타민제, 항정신병약물(Butyrophenones), 코티코스테로이드(Corticosteroids), 벤조디아제핀(Benzodiazepines), 카나비노이드(cannabinoid), 졸레드로닉산(zoledronic acid), 파미드로닉산(pamidronic acid), 에리스로포이에틴(erythropoietin), G-CSF, 필그라스티움(filgrastim), 레노그라스티움(lenograstim), 다베포이에틴(darbepoietin), 다른 항-구토제(anti-emetics), 다른 세로토닌 길항제, 다른 비스포스포네이트(bisphosphonates) 및 다른 적혈구 생성 촉진 인자에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 34

제29항에 있어서,

상기 사멸제(apoptotic agent)는 bcr-abl(break point cluster-Abelson), bcl-2(B-cell lymphoma 2), Bcl-xl(B-cell lymphoma-extra large), Mcl-1(myeloid cell leukemia sequence 1), Bak(BCL2-antagonist/killer), A1 또는 A20에서 선택되는 유전자의 발현을 억제하는 안티센스 뉴클레오티드 서열, RNAi, siRNA 또는 작은 분자

화학 화합물인 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 35

제29항에 있어서,

상기 항-혈관형성제(anti-angiogenic agent)는 중화하는 항체, 안티센스 RNA, siRNA, RNAi, RNA 앵타머 (aptamers) 또는 VEGF를 인코딩하는 유전자, VEGF 수용체를 인코딩하는 유전자, VEGF, 또는 VEGF 수용체에 대항 하는 리보자임; 또는 VEGF에 대하여 상반되는 특성을 갖는 VEGF 변이체에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 36

제29항에 있어서,

상기 비활성화 KIR 수용체에 결합하여 수용체를 비활성화시키는 제2 항체는, 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물에 존재하는 공통 에피토프에 결합하는 항체에 의해 결합되는 에피토프와 다른 비활성화 KIR 수용체의 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편이며, 상기 단편이 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 다이어바디(diabody), 단일 체인(single-chain) 항체 단편 또는 다수의 다른 항체 단편을 포함하는 복합특이성(multispecific) 항체 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 37

제28항에 있어서,

상기 약제 조성물은 편평상피 세포(squamous cell) 암종, 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia), B-세포 림프종, T-세포 림프종, Hodgkins 림프종, non-Hodgkins 림프종, Hairy-cell 림프종, Burketts 림프종, 급성 또는 만성 골수성 백혈병, 전골수성 백혈병, 섬유육종 (Fibrosarcoma), 횡문근종육종(rhabdomyosarcoma); 흑색종(melanoma), 정상피종, 기형암종 (Teratocarcinoma), 신경아세포종(neuroblastoma), 신경교종(glioma), 신경집종(schwannomas); 섬유육종 (Fibrosarcoma), 횡문근종육종(rhabdomyosarcoma), 골육종(Osteosarcoma), 흑색종(melanoma), 색소성건피증 (xeroderma pigmentosum), 각화극세포종(keratocanthoma), 정상피종, 여포상갑상선암(follicular thyroid cancer), 기형암종(tetratocarcinoma), 방광, 가슴, 결장, 신장, 간, 폐, 난소, 전립선, 췌장, 위, 목, 갑상선 및 피부의 다른 암종, 다른 입과구 계통 조혈성 종양, 다른 골수 계통의 조혈성 종양, 다른 중간엽 (mesenchymal) 기관의 종양, 다른 중추신경 시스템 및 말초신경 시스템의 종양, 또는 다른 중간엽 기관의 종양 을 치료하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서,

상기 약제 조성물은 입과구 계통 조혈성 종양을 치료하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 종양은 작은 세포 및 주름진 세포 형태를 포함하여 T-전입과구성백혈병(prolymphocytic leukemia)(T-PLL); T-세포 형태의 큰 과립 림프성 백혈병(LGL); 세자리증후군(Sezary syndrome:SS); 성인의 T세포 백혈병과 림프종 (ATLL); a/d T-NHL 간비장 림프종; 다세포 또는 면역 모세포 아류의 주변/후-흉선 형성 T 세포 림프; 앤지오 (angio) 면역모세포 T-세포 림프종; 앤지오센트릭(angiocentric)(코) T-세포 림프종; 미분화(Ki 1+) 큰 세포 림프종; 장의 T-세포 림프종; T-입과구성; 또는 림프종/백혈병(T-Lbly/T-ALL)에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 40

제28항에 있어서,

상기 약제 조성물은 과다형성(hyperplasia), 섬유증, 혈관 생성(angiogenesis), 건선(psoriasis), 죽상동맥경 화증(atherosclerosis), 혈관 형성이 따르는 협착증 또는 재협착증에서 선택되는 증식성 장애 및 혈관에서의 민

무늬근 증식을 특징으로 하는 다른 질병을 치료하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 41

제28항에 있어서,

상기 약제 조성물은 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 수두, 아데노바이러스, 단순포진바이러스-1(HSV-1), 단순포진바이러스-2(HSV-2), 우역, 코감기 바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스, 호흡계 활액 바이러스(respiratory syncytial virus), 유두종 바이러스, 사이토메갈로(거세포) 바이러스, 에키노바이러스(echinovirus), 아르보바이러스, 헌타바이러스(huntavirus), 수족구병 바이러스(coxsackie virus), 볼거리 바이러스(Mumps Virus), 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 소아마비 바이러스 및 인체 면역결핍 바이러스-1, -2(HIV-1, HIV-2)에서 선택되는 바이러스에 의해 유발되는 전염성 질병을 치료하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 42

제28항에 있어서,

상기 약제 조성물은 포도상구균, 인후염 원인균(S. pyogenes), 장구균, 탄저균, 락토바실러스, 리스테리아, 코리네박테리아 디프테리아, G. 바지날리스; 노카디아; 스트렙토미세스, 터모악티노미세스 불가리스; 트레포넬라; 캄필라오박터(campylobacter), 래루기노사(Raeruginosa); 레지오넬라; 개요 임균(Neisseria gonorrhoeae); 뇌수막염균(Neisseria Meningitides); F. 메닝고셉티쿰(meningosepticum); F. 오도라턴(odoraturm); 부루셀라; 백일해; 보데텔라 브론키셉티카; 대장균; 폐렴간균; 엔테로박테르(enterobacter); 영균(Serratia marcescens); S. 리큐페션(liquefaciens); 에드워드시엘라(Edwardsiella); 프로테우스 미라빌리스(proteus mirabilis); 프로테우스 불가리스; 스트렙토바실러스; 리케치아 픽케스피; 앵무새병 클라미디아; 클라미디아 트라코마티스를; 결핵균, 미코박테륨 인트라셀룰라, 미코박테륨 폴루이턴, 나균, 미코박테륨아비움균, 우형 결핵균, 아프리카 결핵균, 미코박테륨 간사시, 미코박테륨 인트라셀룰라, 미코박테륨 레프라누리움(mycobacterium lepraernurium); 노카르디아(Nocardia), 다른 연쇄상 구균, 다른 바실러스, 다른 가드넬라, 다른 수도모나스, 다른 임균, 다른 플라보박테리아, 다른 보데텔라, 다른 대장균, 다른 세라티아, 다른 프로테우스, 다른 리케치아과, 다른 클라미디아, 다른 미코박테륨, 리슈마니아(Leishmania), 콕크지디아(kokzidioa), 트리파노조마(Trypanosoma), 클라미디아(chlamydia) 또는 리케치아(rickettsia)에서 선택되는 박테리아, 원생생물 또는 기생충에 의해 유발되는 전염성 질병을 치료하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 43

제28항에 있어서,

상기 부가 치료제는 상기 항체와 함께 단일 복용 형태 또는 개별적인 복용 형태로서 투여되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 44

제1항에 있어서,

독소, 검출할 수 있는 모이어티(moiety) 또는 고체 지지체에 접합하거나 공유결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 45

생물학적 샘플에서 세포 표면에 비활성화 KIR을 갖고 있는 NK 세포의 존재를 검출하는 시험관내 방법으로서, 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- a) 상기 생물학적 샘플과 검출할 수 있는 모이어티에 접합하거나 공유결합된 제44항의 항체를 접촉시키는 단계; 및
- b) 상기 생물학적 샘플에서 상기 항체의 존재를 검출하는 단계.

청구항 46

세포 표면에 비활성화 KIR을 갖고 있는 샘플 NK 세포를 정제하는 시험관내 방법으로서, 하기를 포함하는 것을

특징으로 하는 방법:

- a) 세포 표면에 비활성화 KIR을 갖고 있는 상기 NK 세포를 고체 지지체에 접합하거나 공유결합된 상기 항체에 결합하게 하는 조건하에서, 상기 샘플과 제44항의 항체를 접촉시키는 단계; 및
- b) 고체 지지체에 접합하거나 공유결합된 상기 항체로부터 상기 결합된 NK 세포를 분리하는 단계.

청구항 47

제1항에 따른 항체를 포함하는, 암, 다른 증식성 장애, 전염성 질병 또는 면역 장애 치료용 약제 조성물로서, 상기 항체가 리포솜에 통합되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 48

제47항에 있어서,
유전자 치료를 위해 유전자를 전달하기 위한 핵산 분자; NK 세포에서 유전자의 발현을 억제하기 위한 안티센스 RNA, RNAi 또는 siRNA의 전달을 위한 핵산 분자; 또는 NK 세포의 표적 살상을 위한 독소 또는 약제에서 선택되는 부가 물질이 상기 리포솜에 부가적으로 통합되는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 포유류 개체 또는 생물학적 샘플에서 NK 세포의 세포 표면에 존재하는 둘 이상의 비활성화 수용체 (inhibitory receptors)와 교차 반응하고 NK 세포 독성을 상승시키는 항체, 항체 단편 및 그 유도체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 항체, 단편, 변형들 및 유도체; 이를 포함하는 약제 조성물을 만드는 방법 및 특히 치료에 있어서 개체에서 NK 세포 활성 또는 세포 독성을 증가시키기 위해 이러한 분자들 및 조성물의 사용방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 자연 살해(NK) 세포는 림프구의 하위 집단이고, 비양식화된 면역에 관여한다. NK 세포는 혈액 샘플, 혈구 성분 등등과 같은 것에서 관련 분야에서 알려진 여러 기술로 획득할 수 있다.
- [0003] NK 세포의 특징 및 생물학적 특성은 CD16, CD56 및/또는 CD57를 포함하는 표면 항원의 발현; 세포 표면에 알파/베타 또는 감마/델타 TCR 복합체의 부재; 특징의 세포 용해 효소의 활성화에 의해 "자기(self)" MHC/HLA 항원을 발현시키지 못하는 세포에 결합하여 살상하는 능력; NK 활성화 수용체-리간드를 발현시키는 종양 세포 또는 다른 질병 세포를 살상하는 능력; 면역 반응을 촉진하거나 저해하는 시토킨을 방출하는 능력; 및 다수의 세포 분열을 하고 부모 세포와 유사한 생물학적 특성을 가진 딸 세포를 생산하는 능력을 포함한다. 본 명세서의 내용에서 "활성" NK 세포는 생물학적으로 활성인 NK 세포, 더 구체적으로 표적 세포를 용해시키는 능력을 가진 NK 세포를 의미한다. 예를 들어, "활성" NK 세포는 NK 활성화 수용체-리간드를 발현시키고 "자기" MHC/HLA 항원을 발현시키지 못하는 세포(KIR-양립할 수 없는 세포)를 살상할 수 있다.
- [0004] NK 세포의 생물학적 특성에 기초하여, 관련 분야에서는 NK 세포의 조절을 통한 여러 가지 치료 및 접종 방법이 제안되었다. 그러나, NK 세포 활성화는 활성화 및 비활성화 신호 모두를 포함하는 복합적인 메커니즘에 의해 조절된다. 따라서, NK 세포가 관여하는 효과적인 치료는 이러한 세포들의 활성화 및 비활성화 신호의 중화(neutralization) 모두를 필요로 한다.
- [0005] NK 세포는 주조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex)(MHC) class I-특정의 비활성화 수용체에 의해 부정적으로 조절된다(Karre 외, 1986; Ohlen 외, 1989). 이러한 특성의 수용체는 다른 세포에 존재하는 MHC class I 분자 또는 HLA의 다형의 결정자에 결합하고 NK 세포 용해를 비활성화시킨다. 사람의 경우, killer Ig-like receptors(KIRs)라는 용어의 수용체 군의 어떤 구성원은 HLA class I 대립 유전자 그룹을 인식한다.
- [0006] KIRs는 NK 세포를 포함하여 림프구의 어떤 서브셋(subset)에 존재하는 수용체의 큰 집단이다. KIRs의 명명법은 세포 밖의 도메인의 수에 기초하고(KIR2D 또는 KIR3D) 세포질 꼬리가 길거나(KIR2DL 또는 KIR3DL) 또는 짧은 것(KIR2DS 또는 KIR3DS)에 기초한다. 사람의 경우, 주어진 KIR의 존재는 한 개인에 존재하는 NK 집단 내에서 하나의 NK 세포에서 다른 것으로 변화할 수 있다. 사람 집단 내에서 또한 상대적으로 높은 값의 KIR 분자의 다형성이 존재하고, 어떤 KIR 분자는 일부 사람에게는 존재하지만 모든 개인에게 존재하는 것은 아니다. 어떤 KIR 유전자 생성물은 적절한 리간드에 결합했을 때 림프구의 활성을 자극한다. 확인된 활성화 KIRs 모두는 면역 자극적인 모티프(immunostimulatory motif:ITAM)를 가진 적응 인자 분자와 연관된 대전된 트랜스멤브레인 잔기를 구비한 짧은 세포질 꼬리를 가진다. 다른 KIR 유전자 생성물은 본질적으로 비활성이다. 모든 확인된 비활성화 KIRs는 긴 세포질 꼬리를 가지고 KIR 아류형에 따라 HLA 항원의 다른 서브셋과 상호 작용을 나타낸다. 비활성화 KIRs는 세포질내 부분을 나타내거나 또는 포스파타아제(phosphatases)를 모으는 여러 비활성화 모티프를 나타낸다. 알려진 비활성화 KIR 수용체는 KIR2DL 및 KIR3DL 아과(亞科)의 구성 요소를 포함한다. 두 Ig 도메인을 가진 KIR 수용체(KIR2D)는 HLA-C 알로타이프(allo type)를 확인한다: KIR2DL2(전에 p58.2로 지시됨) 또는 상당히 연관된 유전자 생성물 KIR2DL3은 그룹 2 HLA-C 알로타이프(Cw1,3,7,8)에 의해 공유된 에피토프(epitope)를 인식하는 반면, KIR2DL1(p58.1)은 상보적인 그룹 1 HLA-C 알로타이프(Cw2,4,5,6)에 의해 공유되는 에피토프를 인식한다. KIR2DL1에 의한 인식은 HLA-C 대립 유전자의 80 위치에 Lys(리신) 잔기의 존재에 의해 지시된다.
- [0007] KIR2DL2 및 KIR2DL3 인식은 80 위치에 Asn(아스파라긴) 잔기의 존재에 의해 지시된다. 중요하게도 상당한 양의 HLA-C 대립 유전자는 80 위치에 Asn 또는 Lys를 가진다. 세 개의 Ig 도메인을 가진 하나의 KIR인 KIR3DL1(p70)은 HLA-Bw4 대립 유전자에 의해 공유된 에피토프를 인식한다. 마지막으로, 세 개의 Ig 도메인을 가진 동종복합체(homodimer)인 KIR3DL2(p140)는 HLA-A3 및 HLA-A11을 인식한다.
- [0008] 비록 비활성화 KIRs 및 다른 class-I 비활성화 수용체(Moretta 외, 1997; Valiante 외 1997; Lanier, 1998)는 어떤 주어진 개인의 NK 레퍼토리에서 NK 세포에 의해 공동 발현될 수 있지만, 단일 KIR을 발현시키는 세포들이 있고, 상응하는 NK 세포는 단지 특정 class I 대립 유전자 그룹을 발현시키는 세포에 의해 방해된다.
- [0009] KIR에 부적당하게 짝지워진 NK 세포 집단 또는 클론들, 즉 숙주의 HLA 분자와 양립할 수 없는 KIR을 발현시키는 NK 세포 집단은 이종형 이식에서 보여지는 조직 항-백혈병 효과의 가장 그럴듯한 중개자인 것으로 드러났다(Ruggeri 외, 2002). 주어진 개체에서 이러한 효과를 재현하는 한 가지 방법은 KIR/HLA 상호작용을 방지하는 반응물을 사용하는 것이다.
- [0010] KIR2DL1에 특정한 단클론 항체는 KIR2DL1과 Cw4(또는 유사한 것) 대립 유전자의 상호작용을 방지하는 것으로 드러났다(Moretta 외, 1993). KIR2DL2/3에 대항하는 단클론 항체는 또한 KIR2DL2/3과 HLA-Cw3(또는 유사한 것) 대

립 유전자의 상호작용을 방지하는 것으로 기술되었다(Moretta 외, 1993). 그러나, 임상에서 이러한 반응물의 사용은 모든 환자를 치료하기 위해서 어떤 정해진 환자가 class 1 또는 class 2 HLA-C 대립 유전자를 발현시킬지라도 두 치료상의 mAbs의 개선을 필요로 할 것이다. 또한, 어떤 치료 항체를 사용할지를 결정하기 전에 각 개인이 어떤 HLA 타입을 발현시킬지를 미리 결정하여야 하기 때문에 결과적으로 치료 비용은 훨씬 더 상승한다.

[0011] Watzl 외는 조직 항원(Tissue Antigen), 56, p.240(2000)에서 KIRs의 복합 아이소타이프(isotype)를 인식하는 교차반응하는 항체를 제조하였지만, 이러한 항체들은 NK 세포 활성을 상승시키지 않았다. G. M. Spaggiara 외는 혈액(Blood), 100, pp.4098-4107(2002)에서 여러가지 KIRs에 대해 수 많은 단클론 항체를 사용하는 실험을 실행하였다. 이러한 항체들 중 하나인 NKVSF1은 CD158a(KIR2DL1), CD158b(KIR2DL2) 및 p50.3(KIR2DS4)의 공통적인 에피토프를 인식하는 것으로 나타났다. 이는 NKVSF1이 NK 세포 활성을 상승시킬 수 있다는 것을 의미하지 않고 그것이 치료에 사용될 수 있다는 것을 의미하지도 않는다. 따라서, NK 세포 활성의 조절에 대한 실질적이고 효과적인 접근법은 관련 분야에서 아직까지는 존재하지 않으며 여전히 특정 반응물을 사용하여 HLA 대립 유전자에 특정한 개입을 필요로 한다.

발명의 상세한 설명

[0012] 따라서, 본 발명은 NK 세포 활성화에서 현재의 어려움을 극복하는 신규한 항체, 조성물 및 방법을 제공하고 부가적인 바람직한 특징 및 장점을 제공한다. 한 가지 대표적인 관점에서, 본 발명은 사실상 모든 사람에서 사람의 NK 세포의 활성화를 촉진하는 단일 항체를 제공한다. 더 구체적으로, 본 발명은 여러 비활성화 KIR 그룹과 교차 반응하여 그들의 비활성화 신호를 중화시키는 신규한 특정 항체를 제공하고, 이러한 비활성화 KIR 수용체를 발현시키는 NK 세포에서 NK 세포의 세포 독성을 상승시키게 된다. 복합의 KIR 유전자 생성물과 교차 반응하는 이러한 능력은 사람 개체의 HLA 형태를 미리 정해야 하는 부담이나 비용을 소비할 필요없이, 본 발명의 항체가 대부분의 사람 개체에서 NK 세포 활성을 상승시키는데 효과적으로 사용되게 한다.

[0013] 제1 관점에서, 본 발명은 항체, 항체 단편 및 각각의 유도체를 제공하고, 이러한 항체, 단편 또는 유도체는 NK 세포 표면에서 적어도 두 개의 비활성화 KIR 수용체와 교차 반응하여 NK 세포의 비활성화 신호를 중화하고(neutralizing), NK 세포의 활성을 상승시킨다. 더 바람직하게는, 그 항체는 사람의 KIR2DL 수용체의 공통적인 결정자를 결합한다. 더욱 더 구체적으로, 본 발명의 항체는 적어도 KIR2DL1, KIR2DL2 및 KIR2DL3 수용체를 결합한다. 본 발명의 목적을 위해, "KIR2DL2/3"이라는 용어는 KIR2DL2 및 KIR2DL3 수용체 각각 또는 둘 다를 지시한다. 이러한 두 수용체는 매우 높은 상동관계(homology)를 가지고, 아마 같은 유전자의 대립형이며, 관련 분야에서는 호환성이 있는 것으로 여겨진다. 따라서, KIR2DL2/3는 본 발명의 목적을 위해 단일 비활성화 KIR 분자인 것으로 여겨지고 따라서 단지 KIR2DL2 및 KIR2DL3과 교차 반응하는 항체 및 어떤 다른 비활성화 KIR 수용체는 본 발명의 범위 내에 있지 않다.

[0014] 본 발명의 항체는 MHC 또는 HLA 분자가 적어도 두 개의 비활성화 KIR 수용체에 결합하는 것을 특정적으로 저해하여 NK 세포 활성을 촉진한다. 양 활성은 이하에서 사용되는 것처럼, "KIR의 비활성화 활성을 중화하다"라는 용어에 의해 추론된다. 본 발명의 내용에서 "NK 세포 활성을 촉진하다", "NK 세포 독성을 촉진하다", "NK 세포를 촉진하다", "NK 세포 활성을 상승시키다", "NK 세포 독성을 상승시키다" 또는 "NK 세포를 상승시키는" 본 발명 항체의 능력은 그 항체가 표면에 비활성화 KIR 수용체를 발현하는 NK 세포가 그 표면에 특정의 비활성화 KIR 수용체에 대한 상응하는 리간드를 발현하는 세포(예를 들어, HLA 항원)를 용해시키게 함을 의미한다. 특정 관점에서, 본 발명은 HLA-C 분자가 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 수용체에 결합하는 것을 특정적으로 저해하는 항체를 제공한다. 다른 특정 관점에서, 본 발명은 생체 안에서(in vivo) NK 세포 활성을 촉진시키는 항체를 제공한다.

[0015] KIR2DL1 또는 KIR2DL2/3 중 적어도 하나는 사람 집단에서 약 90%가 존재하기 때문에, 본 발명의 더 바람직한 항체는 대부분의 HLA-C 알로타이프 관련 세포, 각각 그룹 1 HLA-C 알로타이프 및 그룹 2 HLA-C 알로타이프에 대항하여 NK 세포 활성을 촉진할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 대부분의 사람, 일반적으로 약 90% 이상의 사람에서 NK 세포를 효과적으로 활성화시키거나 상승시키는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 단일 항체 조성물은 대부분의 사람을 치료하는데 사용될 수 있고, 대립 그룹을 결정하거나 항체 각테일을 사용할 필요가 거의 없다.

[0016] 처음으로 본 발명은 비활성화 KIRs에 대하여 교차 반응하고 중화하는 항체를 만들 수 있고, 이러한 항체가 폭 넓은 범위의 사람들에게 NK 세포의 효과적인 활성화를 허용함을 기술한다.

[0017] 따라서, 본 발명의 특정 목적은 항체에 존재하며, 상기 항체는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 인체 수용체 모두를 특정

적으로 결합하고 이러한 KIRs에 의해 증개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 역전시킨다. 일 실시 형태에서, 이러한 항체는 융합 세포(hybridoma) DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200과 경쟁한다. 임의적으로, 항체 DF200과 경쟁하는 상기 항체는 항체 DF200 그 자체는 아니다.

- [0018] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 항체는 단클론 항체 NKVSF1과 경쟁하고, 임의적으로 항체 NKVSF1과 경쟁하는 항체는 항체 NKVSF1 그 자체는 아니다.
- [0019] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 항체는 항체 1-7F9와 경쟁한다.
- [0020] 바람직하게는 상기 항체들은 키메라항체(chimeric antibodies), 인간화 항체 (humanized antibodies), 또는 인체 항체(human antibodies)이다.
- [0021] 특정 단클론 항체(예를 들어, DF200, NKVSF1, 1-7F9, EB6, GL183)를 언급할 때 "경쟁하다"라는 용어는 항체가 재조합 KIR 분자 또는 표면 발현된 KIR 분자를 사용하는 결합 분석에서 단클론 항체(예를 들어, DF200, NKVSF1, 1-7F9, EB6, GL183)와 경쟁하는 것을 의미한다. 예를 들어, 만약 항체가 결합 분석에서 KIR 분자에 대한 DF200의 결합을 감소시킨다면, 그 항체는 DF200과 "경쟁한다". DF200과 "경쟁하는" 항체는 KIR2DL1 인체 수용체, KIR2DL2/3 인체 수용체, 또는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 인체 수용체 둘 모두의 결합에서 DF200과 경쟁할 수 있다.
- [0022] 바람직한 실시 형태에서, 본 발명은 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 인체 수용체 둘 모두에 결합하고, 이러한 KIRs에 의해 증개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 반전시키며, KIR2DL1 인체 수용체, KIR2DL2/3 인체 수용체, 또는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 인체 수용체 둘 모두에 대한 결합에서 DF200, 1-7F9 또는 NKVSF1과 경쟁하는 항체를 제공한다. 임의적으로, 상기 항체는 키메라, 인체 또는 인간화 항체이다.
- [0023] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 인체 수용체 둘 모두를 결합하고, 이러한 KIRs에 의해 증개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 반전시키며, KIR2DL1 인체 수용체에 대한 결합에서 EB6와 경쟁하고, KIR2DL2/3 인체 수용체에 대한 결합에서 GL183과 경쟁하며, 또는 KIR2DL1 인체 수용체에 대한 결합에서 EB6 및 KIR2DL2/3 인체 수용체에 대한 결합에서 GL183 둘 모두와 경쟁하는 항체를 제공한다. 임의적으로, 상기 항체는 NKVSF1이 아니다; 임의적으로 상기 항체는 DF200이 아니다. 선택적으로, 상기 항체는 키메라, 인체 또는 인간화 항체이다.
- [0024] 바람직한 관점에서, 본 발명은 DF200과 경쟁하고 단클론 항체 DF200처럼 KIR 분자에 본질적이거나 필수적으로 같은 또는 같은 에피토프 또는 "에피토프 자리"를 인식하고, 결합하거나 또는 면역특정성을 가지는 항체를 제공한다. 바람직하게는, 상기 KIR 분자는 KIR2DL1 인체 수용체 또는 KIR2DL2/3 인체 수용체이다.
- [0025] 본 발명의 특정 목적은 항체에 존재하며, 상기 항체는 KIR2DL1 인체 수용체 및 KIR2DL2/3 인체 수용체 모두에 존재하는 공통적인 결정자를 결합하고 이러한 KIRs에 의해 증개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 반전시킨다. 이러한 항체는 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200 또는 융합 세포 NKVSF1에 의해 생산된 항체 NKVSF1처럼 KIR에 실질적으로 같은 자리에 더 특정적으로 결합하며, 이러한 항체는 NKVSF1이 아니다.
- [0026] 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 항체는 단클론 항체이다. 본 발명의 가장 바람직한 항체는 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200이다.
- [0027] 항체 DF200을 생산하는 융합 세포는 프랑스, 파스퇴르 연구소, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25, Rue Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, CNCM 배양 컬렉션에 확인 번호 "DF200", 등록 번호 CNCM I-3224로서 2004년 6월 10일 등록되어 기탁되었다. 항체 NKVSF1은 Serotec(Cergy Sainte-Christophe, France), Catalog 참조 번호 MCA2243에서 이용할 수 있다. NKVSF1은 또한 이하에서 pan2D mAb로 언급된다.
- [0028] 본 발명은 또한 여기서 기술한 항체의 기능적인 단편 및 유도체를 제공하는데, 이는 실질적으로 유사한 항원 특이성 및 활성(예를 들어, 부모 항체와 교차 반응할 수 있고 비활성화 KIR 수용체를 발현시키는 NK 세포의 세포 독성 활성을 상승시킨다)을 가지며, 제한 없이 Fab 단편, Fab'2 단편, 면역 접착(immunoadhesion), 다이아바디(diabody), CDR, 및 ScFv를 포함한다. 또한, 본 발명의 항체들은 인간화, 인간 또는 키메라 항체이다.
- [0029] 본 발명은 또한 독소, 방사성 핵종(radionuclide), 검출할 수 있는 모이어티(예를 들어, 형광제(fluor)) 또는 고체 지지체에 접합하거나 공유 결합한 본 발명의 항체를 포함하는 항체 유도체를 제공한다.
- [0030] 본 발명은 또한 상기한 항체, 그 항체의 단편, 또는 각각의 유도체를 포함하는 약제 조성물을 제공한다. 따라서, 본 발명은 또한 약제 제조를 위한 방법에서 상기한 항체의 사용 방법에 관한 것이다. 바람직한 실시 형

태에서, 상기 약제 또는 약제 조성물은 암 또는 다른 증식성 장애, 감염의 치료 또는 이식에 사용하기 위한 것이다.

[0031] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 결합하는 항체를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 항체는 상기 두 개의 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 중 하나를 발현시키는 NK 세포에 대한 KIR에 의해 중개된 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있고, 상기 항체는 리포솜에 통합된다. 임의적으로, 상기 조성물은 유전자 치료를 위해 유전자의 전달을 위한 핵산 분자; NK 세포에서 유전자의 유전적 발생을 억제하기 위한 안티센스(antisense) RNA, RNAi 또는 siRNA를 전달하기 위한 핵산 분자; 또는 상기 리포솜에 부가적으로 통합된 NK 세포의 파괴를 목표로 한 독소 또는 약제로부터 선택된 부가적인 물질을 포함한다.

[0032] 본 발명은 또한 사람의 NK 세포 활성을 시험관 내(in vitro), 생체 밖(ex vivo) 또는 생체 내(in vivo)에서 조절하는 방법을 제공하는 것으로, 본 발명의 항체, 이러한 항체의 단편, 각각의 어느 유도제 또는 그것들 중 적어도 어느 하나를 포함하는 약제 조성물의 유효한 양을 사람 NK 세포와 접촉시키는 것으로 구성된다. 바람직한 방법은 본 발명의 약제 조성물의 유효한 양의 투여를 포함하고 암, 전염성 질병 또는 면역계 질병을 가진 개체에서 가장 바람직하게는 생체 밖 또는 생체 내에서 사람의 NK 세포의 세포 독성 활성을 증가시키도록 지시된다.

[0033] 또 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 불멸화 세포(예를 들어, 골수종 세포), (b) 비활성화 KIR 폴리펩티드에 존재하는 에피토프를 포함하는 항원으로 면역화되고, 상기 불멸화 세포에 융합되는 포유류 숙주(일반적으로 사람이 아닌 포유류 숙주)의 B 세포를 포함하는 융합 세포를 포함하며, 상기 융합 세포는 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체에 결합하고 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체를 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR이 중개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 적어도 실질적으로 중화할 수 있는 단클론 항체를 제공한다. 임의적으로, 상기 융합 세포는 단클론 항체 NKVSF1을 생산하지 않는다. 바람직하게는 상기 항체는 KIR2DL1 인체 수용체 및 KIR2DL2/3 인체 수용체에 결합한다. 바람직하게는 상기 항체는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 존재하는 공통 결정자에 결합한다. 바람직하게는 상기 융합 세포는 80 위치에 Lys 잔기를 가진 HLA-c 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL1 수용체에 대한 결합 및 80 위치에 Asn 잔기를 가진 HLA-c 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL2/3 수용체에 대한 결합을 억제하는 항체를 생산한다. 바람직하게는 상기 융합 세포는 융합 세포 DF200에 의해 생산된 단클론 항체 DF200처럼 KIR2DL1 또는 KIR2DL2/3 또는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 둘 모두에 실질적으로 같은 에피토프에 결합하는 항체를 생산한다. 이러한 융합 세포의 예는 DF200이다.

[0034] 본 발명은 또한 복합 KIR2DL 유전자 생성물과 교차 반응하고 이러한 KIRs의 비활성화 활성을 중화하는 항체를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:

[0035] (a) 사람이 아닌 포유류를 KIR2DL 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로 면역화시키는 단계;

[0036] (b) 상기 면역화된 포유류에서 상기 KIR2DL 폴리펩티드를 결합하는 항체를 제조하는 단계;

[0037] (c) 적어도 두 개의 서로 다른 KIR2DL 유전자 생성물과 교차 반응하는 (b)의 항체를 선택하는 단계; 및

[0038] (d) NK 세포를 상승시키는 (c)의 항체를 선택하는 단계;를 포함한다. 일 실시 형태에서, 상기 사람이 아닌 포유류는 사람 항체 레퍼토리를 발현시키도록 처리된 유전자 도입 동물(예를 들어, 사람의 면역글로블린 유전자 좌(locus)를 포함하고 본연의 면역글로블린 유전자는 결실된 사람이 아닌 포유 동물, 예를 들어 Xenomouse™ (Abgenix-Fremont, CA, USA) 또는 사람의 Ig를 인코딩하는 유전자의 작은 유전자 좌(minilocus)를 포함하는 사람이 아닌 포유류, 예를 들어 HuMab-mouse™(Medarex-Princeton, NJ, USA))이다. 임의적으로, 본 방법은 영장류, 바람직하게는 사이노몰거스(Cynomolgus) 원숭이 NK 세포 또는 KIR 폴리펩티드에 결합하는 항체를 선택하는 단계를 더 포함한다. 임의적으로, 본 발명은 항체를 평가하는 방법을 더 포함하며, 상기 방법에 따라 생산된 항체는 영장류, 바람직하게는 사이노몰거스 원숭이에게 투여되고, 바람직하게는 상기 원숭이는 항체의 독성 징후의 존재가 관찰된다.

[0039] 본 발명은 또한 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 결합하는 항체를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 항체는 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR에 의해 중개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있으며, 상기 방법은:

[0040] a) 사람이 아닌 포유류를 비활성화 KIR 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로 면역시키는 단계;

[0041] b) 상기 면역화된 동물에서 상기 KIR 폴리펩티드를 결합하는 항체를 제조하는 단계;

- [0042] c) 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물과 교차 반응하는 (b)의 항체를 선택하는 단계, 및 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR에 의해 중개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있는 (c)의 항체를 선택하는 단계를 포함하고, 상기 (c) 및 (d)의 순서는 임의적으로 역전되며 단계는 임의적으로 1회 이상 반복된다. 바람직하게는, 면역화를 위해 사용되는 비활성화 KIR 폴리펩티드는 KIR2DL 폴리펩티드이고 (c) 단계에서 선택된 항체는 적어도 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3과 교차 반응한다. 바람직하게는 상기 항체는 적어도 두 개의 서로 다른 KIR 수용체 유전자 생성물에 존재하는 공통의 결정자를 인식한다; 가장 바람직하게는 상기 KIR은 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3이다. 임의적으로, 본 방법은 영장류, 바람직하게는 사이노몰거스(Cynomolgus) 원숭이 NK 세포 또는 KIR 폴리펩티드에 결합하는 항체를 선택하는 단계를 더 포함한다. 임의적으로, 본 발명은 항체를 평가하는 방법을 더 포함하며, 상기 방법에 따라 생산된 항체는 영장류, 바람직하게는 사이노몰거스 원숭이에게 투여되고, 바람직하게는 상기 원숭이는 항체의 독성 징후의 준부가 관찰된다.
- [0043] 임의적으로, 상기한 방법에서, c) 또는 d) 단계에서 선택된 항체는 NKVSF1이 아니다. 바람직하게는, 상기 방법의 (b) 단계에서 제조된 항체는 단클론 항체이다. 바람직하게는 상기 방법의 (c) 단계에서 제조된 항체는 80 위치에 Lys 잔기를 가진 HLA-C 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL1 수용체에 대한 결합 및 80 위치에 Asn 잔기를 가진 HLA-C 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL2/3 수용체에 대한 결합을 억제한다. 바람직하게는, 상기 방법의 (d) 단계에서 선택된 항체는 NK 세포 독성의 상승을 예를 들어 어떤 정도의 상승, 또는 적어도 5%, 10%, 20%, 30% 또는 더 큰 정도의 NK 세포독성, 예를 들어 표적 NK 세포 독성의 적어도 약 50% 상승을 유발한다(예를 들어, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%(예를 들어 약 65-100%와 같음)의 NK 세포 독성의 상승). 바람직하게는, 상기 항체는 단클론 항체 DF200처럼 KIR2DL1 및/또는 KIR2DL2/3에 실질적으로 같은 에피토프에 결합한다. 임의적으로 상기 방법은 또한 또는 선택적으로 선택된 단클론 항체의 단편을 만드는 부가 단계, 선택된 단클론 항체의 유도체를 만드는 부가 단계(예를 들어, 방사성 핵종, 세포 독성제, 보고 분자(reporter molecule) 등등을 접합함으로써), 또는 이러한 단클론 항체의 서열에 대응하는 서열을 포함하는 생산된 항체 단편의 유도체를 만드는 부가 단계를 더 포함한다.
- [0044] 본 발명은 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 결합하는 항체를 생산하는 방법을 더 제공하며, 상기 항체는 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR에 의해 중개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있으며, 상기 방법은:
- [0045] (a) 라이브러리(library) 또는 레퍼토리에서 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물과 교차 반응하는 단클론 항체 또는 항체 단편을 선택하는 단계, 및
- [0046] (b) 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR에 의해 중개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있는 (a)의 항체를 선택하는 단계를 포함한다. 바람직하게는 그 항체는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 존재하는 공통의 결정자에 결합한다. 임의적으로, 상기 (b) 단계에서 선택된 항체는 NKVSF1이 아니다. 바람직하게는, (b) 단계에서 선택된 항체는 80 위치에 Lys 잔기를 가진 HLA-c 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL1 수용체에 대한 결합 및 80 위치에 Asn 잔기를 가진 HLA-c 대립유전자 분자의 인체 KIR2DL2/3 수용체에 대한 결합을 억제한다. 바람직하게는, 상기 방법의 (b) 단계에서 선택된 항체는 NK 세포독성의 상승을 예를 들어 어떤 정도의 상승, 또는 적어도 5%, 10%, 20%, 30% 또는 더 큰 정도의 NK 세포 독성, 예를 들어 표적 NK 세포 독성의 적어도 약 50% 상승을 유발한다(예를 들어, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%(예를 들어 약 65-100%와 같음)의 NK 세포 독성의 상승). 바람직하게는, 그 항체는 단클론 항체 DF200처럼 KIR2DL1 및/또는 KIR2DL2/3에 실질적으로 같은 에피토프에 결합한다. 임의적으로 상기 방법은 선택된 단클론 항체의 단편을 만드는 부가 단계, 선택된 단클론 항체의 유도체를 만드는 부가 단계, 또는 선택된 단클론 항체 단편의 유도체를 만드는 부가 단계를 포함한다.
- [0047] 또한, 본 발명은 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 결합하는 항체를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 항체는 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR에 의해 중개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있으며, 상기 방법은:
- [0048] a) 상기 단클론 항체의 생산을 위해 허용되는 조건 하에서 본 발명의 융합 세포를 배양하는 단계; 및
- [0049] b) 상기 융합 세포로부터 상기 단클론 항체를 분리하는 단계를 포함한다. 임의적으로 상기 방법은 상기 단클론 항체의 단편을 만드는 부가 단계, 단클론 항체의 유도체를 만드는 부가 단계, 이러한 단클론 항체 단편의 유도체를 만드는 부가 단계를 포함한다. 바람직하게는 항체는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 존재하는 공통의 결정자에 결

합한다.

- [0050] 또한, 본 발명은 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 결합하는 항체를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 항체는 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR에 의해 중개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있으며, 상기 방법은:
- [0051] a) 상기 단클론 항체를 인코딩하는 핵산을 본 발명의 융합 세포로부터 분리하는 단계;
- [0052] b) 단클론 항체의 기능적인 서열에 대응하거나 인간화 항체, 키메라 항체, 단일 체인 항체, 항체의 면역반응성 단편 또는 면역반응성 단편과 같은 것을 포함하는 혼합 단백질에서 선택된 것에 실질적으로 유사한(예를 들어, 이러한 서열에 적어도 약 65%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%(약 70-99%)동일함) 아미노산 서열을 포함하는 변형된 또는 유도된 항체를 인코딩하는 서열을 포함하는 변형된 핵산을 얻기 위하여 상기 핵산을 임의적으로 변형하는 단계;
- [0053] c) 상기 핵산 또는 변형된 핵산(또는 같은 아미노산 서열을 지정하는 관련된 핵산)을 발현 벡터에 삽입하고, 상기 인코딩된 항체 또는 항체 단편은 상기 발현 벡터가 적절한 조건 하에서 자라는 숙주 세포에 존재할 때 발현될 수 있는 단계;
- [0054] d) 면역글로블린 항체 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포를 상기 발현 벡터로 감염시키는 단계;
- [0055] e) 상기 항체 또는 항체 단편의 발현을 유발하는 조건하에서 상기 감염된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- [0056] f) 상기 감염된 숙주 세포에서 생산된 항체 또는 항체 단편을 분리하는 단계를 포함한다. 바람직하게는 상기 항체는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 존재하는 공통의 결정자에 결합한다.
- [0057] 본 발명은 또한 약제학적으로 수용할 수 있는 캐리어 또는 첨가제 및 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 결합하는 항체를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 항체는 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에서 KIR에 의해 중개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있고, 상기 항체는 NK 세포를 포함하는 환자 또는 생물학적 샘플에서 NK 세포 독성을 검출할 수 있게 상승시키기 위한 유효한 양이 존재한다. 바람직하게는 상기 항체는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 존재하는 공통의 결정자에 결합한다. 상기 조성물은 예를 들어 면역 조절제, 호르몬제, 화학 요법제, 항-혈관형성제(anti-angiogenic agent), 사멸제(apoptotic agent), 비활성화 KIR 수용체에 결합하여 비활성화시키는 제2 항체, 항감염제, 타겟팅제(targeting agent) 또는 부가 화합물에서 선택되는 제2 치료제를 더 포함할 수 있다. 바람직한 면역 조절제는 IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF-베타, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-알파, TNF-베타, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-알파, IFN-베타, 또는 IFN-감마에서 선택될 수 있다. 상기 화합물 예들은 알킬화제, 대사길항제, 세포독성 항생제, 아드리아마이신, 닥티노마이신, 미토마이신, 카미노마이신(carminomycin), 다우노마이신, 독소루비신(doxorubicin), 타목시펜, 탁솔, 텍소티어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 에토포사이드(VP-16), 5-플루로우리실(5FU), 시토신 아라비노사이드, 시클로포스파미드, 티오테파, 메토트렉사트, 캄포테신, 악티노마이신-D, 미토마이신 C, 시스플라틴(CDDP), 아미노프테린, 캄브레타스테틴(들)(combretastatins), 다른 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids) 및 그것들의 유도체 또는 전구약물을 포함한다. 상기 호르몬제는 루프로렐린(leuprorelin), 고세렐린(goserelin), 트립토톨린(triptorelin), 부세렐린(buserelin), 타목시펜(tamoxifen), 토레미펜(toremifene), 플루타미드(flutamide), 닐루타미드(nilutamide), 시프로테론(cyproterone), 비칼루타미드(bicalutamid), 애너스트로졸(anastrozole), 이그젠크스텐(exemestane), 레트로졸(letrozole), 파드로졸(fadrozole), 메드록시(medroxy), 클로르마디논(chlormadinone), 메게스트롤(megestrol), 다른 LHRH 촉진제, 다른 항-에스트로젠, 다른 항-안드로젠, 다른 아로마테이즈(aromatase) 억제제, 및 다른 프로게스타젠을 포함한다. 바람직하게는, 비활성화 KIR 수용체에 결합하여 비활성화시키는 제2 항체는 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물에 존재하는 공통 결정자를 결합하는 상기 항체에 의해 결합되는 에피토프와 다른 비활성화 KIR 수용체의 에피토프를 결합하는 항체 또는 그것의 유도체 또는 단편이다.
- [0058] 본 발명은 NK 세포 활성이 필요한 환자에게서 NK 세포 활성을 검출할 수 있게 상승시키는 방법을 또한 제공하며, 상기 환자에게 본 발명에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. NK 세포 활성의 상승이 필요한 환자는 이러한 상승이 치료 효과를 진작시키고, 향상시키며 및/또는 유도할 수 있는 질병 또는 장애를 가진 환자일 수 있다(또는 질병 또는 장애 및 예를 들어 임상 실험에 의해 정해진 것처럼 환자로서 실질적으로 유사한 특징을 가진 환자의 적어도 상당한 비율에서 이러한 효과를 진작시키고, 향상시키며 및/또는 유도한다). 이러한

치료가 필요한 환자는 예를 들어 암, 다른 증식성 장애, 감염성 질병 또는 면역 장애를 겪을 수 있다. 바람직하게는 상기 방법은 상기 환자에게 면역 조절제, 호르몬제, 화학 요법제, 항-혈관형성제(anti-angiogenic agent), 사멸제(apoptotic agent), 비활성화 KIR 수용체에 결합하여 비활성화시키는 제2 항체, 항감염제, 타겟팅제(targeting agent) 또는 부가 화합물에서 선택되는 적절한 첨가 치료제를 투여하는 부가 단계를 포함하며, 상기 첨가 치료제는 상기 항체와 함께 단일 복용 형태 또는 분리된 복용 형태로 환자에게 투여된다. 항체(또는 항체 단편/유도체)의 복용량 및 첨가 치료제의 복용량은 공동으로 NK 세포 활성의 상승을 가진 환자에게서 치료 반응을 검출할 수 있게 유도하고, 진작시키며 및/또는 향상시키기에 충분하다. 각각 투여되는 경우, 항체, 단편, 유도체 및 첨가 치료제는 바람직하게는 환자에게서 검출할 수 있는 복합 치료 이득을 초래하는 조건(예를 들어, 투여시간, 복용 회수 등)하에서 투여된다.

[0059] 본 발명은 사람이 아닌 영장류, 바람직하게는 원숭이 NK 세포 및/또는 원숭이 KIR 수용체에 특징적으로 결합할 수 있는 본 발명의 항체를 더 포함한다. 또한, 본 발명은 후보 약제인 본 발명의 항체의 독성, 투약 및/또는 활성 또는 효율을 평가하는 방법을 포함한다. 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 NK 세포를 가진 사람이 아닌 영장류 수용체 동물에 투여하고 동물, 바람직하게는 표적 조직에 대한 약제의 독성 또는 해로운 효과 또는 역효과를 평가함으로써 동물 또는 표적 조직에 독성을 나타내는 항체의 투여량을 결정하는 방법을 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 NK 세포를 가진 사람이 아닌 영장류 수용체 동물에 투여하고 동물, 바람직하게는 표적 조직에 대한 약제의 독성 또는 해로운 효과 또는 역효과를 평가함으로써 동물 또는 표적 조직에 독성을 나타내는 항체를 확인하는 방법이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 감염, 질병 또는 암에 걸린 사람이 아닌 영장류 모델에 투여하고 그 감염, 질병 또는 암, 또는 그 증상을 개선하는 항체를 확인함으로써, 감염, 질병 또는 종양의 치료에 효과적인 항체를 확인하는 방법이다. 바람직하게는 본 발명의 상기 항체는 (a) 사람 NK 세포의 표면에서 적어도 두 개의 비활성화 사람 KIR 수용체와 교차 반응하고, (b) 사람이 아닌 영장류의 NK 세포 또는 KIR 수용체와 교차 반응하는 항체이다.

[0060] 본 발명은 또한 생물학적 샘플 또는 살아있는 생물체에서 그 세포 표면에 비활성화 KIR을 가지고 있는 NK 세포의 존재를 검출하는 방법으로, 상기 방법은:

[0061] a) 상기 생물학적 샘플 또는 살아있는 조직을 검출할 수 있는 모이어티와 접합하거나 공유 결합된 본 발명의 항체와 접촉시키는 단계; 및

[0062] b) 상기 생물학적 샘플 또는 살아있는 생물체에서 상기 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함한다.

[0063] 본 발명은 또한 그 표면에 비활성화 KIR을 가지고 있는 샘플 NK 세포를 정제하는 방법으로, 상기 방법은:

[0064] a) 세포 표면에 비활성화 KIR을 포함하는 NK 세포를 고체 지지체(예를 들어, 구슬, 매트릭스 등)에 접합하거나 또는 공유 결합된 상기 항체에 결합하게 하는 조건하에서 상기 샘플을 본 발명의 항체와 접촉시키는 단계; 및

[0065] b) 고체 지지체에 접합하거나 공유 결합된 상기 항체로부터 상기 NK 세포를 분리하는 단계를 포함한다.

[0066] 다른 측면에서, 본 발명은 도 12에 도시된 것처럼 항체 DF200 또는 항체 Pan2D의 경쇄 가변 구역(light variable region) 또는 하나 이상의 경쇄 가변 구역 CDRs를 포함하는 항체, 항체 단편 또는 각각의 유도체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 DF200 또는 Pan2D의 경쇄 가변 구역 서열 또는 이러한 항체들 중 하나 또는 전부의 하나 이상의 경쇄 가변 구역 CDRs의 전부 또는 본질적으로 전부에 상당히 유사한 서열을 포함하는 항체, 항체 단편 또는 각각의 유도체를 제공한다.

[0067] 또 다른 측면에서, 본 발명은 도 13에 도시된 것처럼 항체 DF200의 중연쇄 가변 구역(heavy variable region) 또는 하나 이상의 경쇄 가변 구역 CDRs를 포함하는 항체, 항체 단편 또는 각각의 유도체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 DF200의 중연쇄 가변 구역 서열의 전부 또는 본질적으로 전부에 상당히 유사한 서열을 포함하는 항체, 항체 단편 또는 각각의 유도체를 제공한다.

실시예

[0079] 본 발명의 다른 장점들 및 바람직한 면들은 이하에서 상세히 기술될 것이다.

[0080] 항체들

[0081] 본 발명은 인체 비활성화 KIR 수용체의 공통 결정자, 바람직하게는 적어도 두 개의 서로 다른 KIR2DL 유전자 생성물에 존재하는 결정자에 결합하고 이러한 KIR 수용체들 중 적어도 하나를 발현시키는 NK 세포를 상승시키는

신규한 항체, 단편 또는 각각의 유도체를 제공한다. 우선, 본 발명은 이러한 교차 반응 및 중화하는 항체가 제조될 수 있고, 특히 사람에게서 기대하지 않은 결과를 나타내며 신규하고 효과적인 NK에 기초한 치료의 길을 제시한다. 바람직한 실시예에서, 상기 항체는 단클론 항체 NKVSF1이 아니다.

[0082] 본 발명의 내용에서 "공통 결정자(common determinant)"는 인체 비활성화 KIR 수용체의 여러 유전자 생성물이 공유하는 결정자 또는 에피토프를 나타낸다. 바람직하게는, 상기 공통 결정자는 KIR2DL 수용체 그룹의 적어도 두 구성원에 의해 공유된다. 더 바람직하게는, 상기 결정자는 적어도 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3에 의해 공유된다. 본 발명의 어떤 항체들은 KIR2DL의 복합적인 유전자 생성물을 인식하는 것 외에 또한 KIR3DL 수용체 그룹의 유전자 생성물과 같은 다른 비활성화 KIRs에 존재하는 결정자를 인식한다. 상기 결정자 또는 에피토프는 상기 구성원에 의해 공유되는 펩티드 단편 또는 형성된 에피토프를 나타낼 수 있다. 더 구체적인 실시예에서, 본 발명의 항체는 단클론 항체 DF200에 의해 인식되는 실질적으로 같은 에피토프에 특정적으로 결합한다. 상기 이러한 결정자는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 모두에 존재한다.

[0083] 본 발명의 내용에서, 공통 인자에 "결합하는(bind)" 항체라는 용어는 특정성 및/또는 친화력을 가지고 상기 결정자를 결합하는 항체를 나타낸다.

[0084] 본 명세서에서 사용되는 "항체"라는 용어는 다클론 및 단클론 항체 뿐만 아니라 만약 특별한 언급이 없으면 상기 다클론 및 단클론 항체의 단편 및 유도체를 언급한다. 중연쇄(heavy chain)에서 일정한 도메인의 형태에 따라, 전체 길이 항체들은 일반적으로 5 개의 주요한 부류: IgA, IgD, IgE, IgG, IgA 및 IgM 중 하나로 분류된다. 이러한 여러 부류는 또한 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등의 아강(亞綱) 또는 아이소타이프(isotype)으로 분류된다. 면역글로블린의 다른 종류들에 대응하는 중연쇄의 일정한 도메인은 각각 "알파", "델타", "엡실론", "감마" 및 "뮤"로 칭한다. 면역글로블린의 다른 종류의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 잘 알려져 있다. IgG 및/또는 IgM은 생리학적 상황에서 가장 일반적인 항체이고 실험실 조건에서 가장 쉽게 만들어질 수 있기 때문에 본 발명에서 사용되는 항체들 중에서 바람직한 종류이다. 바람직하게는 본 발명의 항체는 단클론 항체이다. 본 발명의 목표 중 하나는 생체 내에서 비활성화 KIR 및 그 대응하는 HLA 리간드의 상호 작용을 NK 세포를 고갈시키지 않고 방지하는 것이기 때문에, IgG4와 같은 낮은 이펙터(effector) 기능을 중개하는 Fc 수용체에 대응하는 아이소타이프가 일반적으로 바람직하다.

[0085] 본 발명의 항체는 관련 분야에서 알려진 여러 가지 기술로 생산될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 항체는 사람이 아닌 동물, 바람직하게는 마우스를 비활성화 KIR 폴리펩티드, 바람직하게는 KIR2DL 폴리펩티드, 더 바람직하게는 사람 KIR2DL 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로 면역화함으로써 제조된다. 상기 비활성화 KIR 폴리펩티드는 일반적으로 면역성 단편, 즉 비활성화 KIR 수용체를 발현시키는 세포 표면에 노출된 에피토프를 포함하는 폴리펩티드의 일부인 전체 길이의 인체 비활성화 KIR 폴리펩티드 또는 단편 또는 각각의 유도체를 포함할 수 있다. 이러한 단편들은 일반적으로 성숙한 폴리펩티드 서열의 적어도 약 7개의 연속적인 아미노산, 더 바람직하게는 적어도 약 10개의 연속적인 아미노산을 포함한다. 단편들은 일반적으로 수용체의 세포외 도메인에서 유래된다. 적어도 하나, 더 바람직하게는 KIR2DL 폴리펩티드의 전체 길이의 세포 외 Ig 도메인 둘 다를 포함하고 KIR2DL 수용체에 존재하는 적어도 하나의 형상의 에피토프를 모방할 수 있는 사람 KIR2DL 폴리펩티드가 더 바람직하다. 다른 실시예에서, 상기 폴리펩티드는 KIR2DL 폴리펩티드의 1-224 아미노산 위치의 세포 외 Ig 도메인의 적어도 약 8개의 연속적인 아미노산을 포함한다(KIR 유전자 집단을 기술하는 PROW 웹 사이트에 따른 아미노산 넘버링 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/guide/1326018082.htm>)

[0086] 가장 바람직한 실시예에서, 상기 면역원은 일반적으로 세포의 표면에서 지질막에 와이드 형태(wild-type)의 사람 KIR2DL 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 면역원은 완전한 NK 세포, 특히 임의적으로 처리되거나 용해된 완전한 사람 NK 세포를 포함한다.

[0087] 사람이 아닌 포유류를 항원으로 면역화시키는 단계는 마우스에서 항체의 생산을 촉진하는 관련 분야의 어떤 잘 알려진 방법으로 실행될 수 있다(예를 들어, E. Harlow 및 D. Lane, 항체들: 실험 매뉴얼., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(1988)를 참조). 그런 다음 면역원은 임의적으로 완전한 Freund's 첨가제와 같은 첨가제를 포함하는 완충 용액에 부유되거나 용해된다. 면역원의 양, 완충 용액의 형태 및 첨가제의 양을 결정하는 방법은 관련 분야의 숙련된 자에게 잘 알려져 있고 본 발명에서 어떤 방식으로 제한되는 것은 아니다. 이러한 변수들은 다른 면역원에서 다를 수 있지만, 쉽게 설명된다.

[0088] 유사하게, 항체의 생산을 촉진하기에 충분한 면역화의 위치 및 빈도는 관련 분야에 잘 알려져 있다. 일반적인 면역화 프로토콜에서, 사람이 아닌 동물은 항원으로 복강내 주사되고 약 1 주일 후 다시 복강내 주사된다. 임의적으로 불완전한 Freund's 첨가제와 같은 첨가제를 포함하는 항원을 약 20일 경에 다시 주입한다. 이러한 주입

은 정맥내로 실행되고 며칠간 연속적으로 반복될 수 있다. 약 40일 경에 일반적으로 첨가제가 없이 정맥 내 또는 복강 내로 증폭 주입이 실행된다. 이러한 프로토콜은 약 40일 후에 항원 특이적인 항체를 생산하는 B 세포를 제조한다. 다른 프로토콜은 면역화에서 사용되는 항원에 대하여 항체를 생산하는 B 세포의 생산을 유발하는 한 사용될 수 있다.

[0089] 다클론 항체 제조를 위해, 면역화된 사람이 아닌 동물에서 혈청을 획득하고 상기 혈청에 존재하는 항체를 잘 알려진 기술로 분리한다. 상기 혈청은 비활성화 KIR 수용체와 반응하는 항체를 얻기 위하여 고체 지지체와 연결된 상기의 어떤 면역원을 사용하여 정제할 수 있다.

[0090] 다른 실시예에서, 면역되지 않은 사람이 아닌 동물로부터 림프구를 분리하여, 시험관 내에서 배양한 다음 세포 배양에서 면역원에 노출시켰다. 그런 다음 상기 림프구를 수확한 다음 이하에서 기술될 융합 단계를 실행한다.

[0091] 단클론 항체에서, 다음 단계는 면역화된 사람이 아닌 포유류로부터 스플레노사이트(splenocytes)의 분리 및 항체를 형성하는 융합 세포를 형성하기 위해 이러한 스플레노사이트를 불멸화 세포와 혼합하는 것이다. 사람이 아닌 포유류에서 스플레노사이트의 분리는 관련 분야에 잘 알려져 있으며 일반적으로 단일 세포 서스펜션을 생산하기 위하여 마취된 사람이 아닌 포유류에서 비장(spleen)을 절단하고, 그것을 작은 조각으로 자르며 나일론천을 이용하여 비장에서 스플레노사이트를 적절한 완충 용액으로 짜는 것과 관련이 있다. 세포들을 세척하고, 원심분리하며 적혈구를 용해하는 완충 용액에서 재부유시킨다. 그 용액을 다시 원심분리하고 펠렛에 존재하는 잔류 림프구를 마지막으로 신선한 완충 용액에서 재부유시킨다.

[0092] 일단 분리된 단일 세포 서스펜션에서, 림프구는 불멸화 세포계(cell line)에 융합될 수 있다. 상기 세포계는 비록 융합 세포를 만들기 위해 많은 다른 불멸화 세포계가 관련 분야에 알려져 있긴 하지만, 일반적으로 마우스 골수종 세포계이다. 바람직한 쥐과 골수종 세포계는 제한적이지는 않지만 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. U.S.A에서 이용할 수 있는 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 또는 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland U.S.A에서 이용할 수 있는 X63 Ag8653 및 SP-2 세포로부터 유도된 것들이다. 상기 융합은 폴리에틸렌글리콜 또는 유사체의 사용에 영향을 받는다. 결과로 얻어지는 융합 세포는 융합되지 않은 모체 골수종 세포의 성장 또는 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 포함하는 선택적인 배지에서 배양된다. 예를 들어, 만약 모체 골수종 세포가 효소 하이포크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼레이즈(hypoxanthin-guanine phosphoribosyl transferase: HGPRT 또는 HPRT)이 부족하다면, 융합 세포를 위한 배양 배지는 일반적으로 하이포크산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin) 및 티미딘(thymidine)를 포함할 것이고(HAT 배지), 이러한 물질은 HGPRT가 결핍된 세포의 성장을 막는다.

[0093] 융합 세포는 일반적으로 대식세포의 피더층(feeder layer)에서 자란다. 대식세포는 바람직하게는 스플레노사이트를 분리하는데 사용되는 사람이 아닌 포유류의 한 배에서 나온 것이고 일반적으로 융합 세포를 평판 배양하기 전에 며칠 동안 완전하지 않은 Freund's 첨가제로 준비된다. 융합 방법은 본 명세서에 참조 문헌에 포함된 Goding, "단클론 항체: 원리 및 실제(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)", pp.59-103(Academic Press, 1986)에 기술되어 있다.

[0094] 세포들은 선택 배지에서 콜로니 형성 및 항체 생산을 위해 충분한 시간 동안 자라게 된다. 이는 대개 7일에서 14일 사이이다. 융합 세포 콜로니는 복합 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물과 교차 반응하는 항체의 생산을 위해 분석된다. 상기 분석은 융합 세포가 자라는 웰(well)에 적합할 수 있게 사용되는 어떤 분석법이 사용될 수 있지만, 측색 병소 감염 진단 테스트(ELISA) 분석법이 일반적이다. 다른 분석법은 면역 침강(immunoprecipitation) 및 표지 면역 검증법(radioimmunoassay)을 포함한다. 원하는 항체 생산을 위한 양성인 웰은 하나 이상의 다른 콜로니가 존재하는지를 결정하기 위해 시험된다. 만약 하나 이상의 콜로니가 존재한다면, 단지 단일 세포가 원하는 항체를 생산하는 콜로니에서 자라도록 하기 위해 세포들은 다시 클론화될 수 있다. 단일의 확실한 콜로니를 가진 양성 웰은 단지 하나의 단클론 항체가 검출되고 생산되도록 하기 위해서 다시 클론화되고 다시 분석된다. 항체들은 또한 예를 들어 Ward 외, 네이처(Nature), 341 (1989)p.544에 기술된 것처럼 면역글로블린의 조합 도서관의 선택에 의해 제조될 수 있다.

[0095] 본 발명의 항체는 KIR이 증개하는 NK 세포 독성의 비활성화; 특히 KIR2DL 수용체 및 더 특별히 적어도 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 둘 다의 비활성화를 중화할 수 있다. 이러한 항체는 KIR 수용체가 MHC class I 분자와 상호작용할 때 상기 KIR 수용체에 의해 증개되는 비활성화 신호 통로를 적어도 부분적으로 및 검출할 수 있을 정도로 방지한다는 점에서 "중화" 또는 "억제" 항체이다. 더 중요하게는, 이러한 억제 활성화는 여러 형태의 비활성화 KIR 수용체, 바람직하게는 여러 KIR2DL 수용체 유전자 생성물, 더 바람직하게는 적어도 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 모두에

대하여 발생하여 그 결과 이러한 항체는 상당한 효율로 여러 개체에 사용될 수 있다. KIR에 의해 증개되는 NK 세포 독성의 비활성화의 억제제는 결합 또는 세포 평가와 같은 여러 평가 또는 테스트로 평가될 수 있다.

- [0096] 일단 복합 비활성화 KIR 수용체와 교차 반응하는 항체가 확인되면, 상기 항체는 완전한 NK 세포에서 이러한 KIR 수용체의 비활성화 효과를 중화하는 능력이 시험될 수 있다. 특정 변형예에서, 중화 활성은 HLA-C 양성 표적의 KIR2DL-양성 NK 클론에 의한 용해를 재구성하는 상기 항체의 능력으로 설명될 수 있다. 다른 특정 실시예에서, 항체의 중화 능력은 HLA-C 분자가 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 수용체에 대한 결합을 억제하는 상기 항체의 능력으로 한정되며, 더 바람직하게는:
- [0097] - Cw1, Cw3, Cw7 및 Cw8에서 선택된 HLA-C 분자(또는 80 위치에 Asn 잔기를 가진 HLA-C 분자)의 KIR2DL2/3에 대한 결합; 및
- [0098] - Cw2, Cw4, Cw5 및 Cw6에서 선택된 HLA-C 분자(또는 80 위치에 Lys 잔기를 가진 HLA-C 분자)의 KIR2DL1에 대한 결합을 변경하는 상기 항체의 능력으로 한정된다.
- [0099] 다른 변형예에서, 본 발명의 항체의 억제 활성은 실시예에 기술된 것처럼 세포 독성 평가에 기초하여 세포에서 평가될 수 있다.
- [0100] 다른 변형예에서, 본 발명의 항체의 억제 활성은 시토킨-방출 분석으로 평가될 수 있고, 여기서 NK 세포는 NK 세포 시토킨 생산(예를 들어, IFN- γ 및/또는 GM-CSF 생산)을 활성화하기 위하여 테스트 항체 및 NK 집단의 KIR 분자에 의해 인식되는 HLA-C 대립 유전자를 발현시키는 표적 세포계와 함께 배양된다. 전형적인 프로토콜에서, PBMC에서 IFN- γ 생산은 약 4일 동안 배양 후에 세포 표면 및 세포질 내 염색 및 흐름 혈구 계산에 의한 분석에 의해 평가된다. 간략히 말해서, Brefeldin A(Sigma Aldrich)는 최소 약 4일간의 배양 동안에 약 5 μ g/ml 농도로 첨가될 수 있다. 그런 다음 세포들은 투과(IntraPrepTM; Beckman Coulter) 및 PE-항-IFN- γ 또는 PE-IgG1(Pharmingen)을 사용한 염색 전에 항-CD3 및 항-CD56와 함께 배양될 수 있다. 다클론 활성화된 NK 세포로부터의 GM-CSF 및 IFN- γ 생산은 ELISA를 사용하여 상등액에서 측정될 수 있다(GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN; IFN- γ : OpE1A set, Pharmingen).
- [0101] 본 발명의 항체는 KIR이 증개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 부분적으로 또는 완전히 중화할 수 있다. "KIR이 증개하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화한다"라는 용어는 정해진 KIR을 발현시키는 NK 세포 집단이 동일한 기원의 MHC class I 분자(NK 세포에서 발현된 KIR에 의해 인식됨)를 발현시키는 표적 세포와 접촉할 때 항체 없이 달성되는 특정 용해의 값과 비교하여, 종래의 세포독성의 크롬 방출에 의해 측정되는 것처럼, KIR에 의해 방해되지 않는 NK 세포 또는 NK 세포주와 같은 비율로 달성되는 특정 용해의 적어도 약 20%, 바람직하게는 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50% 또는 더 이상(예를 들어, 25-100%) 증가시키는 능력을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 바람직한 항체는 짝지어지거나 HLA 양립할 수 있거나 또는 자가 조직의(autoologous) 표적 세포 집단, 즉 다시 말하면 상기 항체 부재시에 NK 세포에 의해 효과적으로 용해되지 않는 세포 집단의 용해를 유도할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체들은 생체 내에서 NK 세포 활성을 촉진하는 것으로 정의될 수 있다.
- [0102] 선택적으로, "KIR이 증개하는 비활성화를 중화하다"라는 용어는 하나 이상의 비활성화 KIRs를 발현시키는 NK 세포 클론 또는 트랜스펙턴트(transfectant) 및 NK 세포에서 KIRs 중 하나에 의해 인식되는 단지 하나의 HLA 대립 유전자를 발현시키는 표적 세포를 사용하는 크롬 분석에서, 항체에 의해 달성되는 세포 독성의 값은 W6/32 항 MHC class I 항체와 같은 알려진 블로킹(blocking) 항MHC class I 분자로 달성되는 세포 독성의 적어도 약 20%, 바람직하게는 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%(예를 들어, 약 25-100%) 또는 더 이상이어야 한다.
- [0103] 특정 실시예에서, 항체는 단클론 항체 DF200(융합 세포 DF200에 의해 제조됨)처럼 실질적으로 같은 에피토프에 결합한다. 이러한 항체는 여기서 "DF200과 같은 항체"로 언급된다. 다른 바람직한 실시예에서, 상기 항체는 단클론 항체이다. 본 발명의 더 바람직한 "DF200과 같은 항체"는 단클론 항체 NKVSF1을 제외한 항체이다. 가장 바람직하게는 단클론 항체 DF200(융합 세포 DF200에 의해 제조됨)이다.
- [0104] 관심이 있는 항체처럼 "실질적으로(substantially) 같은 에피토프 또는 결정자에 결합한다"라는 용어는 항체가 상기 관심이 있는 항체와 "경쟁함"을 의미한다. 단클론 항체 DF200처럼 "실질적으로 같은 에피토프 또는 결정자에 결합한다"라는 용어는 항체가 상기 DF200과 "경쟁함"을 의미한다. 일반적으로, 관심이 있는 단클론 항체처럼(예를 들어, DF200, NKVSF1, 17F9) "실질적으로 같은 에피토프 또는 결정자에 결합한다"라는 용어는 항체가 하

나 이상의 KIR 분자, 바람직하게는 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3으로 구성된 그룹에서 선택된 KIR 분자를 위해 상기 관심이 있는 분자와 "경쟁함"을 의미한다. 다른 실시예에서, 관심이 있는 분자처럼 KIR2DL1 분자의 같은 에피토프 또는 결정자와 실질적으로 결합하는 항체는 KIR2DL1에 결합을 위해 관심이 있는 항체와 "경쟁한다". 관심이 있는 분자로서 KIR2DL2/3 분자의 같은 에피토프 또는 결정자와 실질적으로 결합하는 항체는 KIR2DL2/3에 결합을 위해 관심 항체와 "경쟁한다".

[0105] 관심이 있는 항체처럼 "본질적으로(essentially) 같은 에피토프 또는 결정자에 결합한다"라는 용어는 항체가 상기 관심이 있는 항체가 특정적으로 결합하는 어떤 또는 모든 KIR 분자를 위해 상기 관심이 있는 항체와 "경쟁함"을 의미한다. 단클론 항체 DF200처럼 "본질적으로 같은 에피토프 또는 결정자에 결합한다"라는 용어는 항체가 DF200이 특정적으로 결합하는 어떤 또는 모든 KIR 분자를 위해 상기 DF200과 "경쟁함"을 의미한다. 예를 들어, DF200 또는 NKVSF1처럼 본질적으로 같은 에피토프 또는 결정자를 결합하는 항체는 상기 DF200 또는 NKVSF1과 각각 KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DS1 및 KIR2DS2에 결합하기 위해 경쟁한다.

[0106] 여기서 기술된 단클론 항체처럼 실질적으로 또는 본질적으로 같은 에피토프를 결합하는 하나 이상의 항체들의 확인은 항체 경쟁이 분석될 수 있는 다양한 면역 스크리닝 분석법 중 어느 하나를 사용하여 쉽게 결정될 수 있다. 다수의 이러한 분석법은 일상적으로 실행되고 관련 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 여기에서 참조를 위해 특정적으로 통합된 1997, 8월 26일 등록된 미국 특허 No. 5,660,827 참조). 여기서 기술한 항체가 결합하는 에피토프를 사실상 결정하는 것은 여기서 기술된 단클론 항체처럼 같거나 또는 실질적으로 같은 에피토프를 결합하는 항체를 확인하기 위해 어떤 식으로 필요하지 않다.

[0107] 예를 들어, 시험될 테스트 항체가 다른 동물들에서 획득되고, 심지어 다른 Ig 아이소타이프인 경우, 간단한 경쟁 분석법은 각각이 DF200에 의해 결합되는 것으로 알려진 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 모두를 포함하는 샘플에 대조 항체(예를 들어, DF200) 및 테스트 항체가 혼합되고(또는 미리 흡수되고) 적용되는 경우 사용될 수 있다. ELISAs에 기초한 프로토콜, 표지 면역 검정법, 웨스턴블롯팅(western blotting), 및 (예를 들어, 실시예에서 상기한 것처럼)BIACORE 분석법의 사용은 이러한 간단한 경쟁 분석 연구에서 사용하기에 적절하다.

[0108] 어떤 실시예에서, 비활성화 KIR 항원 샘플에 적용하기에 앞서 얼마 동안 대조 항체(예를 들어, DF200)와 테스트 항체를 양을 달리하며 미리 혼합한다(예를 들어, 약 1:10 또는 약 1:100). 다른 실시예에서, 대조 항체 및 양을 달리하는 테스트 항체는 KIR 항원 샘플에 노출하는 동안 간단히 혼합될 수 있다. 테스트 항체로부터 결합되지 않은 항체(예를 들어, 결합되지 않은 항체를 제거하는 분리 또는 세척 기술을 사용함) 및 DF200(예를 들어, 중-특이적이거나 아이소타이프-특이적인 2차 항체 또는 DF200을 검출할 수 있는 표지로 특정적으로 라벨링(labeling) 함)을 구분할 수 있는 한, 테스트 항체가 두 개의 다른 KIR2DL 항원에 대한 DF200의 결합을 줄이는 지 여부를 결정할 수 있고, 이는 테스트 항체가 DF200처럼 실질적으로 같은 항체를 인식함을 나타낸다. 완전히 부적절한 항체의 부재시에 (표지된) 대조 항체의 결합은 높은 대조값으로 역할을 할 수 있다. 낮은 대조값은 정확히 같은 형태(DF200)의 비표지된 항체와 표지된 항체(DF200)를 배양함으로써 획득할 수 있는데, 경쟁이 발생하여 표지된 항체의 결합을 감소시킨다. 테스트 분석에서, 테스트 항체의 존재시에 표지된 항체의 반응성의 상당한 감소는 상기 테스트 항체가 실질적으로 같은 에피토프, 즉 표지된 항체(DF200)와 "교차 반응하는" 에피토프를 인식한다는 것을 나타낸다. DF200:테스트 항체의 비율이 약 1:10과 1:100 사이이고 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 각각에 대한 DF200의 결합을 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 더 바람직하게는 약 70%(예를 들어, 약 65-100%)를 감소시키는 어떤 테스트 항체는 DF200과 같이 같은 에피토프 또는 결정자에 실질적으로 결합하는 항체로 간주된다. 바람직하게는, 이러한 테스트 항체는 KIR2DL 항원 각각에 대한 DF200의 결합을 적어도 약 90%(예를 들어, 약 95%)까지 감소시킬 것이다.

[0109] 예를 들어, 경쟁은 흐름 혈구계산 테스트(flow cytometry test)로 평가될 수 있다. 이러한 테스트에서, 정해진 KIR을 품고 있는 세포들은 예를 들어 우선 DF200과 배양될 수 있고, 그런 다음 형광 색소 또는 비오틴으로 표지된 테스트 항체와 배양될 수 있다. 상기 항체는 만약 포화된 양의 DF200으로 미리 배양되어 획득된 결합이 DF200과 미리 배양되지 않고 상기 항체에 의해 얻어진 결합(형광의 평균으로 측정됨)의 약 80%, 바람직하게는 50%, 약 40% 또는 그 이하(예를 들어, 약 30%)를 차지한다면 DF200과 경쟁한다고 말한다. 선택적으로, 항체는 포화된 양의 테스트 항체로 미리 배양된 세포 상에 (형광 색소 또는 비오틴으로)표지된 DF200으로 획득된 결합이 상기 항체와 미리 배양되는 것없이 달성된 결합의 약 80%, 바람직하게는 약 50%, 약 40% 또는 그 이하(예를 들어, 약 30%)라면 DF200과 경쟁한다고 말한다.

[0110] 테스트 항체가 포화된 농도로 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 모두가 고정된 표면에 미리 흡수되고 적용되는 간단한 경쟁 분석법도 역시 바람직하게는 사용될 수 있다. 상기 간단한 경쟁 분석법에서 표면은 바람직하게는 BIACORE 칩(또

는 표면 플라즈몬 공명 분석을 위해 적절한 다른 부재)이다. 대조 항체(예를 들어, DF200)는 그런 다음 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3를 포화시키는 농도로 그 표면과 접촉하게 되고 대조 항체의 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3의 표면에 대한 결합은 측정된다. 대조 항체의 이러한 결합은 테스트 항체 부재시에 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3을 포함하는 표면에 대한 대조 항체의 결합과 비교된다. 테스트 분석에서, 테스트 항체 존재시에 대조 항체에 의한 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3을 포함하는 표면의 결합에서 상당한 감소는 상기 테스트 항체가 실질적으로 대조 항체처럼 같은 에피토프를 인식하여 그 결과 테스트 항체가 대조 항체와 "교차 반응"함을 나타낸다. (DF200과 같은)대조 항체의 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 항원 각각에 대한 결합을 적어도 약 30% 또는 더 바람직하게는 약 40% 감소시키는 어떤 테스트 항체는 대조 항체(예를 들어, DF200)처럼 실질적으로 같은 에피토프 또는 결정자를 결합하는 항체로 간주될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 테스트 항체는 KIR2DL 각각에 대한 대조 항체(예를 들어, DF200)의 결합을 적어도 약 50%(예를 들어, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 또는 더 이상) 감소시킬 것이다. 대조 및 테스트 항체의 순서는 바뀔 수 있다: 즉, 대조 항체가 우선 표면에 결합하고 그 후에 경쟁 분석에서 테스트 항체가 표면과 접촉하게 된다. 바람직하게는, KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 항원에 대한 더 높은 친화력을 가진 항체는 먼저 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3을 포함하는 표면에 결합하고, 두 번째 항체(교차 반응하리라고 예상되는 항체)는 더 큰 정도로 결합이 감소할 것임을 기대할 수 있다. 이러한 분석에 대한 다른 예는 여기서 참조용으로 통합된 Saunal 및 Regenmortel, (1995) J. Immunol. Method 183:33-41에 기술되어 있다.

- [0111] 예증을 위해 DF200에 관해 기술하였지만, 상기한 면역성 스크리닝 분석은 NKVSF1, 1-7F9, EB6, GL183 및 본 발명에 따른 다른 항체와 경쟁하는 항체를 확인하기 위해 또한 사용될 수 있다.
- [0112] 척추 동물 세포에서 항체의 면역화 및 생산시, 특히 선택 단계는 상기 항체를 분리하는데 사용될 수 있다. 이러한 점에서, 특정 실시예에서 본 발명은 이러한 항체를 생산하는 방법에 관한 것으로:
- [0113] (a) 사람이 아닌 포유류를 비활성화 KIR 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로 면역시키는 단계;
- [0114] (b) 상기 KIR 폴리펩티드를 결합하는 항체를 상기 면역화된 동물로부터 준비하는 단계;
- [0115] (c) 적어도 두 개의 서로 다른 비활성화 KIR 유전자 생성물과 교차 반응하는 (b)의 항체를 선택하는 단계; 및
- [0116] (d) 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포 집단에 대한 KIR이 증가하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있는 (c)의 항체를 선택하는 단계를 포함한다.
- [0117] 적어도 두 개의 서로 다른 비활성화 KIR 유전자 생성물과 교차 반응하는 항체의 선택은 예를 들어 상기한 것처럼 둘 이상의 다른 비활성화 KIR 항원에 대해 항체를 스크리닝(screening)함으로써 달성될 수 있다.
- [0118] 더 바람직한 실시예에서, (b) 단계에서 준비된 항체들은 단클론 항체들이다. 따라서, "상기 면역화된 동물로부터 항체를 준비하는 단계"라는 용어는 면역화된 동물로부터 B-세포를 얻고 이러한 B-세포를 사용하여 항체를 발현시키는 융합 세포를 생산할 뿐만 아니라 면역화된 동물의 혈청으로부터 직접적으로 항체를 얻는 것을 포함한다. 다른 바람직한 실시예에서, (c) 단계에서 선택된 항체들은 적어도 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3와 교차 반응하는 항체들이다.
- [0119] 또한 다른 바람직한 실시예에서, (d) 단계에서 선택된 항체들은 그 KIR에 의해 방해되지 않는 NK 세포를 구비한 같은 이펙터/표적 비율로 획득된 용해 또는 세포 독성과 비교하여, 같은 종류의 HLA class I 분자를 발현시키는 표적 세포에 대하여 표준 크롬 방출 분석에서 측정되는 것처럼, 상기 항체에 의해 인식되는 적어도 하나의 KIR을 나타내는 NK 세포에 의해 증가되는 적어도 약 10% 특정 용해, 바람직하게는 적어도 약 40% 특정 용해, 적어도 약 50% 특정 용해, 또는 더 바람직하게는 약 70% 특정 용해(예를 들어, 약 60-100% 특정 용해)를 유발한다. 선택적으로, (d) 단계에서 선택된 항체는 하나 이상의 여러 비활성화 KIRs를 발현시키는 NK 세포 클론 및 NK 클론에서 적어도 하나의 KIRs에 의해 인식되는 단지 하나의 HLA 대립유전자를 발현시키는 표적 세포를 사용하는 크롬 분석에서 사용되고, 상기 항체에 의해 획득되는 세포 독성의 정도는 W6/32 항 MHC class I 항체와 같은 블로킹 항 MHC class I mAb로 획득된 세포 독성의 적어도 약 20%, 바람직하게는 적어도 약 30% 또는 더 이상이어야 한다.
- [0120] 상기한 방법의 (c) 및 (d) 단계의 순서는 변할 수 있다. 임의적으로, 상기 방법 역시 또는 선택적으로 예를 들어 여기서 기술된 것처럼 단클론 항체의 단편 또는 단클론 항체 또는 이러한 단편의 유도체를 만드는 부가 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0121] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 적용할 수 있는 방법에 따른 항체를 생산하는데 사용되는 사람이 아닌 동물은 설치류(예를 들어, 마우스, 쥐 등), 소, 돼지, 말, 토끼, 염소, 양 등과 같은 포유류이다. 또한, 사람이 아닌

포유류는 Xenomouse™(Abgenix) 또는 HuMAb-Mouse™(Medarex)와 같이 "사람" 항체를 생산하기 위하여 유전적으로 변형되거나 처리될 수 있다.

- [0122] 다른 변형예에서, 본 발명은:
- [0123] (a) 적어도 두 개의 서로 다른 비활성화 KIR2DL 수용체 유전자 생성물과 교차 반응하는 단클론 항체, 단클론 항체의 단편, 각각의 유도체를 라이브러리 또는 레퍼토리에서 선택하는 단계, 및
- [0124] (b) 상기 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR2DL 수용체 유전자 생성물을 발현시키는 NK 세포의 집단에서 KIR에 의해 중개되는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있는 (a)의 항체, 단편, 또는 각각의 유도체를 선택하는 단계를 포함하는 항체를 획득하는 방법을 제공한다.
- [0125] 상기 레퍼토리는 선택적으로 어떤 적절한 구조(예를 들어, 파지(phage), 박테리아, 합성 복합체 등)로 표현될 수 있는 항체 또는 그 단편의 어떤 (재조합)레퍼토리일 수 있다. 비활성화 항체의 선택은 상기한 것처럼 실행될 수 있고 실시예에서 보다 더 설명된다.
- [0126] 다른 실시예에 따르면, 본 발명은 사람이 아닌 숙주로부터의 B 세포를 포함하는 융합 세포를 제공하며, 상기 B 세포는 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물에 존재하는 결정자를 결합하는 항체를 생산하고 상기 항체는 상기 수용체의 비활성화 활성을 중화할 수 있다. 더 바람직하게는, 본 발명의 이러한 관점의 융합 세포는 단클론 항체 NKVSF1을 생산하는 융합 세포가 아니다. 본 발명의 이러한 관점에 따른 융합 세포는 상기한 것처럼 면역화된 사람이 아닌 포유동물의 스플레노사이트(splenocytes)를 불멸화 세포주와 혼합함으로써 만들어질 수 있다. 이러한 혼합으로 만들어진 융합 세포는 여기서 기술한 것처럼 이러한 교차 반응 항체의 존재로 식별될 수 있다. 바람직하게는, 상기 융합 세포는 적어도 두 개의 서로 다른 KIR2DL 유전자 생성물에 존재하는 결정자를 인식하는 항체를 생산하고, 적어도 하나의 이러한 KIR 수용체를 발현시키는 NK 세포의 상승을 유발한다. 더 바람직하게는, 상기 융합 세포는 실질적으로 DF200처럼 같은 에피토프 또는 결정자에 결합하고 NK 세포 활성을 상승시키는 항체를 생산한다. 가장 바람직하게는, 상기 융합 세포는 단클론 항체 DF200을 생산하는 융합 세포 DF200이다.
- [0127] 본 발명의 단클론 항체를 생산하도록 형성된 융합 세포는 DMEM 또는 RPMI-1640과 같은 적절한 매질에서 더 많은 양으로 성장할 수 있다. 선택적으로, 융합 세포는 동물에서 복수(ascites) 종양으로서 생체 내에서 성장할 수 있다.
- [0128] 원하는 단클론 항체를 생산할 만큼 충분히 성장한 후에, 단클론 항체(또는 복수(ascites) 유체)를 포함하는 성장 매질은 세포와 분리되고 그곳에 존재하는 단클론 항체는 정제된다. 상기 정제는 일반적으로 겔 전기이동, 투석, 단백질 A 또는 단백질 G-세파로오스(Sepharose)를 사용하는 크로마토그래피, 또는 아가로스 또는 세파로오스 비드와 같은 고체 지지체에 연결된 항-마우스 Ig에 의해 달성된다(예를 들어, 여기에 참조를 위해 통합된 Amersham Biosciences, publication No.18-1037-46, Edition AC, 항체 정제 핸드북에 기술됨). 상기 결합된 항체는 일반적으로 항체를 포함하는 부분을 즉시 중화하는 낮은 pH 완충 용액을 사용하여 단백질 A/단백질 G 컬럼에서 용출된다. 이러한 부분은 필요에 따라 모아지고, 투석되며 농축된다.
- [0129] 선택적인 실시예에 따르면, 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물에 존재하는 결정자를 결합하는 항체를 암호화하는 DNA는 본 발명의 융합 세포로부터 분리되고 적절한 숙주로의 이식을 위해 적절한 발현 벡터에 위치한다. 그런 다음 상기 숙주 세포는 항체 또는 그 단클론 항체의 인간화 항체, 상기 항체의 활성 단편 또는 항체의 항원 인식부를 포함하는 키메라 항체와 같은 변형들의 재조합 생산을 위해 사용된다. 바람직하게는, 상기 실시예에서 사용되는 DNA는 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물에 존재하는 결정자를 결합하는 항체를 암호화하고 이러한 KIR 수용체 중 적어도 하나를 발현시키는 NK 세포의 상승을 유발한다. 더 바람직하게는, 상기 DNA는 실질적으로 DF200처럼 같은 에피토프 또는 결정자에 결합하고 NK 세포 활성을 상승시키는 항체를 암호화한다. 가장 바람직하게는, 상기 DNA는 단클론 항체 DF200을 암호화한다.
- [0130] 본 발명의 단클론 항체를 암호화하는 DNA는 종래 방법(예를 들어, 쥐 항체의 중연쇄(heavy chain) 및 경쇄(light chain)를 암호화하는 유전자에 특정적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브(probe)를 사용함)를 사용하여 쉽게 분리되고 서열화된다. 일단 분리되면, 상기 DNA는 발현 벡터에 위치할 수 있고 상기 벡터는 재조합 숙주 세포에서 단클론 항체의 합성을 달성하기 위하여, 상기 벡터가 이식되지 않으면 면역 글로블린 단백질을 생산하지 않는 대장균 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO) 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포에 이식된다. 항체를 암호화하는 DNA의 박테리아에서 재조합 발현은 관련 분야에 잘 알려져 있다(예를

들어, Skerra 외, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5, pp.256(1993); 및 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130, pp.151(1992) 참조).

[0131] 단클론 항체의 단편 및 유도체

[0132] (본 명세서에서 명백히 다른 식으로 표현되지 않으면, "항체" 또는 "항체들"이라는 용어에 포함된)본 발명의 항체, 바람직하게는 DF200과 같은 항체의 단편 및 유도체는 관련 분야에 알려진 기술로 생산될 수 있다. "면역 반응성 단편"은 완전한 항체 부분, 일반적으로 항원 결합 자리 또는 가변 구역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ 및 Fv 단편; 다이어바디(diabodies); 하나의 중단되지 않은 연속 아미노산 잔기로 구성된 1차 구조를 가진 폴리펩티드인 어떤 항체 단편(여기서는 "단일-체인 항체 단편" 또는 "단일 체인 폴리펩티드"라고 언급됨)으로, 제한 없이 (1) 단일-체인(single-chain) Fv(scFv) 분자, (2) 연관된 중연쇄 모이어티 없이, 경쇄 가변 구역의 세 개의 CDRs를 포함하는 단지 하나의 경쇄 가변 도메인 또는 그 단편을 포함하는 단일 체인 폴리펩티드, 및 (3) 연관된 경쇄 모이어티 없이, 중연쇄 가변 구역의 세 개의 CDRs를 포함하는 단지 하나의 중연쇄 가변 구역 또는 그 단편을 포함하는 단일 체인 폴리펩티드를 포함한다; 및 항체 단편에서 형성된 복합 특이성 항체이다. 예를 들어, Fab' 또는 F(ab')₂는 종래 기술에 따라, 분리된 항체의 프로테아제 소화의 해 생산될 수 있다. 면역 반응성 단편은 예를 들어 생체 내에서 제거를 늦추고 더 바람직한 약동학적 특성을 얻기 위하여 알려진 방법으로 변형될 수 있고 단편들은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 변형될 수 있다. PEG를 Fab' 단편에 연결시키고 자리-특정적으로 접합시키기 위한 방법은 참조를 위해 통합된 예를 들어 Leong 외, *Cytokine* 16(3):106-119(2001) 및 Delgado 외, *Br. J. Cancer* 73(2):175-182(1996)에 기술되어 있다.

[0133] 특정 관점에서, 본 발명은 도 12에서 도시한 것처럼 DF200의 경쇄 가변 구역 서열을 포함하는 항체, 항체 단편 및 항체 유도체를 제공한다. 다른 특정 관점에서, 본 발명은 도 12에 도시한 것처럼 Pan2D의 경쇄 가변 구역 서열을 포함하는 항체, 항체 단편 및 항체 유도체를 제공한다. 다른 관점에서, 본 발명은 도 12에 도시한 것처럼 DF200의 하나 이상의 경쇄 가변 구역 CDRs를 포함하는 항체, 항체 단편 및 그 유도체를 제공한다. 또 다른 관점에서, 본 발명은 도 12에 도시한 것처럼 Pan2D의 하나 이상의 경쇄 가변 구역 CDRs를 포함하는 항체, 항체 단편 및 그 유도체를 제공한다. 이러한 서열의 기능적인 변형/유사체는 서열 비교를 통해 도움을 받을 수 있는 표준 기술을 사용하여 이러한 공개된 아미노산 서열에서 적절한 치환, 첨가 및/또는 결실에 의해 만들어질 수 있다. 따라서, 예를 들어 Pan2D와 DF200 사이에서 유지되는 CDR 잔기는 이러한 잔기가 (비록 Pan2D 및 DF200이 경쟁하긴 하지만) 여기서 개시된 다른 항체와의 관계에서 이러한 항체들이 가진 다른 경쟁 특성에 기여하지 않고 따라서 그 특이적인 각각의 에피토프에 이러한 항체들의 특이성에 기여할 수 없으므로 변형을 위한 적절한 목표가 될 수 있다. 다른 관점에서, 잔기가 이러한 항체들 중 하나의 서열에 존재하고 다른 항체의 서열에는 존재하지 않는 위치는 결실, 치환 및/또는 삽입을 위해 적절할 수 있다.

[0134] 특정 관점에서, 본 발명은 도 13에 도시한 것처럼 DF200의 중연쇄 가변 구역 서열을 포함하는 항체, 항체 단편 및 항체 유도체를 제공한다. 다른 관점에서, 본 발명은 도 13에 도시한 것처럼 DF200의 하나 이상의 중연쇄 가변 구역 CDRs를 포함하는 항체, 항체 단편 및 그 유도체를 제공한다. 이러한 서열의 기능적인 변형/유사체는 서열 비교를 통해 도움을 받을 수 있는 표준 기술을 사용하여 이러한 공개된 아미노산 서열에서 적절한 치환, 첨가 및/또는 결실에 의해 만들어질 수 있다. 다른 관점에서, 잔기가 이러한 항체들 중 하나의 서열에 존재하고 다른 항체의 서열에는 존재하지 않는 위치는 결실, 치환 및/또는 삽입을 위해 적절할 수 있다.

[0135] 선택적으로, 본 발명의 항체, 바람직하게는 DF200과 같은 항체를 생산하는 융합 세포의 DNA는 본 발명의 단편을 암호화하기 위하여 변형될 수 있다. 변형된 DNA는 발현 벡터로 삽입되고 후에 원하는 단편을 발현시키는 적절한 세포를 형질 변환시키거나 감염시키기 위해 사용된다.

[0136] 다른 실시예에서, 본 발명의 항체, 바람직하게는 DF200과 유사한 항체를 생산하는 융합 세포의 DNA는 예를 들어 사람이 아닌 이형 동원(homologous)의 위치에 사람의 중연쇄 및 경쇄 일정 도메인을 위한 코딩 서열을 치환하거나(예를 들어, Morrison 외., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, pp.6851(1984)) 또는 비-면역 글로블린 폴리펩티드를 위한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로블린 코딩 서열에 공유적으로 결합시킴으로써 발현 벡터에 삽입되기에 앞서 변형될 수 있다. 이러한 식으로, "키메라" 또는 "이종" 항체는 생산되고 이는 최초 항체의 결합 특이성을 가진다. 일반적으로, 이러한 비-면역 글로블린 폴리펩티드는 본 발명의 항체의 일정한 도메인을 위해 치환된다.

[0137] 따라서, 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 항체, 바람직하게는 DF200과 유사한 항체는 인간화된다. 본 발명에

다른 항체의 "인간화" 형태는 쥐과 동물의 면역 글로블린에서 유래된 최소한의 서열을 포함하는 특정의 키메라 면역글로블린, 그것의 면역글로블린 체인 또는 단편(Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 서열과 같음)이다. 대부분의 경우, 인간화 항체들은 수용체의 상보적인-결정 구역(CDR)에서의 잔기가 최초 항체의 바람직한 특이성, 친화력 및 능력을 유지하면서 최초 항체(공여자 항체)의 CDR에서의 잔기로 치환되는 사람 면역 글로블린(수용체 항체)이다. 몇몇 경우에, 사람 면역 글로블린의 Fv 골격 잔기는 대응하는 사람의 것이 아닌 잔기로 치환될 수 있다. 또한, 인간화 항체는 수용체 항체 또는 이입된 CDR 또는 골격 서열에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형들은 항체의 능력을 더 연마시키고 최적화하도록 만들어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 CDR 구역 전부 또는 실질적으로 전부가 최초 항체의 CDR 구역에 대응하고 FR 구역의 전부 또는 실질적으로 전부가 사람 면역 글로블린 일차 서열의 FR 구역인 가변 도메인을 적어도 하나, 일반적으로 둘을 실질적으로 포함할 것이다. 또한, 인간화 항체는 적절하게는 면역 글로블린 일정 구역(Fc), 일반적으로 사람 면역 글로블린의 면역 글로블린 일정 구역을 포함할 것이다. 보다 구체적인 것은 Jones 외, *Nature*, 321, pp.522(1986); Reichmann 외, *Nature*, 332, pp.323(1988); 및 Presta, *Curr.Op.Struct.Biol.*, 2, pp.593(1992)에서 참조할 수 있다.

[0138] 본 발명의 항체를 사람화하는(humanizing) 방법은 관련 분야에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 본 발명에 따른 인간화 항체는 최초 항체로부터 주입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 이러한 쥐과 동물 또는 다른 사람이 아닌 동물의 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기로 언급되고, 이는 일반적으로 "유입" 가변 도메인에서 인용된다. 사람화(humanization)는 Winter 및 공동 연구자들의 방법을 따라 실행될 수 있다(Jones 외, *Nature*, 321, pp.522(1986); Riechmann 외, *Nature*, 322, pp.323(1988); Verhoeyen 외, *Science*, 239, pp.1534(1988)). 따라서, 이러한 "인간화" 항체들은 키메라 항체(Cabilly 외, U.S. Pat.No.4,816,567)이고, 실질적으로 완전한 사람의 가변 도메인보다 적은 것이 최초 항체의 대응하는 서열로 치환되었다. 실질적으로, 본 발명에 따른 인간화 항체는 일반적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 최초 항체에서 유사한 자리의 잔기로 치환된 사람 항체이다.

[0139] 인간화 항체를 만드는데 사용되는 사람 가변 도메인, 즉 중연쇄 및 경쇄 가변 도메인 둘 다의 선택은 항원성(antigenicity)을 줄이는데 매우 중요하다. 소위 "가장 적합한" 방법에 따르면, 본 발명의 항체의 가변 도메인의 서열은 알려진 사람의 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대하여 식별된다. 마우스의 서열에 가장 근접한 사람 서열은 사람에게 적용된 항체를 위해 사람 골격(FR)으로 수용된다(Sims 외, *J.Immunol.*, 151, pp.2296(1993); Chothia 및 Lesk, *J.Mol.Biol.*, 196, pp.901(1987)). 다른 방법은 경쇄 또는 중연쇄의 특정 하부그룹의 모든 사람 항체의 교감 서열로부터 특정 골격을 사용한다. 상기 같은 골격은 여러 다른 인간화 항체를 위해 사용될 수 있다(Carter 외, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89, pp.4285(1992); Presta 외, *J.Immunol.*, 51, pp.1993).

[0140] 복잡한 비활성화 KIR 수용체에 대한 높은 친화력 및 다른 유의한 생물학적 특성을 보유한 인간화 항체가 또한 중요하다. 이러한 목표를 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체는 어버이 서열의 분석 과정 및 어버이 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 인간화 여러 생성물에 의해 제조된다. 3차원 면역 글로블린 모델은 공통적으로 이용할 수 있고 관련 분야의 숙련된 자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역 글로블린 서열의 3차원 형상 구조는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 나타낼 수 있다. 이러한 화면 표시의 조사는 후보 면역 글로블린 서열의 기능에서 잔기의 그럴듯한 역할을 분석, 즉 후보 면역 글로블린이 그 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 식으로, FR 잔기는 선택될 수 있고 교감 및 유입 서열로부터 결합될 수 있고 그 결과 목표 항원(들)에 대한 증가한 친화력과 같은 원하는 항체 특성은 달성된다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 대하여 직접적 및 가장 실질적으로 연관이 있다.

[0141] "인간화" 단클론 항체를 만드는 다른 방법은 면역화를 위해 사용되는 마우스로서 XenoMouse® (Abgenix, Fremont, CA)를 사용하는 것이다. XenoMouse는 기능적인 사람 면역 글로블린 유전자로 치환된 면역 글로블린 유전자를 가진 본 발명에 따른 쥐과 숙주이다. 따라서, 이러한 마우스 또는 이러한 마우스의 B 세포로부터 만들어진 융합 세포에서 생산된 항체들은 이미 인간화된다. 상기 XenoMouse는 여기서 참조를 위해 통합된 미국 특허 No. 6,162,963에 기술되어 있다. 유사한 방법은 HuMAb-Mouse™(Medarex)를 사용하여 달성될 수 있다.

[0142] 사람 항체는 면역화를 위해 사람 항체 레퍼토리를 발현시키도록 유전적으로 변형된 다른 유전자 도입 동물을 사용하거나(Jakovitz 외, *Nature* 362(1993)255), 또는 파지 전사 방법을 사용하여 항체 레퍼토리의 선택에 의한 여러 가지 다른 기술에 따라 제조될 수 있다. 이러한 기술들은 숙련된 자에게 알려져 있고 본 명세서에 개시된 단클론 항체로부터 시작하여 실행될 수 있다.

- [0143] 본 발명의 항체, 바람직하게는 DF200과 유사한 항체는 중연쇄 및/또는 경쇄의 일부가 최초 항체와 동일하거나 또는 대응하는 서열에 이형 동형이고, 상기 체인의 나머지는 다른 종 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에서 유도된 항체와 동일하거나 또는 대응하는 서열에 이형 동형인 "키메라" 항체(면역 글로블린) 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편으로 유도될 수 있다(Cabilly 외, supra; Morrison 외., Proc.Nat1.Acad.Sci.U.S.A.,81,pp.6851(1984)).
- [0144] 본 발명의 범위 내에서 다른 유도체는 기능화된 항체, 즉 리신, 디프테리아 독소, 아브린(abrin) 및 수도모나스 외독소(Pseudomonas exotoxin)와 같은 독소; 형광 모이어티, 방사성 동위원소 또는 이미징제(imaging agent)와 같은 검출할 수 있는 모이어티; 아가로스 비드 등과 같은 고체 지지체에 접합하거나 공유 결합한 항체를 포함한다. 항체에 대한 이러한 다른 작용제의 접합 또는 공유 결합의 방법은 관련 분야에 잘 알려져 있다.
- [0145] 독소에 대한 접합은 세포 표면에 교차 반응하는 KIR 수용체 중 하나를 나타내는 NK 세포의 표적 살상을 위해 유용하다. 일단 본 발명의 항체가 이러한 세포의 표면에 결합하면, 상기 항체는 흡수되고 독소는 세포 내로 방출되어, 선택적으로 그 세포를 살상한다. 이러한 용도는 본 발명의 다른 실시예이다.
- [0146] 검출할 수 있는 모이어티에 대한 접합은 본 발명의 항체가 진단 목적으로 사용될 때 유용하다. 이러한 목적은 제한적이지는 않지만 그 세포 표면에 교차 반응하는 KIR을 가지고 있는 NK 세포의 존재 및 살아있는 생물체에 교차 반응하는 KIR을 품는 NK 세포의 존재를 검출하기 위해 생물학적 샘플을 평가하는 것을 포함한다. 이러한 평가 및 검출 방법은 또한 본 발명의 다른 실시예이다.
- [0147] 고체 지지체에 대한 본 발명의 항체의 접합은 생물학적 유체와 같은 공급원으로부터 세포 표면에 교차 반응하는 KIR을 가지고 있는 NK 세포의 친화력 정제를 위한 도구로서 유용하다. 이러한 정화 방법은 결과로 획득되는 정제된 NK 세포의 집단처럼 본 발명의 다른 실시예이다.
- [0148] 다른 실시예에서, NKVSF1을 포함하여, 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체 유전자 생성물에 존재하는 공통 결정자에 결합하고 본 발명의 적어도 두 개의 서로 다른 인체 비활성화 KIR 수용체에 대해 KIR이 증대하는 NK 세포 독성의 비활성화를 중화할 수 있는 항체는 단독으로 또는 동물에 목표로 하는 전달을 위해 다른 물질과 함께 리포솜("면역리포솜(immunoliposomes)")에 통합될 수 있다. 상기의 다른 물질은 유전자 치료를 위해 유전자를 전달하기 위한 핵산 또는 NK 세포에서 유전자의 발현을 억제하기 위한 안티센스 RNA, RNAi 또는 siRNA의 전달을 위한 핵산 또는 NK 세포의 표적 살상을 위한 독소 또는 약제를 포함한다.
- [0149] 공개된 결정 구조에 기초한 KIR2DL1,-2 및 -3(KIR2DL1-3)의 세포밖의 도메인의 컴퓨터 모델링(Maenaka 외.(1999), Fan 외.(2001), Boyington 외.(2000))은 KIR2DL1과 KIR2DL1-3-교차 반응하는 마우스 단클론 항체 DF200 및 NKVSF1 사이의 상호 작용에서 KIR2DL1,-2 및 -3의 어떤 구역의 관여를 예상하였다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명은 아미노산 잔기에 의해 한정된 구역 (105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181, 192) 내에서 KIR2DL1에 절대적으로 결합하는 항체를 제공한다. 다른 실시예에서 본 발명은 잔기에 의해 한정되는 구역 (105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 181, 192) 외부의 아미노산 잔기와 상호 작용 없이 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3을 결합하는 항체를 제공한다.
- [0150] 다른 실시예에서, 본 발명은 KIR2DL1에 결합하고 R131이 A1a인 KIR2DL1 돌연변이에 결합하지 않는 항체를 제공한다.
- [0151] 다른 실시예에서, 본 발명은 KIR2DL1에 결합하고 R157이 A1a인 KIR2DL1 돌연변이에 결합하지 않는 항체를 제공한다.
- [0152] 다른 실시예에서, 본 발명은 KIR2DL1에 결합하고 R158이 A1a인 KIR2DL1 돌연변이에 결합하지 않는 항체를 제공한다.
- [0153] 다른 실시예에서, 본 발명은 KIR2DL1 잔기(131, 157, 158)를 결합하는 항체를 제공한다.
- [0154] 다른 실시예에서, 본 발명은 KIR2DS3(R131W)에 결합하지만 와일드 형태 KIR2DS3에 결합하지 않는 항체를 제공한다.
- [0155] 다른 실시예에서, 본 발명은 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 뿐만 아니라 KIR2DS4를 결합하는 항체를 제공한다.

[0156] 다른 실시예에서, 본 발명은 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3 모두에 결합하지만, KIR2DS4에는 결합하지 않는 항체를 제공한다.

[0157] 항체가 상기에 한정된 에피토프 구역 중 하나를 결합하는지 아닌지의 결정은 관련 분야의 숙련된 자에게 알려진 방식으로 실행될 수 있다. 이러한 맵핑(mapping)/특징화 방법의 일 예로서, 항-KIR 항체의 에피토프 구역은 KIR2DL1 또는 KIR2DL2/3 단백질에서 노출된 아민/카르복실의 화학적 변형을 사용하는 에피토프 "풋프린팅(foot-printing)"에 의해 결정될 수 있다. 이러한 풋프린팅 기술의 특징에는 수용체의 수소/중수소 교환 및 리간드 단백질 아미드 양자, 결합, 및 후위 교환이 발생하고, 단백질 결합에 참여하는 중심 아미드 그룹은 후위 교환으로부터 보호되고 그러므로 중수소로 존재하는 HXMS(질량 분석으로 검출되는 수소-중수소 교환)이다. 관련 구역은 이 지점에서 펩신 단백질 가수분해, 빠른 미세관 고성능 액체 크로마토그래피 분리, 및/또는 전자분무 이온화 질량 분석으로 확인될 수 있다. 예를 들어, Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol.267(2)pp.252-259(1999) 및/또는 Engen, J.R. 및 Smith, D.L.(2001) Anal. Chem73, 256A-265A를 참조하라. 적절한 에피토프 확인 기술의 다른 예는 핵자기 공명(NMR) 에피토프 맵핑으로서, 일반적으로 자유 항원 및 항체와 같은 항원 결합 펩티드와 복합된 항원의 2차원 NMR 스펙트럼에서 신호의 위치가 비교된다. 항원은 일반적으로 ¹⁵N으로 선택적으로 동위원소 표지되어 항원에 대응하는 신호는 NMR-스펙트럼에 나타나고 펩티드를 결합하는 항원은 어떤 신호도 나타나지 않는다. 항원 결합 펩티드와 상호 작용하는 아미노산에서 유래된 항원 신호는 일반적으로 자유 항원의 스펙트럼과 비교하여 복잡한 스펙트럼에 위치하고 결합에 관련된 아미노산은 이런 식으로 확인될 수 있다. 예를 들어, Ernst Schering Res Found Workshop.2004;(44):149-67; Huang 외, Journal of Molecular Biology, Vol.281(1)pp.61-67(1998); 및 Saito 및 Patterson, Methods. 1996 Jun;9(3):516-24를 참조하라. 에피토프 맵핑/특징화는 또한 질량 분석법을 사용하여 실행될 수 있다. 예를 들어, Downward, J Mass Spectrom.2000 Apr;35(4):493-503 및 Kiselar 및 Downard, Anal Chem.1999 May 1;71(9):1792-801을 참조하라.

[0158] 프로테아제 소화 기술은 또한 에피토프 맵핑 및 확인을 위해 유용할 수 있다. 항원 결정자 관련 구역/서열은 프로테아제 소화, 예를 들어 37°C, pH 7-8에서 KIR2DL1 또는 KIR2DL2/3에 대하여 그 비율이 약 1:50인 트립신을 사용하고, 이어서 펩티드 확인을 위해 질량 분석(MS)을 함으로써 결정될 수 있다. 항-KIR 결합에 의해 트립신 분해로부터 보호된 펩티드는 트립신 소화를 당한 샘플 및 항체와 배양되고 그런 다음 예를 들어 트립신에 의해 소화된 샘플을 비교함으로써 실질적으로 확인될 수 있다(따라서 바인더에 대해 풋프린트를 나타낸다). 키모트립신, 펩신 등과 같은 다른 효소 또한 선택적으로 유사한 에피토프 특징화 방법에 사용될 수 있다. 또한, 효소성 소화는 잠재된 항원 결정자 서열이 표면에 노출되지 않은 항-KIR 폴리펩티드의 내용에서 KIR2DL1의 구역 내에 존재하는지 여부를 재빨리 분석하는 방법을 제공할 수 있고, 따라서 면역 발생력/항원성의 관점에서 거의 대부분 관련이 없다. 예를 들어, 유사한 기술에 관한 Manca, Ann Ist Super Sanita.1991;27(1):15-9를 참조하라.

[0159] 사이노물거스 원숭이와 교차 반응

[0160] 실시예 7을 보면, 항체 NKVSF1가 또한 사이노물거스 원숭이의 NK 세포에 결합한다는 것이 발견되었다. 따라서 본 발명은 사람 NK 세포 표면에서 적어도 두 개의 비활성화 사람 KIR 수용체와 교차 반응하고 사이노물거스 원숭이의 NK 세포에 또한 결합하는 항체 뿐만 아니라 그 단편 및 유도체를 제공한다. 일 실시예에서, 상기 항체는 항체 NKVSF1이 아니다. 본 발명은 또한 사람 NK 세포 표면에서 적어도 두 개의 비활성화 사람 KIR 수용체와 교차 반응하는 항체 뿐만 아니라 그 단편 및 유도체의 독성을 시험하는 방법을 제공하고, 또한 상기 방법은 사이노물거스 원숭이에서 항체를 시험하는 것을 포함한다.

[0161] 조성물 및 투여

[0162] 본 발명은 또한 항체 뿐만 아니라 그 단편 및 유도체를 포함하는 약제 조성물을 제공하며, 상기 항체, 단편 및 유도체는 NK 세포를 포함하는 환자 또는 생물학적 샘플에서 NK 세포 독성을 검출할 수 있게 상승시키기에 효과적인 분량의 어떤 적절한 운반체를 이용하여 NK 세포 표면에서 적어도 두 개의 비활성화 사람 KIR 수용체와 교차 반응하고 비활성화 신호를 중화하며 이러한 세포의 활성을 상승시킨다. 상기 조성물은 또한 약제학적으로 수용할 수 있는 운반체를 더 포함한다. 이러한 조성물은 또한 "본 발명의 항체 조성물"로 언급될 수 있다. 일 실시예에서, 본 발명의 항체 조성물은 상기 항체 실시예에서 개시된 항체를 포함한다. 항체 NKVSF1은 본 발명의 항체 조성물에서 존재할 수 있는 항체의 범위 내에 포함된다.

[0163] 여기서 사용되는 "생물학적 샘플"이라는 용어는 제한적이지는 않지만 생물학적 유체(예를 들어 혈청, 림프, 혈

액), 세포 샘플 또는 조직 샘플(예를 들어 골수)을 포함한다.

- [0164] 상기의 이러한 조성물에서 사용될 수 있는 약제학적으로 수용할 수 있는 캐리어는 제한적이지는 않지만 이온 교환기, 알루미나, 스테아르산 알루미늄, 레시틴, 사람 혈청 알부민과 같은 혈청 단백질, 인산염과 같은 완충 물질, 글리신, 소르브산, 소르브산 칼륨, 포화된 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물, 물, 황산 프로타민과 같은 염 또는 전해질, 수소인산나트륨, 수소인산칼륨, 염화나트륨, 아연염, 콜로이드성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로오스에 기초한 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 폴리머, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지(wool fat)를 포함한다.
- [0165] 본 발명의 조성물은 환자나 생물학적 샘플에서 NK 세포의 활성을 상승시키는 방법에서 사용될 수 있다. 이러한 방법은 상기 조성물을 환자 또는 생물학적 샘플에 접촉시키는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 진단 및 치료 목적 모두를 위해 유용할 것이다.
- [0166] 생물학적 샘플에 사용하기 위해, 항체 조성물은 샘플의 특성(유체 또는 고체)에 따라 간단히 혼합하거나 또는 직접적으로 샘플에 적용함으로써 투여될 수 있다. 상기 생물학적 샘플은 어떤 적절한 장치(플레이트, 파우치, 플라스크 등)에서 항체와 직접적으로 접촉할 수 있다. 환자에게 사용하기 위해, 상기 조성물은 환자에 투여하기 위해 제제되어야 한다.
- [0167] 본 발명의 조성물은 흡입 스프레이에 의해 국소적인 흡입 살포에 의해 경구로, 비경구로, 직장으로(rectally), 코로(nasally), 구강으로, 질로 투여될 수 있으며 또는 이식된 저장통을 통해 투여될 수 있다. 여기서 사용되는 "비경구"라는 용어는 피하, 정맥 내, 근육 내, 관절 내, 활액 내(intra-synovial), 흉골 내(intrasternal), 척추강 내(intrathecal), 간 내, 병소 내(intralesional) 및 두개 내(intracranial) 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 바람직하게는, 상기 조성물은 경구로, 복강 내로 또는 정맥 내로 투여된다.
- [0168] 본 발명의 조성물의 살균 주입할 수 있는 형태는 수용성 또는 유성 현탁액일 수 있다. 이러한 현탁액은 적절한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하는 관련 분야의 알려진 기술에 따라 제형될 수 있다. 살균 주입할 수 있는 제조물은 1,3-부타디올로서 또한 비독성의 비경구적으로 수용할 수 있는 희석제 또는 용매에서 살균 주입할 수 있는 용액 또는 현탁액일 수 있다. 사용될 수 있는 수용할 수 있는 운반체 및 용매들 중에서는 물, 링거액 및 염화 나트륨 등장(等張)액이 있다. 또한, 살균한 응고된 오일은 종래에 용매 또는 현탁 매질로 사용된다. 이러한 목적을 위하여, 어떤 혼합된 응고 오일은 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함하여 사용될 수 있다. 올레산과 같은 지방산 및 그 글리세리드 유도체는 주입할 수 있는 제조물에서 유용하고, 특히 폴리옥시에틸레이트화된(polyoxyethylated) 형태의 올리브유 또는 피마자유와 같은 자연스러운 제약적으로 수용할 수 있는 오일이다. 이러한 오일 용액 또는 현탁액은 또한 카르복시메틸 셀룰로오스 또는 에멀션 및 현탁액을 포함하는 제약적으로 수용할 수 있는 투여 형태의 제형에 공통적으로 사용되는 유사한 분산제와 같은 긴사슬 알콜 희석제 또는 분산제를 포함할 수 있다. Tweens, Spans 및 다른 에멀션화제와 같은 다른 공통적으로 사용되는 계면 활성제 또는 제약학적으로 수용할 수 있는 고체, 액체 또는 다른 투여 형태의 제조에서 공통적으로 사용되는 생활성 향상제는 또한 제형을 위해 사용될 수 있다.
- [0169] 본 발명의 조성물은 제한적이지는 않지만 캡슐, 정제, 수용성 현탁액 또는 용액을 포함하는 어떤 경구적으로 수용할 수 있는 투여 형태로 경구에 투여될 수 있다. 경구 투여를 위한 정제의 경우, 공통적으로 사용되는 캐리어는 락토오스 및 옥수수 녹말을 포함한다. 스테아르산 마그네슘과 같은 광택제는 또한 일반적으로 첨가된다. 캡슐 형태로 경구 투여를 위해, 유용한 희석제는 락토오스 및 건조된 옥수수 녹말을 포함한다. 경구 투여를 위해 수용성 현탁액이 필요할 때, 활성 제제는 에멀션화제 및 현탁제와 혼합된다. 원한다면, 감미료, 향료 또는 착색제가 또한 첨가될 수 있다.
- [0170] 선택적으로, 본 발명의 조성물은 직장(rectal) 투여를 위해 좌약의 형태로 투여될 수 있다. 이러한 것은 실온에서 고체이고 직장에서 액체여서 직장에서 약을 방출하기 위해 녹는 적절한 비-자극적 첨가제와 약제를 혼합함으로써 제조될 수 있다. 이러한 물질은 코코아 버터, 벌꿀 왁스 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0171] 본 발명의 조성물은 또한 특히 치료하기 위한 표적이 눈, 피부 또는 하부 장관(lower intestinal tract)을 포함하여 국소적인 적용으로 쉽게 접근할 수 있는 부위 또는 기관을 포함할 때 국소적으로 투여될 수 있다. 적절한 국소 제형은 이러한 각 부위 및 기관을 위해 쉽게 제조될 수 있다.
- [0172] 하부 장관을 위한 국소 적용(topical application)은 직장 좌약 제형(상기 참조) 또는 적절한 관장 제형에서 효과적일 수 있다. 국소적인 경피성 패취 역시 사용될 수 있다.

- [0173] 국소 적용을 위해, 상기 조성물은 하나 이상의 캐리어에 분산되거나 용해된 활성 성분을 포함하는 적절한 연고로 제형될 수 있다. 본 발명의 화합물의 국소 투여를 위한 캐리어는 제한적이지는 않지만 미네랄 오일, 액체 바셀린, 백색 바셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 에멀션화 왁스 및 물을 포함한다. 선택적으로, 본 조성물은 하나 이상의 제약적으로 수용할 수 있는 캐리어에 분산되거나 용해된 활성 성분을 포함하는 적절한 로션 또는 크림으로 제형될 수 있다. 적절한 캐리어는 제한적이지는 않지만 미네랄 오일, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 시테아릴 알콜, 2-옥틸도데카놀, 벤진 알콜 및 물을 포함한다.
- [0174] 눈에 사용하기 위해, 본 조성물은 pH가 조절된 살균 염수 등장액 또는 더 바람직하게는 염화 벤질알코니움 (benzylalkonium chloride)과 같은 방부제를 포함하거나 그렇지 않은 pH가 조절된 살균 염수 등장액에서 미분화된 현탁액으로 제형될 수 있다. 선택적으로, 눈에 사용하기 위해, 본 조성물은 바셀린과 같은 연고로 제형될 수 있다.
- [0175] 본 발명의 조성물은 또한 코 에어로졸 또는 흡입제로서 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 제약의 제형 분야에서 잘 알려진 기술에 따라 제조되고 벤질 알콜 또는 다른 적절한 방부제, 생활성을 향상시키기 위한 흡수 촉진제, 탄화플루오르, 및/또는 종래의 다른 용화제 또는 분산제를 포함하는 염수 용액으로 제조될 수 있다.
- [0176] Rituxan(Rituximab), Herceptin(Trastuzumab) 또는 Xolair(Omalizumab)와 같은 여러 단클론 항체들은 임상에서 효과적인 것으로 나타났고, 유사한 투여 계획(예를 들어, 제형 및/또는 복용량 및/또는 투여 프로토콜)은 본 발명의 항체에서 사용될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물에서 항체의 투여를 위한 일정 및 복용량은 예를 들어 제조자의 지시를 사용하여 이러한 제조물에 알려진 방법에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 제약 조성물에 존재하는 항체는 100mg(10mL) 또는 500mg(50mL) 일회용 유리병에 10mg/mL 농도로 공급될 수 있다. 생산물은 염화 나트륨 9.0mg/mL, 구연산 나트륨 2수화물 7.35mg/mL, 폴리소르베이트 80 0.7mg/mL 및 주입을 위한 살균수에서 IV 투여를 위해 제형된다. 그 pH는 6.5로 조절된다. 본 발명의 제약 조성물에서 항체의 대표적으로 적절한 투여 범위는 약 10 mg/m²와 500 mg/m² 사이이다. 그러나, 이러한 계획은 예시적인 것이고 최적의 일정 및 투약 계획은 임상 시험에서 결정되어야 할 약제 조성물에서 특정 항체의 친화력 및 허용 한계를 고려하여 조절될 수 있다. NK 세포를 24시간, 48시간, 72시간 또는 일 주 또는 한 달 동안 포화시키는 본 발명의 제약 조성물에서 항체의 주입 분량 및 계획은 항체의 친화력 및 약동학적 변수를 고려하여 결정될 것이다.
- [0177] 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 항체 조성물은 일반적으로 항체가 투여되는 특정의 치료 목적을 위해 사용되는 다른 치료제를 더 포함할 수 있다. 추가적인 치료제는 일반적으로 치료될 특정 질병 또는 상태를 위해 단독 요법에서 사용되는 양으로 조성물에 존재할 것이다. 이러한 치료제는 제한적이지는 않지만 암의 치료에 사용되는 치료제, 전염성 질병의 치료에 사용되는 치료제, 다른 면역요법에서 사용되는 치료제, (IL-2 또는 IL-15와 같은)사이토킨, 다른 항체 및 다른 항체의 단편을 포함한다.
- [0178] 예를 들어, 치료제의 수는 암의 치료를 위해 소용이 있다. 본 발명의 항체 조성물 및 방법은 특정 질병, 특히 종양, 암 질병, 또는 다른 질병 또는 환자가 나타내는 장애의 치료에서 일반적으로 사용되는 어떤 다른 방법과 합동으로 사용될 수 있다. 특정 치료법이 환자의 상태에 대해 해롭지 않은 것으로 알려지고, 본 발명의 제약 조성물의 항체의 활성을 상당히 증화시키지 않는 한, 본 발명과의 조합이 고려된다.
- [0179] 딱딱한 종양 치료와 관련하여, 본 발명의 제약 조성물은 수술, 방사선치료, 화학 요법 등과 같은 종래 치료법과 병행하여 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 제약 조성물이 수술 또는 방사 치료 전 또는 후에 동시에 사용되고; 종래의 화학 요법, 방사 요법 또는 항-혈관신생 유도제(anti-angiogenic agents) 또는 목표로 한 면역독소 또는 응고리간체(coaguligands)의 전 또는 후에 환자에게 투여되는 복합 치료책을 제공한다.
- [0180] 하나 이상의 작용제가 치료 투약 계획에서 항체를 포함하는 본 발명의 조성물과 합동으로 사용될 때, 복합된 결과는 각각의 치료가 개별적으로 실행될 때 관찰되는 결과의 합이 될 필요는 없다. 비록 적어도 부가적인 효과가 일반적으로 바람직하긴 하지만, 단일 치료 중 하나 이상의 증가된 항암 효과가 이익이 될 것이다. 또한, 가능성이 있고 바람직하긴 하지만 복합 처리가 시너지 효과를 나타낼 필요는 없다.
- [0181] 복합의 항암 치료를 실행하기 위하여, 동물에게 다른 항암제와 함께 본 발명의 항체 조성물을 상기 동물 내에서 복합적인 항암 작용을 효과적으로 유발하는 식으로 단순히 투여한다. 따라서 본 작용제는 종양 맥관구조 내에 복합된 형태로 존재하고 종양 환경에 복합된 작용을 초래하도록 효과적인 양 및 효과적인 시간 동안 제공될 것이다. 이러한 목표를 달성하기 위하여, 본 발명의 항체 조성물 및 항암제는 단일 복합 조성물 또는 다른 투여 경로를 사용하는 두 개의 분리된 조성물로 동시에 동물에게 투여될 수 있다.

- [0182] 선택적으로, 본 발명의 항체 조성물의 투여는 예를 들어 몇 분에서 몇 주 및 몇 달 범위의 시간 간격으로 항암제 처리에 선행하거나 또는 후행할 수 있다. 항암제 및 본 발명의 항체 조성물의 항체는 바람직하게는 암에 대하여 복합 효과를 발휘할 것이다.
- [0183] 대부분의 항암제는 항-혈관신생 치료에서 본 발명의 비활성화 KIR 항체 조성물에 선행하여 투여될 것이다. 그러나, 항체의 면역접합체가 본 발명의 항체 조성물에서 사용될 때, 여러 항암제는 동시에 또는 연속하여 투여될 수 있다.
- [0184] 어떤 경우에, 각각의 항암제 투여 또는 항암제 치료와 본 발명의 항체 조성물의 투여 사이의 시간 간격을 몇 일 (2,3,4,5,6 또는 7), 몇 주(1,2,3,4,5,6,7 또는 8) 또는 심지어 몇 달(1,2,3,4,5,6,7 또는 8)로 하여 치료를 위한 시간 기간을 상당히 늘리는 것도 바람직할 수 있다. 이는 수술 또는 화학 요법과 같은 항암 치료가 종양을 실질적으로 파괴하고, 본 발명의 항체 조성물의 투여가 미세전이(micrometastasis) 또는 종양의 재생장을 방지하고자 하는 경우에 바람직할 수 있다.
- [0185] 또한, 비활성화 KIR 항체에 기초한 본 발명의 조성물 또는 항암제의 하나 이상의 투여가 사용될 것임을 상상할 수 있다. 이러한 작용제들은 서로 다른 날 또는 주; 또는 본 발명의 비활성화 KIR 항체 조성물의 치료 주기 후에 이어 항암제 치료 주기와 같이 호환성 있게 투여될 수 있다. 어떤 경우에, 복합 치료로 종양을 퇴화시키기 위해 필요한 모든 것은 투여의 시간에 상관없이 항암 효과를 발휘하기에 효과적인 복합 분량의 두 작동제를 전달하는 것이다.
- [0186] 수술면에서, 어떤 수술 개입은 본 발명과 조합하여 실행될 수 있다. 방사 요법과 관련하여, 암세포 내에서 국부적으로 DNA 손상을 유발하기 위한 어떤 메카니즘, 즉 감마-방사선 치료, X-레이, UV-방사선 치료, 극초단파 및 심지어 전자 방출 등과 같은 메카니즘을 상상할 수 있다. 암세포에 방사성 동위 원소의 직접적인 전달을 또한 상상할 수 있고, 이는 목표로 하는 항체 또는 다른 목표로 하는 수단과 연계하여 사용될 수 있다.
- [0187] 다른 관점에서, 면역 조절 화합물 또는 처방은 본 발명의 항체 조성물과 함께 또는 부분으로 투여될 수 있다. 면역 조절 화합물의 바람직한 예는 시토킨이다. 여러 가지 시토킨들은 이러한 복합 처방법에서 사용될 수 있다. 본 발명에서 생각하는 복합물에 유용한 시토킨의 예들은 IL-1알파와 IL-1베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, TGF-베타, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF-알파, TNF-베타, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-알파, IFN-베타, IFN-감마이다. 복합 치료 또는 본 발명의 조성물에서 사용되는 시토킨은 환자의 조건 및 시토킨의 상대적 독성과 같은 임상 징후에 일관되게 표준 처방 계획에 따라 처방된다.
- [0188] 어떤 실시예에서, 교차 반응하는 비활성화 KIR 항체를 포함하는 본 발명의 치료 조성물은 화학 요법제 또는 호르몬 치료제와 혼합하여 투여되거나 화학 요법제 또는 호르몬 치료제를 더 포함할 수 있다. 다양한 호르몬 치료제 및 화학 요법제는 본 명세서에서 개시된 복합 치료 방법에서 사용될 수 있다. 전형적인 화학 요법제로 생각해 볼 수 있는 것은 제한적이지는 않지만 알킬화제(Alkylating agent), 대사길항제(antimetabolites), 세포독성 항생제, 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid), 예를 들어 아드리아마이신, 닥티노마이신, 미토마이신, 카르미오마이신, 다우노마이신, 독소루비신, 타목시펜, 탁솔, 텍소티어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈(vinorelbine), 에토포사이드(VP-16), 5-플루오르우라실(5FU), 시토신 아라비노사이드, 시클로포스파미드, 티오테라, 메토티렉사트, 캄포테신, 악티노마이신-D, 미토마이신 C, 시스플라틴(CDDP), 아미노프테린, 캄브레테스테틴(combretastatin(s)) 및 유도체 및 그 프로드러그(prodrug)를 포함한다.
- [0189] 호르몬제는 제한적이지는 않지만 예를 들어 루프로렐린(leuprorelin), 고세렐린(goserelin), 트립토티렐린(triptorelin), 및 부세렐린(buserelin)과 같은 LHRH 촉진제; 타목시펜 및 토레미펜(toremifene)과 같은 항-에스트로젠; 플루타미드, 닐루타미드(nilutamide), 시프로테론 및 비칼루타미드와 같은 항-안드로젠; 애너스트로졸(anastrozole), 엑스메스탄(exemestane), 레트로졸(letrozole) 및 파드로졸(fadrozole)과 같은 아로마타이즈(aromatase) 억제제; 메드록시, 클로르마디논(chlormadinone) 및 메게스트롤(megestrol)과 같은 프로게스타젠(progestagens)을 포함한다.
- [0190] 관련 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 이해되는 것처럼, 화학 요법제의 적절한 복용량은 화학 요법제가 단독으로 또는 다른 화학 요법제와 합동으로 투여되는 임상 치료에서 이미 사용되는 정도일 것이다. 일 예로서, 시스플라틴과 같은 작동제 및 다른 DNA 알킬화가 사용될 수 있다. 시스플라틴은 전체 3번에 걸쳐 매 3주에 5일 동안 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 의 임상 투여로 사용되는 효과가 있는 투여량으로 암을 치료하기 위해 폭넓게 사용되고 있다. 시스플라틴은 경구로 투여되지 않으므로 정맥 내, 피하, 종양 내 또는 복강 내 주사를 통해 전달되어야 한다.

- [0191] 더 유용한 화학 요법제는 DNA 복제, 미토시스 및 염색체 분리를 방해하는 화합물 및 폴리뉴클레오티드 전구체의 합성 및 적합(fidelity)을 방해하는 작동제를 포함한다. 복합 치료를 위한 다수의 대표적인 화학 요법제는 참조를 위해 본 명세서에 통합된 미국 특허 No. 6,524,583의 표 C에 기술되어 있다. 상기 표에 기술된 각각의 작동제는 예시적인 것이지 제한적인 것은 아니다. 숙련된 기술자는 "레밍턴의 제약 과학(Remington's Pharmaceutical Science)" 15th Edition, chapter 33, 특히 페이지 624-652에 지시를 받는다. 투여량은 치료 조건에 따라 변화할 것이다. 의사는 각 개인에 따라 적절한 복용량을 결정할 수 있다.
- [0192] 본 발명의 교차 반응하는 비활성화 KIR 항체 조성물은 어떤 하나 이상의 항-혈관형성(anti-angiogenic) 치료제와 복합적으로 사용될 수 있고 또는 항-혈관 신생제를 더 포함할 수 있다. 이러한 항-혈관형성제의 예는 중화하는 항체, 안티센스 RNA, siRNA, RNAi, RNA 앵타머(aptamers) 및 각각 VEGF 또는 VEGF 수용체에 대항하는 리보자임을 포함한다(참조를 위해 통합된 미국 특허 No.6,524,583). 상반되는 특성을 가진 VEGF 변형들은 또한 사용될 수 있으며, 이는 참조를 위해 본 명세서에 통합된 국제 특허 98/16551에 기술되어 있다. 복합 치료에서 유용한 항-혈관 신생제의 다른 예들은 미국 특허 No. 6,524,583의 표 D에 기술되어 있으며, 참조를 위해 특허 작동제 및 지시 사항들이 통합된다.
- [0193] 본 발명의 비활성화 KIR 항체 조성물은 바람직하게는 아포토시스(apoptosis)를 유발하는 방법과 함께 사용될 수 있고 또는 사멸제(apoptotic agents)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 다수의 종양 유전자가 아포토시스, 또는 프로그래밍된 세포 사멸을 억제하는 것으로 확인되었다. 본 발명의 범위에서 대표적인 종양 유전자는 제한적이지는 않지만 bcr-abl, bcl-2(bcl-1, cyclin D1과 구분됨; GenBank accession numbers M14745, X06487; 미국 특허 No. 5,650,491 및 5,539,094; 각각은 참조를 위해 여기에 통합됨) 및 Bcl-x1, Mcl-1, Bak, A1 및 A20을 포함하는 집합체 구성원을 포함한다. bcl-2의 과잉 발현이 T 세포 림프종에서 처음으로 발견되었다. 종양 유전자 bcl-2는 Bax, 사멸 경로의 단백질을 결합하고 불활성화시킴으로써 기능한다. bcl-2의 기능의 억제는 Bax의 불활성화를 방지하고, 사멸 경로가 진행되도록 한다. 예를 들어, 안티센스 뉴클레오티드 서열, RNAi, siRNA 또는 작은 분자 화학 화합물을 사용하여 종양 유전자의 이러한 기능을 억제하는 것은 아포토시스를 향상시키기 위해 본 발명에서 사용을 고려해 볼 수 있다(미국 특허 No.5,650,491; 5,539,094; 및 5,583,034; 각각은 참조를 위해 여기에 통합됨).
- [0194] 본 발명의 비활성화 KIR 항체 조성물은 표적 세포, 예를 들어 표적 종양 세포의 특정 표지로 향하는 타겟팅 부분, 예를 들어 항체, 리간드 또는 그것의 접합체를 포함하는 분자("타겟팅제(targeting agent)")를 포함하거나 또는 상기 분자와 협력하여 사용될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 이러한 부가적인 관점에서 사용하기 위한 타겟팅제는 우선적으로 또는 특정적으로 종양 자리에서 발현되는 접근할 수 있는 종양 항원을 바람직하게도 인식할 것이다. 상기 타겟팅제는 일반적으로 종양 세포의 표면 발현되는, 표면 접근할 수 있는 또는 표면에 집중된 부분에 결합할 것이다. 상기 타겟팅제는 또한 바람직하게는 높은 친화력을 나타낼 것이고; 심장, 신장, 뇌, 간, 골수, 결장, 가슴, 전립선, 갑상선, 쓸개, 폐, 부신, 근육, 신경섬유, 췌장, 피부 또는 다른 생명 유지 기관 또는 인체의 조직 중에서 선택되는 적어도 하나 이상의 조직과 같은 생명을 유지하는 일반적인 조직에 대하여 생체 내에서 심각한 부작용을 나타내지 않을 것이다. "심각한 부작용을 나타내지 않는다"라는 용어는 타겟팅제가 생체 내에 투여되었을 때 일반적인 화학 요법을 실행하는 동안 발생하는 효과와 같은 무시할 수 있고 임상학적으로 처리하기 쉬운 부작용을 발생시킴을 의미한다.
- [0195] 종양 치료에서, 본 발명의 항체 조성물은 부가 화합물을 부가적으로 포함하거나 또는 함께 사용될 수 있다. 부가 화합물은 일 예로 세로토닌 길항제와 같은 항-구토제(anti-emetics) 및 페노티아진계 약제(phenothiazines), 치환된 벤즈아미드, 항히스타민제, 항정신병약물(Butyrophenones), 코티코스테로이드(Corticosteroids), 벤조디아제핀(Benzodiazepines) 및 카나비노이드(cannabinoid)와 같은 치료제; 졸레드로닉산(zoledronic acid) 및 파미드로닉산(pamidronic acid)과 같은 비스포스포네이트(bisphosphonates); 및 에리스로포이에틴(erythropoietin) 및 G-CSF와 같은 적혈구 생성 촉진 인자, 예를 들어 필그라스티움(filgrastim), 레노그라스티움(lenograstim) 및 다베포이에틴(darbepoietin)을 포함할 수 있다.
- [0196] 다른 실시예에서, NKVSF1을 포함하여 다른 교차 반응성을 가진 본 발명의 둘 이상의 항체는 가능한 한 많은 비활성화 KIR 유전자 생성물의 비활성화 효과를 중화하기 위하여 단일 조성물과 조합될 수 있다. 본 발명의 교차 반응하는 비활성화 KIR 항체, 또는 그 단편 또는 유도체의 조합을 포함하는 조성물은 단일의 교차 반응하는 항체에 의해 인식되는 각각의 비활성화 KIR 유전자 생성물이 부족할 수 있는 사람 집단의 일부가 존재할 수 있기 때문에 훨씬 더 폭넓게 사용될 것이다. 유사하게, 본 발명의 항체 조성물은 단일의 비활성화 KIR 아류를 포함하는 하나 이상의 항체를 더 포함할 수 있다. 이러한 조합은 치료 과정에서 더 넓은 활용폭을 제공한다.

- [0197] 본 발명은 또한 필요시에 환자에게서 NK 세포 활성을 상승시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 환자에게 본 발명에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 증가된 NK 세포 활성이 유익하고, NK 세포에 의한 용해에 영향을 받는 세포와 관련이 있고 영향을 미치며 영향을 받으며, 암, 다른 증식성 장애, 전염성 질병 또는 면역 장애와 같은 불충분한 NK 세포 활성에 의해 야기되는 질병을 가진 환자에게 더욱 더 특징적으로 NK 세포 활성을 증가시킨다. 더 구체적으로, 본 발명의 방법은 다양한 암 및 제한적이지는 않지만 편평상피 세포(squamous cell) 암종을 포함하여 방광, 가슴, 결장, 신장, 간, 난소, 전립선, 췌장, 위, 목, 갑상선 및 피부의 암종; 백혈병을 포함하여 임파구 계통 조혈성 종양, 급성 임파성 백혈병, 급성 임파아구성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, Hodgkins 림프종, non-Hodgkins 림프종, Hairy-cell 림프종 및 Burketts 림프종; 급성 및 만성 골수성 백혈병 및 전골수성 백혈병을 포함하여 골수 계통의 조혈성 종양; 섬유육종(Fibrosarcoma) 및 횡문근종(rhabdomyosarcoma)을 포함하여 중간엽(mesenchymal) 기관의 종양; 흑색종, 정상피종, 기형암종(Teratocarcinoma), 신경아세포종(neuroblastoma) 및 신경교종(glioma)을 포함하여 다른 종양; 성상세포종(astrocytoma), 신경아세포종, 신경교종 및 신경집종(schwannomas)을 포함하여 중추신경 시스템 및 말초신경 시스템의 종양; 섬유 육종, 횡문근종 및 골육종(Osteosarcoma)을 포함하여 중간엽 기관의 종양; 흑색종, 색소성건피증(xeroderma pigmentosum), 각화극세포종(keratocanthoma), 정상피종, 여포상갑상선암(follicular thyroid cancer) 및 기형암종을 포함하여 다른 종양 치료를 위해 활용된다.
- [0198] 본 발명에 따라 치료될 수 있는 바람직한 장애는 작은 세포 및 주름진 세포 형태의 T-전임파구성백혈병(prolymphocytic leukemia)(T-PLL)과 같은 T-세포 장애를 포함하여 예를 들어 T-세포 및 B-세포 종양과 같은 조혈성 종양; 바람직하게는 T-세포 형태의 큰 과립 림프성 백혈병(LGL); 세자리증후군(Sezary syndrome:SS); 성인의 T세포 백혈병과 림프종(ATLL); a/d T-NHL 간비장 림프종; 주변/후-흉선 형성 T 세포 림프종(다세포 및 면역 모세포 아류); 엔지오(angio) 면역모세포 T-세포 림프종; 엔지오센트릭(angiocentric)(코) T-세포 림프종; 미분화(Ki 1+) 큰 세포 림프종; 장의 T-세포 림프종; T-임파구성; 및 림프종/백혈병(T-Lbly/T-ALL)을 포함한다.
- [0199] 예를 들어, 이상 증식, 섬유증(특히, 폐의 섬유증, 또한 신장 섬유증과 같은 다른 형태의 섬유증), 신생혈관의 생성(Angiogenesis), 건선(psoriasis), 아테롬성 동맥 경화증 및 혈관 형성을 해야 하는 협착증 또는 재협착과 같은 혈관에서의 민무늬근 증식을 포함하여 다른 증식성 장애는 또한 본 발명에 따라 치료될 수 있다.
- [0200] 본 발명의 교차 반응하는 비활성화 KIR 항체는 바람직하게는 바이러스, 박테리아, 원생동물, 곰팡이 또는 곰팡이에 의해 유발되는 어떤 전염성 질병을 치료하고 방지하는데 사용될 수 있다. 이러한 바이러스성 감염 생물체는 제한적이지는 않지만 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자, 수두, 아데노바이러스, 단순포진바이러스-1(HSV-1), 단순포진바이러스-2(HSV-2), 우역, 코감기 바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스, 호흡계 활액 바이러스(respiratory syncytial virus), 유두종 바이러스, 사이토메갈로(거세포) 바이러스, 에키노바이러스(echinovirus), 아르보바이러스, 헌타바이러스(huntavirus), 수족구병 바이러스(coxsackie virus), 볼거리 바이러스(Mumps Virus), 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 소아마비 바이러스 및 인체 면역결핍 바이러스-1, -2(HIV-1, HIV-2)를 포함한다.
- [0201] 본 발명에 따라 치료될 수 있는 박테리아성 감염은 제한적이지는 않지만 다음에 의해 유발되는 감염이다: 포도상구균; S. pyogenes를 포함하여 연쇄상 구균; 장구균; 탄저균을 포함하여 바실러스 및 락토바실러스; 리스테리아; 코리네박테리아 디프테리아; G. 바지날리스를 포함하여 가드넬라; 노카디아; 스트렙토미세스, 터모악티노미세스 불가리스; 트레포넬라; 캄플라오박터(camplyobacter), 래루기노사(Raeruginosa)를 포함하여 수도모나스; 레지오넬라; 개요 임균(Neisseria gonorrhoeae) 및 뇌수막염균(Neisseria Meningitides)을 포함하여 임질; F. 메닝고셉티쿰(meningosepticum) 및 F. 오도라턴(odoraturn)을 포함하여 플라보박테리아; 부루셀라; 백일해 및 보데텔라 브론키셉티카를 포함하여 보데텔라; 대장균, 폐렴간균; 영균(Serratia marcescens) 및 S. 리큐페션(liquefaciens)을 포함하여 엔테로박테르(enterobacter), 세라티아; 에드워드시엘라(Edwardsiella); 프로테우스 미라빌리스(proteus mirabilis) 및 프로테우스 불가리스; 스트렙토바실러스; 리케치아 픽케스피를 포함하여 리케치아, 앵무새병 클라미디아 및 클라미디아 트라코마티스를 포함하여 클라미디아; 결핵균, 미코박테륨 인트라셀룰라, 미코박테륨 폴루이던, 나균, 미코박테륨아비움균, 우형 결핵균, 아프리카 결핵균, 미코박테륨 칸사시, 미코박테륨 인트라셀룰라 및 미코박테륨 레프라누리움(mycobacterium lepraenurium)을 포함하여 미코박테륨; 및 노카르디아속(Nocardia).
- [0202] 본 발명에 따라 치료될 수 있는 원생동물 감염은 제한적이지는 않지만 리슈마니아(Leishmania), 콕지디아(kokzidioa) 및 트리파노조마(Trypanosoma)에 유발되는 감염을 포함한다. 전염성 질병에 대한 완전한 목록은 질병 관리 센터(CDC)에서 감염성 질병에 대한 국가 센터(NCID)의 웹사이트에서 찾을 수 있고 (<http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/>), 여기서 참조를 위해 통합된다. 상기 질병들 모두는 본 발명의 교차

반응하는 비활성화 KIR 항체를 사용하는 치료의 후보가 된다.

[0203] 여러 가지 전염성 질병을 치료하는 이러한 방법은 본 발명의 항체 조성물을 단독으로 또는 항바이러스제, 항진균제, 항균제, 항생제, 항기생충제 및 항원생생물체를 포함하여 이러한 질병의 치료를 위한 알려진 다른 치료 방법 및/또는 치료제와 함께 사용할 수 있다. 본 발명의 방법이 부가적인 치료제를 포함하는 부가적인 치료와 관련될 때, 이러한 치료제는 본 발명의 항체와 함께 단일 복용 형태 또는 분리된 복합 투여 형태로 투여될 수 있다. 분리된 복용 형태로 투여될 때, 부가적인 치료제는 본 발명 항체의 투여 전, 동시, 그 후에 투여될 수 있다.

[0204] 본 발명의 다른 측면 및 장점들은 이하의 실험예에서 기술될 것이며, 이하의 실험예는 단지 예시를 위한 것이지만 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0205] 실험예 1

[0206] PBLs의 정제 및 다클론 또는 클론 NK 세포계의 제조

[0207] PBLs를 Ficoll Hypaque 기울기 및 가소성의 점착성 세포의 결실에 의해 건강한 공여체로부터 획득하였다. 풍부한 NK 세포를 얻기 위하여, PBLs를 항 CD3, 항 CD4 및 항 HLA-DR mAbs와 함께 배양하였고(4°C에서 30분), 이어서 관련 분야의 알려진 방법에 따라 염소 항 마우스 자석 비드와 함께 배양하였고(Dyna1)(4°C에서 30분) 면역 자기 선택(Pende 외, 1999)을 실행하였다. CD3⁺, CD4⁺, DR⁺ 세포들을 다클론 NK 세포 집단을 얻기 위하여 방사선을 조사한 공급 세포 및 인터루신 2 100 U/ml(프로루킨, Chiron Corporation) 및 피토헤마글루티닌 (Phytohemagglutinin) A(Gibco BRL) 1.5 ng/ml와 함께 배양하였다. NK 세포들은 희석을 제한함으로써 클론화되었고 NK 세포의 클론은 세포 표면 수용체의 발현을 위한 흐름 혈구 계산에 의해 특징지어진다.

[0208] 사용된 mAbs는 JT3A(IgG2a, 항 CD3), EB6 및 GL183(각각 IgG1 항 KIR2DL1 및 KIR2DL3), XA-141(IgM(EB6처럼 같은 특이성을 가진 항 KIR2DL1), 항CD4(HP2.6), 및 항 DR(D1.12, IgG2a)였다. 출원인에 의해 제조된 JT3A, HP2.6 및 DR1.12 대신에, 같은 특이성의 상업적으로 이용할 수 있는 mAbs가 사용될 수 있다(Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). EB6 및 GL183은 상업적으로 이용할 수 있다(Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). XA-141은 상업적으로 이용할 수 없고, EB6는 기술된 것처럼(Moretta 외., 1993) 용해의 대조 재구성을 위해 사용될 수 있다.

[0209] 세포들을 적절한 한 항체로 염색하였고(4°C에서 30분) 이어서 PE 또는 FITC 접합된 다클론 항 마우스 항체 (Southern Biotechnology Associates Inc)로 처리하였다. 샘플들을 FACSAN 장치(Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 사용하여 사이토플루오르메트릭(cytofluorometric) 분석법으로 분석하였다.

[0210] 다음의 클론들을 본 연구에서 사용하였다. CP11, CN5 및 CN505는 KIR2DL1 양성 클론이고 EB6(IgG1 항 KIR2DL1) 또는 XA-141(EB6에 비교할 때 같은 특이성을 가진 IgM 항 KIR2DL1)으로 염색하였다. CN12 및 CP502는 KIR2DL3 양성 클론이고 GL183 항체로 염색하였다(IgG1 항 KIR2DL3).

[0211] NK 클론의 세포 용해 활성은 이펙터 NK 세포가 NK 세포 용해에 그 민감성이 알려진 Cw3 또는 Cw4 양성 세포계에 시험되는 표준 4시간 ⁵¹Cr 방출 분석에 의해 평가되었다. 모든 표적 세포는 미세적정 판에서 한 웰(well)당 5000 세포로 사용되었고 이펙터:표적 세포 비율은 도면에서 지시된다(대개 한 표적 세포당 4 이펙터). 세포 용해 분석은 1/2로 희석한 지시된 단클론 항체의 상등액이 있는 경우 또는 없는 경우 실행하였다. 그 과정은 이미 기술된 것(Moretta 외., 1993)과 본질적으로 같다.

[0212] 실험예 2

[0213] 새로운 mAbs의 제조

[0214] 5주 동안 늙은 Bald C 마우스를 (Moretta 외., 1990)에 기술된 것처럼 활성화된 다클론 또는 단클론 NK 세포계로 면역화시킴으로써 mAbs가 제조되었다. 다른 세포 융합 후에, 우선 상기 mAbs는 EB6 및 GL183 양성 NK 세포계 및 클론과 교차 반응하는 능력으로 선택되었다. 양성 단클론 항체는 또한 각각 Cw4 또는 Cw3 양성 표적 세포의 EB6 또는 GL183 양성 NK 클론에 의해 용해를 재구성하는 그 능력으로 구별되었다.

[0215] 세포 염색은 다음처럼 실행되었다. 세포들을 PE-접합된 염소 F(ab')₂ 단편 항-마우스 IgG(H+L) 또는 PE-접합된

염소 F(ab')₂ 단편 항-사람 IgG(Fc 감마) 항체(Beckman Coulter)에 따른 항체들의 패널(1 µg/ml 또는 50µl 상 등액, 4°C에서 30분)로 염색하였다. 사이토플루오르메트릭(cytofluorometric) 분석은 Epics XL.MCL 장치(Beckman Coulter)로 실행하였다.

[0216] 단클론 항체들 중 하나인 DF200 mAb는 KIR2DL1, KIR2DL2/3을 포함하여 KIR 집단의 여러 구성원과 반응하는 것이 발견되었다. KIR2DL1+ 및 KIR2DL2/3+ NK 세포 둘 다는 DF200 mAb로 밝게 염색되었다(도 1)

[0217] 이러한 HLA class I-특정의 비활성화 수용체의 하나 또는 다른 것(또는 둘 다)을 발현시키는 NK 클론은 하나 이상의 HLA-C 대립 유전자를 발현시키는 표적 세포에 대하여 이펙터 세포로서 사용되었다. 세포독성 분석은 아래 처럼 실행되었다. YTS-KIR2DL1 또는 YTS-Eco 세포계의 세포 용해 활성은 표준 4시간 ⁵¹Cr 방출 분석에 의해 평가되었다. 이펙터 세포는 HLA-Cw4 양성 또는 음성 EBV 세포계 및 721.221 세포들이 이식된 HLA-Cw4 상에서 테스트 되었다. 모든 표적 세포들은 미세적정 판에서 웰(well)당 3000 세포로 사용되었다. 이펙터/표적 세포 비율은 도면에서 지시된다. 세포 용해 분석은 단클론 마우스 또는 사람 항체의 전체 길이 또는 F(ab')₂ 단편이 있는 경우 또는 없는 경우 실행되었다. 예상했던 것처럼, KIR2DL1⁺NK 클론은 HLA-Cw4를 발현시키는 표적 세포에 대하여 어떤 세포 용해 활성을 나타내지 않았고 KIR2DL3⁺NK 클론도 Cw3 양성 표적 세포에 대하여 거의 나타내지 않았다. 그러나, DF200mAb(그 KIR2DL 수용체를 막기 위해 사용됨) 존재시에, NK 클론은 그 HLA-C 리간드를 인식할 수 없었고 Cw3 또는 Cw4 표적 세포에 대한 강한 세포 용해 활성을 나타내었다.

[0218] 예를 들어, C1R 세포계(Cw4⁺EBV 세포계, ATCC n° CRL 1993)는 KIR2DL1⁺NK 클론(CN5/CN505)에 의해 사멸되지 않았지만, 비활성화는 DF200 또는 종래 항KIR2DL1 mAb의 사용으로 효과적으로 역전될 수 있다. 다른 한편 KIR2DL2/3⁺ KIR2DL1⁻ 표현형(CN12)을 발현시키는 NK 클론은 C1R 세포를 효과적으로 살상하였고 이러한 살상은 DF200mAb에 의해 영향을 받지 않았다(도 2). 유사한 결과는 Cw3 양성 표적 세포에 대한 KIR2DL2- 또는 KIR2DL3-양성 NK 클론으로 획득되었다.

[0219] 유사하게, Cw4+221 EBV 세포계는 KIR2DL1⁺ 이식된 NK 세포에 의해 살상되지 않았지만, 비활성화는 DF200, DF200 Fab 단편, 종래 항 KIR2DL1 mAb EB6 또는 XA141의 사용으로 효율적으로 역전될 수 있었다. 또한, Cw3+221 EBV 세포계는 KIR2DL2⁺NK 세포에 의해 살상되지 않았지만, 그 비활성화는 DF200 또는 DF200 Fab 단편의 사용으로 역전될 수 있었다. 마지막으로, Cw3+221 EBV 세포계는 KIR2DL3⁺NK 세포에 의해 살상되지 않았지만, 그 비활성화는 DF200 Fab 단편 또는 종래 항 KIR2DL3 mAb GL183 또는 Y249의 사용에 의해 역전될 수 있었다. 그 결과는 도 3에 도시된다.

[0220] F(ab')₂ 단편 역시 Cw4 표적 세포의 용해를 재구성하는 능력이 평가되었다. DF200 및 EB6 Abs의 F(ab')₂ 단편은 221 세포계가 이식된 Cw4의 KIR2DL1이 이식된 NK 세포 및 Cw4+ TUBO EBV 세포계에 의한 용해의 비활성화 둘 다를 역전시킬 수 있었다. 결과는 도 4에 도시된다.

[0221] 실시에 4

[0222] 새로운 사람 mAbs의 제조

[0223] 사람 단클론 항-KIR Abs는 재조합 KIR 단백질을 가진 사람 항체 레퍼토리를 발현시키도록 유전적으로 변형된 유전자 이식 생쥐를 면역시킴으로써 발생되었다. 다른 세포 융합 후에, 상기 mAbs는 우선 부동화된 KIR2DL1 및 KIR2DL2 단백질과 교차 반응하는 그 능력으로 선택되었다. 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 및 1-6F1을 포함하여 여러 단클론 항체들은 KIR2DL1 및 KIR2DL2/3과 반응하는 것으로 밝혀졌다.

[0224] 양성 단클론 항체들은 또한 Cw4-양성 표적 세포의 KIR2DL1을 발현시키는 EB6 양성 NK 트랜스펙턴트에 의한 용해를 재구성하는 능력으로 구별되었다. HLA class I-특정의 비활성화 수용체를 발현시키는 NK 세포는 하나 이상의 HLA-C 대립 유전자를 발현시키는 표적 세포에 대하여 이펙터 세포로서 사용되었다.(도 5 및 도 6) 세포 독성 분석은 상기한 것처럼 실행되었다. 이펙터/표적 세포 비율은 도면에 지시되었고, 항체들은 10 µg/ml 또는 30 µg/ml로 사용되었다.

[0225] 예상했던 것처럼, KIR2DL1⁺NK 세포는 HLA-Cw4를 발현시키는 표적 세포에 대하여 어떤 세포 용해 활성도 거의 나

타내지 않았다. 그러나, 1-7F9 mAb 존재시에, NK 세포는 그 HLA-C 리간드를 인식할 수 없었고 Cw4 표적 세포에 대하여 강한 세포용해 활성을 나타내었다. 예를 들어, 시험된 두 개의 세포계(721.221이 이식된 HLA-Cw4 및 CW4⁺ EBV 세포계)는 KIR2DL1⁺NK 세포에 의해 살상되지 않았지만, 상기 비활성화는 Mab 1-7F9 또는 종래의 항 KIR2DL1 mAb EB6의 사용으로 효율적으로 역전될 수 있었다. Abs DF200 및 panKIR(NKVSF1으로 언급됨)은 1-7F9와 비교되었다. 다른 한편 항체들 1-4F1, 1-6F5 및 1-6F1은 Cw4 양성 표적 세포에 대한 NK 세포에 의한 세포 용해를 재구성할 수 없었다.

[0226]

실시예 5

[0227]

DF200 mAb/KIR2DL1 및 DF200 mAb/KIR2DL2/3 상호 작용의 비아코어(Biacore) 분석

[0228]

재조합 단백질의 생산 및 정제

[0229]

KIR2DL1 및 KIR2DL3 재조합 단백질은 대장균에서 제조되었다. KIR2DL1 및 KIR2DL3의 전체 세포 외 도메인을 암호화하는 cDNA는 다음의 프라이머(primer)를 사용하여 pCDM8 클론 47.11 벡터(Biassoni 외, 1993) 및 RSVS(gpt)183 클론 6 벡터(Wagtmann 외, 1995) 각각으로부터 PCR에 의해 증폭되었다:

[0230]

센스(sense): 5'-GGAATCCAGGAGGAATTTAAAATGCATGAGGGAGTCCACAG-3'

[0231]

안티센스(anti-sense): 5'-CGGGATCCCAGGTGCTGGGGTTACC-3'

[0232]

상기 재조합 단백질들은 비오틴일레이션(biotinylation) 신호를 암호화하는 서열을 구비한 구조(Saulquin 외, 2003)에서 pML1 발현 벡터로 클론화되었다.

[0233]

단백질 발현은 BL21(DE3) 박테리아성 스트레인(Invitrogen)에서 실행되었다. 이식된 박테리아는 앰피실린(100 µg/ml)이 공급된 배지에서 37°C에서 OD₆₀₀=0.6으로 배양되었고 발현은 1 mM IPTG로 유도되었다.

[0234]

단백질을 변성 조건하(8 M 요소)에서 세포 함유물로부터 회수하였다. 재조합 단백질의 리폴딩(refolding)은 여섯 단계 투석(각각 4, 3, 2, 1, 0.5 및 0 M 요소)에서 요소의 농도를 감소시킴으로써, 실온에서 L-아르기닌(400 mM, Sigma) 및 β-메르캅토에탄올(1 mM)을 포함하고 20 mM Tris, pH 7.8, NaCl 150 mM 완충 용액에서 실행되었다. 환원 및 산화된 글루타티온(각각 5 mM 및 0.5 mM, Sigma)은 0.5 및 0 M 요소 투석 단계 동안에 첨가되었다. 마지막으로, 상기 단백질을 폭넓게 10 mM Tris, pH 7.5, NaCl 150 mM 완충 용액에서 투석하였다. 수용성이고 리폴드된(refolded) 단백질을 농축하였고 그런 다음 Superdex 200 크기 배제 컬럼(Pharmacia;AKTA 시스템)에서 정제하였다.

[0235]

표면 플라스몬 공명 측정은 비아코어(Biacore) 장치(Biacore)에서 실행하였다. 모든 비아코어(Biacore) 실험에서 HSB 완충 용액은 흐르는 완충 용액으로 역할을 하는 계면 활성제 P20 0.05%가 공급되었다.

[0236]

단백질의 부동화.

[0237]

상기한 것처럼 제조된 재조합 KIR2DL1 및 KIR2DL3 단백질은 Sensor Chip CM5(Biacore) 상의 텍스트란 층의 카르복실기에 공유적으로 부동화되었다. 센서 칩 표면은 EDC/NHS(N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 하이드로클로라이드 및 N-하이드록시숙신이미드, 비아코어)로 활성화 되었다. 완충 용액(10 mM 아세트산, pH 4.5)와 혼합된 단백질은 주입되었다. 남아있는 활성화된 그룹의 불활성화는 pH8인 100 mM 에탄올아민을 사용하여 실행되었다(Biacore).

[0238]

친화력 측정.

[0239]

동역학적 측정을 위해, 여러 농도의 수용성 항체(1×10^{-7} 에서 4×10^{-10} M)을 부동화된 샘플에 적용하였다. 측정은 20 µl/분의 연속 흐름 속도에서 이루어졌다. 각 주기마다, 센서 칩의 표면을 10 mM NaOH pH11을 5 µl 주입하여 재생시켰다. 자료 분석을 위하여 BIAlogue Kinetics Evaluation 프로그램(BIAevaluation 3.1, Biacore)을 사용하였다. 수용성 분석물(여러 농도에서 40µl)은 각각 KIR2DL1 및 KIR2DL3의 1000 또는 700 반사율 단위(RU) 및 500 또는 540 RU를 포함하는 텍스트란 층에서 HBS 완충 용액에 20 µl/분의 흐름 속도로 주입되었다. 실험 결

과는 6번의 독립적인 실험을 대표한다. 그 결과는 이하의 표 1에 존재한다.

표 1

[0240] 부동화된 KIR2DL1 및 KIR2DL3에 DF200 mAb 결합의 BIAcore 분석.

단백질	$K_D(10^{-9} \text{ M})$
KIR2DL1	10.9+/-3.8
KIR2DL3	2.0+/-1.9

[0241] K_D : 해리상수

[0242] 실시예 6

[0243] 쥐 및 사람 항-KIR 항체의 Biacore 경쟁적인 결합 분석

[0244] 에피토프 맵핑 분석은 상기한 것처럼 마우스 항-KIR 2D 항체 DF200, Pan2D, g1183 및 EB6과 사람 항-KIR2D 항체 1-4F1, 1-6F1, 1-6F5 및 1-7F9로 부동화된 KIR2DL1(900 RU), KIR2DL3(2000 RU) 및 KIR2DS1(1000 RU)에서 실행되었다(Gauthier 외, 1999, Saunal 및 van Regenmortel 1995).

[0245] 모든 실험은 15 $\mu\text{g/ml}$ 로 서로 다른 항체들을 2분 주입하고 HBS 완충 용액을 15 $\mu\text{l/분}$ 흐름 속도로 흘리면서 실행하였다. 항체들의 각쌍에서 경쟁적인 결합 분석은 두 단계로 실행되었다. 첫 번째 단계에서 제1 단클론 항체 (mAb)를 KIR2D 목표 단백질에 주입하였고 이어서 (제1 mAb를 제거하지 않고)제2 mAb를 주입하였으며 제2 mAb RU 값(RU2)을 기록하였다. 제2 단계에서 우선 제2 mAb를 직접적으로 누드(nude) KIR2D 주입하였고, mAb RU값(RU1)을 기록하였다. 제1 mAb에 의한 제2 mAb의 KIR2D에 대한 결합의 비활성화 백분율은 다음에 의해 계산되었다: $100 \times (1 - \text{RU2}/\text{RU1})$.

[0246] 결과는 표 2, 3 및 4에 도시되어 있고, '제1 항체'라고 지시된 항체들은 수직 컬럼에 기록되어 있고 '제2 항체'라고 지시된 항체들은 수평 컬럼에 기록되어 있다. 테스트된 각 항체 조합에서, 칩에 대한 항체의 직접 결합 정도의 값(RU)은 표로 기록되었으며, KIR2D 칩에 대한 제2 항체의 직접 결합은 필드의 상단부에 기록되어 있고 제1 항체가 존재할 때 KIR2D 칩에 대한 제2 항체의 직접 결합은 필드의 하단부에 기록되어 있다. 각 필드의 오른쪽에 기록된 것은 제2 항체 결합의 비활성화 백분율이다. 표 2는 KIR2DL1 칩에 대한 결합을 보여주고, 표 3은 KIR2DL3 칩에 대한 항체의 결합을 보여주며, 표 4는 KIR2DS1 칩에 대한 항체의 결합을 보여준다. 부동화된 KIR2DL1, KIR2DL2/3 및 KIR2DS1에 대한 쥐 항체 DF200, NKVSF1 및 EB6와 사람 항체 1-4F1, 1-7F9 및 1-6F1의 경쟁적인 결합은 평가되었다. KIR2DL1에 대한 항-KIR 항체들의 결합에 관한 실험으로부터 에피토프 맵핑(도 7)은 (a) 항체 1-7F9가 EB6 및 1-4F1와 경쟁하지만, NKVSF1 및 DF200과 경쟁하지 않고; (b) 항체 1-4F1이 EB6, DF200, NKVSF1 및 1-7F9와 경쟁하며; (c) NKVSF1이 DF200, 1-4F1 및 EB6과 경쟁하지만, 1-7F9와 경쟁하지 않고; 그리고 (d) DF200이 NKVSF1, 1-4F1 및 EB6와 경쟁하지만, 1-7F9와 경쟁하지 않음을 보여준다. KIR2DL3에 대한 항-KIR 항체들의 결합에 관한 실험으로부터 에피토프 맵핑(도 8)은 (a) 1-4F1이 NKVSF1, DF200, g1183 및 1-7F9와 경쟁하고; (b) 1-7F9가 DF200, g1183 및 1-4F1과 경쟁하지만, NKVSF1과 경쟁하지 않으며; (c) NKVSF1이 DF200, 1-4F1 및 GL183과 경쟁하지만, 1-7F9와 경쟁하지 않고; (d) DF200가 NKVSF1, 1-4F1 및 1-7F9와 경쟁하지만, GL183과 경쟁하지 않음을 보여준다. KIR2DS1에 대한 항-KIR 항체들의 결합에 관한 실험으로부터 에피토프 맵핑(도 9)은 (a) 1-4F1이 NKVSF1, DF200 및 1-7F9와 경쟁하고; (b) 1-7F9가 1-4F1과 경쟁하지만, DF200 및 NKVSF1과 경쟁하지 않으며; (c) NKVSF1이 DF200 및 1-4F1과 경쟁하지만, 1-7F9와 경쟁하지 않고; (d) DF200가 NKVSF1 및 1-4F1과 경쟁하지만, 1-7F9와 경쟁하지 않음을 보여준다.

[0247] 실시예 7

[0248] 사이노몰거스 NK 세포로 항-KIR mAb 적정

[0249] 항-KIR 항체 NKVSF1은 사이노몰거스 원숭이의 NK 세포에 결합하는 능력이 평가되었다. 원숭이 NK 세포에 대한 항체의 결합은 도 10에 도시된다.

[0250] 원숭이 PBMC의 정제 및 다클론 NK 세포 벌크(bulk)의 제조

[0251] 사이노몰거스 짧은 꼬리 원숭이(Macaque) PBMC는 시트르산 나트륨 CPT 튜브(Becton Dickinson)에서 제조되었다. NK 세포 정제는 음성 체액 감소(Macaque NK 세포가 풍부한 키트, Stem Cell Technology)에 의해 실행되었다. NK 세포들은 다클론 NK 세포 집단을 얻기 위하여 방사선을 조사한 사람 공급 세포, 인터루신 2 300 U/ml(프로루킨, Chiron Corporation) 및 피토헤마글루티닌(Phytohemagglutinin) A(Invitrogen, Gibco) 1 ng/ml와 함께 배양하였다.

[0252] 사이노몰거스 NK 세포로 Pan2D mAb 적정

[0253] 사이노몰거스 NK 세포(NK 벌크일 16)를 다른 분량의 Pan2D mAb와 이어서 PE-접합된 염소 F(ab')² 단편 항-마우스 IgG(H+L) 항체와 함께 배양하였다. 양성 세포의 백분율은 아이소타이프 대조구(정제된 마우스 IgG1)로 정해졌다. 샘플들을 두 번씩 실험하였다. 평균 형광 강도=MFI.

표 2

[0254] KIR2DL1 에피토프 맵핑

제1 Ab (아래)	<-제2 Ab->						
	DF200	Pan2D	EB6	1-4F1	1-7F9	1-6F1	1-6F5
DF200		80%	90%	490 92% 40	480 27% 350	540 15% 460	400 15% 340
Pan2D	90%		90%	900 95% 50	860 2% 840	750 12% 660	600 13% 520
EB6	60%	40%	460 57% 200	370 48% 190	490 65% 170	260 23% 200	nd
1-4F1							
1-7F9	600 10% 545	545 2% 534	460 60% 180	360 95% 16		330 9% 300	nd
1-6F1	350 11% 310	475 7% 440	260 18% 320	360 23% 275	490 10% 440		nd
1-6F5	350 17% 290	475 7% 440	nd	360 17% 300	nd	290 40% 170	

표 3

[0255] KIR2DL3 에피토프 맵핑

제1 Ab (아래)	<-제2 Ab->						
	DF200	Pan2D	g1183	1-4F1	1-7F9	1-6F1	1-6F5
DF200		75%	20%	1270 75% 320	520 62% 200	550 16% 460	440 4% 420
Pan2D	95%		85%	2250 68% 730	880 15% 750	840 8% 770	560 18% 460
g1183	8%	40%		1300 75% 330	670 76% 160	530 18% 430	nd
1-4F1	1140 82% 210	2400 63% 890	1240 73% 330		1050 87% 140		
1-7F9	770 42% 450	870 5% 830	800 75% 200	1000 63% 270			
1-6F1	790 4% 760	990 0% 1090	620 8% 570				

1-6F5	800 5% 760	990 4% 950	nd				
-------	---------------	---------------	----	--	--	--	--

표 4

[0256] KIR2DS1 에피토프 맵핑

제1 Ab (아래)	<-제2 Ab->			
	DF200	Pan2D	1-4F1	1-7F9
DF200		70%	660 87% 80	975 15% 825
Pan2D	100%		650 100% -8	920 45%* 500
1-7F9	900 17% 1090	1350 11% 1200	660 96% 23	

[0257]

실시예 8

[0258]

KIR2DL1에 대한 DF200- 및 pan2D 결합의 에피토프-맵핑

[0259]

공개된 결정 구조에 기초한 KIR2DL1, -2 및 -3(KIR2DL1-3)의 세포 외 도메인의 컴퓨터 모델링(Maenaka 외. (1999), Fan 외. (2001), Boyington 외. (2000))은 KIR2DL1과 KIR2DL1-3 교차 반응하는 마우스 단클론 항체 (mAb's) DF200 및 pan2D 사이의 상호 작용에서 아미노산 R131(단일 문자(single-letter) 아미노산 코드)의 관여를 예상하였다. 이를 증명하기 위하여, 사람 Fc(hFc)와 혼합된 와일드 형태 또는 돌연변이된(예를 들어, R131W: KIR2DL1에서 N-말단으로부터 131 아미노산 위치에서 W를 위해 R의 치환) KIR2DL1(아미노산 H1-H224)의 완전한 세포 외 도메인으로 구성된 혼합 단백질을 제조하였다. 여러 가지 KIR2DL1-hFc 혼합 단백질을 제조하고 평가하기 위해 사용되는 물질 및 방법은 이미 기술되어 있다(Winter 및 Long(2000)). 간략히 말해서, KIR2DL1(R131W)-hFc 인코딩 cDNA-벡터들은 와일드 형태의 KIR2DL1-hFc(Wagtman 외, (1995))의 제조를 위한 공개된 cDNA-벡터, CL42-Ig의 PCR에 기초한 돌연변이 생성(Quickchange II, Promega)으로 제조되었다. KIR2DL1-hFc 및 KIR2DL1(R131W)-hFc는 COS7 세포에서 제조되었고 이미 기술된 것처럼(Wagtman 외, (1995)) 조직 배양 배지로부터 분리되었다. 올바른 폴딩(folding)을 시험하기 위하여, KIR2DL1-hFc 및 KIR2DL1(R131W)-hFc는 HLA-Cw3(KIR2DL1 리간드가 아님) 또는 HLA-Cw4(KIR2DL1 리간드)를 발현시키는 LCL721.221 세포와 배양되었고, KIR-Fc 혼합 단백질과 세포들 사이의 상호작용은 세포 표면에서 단백질-상호작용의 연구를 위한 표준 기술인 FACS에 의해 분석되었다. 독립적인 실험의 예는 도 11, 패널 A에 주어진다. 문헌에서 예상된 것처럼, KIR2DL1-hFc 혼합 단백질 중 어떤 것도 LCL721.221 세포를 발현시키는 HLA-Cw3과 결합하지 않았다. 대조적으로, KIR2DL1-hFc 및 KIR2DL1(R131W)-hFc 모두는 LCL721.221 세포를 발현시키는 HLA-Cw4에 결합하였고, 그 올바른 폴딩을 확인한다.

[0260]

KIR-특정의 mAb's(DF200, pan2D, EB6 및 GL183)에 대한 KIR2DL1(R131W)-hFc 및 KIR2DL1-hFc에 대한 결합은 단백질 상호작용을 연구하는 표준 기술인 ELISA를 사용하여 연구하였다. 간략히 말해서, KIR2DL1(R131W)-hFc 및 KIR2DL1-hFc는 KIR-특정의 mAb's가 여러 농도로(PBS에서 0-1µg/ml) 첨가된 후에, 염소 항-사람 항체를 통해 96-웰(we11) 플레이트와 연결된다. KIR2DL1-hFc 변형과 mAb's 사이의 상호 작용은 TMB 기질을 전환시키기 위하여 마우스 항체에 특이적인 페록시다아제에 연결된 제2 항체를 사용하여 분광광도법(450nm)으로 시각화 되었다. 독립적인 실험의 예들은 도 11, 패널 B에 주어진다. KIR2DL2-3에 특이적인 mAb GL183은 KIR2DL1-hFc 혼합 단백질 중 어떤 것에도 결합할 수 없는 반면, KIR2DL1에 특이적인 mAb EB6, DF200 및 pan2D는 투여량에 따라 KIR2DL1-hFc 변형에 결합하였다. 단일 자리 돌연변이(R131W)는 DF200 및 pan2D 결합을 mAb 최고 농도(1 µg/ml)에서 와일드 형태와 비교하여 ~10% 감소시켰고, R131이 KIR2DL1의 세포 외 도메인 2에서 DF200 및 pan2DDML 결합 자리의 일부임을 확인시켰다.

참조 문헌

Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E., and et al. (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 172, 1589-1598.

Moretta, A., Vitale, M., Bottino, C., Orengo, A. M., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Ciccone, E., and Moretta, L. (1993). P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 178, 597-604.

Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., et al. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1505-1516.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., et al. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097-2100.

Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, Bottino C, Moretta L, Moretta A, Long EO. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity*. 1995 May;2(5):439-49.

Biassoni R, Verdiani S, Cambiaggi A, Romeo PH, Ferrini S, Moretta L. Human CD3-CD16+ natural killer cells express the hGATA-3 T cell transcription factor and an unrearranged 2.3-kb TcR delta transcript. *Eur J Immunol.* 1993 May;23(5):1083-7.
 Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j) *J Exp Med.* 2003 Apr 7;197(7):933-8.

Gauthier, L., Lemmers, B., Guelpa-Fonlupt, V., Fougereau, M., and Schiff, C. μ -SLC physico-chemical interactions of the human preB cell receptor: implications for VH repertoire selection and cell signaling at the preB cell stage. *Journal of Immunology*, 162., 41-50. (1999).

Saunal, H. and Van Regenmortel, M.H.V., Mapping of viral conformation epitopes using biosensor measurements. *Journal of Immunology*, 183: 33-41 (1995).

Boyington JC; Motyka SA; Schuck P; Brooks AG; Sun PD. *Nature*, Vol. 405 (6786) pp. 537-543 (2000)

Fan QR; Long EO; Wiley DC. *Nature immunology*, Vol. 2 (5) pp. 452-460 (2001)

Maenaka K; Juji T; Stuart DI; Jones EY. *Structure with Folding and design*, Vol. 7 (4) pp. 391-398 (1999)

Wagtmann N; Rajagopalan S; Winter CC; Peruzzi M; Long EO. *Immunity*, Vol. 3 (6) pp. 801-809 (1995)

Winter CC; Long EO. *Natural Killer Cells Protocols (edited by Campbell KS and Colonna M)*. Human Press. pp. 219-238 (2000)

[0262]

[0263] 간행물, 특허 출원 및 특허를 포함하여 본 명세서에서 인용한 모든 참조 문헌은 각 참조 문헌이 개별적으로 그리고 특정적으로 참조를 위해 통합된 것처럼 같은 분량이 참조를 위해 모두 인용되었다.

[0264] 모든 제목 및 부제목들은 단지 편의를 위해 사용하였으며 어떤 식으로든지 본 발명을 제한하지 않아야 한다.

[0265] 모든 가능한 변형예에서 상기한 구성 성분들의 어떠한 조합은 본 명세서에서 특별히 지적되거나 본 발명에 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다.

[0266] 본 발명을 설명하기 위하여 사용되는 "a" 및 "an" 및 "the" 및 이와 유사한 지시사는 만약 본 명세서에서 다른 식으로 지적되거나 또는 본 발명에 명백히 모순되지 않는다면 단수 및 복수 모두를 포함하는 것이다.

[0267] 본 명세서에서 범위값의 설명은 특별한 설명이 없으면 이 범위 내에 포함되는 각각의 독립적인 값을 개별적으로 언급하기 위한 간략화 방법으로서 역할을 하고, 각각의 독립적인 값들은 상세한 설명에서 설명된다. 만약 다른 설명이 없다면, 여기서 제공된 모든 정확한 값들은 상응하는 대략적인 값들을 대표한다(예를 들어, 특정 요소 및 특징에 관해 제공되는 모든 정확한 예시적인 값들은 또한 상응하는 대략적인 측정치, 즉 "약"으로 표현되는 측정치를 제공하는 것으로 간주된다).

[0268] 여기서 기술된 모든 방법들은 만약 특별한 지시가 없거나 본 발명의 내용에 특별히 반하지 않으면 어떤 적절한 순서로 실행될 수 있다.

[0269] 본 명세서에서 사용되는 어떤 및 모든 실시예, 또는 예시적인 언어(예를 들어, "와 같은")들은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위한 것이고 특별한 지시가 없으면 본 발명의 범위를 한정하기 위함이 아니다. 본 명세서에서 어떠한 표현도 명백히 기술되어 있지 않는 한, 어떤 성분이 본 발명의 실행을 위해 필수적임을 지시하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0270] 본 명세서에서 특허 문서의 인용하여 포함시킨 것은 단지 편의를 위한 것이고 각 특허 문서의 유효성, 특허성 및/또는 실시성(enforceability)의 어떤 관점을 반영하지는 않는다.

- [0271] 구성 성분 및 성분들에 관하여 "포함하는(comprising)", "가진(having)", "포함하는(including)" 또는 "포함하는(containing)"과 같은 용어를 사용하여 본 발명의 어떤 측면 또는 실시예에 대한 설명은 만약 다른 설명이 없거나 특히 본 발명의 내용에 대조적이지 않으면, 특정 성분 및 성분들로 "구성된(consists of)", "본질적으로 구성된(consists essentially of)" 또는 "본질적으로 포함하는(substantially comprises)" 본 발명의 유사한 관점 또는 실시예를 지지하기 위해 제공된다(예를 들어, 여기서 특정 성분을 포함하는 것으로 기술된 조성물은 만약 다른 설명 또는 본 발명에 명백히 대조되지 않는다면 그 성분들로 구성된 조성물을 설명하는 것으로 이해되어야 한다).
- [0272] 본 발명은 적용 법률이 허용하는 최대한의 범위까지 본 명세서에서 표현된 관점 또는 청구항에서 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함한다.

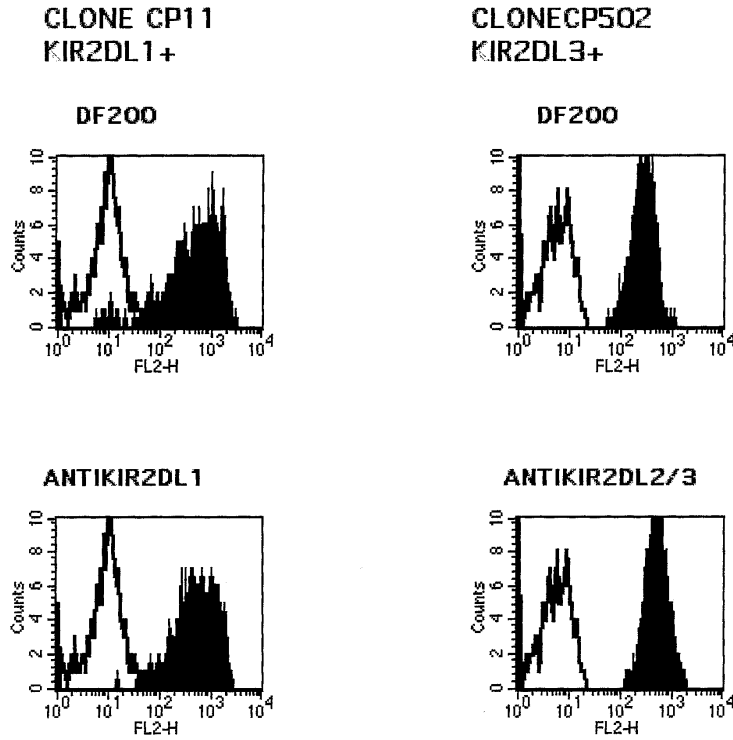
도면의 간단한 설명

- [0068] 도 1은 여러 가지 사람 KIR2DL 수용체의 공통의 결정자에 결합한 단클론 항체 DF200을 도시한 도면;
- [0069] 도 2는 Cw4 양성(positive) 표적 세포에 대하여 KIR2DL이 중개하는 KIR2DL1 양성 NK 세포 독성의 비활성화를 중화하는 단클론 항체 DF200을 도시한 도면;
- [0070] 도 3은 Cw4 양성(positive) 표적 세포에 대하여 KIR2DL이 중개하는 KIR2DL1 양성 NK 세포 독성의 비활성화 및 Cw3 양성 표적 세포에 대하여 KIR2DL이 중개하는 KIR2DL2/3 양성 NK 세포 독성의 비활성화를 중화하는 단클론 항체 DF200, DF200의 Fab 단편 및 KIR2DL1 또는 KIR2DL2/3에 특이적인 종래의 항체를 도시한 도면;
- [0071] 도 4는 DF200 및 EB6 항체의 F(ab')₂ 단편 존재시에 HLA Cw4 양성 표적 세포의 NK 클론에 의한 세포 용해의 재구성을 도시한 도면;
- [0072] 도 5 및 도 6은 Cw4 양성(positive) 표적 세포에 대하여 KIR2DL이 중개하는 KIR2DL1 양성 NK 세포 독성의 비활성화를 중화하는 단클론 항체 DF200, NKVSF1(pan2D), 사람 항체 1-7F9, 1-4F1, 1-6F5 및 1-6F1, 그리고 KIR2DL1 또는 KIR2DL2/3에 특이적인 종래의 항체를 도시한 도면(도 5에서는 Cw4 감염된 세포 및 도 6에서는 EBV 세포);
- [0073] 도 7은 KIR2DL1에 대하여 항-KIR 항체를 구비한 표면 플라즈몬 공명(BIAcore®) 분석으로 얻은 경쟁적인 결합 실험의 결과를 도시한 에피토프 지도로서, 상기 지도의 겹치는 원부분은 KIR2DL1에 대한 결합의 중복을 나타내는데, 1-7F9는 KIR2DL1에서 EB6 및 1-4F1과 경쟁하고, NKVSF1 및 DF200과는 경쟁하지 않으며, 다음으로 항체 1-4F1은 EB6, DF200, NKVSF1 및 1-7F9와 경쟁하고, 항체 NKVSF1은 KIR2DL1에서 DF200, 1-4F1 및 EB6과 경쟁하지만, 1-7F9와는 경쟁하지 않으며, DF200은 KIR2DL1에서 NKVSF1, 1-4F1 및 EB6와 경쟁하지만, 1-7F9와는 경쟁하지 않음을 도시한 도면;
- [0074] 도 8은 KIR2DL3에 대하여 항-KIR 항체를 구비한 BIAcore® 분석으로 얻은 경쟁적인 결합 실험의 결과를 도시한 에피토프 지도로서, 상기 지도의 겹치는 원부분은 KIR2DL3에 대한 결합의 중복을 나타내는데, 1-4F1은 KIR2DL3에서 NKVSF1, DF200, g1183 및 1-7F9와 경쟁하며, 1-7F9는 KIR2DL3에서 DF200, g1183 및 1-4F1와 경쟁하고, NKVSF1과는 경쟁하지 않고, NKVSF1은 KIR2DL3에서 DF200, 1-4F1 및 GL183과 경쟁하고, 1-7F9와는 경쟁하지 않으며, DF200은 KIR2DL3에서 NKVSF1, 1-4F1 및 1-7F9와 경쟁하지만, GL183과 경쟁하지 않음을 도시한 도면;
- [0075] 도 9는 KIR2DS1에 대하여 항-KIR 항체를 구비한 BIAcore® 분석으로 얻은 경쟁적인 결합 실험의 결과를 도시한 에피토프 지도로서, 상기 지도의 겹치는 원부분은 KIR2DS1에 대한 결합의 중복을 나타내는데, 항체 1-4F1은 KIR2DS1에서 NKVSF1, DF200 및 1-7F9와 경쟁하고, 항체 1-7F9는 KIR2DS1에서 1-4F1와 경쟁하지만, DF200 및 NKVSF1와 경쟁하지 않으며, NKVSF1은 KIR2DS1에서 DF200 및 1-4F1와 경쟁하고, 1-7F9와 경쟁하지 않고, DF200은 KIR2DS1에서 NKVSF1 및 1-4F1와 경쟁하고, 1-7F9와 경쟁하지 않음을 도시한 도면;
- [0076] 도 10은 사이노몰거스 NK 세포에 대한 mAb의 결합을 나타내는 NKVSF1(pan2D)mAb 적정을 도시한 도면으로서, 사이노몰거스 NK 세포(NK bulk 16일)는 다른 양의 Pan2D mAb 및 이어서 PE-접합된 염소(goat) F(ab')₂ 단편 항-마우스 IgG(H+L) 항체로 배양되었고, 양성 세포의 백분율은 아이소타이프(isotype) 제어(정제된 마우스 IgG1)로 결정되었으며, 샘플들은 두 번씩 반복 실행되었고, 평균 형광 강도 = MFI를 도시한 도면;
- [0077] 도 12는 항체 DF200 및 Pan2D mAb의 경쇄 가변 구역(light variable region) 및 경쇄 가변 구역 CDRs의 아미노산 서열의 비교적인 배열을 도시한 도면; 및

[0078] 도 13은 항체 DF200의 중연쇄 가변 구역(heavy variable region)을 도시한 도면이다.

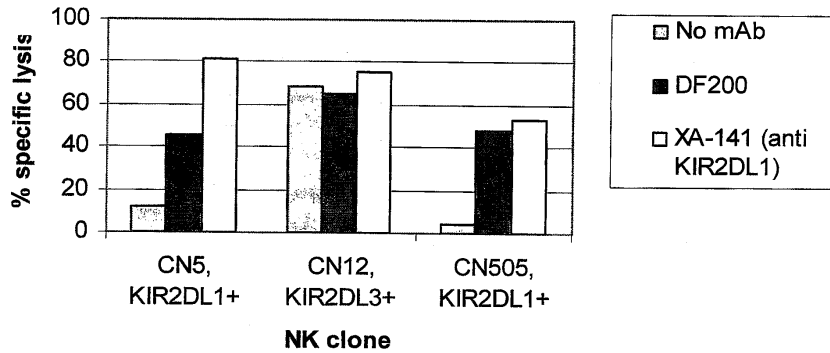
도면

도면1

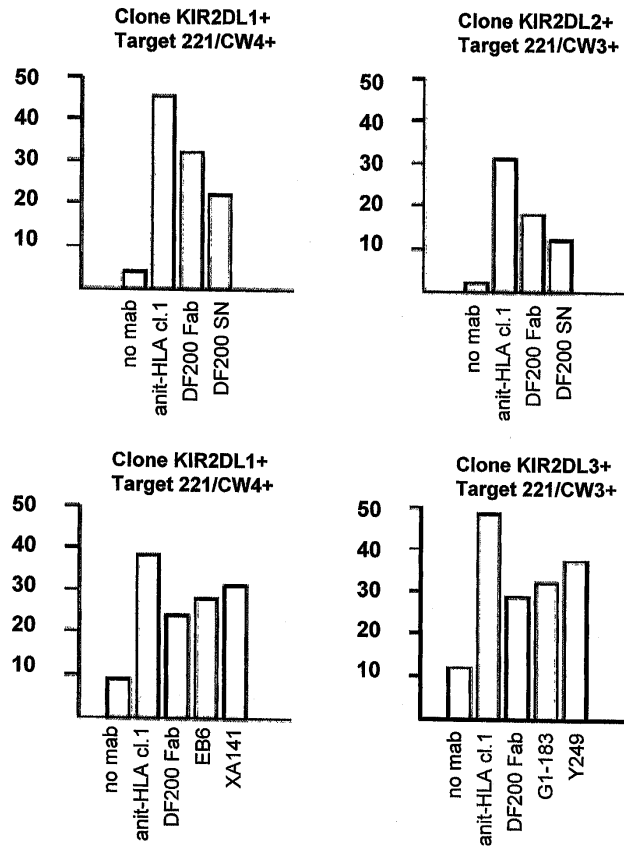


도면2

이펙터/표적세포 비율이 4/1에서
C1R Cw4 표적에 대한 항 KIR2D mAb의 용해의 재구성

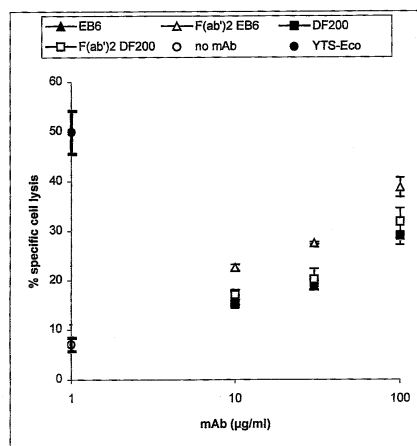


도면3



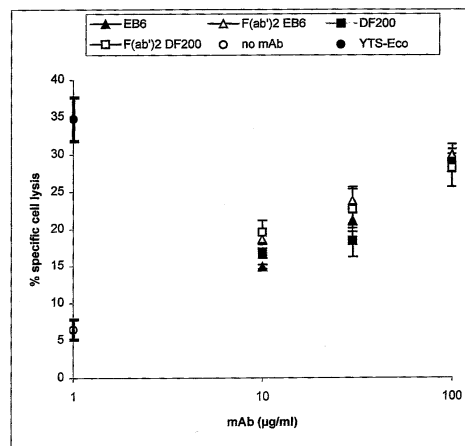
도면4

Target cell: FIG 4A : 721.221-cw4



E/T ratio= 1

FIG 4B : TUBO



E/T ratio= 2

도면5

FIG 5A : mAb: 30µg/ml

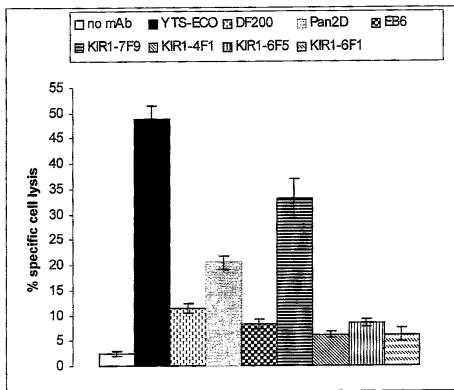
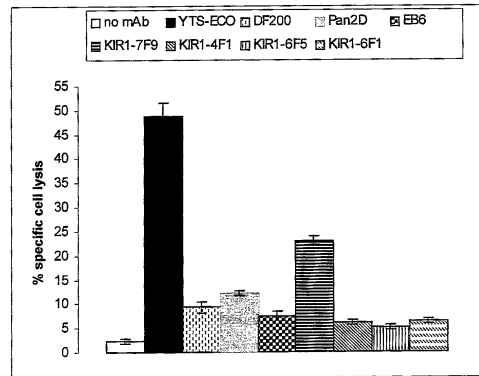


FIG 5B : mAb: 10µg/ml



E/T ratio= 1

도면6

FIG 6A: mAb: 30µg/ml

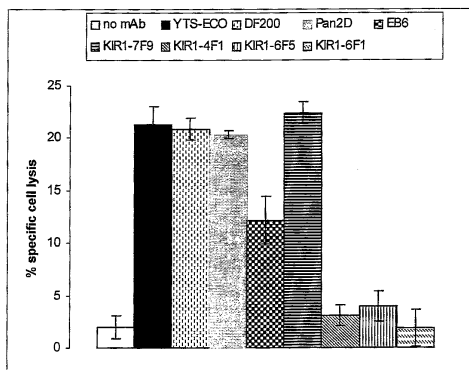
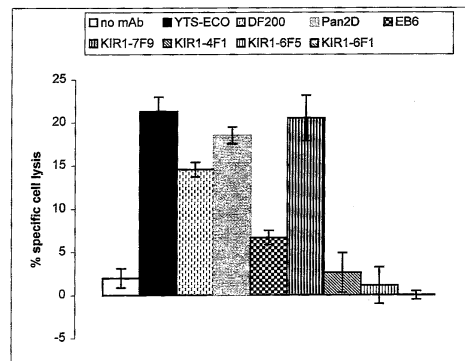
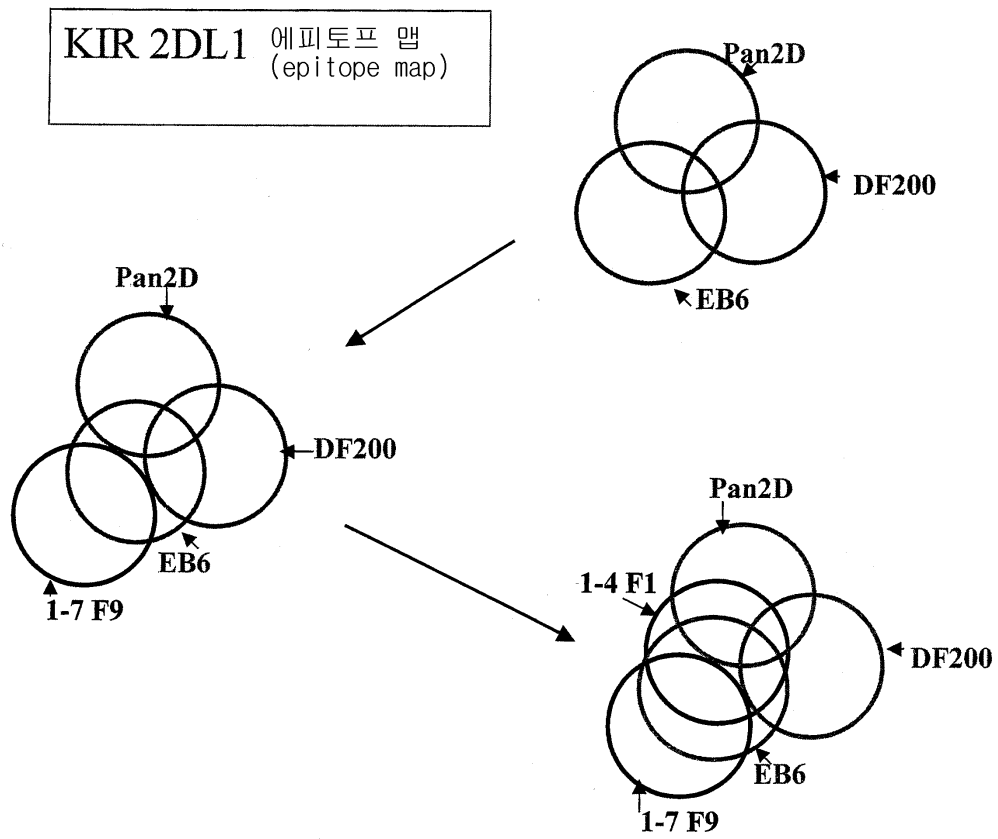


FIG 6B : mAb: 10µg/ml

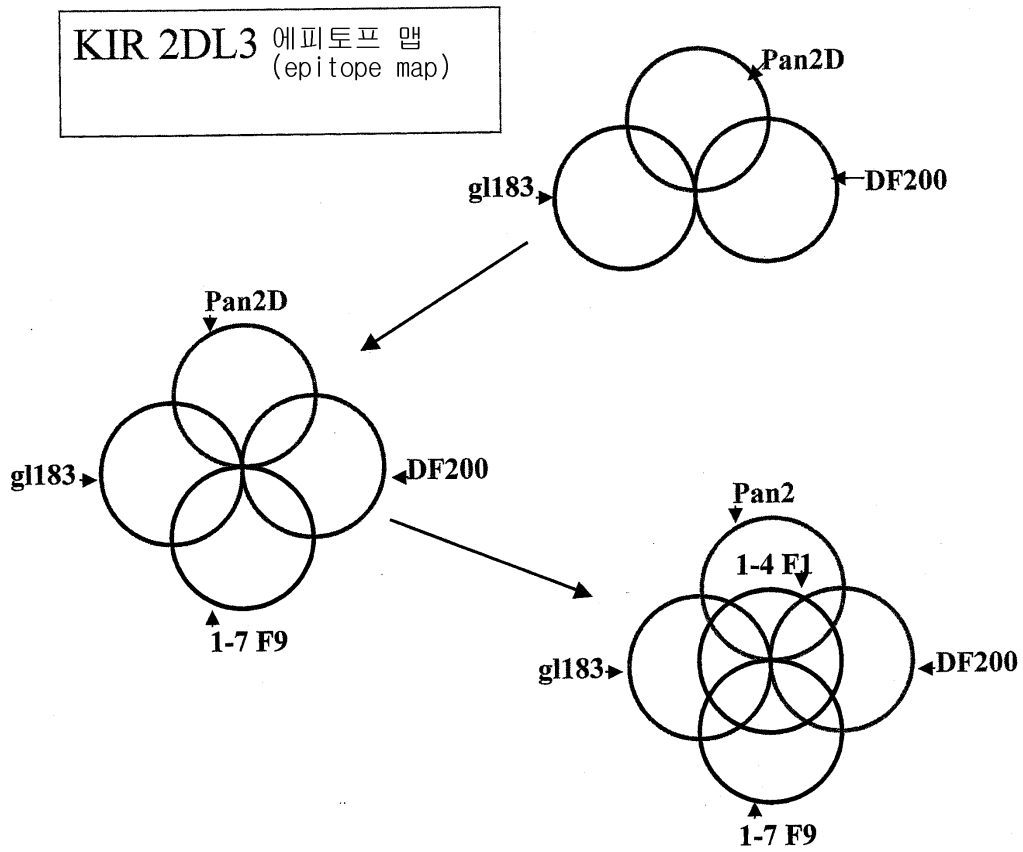


E/T ratio= 2

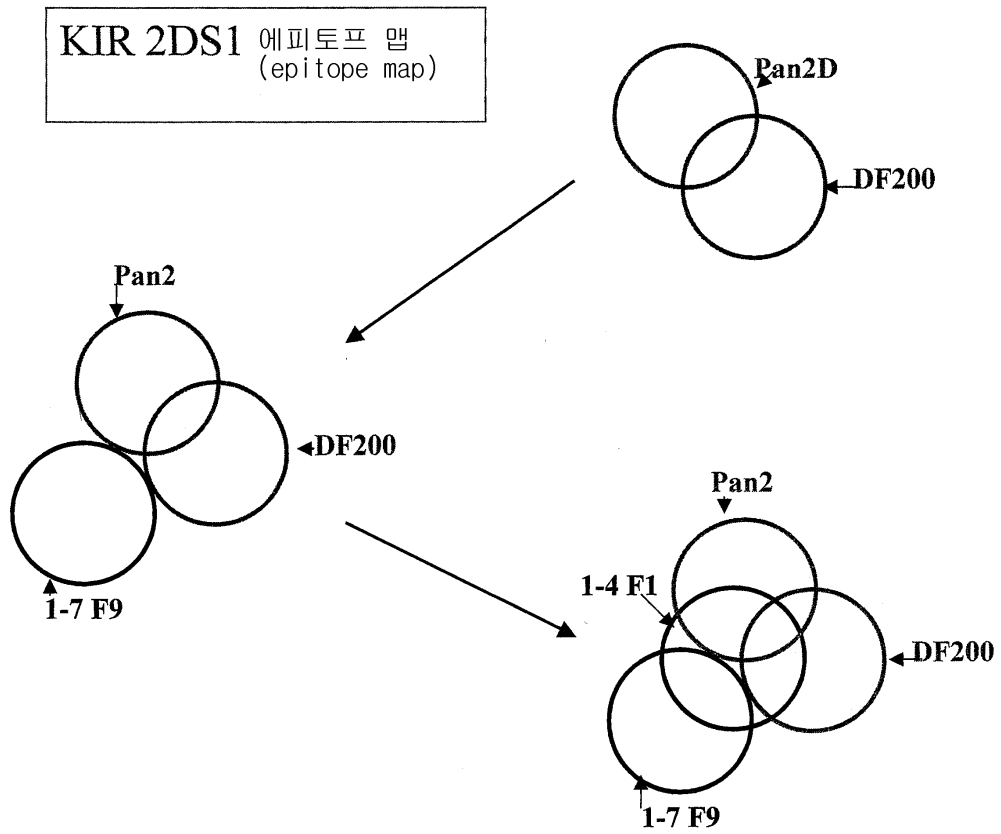
도면7



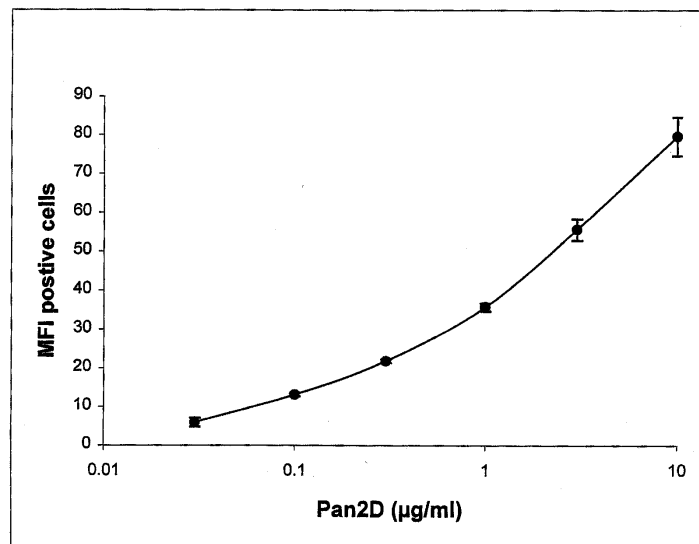
도면8



도면9



도면10



도면11

FIG 11A KIR2DL1(R131W)-hFc

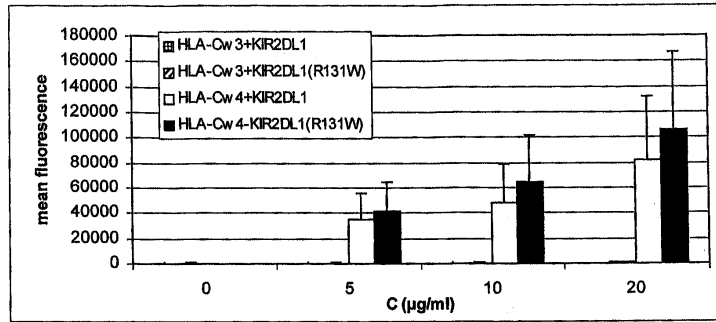
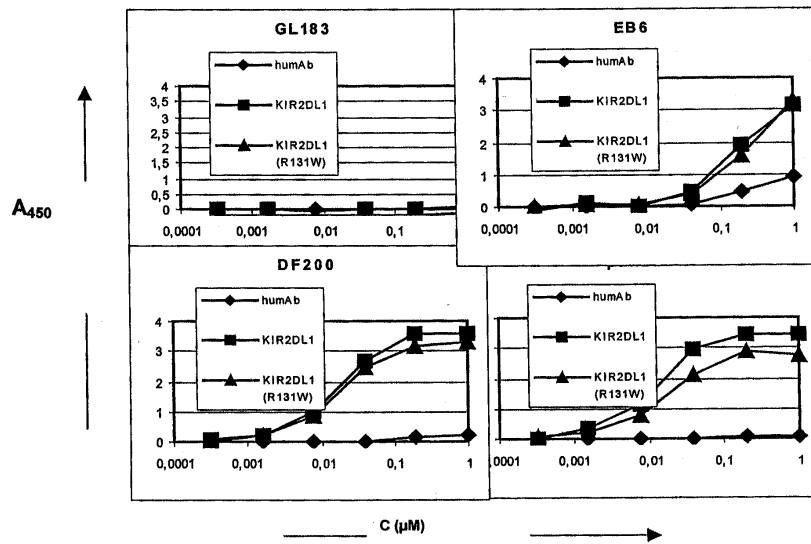


FIG 11B



도면12

FIG 12

Anti-KIR light variable regions

```

1
DF-200 light variable (1) M--ESQTLVFASILLWYGADGNIVMTQSPKMSMSVGERVTTFCASEN 50
PAN2D-Light-variable (1) MDPQVQIFSFILLISASVIMSRGQIVTQSPASMSASVGERVTTFCASSS
Consensus (1) Q FI I L A GNVLTQSP SMS SLGERVTLTC AS
51
DF-200 light variable (49) VVT-YSWYQOKPEOSPKLLIYGASNRYTGVDPRTFGSGSATDFSLTISS 100
PAN2D-Light-variable (51) VSSYLYWYQOKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISS
Consensus (51) V S YL WYQOKP SPKL IY SN SCVP RFGSGSAT FSLTISS
101
DF-200 light variable (98) MQAEDLADYHCGQGYSPYTFGGGTKLEIKR 131
PAN2D-Light-variable (101) MEAEDAAATYCHQYHRSPTTFGGGTKLEIKR
Consensus (101) M AED A YHC Q H P TFGGGTKLEIKR
    
```

Numbers above amino acid sequences indicate position respective to initiation of translation Met (+1) in the immature (non-secreted) immunoglobulin. Underlined are the CDR regions

CDR's from the anti-KIR light variable regions

<p>CDR-L1 from clones PAN-2D and DF-200 Residue before: Normally Cys. Residues after: Trp. Typically Trp-Tyr-Leu.Length: 10-17 aa Start: approximately 24 aa from the beginning of secreted protein</p> <p>DF-200 light variable (44) KASENV<u>V</u>T-<u>Y</u>YS PAN2D-Light-variable (46) TASSSVSS<u>Y</u>TY Consensus AS V S YL</p>	<p>CDR-L2 from clones PAN-2D and DF-200 Residues before: Generally Ile-Tyr Length: 7 aa Start: approximately 16 aa after the end of CDR-L1</p> <p>DF-200 light variable (70) GASNRY<u>T</u> PAN2D-Light-variable (73) STSNLA<u>S</u> Consensus SN S</p>
<p>CDR-L3 from clones PAN-2D and DF-200 Residues before: Cys Residues after: Phe-Gly-XXX-Gly Length: 7-11 aa Start: approximately 33 aa after the end of CDR-L2</p> <p>DF-200 light variable (109) GGG<u>Y</u>SVPYT PAN2D-Light-variable (112) HQY<u>H</u>RSPT Consensus Q H P T</p>	

12/13

도면13

```

>DF-200\VH\immature-PROT
MAVLGLLFCLVTFPSCVLS
QVLEQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSEFTPYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNAAAFISRLSINKDNSKSVFFKMNLSQVND
TAIYYCARNRPRGNYPYGMDYWGQGTSTVTVSS
    
```

Anti-KIR heavy variable regions (immature Fabs)

Sequences including CDR regions in heavy variable regions

<p>CDR-H1 from clone DF-200 Residues before: Cys-XXX-XXX-XXX Residues after: Trp. Generally Trp-Val or Trp-Ile Length: 10-14 aa Start: Approximately 22-26 aa from the beginning of the secreted protein</p> <p>GFSFTPYGVH</p>	<p>CDR-H2 from clone DF-200 Residues before: Leu-Glu-Trp-Ile-Gly but other variations possible Residues after: Lys or Arg / Leu or Ile or Val or Phe or Thr or Ala / Thr or Ser or Ile or Ala Length: 16-20 aa Start: Approximately 15 aa after the end of CDR-H1</p> <p>VIWSGGNTDYNAAAFIS</p>
<p>CDR-H3 from clones 4G1, 5D5 and 6C12 Residues before: Cys-XXX-XXX (Typically Cys-Ala-Arg) Residues after: Trp-Gly-XXX-Gly Length: 3-25 aa Start: Approximately 33 after the end of CDR-H2</p> <p>NPRPGNYPYGMDY</p>	

The secreted, mature VH starts at:
Position 20: residue Q

The VH region ends with residue S and thereafter the constant region (not shown) continues

서열목록

<110> INNATE PHARMA
UNIVERSITA DI GENOVA

<120> Compositions and methods for regulating NK cell activity

<130> IP2005668/FR

<140> PCT/IB2004/002464
 <141> 2004-07-01

<150> US 60/483,894
 <151> 2003-07-02

<150> US 60/545,471
 <151> 2004-02-19

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 1
 Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
 1 5 10 15
 Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
 20 25 30
 Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr

100 105 110
 Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 2
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
 100 105 110

Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys Arg
 130

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
 1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9
 Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe
 35 40 45

Thr Pro Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr Gly Val His
 1 5 10

<210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 11
 Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12
 Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr
 1 5 10