

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/12

(45) 공고일자 2000년11월 15일

(11) 등록번호 10-0271382

(24) 등록일자 2000년08월 16일

(21) 출원번호	10-1999-7007048(분할)	(65) 공개번호	특1996-0705040
(22) 출원일자	1999년07월30일	(43) 공개일자	1996년10월09일
(62) 원출원	특허 특1996-0701385		
	원출원일자 : 1996년03월 16일	심사청구일자	1996년05월08일
(30) 우선권주장	8/122,796 1993년09월 16일	미국(US)	
(73) 특허권자	인디애나 유니버시티 파운데이션 왈터 엘 쿤, 주니어		
(72) 발명자	미합중국 인디애나주 47402, 블루밍톤, 피.오.박스 500, 쇼우월터하우스 권병에스.		
(74) 대리인	미합중국, 인디애나주46223, 인디애나폴리스, 반힐드라이브63,255호, 인디애나스쿨어브메디슨, 메디칼사이언스 문창화		

심사관 : **된-김형준**

(54) 인간 수용체 에이치4-1비비

요약

인간의 수용체 H4-1BB를 분리한 후 서열을 결정하고 이를 여기에 개시하였다. 쥐의 cDNA 4-1BB의 염기서열과 65% 동일한 인간의 수용체 H4-1BB의 cDNA는 cDNA 4-1BB로부터 유래한 프로브(probe)를 사용하여 분리하였다. 인간의 수용체 단백질 H4-1BB의 세포막 리간드를 검출하기 위한 융합단백질을 개발하였다. 이것은 수용체 단백질 H4-1BB의 세포외 부분과 상기 수용체 단백질 H4-1BB의 상기 부분에 결합된 검출단백질(알칼라인 포스파타제)을 포함한다. 수용체 단백질 H4-1BB의 리간드를 발현시킨 B-세포는 수용체 단백질 H4-1BB를 발현시킨 세포들로 처리될 수 있다. 이때 B-세포 증식은 유도될 수 있다. H4-1BB 리간드 결합을 방해하기 위한 H4-1BB의 사용은 신체기관의 이식동안 면역체계를 억제하는데 실용적으로 적용될 수 있다. H4-1BB에 대한 모노클로날 항체는 수용체 단백질 H4-1BB를 발현한 T-세포를 H4-1BB 모노클로날 항체로 처리하는 방법에 의해 T-세포 증식을 향상시킬 수 있다. H4-1BB로 처리된 종양은 보조 자극신호들 뿐만 아니라 항원-특이성 신호들을 전달할 수 있고 인간의 사이토톡신 T-임파구에 의해 제거될 수 있다.

대표도

도 3

색인어

인간수용체, T-세포, B-세포, 백혈구, 적혈구, 항체, 림포킨, 뉴클레오티드.

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 쥐 수용체 단백질의 cDNA에 대한 서열과 인간의 상동체 H4-1BB를 얻기 위해 PCR 프라이머로 사용된 영역을 나타낸 코드표,

도 2의 a는 인간의 수용체 H4-1BB의 염기서열을 나타낸 코드표,

도 2의 b는 인간의 수용체 H4-1BB의 유도 아미노산 서열을 나타낸 코드표,

도 3의 ab는 T-세포 활성화와 관련된 분자의 도면,

도 4의 abc는 정상 T-세포 활성화 경로를 나타낸 도면,

도 5의 a는 T-세포 활성화 경로에서 블록 단계에 사용된 CTLA4-1g를 나타낸 도면,

도 5의 b는 T-세포 활성화 경로에서 블록 단계에 사용된 4-1BB/AP와 CTLA4-1g를 나타낸 도면,

도 5의 c는 T-세포 활성화 경로에서 블록 단계에 사용된 4-1BB/AP를 나타낸 도면이다.

다음 상세한 설명에서 참고문헌은 출원인의 공개된 보고서는 물론 이미 알려진 연구결과이다. 이러한 공개문헌은 명확하게 발명을 기술하기 위한 것으로 상세한 설명의 마지막 부분에 그 목록이 첨부되어 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

이 출원은 출원번호 08/012,269, 출원일 1993. 2. 1.인 출원인 CIP 출원이고, 후자는 출원번호 07/929,966, 출원일 1992. 7. 30.인 출원의 CIP 출원이며, 또한 후자는 07/267,577, 출원일 1988. 11. 7.인 출원의 CIP 출원이다.

여기 기술된 발명의 주제는 NIH Grants Nos. IR 23AI23058-03, RoI AI 28175와 P60 KD 20542의 발명의 주제를 포함하며, 상기한 발명에서 본 발명자는 주연구자이고, 구드리 스퀘어 의학연구소(Sayre, Pennsylvania, 8849-1669)재단과 인디애나 의과대학(인디애나폴리스, 인디애나 46202)이 특허권자이다.

본 발명은 미지의 인간 수용체 단백질인 H4-1BB에 관련된 것으로, H4-1BB는 동종의 쥐 수용체 단백질인 4-1BB를 이용한 작업에 기초하여 분리되고 확인되었으며, 4-1BB는 본 발명에서 T-세포 유전자의 특이적 형질화(expression)에 의해 분리되고 확인되었다.

인간과 기타 종의 면역계는 백혈구가 골수에서 형성되는 것을 요구하는데 백혈구에는 식세포, 림프구, B-세포가 포함된다. 골지된 바와 같이 식세포는, 면역계로부터 바이러스 단백질과 같은 원하지 않는 물질을 제거하는 거대식세포를 가지고 있다. 림프구는 헬퍼 T-세포와 킬러 T-세포와 B-세포를 다른 세포와 함께 가지고 있고, 억제 T-세포로 분류된 것들도 가지고 있다. 킬러 T-세포는 물리적으로 세포를 파괴하고, 헬퍼 T-세포는 그 전과정을 촉진시킨다. 어떤 경우든 면역과정은 림포킨(Lymphokine)에 의해 촉진된다.

림포킨은 면역세포끼리 교통하게 하는 단백질이다. 과학자들은 면역계 질환에 대한 의학적 목적으로 상당량의 림포킨을 생산한다. 알려져 있는 림포킨으로는 인터페론, 인터루킨-1,2,3,4,5,6,7 콜로니(colony) 자극인자, 림포톡신, 종양세포 과사인자, 에리트로포이에틴 및 기타 물질이 있다.

인터루킨 1은 거대식세포에서 분비되는 것으로, 헬퍼 T-세포를 자극하여 체온을 상승시키고 이로써 면역세포의 활성을 증가시킨다. 활성화된 T-세포는 인터루킨 2를 생성하고 인터루킨 2는 헬퍼 T-세포와 킬러 T-세포의 성장과 분열이 일어나도록 자극한다. 또한, 헬퍼 T-세포는 또 다른 림포킨인 B-세포 성장인자(BCGF)를 생성하는데 BCGF는 B-세포의 증식을 야기한다. B-세포의 수가 증가함에 따라 헬퍼 T-세포는 B-세포 분화인자(B cell differentiating factor, BCDF)로 알려진 또 다른 림포킨을 생성하고 BCDF는 B-세포 중 일부가 복제를 중단하고 항체를 생성할 것을 지시한다. T-세포도 또한 감마 인터페론(IF)이라는 림포킨을 생성하는데 IF는 인터루킨 2와 마찬가지로 증식시키는 효과가 있다. 인터페론은 킬러 T-세포의 활성화를 돕고 이로써 침입한 유기체를 공격하는 것이 가능하다. BCGF와 마찬가지로 인터페론은 B-세포가 항체를 생성하는 능력을 증가시킨다. 인터페론은 또한 거대식세포에 영향을 미쳐서 거대식세포가 병소에 머물도록 하며 또한, 탐식한 세포를 소화시키는 것을 돕는다. 거대식세포와 T-세포간의 면역계의 대응을 증폭시키고 바이러스 단백질이나 전염된 세포의 기타 이물질을 통제한다. 면역과정에 참여하는 림포킨은 수백가지가 있고, 많은 림포킨들이 아직 알려지지 않은 상태이다.

림포킨은 종종 세포간 펩티드 신호라 불리운다. 과학자들간에는 클론된 셀라인을 림포킨 생성체로 널리 사용하고 있으며 mRNA 림포킨의 분리는 통상의 기술로 되었다. 쥐의 수용체 단백질인 4-1BB는 본 발명에서 확인된 기술을 이용한 T-세포 유전자의 특이적 형질화에 의해 분리확인되었다(문헌: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84,2896-2900, May 1987, Immunology). 이 문헌에서 보고된 프로토콜은 과학자들이 직접 모든 종류의 림포킨을 검출하는데 사용될 수 있다. 본 방법은 직접적으로 모든 mRNA가 형질화된 것을 검출하도록 고안되었고 면역세포의 mRNA순서는 형질화 수준이 낮고 분비된 림포킨의 양이 적을 지라도, 다르게 형질화 된다. 본 발명자는 상기 문헌에서 기술된 분석법이 림포킨 같은 생물학적으로 중요한 물질을 밝혀낼 수 있다고 믿는데 그 이유는 생물학적으로 중요하거나 활성있는 물질은 대부분의 희귀 신호(scare message)에 의해 코드된다. 일례로써, 전이성장인자(transforming growth factor, TGF)는 백만개의 클론 중 1개 비율로만 존재한다.

대부분의 T-세포인자는 실험 중 생물학적 활성을 인식하거나 단백질정보를 정제함으로써 확인된다. 또 다른 접근방법은 특이적 형질화에 의한 추정적 T-세포 유전자를 분리한 후 미지 물질의 기능을 보여주는 것이다. 상기한 변형된 선별공정을 사용하여 본 발명자는 클론된 헬퍼 T 림프구(HTL)L2와 클론된 세포융해성 T 림프구(LTL)L3로부터 일련의 T-세포 서브셋-특이적 cDNA를 클로닝하였다.

일련의 T-세포 서브셋-특이적 cDNA는 변형된 선별공정을 사용하여 클론된 쥐의 T-세포로부터 분리되었다. 특정의 c-DNA종에 대한 뉴클레오타이드의 서열과 형질화 특성은 보고된 바 있다. 예전에 규명되지 않은 유전자 중 쥐의 수용체 단백질인 4-1BB를 코드하는 유전자에 대해서는 계속 연구되었다. 이러한 연구로 인해 4-1BB와 상동(homologue)인 H4-1BB의 분리가 이루어졌다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 주 목적은 서열에 의해 확인된 새로운 인간 수용체 H4-1BB를 특정하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 H4-1BB의 세포외 부분을 구성하는 융합단백질과 검출단백질을 제시하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 cDNA H4-1BB, 수용체 단백질 H4-1BB, 모노클론 항체 및 H4-1BB의 리간드를 사용하는 방법을 제시하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 요약

본 발명은 인간의 수용체 단백질 H4-1BB와 인간의 수용체 단백질 H4-1BB를 코드하는 c-DNA 유전자를 포함한다. 분리된 c-DNA의 뉴클레오타이드 순서는 추론되는 아미노산 순서에 의해 밝혀진다. pH4-1BB에서 확인된 cDNA 유전자는 농업 연구소 배양 보관소 (Agricultural Research Service Culture Collection)에 기탁되었고 기탁번호 NRRN B21131을 부여 받았다.

c-DNA와 그 유도체는 c-DNA에 의해 코드된 수용체 단백질과 유사한 단백질을 코드하는 DNA순서를 분리하는 프로브(probe)로서 사용될 수 있다. 인간의 수용체 단백질 H4-1BB의 c-DNA는 쥐의 c-DNA 4-1BB에 대해 약 65% 상동이고, c-DNA 4-1BB로부터 유도된 프로브를 사용하여 분리된다. P4-1BB로 확인된 c-DNA 유전자는 1231 파크론 드라이브, 록빌, 메릴랜드 20852에 소재한 미국 타이프 컬처 컬렉션에 기탁되었고 기탁번호는 ACTT No. 67825이다.

인간의 수용체 단백질 H4-1BB는 다음 공정에 의해 생산될 수 있다: 1) H4-1BB의 c-DNA를 적절한 운반체에 삽입, 2) 적절한 숙주에 트랜스펙션, 3) 트랜스펙션된 숙주를 적절한 배양지에서 배양, 4) 배양지로부터 수용체 단백질을 정제. 본 단백질과 그 유도체는 다음 용도로 사용될 수 있다: 1) 인간의 수용체 단백질 H4-1BB의 리간드를 분리하는 프로브, 2) H4-1BB 리간드를 표현하는 B-세포의 세포분열 자극, 3) H4-1BB 리간드의 결합 차단.

B-세포의 세포분열은 수용체 단백질 H4-1BB에 대한 리간드를 표현하는 세포와 함께 처리함으로써 유도된다. H4-1BB 리간드의 결합을 차단하는 H4-1BB는 기관 이식중 면역계를 억제하는데 실제로 적용될 수 있다. 유사한 면역계 보조자극 경로는 분석중에 있다. 참고문헌 '원치 않는 면역반응에 대해 표적화된 스트라이크 보내기', 존코헨, 사이언스, vol. 257, 8-7-92; 'CTLA-4 T-세포 활성화 물질의 수용성(soluble form)에 의한 생체내 면역억제', 린슬리 등, 사이언스 vol. 257 7-8-92.

H4-1BB에 대한 단일 클론항체는 T-세포의 세포분열 촉진에 사용될 수 있는데 이는 수용체 단백질 H4-1BB를 표현하는 T-세포를 안티 H4-1BB 단일 항체와 함께 처리함으로써 이루어진다. 어떤 종양은 잠재적으로는 면역원이지만 생체내에서 유효한 항-면역반응을 일으키지는 않는다. 종양은 T-세포에 항원특이성 신호를 전달할 수 있지만 T-세포를 완전히 활성화하는데 필요한 보조자극적 신호는 전달하지 않는다. 흑색종(mel anoma)세포에 대한 보조자극 리간드 B7의 발현은 쥐의 흑색종의 거부반응을 유도하는데서 발견되었다 (B7-트랜스펙션된 흑색종 세포에 의한 CDS + T-세포의 직접적 보조자극후의 종양 거부반응. 사라, E. 타운센드와 제임스 P. 알리슨, 사이언스 vol. 259, 1-5-93). H4-1BB에 대한 단일클론 항체는 T-세포의 세포분열을 유도하고 자극하는 것으로 알려진 것과 같은 효과를 발휘할 수 있다.

인간의 수용체 단백질 H4-1BB에 대한 세포막 리간드를 검출하는 융합단백질 (fusion protein)이 개발되었다. 융합단백질은 수용체 단백질 H4-1BB의 세포외 부분과 수용체 단백질 H4-1BB의 상기 부분에 결합된 검출단백으로 구성되어 있다. 수용체 단백질 H4-1BB의 상기 부분은 세포막 리간드와 결합하고 그 결합은 검출단백에 대한 상대적 활성실험에 의해 검출될 수 있다. 융합단백은 수용체 단백질 H4-1BB를 발현하는 것으로 추정되는 세포중에 위치시킨다. 그런 다음 당해 세포에서 세포막 리간드와 결합하지 않은 융합단백질을 씻어낸다. 씻어낸 세포를 검출단백에 대한 기질 중에 위치시키면 검출단백의 상대적 활성이 측정될 수 있다.

쥐 수용체 4-1BB의 분리 특성

도 1은 쥐 수용체 4-1BB의 염기서열과 그에 따른 아미노산서열을 도시한다. 메시지 스트랜드의 뉴클레오타이드는 5'에서 3'방향으로 번호가 붙여지고, 번호는 서열의 양쪽에 도시된다. 뉴클레오타이드 레지듀1은 개시코돈 ATG의 A이고, 레지듀 1의 5' 쪽의 뉴클레오타이드는 음수로 나타나 있다. 예정된 아미노산 서열은 염기서열 아래에 도시된다. 추정된 시그널 펩티드에는 밑줄이 그어있다. 정지코돈은 (---)로 표시된다. 시스테인 레지듀는 점으로 강조된다. 4-1BB서열의 특징은 뉴클레오타이드 1158-1163(도 1에서 박스로 표시됨)에서 AATAAA인 포텐셜 폴리아데닐레이션 신호이다. 이 유전자는 적어도 두 개의 다른 크기의 mRNA를 만들어내므로 이 신호는 기능적이다.

4-1BB의 전사는 쥐 스플레노사이트, T 세포 클론 및 하이브리도마에서 컨카나발린 A에 의해 유도될 수 있다. 4-1BB 전사의 발현은 사이클로스포린 A에 의해 억제된다. 4-1BB mRNA는 항원수용체 자극에 의해 유도될 수 있지만 클론된 T-세포(1)에서 1-2 자극에 의해 유도될 수는 없다. 4-1BB cDNA는 추정된 리더서열, 포텐셜 멤브레인 앵커 세그먼트 및 다른 특성을 갖는 수용체 단백질을 함유하는 256 아미노산의 펩티드를 코드한다. 그러므로 4-1BB의 발현 패턴은 림포킨의 발현 패턴과 유사하며, 서열은 수용체 단백질의 서열과 일치한다.

세포 표면위의 4-1BB의 주종은 55-KDa 이량체인 것으로 보여진다. 또한 4-1BB는 30-KDa 단량체로서 110-KDa 사량체로서도 존재하는 것으로 보여진다. 이러한 4-1BB량은 균일한 세포(T-세포 클론 F1)집단으로부터 면역침강되었기 때문에 모든 형태는 잠재적으로 각각의 세포위에 공존한다. 4-1BB 단량체 및 이량체로부터 펩티드 소화의 비교는 4-1BB가 세포 표면 위에서 균일이량체(homodimer)로서 존재하는지 여부를 결정하는데 필요할 것이다. 인슐린 수용체(2), B-세포 표면 면역글로블린 수용체(3), T-세포 Ag 수용체(2), B-세포 표면 면역글로블린 수용체(3), T-세포 Ag 수용체(4), CD28 공자극적인 수용체(5), 및 C027 T-세포 항원(6)과 같은 세포 표면 수용체의 변종은 디설파이드-결합된 서브단위(subunit)로 구성된다. 수용체 이량화는 리간드 결합 및 그 뒤의 생화학적 신호에 요구될 수 있다.

4-1BB는 휴면중인 T-세포 위에는 나타나지 않으나, T-세포에 완전한 성장 자극을 전달하는 촉진제(activator)로서 유도될 수 있다. PMA와 이오노마이신

(ionomycin)의 조합은 T-세포 급증식에 요구되는 그러한 신호를 모방할 수 있다. PMA 또는 이오노마이신이 단독으로 4-1BB mRNA를 유도할 수 있을지라도 PMA와 이오노마이신의 조합은 적절한 4-1BB의 발현을 초래한다. 더우기 4-1BB의 발현은 일시적인 것이 아니다. 정제된 비장의 T-세포가 고정된 항-CD3로 자극 받은 경우, 4-1BB mRNA는 표현되고 이 표현은 96시간 급증식동안 유지된다. 세포 사이클 분석은 4-1BB가

세포사이클 진행중에 발현되는 것을 확인하기 위해서 요구될 것이다.

4-1BB는 구조적으로 신경 성장 요소 수용체 슈퍼-군(super-family)의 구성요소와 관계가 있다. 이러한 수용체가 구조적으로 비슷한 리간드-결합 성질 (시스테인-풍부지역)을 가지고 있더라도 이 단백질 세포질 영역은 비보존되어, 전이막 신호에서 다양성이 허용된다. 이 군의 구성요소의 일부는 T 또는 B-세포 활성화 과정에 포함된다. OX-40, CD40 및 CD27 항원에 대한 시험관 내의 기능적 자료가 있다. OX-40에 대한 항체는 혼합된 림프구 반응(7)에서의 T-세포 반응을 증가시키고, CD40에 대한 항체는 PMA 또는 CD20 항체와 같은 공활성화제(coactivator)의 존재하에 B-세포의 증식을 증가시키고, 시험관내의 IL-4와 함께 B-세포의 분화를 유도하며, 장기간 정상적인 B-세포선(8)을 형성시킨다. CD27 분자위에서 에피토프

(epitope)를 인식하는 항-1A4인 하나의 이노노클론항체는 칼슘유동화, IL-2분비, T-세포기능 보조제, 및 T-세포 급증식을 방해한다. 반면에 CLB-CD27/1, 또 하나의 항-CD2n mAb는 PMA 또는 항-CD3 mAb(6)로 자극받은 사람의 T-세포의 급증식을 촉진한다. 이러한 결과는 CD27 분자가 T-세포 활성화에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. TNFRs, NCFR 및 CD40을 제외하고 슈퍼군의 구성요소에 연결된 리간드 또는 세포 표면 분자는 아직 동정되지 않았다. 수용체에 연결된 리간드의 동정 및 특정화는 4-1BB의 생리학적 역할을 정의하는데 도움이 될 것이다.

세포 표면 4-1BB가 T-세포 활성화에 기여하는지를 규명하기 위해서 항-4-1BB 53A2PK 4-1BB에 대한 길항제 로서 사용되었다. 이러한 자료는 4-1BB가 사실은 T-세포 활성화 및 급증식 동안에 보조적 신호 분자로서 잠재적인 기능을 가지고 있음을 제시한다. 고정된 항-CD3으로 자극된 정제된 비장의 T-세포에 수용성 53A2를 첨가하면 항-CD3 단독으로만 자극된 T-세포와 비교하여 ³H 티미딘 합체의 증대를 일으킨다. 2-에서 10-범위에 걸쳐 이러한 형태의 증가는 3개의 독립된 실험에 포함된다.

브렉처와 콘의 본래의 2개의 신호 모형에서, 그들은 T-세포 항원 수용체(TCR)의 점유인 신호1이 보조 세포에 의해 제공된 신호 2의 부재하에서 T-세포의 불활성을 초래한다고 제안했다. 이것은 이후 변종의 연구(8)에 의해서 확인되었다. T-세포 위에서 잠재적 공동자극 수용체로서 보조세포 CD20의 동정은 적절한 T-세포 급증식(10)에 요구되는 보조신호(6)를 특징화시키는데 상당한 기여를 했다. 다른 세포표면 분자들은 이 공동자극 활성화 요구(11)에 기여할 수 있다.

4-1BB를 통하여 전달되는 생화학적 신호는 완전히 밝혀지지 않았다. 고려되는 한가지 가능성은 4-1BB는 그의 세포질 꼬리부분에서 추정상의 p56^{lck} 티로시나제 키나제 결합영역을 포함한다는 관찰이다. p56^{lck} 티로시나제 키나제가 4-1BB에 결합되어 있는 것은 나중에 결정되었다. 4-1BB-매개신호가 그 발현이 T-세포 활성화 및 그 뒤의 급증식에 요구되는 IL-2 및 IL-2수용체와 같은 유전자들 조절할 수 있는지를 결정하는 것 또한 가치 있는 일이다.

신경 성장 요소 수용체(NGFR)군의 구성요소의 정확한 기능은 다양한 것 같음에도 불구하고, 떠오르는 주제는 이러한 분자들이 그들이 발현되는 특정 세포형태의 반응성 또는 생활력의 유지에 다양한 방법으로 기여할 수 있다는 한가지이다. 예를들면, NGF는 시험관내 및 생체내(12)에서의 뉴런의 생활력에 절대적으로 요구된다. 수용성 항 CD40 단클론성 항체에 의한 CD40의 가교결합은 CD40에 의해 전달되는 신호는 또한 차별화 요소에 대한 반응성의 유지를 도울 수 있다. IL-4 존재하에서 CD40과 항-CD40 F9(ab')₂ 단편의 연결은 IgE 합성(14)의 큰 증가를 유도한다. 또한, 항-CD40은 IL-10으로 처리된 순수한 B-세포를 활성화시키고, 형질 전환성장 요소-β는 IgA 분비(15)에 맡겨지게 된다.

분자적 특성을 NGFR과 (super family)와 공유함과 더불어 4-1BB는 이스트 e1F-2β 단백질의 추정되는 아연 핑거구조를 가지고 있음이 알려졌다. 4-1BB는 또한 보존되는 3역을 시나세분과 absentia of Drosophila에서 공유하는데 absentia of Drosophila는 광수용체 세포의 적정분화에 요구된다. 전기한 구역은 Dictyostelium의 DGIN 유전자의 단백질 생성물과 유사하고 전기한 유전자의 변형은 C-AMP(18)에 의한 어그리게이션도 중 특이적으로 유도된다.

이 구역은 C-X₂-C-X₉-C-X₃-H-X₉-C-X-C의 패턴을 형성한다. 시스테인과 히스티딘은 4-1B, 시나(sina), DG17 단백질에서 유사한 공간에 보존된다. 4-1BB와 시나 단백질의 24개의 아미노산 중 10개는 동일하고 24개중 3개는 보존되는 대응물

(substitute)이다. 보존되는 패턴은 이러한 아미노산이 기능적으로 시나 단백질을 암시한다. 시나 단백질은 핵에 위치하는데 이는 시나단백이 세포 조절하는 기능을 가짐을 암시한다.

4-1BB의 아미노산 서열 특성이 아연 핑거 모티브, 핵단백 및 수용체 도메인(domain)과 같다는 사실은 4-1BB가 세포분열 및 분화에서 다양한 역할을 수행함을 암시한다. 4-1BB는 T-세포-APC 상호작용과 관련된 또 다른 세포-표면 물질을 나타낸다. 4-1BB-AP 융합단백은 특이 성숙된 β-세포라인, 안티-μ-활성화된 1차 β 세포 및 성숙된 거대 식세포 라인 4-1BB-AP는 미성숙 β와 거대 식세포 라인, T-세포 클론, T-세포 라인, 1차 배양 T-세포 및 다양한 비 림프구 라인에 적어나 비중없는 수준으로 존재한다. 4-1BB-AP가 성숙된 β 세포와 거대 식세포에 결합되어 있으므로 4-1BB 결합에 전달된 신호는 특정방법으로 APC 기능을 조절할 수도 있다. 이러한 가능성은 연구과제로 남아있다.

살루피와 그의 동료 (19)는 4-1BB의 세포외 도메인과 인간 IgG의 Fc 영역으로 구성된 융합 단백질인 4-1BB Rg가 세포의 매트릭스(ECM)에 결합되어 있음을 제안했다. 4-1BB Rg결합의 상당부분이 인간의 비트로넥틴(vitronectin)이다. 제시되지 않은 데이터에서는 엘리사(ELISA)가 4-1BB-AP와 인간의 비트로넥틴을 사용하여 수행되었다. AP활성에 기초한 4-1BB-AP의 결합은 관찰되지 않았다. 4-1BB-AP가 세포에 부착된 단백질과 외부적으로 결합할 가능성을 배제하기 위하여 표면(가능한 세포의 매트릭스 성분), B-세포 임파종 결합시험전에 산성조건하에서 세정하였다. 4-1BB-AP는 성숙한 B-세포 임파종에 특이적으로 그대로 결합되었다. 4-1BB-리간드가 B-세포상에서 특이적으로 발현되고 대식세포가 존재하는지, 그리고 4-1BB-AP가 특정결합조건하에서 ECM에 결합할 수 있는지를 결정해야 한다. ECM이 4-1BB가 특정 세포-표면 리간드에 결합하는 것을 용이하게 하는 것이 가능하다.

B-세포와 헬퍼 T-세포는 T-세포상의 특정 카운터-수용체에 결합한 B-세포상의 수용체를 통해 서로 상호작용

용한다. 이 상호작용이 이 두세포 타입간의 생화학적 시그널 릴레이의 연쇄작용을 유발한다고 생각된다(20). 이러한 상호작용이 진행되면서, 이들 세포는 세포주기의 S단계로 들어가게 된다. T-세포상의 TCR과 CD4 사이의 초기 상호작용 및 B-세포상의 프로세싱된 항원 MHC II는 세포주기로 들어갈 수 있는 B-세포를 유발하지는 못한다. 그러나, 인 비트로 시스템에서의 연구결과는 일단 T-세포가 자극되면, B-세포가 세포주기로 들어가도록 유도할 수 있는 새로이 합성되거나 변형된 세포-표면 분자를 발현한다(22,23). 이러한 T-세포가능은 항원-특이적 또는 MHC-제한을 받지 않는다(24). 또한, 용해성 인자가 B-세포활성화의 활성화된 Th 유도에 필요하지 않다(25). 일단 B-세포가 세포주기로 들어가면, IL-4는 B-세포가 G₁에서 S단계로 진행하도록 유도한다. B-세포가 세포주기로 들어가는 것을 증진시키는 활성화된 T-세포 또는 T-세포막의 능력은 시클로헥시미드 또는 시클로스포린A 처리에 의해 저지될 수 있다(26,27). 이러한 새로이 발현된 막 단백질은 그 유도특성에 있어서 '림포카인과 같은' 성질을 나타낸다.

4-1BB는 B-세포 공동자극자의 요구를 만족하는 발현성질을 가진다. 4-1BB는 안티-CD3 또는 TCR-매개 T-세포 자극에 의해 유도되고, 그 발현은 시클로헥시미드 처리 뿐만 아니라 시클로스포린A에 영향을 받는다(28). 흥미롭게, 파라폼알데히드-고정된 SF21-4-1BB-세포는 B-세포증식을 유도하는데 안티- μ 와 상승작용을 한다. SF21-4-1BB에 의한 비장의 B-세포의 공동자극은 최적(10 μ g/ml) 및 준최적

(1.0~0.1 μ g/ml)의 안티- μ 농도에서 일어난다. 휴지기의 B-세포에 SF21-4-1BB 세포의 첨가는 B-세포증식을 유발하지 않는다. SF-21-4-1BB-세포는 B-세포증식 유도에 있어서 TPA 또는 이오노마이신 또는 준최적 농도의 LPS와 상승작용을 하지 않는다.

비록 바쿨로바이러스 시스템이 재조합 용해성 단백질의 다량발현에 사용되어 왔지만, 이 시스템은 재조합 세포-표면 단백질의 발현에도 사용될 수 있다. 바쿨로바이러스 감염은 세포기준당 높은 수준의 재조합 단백질을 발현하는 손쉬운 수단을 제공한다. SF21세포 단독첨가는 유의할 만한 수준의 공동자극을 일으키지 않는다. 이것은 강한 공동자극 활성을 나타내는 COS- 또는 L-세포를 사용할 때 잠재적인 문제점이 될 수 있다.

NGFR 슈퍼패밀리의 또 다른 일원인 CD40는 활성화된 T-세포상에 발현되는 gp 39분자와 상호작용하며 β 세포상에서 발현된다. 쥐(29)와 사람(30) gp 39를 코딩하는 cDNA가 클론되었으며 이 세포표면 분자는 종양괴사인자와 상동성이 있는 타입 II 막 단백질이다. 노알레(31) 등은 CD40-면역글로불린 융합단백질이 T-세포-유발 β -세포 증식과 분화를 농도의존성 방법으로 저지할 수 있음을 발견하였다. 아미티지 등은 쥐의 gp 39에 대한 cDNA를 분리하였고 gp 39가 공동자극 없이 β -세포증식을 유도할 수 있고, IL-4-존재하에 IgE생산을 유발함을 보였다. 홀렌바우(32) 등은 인간의 gp 39로 트랜스펙트된 COS세포가 인간의 β -세포증식유발에 있어서 TPA 또는 안티-CD 20과 상승효과를 나타내고, 적은 수준에서 공동자극자없이 β 세포를 자극할 수 있음을 나타냈다. 이들 데이터는 CD40이 T-세포와의 물리적 접촉중에 신호를 전달하는 β -세포-표면 분자중 하나임을 나타낸다.

세포-표면 수용체는 용해성 인자 또는 인접 세포상에 발현된 다른 세포 표면 분자와 상호작용하여 외부환경과 상호 연락한다. 세포-세포접촉에 의해 전달되는 생화학적 신호와 세포표면 수용체와 상호 작용하는 용해성 인자에 의해 전달되는 신호의 역할은 분명하지 않다. NGFR 슈퍼패밀리는 NGFR 뿐만 아니라 TNFR I 및 II의 하나이상의 리간드에 대한 결합에 대해 TNFRs I 및 II는 모두 특이하다. TNF- α 와 TNF-R에 결합한다(33). NGFR은 NGF 뇌-유래성 뉴로트로픽 인자. 및 뉴로트로핀-3에 결합한다(34).

또한, 하나의 리간드는 세포표면 및 용해성 리간드 양자로서 기능할 수 있다. CD40 리간드, gp 39에 대한 최근의 증거는 이 리간드가 용해성 리간드 뿐만 아니라 막 부착성으로 존재할 수 있음을 암시한다(35). 4-1BB는 분비되어 용해성 형태로 β 세포와 상호작용할 수 있고 막 부착 형태로도 상호작용할 수 있다. T-세포상에서 발현되는 NGFR 수용체 패밀리의 한 구성원인 CD27은 세포표면상에서 발현될 뿐만 아니라 분비된다(36). 또한, 하나이상의 리간드(용해성 및 세포표면)가 4-1BB에 결합하는 것이 가능하다.

인간의 상동체 H4-1BB의 단리

마우스 4-1BB의 인간의 상동체(H4-1BB)를 단리하기 위해 2세트의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 프라이머가 고안되었다. PCR 프라이머를 고안하기 위해 신경 성장인자 수용체(NGFR) 슈퍼패밀리의 구성원의 아미노산 배열이 비교되었는데 이는 4-1BB가 슈퍼패밀리의 구성원이기 때문이다(37). 이용된 아미노산 배열은 마우스 4-1BB(38), NGFR(39), 인간의 종양괴사인자 수용체(33), 인간의 CD40(40), 및 인간의 CD27(6)이었다. NGFR슈퍼패밀리 중 보존된 배열부위가 선택되었다.

전행성 프라이머 I (H4-1BBF I)는 아미노산 36-41까지이고 전행성 프라이머 II (H4-1BB II)는 상기 쥐4-1BBDML 아미노산 52에서 58까지이다. 리버스 프라이머 I (H4-1BBR I)은 쥐4-1BB의 아미노산 116에서 121에 걸쳐있고 리버스 프라이머 II (H4-1BBR II)는 아미노산 122에서 128까지에 걸쳐 있다. 쥐 4-1BB에서 PCR 프라이머로 사용된 지역들을 그림 1에 도시하였다.

각 프라이머들의 퇴행성 올리고 뉴클레오티드의 순서는 다음과 같다:

H4-1BBF I : 5' TTC TGT CGI AAA TAT AAT CC 3'

T C A G C C

H4-1BBF II : 5' TTC TCI TCI ATT GGI GGI CA 3'

T G G C

A

H4-1BBR I : 5' CC IAA IGA ACA IGT TTT ACA 3'

G CT G C G

H4-1BBR II : 5' TT TTG ATC ATT AAA IGT ICC 3'

C G G G

건강한 정상인으로부터 주변 혈액 림프구를 분리하여 PMA(10mg/ml)와 이오노마이신(1 μ M)으로 활성화시켰다. 림프구조로부터 mRNA를 분리하였다. 역전사효소를 사용하여 인간의 림프구 mRNA를 외출 c-DNA로 전환시켰다. 그리고 나서 프라이머들의 조합을 가진 테그 폴리머라제를 사용하여 cDNA를 증폭시켰다. 프라이머의 조합은 다음과 같다: H4-1BB I; 및 H4-1BBR I; H4-1BBFI 대 H4-1BBR II; H4-1BBF II 대 H4-1BBRI; 및 H4-1BBF II 대 H4-1BBR II.

H4-1BBF II와 H4-1BBR II의 프라이머 세트는 -240bp의 특이 밴드를 산출하였다. 240bp밴드는, 만약 인간의 상동물(호모로그)이 쥐 4-1BB와 크기면에서 비슷하다면, 인간의 4-1BB의 크기로 예상된다. PCR산물(240bp)을 PGEM3 벡터내에서 클로닝하여 순서를 결정하였다. PCR산물의 한 오픈 리딩 프레임은 쥐 4-1BB의 것과 -65% 동일하였다. 그러므로, 240bp PCR 산물은 쥐 4-1BB의 인간 상동물이라고 결론지었다. 240bp PCR 산물은 활성화된 인간의 T 림프구의 λ gt11 cDNA 라이브러리를 스크린 하는데 사용하였다. -0.85kb cDNA가 분리되었다. 상기 cDNA의 염기서열은 도 2에 도시된 바와 같으며 예견되는 아미노산 서열은 도 2의 b에 도시된 바와 같다. 도시된 상기 정보는 본 명세서에 첨부된 서열표에 서열 1d.1.로 도시된 바와 같다.

H4-1BB-AP 융합단백질을 생산하기 위한 발현 플라스미드를 완성하였는데, 신호 염기서열을 코딩하는 염기서열을 포함하는 상기 H4-1BB cDNA의 5' 부분과 전체 세포의 부분은 PCR에 의해 증폭되었다. 정확하게 클로닝을 하기 위하여 전위 프라이머 (primer)의 5' 말단의 *Hind III* 절단위치 및 리버스 프라이머 (reverse primer)의 Bg1 II 절단위치를 만들었다.

상기 *Hind III*-Bg1 II H4-1BB 단편은 포유류 발현벡터 A₁tag-1에 삽입되는데 인간의 태반성 알칼라인 포스파타제 (AP)를 코딩하는 염기서열의 업스트림(upstream)에 삽입된다. H4-1BB의 5' 부분의 증폭을 위한 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머로는 하기와 같은 것이 사용된다.

전위 프라이머 : 5' AAT AAG CTT TGC TAG TAT CAT ACC 3'

리버스 프라이머 : 5' TTA AGA TCT CTG CGG AGA GTG TCC TGC CTC 3'

H4-1BB-AP는 인간의 4-1BB (즉, H4-1BBL)의 리간드를 발현하는 세포와 조직을 식별하기 위하여 사용된다. 쥐 4-1BB로 연구한 결과는 4-1BB의 리간드가 세포표면에 존재하고 있음을 보여주었다. B-세포와 마크로파아지는 4-1BBL를 발현하는 주요 세포이다. H4-1BBL 또한 인간의 B-세포와 마크로파아지 상에서 발현하는 것으로 생각되고 있다.

포유류의 발현 cDNA 라이브러리(library)는 H4-1BB를 발현하는 인간의 세포라인에서 발생된다. 상기 라이브러리는 ¹²⁵I로 표지된 H4-1BB-AP에 의해 선별된다. 다음, H4-1BB cDNA는 분리되어 특성화된다. 그 다음 수용성 재조합 H4-1BBL은 생산된다. H4-1BB-AP와 H4-1BBL은 후술하는 바와 같이 면역반응을 억제하거나 향상시키는데 사용된다. 다음 H4-1BB와 H4-1BBL에 대한 모노클로날 항체가 생산된다.

쥐 4-1BB에 대한 연구에 따르면 4-1BB는 보조 자극신호로서 작용한다. H4-1BB 역시 T-세포 활성을 위한 보조 자극신호로서 작용하는 것으로 생각된다. 쥐 H4-1BB는 B-세포가 증식되고 분화되는 것을 돕는다. H4-1BB 역시 같은 역할을 하는 것으로 생각된다. H4-1BB-AP, H4-1BBL 및 모노클로날 항체는 인간의 면역반응을 억제하거나 향상시키는데 사용될 수 있다.

도 3의 a도와 b도는 T-세포 활성화에 관여하는 분자들을 도해하고 있다. 초기 T-세포 활성화기간 (인식단계)중에는 휴지상태의 T-세포는 TCR/CD3 복합체와 다른 '보조' 분자들을 발현시킨다. 상기 발현된 분자들 중에서 CD4(또는 CD8), LFA-1 및 CD28은 보조 자극신호를 수용하는 분자들로 추정된다. 상기 '보조'의 자극신호들과 조합된 TCR/CD3 복합체와의 초기 상호작용은 연이어 CD28, CTLA4 및 4-1BB와 같은 추가의 수용체 분자들의 발현을 유도한다. 상기 새롭게 발현된 분자들은 아마도 T-세포 활성화의 후기단계 (클론 확장)에서 추가의 중요한 보조 자극신호들을 수용할 것이다.

면역반응의 억제

도 4의 a에서 c도는 정상적인 T-세포 활성화의 경로를 도해하고 있다. 도 5의 a에서 c도는 4-1BB의 수용성 변종단백질(chimera)로 면역반응을 억제하는 과정을 설명하고 있다. 4-1BB가 T-세포 활성화에 중요한 역할을 한다면, 항원-제공 세포상의 4-1BB 리간드와의 상호작용의 방해는 T-세포-의존성 면역반응들을 억제할 것이다. CD28과 CD28에 대한 대응수용체 B7과의 상호작용의 방해는 궁극적으로는 다양한 정도로 생체내 항체생산과 세포-매개성 면역반응들을 억제한다. 양 작용의 억제는 보다 효과적으로 면역억제를 유발하는데 이는 4-1BB가 T-세포 활성화중에 유도되는데 기인한다. 4-1BB와 리간드와의 상호작용을 억제하는 것은 상기 CD28/B7의 상호작용이 더 이상 적절치 못한 활성화과정의 후기단계에서 매우 중요하다.

쥐 수용체 4-1BB 및 쥐 리간드 4-1BB로 설명되는 바와 같이, H-4-1BB-AP의 첨가는 H4-1BBL을 발현하는 세포들을 코팅하여 H4-1BB와 H4-1BBL의 정상적인 상호작용을 방해한다. 이는 결국에는 면역반응을 억제시킨다. 이러한 면역억제 유형은 항원에 따라 특이적이다. 그러므로 이 방법은 안티-CD3 또는 시클로스포린 A (cyclosporin A) 처리에 의해 유도되는 일반적인 면역억제를 회피한다. H4-1BB-AP 처리는 일정 자가면역성 질환을 치료하거나 특정 신체기관의 이식을 도와줄 수 있다.

면역기능의 향상

H4-1BB는 T-세포 활성화의 후기단계에서 기능할 수 있고, T-세포 활성화의 완성을 위한 중요 분자일 수 있다. 대다수의 종양은 종양-특이성 항원을 가지고 있다. 그러나, 면역성의 종양이 숙주의 면역체계를 벗어나는 이유 중 하나는 바로 종양-활성의 T-세포가 부적절한 보조자극을 수용하기 때문이다. 그러므로 H4-1BB와 같은 보조 자극분자의 종양으로의 도입은 세포독성의 T-세포 (cytotoxic T cell, CTL)의 항-종양 면역성을 향상시킬 수 있다. H4-1BLL은 세포-특이성을 가지고 발현될 수 있다. 예를 들어, 상기 H4-1BB는 멜라노사이트-특이성 프로모터 (melanocyte-specific promoter)를 이용하여 멜라노마(melanoma)에서 발현될 수 있다. 상기 H4-1BBL 발현 멜라노마는 H4-1BB를 통하여 세포독성의 T-세포를 자극하고 상기 멜

라노마-특이성 CTL을 활성화 시킨다. 상기 활성화된 멜라노마-특이성 CTL은 멜라노마를 파괴할 수 있다.

발명의 효과

본 발명은 서열에 의해 확인된 새로운 인간 수용체와 H4-1BB를 특징하는 것으로서, 본 발명은 H4-1BB의 세포의 부분을 구성하는 융합단백질과 검출단백질을 제시하고, 또한 cDNA, H4-1BB, 모노클론 항체 및 H4-1BB의 리간드를 사용하는 방법을 제시한다.

부록 : 참고문헌들

1. Smith, C.A. Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M.F., Jerzy, R., Dower, S.K., Cosman, D., and Goodwin, R.C. 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248:1019-1023.
2. Ebina, Y., L. Ellis, K. Jaruagin, M. Ederly, L. Graf, E. Clauser, J. On, F. Marizrz, Y.W. Kan, J.D. Goldfine, P.A. Roth and W.J. Rutter, 1985, The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling, *Cell* 40:747.
3. Vassali, R., R. Tedghi, B. Listowska-Bernstein, A. Tartakoff and J.C. Jaton, 1979, Evidence for hydrophobic region within heavy chains of mouse B lymphocyte membrane-bound IgM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5515.
4. Haskins, K., R. Kubo, J. White, M. Pigeon, J. Kappler and P. Marrack, 1983, The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T. cells I Isolation with monoclonal antibody, *J. Exp. Med.* 157:1149.
5. Lesslaver, W. and H. Gmunder, 1986, Biochemical characterization of the 9.3 antigens of human T-cells: simultaneous expression of disulfide-bonded 90-Kilodalton dimers and free subunits at the cell surface, *Mol. Immunol.* 23:271.
6. Van Lier, R., J. Borst, T. Vroom, H. Klein, P. Mourik, W. Zeijlemaker and C. Melife, 1987, Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27) a novel T cell differentiation antigen, *J. Immunol.* 139:1589.
7. Mallett, S., S. Fossum and A Barclay, 1990, Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes—a molecule related to nerve growth factor receptor, *EMBO J.* 9:1603.
8. Banchereau, J., P. Paoli, A., Valle, E. Garcia and F. Roussel, 1991, Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40, *Science* 251:70.
9. Moeller, D.L., M.K. Jenkins and R.H. Schwartz, 1989, Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a co-stimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy, *Ann. Rev. Immunol.* 7:445.
10. June, D.H., J.A. Ledbetter, P.S. Linsley and C.B. Thompson, 1989, Role of CD28 receptor in T cell activation, *Immunol. Today* 11:211.
11. Yang, L., B. Jones, A. Aruffo, K.M. Sullivan, P.S. Linsley and C.A. Janeway, Jr., 1992, Heat stable antigen is a co-stimulatory molecule for CD4 T cell growth, *J. Exp. Med.* 175:437.
12. Yamori, T., 1992, Molecular mechanisms for generation of neural diversity and specificity: roles of polypeptide factors in development of post-mitotic neurons, *Neurosci. Res.* 12:545.
13. Liu, Y.J., D.E. Joshua, C.T. Williams, C.A. Smith, J. Gordon and I.C. M. MacLennan, 1989, Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres, *Nature*, 342:929.
14. Jabara, H. H., S. M. Fu, R.S. Geha and D. Vercelli, 1990, CD40 and IL-4: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells, *J. Exp. Med.* 172:1861.
15. Defrance, R., B. Vanberviliet, F. Briere, I. Durnad, F. Roussel and J. Banchereau, 1992, Interleukin 10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40 activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A, *J. Exp. Med.* 175:671.
16. Donahue, T., Cigan, A., Pahich, E. and Valavicius, B., Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF 2 β gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process, *Cell* 54 (1988) 621-632).
17. Carthew, R.W and Rubin, G.M., seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye, *Cell*, 63(1990)561-577.
18. Driscoll, D.M. and Williams, J.G., Two divergently transcribed genes of *Dictyostelium discoideum* are cyclic AMP-inducible and coregulated during development, *Mol. and Cell. Biol.* 7 (1987) 4482-4489.
19. Chalupny, N.J., Peach, R., Hollenbaugh, D., Ledbetter, J.A., Farr, A.G. and Aruffo, A., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10360-10364.
20. Noelle, R.J., and Sow, E.C., 1991, *The FASEB J.* 5:2770-2776.

21. Noelle, R. and Snow, E., 1990, Immunol, Today 11:361-368.
22. Zurawski, G., Benedik, M., Kamb, B.J., Abrams, J.S., Zurawski, S.M. and Lee, F.D. (1986) Science 232,772-775.
23. Kianchi, T. (1986) Nature 325,70-73.
24. Gershenfeld, H.K. and Weissman, I.L. Science (1986) 232,854-858.
25. Biggin, M., Cison, T. and Hung, G. (1983 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80,3963-3965.
26. Hodgkin, P.D., Yamashita, L.C., Coffman, R.L. and Kehry, M.R., 1990, J. Immunol. 145:2025-2034.
27. Barlett, W.C., McCann, J., Shephaer, D.M., Roy, M. and Noelle, R.J., 1990, J. Immunol. 145:3956-3962.
28. Kwon, B.S., Kestler, D.P., Eshhar, Z., Ho, K., and Wakulchik, M. 1989. Expression characteristics of two potential T cell mediator genes. Cell. Immunol. 121:414-422.
29. Armitage, R., Fanslow, W., Strocchine, L., Sato, T., Clifford, K., MacDuff, B., Anderson, D., Gimpel, S., Davis-Smith, T., Maliszewski, C., Clark, E., Smith, C., Grabstein, K., Cosman, D. and Sprigs, M., 1991, Nature 357:80-82.
30. Kwon, B., Kestler, D., Lee, E., Wakulchik, M. and Young J. (1988) J. Exp. Med (1988) (In press).
31. Noelle, R.J., Roy, M., Shepherd, D.M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A. and Ariffo, A., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA88:6550-6554.
32. Hollenbaugh, D., Grosmaier, L.S., Kullas, C.D., Chalupny, N.J., Braescj-Andersen, S., Noelle, R.J., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A. and Aruffo, A., 1992, EMBO 11:4314-4321.
33. Schall, T.J., M. Lewis, K.J. Koller, A. Lee, G.C. Rice, G.H. W. Wong, T. Gatanaga, G.A. Granger, R. Lentz, J. Rab, W.J. Kohr and D.V. Goeddel, 1990, Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor, Cell 61:361.
34. Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F. and Barbacid, M., 1991, Cell 66:3395-403.
35. Armitage, R.J., Sato, T.A., Macduff, B.M., Clifford, K.N., Alpert, A.R., Smith, C.A. and Fanslow, W.C., 1992, Eur. J. Immunol. 22:2071-2076.
36. Hintzen, R.Q., deJong, R., Hack, E.E., Chamuleau, M., de Vries, E. F.R., ten Berge, I.J.M., Borst, J. and van Lier, R.A.W., 1991, J. Immunol. 147:29-35.
37. Mallett, S., and Barclay, A.N. 1991. A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor. Immunol. Today. 12:220-223.
38. Kwon, B.S., and Weissman, S.M. 1989. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:1963-1967.
39. Johnson, D., Lanahan, A., Buck C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. 1986. Expression and structure of the hamian NGF receptor. Cell 47:545-554.
40. Stamenkovic, I., Clark, E., and Seed, B. 1989. A B-lymphocyte activation molecule to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. EMBO. J. B:1403-1408.

전술한 상세한 설명은 도해와 설명의 목적을 위한 특허법령상의 요구에 따라 본 발명의 특정 실시예를 설명하고 있는 것이다. 그러나, 본 발명의 기술분야의 당업자라면 상기 발명의 변형과 변경은 본 발명의 범위와 사상을 벗어나지 않는 한도내에 가능하다. 한편, 하기의 특허청구범위들은 이러한 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되도록 의도된 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

분리된 DNA로서, 상기 DNA는 다음의 a)-e)로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA.

- a) H4-1BBF I의 뉴클레오티드;
- b) H4-1BBF II의 뉴클레오티드;
- c) H4-1BBR I의 뉴클레오티드;
- d) H4-1BBR II의 뉴클레오티드;
- e) 인간 4-1BB의 세포 외 도메인을 포함하는 수용성 인간 4-1BB 폴리펩티드(서열번호 2의 아미노산 1-163) 또는 4-1BB-L에 결합될 수 있는 상기 세포 외 도메인의 단편을 코딩하는 분리된 DNA;
- f) 인간 4-1BB 폴리펩티드가 아닌 동시에 수용성 인간 4-1BB 폴리펩티드의 C-말단에 위치하는 폴리펩티드

를 추가적으로 코드하는 상기 e)의 분리된 DNA;

g) 인간 4BB를 코딩하는 상기 e) 또는 f)의 DNA의 변종으로서 동일한 아미노산 서열을 코드하는 DNA 변종.

청구항 2

인간의 4-1BB 폴리펩티드를 코딩하는 분리된 DNA로서, 상기 DNA는 다음의 a)-c)로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA.

- a) 서열번호 2를 코딩하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 41-805;
- b) 서열번호 2의 일부분을 코딩하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 110-805;
- c) 상기 a) 또는 b) 뉴클레오티드 서열에 해당되는 유전자코드에 따른 변종 뉴클레오티드 서열.

청구항 3

다음의 (a) 및 (b) 과정에 의해 생산되는 수용체 단백 H4-1BB.

(a) 적어도 서열번호 1의 뉴클레오티드 110-805를 갖는 DNA 서열을 포함하는 발현벡터와 적절한 트랜스팩션 숙주를 접촉시켜 트랜스팩션된 숙주세포가 상기 DNA 서열에 의해 코드된 단백질을 발현시키도록 하는 단계;

(b) 상기 단백질을 정제하는 단계

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는

- a) 수용체 단백 H4-1BB의 리간드를 식별하기 위한 프로브로서 사용될 수 있으며;
- b) B-세포의 증식촉진에 사용될 수 있으며;
- c) H4-1BB 리간드 결합을 차단하기 위해 사용될 수 있는 것을 특징으로 하는 상기 단백질의 단편.

청구항 6

수용체 단백 H4-1BB를 특이적으로 인식하는 H4-1BB에 대한 모노클로날 항체.

청구항 7

서열번호 2를 갖는 수용체 단백 H4-1BB 또는 그 단편을 특이적으로 인식하는 H4-1BB에 대한 모노클로날 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마.

청구항 8

T-세포 증식을 향상시키기 위하여 제7항의 모노클로날 항체를 사용하는 방법으로서, 수용체 단백 H4-1BB를 발현시킨 T-세포를 상기 모노클로날 항체로 처리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 티로시나제 키나제(tyrosinase kinase)의 존재하에 상기 항체처리과정을 수행하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

T-세포 활성을 향상시키기 위하여 제6항의 모노클로날 항체를 사용하는 방법으로서, 수용체 단백 H4-1BB를 발현시킨 T-세포를 상기 모노클로날 항체로 처리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 티로시나제 키나제(tyrosinase kinase)의 존재하에 상기 항체처리과정을 수행하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

인간의 수용체 단백 H4-1BB의 세포막 리간드를 검출하기 위한 융합단백질로서 다음의 a) 및 b)를 포함하는 것을 특징으로 하는 융합단백질.

- a) 상기 수용체 단백 H4-1BB의 세포 외 부분에 해당하고 서열번호 2를 포함하는 상기 수용체 단백 H4-1BB의 적어도 한 부분으로서, 이 부분은 바로 상기 세포막 리간드에 결합되는 부분인 것을 특징으로 하는 부분,
- b) 상기 수용체 단백 H4-1BB의 상기 부분에 결합된 검출단백으로서, 상기 검출 단백질에 대한 상대적 활성 분석에 의해 리간드 결합이 검출될 수 있는 것을 특징으로 하는 검출단백.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 검출단백질은 알칼라인 포스파타제인 것을 특징으로 하는 융합단백질.

청구항 14

인간의 수용체 단백 H4-1BB의 세포막 리간드를 검출하는 방법으로서 다음의 a)-c) 단계를 포함하는 것을

특징으로 하는 방법.

a) 상기 수용체 단백 H4-1BB를 발현시키는 것으로 추정되는 세포중에 융합단백질을 위치시키는 단계로서, 상기 융합단백질은 다음의 i)과 ii)를 포함하는 것을 특징으로 하는 단계;

i) 상기 수용체 단백 H4-1BB의 세포외 부분에 해당하는 상기 수용체 단백 H4-1BB의 적어도 한 부분으로서, 이 부분은 바로 상기 세포막 리간드에 결합되는 부분인 것을 특징으로 하는 부분,

ii) 상기 수용체 단백 H4-1BB의 상기 부분에 결합된 검출단백으로서, 상기 검출단백에 대한 상대적 활성 분석에 의해 리간드 결합이 검출될 수 있는 것을 특징으로 하는 검출단백

b) 상기 세포막 리간드에 결합되지 않은 융합단백질의 세포를 씻어내는 단계;

c) 상기 씻어낸 세포들을 상기 검출단백에 대한 기질중에 위치시키고, 상기 검출단백의 상대적 활성을 측정하는 단계

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 검출단백질은 알칼라인 포스파타제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

B-세포 증식을 유도하는 방법으로서, 인간의 수용체 단백 H4-1BB의 리간드를 발현한 B-세포를 수용체 단백 H4-1BB를 발현한 세포로 처리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

제 1항에 따른 DNA 서열을 포함하는 재조합 발현벡터로서, 숙주세포에서의 DNA 서열의 발현에 적합한 조절 염기서열에 작동가능하도록 결합되는 제 1항에 따른 DNA 서열을 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 18

서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 인간 수용체 단백 H4-1BB에 대한 DNA 서열을 포함하는 재조합 발현벡터로서, 숙주세포에서의 DNA 서열의 발현에 적합한 조절 염기서열에 작동가능하도록 결합되는 재조합 발현벡터.

청구항 19

제 2항에 따른 DNA 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로서, 숙주세포에서의 상기 DNA 염기서열의 발현에 적합한 조절 염기서열에 작동가능하도록 결합되는 재조합 발현벡터.

청구항 20

Leu-Gln-Asp-Pro-Cys-Ser-Asn-Cys-Pro-Ala-Gly-Thr-의 N-말단 아미노산 서열을 포함하는 서열번호 2로부터 유래되는 정제된 인간 4-1BB 폴리펩티드.

청구항 21

제 20항에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 24-255와 서열번호 2의 아미노산 24-186으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 정제된 인간 4-1BB 폴리펩티드.

청구항 22

제 20항에 있어서, 보존적인 아미노산 대체를 제외하고는 서열번호 2의 아미노산 24-255와 서열번호 2의 아미노산 24-186으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는 정제된 인간의 4-1BB 폴리펩티드.

청구항 23

정제된 수용성 인간의 4-1BB 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 24-186 또는 그 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 정제된 수용성 인간 4-1BB 폴리펩티드.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 인간의 4-1BB 폴리펩티드와 C-말단에 융합된 폴리펩티드를 추가적으로 포함하는 정제된 수용성 인간 4-1BB 폴리펩티드.

청구항 25

적합한 희석제, 담제 또는 부형제와 혼합된 제20항의 수용성 인간 4-1BB의 유효량을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 26

제20항의 인간 4-1BB 폴리펩티드와 면역학적으로 반응하는 항체.

도면

도면 1a

ATGTCCATGA ACTGCTGAGT GGATAAACAG CACGGGATAT CTCTGTCTAA - 96
 AGGAATATTA CTACACCAGG AAAAGGACAC ATTCGACACC AGGAAAGGAG - 46
 CCTGTACACAG AAAACCACAG TGTCTGTGC ATGTGACATT TCGCC - 1

ATG GGA AAC AAC TGT TAC AAC GTG GTG GTC ATT GTG CTG CTG CTA 45
 Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu

GTG GGC TGT GAG AAG GTG GGA GCC GTG CAG AAC TCC TGT GAT AAC 90
 Val Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn

TGT CAG CCT GGT ACT TTC TGC AGA AAA TAC AAT CCA GTC TGC AAG 135
 Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys
 • H4-1BB PI •

AGC TGC CCT CCA AGT ACC TTC TCC AGC ATA GGT GGA CAG CCG AAC 180
 Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Glu Pro Asn
 • H4-1BB PI •

TGT AAC ATC TGC AGA GTG TGT GCA GGC TAT TTC AGG TTC AAG AAG 225
 Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys

TTT TGC TCC TCT ACC CAC AAC GCG GAG TGT GAG TGC ATT GAA GGA 270
 Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly

TTC CAT TGC TTG GGG CCA CAG TGC ACC AGA TGT GAA AAG GAC TGC 315
 Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys

AGG CCT GGC CAG GAG CTA AGC AAG CAG GGT TGC AAA ACC TGT ACC 360
 Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser
 • H4-1BB RI •

TTG GGA ACA TTT AAT GAC CAG AAC GGT ACT GGC GTC TGT CCA CCC 405
 Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro
 • H4-1BB RI •

TGG ACG AAC TGC TCT CTA GAC GGA AGG TCT GTG CTT AAG ACC GGG 450
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly

ACC ACG GAG AAG GAC GTG GTG TGT GGA CCC CCT GTG GTG AGC TTC 495
 Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe

TCT CCC AGT ACC ACC ATT TCT GTG ACT CCA GAG GGA GGA CCA GGA 540
 Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly

GGG CAC TCC TTG CAG GTC CTT ACC TTG TTC CTG GCG CTG ACA TCG 585
 Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala Leu Thr Ser

GCT TTG CTG CTG GCC CTG ATC TTC ATT ACT CTC CTG TTC TCT GTG 630
 Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe Ser Val

CTC AAA TGG ATC AGG AAA AAA TTC CCC CAC ATA TTC AAG CAA CCA 675
 Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln Pro

TTT AAG AAG ACC ACT GGA GCA GCT CAA GAG GAA GAT GCT TGT AGC 720
 Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser

도면 1b

TGC CGA TGT CCA CAG GAA GAA GAA GGA GGA GGA GGA GGC TAT GAG 765
 Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Tyr Glu

CTG TGA 771
 Leu ---

TGTAATAATG TAGGAGATGT GTGGGCCGAA ACCGAGAAGC ACTAGGACCC 821
 CACCATCCTG TGGAAACAGCA CAAGCAACCC CACCACCCTG TICTIACACA 871
 TCATCCTAGA TGATGTGTGG GCGCGCACCT CAICCAAGTC TCTTCTAACG 921
 CTAACATATT TGTCTTTACC TTTTTTAAAT CTTTTTTTAA ATTTAAATTT 971
 TATGTGTGTG AGTGTTTTGC CTGCCTGTAT GCACACGTGT GTGTGTGTGT 1021
 GTGTGTGACA CTCTGATGC CTGAGGAGGT CAGAAGACAA AGGGTGTGGT 1071
 CCATAAAGAAC TGGAGTTATG GATGGCTGTG AGCCGGNNG ATAGGTGGG 1121
 ACGGAGACCT GCTTCTTAT TTTAACGTGA CTGTATAATA AAAAALAT 1171
 GATATTTTGG GAATTGTAGA GATTGTCTG ACACCCTTCT AGTTAATGAT 1221
 CTAAGAGGAA TTGTTGATAC GTAGTACT GTATATGTGT ATGTATATGT 1271
 ATATGTATAT ATAAGACTCT TITACTGTCA AAGTCAACT AGAGTGTCTG 1321
 GTTACCAGGT CAATTTTATT GACATTTTA CGTCACACAC ACACACACAC 1371
 ACACACACAC ACCTTTTATC TACGTACTGT TATCGGTATT CIACGTCAIA 1421
 TAATGGGATA GGGTAAAAGG AAACCAAAGA GTGAGTGATA TTATTGTGGA 1471
 GGTGACAGAC TACCCCTTCT GGGTACGTAG GGACAGACCT CCTTCGGACT 1521
 GTCTAAAACCT CCCCTTAGAA GTCTGICAA GTTCCCGGAC GAAGAGGACA 1571
 GAGGAGACAC AGTCCGAAAA GATTTTTTC CGGCAAAATCC TTTCCCTGTT 1621
 TCGTGACACT CCACCCCTTG TGGACACTTG AGTGTCTATCC TTGCCCCGGA 1671
 AGGTCAAGTG GTACCCGCTG GTAGGGGCGG GGAGACAGAG CCGCGGGGGA 1721
 GCTACGAGAA TCGACTCACA GGGCGCCCGG GGCTTCGCAA ATGAAACTTT 1771
 TTTAAATCTCA CAAGTTTTCT CCGGGCTCGG CGGACCTATG GCGTCGAI CC 1821
 TTATACCTT ATCTGGGCGC CAAGATAAAA CAACCAAAGG CCTTACTTCC 1871
 GGTACTAATT CTCCCTGCGG GCCCCCGTAA GCATAACGGG GCGATCTCGA 1921
 CTTAAGAAC CTGGCCGCGT TCTGCCTGGI CTGCTTTCG TAAACGGTTC 1971
 TTACAAAAGT AATTAGTTC TCTTTTCCG CTCCAAGCTT CTGCTAGTCT 2021
 ATGGCAGCAT CAAGGCTGGT ATTTGCTAG GCTGACCCT ACGCCGCGC 2071
 AATAAGGGTA CTGGCGGCG CTGCGAAGGC CCTTGTGTT CAGAAACCA 2121
 AGGCCCCCT CATACCAACG TTTGACITTT GATTCCTGCC GGTACGTGGT 2171
 GGTGGGTGCC TTAGCTCTT CTCGATAGTT AGAC 2208

도면 2a

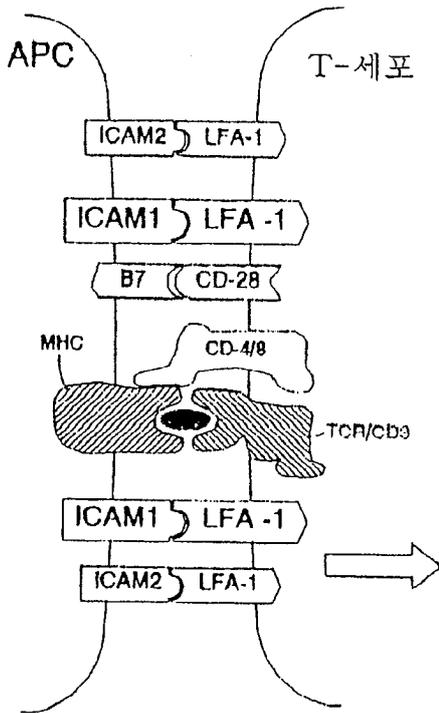
human homologue of mouse 4-1bb
 h4-1bb Length 838

1 AATCAGCTTT GCTAGTATCA TACCTGTGCC AGATTTCATC ATGGGAAACA
 51 GCTGTTACAA CATAGTAGCC ACTCTGTTGC TGGTCTCAA CTTTGAGAGG
 101 ACAAGATCAT TCAGGATCC TTGTAGTAAC TGCCAGCTG GTACATCTG
 151 TGATAATAAC AGGAATCAGA TTTGCAGTCC CTGTCTCCA AATAGTTCT
 201 CCAGCCGAGG TGGACAAAGG ACCTGTGACA TATGCAGGCA GTGTAAAGGT
 251 GTTTTCAGGA CCAGGAAGGA GTGTTCTCC ACCAGCAATG CAGAGTGTGA
 301 CTGCACATCA GGGTTTCACT GCCTGGGGGC AGGATGCAGC ATGTGTGAAC
 351 AGGATTGTAA ACAAGGTCAA GAACATCAA AAAAAGGTTT TAAAGACTGT
 401 TGCTTTGGGA CATTAAACGA TCAGAAACGT GGCATCTGTC GACCCTGGAC
 451 AAAGTGTTC TTTGATGGAA AGTCTGTGCT TGIGAAATGGG ACGAAGGAGA
 501 GGGACGTGGT CTGTGGACCA TCTCCAGCTG ACCTCTCTCC GGGAGCATCC
 551 TCTGTGAGCC CGCTGCCCC TGGAGAGAG CCAGGACACT CTCCGCAGAT
 601 CATCTCCTTC TTTCTTGGCG TGACGTGAC TGCGTTGCTC TTCTGCTGT
 651 TCTTCTCAC GCTCCGTTTC TCTGTTGTTA AACGGGGCAG AAAGAAACTC
 701 CTGTATATAT TCAAACAACC ATTTATGAGA CCAATACAAA CTAATCAAGA
 751 GGAAGATGGC TGTAGCTGCC GATTCACAGA AGAAGAAGAA GGAGGATGTG
 801 AACTGTGAAA TGGAAATCAA TAGGGCTGTT GGGACTTT

도면 2b

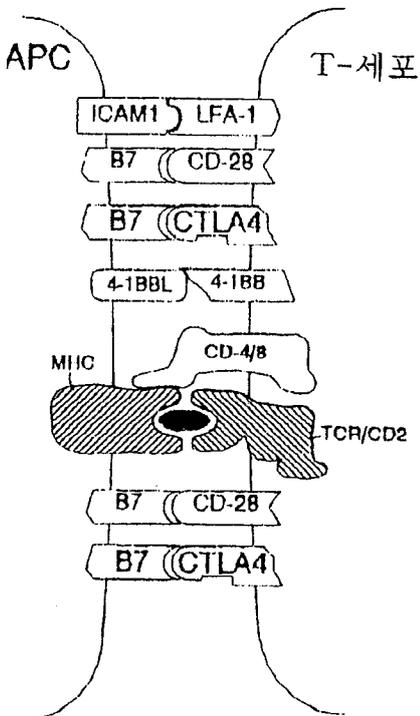
1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCFP
 51 NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VERURKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS
 101 MCEQDCKQGG ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRFPWTNCS LDGKSVLVNG
 151 TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTFPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL
 201 FLLFFLTLRF SVVYKGRKKL LYIFKQPFMR FVQITQEEEDG CSCRFPEEEE
 251 GGCEL

도면3a



인식단계
활성화 단계 초기

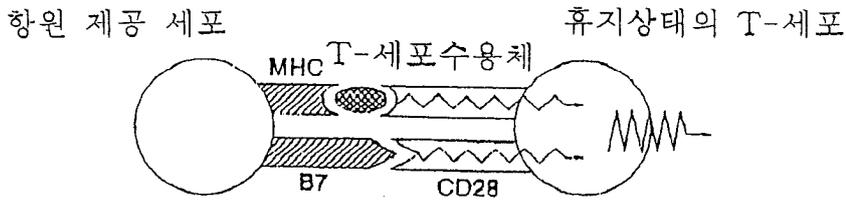
도면3b



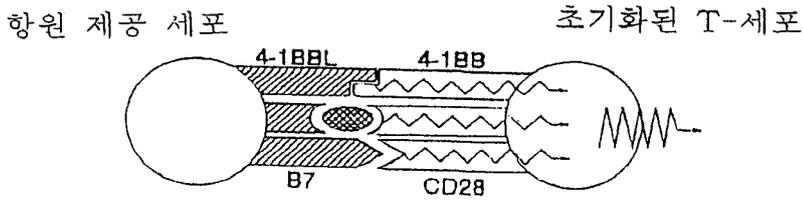
증식
클론 확장
활성화 단계 후기

도면4a

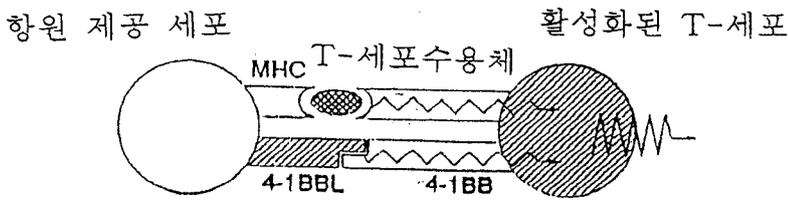
정상적인 T-세포 활성화경로



도면4b

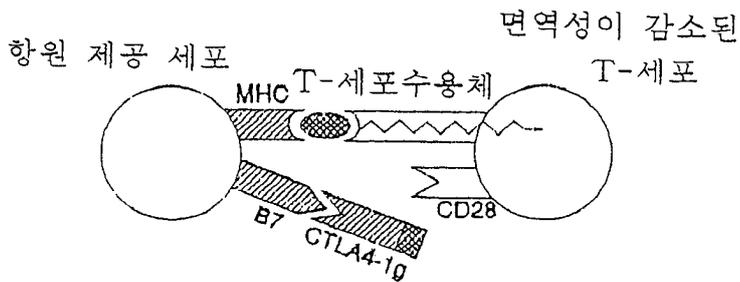


도면4c

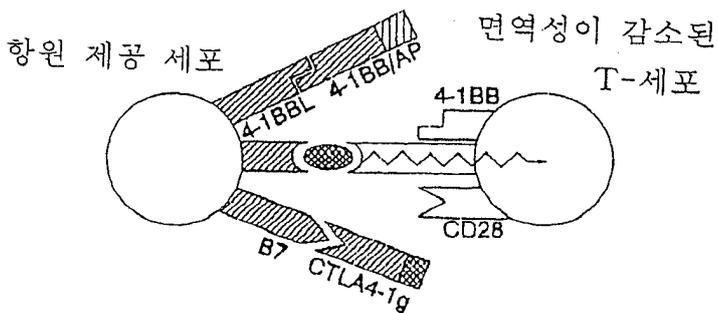


도면5a

T-세포 활성화경로에서의 방해단계



도면5b



도면5c

