



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0059168
(43) 공개일자 2014년05월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7030627
- (22) 출원일자(국제) 2012년04월23일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2013년11월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/034662
- (87) 국제공개번호 WO 2012/145746
국제공개일자 2012년10월26일
- (30) 우선권주장
61/477,955 2011년04월21일 미국(US)

- (71) 출원인
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 콜로라도, 어바디 코퍼레이트
미국 콜로라도 80203 덴버 제8 플로어 그랜트 스트리트 1800
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아, 어 캘리포니아 코퍼레이션
미국 캘리포니아주 94607 오클랜드 프랭클린 스트리트 1111 12층
- (72) 발명자
베넷, 제프리, 엘
미합중국, 콜로라도 80045, 오로라, 메일, 스톱비-182 리서치 2, 이스트 19번가 12700, 스쿠울 오브 메디신, 유니버시티 오브 콜로라도 덴버
오웬스, 그레고리, 피
미합중국, 콜로라도 80045, 오로라, 메일, 스톱비-182 리서치 2, 이스트 19번가 12700, 스쿠울 오브 메디신, 유니버시티 오브 콜로라도 덴버
버크만, 엘린, 에스
미합중국, 캘리포니아 94143, 샌프란시스코, 메드 싸이, 파내서스 애버뉴 513, 유씨에스에프 스쿨 오브 메디신
- (74) 대리인
김영관

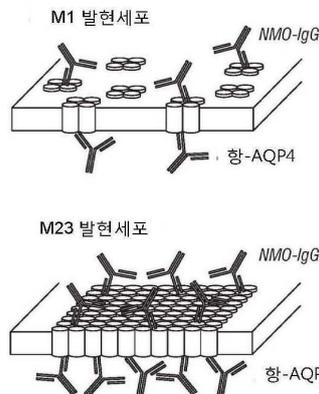
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **시신경 척수염 치료용 조성물 및 치료 방법**

(57) 요약

본 발명은 아쿠아포린 4(aquaporin 4)(AQP4)에 결합하는 항체 및 이들 항체를 이용하여 단일요법 또는 면역억제제 또는 혈장분리반출술(plasmapheresis)와 같은 기본 NMO 요법과 함께 시신경척수염(NMO)를 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

항-아쿠아포린-4(AQP4) 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 시약을 상기 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것으로, 상기 시약은 온전한(intact) 항체의 효과기(effector) 기능이 결여된 것인 시신경 척수염(NMO) 스펙트럼 질환(neuromyelitis optica(NMO) spectrum disease)을 가진 대상을 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대상은 인간인 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 안구내, 동맥 내, 피하투여, 정맥 내 투여 또는 경막내 경로로의 투여를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 시약은 효과기 기능이 결여된 돌연변이 Fc 부위를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 돌연변이 Fc 부위는 L234A/L235A 치환을 갖는 IgG1 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 돌연변이 Fc 부위는 K322A 치환을 갖는 IgG1 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 돌연변이 Fc 부위는 G237A 아미노산 치환을 갖는 IgG1 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 돌연변이 Fc 부위는 L234A/L235A/G237A 치환을 갖는 IgG1 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 시약은 IgG4 항체인 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 시약은 화학적으로 변형된 돌연변이 Fc 부위를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 시약은 Fc 부위가 결여된 항체의 Fab 단편 을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 시약은 비-항체 단백질 분절(segment)이 융합된 항체의 Fab 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 시약은 단일 사슬 항체 또는 F(ab')₂를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 치료는 하나 이상의 망막신경절세포의 죽음, 시각신경 손상, 척수손상, 또는 축삭 횡절단을 감소하는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 치료는 하나 이상의 시각신경 탈수초화, 척수 탈수초화, 별아교세포의 죽음 또는 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)의 죽음의 감소를 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 시약은 만성적으로 사용하거나 매일 사용하는 것을 포함하여, 한번 이상 투여하는 것인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 시약은 NMO가 발병하거나 발병한 직후 투여되는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 시약은 NMO의 발병 이후 약 1시간, 6시간, 12시간, 24시간 또는 2일 내에 투여되는 것인 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상에게 NMO의 하나 이상의 양상을 치료하는 제2 물질을 투여하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제2 물질은 상기 시약과 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 제2 물질은 상기 시약의 투여전 또는 투여후에 투여되는 것인 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 6 또는 서열번호 6과 80% 동일성을 갖는 경쇄 변이 서열, 서열번호 8 또는 서열번호 8과 80% 동일성을 갖는 중쇄 변이 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 10 또는 서열번호 10과 80% 동일성을 갖는 경쇄 변이 서열, 서열번호 12 또는 서열번호 12와 80% 동일성을 갖는 중쇄 변이 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 19 또는 서열번호 19와 80% 동일성을 갖는 경쇄 변이 서열, 서열번호 17 또는 서열번호 17과 80% 동일성을 갖는 중쇄 변이 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 5 또는 서열번호 5와 70% 동일성을 갖는 경쇄 변이 서열, 서열번호 7 또는 서열번호 7과 70% 동일성을 갖는 중쇄 변이 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 9 또는 서열번호 9와 70% 동일성을 갖는 경쇄 변이 서열, 서열번호 11 또는 서열번호 11과 70% 동일성을 갖는 중쇄 변이 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 20 또는 서열번호 20과 70% 동일성을 갖는 경쇄 변이 서열, 서열번호 18 또는 서열번호 18과 70% 동일성을 갖는 중쇄 변이 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 연구소 명칭 rAb-53 또는 rAb-58를 갖는 항체의 항원 결합 부위를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제1항에 있어서, 상기 방법은 환자에 대하여 혈청학적으로 NMO-IgG(AQP4) 양성여부를 평가하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제1항에 있어서, 상기 대상은 혈청학적으로 양성 NMO-IgG(AQP4)를 나타내는 것인 방법.

청구항 31

제1항에 있어서, 상기 대상은 하나 이상의 횡단성 척수염, 시신경염, 또는 관계가 없는 신경학적 이상을 나타내는 것인 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 관계가 없는 신경학적 이상은 지연성 오심(protracted nausea) 또는 구토를 포함하는 것인 방법.

청구항 33

항-아쿠아포린-4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 시약을 상기 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것으로, 상기 시약은 온전한 항체의 효과기 기능이 결여된 것인 시신경 척수염 스펙트럼 질환의 예방 또는 악화 경감을 위해 대상을 치료하는 방법.

청구항 34

항-아쿠아포린-4 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 시약을 상기 대상에 투여하는 단계를 포함하는 것으로, 상기 시약은 온전한 항체의 효과기 기능이 결여된 것인 시신경 척수염 스펙트럼 질환의 진행을 예방 또는 저해하는 방법.

청구항 35

온전한 항체의 효과기 기능이 결여된 항-아쿠아포린-4(AQP4) 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 시약.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 시약은 효과기 기능이 결여된 돌연변이 Fc 부위를 포함하는 것인 시약.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 돌연변이 Fc 부위는 L234A/L235A 치환을 갖는 IgG1 서열을 포함하는 것인 시약.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 돌연변이 Fc 부위는 K322A 치환을 갖는 IgG1 서열을 포함하는 것인 시약.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 돌연변이 Fc 부위는 G237A 아미노산 치환을 갖는 IgG1 서열을 포함하는 것인 시약.

청구항 40

제36항에 있어서, 상기 돌연변이 Fc 부위는 L234A/L235A/G237A 치환을 갖는 IgG1 서열을 포함하는 것인 시약.

청구항 41

제1항에 있어서, 상기 시약은 IgG4 항체인 것인 시약.

청구항 42

제1항에 있어서, 상기 시약은 상기 시약은 화학적으로 변형된 돌연변이 Fc 부위를 포함하는 것인 시약.

청구항 43

제1항에 있어서, 상기 시약은 Fc 부위가 결여된 항체의 Fab 단편을 포함하는 것인 시약.

청구항 44

제1항에 있어서, 상기 시약은 비-항체 단백질 분절(segment)이 융합된 항체의 Fab 단편을 포함하는 것인 시약.

청구항 45

제1항에 있어서, 상기 시약은 단일 사슬 항체 또는 F(ab')₂ 를 포함하는 것인 시약.

청구항 46

제36항에 있어서, 상기 시약은 IgG2 또는 IgG3 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것인 시약.

명세서

기술분야

- [0001] 본 출원은 참고문헌으로 여기에 전 내용이 포함되어 있는 2011년 4월 21일에 출원한 미국 가출원 제61/477,955 호에 대한 우선권의 이익을 향유한다.
- [0002] 본 발명은 미국 국립 보건원(NIH)로부터 수여받은 연구지원금 EY13574, EB00415, DK35124, HL73856, DK86125, DK72517의 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 일정한 권리를 갖는다.
- [0003] 본 발명은 일반적으로 의학, 면역학, 신경학과 병리학 분야와 관련되어 있다. 좀 더 특정적으로는 시신경척수염(NMO)를 치료를 위해 이용되는 면역물질의 개발을 다룬다.

배경기술

- [0004] AQP-4(아쿠아포린-4)는 중추신경계에 존재하는 별아교세포(astrocyte)에서 발견되는 수분채널 단백질로(레논(Lennon) 등, 2005), 두너(맨리(Manley) 등, 2000; 파파도폴로스(Papadopoulos) 등, 2004)와 척수(사도운(Saadoun) 등, 2008)의 수분 조절, 감각 신호전달(리(Li)와 베크만(Verkman), 2001; 루(Lu) 등 2008)과 발작성 활동(빈더(Binder) 등, 2006)과 걸질확산성 억제(cortical spreading depression)(파드마와(Padmawar) 등, 2005)을 포함하는 신경흥분 현상(neuroexcitatory phenomena), 별아교세포 이동과 아교세포 흉터생성(glial scarring)(사도운(Saadoun) 등, 2005; 오거스티(Auguste) 등, 2007)에 관여한다. AQP4는 별아교세포에서 두가지 주된 아이소형(isoform)으로 발견된다: 1번 메티오닌(Met-1)에서부터 번역이 시작되는 긴형태(M1) 아이소형과 23번 메티오닌(Met-23)에서부터 번역이 시작되는 좀더 짧은 형태(M23)의 아이소형이 그것이다(하세가와(Hasegawa) 등, 1994; 정(Jung) 등, 1994; 양(Yang) 등, 1995; 루(Lu) 등, 1996). M23 AQP4는 입자직교배열(orthogonal arrays of particles)(OAPs)라고 불리는 규칙적인 정사각형의 배열로써 세포막에서 구성되며, 이것들은 프리즈-프랙춰 전자현미경(freeze-fracture electron microscopy)에 의하여 처음으로 관찰되었다(랜디스(Landis and Reese), 1974; 월버그(Wolburg), 1995).
- [0005] M23에 의한 OPA 형성은 세포질면 N-말단에 있는 23번 메티오닌의 바로 아랫쪽의 잔기를 포함하는 사합체-사합체 상호작용(tetramer-tetramer interaction)에 의하여 형성되는 반면, M1 AQP4의 23번 메티오닌의 바로 윗쪽의 잔기는 이 상호작용을 파괴하는 역할을 한다(크레인과 버크만(Crane and Verkman), 2009). M1은 그 자체로 OAP를 형성하지 못하지만, M23과 OAP의 크기를 한정하는 이질이합체를 함께 형성할 수 있다(닐리(Neely) 등, 1999; 퍼먼(Furman) 등, 2003; 크레인(Crane) 등, 2009; 타지마(Tajima) 등, 2010). AQP4에 의한 OAP 형성의 생물학적 유의성은 알려져 있지 않으나, 세포간 유착, AQP4 수분 투과성 향상, 별아교세포 말단에서의 AQP4 극성화 등을 포함하는 작용을 하는 것으로 추정된다.
- [0006] 신경염증성 탈수초질환(neuroinflammatory demyelinating disease)인 시신경척수염(NMO)을 정의하는 특징은

AQP4에 대한 혈청 자가항체(NMO-IgG)의 존재이다. NMO-IgG의 존재는 NMO에 특이적이며, 몇몇 보고에서 혈청 NO-IgG의 역가는 시신경척수염 활성화에 연관되는 것이 알려졌다(마티엘로(Matiello) 등, 2008; 야리우스(Jarius) 등, 2008). 설치류에서의 연구 결과는 NMO에서 NMO-IgG가 병원성임을 시사한다. 인간 NMO-IgG은 기존에 존재하는 실험적인 자가면역 뇌척수염을 가지거나(벤넷(Bennett) 등, 2009; 브래들(Bradl) 등, 2009) 완전한 프로인드보강제(complete Freund될 adjuvant)로 전처리한 쥐(키노시타(Kinoshita) 등, 2010)나 인간 보체와 함께 주사된 무경험의(naive) 쥐(사아도운(Saadoun) 등, 2010)에서 NMO 증상의 많은 특징을 만들어 낸다. 이들 동물들은 신경염증, 활성화된 보체의 혈관주위 침착, 탈수초화, 별아교세포 GFAP와 AQP4 면역활성의 상실과 같은 특징적인 NMO 병변을 발생시킨다. 현재, 기반하는 염증현상을 방지하는 기존의 치료법은 없으며 NMO의 증상에 대한 제한적인 치료법만이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 그러므로, 본 발명에 따르면, 대상에 항-아쿠아포린-4(AQP4) 항체 및 그 항원 결합 단편을 포함하는 시약을 대상에 투여하는 것을 포함하는 시신경 척수염(NMO) 스펙트럼 질환(neuromyelitis optica(NMO) spectrum disease)을 가진 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 이 시약은 온전한(intact) 항체의 효과기 기능이 결여된 시약이다. 대상은 인간일 수 있다. 투여법은 안구내, 동맥 내, 피하투여, 정맥 내 투여 또는 경막내 경로로의 투여를 포함할 수 있다. 상기 시약은 Fc 부위내 L234A/L235A 아미노산 치환, L234A/L235A/G237A 아미노산 치환, 및/또는 K322A 아미노산 치환을 포함한 IgG1 서열과 같은 효과기 기능이 결여된 돌연변이 Fc 부위로 구성할 수 있다. 상기 시약은 또한 보체 활성화와 같은 효과기 기능을 없애도록 Fc 부위를 치환한 IgG2 또는 IgG3 서열로 구성할 수 있다. 다른 방법으로는, 상기 시약은 IgG4 항체로 구성할 수 있다. 상기 시약은 화학적으로 변형된 Fc 부위로 구성할 수 있다. 시약은 또한 Fc 부위가 결여된 항체의 Fab 단편이나 항체가 아닌 단백질 분절(segment)과 융합시킨 항체 Fab 단편을 포함할 수 있다. 상기 시약은 또한 단일 사슬 항체나 F(ab')₂를 포함할 수 있다. 항체는 항원결합부위의 특정 잔기를 돌연변이 시킴으로써 AQP4 결합을 최적화시킬 수 있다.

[0008] 치료는 하나 이상의 망막신경절세포의 죽음, 시각신경 손상, 척수손상, 또는 축삭 횡단단을 감소를 포함할 수 있다. 치료는 하나 이상의 시각신경 탈수초화, 척수 탈수초화, 별아교세포의 죽음이나 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)의 죽음을 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 상기 시약은 만성적으로 사용하거나 매일 사용하는 것을 포함하여 한번 이상 투여할 수 있다. 시약은 NMO 이 발병하거나, NMO 발병 한 다음 1시간, 6시간, 12시간, 24시간이나 2일 내와 같이 NMO 발병 이후 투여할 수 있다. 투여 방법은 추가로 대상에게 NMO의 하나 또는 그 이상의 양상을 치료하는 제2 물질을 투여할 수 있다. 제2 물질은 시약과 동시에 투여하거나 또는 시약의 투여 전 또는 투여 후에 투여할 수 있다. 투여 방법은 환자에 대하여 혈청학적으로 NMO-IgG(AQP4) 양성여부를 평가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 대상은 혈청학적으로 NMO-IgG(AQP4) 양성을 나타낼 수 있다. 상기 대상은 하나 이상의 횡단성 척수염, 시신경염, 또는 그 밖의 관계가 없는 신경학적 이상(지연성 오심 또는 구토)을 나타낼 수 있다.

[0009] 또 다른 구체예는 대상에서 시신경척수염 스펙트럼 질환(neuromyelitis optica(NMO) spectrum disease)의 악화를 방지하거나 감소하기 위하여 장기적으로 치료하는 상기한 대상에 항-아쿠아포린-4(AQP4) 항체나 그로부터 기인한 항원결합 단편으로 구성하는 온전한 항체의 효과기 기능이 결여된 시약을 투여하는 것을 포함하는 방법과 시신경척수염 스펙트럼 질환의 진행을 방지하거나 방해하는 상기한 대상에 항-아쿠아포린-4(AQP4) 항체나 그로부터 기인한 항원 결합 단편으로 구성하는 본래 항체의 효과기 기능이 결여된 시약을 투여하는 것을 포함하는 방법을 포함한다.

[0010] 또 다른 구체예에서는 항-아쿠아포린-4(AQP-4) 항체나 그로부터 기인한 항원 결합 단편으로 구성된 시약을 제공하며, 상기한 시약은 본래 항체의 효과기 기능을 상실하였다. 시약은 Fc 부위내 L234A/L235A 아미노산 치환, L234A/L235A/G237A 아미노산 치환, 및/또는 K322A 아미노산 치환을 포함한 IgG1 서열 또는 돌연변이 IgG2나 IgG3 Fc 부위와 같은 효과기 기능이 결여된 돌연변이 Fc 부위로 구성할 수 있다. 시약은 화학적으로 변이시킨 Fc 부위를 포함할 수 있다. 시약은 항체 Fab 단편을 포함하고 Fc 부위를 제외하여 구성할 수 있다. 시약은 항체가 아닌 단백질 분절과 융합시킨 항체 Fab 단편을 포함할 수 있다. 시약은 단일체인 항체나 F(ab)₂를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술한 어떠한 방법이나 조성은 본 명세서에 기술한 다른 어떤 방법이나 조성에 실시할 수 있는 것이기도 하다.

[0011] 항체 또는 상기한 항체의 항원 결합 단편은 서열번호 6 또는 서열번호 6과 95%, 90%, 85%, 또는 80%의

동일성을 갖는 서열에 따른 경쇄 변이 부위 서열과 서열번호 8이나 서열번호 8과 95%, 90%, 85% 또는 80% 동일성을 갖는 서열에 따른 중쇄 서열, 또는 서열번호 10 또는 서열번호 10과 95%, 90%, 85%, 또는 80%의 동일성을 갖는 서열에 따른 경쇄 변이 부위 서열과 서열번호 12 또는 서열번호 12와 95%, 90%, 85%, 또는 80%의 동일성을 갖는 서열에 따른 중쇄 서열, 또는 서열번호 19 또는 서열번호 19와 95%, 90%, 85%, 또는 80%의 동일성을 갖는 서열에 따른 경쇄 변이 서열과 서열번호 17 또는 서열번호 17과 95%, 90%, 85%, 또는 80%의 동일성을 갖는 서열의 중쇄 변이 서열로 구성할 수 있다. 항체 항원 결합 단편은 서열번호 5나 서열번호 5와 85%, 80%, 75%, 또는 70%의 동일성을 갖는 서열에 따른 경쇄 변이 서열과 서열번호 7이나 서열번호 7과 85%, 80%, 75%, 또는 70%의 동일성을 갖는 서열에 따른 중쇄 서열로 암호화할 수 있다; 또는 서열번호 9 또는 서열번호 9와 85%, 80%, 75%, 또는 70%의 동일성을 갖는 서열에 따른 경쇄 변이 서열과 서열번호 11 또는 서열번호 11과 85%, 80%, 75%, 또는 70%의 동일성을 갖는 서열에 따른 중쇄 서열로 암호화할 수 있다; 또는 서열번호 20 또는 서열번호 20과 85%, 80%, 75%, 또는 70%의 동일성을 갖는 서열에 따른 경쇄 변이 서열과 서열번호 18 또는 서열번호 18과 85%, 80%, 75%, 또는 70%의 동일성을 갖는 서열에 따른 중쇄로 암호화할 수 있다. 항체 항원 결합 단편은 연구소 명칭 rAb-53, rAb09-3-33 또는 rAb-58을 갖는 항체의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0012] 본 청구항 및/또는 명세서에서 "하나(a)" 또는 "하나(an)"이라는 단어를 "포함하는(comprising)"이라는 문구와 함께 쓰일 경우 "하나"를 뜻할 수 있다. 그러나 "하나 또는 그 이상", "적어도 하나", 그리고 "하나 또는 하나 이상"의 뜻과 일치할 수 있다. 단어 "약(about)"은 언급한 숫자의 전후 5%를 의미한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명에서 명백하게 될 것이다. 그러나 상세한 설명과 본 발명의 특정한 실시예를 나타내는 특정한 예는 예시를 위해서 주어진 것임을 이해해야만 한다. 왜냐하면 본 발명의 정신과 범위 내에서 상세한 설명으로부터 다양한 변경과 변화가 일어날 수 있음이 동 분야에서 일하는 사람들에게 명백하기 때문이다.

[0014] 발명자들은 이전에 NMO 환자 혈청과 재조합 단일 클론 NMO-IgG가 각각 AQP4의 M23과 M1 이소형과 결합할 수 있다는 것을 보였으며(크레인(Crane) 등, 2009), 이것은 한 NMO 환자로부터 얻은 혈청의 AQP4가 M1에 결합하는 것을 탐지할 수 없었다는 이전의 연구(니치아(Nicchia) 등, 2009)와 모순된다. 단일 NMO 혈청 표본을 분석한 이전의 결과는 OAP가 NMO-IgG의 단일 목표라고 결론지었다(니치아(Nicchia) 등, 2009). 그러나 이러한 결론은 M1 AQP4를 이용한 혈청 항-AQP4 자가항체의 임상적 혈청 분석(윙거척(Wingerchuck) 등, 2006)과 발명자들(벤넷(Bennett) 등, 2009; 크레인(Crane) 등, 2009)과 다른이들(힌슨(Hinson) 등, 2007)이 M1 AQP4만을 발현하는 세포에서 일부 NMO 자가항체들의 강한 결합을 보고한 점 등에서 옳을 수 없다. 최근의 연구가 M23을 발현하는 세포들을 이용하여 임상적인 NMO-IgG 결합 분석을 향상시킬 수 있다는 것을 보여준 반면, NMO-IgG AQP4 특이성의 정량적 연구나 AQP4 이소형의 NMO-IgG 결합의 친화성을 측정하는 연구는 존재하지 않는다.

[0015] 발명자들은 AQP4에 결합하는 NMO 자가항체를 측정하기 위하여 정량 비율 영상을 이용하였는데, 여기서 형광 이차 항체에 의하여 나타나는 것처럼 NMO-IgG 결합을 AQP4 C-말단을 직접적으로 인식하는 항체를 이용하여 측정된 전체 AQP4 단백질로 표준화하였다. 본 연구를 위하여 발명자들은 진핵 형 질전환 후 형질막 패턴에서 AQP4를 발현하는 인간 별아교세포 유래 세포주를 식별하였다. AQP4 이소형과 OAP에 대한 NMO-IgG 결합 특이성을 독립적으로 평가하기 위하여 M1과 M23 AQP4를 다른 비율로 발현하거나, 또는 OAP를 파괴하는 N-말단의 단일 아미노산 치환을 포함하는 M23 돌연변이체를 발현하는 전략을 사용하였다. 측정은 NMO 환자로부터 얻은 혈청 표본과 재조합 기술로 NMO환자의 뇌척수액의 형질세포로부터 얻은 클론한 서열로부터 생산한 순화된 단일 클론 항체로 실시하였다. 단일 클론 NMO 항체를 이용한 연구는 처음으로 NMO-IgG의 AQP4에 대한 절대적인 결합 친화도의 측정을 가능하게 하였다. M23 AQP4의 OAP-결핍 돌연변이와 다양한 이종 사랑체-형성 AQP4 이소형 혼합물을 이용한 연구는 OAP에서 향상된 NMO-IgG의 AQP4에 대한 결합을 나타내었다. 전체 NMO-IgG와 순화된 Fab 단편을 비교하는 연구는 배열을 구성한(array-assembled) AQP4에 결합하는 향상된 NMO-IgG의 분자적인 기초를 제시하였다.

[0016] 추가하여, 발명자들은 "아쿠아포르룸(aquaporumab)"이라고 부르는 NMO-IgG의 AQP4에 결합하는 것을 선택적으로 차단하여 NMO-IgG-유도 세포 치사 및 병변 형성을 방지하는 비병원성 인간 재조합 항 AQP4 항체를 생성하였다. 아쿠아포르룸은 단단히 결합하는(tight-binding) 항-AQP4 Fab와 기능적으로 보체와 세포매개 세포독성을 결핍한 돌연변이 Fc로 이루어진다. AQP4 발현 세포 배양에서, 아쿠아포르룸은 인간 혈청에서 NMO-IgG의 결합을 차단하여 보체- 및 세포매개 세포독성의 거의 0으로 감소하였다. 아쿠아포르룸은 NMO의 생체의 척수 단편 모델과 NMO-IgG와 보체의 뇌내 주사에 의한 생체 내 마우스 모델에서 유사 NMO 병변의 발달을 방지하였다. 아쿠아포르룸 만으로는 병리를 야기하지 않는다. 아쿠아포르룸의 광범위한 억제 효능은 AQP4의 세포의 도메인과 비교하였을 때

대형인 물리적인 크기로 미루어 위치적인 경쟁 때문으로 보인다. 이러한 결과는 NMO에 대한 아쿠아포루맵 치료법의 가능성을 제시한다.

[0017] 본 발명의 이러한 측면과 그 밖의 측면은 이하에서 더 자세하게 설명한다.

[0018] **I. 시신경척수염(NMO)**

[0019] 데빅씨 병(Devic's disease) 또는 데빅증후군(Devic's syndrome)으로 알려진 시신경척수염(NMO)은 환자의 자체 면역시스템이 시신경과 척수를 공격하는 자가면역성, 염증성 이상이다. 이것이 시신경(시신경염)과 척수(척수염)에 염증을 유발한다. 염증이 두뇌에도 영향을 미칠 수 있음에도 불구하고, 병변은 관련된 병중인 다발성경화증(MS)에서 관찰할 수 있는 것과는 차이가 있다. 척수 병변은 다리나 팔에서 다양한 정도의 쇠약 또는 마비, (시각을 포함한) 감각의 상실, 및/또는 방광과 배변 장애를 야기한다.

[0020] NMO는 MS와 여러면에서 유사한 드문 이상이지만, 최상의 결과를 위해서는 MS와 다른 방향의 치료를 요구한다. 또한 NMO는 급성파종뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis)의 변종으로 여겨져 왔다. 최소한 몇몇 NMO 환자에서 자가면역공격의 목표를 파악하였다 - 아쿠아포린4(aquaporin 4) 또는 AQP4로 알려진 신경계 세포의 단백질이다.

[0021] NMO의 주증상은 시력과 척수 기능의 상실이다. 시신경염의 다른 병인들과 마찬가지로, 시각적인 장애는 시야결손 또는 색깔의 상실이 공식적인 시력의 상실과 별개 또는 선행해서 발생할 수 있음에도 불구하고 일반적으로 시력의 저하가 주증상으로 나타난다. 척수 기능 장애는 근육약화, 감각저하, 또는 방광이나 배변조절의 상실로 이어질 수 있다. 전형적인 환자는 종종 방광 조절의 상실과 함께하는 감각각적인 신호와 함께하는 다리(하반신마비(paraparesis)) 또는 사지(사지부전마비(tetraparesis))의 중증급성경직(an acute and severe spastic weakness of the legs or all four limbs with sensory signs)을 보인다.

[0022] NMO는 신경세포를 둘러싸는 수초(myelin)의 면역매개 파괴가 발생한다는 점에서 MS와 유사하다. 일반적인 MS와는 달리, 공격이 수초를 생성하는 세포들(희소돌기아교세포(oligodendrocyte))을 목표로 하거나 면역체계의 T세포가 주로 매개하지 않고 NMO-IgG 또는 NMO 항체라고 지칭하는 항체들에 의하여 매개한다. 이들 항체는 별아교세포(astrocyte)의 세포막에 존재하는 세포막을 통해 수분의 운송을 위한 채널로 작용하는 AQP4를 목표로 한다. AQP4는 혈관 내의 물질이 두뇌로 넘어가는 것을 방지하는 체계인 혈액뇌장벽(blood-brain barrier)을 둘러싸는 별아교세포의 돌기에서 찾을 수 있다. 혈액뇌장벽은 NMO에서 약화되는데, 현재 NMO-IgG 면역반응이 희소돌기아교세포의 죽음과 탈수초화를 유도하는 과정은 알려지지 않았다.

[0023] NMO의 병인에 대한 대부분의 연구는 척수에 집중해 왔다. 척수에서 일어나는 손상은 염증성 탈수초화에서부터 백색질과 회색질의 괴사성 손상에까지 이른다. NMO에서 염증성 병변은 제2형 병변(보체매개성 탈수초화)으로 분류하였으나, 현저한 혈관주위 분포에서 MS의 제2 패턴 병변과는 차이가 있다. 그러므로, 염증의 패턴은 종종 MS에서 보이는 것과는 상당한 차이를 보인다.

[0024] 메이요 클리닉(Mayo Clinic)은 2006년 NMO의 진단을 위한 기준의 개정된 세트를 제안하였다. 진단을 위한 새로운 가이드라인은 다음과 같은 두 개의 절대적인 기준에 더하여 세가지 중에서 최소한 두가지의 보조적인 기준(supportive criteria)을 필요로 한다.

[0025] 1. 절대적 기준:

[0026] 시신경염

[0027] 급성 척수염

[0028] 2. 보조적인 기준:

[0029] 질병 발병시 MS 기준을 충족하지 않는 두뇌 MRI

[0030] 척수에서 비교적 대형의 병변을 나타내는 3 또는 그 이상의 척추분절(vertebral segments)에 걸쳐진 근접한 T2-강조 신호 이상(contiguous T-2 weighted signal abnormality)을 갖는 척수 MRI

[0031] NMO-IgG 혈청양성 상태. NMO-IgG 시험은 아쿠아포린 4 항원에 대한 항체의 존재를 검사한다.

- [0032] NMO-IgG 시험의 개발 후에, NMO를 구성하는 이상의 범위가 확장되었다. NMO 범위는 이제 다음의 상태로 구성하는 것으로 간주한다.
- [0033] - 상기한 진단 기준에 따른 표준 NMO
- [0034] - 종방향으로 확장한 척수염(longitudinally extensive myelitis), 양측 동시 또는 재발성 시신경염(bilateral simultaneous or recurrent optic neuritis) 과 같은 제한된 형태의 NMO
- [0035] - 아시아인 시신경-척수형 다발성 경화증(optic-spinal MS). 이러한 변형은 MS와 같은 CNS 포함을 나타낼 수 있다.
- [0036] - 전신자가면역질환(systemic auto-immune disease)과 연관한 종방향으로 확장한 척수염이나 시신경염
- [0037] - 시신경염 또는 시상하부, 뇌실옆핵(periventricular nucleus), 뇌간과 같은 특정 두뇌 영역과 연관한 척수염
- [0038] NMO가 별개의 질환인지 아니면 다발성 경화증의 넓은 범위의 일부인지에 대해서는 논란이 진행 중이다. 일반적으로, NMO는 현재 별개의 신경-염증성 이상으로 간주한다. NMO는 일반적으로 MS에서 보다 - MS는 드물게 횡단척수염이 나타난다 - 급성발병(acute episode) 후 더 심각한 후유증을 겪는다는 점과 데빅씨 병에서는 CSF에서 올리고클론 띠(oligoclonal band)이 두뇌 MRI에서의 백색질 병변과 마찬가지로 흔하지 않지만, MS 환자에서는 90% 이상 발병한다는 점에서 차이를 보인다. 최근, 항바이러스 면역반응이 다발성 경화증과 시신경척수염을 구분한다는 사실을 발견하였다.
- [0039] NMO는 몇몇 동시이환 상태(comorbid condition)의 NMO 환자들의 증례에 기반하여 많은 전신 질환과 연관지어 왔다. 이러한 상태는 다음을 포함한다: 교원혈관병(collagen vascular disease), 자가항체 증후군, 수두대상포진 바이러스(varicella-zoster virus), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), HIV의 감염, 및 클리오퀴놀(clioquinol)과 항결핵제에의 노출.
- [0040] 현재 NMO의 치료제는 없으며, 대증 요법이 존재한다. 일부 환자들은 회복하지만, 많은 수가 시력과 사지에 장애가 남게 되며, 일부는 심할 수도 있다. 발작시에는 정맥 내에 고용량의 메틸프레드니솔론(methylprednisolone) IV와 같은 코티코스테로이드(corticosteroid)를 단기간 처방하여 치료한다. 발작이 진행될 때 또는 코티코스테로이드 치료법에 반응이 없을 시에는, 혈장분리교환술(plasmapheresis)를 유효한 치료방법으로 사용할 수 있다. 이러한 치료법에 대한 임상시험은 아주 적은 숫자의 피험자를 사용하며, 대부분 통제가 되지 않는다.
- [0041] 발작이 예방을 위한 치료법의 효능을 확인하기 위한 통제되지 않은 시험은 확립하지 않았다. 많은 임상가들은 발작의 빈도와 중증도를 감소시키기 위하여 장기간의 면역억제(immunosuppression)가 필요하다는 데 동의하는 반면, 한편에서는 정확하게 반대의견을 표시하기도 한다. 일반적으로 사용하는 면역억제제 치료법은 아자티오프린(azathioprine)(이무란(Imuran))과 프레드니손(prednisone), 마이코페놀레이트(mycophenolate) 모페틸(mofetil)과 프레드니손, 리투시맙(Rituximab), 마이토잔트론(Mitoxantrone) 정맥주사용 면역글로불린(IVIG), 그리고 시클로포스파마이드(cyclophosphamide)를 포함한다. 2007년 NMO가 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate)와 저용량의 코티코스테로이드에 반응한다는 보고가 있었다. 일반적으로 몇주 이내에 어느 정도의 개선을 보이지만, 잔여 신호(residual sign)과 장애는 계속 될 수 있으며 때로는 심각할 수도 있다.
- [0042] 질병은 한번 발병하고 영구적으로 완화하는 단상일 수 있다. 그러나 적어도 85%의 환자가 반복되는 횡단척수염 및/또는 시신경염 발작을 보이는 재발형 질병을 갖는다. 단상성 환자에게서 횡단척수염과 시신경염은 동시에 발생하거나 며칠간의 간격으로 발병한다. 반면, 재발형의 환자는 초기 발작후 몇주 또는 몇달간의 간격을 보이며 발병을 하며, 초기 횡단척수염 이후 더 나은 운동기능 회복을 보인다. 재발은 약 55%의 환자에서 1년 내에 재발하고 90%에서 첫 5년 내에 재발하는 등 일반적으로 초기에 재발한다. 다발성 경화증과 달리 NMO는 발작간에 진정기 없이 신경학적인 퇴행이 증가하는 2차 진행기가 거의 없다. 대신에 장애는 급성 발작으로 인해 일어난다.
- [0043] 단상형 NMO환자의 약 20%는 영구적인 시력손실을 입고, 30%는 하나 또는 그 이상의 다리에 영구적인 마비손상을 입는다. 재발형 NMO를 갖는 환자들 중에서 50%는 5년 이내에 마비나 실명을 겪게 된다. 일부 환자들(한 연구에서는 33%)은 목 척수의 횡단척수염으로 인해 호흡곤란을 겪고 그 결과 사망하게 된다. 그러나 NMO의 범위가 진단 기준의 향상으로 인하여 확대되고, 치료방법의 향상으로 인한 결과, 연구자들은 이러한 예측이 감소할 것으로 믿는다.
- [0044] NMO의 유병률과 발병률은 아직 밝혀지지 않았는데, 부분적인 이유는 본 질병이 저평가되고 때로 MS와 혼동하기

때문이다. NMO는 남성보다 여성에게서 더 흔하게 발병하여, 환자들의 2/3 이상을 여성이 차지하며, 이들중 80% 이상이 재발형의 질병이다. 영국 왈튼 센터(Walton Centre)에 따르면, "NMO는 온대기후지역 및 백인에게서 더 발병율이 높은 MS와는 달리 전세계에 걸쳐 존재하는 것 같다. 본 질병의 정확한 발병율이 알려지지 않아 특정한 결론을 짓기는 어렵지만 아프리카 인들과 아시아인, 그중에서도 특히 극동지역 아시아인들은 NMO의 위험도가 더 높을 수 있다." NMO를 보유한 많은 사람들이 초기에 MS로 잘못 진단됨에도 불구하고, 35%의 아프리카계 미국인들이 종종 실제로는 NMO임에도 불구하고 MS로 잘못 진단되곤 한다. NMO는 백인(Caucasian)보다는 아시아계 인종에 더 흔하다. 아시아 시신경-척수(Asian optic-spinal) MS(일본에서 30%의 MS 병례를 차지한다)는 NMO와 동일하다고 제안되었다(일본인 환자들 중에서 고전적인 MS와 시신경-척수 MS의 차이로 인하여). 열대 및 아열대 지역의 토착 인구에서 MS는 드물지만 발병할 시에는 시신경-척수 MS의 형태로 발병한다. 대부분의 NMO 환자는 인척관계에 영향을 받지 않는다는 점에서 일반적으로 비가족적 질병으로 간주한다.

[0045] II. 단일 클론 항체의 생산

[0046] A. 일반적인 방법

[0047] AQP4에 결합하는 단일 클론 항체는 여러가지 응용법에서 유용성을 가짐을 이해하여야 한다. 이러한 응용법은 NMO를 치료하는 것 뿐만 아니라, NMO를 감지하고 진단하는데 사용하는 진단 키트의 생산을 포함한다. 이러한 맥락에서 이러한 항체를 진단 또는 치료물질과 연결하거나, 이들을 경쟁적인 분석법에서 포획물질이나 경쟁물질로 사용하거나, 또는 추가적인 부착물질 없이 개별적으로 사용할 수 있다. 항체들은 이하에서 논하는 것처럼 돌연변이 시키거나 변형시켜서 사용할 수 있다. 항체를 준비하고 특성을 묘사하는 것은 본 기술이 속한 분야에서 잘 알려져 있다(항체: 실험실 메뉴얼, 콜드스프링하버 연구소(Cold Spring Harbor Laboratory), 1988; 미국 특허 제4,196,265호 참조).

[0048] 단일 클론 항체(mAbs)를 생성하는 방법은 일반적으로 다클론항체(polyclonal antibodies)를 준비하는 것과 동일한 선상에 있다. 양 기술의 첫번째 단계는 적절한 숙주의 면역화(immunization) 또는 이전의 자연적인 감염으로 인해 면역을 갖는 피험체의 확인이다. 본 기술이 속한 분야에서 잘 알려진 것처럼, 면역화를 위한 구성성분은 각각의 면역원성에 따라 다양하다. 따라서 종종 숙주 면역체계를 증진시키는 것이 필요한데, 이는 펩타이드 또는 폴리펩타이드 면역원을 운반체와 결합시켜서 달성할 수 있다. 전형적이고 바람직한 운반체는 열쇠구멍갯조개 해모시아닌(keyhole limpet hemocyanin)(KHL)과 소혈청알부민(bovine serum albumin)(BSA)이다. 난알부민, 마우스혈청알부민 또는 토끼혈청알부민과 같은 다른 알부민들도 또한 운반체로 사용할 수 있다. 폴리펩타이드를 운반체 단백질에 결합하는 방법은 본 기술이 속한 분야에서 잘 알려져 있으며, 이는 글루타르알데히드, 엠-말레이미도벤코일-엔-하이드록시숙시니미드 에스터(m-maleinidobencoyl-N-hydroxysuccinimide), 카보디미드(carbodiimide), 및 비스-비아조티크드 벤지딘(bis-biazotized benzidine)을 포함한다. 또한 본 기술이 속한 분야에서 잘 알려진 것처럼 특정 면역원 구성의 면역원성은 항원보강제로 알려진 면역반응의 비특이적 자극기의 사용으로 향상시킬 수 있다. 전형적이고 선호되는 항원보강제는 완전 프루인드 보강제(죽은 마이코박테리움 투버클로시스(*Mycobacterium tuberculosis*))를 포함하는 면역반응의 비특이적 자극기), 불완전 프루인드 보강제, 및 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide) 항원보강제를 포함한다.

[0049] 다클론 항체를 생산하는 데 사용하는 면역원 조성의 양은 면역화에 사용하는 동물의 종류 뿐만 아니라 면역원의 특성에 따라 다양하다. 면역원을 투여하는 데에는 다양한 경로를 사용할 수 있다(피하, 근육내, 피부내, 정맥내, 및 복강내 투여). 다클론항체의 생산은 면역화 이후 다양한 시점에서 면역한 동물의 혈액을 채취하여 관리할 수 있다. 두번째 또는 추가접종 또한 실시할 수 있다. 추가주사와 역가측정 과정을 적당한 역가를 달성할 때까지 반복한다. 원하는 수준의 면역원성을 획득하면, 면역한 동물의 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 저장하고/저장하거나 동물을 MAbs를 생성하는데 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명의 재조합 항체는 영향을 받은 개체의 CSF로부터 분리한 단일 형질모세포 또는 b 세포를 이용하여 생산한다. 비록 형질모세포가 다소 적기는 하지만 혈액을 사용할 수도 있다. 항체의 중쇄와 경쇄 염기 서열을 RT-PCR로 판명한다. 판명한 중쇄와 경쇄의 쌍을 기본적인 클로닝 기술을 이용하여 재설계하여 발현 벡터에 삽입하고 포유류 세포주에 진행 형질 전환시켜서 항체를 생산한다.

[0051] 상기한 방법 중 하나로 생산한 Mab는 이후 필요한 경우 여과, 원심분리와 FLPC 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 다양한 크로마토그래피 방법을 이용하여 순화할 수 있다. 본 발명의 단일 클론 항체의 단편은 펩신(pepsin) 또는 파파인(papain)과 같은 효소로 절단하기 및/또는 화학적 환원을 이용하여 이황화 결합을 분리하

는 것을 포함하는 방법을 이용하여 순화한 단일 클론 항체로부터 얻을 수 있다. 다른 방법으로, 단일 클론 항체의 단편은 자동화 펩타이드 합성 장치를 이용하여 본 발명을 생산함으로써 합성할 수 있다.

[0052] 분자 클로닝적인 접근법을 사용하여 단일 클론 항체를 생성하는 것을 고려할 수 있다. 이를 위해서는, RNA를 하이브리도마 세포주로부터 분리하여 RT-PCR에 의하여 항체 유전자를 획득한 후 면역글로불린 발현 벡터에 클론한다. 다른 방법으로는, 면역글로불린 조합의 파지미드(phagemid) 라이브러리를 세포주로부터 분리한 RNA로부터 준비한 다음 바이러스 항원을 이용한 패닝법으로 원하는 항체를 발현하는 파지미드를 선택한다. 기존의 하이브리도마 기법과 비교하여 이러한 접근법의 장점은 한번의 시도로 약 10^4 배나 되는 많은 항체들을 생산하고 스크린할 수 있다는 점과 H 체인과 L 체인의 조합에 의하여 적절한 항체를 발견할 수 있는 기회를 증가시킬 수 있는 새로운 특이성을 생성할 수 있다는 점이다.

[0053] 여기에 참고 문헌으로 포함한 본 발명에서 항체의 생산법을 알려주는 다른 미국 특허들은 조합적인 접근법을 이용하여 키메라 항체를 생산하는 법을 설명하는 미국 특허 제5,565,332호; 재조합 면역글로불린 준비방법을 설명하는 미국 특허 제 4,816,567호; 항체요법용 항원보강제를 설명하는 미국 특허 제4,867,973호를 포함한다.

[0054] **B. 본 발명의 항체들**

[0055] 본 발명에 따라 항체들을 우선 결합 특이성에 따라 정의할 수 있는데, 이 경우 AQP4에 대한 결합 특이성에 따라 정의할 수 있다. 주어진 항체의 결합 특이성/결합 친화도를 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 기법을 이용하여 평가함으로써 당업자라면 이러한 항체가 본 발명의 청구 범위에 속하는지를 결정할 수 있다.

[0056] 일 양상은, AQP4에 결합하는 단일 클론 항체를 제공한다. Fc와 연관한 효과기(effector)를 제거한 특정 형식의 항체이다. 실제로, AQP4에 대한 항체는 질병을 유발하므로, 안전할 뿐만 아니라 방어성을 나타내기 위해서는 이러한 AQP4 항체는 반드시 변형시켜야 한다. 이러한 항체는 보체 활성화와 면역세포 동원에 비효과적으로 만들기 위하여 그러한 기능을 보이는 항체(IgG1 또는 IgG2 또는 IgG3)의 Fc 부위를 돌연변이 시킴으로써, 또는 자연적으로 이러한 기능이 결여된 항체(IgG4)를 이용함으로써, 또는 이러한 항체들 중의 한 가지를 화학적으로 변형시킴으로써 생산할 수 있다.

[0057] 다른 양상은, 항체는 그들이 결합하는 구조의 부위의 특성에 의하여 정의할 수 있다. 예를 들어, AQP4의 세포외 표면과 직각배열(orthogonal array)는 항체 결합의 독특한 플랫폼을 제공한다.

[0058] 또 다른 양상은, 항체는 그들의 결합 특이성을 결정짓는 가변부위 염기 서열에 의하여 정의할 수 있다. 이하에 예를 나타낸다:

[0059] **rAb53 중쇄 염기 서열(가변 부위) 핵산염기 서열(서열번호 7):**

[0060] CAGGTGCAGTGCAGGAGTCGGGCGCAGGACTGGTAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTGGTCACTACTGG
AACTGGATCCGGCAGCCCCAGGAAGGACTGGAGTGGATTGGGTACATCCATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACC
ATATCAGTGGACAGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCAGAGGGGAGAGGA
TGGAGTGTCTTCTACTACTACTACATGGAAGTCTGGGGCAAAGGGTCCACGGTCTCCGTCTCCTCA

[0061] **rAb53 중쇄 서열(변이 부위) 단백질(서열번호 8):**

[0062] QVQLQESGAGLVKPSSETLSLTCTVSGGSI SGHYWNWIRQPPGKLEWIGYIHYSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARAEGRG
WSAFYYYYMEVWVGKSTVSVSS

[0063] **rAb53 경쇄 서열(변이 부위 + IgG 불변부) 핵산(서열번호 5):**

[0064] GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTGTTGCACTCACTACTTA
GCCTGGTTCAGCAGAACTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTTTGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGGACGTTCCGGCAAGGG
ACCAAGGTGGAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTG

CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0065] **rAb53 경쇄 서열(변이 부위 + IgK 불변 부위) 단백질(서열번호 6):**

[0066] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVRTNYLAWFQQKPGQAPRLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQYSSPWTFGGQ
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSS
PVTKSFNRGEC

[0067] 다음의 "돌연변이"로 설명한 염기 서열들은 Fc 돌연변이 구조를 생산하는데 사용한 실제 서열이다. rAb-53은 원래 IgG2 분자로, 5' IgG2 Fc 부위의 일부를 유지하는 돌연변이 IgG1 Fc 부위를 만들기 위하여 클로닝 단계를 사용하였다. 아미노산 수준에서, 서열은 처음 35 아미노산에서 4개의 아미노산이 IgG1과 차이를 보인다. IgG1 서열의 끝에서 발명자들은 FLAG 표지(LEDYKDDDDK; 서열번호 16)를 추가하였다. 그러므로 서열은 기술적으로 인간 IgG1이 아니다; 이는 14/340 잔기 또는 4%의 차이를 보인다. 최종 산물은 돌연변이 인간 IgG1이다.

[0068] **돌연변이 인간 IgG1 Fc K322 돌연변이 핵산(서열번호 3):**

[0069] GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACGGTGTGCGTGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATC
TCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
GCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGG
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAACTCGAGGACTACAAGGACGATGACGATAAG
TGA

[0070] **돌연변이 인간 IgG Fc K322 돌연변이 단백질(서열번호 4):**

[0071] ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKC
AVSNKALPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
SCSMHEALHNYHTQKLSLSPGKLEDYKDDDDK*

[0072] **돌연변이 인간 IgG1 Fc L234A/L235A 돌연변이 핵산(서열번호 1):**

[0073] GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACGGTGTGCGTGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATC
TCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGG
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAACTCGAGGACTACAAGGACGATGACGATAAG

TGA

[0074] **돌연변이 인간 IgG1 Fc L234A/L235A 돌연변이 단백질(서열번호 2):**

[0075] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
SCSMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKLEDYKDDDDK*

[0076] **rAb58 중쇄 서열(변이 부위) 핵산(서열번호 11):**

[0077] GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGTGGCTTGGTTCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGAGGTTATGCCATGAAC
TGGGTCCGCCAGGCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTGCAAGTATCAGTGGCAGTGGTAGTATCACACAGTACGCAGACTCCGCGAAGGGCCGCTTACC
ATCACCAGAGACAACCTCCAAGAGCACGCTCTATGCGCATGTGAGTAGCTGAGAGCCGATGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGGGACTACGTCTTT
GACTACTGGGACAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0078] **rAb58 중쇄 서열(변이 부위) 단백질(서열번호 12):**

[0079] VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRGYAMNWRQAPGKLEWVASISGSGSITQYADSAKGRFTITRDNSKSTLYAHVSSLRADDTAIVYYCAKGDYVF
DYWGQGLVTVSS

[0080] **rAb58 경쇄 서열(변이 부위 + IgK 불변 부위) 핵산(서열번호 9):**

[0081] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCGCCCTGCTGCATCTGTAGGAGACACAGTACCATCCTTCCCGGCCAGTCAGAGTATTAGGAGCTGGTTGGCC
TGGTATCAGCAGAAAACAGGAAAGCCCTAAACTCCTGATCTATAAGCGTCTGATTTACAAAGTGGGGTCCCATCAAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGG
ACAGACTTACTCTCACCATCAGCGGCTGCAGCCTGATGATTTGCAACTTATTACTGCCAACACTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGCCAGGGGACC
AAGGTGGAGATCAGACGAACTGTGGCTGCACCATCTGCTCTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGCTGCTG
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGTTCCGCC
GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0082] **rAb58 경쇄 서열(변이 부위 + IgK 불변 부위) 단백질(서열번호 10):**

[0083] DIQMTQSPSALSASVGDIVTITCRASQSI RSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASDLQSGVPSRFSGSGSDFTLTITISGLQPDFFATYYCQHYNSYPYTFGQGT
KVEIRRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAVQWVQVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
YTKSFNRGEC

[0084] **돌연변이 인간 IgG Fc L234A/L235A/G237A 돌연변이 핵산(서열번호 14):**

[0085] GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
GAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCGGGTGCTTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT
TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCACGACCTGAAGCCGCGGGGCAACCGTCACTTCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTCATATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
AAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCTTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGG
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCTGCTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACACTACACGAGAAGAGCCTTCCCTGTCTCCGGTAAACTCGAGGACTACAAGGACGATGACGATAAG

TGA

[0086] 돌연변이 인간 IgG Fc L234A/L235A/G237A 돌연변이 단백질(서열번호 15):

[0087] ASTKGPSVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHICTPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
KVSNAKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKLEDYKDDDDK*

[0088] rAb09-3-33 중쇄 서열(변이 부위) 단백질(서열번호 17):

[0089] VTTGVHSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCTASGFNDDYDIHWVRQAPGKGLQWVA ILQPEESHQDY INSVRGRFSVSRDSSRDTIDLQMHSLRPEDTAIYY
CTRSPGLMTLRGMVTRRHFFHYFTMDVWVGKGTIVIVSS

[0090] rAb09-3-33 중쇄 서열(변이 부위) 핵산(서열번호 18):

[0091] GTAAC TACAGGTGTCCACTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGGGTCCTAAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGTTTC
AACTTAGATGACTATGACATTCAGTGGTCCGCCAGGCGCCGCAAGGGGTCAGTGGGTGGCAATTTGCAGCCTGAAGAAAGTCATCAAGACTATATA
AATTCCTGAGGGGCGATTCTCCGTCTCCAGAGACAGTTCGAGGGACACAATAGATCTGCAATGCACAGTCTTAGACTGAAGACACGGCTATATATTAC
TGTACGCGATCTCCGGGCTCATGACTACGCTGCGGGGAATGGTGACCAGGAGGCACTTCTACTTACCATGGACGCTCTGGGGCAAAGGACCACGGTC
ATCGTCTCCTCA

[0092] rAb09-3-33 경쇄 서열(변이 부위 + IgK 불변 부위) 단백질(서열번호 19):

[0093] VLGLLLWLTDARCDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLRHTITGYNYINWYLQKPGQSPQLLIFLASSRATGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAED
VGIYYCMQALHTPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKLYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

[0094] rAb09-3-33 경쇄 서열(변이 부위 + IgK 불변 부위) 핵산(서열번호 20):

[0095] GTCCTGGGGTGTGCTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGATATTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCT
ATCTCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCGCCACCCATCACTGGATACTATATCAATTTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAACCTCTGATC
TTTTTGGCCTCTTCTCGGCCACCGGGTCCCTGACAGGTTAGTGGCAGTGGAGCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGAT
GTTGGAATTTACTGATGCAAGCTCTACACTCCGCCACTTTTGGCCAGGGACAACTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGCTGTAATACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTTG
GATAACGCCCTCCAACTCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA
GACTACGAGAAACAAACTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAA

[0096] 게다가, 항체 서열은 상기한 서열로부터 아래에 더 자세히 논의한 방법을 선택적으로 사용하여 변화가 있을 수 있다. 예를 들어, 핵산 서열이 상기한 세트로부터 다음과 같은 변화가 있을 수 있다. (a) 변이 부위가 경쇄의 불변 부위로부터 분리되어 있을 수 있다. (b) 핵산 서열이 그에 의해 암호화되어 있는 잔기에 영향을 미치지 않으면서 상기한 서열로부터 변화가 있을 수 있다. (c) 핵산 서열이 상기한 서열로부터 주어진 백분율 즉 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 유사성을 가지면서 변화가 있을 수 있다. (d) 핵산은 65궤, 50% 포름아마이드(formamide), 0.1X SSC, 0.1% SDS와 같은 높은 스트린전시(stringency) 상황에서 혼성화(hybridize)하는 능력을 위하여 상기한 세트에서 변화가 있을 수 있다. (e) 단백질 서열이 상기한 서열로부터 주어진 백분율 즉 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 유사성을 가지면서 변화가 있을 수 있다. 또는 (f) 아미노산이 보존성 치환을 유지하면서 상기한 서열로부터 변화가 있을 수 있다(아래에서 논의).

[0097] C. 항체 서열의 공학

[0098] 다양한 실시예에서, 발현의 향상, 교차 반응성의 향상, 목표의 결합력의 저하 또는 보체의 활성화나 면역세포(즉, T 세포, 단핵구, 또는 NK 세포)의 모집과 같은 하나 또는 그 이상의 자연적인 효과기 기능의 억제 등과 같은 다양한 원인으로 식별한 항체의 서열을 공학적으로 변형하는 것을 선택할 수 있다. 이하는 항체 공학을 위한 연관된 기술의 일반적인 논의이다.

[0099] 하이브리도마는 배양을 한 다음 세포를 파괴하고 전체 RNA를 추출할 수 있다. RNA의 cDNA 카피를 RT로 생성하기 위해 임의의 육합체(hexamer)를 사용할 수 있고, 이후 모든 인간 유래 변이 유전자 서열을 증폭하는 것으로 기대되는 PCR 프라이머(primer)의 다중 혼합물을 사용하여 PCR을 수행한다. PCR 산물은 pGEM-T Easy 벡터에 클론한 다음 표준 벡터 프라이머를 이용하여 자동화한 DNA 염기 서열 확인법에 의하여 염기 서열을 확인한다. 하이브리도마 상층액으로부터 수집한 항체들을 이용하여 결합 및 증화 분석을 수행할 수 있고, 단백질 G 컬럼을 이용한 FPLC에 의하여 순화할 수 있다.

[0100] 재조합의 전체길이 IgG 항체는 클로닝 벡터로부터 중쇄와 경쇄 Fv DNA를 론자(Lonza) pConIgG1이나 pConK2 플라스미드 벡터에 서브클로닝(subcloning) 하여 293 프리스타일 세포(Freestyle cell) 또는 론자 CHO 세포(Lonza CHO cell)에 진핵형질전환함으로써 생성할 수 있고, 항체는 CHO 세포 상층액으로부터 수집하고 순화한다. 다른 방법은 벤넷(Bennett) 등이 설명하였다(2009).

[0101] 최종 cGMP 생산 과정과 동일한 숙주세포와 세포 배양 과정에서 생산하는 항체의 빠른 가용성은 개발 프로그램의 기간을 감소할 수 있는 가능성을 보여준다. 론자(Lonza)는 CDACF 배지에서 배양한 수집한 진핵 형질 전환물(pooled transfectants)을 이용하여 CHO 세포에서 소량(50g 까지)의 항체를 급속하게 생산하는 일반적인 방법을 개발하였다. 진정한 일시적인 시스템(true transient system)보다 약간 느리기는 하지만, 더 높은 산물 농도와 생산 세포주와 동일한 숙주와 과정을 사용한다는 장점을 갖는다. 일회용 바이오리액터(bioreactor)를 이용하여 모델 항체를 발현하는 GS-CHO 풀(pool)의 성장과 생산성의 예: 유가식 배양(fed-batch) 형식의 일회용 백 바이오리액터 배양(실제 작업 용량 5L)에서 9주의 진핵형질전환을 통하여 2g/L의 수확 항체 농도(harvest antibody concentration)를 달성하였다.

[0102] pCon Vector™는 전항체(whole antibody)를 재발현하는 쉬운 방법이다. 불변 부위 벡터는 pEE 벡터에 클론한 다양한 면역글로불린 불변 부위 벡터를 제공하는 벡터의 조합이다. 이들 벡터들은 인간 유래 불변 부위와 GS System™과 함께 전체 길이 항체의 쉬운 생성을 제공한다.

[0103] 항체 분자는 예를 들어 mAb의 단백질분해에 의한 절단, 또는 예를 들어 재조합적인 방법에 의해 생산할 수 있는 단일체인 면역글로불린에 의하여 만들 수 있는 단편(F(ab)'), F(ab')₂와 같은)으로 이루어진다. 이러한 항체 유도체들은 1가성(monovalent)이다. 일 실시예에서, 이러한 단편들은 다른 것들과 결합하거나, 다른 항체 단편이나 수용체 리간드와 결합하여 "키메라(chimeric)" 결합분자를 형성할 수 있다. 명백하게, 이러한 키메라 분자들은 동일 분자의 다른 에피토프(epitope)와 결합할 수 있는 치환체를 포함할 수 있다.

[0104] 인간 치료에 사용할 때 발생할 수 있는 어떠한 면역반응을 약화시키기 위해서는 "인간화한" 항체를 비인간 숙주에서 생산하는 것이 바람직할 수도 있다. 이러한 인간화한 항체는 생체 외 또는 생체 내 상황에서 연구할 수 있다. 인간화한 항체는 일례로 항체의 면역원성 부위를 대응하는 비면역원성 부분으로 대체하여(즉, 키메라 항체) 생산할 수 있다. PCT 출원 PCT/US86/02269; EP 출원 86/01533; EP 출원 171,496; EP 출원 173,494; PCT 출원 WO 86/1533; EP 출원 125,023; 선(Sun) 등(1987); 우드(Wood) emd(1985); 그리고 쇼(Shaw) 등(1988); 이들 참고문헌들은 본 특허 출원에 참고 문헌으로 삽입되어 있다. "인간화한" 키메라 항체에 대한 일반적인 리뷰가 모리슨(Morrison)(1985)에 의해 제공되었다; 또한 여기에 참고문헌으로 통합되어 있다. "인간화한" 항체는 다른 방법으로 CDR이나 CEA 치환에 의하여 생산할 수 있다. 존스(Jones) 등(1986); 버호옴(Verhoeyen) 등(1988); 베이들러(Beidler) 등(1988); 이들 모두 본 특허 출원에 참고 문헌으로 삽입되어 있다.

[0105] 연관된 실시예에서, 항체는 공개 항체의 유도체, 즉 공개 항체(즉 키메라, 인간화 또는 CDR-이식한 항체)의 CDR과 동일한 CDR 서열로 구성하는 항체들이다. 추가적인 실시예에서 항체는 완전한 인간 재조합 항체이다.

[0106] 또한, 항체 분자에 보존적인 변화(conservative change)를 도입하는 것과 같은 수정을 가하고자 할 수 있다. 이러한 변화를 가하는 것으로 아미노산의 수치료적 지표(hydropathic index)를 고려할 수 있다. 단백질에 상호적

인 생물학적 기능을 부여하는데에 수치료적 아미노산 지표(hydropathic amino acid index)의 중요성은 본 발명이 속해있는 분야에서 일반적으로 알려져 있다(카이트와 돌리틀(Kyte and Doolittle), 1982). 아미노산의 상대적인 수치료적 특성이 결과 단백질의 이차구조에 기여한다는 것이 알려졌으며, 이러한 이차구조가 단백질의 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원과 같은 다른 분자와의 상호작용을 정의한다.

[0107] 또한, 본 발명이 속한 분야에서 아미노산의 대체가 친수성의 기초를 효과적으로 확립한다는 것이 알려져 있다. 본 출원에 참고 문헌으로 삽입된 미국 특허 제4,554,101호는 그와 인접한 아미노산의 친수성에 의하여 결정되는 단백질의 최대 국지적 평균 친수성(the greatest local average hydrophilicity of a protein)이 단백질의 생물학적 특성과 연관한다는 사실을 언급하였다. 미국 특허 제4,554,101호가 자세히 설명하고 있는 것처럼, 각각의 아미노산 잔기에 대하여 다음의 친수성 수치를 할당하였다: 염기성 아미노산: 알기닌(+3.0), 리신(+3.0), 히스티딘(-0.5); 산성 아미노산: 아스파라진산(aspartate)(+3.0 ± 1), 글루탐산(glutamate)(+3.0 ± 1), 아스파라진(+0.2), 글루타민(+0.2); 친수성, 비이온성 아미노산: 세린(serine)(+0.3), 아스파라진(+0.2), 글루타민(+0.2), 스레오닌(threonine)(-0.4), 황을 포함하는 아미노산: 시스테인(-1.0), 메티오닌(-1.3); 소수성, 비방향성 아미노산: 발린(-1.5), 류신(-1.8), 이소류신(-1.8), 프롤린(proline)(-0.5 ± 1), 알라닌(-0.5), 글리신(glycine)(0); 소수성, 방향성 아미노산: 트립토판(-3.4), 페닐알라닌(-2.5), 타이로신(tyrosine)(-2.3).

[0108] 한 아미노산을 유사한 친수성을 가지는 다른 아미노산으로 대체하여 생물학적으로 또는 면역학적으로 변형한 단백질을 만들 수 있다는 것은 알려져 있다. 이러한 변화에서, 친수성 수치가 ±2 내에 있는 아미노산으로 대체하는 것이 바람직하며 그중에서도 ±1 이내인 것을 특히 바람직하고, ±0.5 이내인 것이 가장 바람직하다.

[0109] 위에서 개략적으로 다룬 것처럼, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 사이드체인(side-chain) 치환기, 예를 들면 그들의 소수도, 친수도, 전하, 크기와 같은 것의 상대적인 유사도에 기초하여 실시한다. 전술한 다양한 특성들을 고려한 전형적인 대치가 본 발명이 속한 분야에 잘 알려져 있고 다음을 포함한다: 알기닌과 라이신; 글루탐산과 아스파라진산; 세린과 스레오닌; 글루타민과 아스파라진; 그리고 발린, 류신과 이소류신.

[0110] 본 발명은 이소형(isotype) 변형도 또한 고려하고 있다. Fc 부위를 다른 이소형으로 변경함으로써, 다른 기능을 얻을 수 있다. 일례로, IgG4로의 변경으로 다른 이소형과 관련한 면역효과기 기능을 감소시킬 수 있다.

[0111] 변형한 항체는 당업자면 알고 있는 기본적인 분자생물학적 기술을 통한 발현 또는 폴리펩타이드(polypeptide)의 화학적 합성을 포함하는 어떠한 기술로 만들 수 있다. 재조합 발현 방법을 본 명세서의 다른 곳에 기술하고 있다.

[0112] **D. 화학적 변형**

[0113] Fc 부위의 IgG 기능을 손상시키는 또 다른 접근법은 항체의 카바밀레이트(carbamylate), 아미데이트(amidate), 벤질레이트(benzylate)화 하는 것이다. 이러한 변형의 기술은 트라셔와 코헨(Thrasher and Cohen), 면역학 저널(J. Immunol.), 107:672-677(1971)에서 기술하고 있다.

[0114] **E. 단일체인 항체**

[0115] 단일체인 변이부 단편(Single Chain Variable Fragment)(scFv)는 짧은(일반적으로 세린, 글라이신) 연결체로 연결된 면역글로불린의 중쇄와 경쇄의 변이 부위의 융합체이다. 이 키메라 분자는 불변 부위를 제거하고 연결 펩타이드를 도입하였지만, 기존의 면역글로불린의 특이성을 보유하고 있다. 이러한 변형은 일반적으로 특이성에 변화를 가져오지 않는다. 이러한 분자들은 역사적으로 항원 결합 도메인을 단일 펩타이드로 발현하는 것이 매우 편리한 파지 디스플레이(phage display)를 가속화하기 위하여 개발하였다. 한편으로, scFv는 하이브리도마(hybridoma)로부터 파생한 서브클론한 중쇄와 경쇄로부터 직접적으로 만들 수 있다. 단일체인 변이부 단편은 완전 항체 분자에서 발견할 수 있는 불변 부위 Fc 지역이 없어서 항체를 순화하는데 사용하는 일반적인 결합부(단백질 A/G)가 존재하지 않는다. 이러한 단편들은 종종 카파 경쇄(kappa light chain)의 변이 부위와 결합하는 단백질 L을 이용하여 순화/고정할 수 있다.

[0116] 유연성 있는 연결체(flexible linker)는 일반적으로 알라닌, 세린, 글리신과 같이 나선형과 회전을 촉진하는(helix- and turn-promoting) 아미노산을 포함한다. 그러나 다른 잔기들도 또한 사용할 수 있다. 탕(Tang) 등(1996)은 파지디스플레이(phage display)를 단백질 연결체 라이브러리(protein linker libraries)로부터 단일체인 항체(scFvs)를 위한 맞춤형 연결체(tailored linker)를 빠르게 선정하기 위한 방법으로 사용하였

다. 무작위 연결체 라이브러리(random linker library)를 다양한 구조의 18개 아미노산을 부호화하고 있는 분절로 연결되어 있는 중쇄와 경쇄 변이 부위를 위한 유전자들로부터 구축하였다. scFV 레퍼토리(repertoire)(약 5×10^6 종류의 다른 구성체로 구성)를 선형의 파지(phage)에 표시한 후 합텐(hapten)을 이용하여 친화도 선택을 하였다. 선정한 변종들의 무리는 결합 활성에 현저한 증가를 나타내었지만, 충분한 서열 다양성을 유지하였다. 1054종의 변종을 스크리닝하여 결과적으로 효과적으로 수용성의 형태로 생산할 수 있는 촉매적으로 활성이 있는 scFv를 얻었다. 서열분석 결과 선택한 구속구(tether)에 유일한 공통적인 특징으로 VHC 말단 후 연결체 두 잔기에서 보존된 프롤린(proline)과 다른 부위에서 아르기닌과 프롤린이 풍부함을 확인할 수 있었다.

[0117] 본 발명의 재조합 항체는 또한 수용체의 이합체화(dimerization)이나 다합체화(multimerization)을 허용하는 서열이나 부분을 포함할 수 있다. 이러한 서열은 J-체인과 결합하여 다합체를 구성하는 것이 가능한 IgA로부터 파생한 서열을 포함한다. 또 다른 다합체화 도메인은 Gal4 이합체화 도메인이 있다. 다른 실시예에서 체인들을 비오틴/아비딘(biotin/avidin)과 같은 물질을 이용하여 두 항체의 조합을 가능하게 변형할 수 있다.

[0118] 또 다른 실시예에서, 단일체인 항체는 비펩타이드 연결체 또는 화학적 유니트(unit)를 이용하여 경쇄와 중쇄 수용체를 결합시킴으로써 만들어 낼 수 있다. 일반적으로, 경쇄와 중쇄는 각각 다른 세포에서 생산하여 순화하고 결과적으로 적절한 방법(중쇄의 N-말단을 적절한 화학적 연결체를 통해 경쇄의 C-말단에 연결)으로 함께 연결하게 된다.

[0119] 교차결합 물질(cross-linking reagents)는 두개의 다른 분자들 즉, 안정화 및 응고 인자들의 기능군을 묶어주는 분자적인 교량을 형성하는데 사용한다. 그러나 동일한 유사체나 다른 유사체로 구성하는 이형의(heteromeric) 복합체의 이합체 또는 다합체를 만들 수 있다는 것을 염두에 두어야 한다. 두개의 다른 복합물을 단계적인 방법으로 연결하기 위하여, 이형 이중기능성의 교차결합체(hetero-bifunctional cross-linker)를 이용하여 불필요한 단일중합체(homopolymer) 형성을 제거할 수 있다.

[0120] 전형적인 이형 이중기능성 교차결합체(hetero-bifunctional cross-linker)는 두개의 반응군을 함유한다: 제1 아민 그룹(primary amine group)(즉, N-하이드록시 수시니미드(N-hydroxy succinimide)과 반응하는 군과 티올군(thiol group)(즉, 피리딜 디설파이드(pyridyl disulfide), 말레이미드(maleimides), 할로젠(halogen) 등)과 반응하는 군. 제1 아민 반응 군을 통해서 연결체는 단백질(선정한 항체 또는 그 단편)의 라이신 잔기와 반응할 수 있고, 티올 반응군을 통하여 첫번째 단백질과 이미 결합한 연결체가 다른 단백질(선택성 물질)의 시스테인 잔기(자유 설프하이드릴 군(free sulfhydryl group))과 반응을 한다.

[0121] 혈액 내에서 적당한 안정성을 갖는 연결체를 사용하는 것을 선호한다. 많은 형식의 이황화결합(disulfide-bond)를 포함하는 연결체(linker)가 성공적으로 목표 물질과 치료/예방 물질을 결합하는데 사용하는 것이 잘 알려졌다. 입체적으로 방해하는(sterically hindered) 이황화결합을 함유하는 연결체는 생체 내에서 더 큰 안정성을 부여하여, 작용지점에 도달하기 전에 목표 펩타이드를 방출하는 것을 방지하는 것을 증명할 수 있다. 따라서 이러한 연결체들이 연결물질의 한 군을 형성한다.

[0122] 또 다른 교차결합 시약은 SMPT로써, 이것은 인접한 벤젠링(benzene ring)과 메틸군(methyl group)에 의하여 "입체적으로 방해하는(sterically hindered)" 이황화결합을 함유하는 이중능력의 교차결합물이다. 이황화결합의 입체적인 장애는 글루타이온(glutathione)과 같이 조직과 혈액에 존재하는 티올레이트 음이온(thiolate anion)에 의한 공격으로부터 결합을 방어하여 목표지점까지 결합한 물질을 운반하기 위하여 이전에 결합의 풀림을 방지하는데 도움을 주는 기능을 하는 것으로 알려졌다.

[0123] SMPT 교차결합 시약은 다른 많은 교차결합시약들처럼 시스테인의 SH나 제1 아민(즉, 라이신의 엡실론(epsilon) 아미노군)과 같은 기능군과 교차결합을 하는 능력을 가진다. 또 다른 교차결합 가능형은 술포숙시니미딜-2-(p-아지도 살리실아미도) 에틸-1, 3'-다이티오프로피오네이트(sulfosuccinimidyl-2-(p-azido salicylamido) ethyl-1, 3'-dithiopropionate)와 같은 분열가능한 이황화결합을 포함하는 이형 이중기능성 광반응성 페닐아자이드(hetero-bifunctional photoreactive phenylazides)를 포함한다. N-하이드록시-숙시니미딜 군(N-hydroxy-succinimidyl group)은 주 아미노 군과 반응하고 페닐아자이드(phenylazide)는(광분해(photolysis)하면서) 비선택적으로 어떠한 아미노산 잔기와도 반응한다.

[0124] 방해형 교차 결합물(hindered cross-linkers)에 부가하여, 비방해형 결합물(non-hindered linkers) 또한 이에 따라서 사용할 수 있다. 이황화결합을 포함하거나 생성하는 것으로 간주되지 않는 또 다른 유용한 교차결합물은 보호받는 SATA, SPDP와 2-이미노티올레인(2-iminothiolane)을 포함한다(와르진크작과 토르프(Wawrzynczak & Thorpe), 1987).

- [0125] 미국 특허 제4,680,338호는 아민(amine)을 포함하는 중합체 및/또는 단백질과 리간드(ligand)의 결합, 특히 킬레이트제(chelator), 약, 효소, 탐지가능한 표지와 같은 것들과 결합하는 항체를 형성하는데 유용한 이중작용 연결체(bifunctional linker)에 대해 기술한다. 미국 특허 제5,141,648호와 제5,563,250호는 다양한 정도의 조건(mild condition) 하에서 조깅 수 있는 불안정한 결합을 포함하는 절단 가능한 결합을 발표하였다.
- [0126] 미국 특허 제5,856,456호는 단일 사슬 항체와 같은 융합 단백질(fusion protein)를 만드는 폴리펩타이드 성분을 연결하는데 사용하는 펩타이드 연결체(peptide linker)를 제공한다. 연결체는 적어도 한개 이상의 전하를 띤 아미노산(알기닌과 라이신을 선호함) 다음 프롤린이 오는 것을 포함하는 최대 약 50개의 아미노산의 길이로 더 큰 안정성과 감소한 응집성을 특징으로 한다. 미국 특허 제 5,880,270호는 다양한 면역진단과 분리적인 기술에 유용한 아미노옥시를 포함하는 연결체(aminoxy-containing linkers)를 발표하였다.
- [0127] **F. 순화**
- [0128] 특정 실시예에서, 본 발명의 항체를 순화할 수 있다. 본 출원에서 사용한 "순화(purification)"라는 용어는 다른 성분으로부터 분리 가능한 성분을 지칭하고자 사용하는 단어로, 그 중에서 단백질은 자연적으로 획득가능한 상태에서 상대적으로 어느 정도 순화한다. 그러므로 순화한 단백질은 자연적으로 발생할 수 있는 환경으로부터 분리한 단백질을 지칭한다. "실질적으로 순화한(substantially purified)"이라는 용어는 구성물에서 단백질이 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 그 이상을 구성하는 것처럼 단백질 또는 펩타이드가 성분의 주된 구성물인 구성물을 지칭한다.
- [0129] 단백질 순화 기술은 본 발명이 속한 분야에서 일하는 사람들에게 잘 알려져 있다. 이러한 기술은 한 수준에서, 세포환경의 폴리펩타이드와 비폴리펩타이드 분획으로 대략의 분획하는 것(crude fractionation)을 포함한다. 다른 단백질로부터 분리한 폴리펩타이드를 이용하여, 관심이 있는 폴리펩타이드를 크로마토그래피와 전기영동적인 기술을 이용하여 더 순화함으로써 부분적 또는 완전한 순화(또는 동질성으로의 순화)를 달성할 수 있다. 특히 순수 펩타이드의 준비에 적합한 분석방법은 이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography), 배제 크로마토그래피(exclusion chromatography); 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis); 등전초점조절(isoelectric focusing) 등이 있다. 단백질 순화를 위한 다른 방법들은 암모늄 황산염(ammonium sulfate), 피이지(PEG), 항체를 이용한 침전 또는 열변성(heat denaturation)에 의한 침전 후 원심분리; 젤 여과(gel filtration), 역상(reverse phase), 하이드록실아파타이드(hydroxylapatite), 친화크로마토그래피(affinity chromatography); 그리고 이들과 다른 기술의 조합을 포함한다.
- [0130] 본 발명의 항체를 순화하는 데 있어서, 원핵동물 또는 진핵동물을 이용한 발현 체계에서 폴리펩타이드를 발현하고 변성조건을 이용하여 단백질을 추출하는 것이 바람직할 수 있다. 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 표지된 부분과 결합하는 친화도 컬럼(affinity column)을 이용하여 다른 세포 구성물로부터 순화할 수 있다. 본 발명이 속한 분야에서 일반적으로 알려진 것처럼, 다양한 순화 단계를 수행하는 순서는 변경하거나 어떤 단계들을 삭제할 수 있으며, 그렇게 해도 실질적으로 순화한 단백질 또는 펩타이드의 준비를 위한 적절한 방법으로 귀착할 수 있다고 믿어진다.
- [0131] 일반적으로, 완전한 항체는 항체의 Fc 부분과 결합하는 인자(예, 단백질 A)를 활용하여 분획할 수 있다. 다른 방법으로는, 항원을 적절한 항체를 순화와 동시에 선택하는데 사용할 수 있다. 이러한 방법은 종종 컬럼(column), 여과기(filter), 또는 비드(bead)와 같은 지지대에 결합한 선택인자를 활용한다. 항체들은 지지대에 결합하여 오염물을 제거하고(즉, 세척하고(washed away)), 항체들은 조건(염(salt), 열 등)을 적용하여 방출한다.
- [0132] 단백질이나 펩타이드의 순화 정도를 정량하는 다양한 방법을 본 발명에 비추어 본 발명이 속한 분야의 업자들에게 공지할 것이다. 일례로, 여기에는 활성 분획의 특이 활성도를 결정하는 법, 또는 SDS/PAGE 분석을 통해 분획내의 폴리펩타이드의 양을 평가하는 법을 포함한다. 분획의 순화를 평가하는 또 다른 방법은 분획의 특이 활성도를 계산하고, 최초 추출물의 특이 활성도와 비교하여, 순화의 정도를 계산하는 것이다. 물론 활성도의 양을 표현하는데 사용하는 실제적인 단위는 순화과정을 추적하기 위해 선택한 특정 분석 기술과 발현하는 단백질 또는 펩타이드가 감지할 수 있는 활성을 나타내는지의 여부에 따르게 될 것이다.
- [0133] 폴리펩타이드의 이동은 다른 조건의 SDS/PAGE에서 다양하며, 때로는 상당히 차이가 난다는 것이 밝혀졌다(카팔디(Capaldi) 등, 1977). 따라서 서로 다른 전기영동 조건하에서, 순화한 또는 부분적으로 순화한 발현 산물의 겔보기 분자량이 차이가 있을 수 있다.

[0134] III. NMO의 치료 또는 예방

[0135] A. 성분과 투여

[0136] 본 발명은 항-AQP4 항체와 그를 생성하기 위한 항원으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 이러한 구성물은 예방적으로 또는 치료적으로 효과적인 양의 항체 또는 그의 단편과 약학적으로 적합한 운반체(carrier)로 구성한다. 특별한 실시예에서, "약학적으로 적합한"이라는 용어는 연방(Federal) 또는 주정부(state government)의 규제기관에 의하여 허가되거나 또는 미국 약전이나 다른 일반적으로 알려진 약전에 동물, 그 중에서도 특히 인간에 사용하도록 허가되었음을 의미한다. "운반체(carrier)"라는 용어는 희석제, 부형제, 또는 약물이 투여되는 매개체(vehicle)를 지칭한다. 이러한 약학 운반체는 물이나 기름과 같은 멸균한 액체가 될 수 있으며, 기름은 땅콩기름, 콩기름, 미네랄 오일(mineral oil), 참기름 또는 이와 유사한 광물성, 동물성, 식물성 또는 합성 기원을 갖는다. 물은 약학 조성물을 정맥 내로 투여할 때 사용하는 특수 운반체이다. 식염수 용액(saline solution)과 액상 포도당(aqueous dextrose) 및 글리세롤 용액(glycerol solution) 또한 액체 운반체로 사용할 수 있으며, 특히 주사액으로 사용한다. 그 밖의 약학적으로 적합한 부형제는 전분, 포도당, 젓당, 설탕, 젤라틴(gelatin), 맥아, 쌀, 밀가루, 석회분말(chalk), 실리카 겔(silica gel), 스테아린산 나트륨(sodium stearate), 글리세롤 모노스테아레이트(glycerol monostearate), 활석, 염화나트륨, 건조탈지유, 글리세롤(glycerol), 프로필렌(propylene), 글리콜(glycol), 물, 에탄올(ethanol)과 그와 유사한 물질을 포함한다.

[0137] 조성물은 필요한 경우 소량의 습윤제(wetting agent) 또는 유화제(emulsifying agents), 또는 pH 완충제(pH buffering agent)를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액(suspension), 유탁액(emulsion), 알약(tablet), 환약(pill), 캡슐약(capsule), 가루, 지효성 구조(sustained-release formulation)나 그와 유사한 구조의 형태를 띌 수 있다. 경구제제(oral formulation)은 약제등급의 만니톨(mannitol), 젓당, 전분, 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate), 사카린 나트륨(sodium saccharine), 셀룰로스(cellulose), 탄산마그네슘(magnesium carbonate) 등을 기본 운반체로 포함한다. 약학적으로 적합한 물질의 예는 "레밍턴의 약학(Remington's Pharmaceutical Sciences)"에서 기술하고 있다. 이러한 조성물은 예방효과 또는 치료 효과를 보기에 충분한 양의 항체 또는 그의 단편을 포함하고 있으며, 바람직하게는 순화한 형태로 환자에게 적절한 투여를 할수 있는 형태로 제공할 수 있는 만큼 적당한 양의 운반체를 함께 포함한다. 조성물은 투여방법에 적절해야 하며, 이러한 투여방법은 경구투여, 정맥 내 투여, 동맥 내 투여, 혀내투여(intrabuccal), 비강 내 투여, 분무화(nebulized), 기관지 흡입, 또는 기계적 환기에 의한 전달 방법등이 있다.

[0138] 인위적 획득 수동 면역(artificially acquired passive immunity)이라고도 알려진 항체의 수동적인 전달은 일반적으로 정맥 내 또는 근육내 주사법을 포함한다. 항체의 형태는 정맥 내(IVIG) 또는 근육내(IG) 주사로 사용하기 위하여 풀링한 인간 면역글로불린(pooled human immunoglobulin), 면역화한 또는 질병으로부터 회복한 기증자로부터 얻은 고역가의 인간 IVIG 또는 IG 형태, 그리고 단일 클론 항체(MAb)로써의 인간 또는 동물 혈장(blood plasma) 또는 혈청(serum)이 될 수 있다. 이러한 면역는 일반적으로 단기간만 지속하며, 또한 과민반응과 특히 비인간유래의 감마 글로불린(gamma globulin)으로 인한 혈청질환(serum sickness)의 잠재적인 위험이 존재한다. 그러나 수동면역은 즉각적인 방어를 제공한다. 항체는 멸균하고 주사가 가능하도록 주사를 위해 적합한 운반체에 조합하게 된다.

[0139] 일반적으로, 조성물의 성분은 분리하여 또는 일례로 동결 건조한 분말 또는 앰플(ampoule) 또는 활성요인의 양을 표시한 사케트(sachette)와 같이 밀봉한 용기에 탈수 농축(water-free concentrate)한 형태의 단일 용량 형태로 함께 혼합하여 제공할 수 있다. 조성물을 인퓨전(infusion)에 의하여 투여할 경우, 조성물은 무균의 제약등급의 물이나 식염수를 포함하는 인퓨전 병(infusion bottle)에 조제할 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여할 경우, 투여 전에 성분을 혼합할 수 있도록 주사를 위한 무균수 또는 식염수의 앰플(ampoule)을 제공할 수 있다.

[0140] 조성물은 중성 또는 염의 형태로 제조할 수 있다. 약학적으로 허용하는 염은 염산(hydrochloric), 인산(phosphoric), 아세트산(acetic), 옥살산(oxalic), 타르타르산(tartaric acid) 등으로부터 유도한 음이온과 형성한 염과 나트륨(sodium), 칼륨(potassium), 암모니움(ammonium), 칼슘(calcium), 수산화제이철(ferric hydroxide), 이소프로필아민(isopropylamine), 트리에틸아민(triethylamine), 2-ethylamino 에탄올(2-ethylamino ethanol), 히스티딘(histidine), 프로케인(procaine) 등으로부터 유도한 양이온과 형성한 염을 포함한다.

[0141]

[0142] **B. 조합치료(Combination Therapy)**

[0143] 본 발명에서 항체 요법의 효용성을 증가시키기 위하여, NMO를 치료하거나 방지하는데 효과적인 다른 물질과 본 치료법을 조합하는 것이 필요할 수도 있다. 이러한 과정은 환자에게 본 발명의 항체와 다른 물질(들)을 동시에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 이것은 두 물질을 포함하는 한가지 약제 구성을 사용하거나 하나에는 본 발명의 항체를 포함하고, 다른 하나에는 제2 물질(들)을 포함하는 두 개의 다른 조성물을 동시에 투여함으로써 달성할 수 있다.

[0144] 두 치료법은 순서대로 또는 몇분에서 몇주의 간격으로 하나를 선행하고 그 다음 치료를 후행하는 방식으로 진행할 수 있다. 다른 물질을 따로 적용하는 실시예에서, 일반적으로 물질들이 환자에 유익한 조합 효과를 발휘할 수 있으면서도 각각의 전달 시간 간에 효능을 상실하지 않는 충분한 시간 간격을 확보할 수 있을 것이다. 이러한 예에서, 두 종류를 12-24시간 내에, 더욱 바람직하게는, 각각 6-12시간 내에 투여할 수 있음을 고려할 수 있다. 그러나, 어떤 상황에서는 각각의 투여 간에 며칠(2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일)에서 몇주(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주)의 간격으로 치료의 간격 기간을 충분히 연장하는 것이 필요할 수 있다.

[0145] 본 발명의 항체 치료를 "A"라고 하고, 두번째 치료를 "B"라고 할 때, 다양한 조합을 사용할 수 있다:

[0146] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0147] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0148] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0149] 제2 물질의 투여는 만약 독성이 있다면 독성을 고려하여 그 약의 일반적인 프로토콜(protocol)에 따를 것이다. 상기 치료 사이클은 필요하다면 반복될 수 있을 것으로 예측될 수 있다. 제2 치료에 대해 하기 설명한다.

[0150] **i. 면역억제제(Immunosuppressive Agents)**

[0151] 프레드니손(prednisone)과 같은 코티코스테로이드(corticosteroid)(급성 발작에는 고용량, 만성 치료를 위해서는 저용량을 사용)는 NMO에 주로 사용하는 치료법이고 따라서 본 발명의 항-AQP4 항체를 이용한 조합 치료에 바로 이용이 가능하다. 항-AQP4 항체를 사용하는 조합에 사용할 수 있는 면역억제제 처리는 프레드니손과 아자티오프린(azathioprine)(이뮤란(Imuran)), 마이코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil)과 프레드니손, 리투시맙(Rituximab), 미톡잔트론(Mitoxantrone), 정맥 내 면역글로블린 주사(IVIG), 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide)를 포함한다.

[0152] **ii. 혈장분리반출술(Plasmapheresis)**

[0153] 혈장분리반출술(plasmapheresis)는 혈액순환으로부터 혈장(의 구성물)을 제거하고, 처리한 후, 복구하는 것이다. 그러므로 이것은 체외 처리(신체의 외부에서 수행하는 의료 과정)에 속한다. 이 방법은 추가적인 공정을 통해 다양한 종류의 약물을 생산하기 위해 혈장을 수집하는데 사용할 수 있다. 이 기술은 중증근육무력증(Myasthenia gravis), 길랭-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 루푸스(lupus), 혈전저혈소판혈증자색반병(thrombotic thrombocytopenic purpura) 및 NMO와 같은 면역체계의 이상을 포함하는 다양한 이상을 치료하는데 사용한다. 혈장분리반출술(plasmapheresis) 중에 혈액을 일단 바늘 또는 이전에 이식한 카테터(catheter)를 통하여 신체로부터 추출한다. 이후 세포 분리기(cell separator)를 이용하여 혈액으로부터 제거한다. 혈액세포로부터 혈장을 분리하는데에는 세가지 기술법을 이용한다:

[0154] - 불연속 흐름 원심분리법(discontinuous flow centrifugation): 한 개의 정맥 카테터 선(venous catheter line)이 필요하다. 전형적으로 300ml 배치(batch)의 혈액을 한번에 제거하여 혈액 세포로부터 혈장을 분리하기 위하여 원심분리를 실시한다.

[0155] - 연속흐름 원심분리법(continuous flow centrifugation): 두 개의 정맥 선(venous line)을 사용한다. 이 방법은 약간 더 적은 양의 혈액이 계속적으로 혈장을 내놓게 하기 위해서 한번에 신체로부터 빠져나오게 된다.

[0156] - 혈장여과법(plasma filtration): 두 개의 정맥 선(venous line)을 사용한다. 혈장은 기본적인 혈액투석

(hemodialysis) 기구를 이용하여 여과한다. 이 연속적인 시술법은 한번에 신체외로 100 ml의 혈액을 제거한다.

[0157] 각 방법은 각각의 장점과 단점이 있다. 혈장 분리 후, 혈액세포는 치료중인 사람에게 돌아가고, 항체를 포함하는 혈장은 먼저 처리를 한 후 전통적인 혈장분리반출술 중인 환자에게 되돌아간다(혈장 교체에서는, 제거한 혈장은 폐기하고 환자는 교체용 기증자 혈장, 알부민(albumin) 또는 알부민과 식염수(보통 70% 알부민과 30% 식염수를 사용)의 조합을 받는다). 드물게, 혈액 수혈에 반대하는 사람에게는 하이드록시에틸 전분(hydroxyethyl starch)와 같은 다른 교체액을 사용할 수 있으나 심각한 부작용으로 인해 거의 사용하지 않는다. 혈액이 응고하는 것을 막는 약품(항응고제(anticoagulant))을 시술동안 환자에게 투여한다.

[0158] 혈장분리반출술(plasmapheresis)의 중요한 사용법은 다른 의학적 치료에 부가하여 순환계로부터 질병을 유발하는 자가항체(autoantibody)의 신속한 제거를 요구하는 자가면역이상(autoimmune disorder)의 치료에 사용하는 것이다. 혈장교환요법(plasma exchange therapy)에서 또는 그 자체가 장기적인 관리를 위해 의학적 및 면역억제적 치료법이 동시에 필요한 질병의 진전을 완화하는데 유용하다는 것에 주목하는 것이 중요하다. 혈장 교환은 유해한 자가항체를 제거하는데 가장 빠른 단기적인 해답을 제공한다; 그러나 면역체계에 의한 자가항체의 생산 또한 억제하여야 하는데 이것은 일반적으로 프레드니손(prednisone), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 시클로스포린(cyclosporine), 마이코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil), 리투시맵(rituximab) 또는 이들의 혼합물을 이용하여 억제한다.

[0159] **IV. 결합 항체(Antibody Conjugates)**

[0160] 항체는 결합 항체(antibody conjugate)를 만들기 위해서 하나 이상의 물질과 연결(conjugate)할 수 있다. 항체 분자의 진단용 또는 치료용 물질로써의 효능을 증가시키기 위하여, 하나 이상의 원하는 분자 또는 부분과 연결하거나 또는 공유결합적으로 결합을 하거나 복합체를 만드는 것이 전통적이었다: 이러한 분자 또는 부분은 하나 이상의 효과기(effector) 또는 리포터(reporter) 분자일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 효과기 분자는 원하는 활성, 즉 면역억제/항염증 활성을 갖는 분자를 포함한다. 이러한 분자의 비제한적인 예(non-limiting example)는 위에 명시하고 있다. 이러한 분자들은 선택적으로 목표지점에 또는 그 부근에서 분자가 방출되도록 설계한 절단 가능한 연결체(cleavable linker)를 통하여 연결한다.

[0161] 대조적으로, 리포터 분자(reporter molecule)는 분석을 통하여 감지할 수 있는 모든 부분으로 정의할 수 있다. 항체에 결합하는 리포터 분자는 효소, 방사성표지(radiolabels), 합텐(hapten), 형광성 표지(fluorescent labels), 인광성 분자(phosphorescent molecules), 화학발광성 분자(chemiluminescent molecules), 발색단(chromophores), 광친화분자(photoaffinity molecules), 비오틴(biotin)과 같은 유색입자 또는 리간드(ligand)를 포함하나, 이에 한정하지 않는다.

[0162] 결합 항체는 일반적으로 진단 물질로 사용하는 것이 바람직하다. 항체진단법은 일반적으로 두 종류로 구분이 가능한데, 하나는 다양한 면역분석법과 같은 생체외 진단법(*in vitro* diagnostics)과 일반적으로 “항체지시 영상법(antibody-directed imaging)”으로 알려진 생체 내 진단 프로토콜(*in vivo* diagnostic protocol)으로 구분할 수 있다. 본 발명이 속한 분야에서 적절한 영상화 물질들이 많이 알려져 있는 것처럼, 항체에 이들을 부착하는 방법도 많이 알려져 있다(미국 특허 제5,021,236호, 제4,938,948호, 제4,472,509호 참조). 사용하는 영상화 부분은 상자성 이온(paramagnetic ions), 방사성 동위원소(radioactive isotopes), 형광색소, NMR로 탐지 가능한 물질(NMR-detectable substances), 엑스레이 영상화 물질(X-ray imaging agents)이 될 수 있다.

[0163] 상자성 이온(paramagnetic ion)의 경우, 크롬(chromium)(III), 망간(manganese)(II), 철(III), 철(II), 코발트(cobalt)(II), 니켈(nickel)(II), 구리(II), 네오디뮴(neodymium)(III), 사마리움(samarium)(III), 이테르비움(ytterbium)(III), 가돌리늄(gadolinium)(III), 바나듐(vanadium)(II), 테르비움(terium)(III), 디스프로슘(dysprosium)(III), 홀미움(holmium)(III) 및/또는 가돌리움과 에르비움(erbium)(III)과 같은 이온의 예를 드는 것이 특히 바람직하다. 엑스레이 영상화(X-ray imaging)과 같은 다른 문맥에 유용한 이온은 란탄(lanthanum)(III), 금(III), 납(II), 특히 비스무스(bismuth)(III)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0164] 치료용 및/또는 진단용 적용을 위한 방사성 동위원소(radio isotope)의 경우, 스타틴²¹¹(statine²¹¹), ¹⁴탄소(¹⁴carbon), ⁵¹크롬(⁵¹chromium), ³⁶염소(³⁶chlorine), ⁵⁷코발트(⁵⁷cobalt), ⁵⁸코발트(⁵⁸cobalt), 구리⁶⁷(⁶⁷copper), ¹⁵²Eu, 갈륨⁶⁷(⁶⁷gallium), ³수소(³hydrogen), 요오드¹²³(¹²³iodine), 요오드¹²⁵(¹²⁵iodine), 요오드¹³¹(¹³¹iodine), 인듐¹¹¹(¹¹¹indium), ⁵⁹철, ³²인, 레늄¹⁸⁶(¹⁸⁶rhenium), 레늄¹⁸⁸(¹⁸⁸rhenium), ⁷⁵셀레늄(⁷⁵selenium), ³⁵황, 테크네튬

^{99m}(technicium ^{99m}), 및/또는 이트륨(⁹⁰yttrium ⁹⁰)을 거론할 수 있다. ¹²⁵요오드가 특정 실시예에서 사용될 수 있고, 테크니시움(^{99m}technicium ^{99m}) 및/또는 인듐(¹¹¹indium ¹¹¹) 또한 저 에너지와 장거리 포착(long range detection)에 적합함으로 인해 종종 선호된다. 방사성 동위원소로 표지한 단일 클론 항체는 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 생산할 수 있다. 예를 들어, 단일 클론 항체는 요오드 나트륨과/또는 요오드 칼륨과 접촉을 하거나 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite)와 같은 화학적 산화물질(chemical oxidizing agent), 또는 락토퍼옥시다제(lactoperoxidase)와 같은 효소적 산화제(enzymatic oxidizing agent)를 이용하여 요오드표지할 수 있다. 단일 클론 항체는 과테크네튬산(pertechnate)를 제일주석 용액(stannous solution)으로 환원시키고, 환원된 테크네튬(technetium)을 세파덱스 컬럼(Sephadex column)에서 킬레이트화(chelating)하여 항체를 본 컬럼에 통과시키는(apply) 것과 같은 리간드 교체 과정(ligand exchange process)를 이용하여 테크네튬(^{99m}technetium)로 표지할 수 있다. 또 다른 방법으로는 직접 표지 기술(direct labeling technique)을 이용할 수 있는데, 이 경우 과테크네튬산(pertechnate)을 SNC12와 같은 환원제, 나트륨-칼륨 프탈레이트(sodium-potassium phthalate)와 같은 완충액, 그리고 항체와 배양하는 것을 이용할 수 있다. 디에틸렌 에트리아민펜타아세트산(diethylenetriaminepentaacetic acid)(DTPA) 또는 에틸렌 디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid)(EDTA)가 금속이온으로 존재하는 방사성 동위원소를 항체와 결합하는데 종종 사용하는 중간기 작용군(intermediary functional group)이다.

[0165] 결합에 사용하는 것을 고려하는 형광 표지들은 알렉사 350(Alexa 350), 알렉사 430(Alexa 430), AMCA, 보디피 630/650(BODIPY 630/650), 보디피-FL(BODIPY-FL), 보디피-R6G(BODIPY-R6G), 보디피-TMR(BODIPY-TMR), 보디피-TMX(BODIPY-TMX), 캐스케이드 블루(Cascade Blue), Cy3, 6-FAM, 플루오레신 이소티오시아나트(Fluorescein Isothiocyanate), HEX, 6-JOE, 오레곤 그린 488(Oregon Green 488), 오레곤 그린 500(Oregon Green 500), 오레곤 그린 514(Oregon Green 514), 퍼시픽 블루(Pacific Blue), REG, 로다민 그린(Rhodamine Green), 로다민 레드(Rhodamine Red), 레노그라핀(Renographin), ROX, TAMRA, TET, 테트라메틸로다민(Tetramethylrhodamine), 및/또는 텍사스 레드(Texas Red)를 포함한다.

[0166] 예상할 수 있는 또 다른 형태의 결합 항체는 주로 생체 외(in vitro)에서 사용하는 것을 고려하는 형태로, 항체는 이차 결합 리간드(secondary binding ligand)와/또는 발색기질과 접하면 색소물질을 생성하는 효소(효소표지)와 연결한다. 적당한 효소의 예는 유리아제(urease), 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase), (홍당무) 과산화수소효소(hydrogen peroxidase) 또는 포도당 산화효소(glucose oxidase)이다. 바람직한 이차 결합 리간드(secondary binding ligand)는 비오틴(biotin)과 아비딘(avidin), 그리고 스트렙타비딘 화합물(streptavidin compounds)이다. 이러한 표지의 사용은 본 발명이 속한 기술에 능통한 사람들은 잘 알고 있으며 미국 특허 제3,817,837호, 제3,850,752호, 제3,939,350호, 제3,996,345호, 제4,277,437호, 제4,275,149호, 및 제4,366,241호와 같은 예에 잘 기술하고 있다.

[0167] 항체에 분자의 위치-특이적인 부착(site-specific attachment)하는 또 다른 알려진 방법은 합텐에 기초한 친화도 표지(hapten-based affinity label)한 항체의 반응으로 구성한다. 본질적으로, 합텐에 기초한 친화도 표지는 항체 결합부위의 아미노산과 반응하여 이 부위를 파괴하여 특이적인 항원 반응을 차단한다. 그러나 이것은 항체 결합에 의한 항원에 대한 결합을 상실해버리게 되므로 잇점이 아닐 수도 있다.

[0168] 아지도 군(azido group)을 포함하는 분자들 또한 단백질에서 저장도의 자외선 빛에 의해 생성되는 니트렌 중간물(nitrene intermediate)를 통해 공유결합을 형성하는데 사용할 수 있다(포터와 헤일리(Potter and Haley), 1983). 특히, 퓨린 핵산(purine nucleotide)의 2-와 8-아지도 유사체(azido analogues)는 세포의 미정제 추출물(crude cell extract)에서 단백질과 결합하는 핵산(nucleotide)를 파악하기 위한 부위특이적인 광탐색자(site-directed photoprobes)로써 사용하여 왔다(오웬스 & 헤일리(Owens & Haley), 1987; 에더튼(Atherton) 등, 1985). 2-와 8- 아지도 핵산(azido nucleotide)은 순화한 단백질의 핵산 결합 도메인을 맵하는 데(map) 사용하고(카톤(Katoon) 등, 1989; 킹(King) 등, 1989; 돌라키아(Dholakia) 등, 1990), 아마도 항체 결합 물질에 사용할 수 있다.

[0169] 본 발명이 속한 분야에는 항체를 그 접합체 부분과 부착하거나(attachment) 또는 결합하는(conjugate) 몇 가지 방법이 알려져 있다. 어떤 부착법은 일레로 디에틸렌트리아민펜타아세트산 무수물(diethylenetriaminepentaacetic acid anhydride)(DTPA); 에틸렌트리아민테트라아세트산(ethylenetriaminetetraacetic acid); N-클로로-p-톨루엔설포나미드(N-chloro-p-toluensulfonamide); 및/또는 테트라클로로-3-α-6-α-디페닐글리코우릴-3(tetrachloro-3-α-6-α-diphenylglycouril-3)와 같은 유기 킬레이트제(organic chelating reagent)를 항체에 부착하기 위하여 금속 킬레이트 복합체(metal chelate complex)를 사

용하는 것을 포함한다(미국 특허 제4,472,509호와 제4,938,948호). 또한 단일 클론 항체는 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)나 과옥소산(periodate)와 같은 결합제(coupling agent)의 존재하에서 효소와 반응시킬 수 있다. 형광물질 표지(fluorescein marker)를 갖는 결합기의 존재하에서 준비하거나 또는 이소티오시안염(isothiocyanate)과 반응을 시킴으로써 준비할 수 있다. 미국 특허 제4,938,948호에서, 단일 클론 항체와 영상으로 메틸-p-하이드록시벤지미데이트(methyl-p-hydroxybenzimidate) 또는 N-숙시니미딜-3-(4-하이드록시페닐)프로피오네이트(N-succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionate)와 같은 연결체를 이용하여 항체에 결합시킨 포착 가능한 부분을 이용하여 유방 종양의 영상을 얻었다.

[0170] 다른 실시예에서, 항체 결합 부분을 변화시키지 않는 반응 조건을 이용하여 면역글로불린의 Fc 부분에 술포하이드릴군(sulfhydryl group)을 선택적으로 도입하는 것에 의한 면역글로불린의 유도체화(derivatization)을 고려하였다. 이 방법론에 따라 생산한 결합 항체는 향상된 수명, 특이성 및 민감성을 나타내는 것을 확인하였다(본 출원서에 참고문헌으로 삽입된 미국특허 제5,196,006호). 효과기 또는 리포터 분자(reporter molecule), 그중에서도 Fc 부위의 탄수화물 잔기에 결합한 리포터 또는 효과기 분자의 부위 특이적인 결합(site-specific attachment) 역시 문헌에 발표되었다(오샤네시(O'Shannessy) 등, 1987). 이러한 접근법은 현재 임상적 평가가 진행중인 진단용 및 치료용으로 유망한 항체를 생산하는 것으로 보고되었다.

[0171] **V. 면역학적 탐지 방법(Immunodetection Methods)**

[0172] 또 다른 실시예에서, 결합, 순화, 제거, 정량화 및 그 밖의 일반적으로 AQP4 및 그와 관련한 항원을 포착하는 면역학적 탐지 방법(immunodetection methods)이 있다. 일부 면역학적 탐지 방법은 몇가지를 언급한다면 효소면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay)(ELISA), 방사면역측정법(radioimmunoassay)(RIA), 면역방사측정법(immunoradiometric assay), 형광면역측정법(fluoroimmunoassay), 화학발광측정법(chmiluminescent assay), 생물발광측정법(bioluminescent assay), 및 웨스턴 블랏(Western blot) 등의 방법을 포함한다. 특히, AQP4 항체의 탐지 및 정량을 위한 경쟁적 분석 또한 제공한다. 다양한 유용한 면역학적 탐지 방법의 단계는 돌리틀과 벤지브(Doolittle and Ben-Zeev)(1999), 걸비스와 갈란드(Gulbis and Galand)(1993), 드 예거(De Jager) 등(1993), 나카무라(Nakamura) 등(1987) 등의 과학적 문헌에서 설명하고 있다. 일반적으로, 면역학적 결합방법은 경우에 따라 면역복합체(immunocomplex)를 형성하는 것이 효과적인 조건 하에서 표본을 획득하고 표본을 본 출원에서 설명한 실시예에 따라서 첫번째 항체와 접촉하는 것을 포함한다.

[0173] 선택한 생물학적인 표본을 효과적인 조건 하에서 면역 복합체(immune complex)(1차 면역 복합체(primary immune complex))의 형성을 허용하는 충분한 시간동안 항체에 접촉하는 것은 일반적으로 단순히 항체 구조를 표본에 넣고 항체가 면역 복합체를 형성하는데 충분한 시간동안 혼합물을 배양하는, 즉 AQP4의 존재하에서 결합을 시키는 것에 대한 문제이다. 이 시간이 지나면, 조직 절편(tissue section), 효소면역측정법(ELISA) 판, 닷 블랏(dot blot) 또는 웨스턴 블랏(Western blot)과 같은 표본-항체 구조(sample-antibody composition)는 일반적으로 비특이적으로 결합한 항체류를 세척하여 제거하여 일차 면역 복합체와 특이적으로 결합하는 항체들만을 탐지할 수 있도록 하게 된다.

[0174] 일반적으로, 면역복합체(immunocomplex) 형성의 탐지는 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려져 있으며, 다양한 접근법의 적용을 통하여 달성할 수 있다. 이러한 방법은 일반적으로 방사성, 형광성, 생물학 및 효소적 표지(tag) 중 하나와 같은 표지(lable)나 마커(marker)의 탐지에 기반한다. 이러한 표지를 다루는 특허는 미국특허 제 3,817,837호, 제3,850,752호, 제3,939,350호, 제3,996,345호, 제4,277,437호, 제4,275,149호 및 제4,366,241호를 포함한다. 물론 본 발명이 속한 분야에 알려져 있는 것처럼 이차 항체 및/또는 비오틴(biotin)/아비딘(avidin) 리간드(ligand) 결합 배열과 같은 이차적인 결합 리간드(ligand)를 사용하는 것을 이용한 추가적인 장점을 발견할 수 있다.

[0175] 탐지에 사용하는 항체는 그 자체에 탐지 가능한 표지를 연결하여, 단순히 이 표지를 탐지하여 일차 면역 복합체의 양을 결정할 수 있도록 할 수 있다. 다른 방법으로는 일차 면역 복합체에 결합하는 첫번째 항체를 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 이차 결합 리간드를 이용하여 탐지할 수 있다. 이 경우, 이차 결합 리간드를 탐지 가능한 표지와 연결할 수 있다. 이차 결합 리간드는 종종 그 자체가 항체여서, "이차" 항체라는 용어를 사용할 수도 있다. 일차 면역 복합체는 이차 면역 복합체를 형성하는데 효과적인 조건과 충분한 시간 동안 표지한 이차 결합 리간드, 또는 이차 항체와 접촉한다. 그 다음 이차 면역 복합체는 일반적으로 비특이적으로 결합한 표지한 이차 항체 또는 이차 리간드를 세척하여 제거한 다음 이차 면역 복합체에 남아있는 표지를 탐지한다.

- [0176] 자세한 방법은 두단계 접근 방식에 의한 일차 면역 복합체의 탐지를 포함한다. 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 항체와 같은 두번째 결합 리간드를 이차 면역 복합체를 형성하기 위하여 상기한 것처럼 사용한다. 세척 후에, 이차 면역 복합체는 이차 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 3차 결합 리간드나 항체와 면역 복합체(3차 면역 복합체)를 형성할 수 있는 효과적인 조건하에서 충분한 기간동안 접촉한다. 세번째 리간드 또는 항체는 탐지가능한 표지와 연결되어 형성한 3차 면역 복합체의 탐지를 가능하게 한다. 이 체계는 필요하다면 신호 증폭을 제공할 수 있다.
- [0177] 면역학적 탐지법의 한가지 방법은 두 가지 다른 항체를 사용한다. 첫번째 바이오티닐레이트된 항체(biotinylated antibody)는 목표 항원을 탐지하는데 사용하고, 두번째 항체는 복합체를 형성한 비오틴(biotin)에 부착한 비오틴을 탐지하는데 사용한다. 이 방법에서, 검사할 표본은 먼저 첫번째 단계 항체를 포함한 용액에 배양한다. 만약 목표 항원이 존재한다면, 항체의 일부가 항원에 결합하여 비오틴리레이티드 항체/항원 복합체(biotinylated antibody/antigen complex)를 형성한다. 항원/항체 복합체는 각 단계에서 항체/항원 복합체에 추가적인 비오틴 부위를 첨가하도록 스트렙타비딘(streptavidin)(또는 아비딘(avidin), 비오틴리레이티드 DNA(biotinylated DNA), 및/또는 상보적인 비오틴리레이티드 DNA(biotinylated DAN)의 용액에 연속적으로 배양하여 증폭한다. 증폭 단계는 충분한 수준으로 증폭할 때까지 반복한 후 표본을 비오틴에 대한 두번째 단계 항체를 함유한 용액에서 배양한다. 두번째 단계 항체는 예를 들어 발색 기질을 이용한 조직효소학에 의하여 항원/항체 복합체의 존재를 탐지하는데 사용할 수 있는 효소로 표지한다. 적절한 증폭으로 현미경적으로 관찰이 가능한 결합체를 생성할 수 있다.
- [0178] 면역학적 탐지법의 또 다른 방법은 면역-PCR(중합효소연쇄반응) 방법론의 장점을 이용한다. PCR법은 비오틴리레이티드 DNA(biotinylated DNA)를 이용한다는 점에서는 캔토법(Cantor method)와 유사하지만, 여러 라운드의 스트렙타비딘과 비오틴리레이티드 DNA 배양을 사용하는 대신, DNA/비오틴/스트렙타비딘/항체 복합체를 항체를 방출하는 저 pH 또는 고염 완충액으로 세척한다. 얻어지는 세척 용액을 사용하여 적절한 시동물질(primer)를 이용하여 적절한 조절과 함께 PCR 반응을 수행한다. 최소한 이론상으로는 PCR의 거대한 증폭능력과 특이성을 이용하여 한개의 항원 분자를 탐지할 수 있다.

[0179] **1. 효소결합면역흡착측정법(ELISAs)**

- [0180] 가장 간단하고 직접적인 면역분석법은 결합분석법(binding assay)이다. 본 발명이 속한 분야에서 특징하게 바람직한 면역분석법은 여러 가지 종류의 효소결합면역흡착측정법(ELISAs)과 방사면역측정법(RIA)이다. 조직 절편을 이용한 면역화학적 탐지 또한 특히 유용하다. 그러나, 탐지법이 이러한 기술에 국한하지 않고 웨스턴 블랏팅(western blotting), 점적시험(dot blotting), FACS 분석 및 그와 같은 기술도 이용할 수 있음을 이해하고 있어야 한다.
- [0181] 하나의 예시적인 ELISA에서, 본 발명의 항체를 폴리스티렌 미량 역가판(polystyrene microtiter plate)의 웰(well)과 같이 단백질 친화성을 보이는 선택한 표면에 고정한다. 그 다음, AQP4를 포함하는 것으로 생각하는 시료화합물을 웰(well)에 첨가한다. 결합과 비특이적으로 결합한 면역 복합체를 제거하기 위한 세척 후, 결합한 항원을 탐지할 수 있다. 탐지는 탐지할 수 있는 표지를 연결한 또 다른 항-AQP4 항체를 첨가함으로써 수행할 수 있다. 이러한 형식의 ELISA는 간단한 "샌드위치 ELISA(sandwich ELISA)"이다. 탐지는 두번째 항-AQP4 항체를 첨가하고 두번째 항체에 결합 친화성을 가지고 탐지할 수 있는 표지를 연결한 세번째 항체를 첨가함으로써 수행한다.
- [0182] 다른 예시적인 ELISA에서, AQP4 항원을 포함하고 있는 것으로 의심하는 표본을 웰(well) 표면에 고정하고 항-AQP4 항체와 접촉한다. 결합과 비특이적으로 결합한 면역 복합체를 제거하기 위한 세척 후, 결합한 항-AQP4 항체를 탐지한다. 처음으로 접촉하는 항-AQP4 항체에 탐지가능한 표지를 연결하면, 면역 복합체를 직접적으로 탐지할 수 있다. 위의 예와 마찬가지로 면역 복합체를 첫번째 항-AQP4 항체에 대한 결합 친화도를 가지고 탐지가능한 표지를 연결한 두번째 항체를 이용하여 탐지할 수 있다.
- [0183] 사용한 포맷(format)에 상관없이, ELISA는 코팅(coating), 배양 및 결합, 비특이적으로 결합하는 종을 제거하기 위한 세척, 결합한 면역 복합체를 탐지하는 것과 같이 공통적인 특정한 특징을 가지고 있다. 이들에 대해서는 후술한다.
- [0184] 항원이나 항체로 판을 코팅(coating)하면서, 일반적으로 판(plate)의 웰(well)을 항원 또는 항체 용액과 밤새도록 또는 특정기간의 시간동안 배양을 한다. 그 다음 판(plate)의 웰(well)을 세척하여 불완전하게 흡착한 물질

들을 제거한다. 웰(well)의 표면에 남아있는 잔류물이 무엇이든 다시 시험하는 항혈청에 관해서는 항원적으로 중성인 비특이적인 단백질과 "코팅(coated)"한다. 이러한 단백질은 소혈청 알부민(bovine serum albumin)(BSA), 카제인(casein) 또는 조제분유 용액을 포함한다. 코팅(coating)은 고정된 표면에서 비특이적인 흡착 부위를 막아주도록 하고 그러므로 표면에서 항혈청의 비특이적인 결합에 의하여 야기하는 배경신호(background)를 감소시킨다.

[0185] ELISA에서, 이차 또는 삼차 탐지 수단을 사용하는 것이 직접적인 과정보다 더 일반적인듯 하다. 따라서, 웰(well)에 단백질이나 항체를 결합하고, 비반응적인 물질으로 코팅하여 배경신호를 감소시키고 결합하지 않은 물질들을 제거하기 위하여 세척을 한 후에 고정된 표면을 면역 복합체(항원/항체) 형성을 가능하게 하는 효과적인 조건하에서 시험하고자 하는 생물학적 표본과 접촉시킨다. 면역 복합체의 탐지는 표지한 이차 결합 리간드 또는 항체를 필요로 하고, 이차 결합 리간드 또는 항체는 표지한 3차 항체 또는 3차 결합 리간드와 결합시킨다.

[0186] "면역 복합체(항원/항체) 형성을 가능하게 하는 효과적인 조건(Under conditions effective to allow immune complex (antigen/antibody) formation)"란 BSA, 소혈청 감마 글로불린(bovine gamma globulin)(BGG) 또는 인산염완충식염수(phosphate buffered saline)(PBS)/트윈(Tween)과 같은 용액으로 항원 및/또는 항체를 희석하는 것을 선호적으로 포함하는 조건을 의미한다. 여기에 첨가한 물질 또한 비특이적인 배경신호를 감소하는데 도움을 주는 경향이 있다.

[0187] "적절한(suitable)" 조건 역시 효과적인 결합을 허용하는데 충분한 온도 또는 시간으로 배양하는 것을 의미한다. 배양 단계는 전형적으로 온도는 대략 25℃ 에서 27℃에서 1시간에서 두시간에서 4시간 정도, 또는 약 4℃ 정도에서 오버나이트(overnight)로 진행한다.

[0188] ELISA에서 모든 배양 단계를 진행하면, 접촉한 표면을 복합체를 형성하지 않은 물질(non-complexed material)을 제거하기 위하여 세척한다. 바람직한 세척 과정은 PBS/트윈(Tween), 또는 붕산염 완충액(borate buffer)와 같은 용액으로 세척하는 것을 포함한다. 시험 표본과 원래 결합한 물질간에 특이적인 면역 복합체가 형성되고 이후의 세척을 실시한 이후, 면역복합체의 미세한 양의 발생을 측정할 수 있다.

[0189] 탐지 수단을 제공하기 위하여, 이차 또는 삼차 항체를 탐지가 가능하도록 표지와 연관시킬 수 있다. 되도록이면, 이러한 표지는 적절한 색소생성 기질과 배양할 때 발색을 하는 효소를 사용하는 것이 바람직하다. 그러므로 일례로, 일차 및 이차 면역 복합체를 일정기간 동안 추가적인 면역 복합체 형성을 촉진하는 조건하에서(예를 들어 실온에서 PBS를 포함하는 PBS-트윈(Tween)과 같은 용액으로 2시간동안 배양) 요소분해효소(urease), 포도당 산화효소(glucose oxidase), 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase), 또는 과산화수소 분해효소(hydrogen peroxidase)와 결합한 항체와 접촉하거나 배양하고자 할 수 있다.

[0190] 표지한 항체와 배양하고, 이후의 비결합 물질을 제거하기 위한 세척 후, 표지의 양을 예를 들어, 요소(urea), 또는 브로모크레솔 자주색(bromocresol purple), 또는 2,2'-아지노-디-(3-에틸-벤지아졸린-6-술포닉 산(2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), 또는 효소 표지로 과산화수소 분해효소(peroxidase)를 사용할 경우 H₂O₂와 같은 색소생성 기질(chromogenic substrat)와 배양하는 것으로 정량한다. 정량은 예를 들어 가시선 분광광도계(visible spectra spectrophotometer)를 이용하여 생성한 색의 정도를 측정함으로써 달성할 수 있다.

[0191] **2. 웨스턴 블랏(Western Blot)**

[0192] 웨스턴 블랏(Western blot)(또는 단백질 면역탁본법(protein immunoblot))은 주어진 조직 균질물(homogenate) 또는 추출액(extract)의 표본 내의 특정한 단백질을 탐지하는데 사용하는 분석기법이다. 이는 겔 전기영동(gel electrophoresis)를 이용하여 폴리펩타이드의 길이(변성 조건(denaturing condition)) 또는 단백질의 3-D 구조(자연적/비변성 조건(native/non-denaturing condition))를 이용하여 자연적 또는 변성한 단백질을 분리한다. 단백질은 이후 막(membrane)(전형적으로 니트로셀룰로스(nitrocellulose) 또는 PVDF)에 옮긴 다음 표적 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 조사한다(탐지한다).

[0193] 표본은 전체 조직이나 세포 배양으로부터 얻을 수 있다. 많은 경우, 조직 고형물(solid tissues)를 먼저 믹서(blender)(표본 부피가 클 경우), 조직분쇄기(homogenizer)(적은 부피), 또는 음파파쇄법(sonication)을 이용하여 기계적으로 분쇄한다. 세포들은 상기한 기계적 방법 중의 하나로 파쇄할 수 있다. 그러나 세균, 바이러스 또는 환경적인 표본(environmental samples)이 단백질의 원천이 될 수 있으며 따라서 웨스턴 블랏은 세

포괄적인 연구용으로만 한정할 수 없다는 것을 주지하여야 한다. 세포의 분해를 촉진하고 단백질을 용해하기 위하여 여러 종류의 계면활성제, 염, 및 완충제를 사용할 수 있다. 종종 단백질분해효소 억제제와 인산분해효소 억제제를 추가하여 표본 자체의 효소에 의하여 분해가 되는 것을 방지한다. 조직 준비는 종종 단백질의 변성을 피하기 위하여 저온(cold temperature)에서 수행한다.

[0194] 표본의 단백질은 겔 전기영동(gel electrophoresis)를 이용하여 분리한다. 단백질의 분리는 등전압점(isoelectric point)(pI), 분자량, 전기적 전하, 또는 이들 요소의 조합에 의하여 이루어질 수 있다. 분리의 본질은 표본의 처리와 겔의 특성에 따라 달라진다. 이것은 단백질을 결정하는데 아주 유용한 방법이다. 단백질을 단일 표본으로부터 2차원적으로 퍼져나가게 하는 2차원(2-D) 겔을 사용할 수도 있다. 단백질들은 1차원적으로는 등전압점(isoelectric point)(전체 전하가 중성이 되게 되는 pH)에 따라 분리하고 2차원적으로는 그들의 분자량에 따라 분리한다.

[0195] 단백질을 항체로 탐지할 수 있도록 하기 위해서, 단백질을 겔 내에서 부터 니트로셀룰로스(nitrocellulose) 또는 폴리비닐덴 디플로라이드(polyvinylidene difluoride)(PVDF)로 만들어진 막(membrane)으로 전달한다. 막은 겔 위에 위치하고 여과지 더미를 그 위에 올려놓는다. 전체 더미를 모세작용에 의하여 종이까지 이동하면서 단백질을 함께 이동시킬 완충액 용액에 위치시킨다. 단백질을 이동시킬 또 다른 방법은 전기 블롯팅(electroblotting)이라고 하는 방법으로 전류를 이용하여 겔의 단백질을 PVDF나 니트로셀룰로스(nitrocellulose) 막으로 이동시킨다. 단백질은 겔에 존재할 때 위치한 체제(organization)를 유지하면서 겔로부터 막으로 이동한다. 이 블롯팅 과정의 결과로써, 단백질을 탐색을 위하여 얇은 표면 층에 노출하게 된다(아래 참조). 두 종류의 막은 그들의 단백질에 대한 비특이적인 결합 특성(즉, 모든 단백질과 동일하게 잘 결합한다)으로 인하여 선택한 것이다. 단백질 결합은 막과 단백질간의 전하적인 상호작용 뿐만 아니라 소수상호작용(hydrophobic interaction)에 기초하여 일어난다. 니트로셀룰로스 막은 PVDF보다 저렴하지만 좀 더 취약하고 반복하는 조사에 잘 견디지 못한다. 단백질의 겔로부터 막으로의 이동의 균일성과 전체적인 유효성은 막을 코마시브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue) 또는 폰슈 S(Ponceau S) 염색약으로 염색하여 확인할 수 있다. 일단 이동시키면 단백질은 표지한 일차 항체 또는 표지하지 않은 일차항체 후 표지한 단백질 A 나 일차 항체의 Fc 부위와 결합하는 표지한 2차 항체를 이용하여 간접적으로 탐지할 수 있다.

[0196] **3. 면역조직화학(Immunohistochemistry)**

[0197] 항체는 또한 면역조직화학(IHC)에 의한 연구를 위해 준비한 갓 냉동한 및/또는 포르말린으로 고정한(formalin-fixed), 파라핀에 묻은(paraffin-embedded) 조직 블록(block)과 함께 사용할 수 있다. 이들 미립자 시료로부터 조직 블록을 준비하는 방법을 이용하여 이전의 다양한 예후인자의 IHC 연구에 성공적으로 사용하였으며, 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 기술이다(브라운(Brown) 등 1990; 아본단조(Abbondanzo)등, 1990; 알레드(Allred) 등, 1990).

[0198] 간단하게, 냉동절편(frozen-section)은 50 ng의 냉동 "분쇄(pulverized)" 조직을 실온에서 작은 플라스틱 캡셀(capsule) 내에서 인산염완충식염수(PBS)에 재수화; 원심분리하여 입자를 침전; 침전을 점성의 임베딩 매체(embedding medium)(OCT)에 현탁화; 캡셀을 반전하고/또는 원심분리로 재침전; -70°C 이소펜테인(isopentane)에 급속동결(snap-freezing); 플라스틱 캡셀을 절단하고/또는 조직의 냉동 실린더(cylinder)를 제거; 냉동미세절단기(cryostat) 박절기(microtome) 척(chuck)에 조직 실린더에 고정; 캡셀로부터 및/또는 25-50개의 연속 절편을 생성함으로써 준비할 수 있다. 다른 방법으로는 전체 냉동 조직 표본을 연속절편절단을 위해서 사용할 수 있다.

[0199] 영구적인 절편(permanent-section)은 50 mg 표본을 플라스틱 마이크로퓨지 튜브(microfuge tube)에서 재수화; 10% 포르말린(formalin)에서 현탁화 하여 4시간 고정; 세척/침전(pelleting); 따뜻한 2.5% 우무배지(agar)에 현탁화; 침전(pelleting); 우무배지를 경화하기 위하여 얼음물에서 식힘; 튜브로부터 조직/우무배지 블록(block)을 제거; 블록(block)을 파라핀(paraffin)에 침윤 및/또는 임베딩(embedding) ; 및/또는 최대 50개의 연속적인 영구 절편으로 절단하는 것을 포함하는 유사한 방법으로 준비할 수 있다. 마찬가지로, 전체 조직 표본으로 대체할 수 있다.

[0200] **4. 면역탐지법 키트(Immunodetection Kits)**

[0201] 또 다른 실시예로, 상기한 면역측정법을 이용한 면역탐지 키트가 있다. 따라서 면역탐지 키트는 적절한 용기 수

단(container means), AQP4 항원에 결합하는 1차 항체, 및 선택사항으로 면역탐지 시약을 포함한다.

- [0202] 어떤 실시예에서 AQP4 항체를 컬럼 매트릭스(column matrix) 및/또는 미량역가관의 웰(well)과 같은 고체 지지체에 사전에 결합시킬 수 있다. 키트의 면역탐지 시약은 주어진 항체와 연결하거나 연관될 수 있는 탐지가능한 표지를 포함하는 여러 가지 형태의 어느 한 형태를 취할 수 있다. 탐지가능한 표지를 2차 결합 리간드(ligand)와 연관하거나 리간드에 결합하는 것 또한 고려할 수 있다. 전형적인 2차 리간드는 1차 항체에 대한 결합 친화력을 갖는 2차 항체이다.
- [0203] 추가적으로 본 발명에서 사용기에 적합한 면역탐지 시약은 2차 항체에 대한 결합 친화력을 갖는 탐지가능한 표지와 연결한 3차 항체와 함께 1차 항체에 대한 결합 친화력을 갖는 2차 항체로 구성하는 2개의 구성요소 시약을 포함한다. 위에서 언급한 것처럼, 상당수의 전형적인 표지는 본 발명이 속한 분야에 알려져 있으며 모든 표지는 여기에서 논의한 실시예와 관련하여 적용할 수 있다.
- [0204] 키트는 추가해서 탐지 분석을 위한 표준곡선을 준비하는데 사용할 수 있는 표지하거나 표지하지 않은 AQP4 항원을 적절하게 등분한 구성으로 구성할 수 있다. 키트는 완전히 결합한 형태, 중간물 형태, 또는 키트의 사용자가 결합하도록 분리한 부분의 형태로 항체-표지 결합물을 포함할 수 있다. 키트의 구성물은 수성 매체 또는 동결 건조한 형태로 포장할 수 있다.
- [0205] 키트의 포장 수단은 일반적으로 하나 이상의 바이알(vial), 시험관, 플라스크(flask), 병, 항체가 위치할, 또는 선호적으로는 적절하게 등분한, 주사기 또는 다른 포장 수단을 포함한다. 키트는 또한 상업적인 판매를 위해 밀봉한(in close confinement for commercial sale) 항체, 항원, 및 다른 시약 용기를 포함하는 수단을 포함한다. 이러한 용기는 원하는 바이알(vial)을 유지하는 인젝션(injection) 또는 블로우 몰드(blow-molded)한 플라스틱(plastic) 용기를 포함할 수 있다.
- [0206] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 발명의 특정 실시예를 추가로 설명하기 위하여 포함한다. 본 발명은 본 명세서에 제시한 특정 실시예의 자세한 설명과 하나 또는 그 이상의 그림들을 조합하여 참조할 때 더 잘 이해할 수 있을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0207] 도 1a-도 1b. AQP4 이소형에 결합하는 NMO-IgG의 양을 측정하기 위한 2색 비율 영상화 방법(two-color ratio imaging method)의 모식도.
 도 1a는 AQP4 단량체(원통형)를 사량체(tetramer)(위) 또는 OAP(아래)로 조립하는 것을 보여준다. NMO-IgG(녹색)는 AQP4의 세포외 도메인(extracellular domain)에 결합하고, 참고용 AQP4 항체(녹색)은 세포 내측에 결합한다.
 도 1b는 참고용 AQP4 항체는 AQP4 N-말단 이소형과 OAP 형성에 무관하게 AQP4의 C-말단에 결합하는 것을 보여준다.
- 도 2a-도 2d. 안정적으로 진행형질전환한(transfected) AQP-4를 발현하는 U87MG 세포의 특성
 도 2a는 안정적으로 M1(상)이나 M23(하)을 발현하고 NMO-IgG(녹색)과 C-말단 항-AQP4 항체(적색)으로 염색한 U87MG 세포들을 보여주는 동일초점 형광 현미경 영상을 보여준다..
 도 2b는 M23을 발현하는 세포에서 독특한 OAP(하)과 M1을 발현하는 세포의 매끄러운(smooth) 형광 염색 패턴(상)을 보여주는 모든 내부반사 형광 영상(total internal reflection fluorescence image)을 나타낸다.
 도 2c는 안정적으로 AQP4를 발현하는 U87MG 세포 용해물(lysates)의 AQP4 면역탁본(immunoblot) 후 청색-비환원 젤 전기영동(blue-native gel electrophoresis)(상)과 트리신(Tricine) SDS-전기영동(하)한 결과를 보여준다.
 도 2d는 안정적(회색)으로 또는 일시적(백색)으로 M1 또는 M24 AQP4를 진행형질전환한 후 상기한 제조법 단일 클론 NMO-IgG로 표지한 U87MG 세포에서 측정된 녹색 대 적색 형광 비(G/R)를 보여준다.
- 도 3a-도 3b. NMO환자 혈청에서 얻은 NMO-IgG의 M1 AQP4와 M23 AQP4에 대한 결합도 차이
 도 3a는 M1과 M23을 발현하는 U87MG 세포를 4명의 환자로 부터 얻은 5% MNO 혈청(녹색)과 기준(reference) AQP4 항체(적색)으로 염색한 사진을 보여준다.

도 3b는 NMO 환자 혈청의 M1과 M23 AQP4에 대한 결합 곡선(평균 ± 표준편차, n=5). 곡선은 단일위치결합(single-site binding) 모형에 들어맞음을 보인다.

도 4a-도 4b. 순화한 단일 클론 NMO-IgG의 M1 AQP4와 M23 AQP4에 대한 결합도 차이.

도 4a는 기준 AQP4 항체(적색)와 함께 농도의 함수로써 rAb-53과 rAb-58(녹색)의 결합을 보여주는 대표적인 형광 현미경 화상이다

도 4b는 rAb-53(좌), rAb-58(중앙), rAb-186(우)의 M1과 M23 AQP4에 대한 결합 곡선(평균 ± 표준편차, n=5). 곡선은 단일위치결합 모형에 들어맞음을 보인다.

도 5a-도 5c. NMO-IgG의 M1과 M23 AQP4의 혼합물에 대한 결합과 OAP를 파괴하는 돌연변이를 함유하는 M23 돌연변이에 대한 결합.

도 5a는 rAb-53의 결합(좌)과 확산범위의 누적 배포(우), 지정한 비율의 M1과 M23 AQP4 혼합물에 대한 양자점 단일입자 추적에 의한 측정(평균 ± 표준편차, n=5)이다.

도 5c는 rAb-53의 결합(좌)과 AQP4 돌연변이 M23-F26Q(적색)과 M23-G29P(녹색)의 확산범위(우)(평균 ± 표준편차, n=5)이다.

도 6a-도 6d. 어레이를 형성한(array-assembled) AQP4에 대한 증가한 NMO-IgG 결합 친화도의 기작.

도 6a는 전체 IgG에서 Fab결합부간 간격과 비교한 AQP4 사량체(tetramer)의 상대적인 크기를 보여주는 인간 IgG와 AQP4 결정구조(해리스(Harris) 등, 1998; 호(Ho) 등, 2009)이다.

도 6b는 이가(bivalent) 결합 대 일가(monovalent) 결합 기작의 예측. AQP4 단량체(monomer)(원통형)가 결합하여 사량체(M1)나 OAP(M23)을 형성하는 것을 표시한다. NMO-IgG(녹색)이 일가 또는 이가적으로 AQP4에 있는(알려지지 않은) 세포의 도메인에 결합한다.

도 6c는 쥐 단일 클론 항-Myc 항체의 Myc-표지한 M1과 M23 AQP4를 발현하는 세포에의 결합이다.

도 6d는 고정된 농도에서 쥐 항-Myc(좌), rAb-53(중앙), rAb-58(우)의 전체 IgG 또는 순화한 Fab 단편의 M1에 대한 M23의 상대적인 결합(평균 ± 표준편차, n=5)이다.

도 7a-도 7c. 아쿠아포루맘(aquaporin) 치료법을 위한 고친화성 재조합 항-AQP4 단일 클론 항체.

도 7a는 IgG1 항체와 같은 배율로 나타낸 AQP4 사량체의 결정 구조이다.

도 7b는 AQP4를 재구성한 프로테오리포솜(proteoliposome)에 결합한 재조합 항체의 표면 플라즈몬 공명 측정(surface plasmon resonance measurement)은 각기 다른 농도에서의 rAb-53(좌)과 일정한 농도에서 다른 NMO rAb(우)의 결합/분리 역학을 나타낸다.

도 7c는 AQP4를 발현하는 U87MG 세포에 대한 rAb-53(25 µg/ml)의 결합과 분리 역학. 결합은 특정시간동안 rAb-53을 인큐베이션(incubation)시킨 다음 씻고, 고정하고, 형광 이차 항체를 첨가하여 측정한다. 분리는 rAb-53과 60분간 인큐베이션 시킨 후 항체가 없는 완충액으로 특정시간동안 씻어주어 측정한다. 위: rAb-53(적색)으로 표면을 염색한 세포를 보여주는 대표적인 현미경사진. 아래: 결합 평균 데이터(평균 ± 표준편차, n=4).

도 8a-도 8d. 돌연변이시킨, 비병원성 rAb-53(아쿠아포루맘)이 병원성 NMO-IgG가 AQP4에 결합하는 것을 방해함

도 8a는 rAb-53의 중쇄(VH)와 경쇄(VL)의 변이 부위, 경쇄 불변 부위(CL), IgG1중쇄 불변 부위(CH1-CH3)을 보이는 모식도이다.

도 8b는 돌연변이시킨 rAb-53(L234A/L235A)와 AQP4 재구성한 프로테오리포솜의 결합과 분리의 표면 플라즈몬 공명 측정이다.

도 8c는 돌연변이 rAb-53는 Cy3-표지(비돌연변이성) rAb-53이 AQP4를 발현하는 세포에 결합하는 것을 방해함을 보여준다. Cy3 형광은 AQP4-없는(제일 좌측 패널) 또는 AQP4를 발현하는(다른 패널들) 세포들을 20 µg/ml의 Cy3-rAb-53과 1시간동안 표시한 100 µg/ml 의(표지하지 않은) 항체들이 존재하거나 존재하지 않은 상태로 배양한다.

도 8d는 관련하지 않은 단일 클론 NMO 항체와 인간 NMO 혈청이 AQP4와 Cy3-표지한 rAb-53의 결합을 방지함을 보여준다. 세포 내에서 영상화한 Cy3 형광은 10%의 대조(NMO가 아닌) 또는 NMO 환자 혈청, 또는 100 µg/ml의 재

조합 NMO 단일 클론 항체 rAb-186의 존재 또는 부재 하에 20 µg/ml의 Cy3-rAb-53과 배양한다.

도 9a-도 9d. 돌연변이 비병원성 rAb-53 아쿠아포루맵(aquaporumab)은 NMO-IgG에 노출한 AQP4 발현 세포에서 CDC와 ADCC를 방지한다.

도 9a는 대조(비-NMO) mAb나 rAb-53(2.5 µg/ml, 비돌연변이 또는 돌연변이)와 함께 AQP4를 발현하는 CHO 세포의 인간 보체에 노출 90분 후의 살아있는/죽은 세포 분석. 죽은 세포의 백분율을 좌측에 요약하였다(평균 ± 표준편차, n=4-6, rAb-53만 처리하였을 때와 비교시 *P<0.001).

도 9b는 A와 같은 분석을 12.5 µg/ml의 표시한 아쿠아포루맵의 존재하에서 보체 + rAb-53으로 실시한 결과이다.

도 9c는 표시한 아쿠아포루맵의 존재 또는 부재 하에서 대조(비-NMO) 혈청 또는 보체의 존재하의 NMO 환자 혈청에 60분간 노출한 살아있는/죽은 세포 분석이다.

도 9d는 대조(비-NMO) mAb 또는 rAb-53 또는 아쿠아포루맵(개별적으로), 또는 rAb-53과 아쿠아포루맵과 함께 NK-세포와 배양한 AQP4 를 발현하는 CHO 세포를 이용하여 수행한 ADCC 분석이다.

도 10a-도 10c. 아쿠아포루맵(aquaporumab)은 NMO-IgG와 인간 항체의 뇌내 주사로 생체 내 생산한 마우스 두뇌 내의 유사 NMO 병변을 감소시킨다.

도 10a는 뇌내 주사 후 24시간의 마우스 두뇌 단면의 헤마토자일린(hematoxylin)과 이오신(eosin)(H&E)와 루솔 패스트 블루(Luxol fast blue)(수초(myelin))으로 염색하고 AQP4(AQP4)와 C5b-9(활성화한 보체)로 갈색으로 면역염색한 패널. 뇌내 주사는 NMO-IgG(NMO혈청으로부터 순화한 IgG)와 인간 보체, 아쿠아포루맵(aquaporumab)(Aqmab)의 유무, 대조군들(대조 IgG, AQP4 녹아웃(knockout) 쥐, Aqmab만)로 구성한다. 분홍색 선은 루솔 패스트 블루 염색이나 AQP4 면역염색이 부재하는 영역을 표시한다. 검정색 선은 주사한 반구와 주사 자국을 나타낸다. 화살표, 호중구; 화살머리, 혈관주위 C5b-9 면역활성; V, 혈관. 막대, 50 µm.

도 10b는 분홍표시/검정표시의 면적 %로 정량한 AQP4와 수초 상실(표준오차평균(S. E. M.), 그룹당 5마리의 쥐, *P<0.01)이다.

도 10c는 5쌍의 쥐에서 나타난 수초와 AQP4 상실 %로서, 각 쌍은 아쿠아포루맵의 유무하에 인간 보체를 넣은 다른 NMO환자로부터 얻은 NMO-IgG를 주사하였다.

도 11a-도 11b. 아쿠아포루맵(aquaporumab)은 생체의 척수 단편 배양 내에 NMO-IgG와 인간 보체로 생산한 유사 NMO 병변을 감소시킨다.

도 11a는 척수 단편을 7일간 배양한 후 아쿠아포루맵(Aqmab)의 유무 하에서 NMO-IgG(NMO 혈청에서 순화한 IgG)와 인간 보체의 존재 하에서 3일간 배양한 생체의 척수 단편 배양 모형이다. 면역염색은 AQP4, GFAP와 수초를 나타낸다. 대조군은 비-NMO IgG, NMO-IgG 또는 Aqmab만, 보체와 Aqmab, AQP4없는 쥐(AQP4 null mice)로부터 얻은 단편 배양을 포함한다.

도 11b는 NMO 병변점수이다(실험 방법 참조)(표준오차평균(S. E. M), n=4-5, P<0.001).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0208] 이후의 예는 바람직한 실시예를 실증하는 것을 포함한다. 실시예에서 잘 작동하는 발명자들이 발견한 표시 기술들을 따르는 예에서 공개한 기술이 속한 분야의 사람들에게 평가받을 수 있고, 따라서 그 연습을 위한 선호 모드(mode)를 구성하는 것으로 고려할 수 있다. 그러나 본 발명이 속한 분야의 사람들은 본 발명의 관점에서 공개한 특정한 시행례에서 많은 변화를 가져올 수 있고 본 발명의 정신이나 범위를 벗어나지 않는 동일하거나 유사한 결과를 여전히 얻을 수 있다는 사실을 이해해야 한다.

[0209] 실시예 1 - 재료와 방법

[0210] DNA 컨스트럭트(construct), 세포 배양 및 유전자 전달감염(transfection). 전체 길이의 인간 AQP4(M1과 M23 이소형(isoform))을 부호화하는 DNA 컨스트럭트를 전체 두뇌 cDNA를 주형으로 하여 PCR 증폭에 의하여 생성한다. 몇몇 연구에서 Myc 항원결정인자(epitope)(NH₂-EQKLISEEDL-COOH; 서열번호 13)를 표지하지 않은 컨스트럭트(non-tagged construct)를 주형으로 하여 PCR 증폭에 의하여 제 3세포의 루프(loop)에 삽입한다. 모든

PCR 단편을 포유류 발현 벡터(vector) pcDNA3.1에 결합하고(ligated) 완전히 염기 서열을 분석하였다.

[0211] U87MG 세포 배양(ATCC HTB-14)은 37°C에서 5% CO₂/95%의 공기에서 10% 소태아혈청, 100 U/mL 페니실린(penicillin)과 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함한 EMEM 배지에서 유지하였다. 세포들을 유리 커버슬립(cover slip)에서 배양하고 항생제가 없는 배지에서 제조자의 연구계획서에 따라 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000)(인비트로젠(Invitrogen), 칼스배드(Carlsbad), CA)을 이용하여 DNA를 유전자 전달감염시켰다. 안정하게 AQP4를 발현하는 클론(clone)을 선정하여 제네티신(Geneticin)(인비트로젠(Invitrogen))으로 강화한 다음 96웰 플레이트(96-well plate)에 아주 낮은 밀도로 평판배양한다.

[0212] **NMO 환자 혈청과 재조합 AQP4 자가항체.** NMO 혈청은 임상질병을 위한 진단 기준 교정본(윙거척(Wingerchuk) 등, 2006)에 합치하는 네 명의 NMO-IgG 양성혈청 환자로부터 획득하였다. 대조(비NMO) 인간 혈청은 UCSF 세포 배양 시설로부터 구매하였다. 재조합 단일 클론 NMO 항체는 클론에 의하여 확장한(clonally-expanded) 뇌척수액 형질모세포로부터 이전에 기술한 방법에 의하여 생성하였다(벤넷(Bennett) 등, 2009). 중쇄 및 경쇄 컨스트럭트를 HEK293 세포에 함께 유전자 전달감염시켜 상등액을 얻고, 세포나 조직파편을 원심분리하여 제거하고, 단백질 A-세파로스(protein A-Sepharose)(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 세인트 루이스(St. Louis), MO)와 4°C에서 오버나이트(overnight)로 배양하였다. rAB를 0.1M 글리신(glycine)/1M NaCl(pH 3.0)에서 용출하고 0.1M 트리스-HCl(Tris-HCl), pH 8.0을 사용하여 pH 7.5로 조절한다. 재조합 IgG를 그 다음에 교환하고 0.1% 단백질 분해 효소가 없는 소혈청 알부민을 포함하는 PBS에서 울트라셀(Ultracel) YM-30 소형 농축기(microconcentrator)(밀리포어(Milipore), 빌레리카(Billerica), MA)를 이용하여 농축한다. Fab 단편은 전체 IgG를 고정된 파파인(papain)으로 절단하고, 단백질-A(protein-A)(서모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 록포드(Rockford), IL)에 의하여 절단되지 않은 IgG와 Fc 단편을 제거하여 순화한다. 항체의 통합성을 변성 및 비변성 겔 전기영동(gel electrophoresis)으로 확인하고, IgG 농도를 인간 IgG-포착 ELISA를 이용하여 분석한다.

[0213] **정량적 면역형광법.** AQP4를 발현하는 U87MG 세포를 20분간 생세포 차단 완충액(live-cell blocking buffer)(6mM 포도당, 1mM 피루브산(pyruvate), 1% 소혈청 알부민, 2% 염소 혈청을 함유하는 PBS)에서 배양하고, 그 다음 30분간 NMO 환자 혈청이나 재조합 NMO-IgG와 차단 완충액에서 배양한다. 세포를 이후 PBS와 광범위하게 헹구어 낸 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 15분간 고정하고, 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100)으로 투과가능하게(permeabilize) 한다. 세포는 다시 차단하고 30분간 0.4 mg/mL C-말단 특이적인 다클론 토끼 항-AQP4 항체(산타크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 산타크루즈(Santa Cruz), CA)와 배양한 다음, PBS로 헹군다. 최종적으로 세포를 30분간 4 µg/mL 염소 항-인간 IgG-결합 알렉사 플루어 488(Alexa Fluor 488)과 염소 항-토끼 IgG-결합 알렉사 플루어 555(Alexa Fluor 555)(인비트로젠(Invitrogen))을 함유한 차단 완충액과 배양한다. 2차 항체와 배양한 후, 세포를 PBS로 광범위하게 헹구고, 커버글라스(coverglass)를 벡타마운트 하드셋 매체(VectaMount hard-set medium)(벡터 라보라토리(Vector Laboratories), 버링게임(Burlingame), CA)로 마운트(mount)한다. 어떤 실험들은 U87MG 세포들을 상기한 것처럼 표지하지만, 단일 클론 마우스(mouse) 항-Myc IgG(코벤스(Covance), 에머리빌(Emeryville), CA)나 전체 NMO-IgG 대신 순화한 Fab 단편으로 표지한다. 항-Myc는 염소 항-마우스(mouse) IgG-연결 알렉사 플루어 488(Alexa Fluor 488)(인비트로젠(Invitrogen))으로 염색하는 반면, Fab 단편은 다이라이트 488과 연결한 F(ab')₂-특이적 2차 항체(Dylight 488-linked F(ab')₂-specific secondary antibodies)(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 웨스트 그로브(West Grove), PA)를 이용하여 염색한다. AQP4-항체 결합의 정량적인 분석은 니콘 10x 공기 대물렌즈(Nikon 10x air objective)(개구(numerical aperture) 0.3)를 장비한 니콘 이클립스 TE2000S 도립 에피플루오레센스 현미경(Nikon Eclipse TE2000S inverted epifluorescence microscope)(니콘(Nikon), 멜빌(Melville), NY)를 이용하여 수행하였다. 녹색 및 적색 염색약은 크로마 필터 셋(Chroma filter sets) #41001과 #42001(크로마(Chroma), 로킹햄(Rockingham), VT)을 통하여 각각 여기시키고(excited) 관찰하였다. 영상은 CCD 카메라(하마마츠 오르카(Hamamatsu Orca), 브리지워터(Bridgewater), NJ)를 이용하여 녹화하였고, 강도는 사용자 정의 소프트웨어(custom software)를 이용하여 측정하였다.

[0214] **전반사형광현미경.** TIRFM은 니콘 이클립스 TE2000E 현미경(Nikon Eclipse TE2000E microscope)과 퍼펙트 포커스 모듈(perfect focus module)(니콘(Nikon))에 장착한 스루-오브젝티브 TIRF 부착물(through-objective TIRF attachment)과 100x TIRF 유침 대물렌즈(oil immersion objective)(개구(numerical aperture) 1.49)를 이용하여 수행하였다. 알렉사 플루어 555로 표지한 AQP4(Alexa Fluor 555-labeled AQP4)를 아르곤 이온 레이저(Argon-ion laser)로 Z514/10x 여기 필터(excitation filter)와 Z514RDC 다이크로익 거울(dichroic mirror)를 통하여 여기(excite)시키고, ET605/40m 방출 필터(크로마(Chroma))를 통하여 탐지하였다. 영상은 콰트EM 512SC 딥-컬러드 CCD 카메라(QuantEM 512SC deep-colored CCD camera)(포토메트릭스(Photometrics), 투산(Tucson),

AZ)를 이용하여 획득하였다.

[0215] **단일 입자 추적(Single particle tracking).** 퀀텀 닷(quantum dots)(큐닷츠(Qdots))을 이용한 AQP4의 표지에 앞서서, Myc-표지한 AQP4(Myc-tagged AQP4)를 발현하는 세포를 6 mM 포도당과 1 mM 피루브산(Pyruvate)를 포함한 2ml PBS로 세척하고 차단 완충액과 5분간 배양한다. 세포를 이후 70 ng/mL 마우스 항-Myc 항체(mouse anti-Myc antibody)(코벤스(Covance))가 들어있는 차단 완충액에서 5분간 배양하고, 평균 다음, 0.1 nM 염소 F(ab')₂ 항-마우스 IgG 결합 Qdot 655(인비트로젠(Invitrogen))가 들어있는 차단 완충액에서 5분간 배양한다. 세포를 광범위하게 행구고 시험기간 동안 GP 완충액에 유지한다. 단일입자추적(SPT)는 니콘 100x TIRF 유침 대물렌즈(oil immersion objective)(개구(numerical aperuture) 1.45)와 딥-쿨드 CCD 카메라(deep-cooled CCD camera)(하마마츠 EM-CCD(Hamamatsu EM-CCD), 브리지워터(Bridgewater), NJ)를 장비한 니콘 이클립스 TE2000S 도립에피플루오레센스 현미경(Nikon Eclipse TE2000S inverted epifluorescence microscope)를 이용하여 수행하였다. Qdot 형광은 E460SPUV 여기 필터와 475DCXRU 디크로익 거울(dichroic mirror)를 이용하여 여기하였고, D655/40m 방출 필터(크로마(Chroma)를 통하여 탐지하였다. 데이터는 11ms마다 한 프레임씩(91Hz) 6초간 계속적으로 획득하였다. 연속영상은 이전에 자세히 설명한 것처럼 분석하고 궤도를 구성하였다(크레인과 버크만(Crane and Verkman), 2008). 확산 데이터(diffusion data)는 1s의 거리의 누적분포의 형태로 보고되며, P(거리)는 입자의 거리가 t=1s 에서 주어진 거리와 동일하거나 더 작을 확률로 정의한다.

[0216] **전기영동과 면역탁본법(immunoblotting).** 배양한 세포들을 0.5% 도데실-β-D-말토스배당체(dodecyl-β-D-maltoside)(EMD 케미칼스(EMD Chemicals), 깁스타운(Gibbstown), NJ)를 함유한 비변성 PAGE 표본 완충액(인비트로젠(Invitrogen))으로 10분간 얼음 위에서 용해한다. 용해물을 4℃에서 30분간 20,000g로 원심분리하고 침전물은 버린다. 청색-비변성 겔 전기영동(Blue-Native gel electrophoresis)(BN-PAGE)를 위해서, 폴리아크릴아마이드 비변성 구배 겔(polyacrylamide native gradient gel)(3-9%)을 이전에 설명한 것처럼 준비한다(위티그(Wittig) 등, 2006). 10 μg의 단백질을 5% 코마시 블루 G-250(Coomassie Blue G-250)(인비트로젠(Invitrogen))과 혼합하여 각 레인(lane)에 로드(load)한다. 페리틴(Ferritin)을 분자량 표준(440에서 880kDa)으로 사용하였다. 전기영동 완충액은 다음과 같다: 25 mM 이미다졸(imidazole), pH 7(양극 완충액)과 50mM 트리신(Tricine), 7.5 mM 이미다졸(imidazole), 0.02% 코마시 블루 G-250(Coomassie Blue G-250), pH 7(음극 완충액). 트리신 SDS-PAGE(Tricine SDS-PAGE)를 12% 영동겔(running gel)과 3% 농축겔(stack gel)을 사용하여 이전에 설명한 것처럼 수행하였다(샤거와 트리신(Schagger and Tricine), 2006). 시블루 플러스2 사전염색 표준(SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard)(인비트로젠(Invitrogen))을 분자량 표지로 이용하였다. 단백질을 폴리비닐 디플루오라이드 막(polyvinyl difluoride membrane)(바이오-래드(Bio-Rad), 허큘리스(Hercules), CA)에 블롯(blot)한다. 면역탁본 분석을 위해서, 막을 3% BSA로 차단하고, 토끼 항-AQP4 1차 항체(산타크루즈(Santa Cruz))와 2시간 배양한다. 막을 이후 평균 후 홍당무 과산화효소-결합 염소 항-토끼 IgG(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch))와 1시간 배양하고, 충분히 행구어 준 다음, 표지된 단백질을 ECL 플러스 효소적 화학발광 키트(ECL Plus enzymatic chemiluminescence kit)(애머삼 바이오사이언스(Amarsham Bioscience), 피츠버그(Pittsburgh), PA)를 이용하여 탐지한다.

[0217] **실시예 2 - 결과**

[0218] **AQP4와 결합하는 NMO-IgG의 정량적 분석을 위한 접근.** 도 1은 AQP4와 결합하는 NMO-IgG의 정량적 분석을 위하여 사용하는 접근법의 개략도이다. 형질막에서 특이적인 AQP4 이소형(들)(isoform(s))을 발현하는 세포를 NMO-IgG(NMO 환자 혈청 또는 재조합 단일 클론 항체)와 배양을 한 다음, 고정하고, 투과 가능하게 한 다음, 항-AQP4 항체와 배양한다(도 1a). 항-AQP4 항체는 모든 AQP4 이소형에 공통인 AQP4의 C-말단을 인식한다(도 1b). 형광의 2차 항체를 사용하여 NMO-IgG는 녹색 형광으로, AQP4는 적색 형광으로 탐지하였다. AQP4에 결합하는 NMO-IgG는 녹색대 적색(green-to-red)(G/R)의 형광비로 정량화하였다. 결합 친화도와 화학양론(stoichiometry)를 NMO-IgG 농도를 증가시키면서 적정하여 결정한다. 단일 NMO-IgG 농도에서 측정된 것과 대조적으로 전체적인, 농도-의존적인 결합의 측정은 AQP4에 결합하는 NMO-IgG의 정량적이고 공정한 설명을 제공한다.

[0219] AQP4에 대한 NMO-IgG의 결합에 대한 분석을 위한 세포주는 안정적으로 또는 일시적으로 유전자 전달감염을 시킨 다음 인간 신경아세포 기원의 빠른 성장 및 커버글래스 지지물(coverglass support)에 강한 유착성을 보일 뿐 아니라 AQP4 이소형의 효과적인 형질막 표적화를 보이는 세포주를 선택하였다. 선택한 세포주 U87MG는 별아교세포종으로부터 유래하였다(폰텐과 매킨타이어(Ponten and Macintyre), 1968). 도 2a는 M1 또는 M23 AQP4를 안정적으로 발현하고, 재조합 단일 클론 NMO-IgG(녹색)과 항-AQP4 항체(적색)으로 염색한 U87MG 세포의 고배율 공초

점 현미경 사진을 보여준다. AQP4는 세포의 형질막에 존재하며 약간의 세포내 적색 형광을 보인다. 도 2b는 항-AQP4 항체로 염색한 AQP4 발현세포의 TIRFM을 보여준다. 다른 세포형에서 발견할 수 있는 것처럼(크레인(Crane) 등, 2008), M1-AQP4에서는 매끄러운 형광 패턴(smooth pattern)을 보여주고 M23-AQP4에서는 점상의 패턴(punctate pattern)을 보여주어 유전자 전달감염한 U87MG 세포에서 M23-AQP4는 OAP를 형성하는 반면, M1-AQP4는 그렇지 않다는 것을 확인할 수 있다. 세포 균질화물의 면역탁본 분석은 AQP4의 M1과 M23 이소형의 기대한 분자량을 보인다(도 2c, 아래). M23만을 발현하는 세포의 BN-PAGE는 기대되는 대형 초분자 응집체(large supramolecular aggregate)(OAP)에 대응하는 다수의 고분자량 밴드를 보이는 반면, M1을 발현하는 세포는 기대했던 것처럼 개별의 AQP4 4합체에 대응하는 ~300kDa 밴드만을 보인다(도 2c, 위). 도 2d는 재조합 단일 클론 NMO-IgG(rAb-53, rAb-58, 및 rAb-186) 또는 대조군 항체(rAb-2B4)(각 20 µg/mL)과 M1 또는 M23 AQP4를 발현하는 세포의 결합 후 측정된 녹색대 적색비(G/R)의 일례를 보여준다. 이러한 초기 측정은 NMO-IgG와 M1 대 M23 AQP4 이소형(isoform)의 상당한 다양성을 보이며, 안정적으로 및 일시적으로 유전자 전달감염한 U87MG 세포 양쪽에서 비슷한 결과를 보여준다.

[0220] **NMO 혈청 표본에서 AQP4 이소형(isoform)과 비균질 NMO-IgG의 결합.** 인간 NMO 혈청에서 M1과 M23 AQP4 이소형(isoform)에 대한 NMO-IgG의 결합을 형광 비 영상법(fluorescence ratio imaging method)으로 측정하였다. 1:100 희석으로 공부한 NMO 환자로부터 얻은 10개의 혈청 표본에서 실시한 초기 측정은 0.14에서 0.67까지 광범위한 범위의 상대적인 M1:M23 결합을 보인다. 도 3a는 4명의 NMO 환자로부터 얻은 혈청 표본의 대표적인 형광현미경 영상을 나타낸다. 각 혈청 표본은 M23 AQP4에 강한 NMO-IgG 결합을 보이나 M1 AQP4에 대해서는 다양한 결합을 보인다. 도 3b는 혈청 농도의 함수로 결정한 배경-수정한 R/G 비에 따른 농도-의존적인 NMO-IgG 결합을 보여준다. AQP4에 대한 NMO-IgG 결합은 0.11(혈청1), 0.26(혈청2), 0.03(혈청3), 0.21(혈청4)의 상대적인 M23:M1 결합 친화도로 포화가 가능하다. 흥미롭게도, NMO 혈청의 다클론성 구성 추정에도 불구하고 결합 데이터가 단일 힐 상수(unity Hill coefficient) 부근에서 단일-부위, 포화가능 결합 모형에 잘 들어맞는다. 혈청의 전체 IgG에서 NMO-IgG의 분율 및 다클론 NMO-IgG 구성의 비율을 알 지 못하므로 혈청을 이용한 AQP4에 대한 NMO-IgG의 절대적인 결합 친화도를 결정하는 것은 불가능하다.

[0221] **AQP4 이소형(isoform)에 대한 재조합 단일 클론 NMO-IgG의 정량적인 결합.** 단일 NMO환자로부터의 혈청 내의 NMO-IgG는 다클론성으로 단일 클론 NMO-IgG들의 풀(pool)로 구성한다. 다음의 사항을 결정하기 위하여 단일 NMO 환자로부터 유래한 단일 클론의 재조합 NMO-IgG들을 이용한 유사한 결합 분석을 수행하였다:(i) 절대적인 결합 친화도;(ii) 단일 NMO 환자에서 차별성 M23:M1(differential M23:M1)이 비균질적인지;(iii) 차별성 M23:M1(differential M23:M1) 결합이 NMO-IgG 결합 친화도 및/또는 화학양론의 차이로 인한 것인가. 도 4a는 한 NMO 환자로부터 얻은 두 재조합 단일 클론 NMO-IgG(rAb-53과 rAb-58)의 형광 현미경사진을 보여준다. 본 연구에 사용한 단일 클론 항체는 한 NMO환자(도 3에서 "혈청 1"에 대응함)의 CSF로부터 유래한 것이다. M23 AQP4에 대한 강력하게 결합하는 단일 클론 항체를 각 경우에서 볼 수 있었으며, M1 AQP4에 대한 결합은 변화가 존재했다. 도 4b는 3종의 재조합 NMO-IgG의 농도-의존적 결합 곡선을 요약한 것으로, 모두 단일 부위 결합 모형과 합치한다. 각각의 경우에서 데이터는 거의 단일 힐 상수(unity Hill coefficient)로 단일 부위 모형과 잘 맞는다. 가장 낮은 해리 상수는 M23 AQP4에 대한 rAb-53의 결합에서 관찰할 수 있는 44 nM이다. 단일 NMO환자로부터 단일 클론 NMO-IgG에 대한 현저한 비균질성을 발견하였고 상대적인 M23:M1 결합 친화도는 0.02(rAb-53), 0.46(rAb-58) 및 0.02(rAb-186)이었다. 도 4b의 결합 곡선 또한 M23:M1 결합의 차이는 결합 능력이라기 보다는 결합 친화도의 차이 때문이라는 결론을 지지한다.

[0222] **NMO-IgG의 AQP4 이소형 특이적인 결합의 기작.** 발명자들은 M23 대 M1 AQP4에 대한 NMO-IgG의 결합 친화도의 차이가 M23 AQP4에 의한 OAP의 형성 및/또는 M23대 M1의 N-말단의 차이 때문인 것인지 조사하였다. NMO-IgG가 다음을 발현하는 세포들과의 결합을 측정하였다:(i) 서로 다른 비율의 M23:M1 AQP4;(ii) M23과 함께 발현할 때 OAP를 방해하는 감소한 능력을 갖는 M1 돌연변이; 및(iii) 감소된 OAP를 형성능력을 가진 M23 AQP4 돌연변이. 이 연구를 위해서 발명자들은 일시적으로 유전자 전달감염한 U87MG 세포를 이용하였다. 일시적으로 유전자 전달감염한 세포들의 적절성은 고정된 농도에서 NMO-IgG가 안정적으로 대 일시적으로 유전자 전달감염한 세포들에 대해 유사한 결합을 보이는 것으로 위에서 확인하였다(도 2d).

[0223] 도 5a는 NMO-IgG의 서로 다른 비율의 M23:M1 AQP4 를 함께 발현하는 U87MG 세포에 대한 농도 의존적 결합을 보여준다. OAP에서 AQP4의 분획(fraction)과 OPA평균크기는 M23:M1 AQP4 비율에 직접적으로 연관이 있다. 각기 다른 M23:M1 비율에서 형성하는 OAP의 특성을 결정하기 위하여 양자점 단일 입자 추적법(Quantum dot single-particle tracking measurement)를 이용하였다. 도 5a(우)는 이전에 보인 것과 같이(크레인(Crane) 등, 2009), 더 높은 M1 함량에 따라 AQP4이 증가하는 것을 보여준다. 이러한 AQP4 확산의 증가는 M1 AQP4가 증가함에 따라

OAP 성장의 능동적인 붕괴(active disruption)에 의한 것이다. 당연하게도, M23 만의 결합과 비교할 때, rAb-53은 3:1과 1:1의 M23:M1의 혼합물에서 점차적으로 감소하는 AQP4 결합을 보여주었다(도 5a, 좌).

[0224] 도 5b는 비변성의 M1이 이중 시스테인(double-cystein) 돌연변이 M1-C13A/C17A(CCA)로 치환한 것을 제외하고는 도 5a에서와 유사한 시험으로부터의 데이터를 보여준다. CCA AQP4는 그 자체로는 OAP를 형성하지 않지만, M23과 함께 발현할 경우 OAP를 붕괴하는 능력을 심하게 감소시켰다(크레인(Crane) 등, 2009). 그러므로, 동일한 M23:M1 비율에서, 비변성의 M1 대신 CCA 돌연변이를 발현하는 세포들은 단일 입자 추적에서 확인한 것처럼 더 많은 OAP 함량을 갖는다(도 5b, 우). rAb-53의 농도 의존적 결합은 M23:M1 혼합물에서 보다 M23:CCA 혼합물에서 더 많은 결합을 보인다(도 5b, 좌). M23:CCA를 3:1의 비율로 발현하는 세포에 대한 rAb-53의 결합은 M23 만을 발현하는 세포와 동일하다.

[0225] 결합 특이성 문제점을 제거하기 위한 독립적인 접근법으로써, 발명자들은 OAP를 붕괴시키는 점 돌연변이를 포함하는 M23 돌연변이를 발현하는 U87MG 세포에 결합하는 NMO-IgG를 측정하였다. 이들 돌연변이의 OAP 붕괴 효과는 양자점 단일 입자 추적법(quantum dot single-particle tracking)으로 확인하였다. 도 5c(우)는 이전에 발명자들이 AQP4에 대응하는 랫트(rat) 이소형을 가지고 알아낸 내용(크레인과 버크만(Crane and Verkman), 2009)과 유사하게 M23 AQP4 N-말단의 돌연변이 F26Q와 G28P가 OAP 함량을 매우 감소시키는 것을 보여준다. 도 5c(좌)는 비변성의 M23과 비교하였을 때 이들 M23 돌연변이를 발현하는 세포들에 대한 rAb-53의 매우 감소한 농도 의존적 결합을 보여준다. 종합할 때, 도 5a-C의 결과는 OAP 형성이 M23 대 M1 AQP4에 대한 NMO-IgG의 증가한 친화도를 가져옴을 나타낸다.

[0226] 2가 대 1가 NMO-IgG 결합이라는 두개의 가능한 기작을 가지고 OPA 대 비 OAP와 연관한 AQP4의 NMO-IgG의 증가한 친화도를 설명할 수 있다. 도 6a는 IgG에서 인접한 Fab 결합부위 간 거리(소스닉(Sosnick) 등, 1992; 해리스(Harris) 등, 1998)와 AQP4 4량체(tetramer)의 크기(호(Ho) 등, 2009)의 비교를 보여준다. 도 6b는 가능한 역 결합 기작(opposing binding mechanism). 첫번째는 2가 결합이다. 강한 NMO-IgG 결합은 두개의 Fab 부위가 AQP4 단량체 또는 4량체와 결합해야만 하는 2가 상호작용을 필요로 한다. M23 결합이 M1 결합보다 매우 더 강한 rAb-53에서, AQP4 단량체의 결합 항원결정인자(binding epitope)의 위치가 단일 4량체내에서는 Fab 부위간에 그러한 2가 상호작용이 불가능하게 떨어져 있으나, OAP에서 인접한 4량체와 가교화를 형성하는데에는 최적의 거리로 떨어져 있다. rAb-58의 경우, 항원결정인자가 단일 4량체 내에서 이가 결합이 발생할 수 있는 위치에 존재할 수 있어서 M1과 M23 AQP4에 대해 유사한 결합을 형성할 수 있다. 둘째로 1가 결합이다. NMO-IgG 결합은 고전적인 1가 상호작용을 포함하고, 이들 결합은 주로 개개의 Fab들의 각각의 항원결정인자와의 친화도에 따라 조절할 수 있다. rAb-53에서, OAP 형성에 따른 항원결정인자 부위의 구조적인 변화는 더 높은 친화도를 가져온다. rAb-58에서, 항원결정인자 부위는 OAP 형성에 의하여 변하지 않아서 M1 대 M23 AQP4에 대해 유사한 친화도를 갖는 결과를 가져온다.

[0227] M1과 M23 AQP4에 대한 Fab 결합은 이들 경쟁 기작을 시험하여 측정하였다. NMO-IgG를 파과인으로 분해하고 순화하여 Fab'를 만들었다. 2가 결합 기작은 Fab'에 의해서 결합이 거의 일어나지 않고 M1대 M23 AQP4에 대한 Fab 결합간에 차이가 없을 것을 예측한다. 1가 결합 기작은 M23 AQP4에 대한 rAb-53의 증가한 결합이 개개의 Fab'에서도 또한 관찰할 수 있을 것임을 예측한다. 대조군으로, 발명자들은 마우스(mouse) 항-Myc 단일 클론 항체로부터 생성한 Fab'의 외부의 Myc-표지한 AQP4 이소형에 대한 결합을 측정하였다. 예측한 것처럼, 전체 항-Myc IgG는 Myc-표지한 M1과 M23 AQP4에 $K_D \sim 10$ nM로 동일하게 결합하였다(도 6c). 도 6d는 M1 대 M23 AQP4에 대한 Fab 단편의 결합을 보여준다. rAb-53로부터 얻은 전체 IgG와 Fab'는 M34 AQP4에 대해 현저하게 큰 결합을 보였으나, rAb-58 및 항-Myc로부터 얻은 전체 IgG와 Fab'는 유사한 M1대 M23 결합을 보였다. 이러한 데이터는 1가 결합을 포함하는 2차 기작에 대한 직접적인 증거를 제공한다.

[0228] **실시예 3 - 고찰**

[0229] 여기에서 발명자들은 형광 비율 영상(fluorescence ratio imaging)을 AQP4에 대한 NMO-IgG의 결합을 정량하고, NMO-IgG 결합에 AQP4 이소형과 OAP의 역할을 알아보기 위하여 사용하였다. 이 살아있는 세포를 사용하는 체계(live-cell system)은 단일 클론 NMO-IgG와 다클론 NMO 환자 혈청을 특징지우기 위한 강력한 방법의 필요에 의하여 개발하였다. 발명자들은 U87MG 세포들이 안정적 또는 일시적인 유전자 전달감염 후 세포내 AQP4 발현이 거의 없이 AQP4를 형질막에 효과적으로 발현하므로 정량적인 결합측정법에 적합하다는 사실을 발견하였다. U87MG 세포에서 AQP4의 우수한 막 발현은 그들의 아교세포 기원에 의한 것으로 보이며, 따라서 기존의 인체 아교세포에서와 동일한 운반 기작의 발현에 의한 것으로 보인다. 본 연구에서 사용한 안정적으로 유전자 전달감염한 클

론의 면역탁본 분석은 M1 세포주에서 M23이 거의 탐지되지 않는, 개개의 AQP4 이소형의 배타적인 발현을 보여준 다(도 2c). U87MG 세포는 빠르게 자라고 배양지질물에 잘 유착하므로, 자동화 및 고속처리 분석법에 적합하다.

[0230] 시험한 모든 단일 클론 및 다 클론 NMO 항체들에서, 비록 모든 경우에서 M1에 측정가능한 결합을 발견할 수 있지만, M23을 발현하는 세포에 결합하는 NMO-IgG는 M1을 발현하는 세포에 결합하는 것과 비슷하거나 더 큰 결합력을 갖는다. NMO-IgG는 각 AQP4 이소형에 명백한 단일 부위, 비협조적 결합과 일치하는 단일 힐 상수(unity Hill coefficient)에 가까운 단일부위, 포화가능한 결합 모형에 잘 들어맞는 농도 의존적인 방식으로 결합하는 것을 발견하였다. NMO-IgG의 M23 AQP4에 대한 바람직한 결합은 더 큰 결합 능력이라기 보다는 더 큰 결합 친화도의 결과에 의한 것임을 밝혔다. 단일 클론 NMO-IgG rAb-53의 AQP4 M23과 M1 이소형에 대한 결합 친화도의 차이는 N-말단 염기 서열의 차이 때문이 아니라 M23 AQP4에 의한 OAP 형성의 결과임을 발견하였다. 이 사실은 OAP를 형성하고 파괴하는 변경된 능력을 갖는 M1과 M23 AQP4의 돌연변이를 이용하여 밝혀내었다. 2색 단일 입자 추적법(two-color single particle tracking approach)을 이용하여, 최근 발명자들은 함께 발현하는(co-expressed) M1과 M23 이소형이 OAP를 구성하는데 구분이 되는 능력을 가진 AQP4 4량체를 함께 구성한다는 것을 시연하였다. 또한 그들은 OAP 크기와 내용물이 M1:M23 비율을 변경하거나 M1 AQP4의 팔미토일레이션(palmitoylation)을 변화시킴으로써 변화시킬 수 있다는 사실을 보여주었다(크레인(Crane) 등, 2009). 발명자들은 여기에서 M1과 M23의 공동 발현 또한 NMO-IgG 결합에 영향을 미친다는 사실을 발견하였다(도 5a). 그러나, 팔미토일레이션이 없는(palmitoylation-null) M1 돌연변이의 발현을 통하여 M1의 OAP를 파괴하는 능력을 감소 시킴으로써, 동일한 M23:M1 비를 가진 혼합물에서 NMO-IgG 결합을 현저하게 증가시킴을 발견하였다(도 5b). 발명자들은 이전에 M23에 의한 OAP 형성에 메티오닌-23(Met-23)의 바로 아랫쪽에 있는 잔기 24-26에서의 N-말단 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)이 필요하다는 사실을 발견하였고(크레인과 버크만(Crane and Verkman), 2009), OAP 형성 능력을 매우 감소시킨 M23 돌연변이를 발견하였다(M23-F26Q와 M23-G28P). 이들 OAP 형성을 파괴하는 M23 AQP4 돌연변이들은 NMO-IgG 결합을 현저하게 감소시킨다(도 5c). 개개의 M1과 M23 이소형에 대한 NMO-IgG의 결합에 대한 등온선(isotherms)과는 대조적으로, AQP4 돌연변이 M23-F26Q와 M23-G28P는 단일 부위 결합 모형에 적합하지 않은 등온선을 만들어 내는데, 아마도 이들 돌연변이의 발현이 OAP를 구성하는 AQP4와 OPA를 형성할 수 없는 AQP4의 비균질적인 모집단을 생산하기 때문으로 보인다.

[0231] OAP를 형성하는 AQP4에 대한 NMO-IgG의 더 높은 친화도의 기작은 전체(2가형) NMO-IgG를 그의 1가형 Fab'와 비교함으로써 연구하였다. OAP 형성은 2가 IgG 결합에 의한 향상이 아닌 개개의 Fab 결합 부위에 대한 더 높은 친화도의 결과이다. 발명자들은 그러므로 NMO에서 발견할 수 있는 IgG들의 다수에 대한 결합 항원결정인자가 OAP 형성에 생성된 4량체/4량체 접촉면에 위치할 수 있다고 제안한다. 그러나 결합 친화도의 차이는 아마도 항원결정인자의 구조에 따라 다양하고, 일부 NMO-IgG(rAb-58)는 OAP를 구성하지 않은 M1 AQP4에 대해 강한 친화도를 갖는다.

[0232] 항체 NMO-IgG 면역형광법에 널리 사용하는 분석법을 M1 AQP4를 발현하는 HEK-293 세포에서 수행하였다(레논(Lennon) 등, 2005). 여기에서의 데이터는 NMO-IgG가 M23 AQP4에 결합하는 것이 M1 AQP4에 결합하는 것 만큼 우수하거나 일반적으로 그보다 더 우수하므로 M23 AQP4를 발현하는 세포가 더 우수하다는 것을 나타낸다. 결합에서의 차이가 모든 NMO-IgG 농도에서 볼 수 있으며, 종종 인간 혈청 표본에서 보이는 것처럼, 낮은 농도에서 표시된다. 기존의 방법을 이용하여 분석하였을 때 확립된 임상적 기준으로 정의한 NMO를 가진 환자로부터 얻은 혈청의 30%까지 음성혈청반응을 나타낸다(윙거츱(wingerchuk)등, 2006). 이 값은 본 출원에서 확립한 영상분석과 같은 더 민감한 분석을 이용하고, OAP를 형성하는 AQP4의 M23 이소형을 강하게 발현하는 인간 아교 세포(human glial cell)을 활용할 경우 실질적으로 더 낮아진다. 실제로, 다종의 인간 혈청 표본을 이용한 최근의 연구가 M1을 발현하는 세포 대신 M23을 발현하는 세포를 사용할 때 NMO-IgG에 대한 민감도(sensitivity)가 70%에서 97%로 향상하는 것을 나타낸다(마더(Mader)등, 2010). 본 출원에서 확립한 이러한 정량적 결합 분석은 질병 활성, 처리 상태와 환자 특성과 같은 NMO 임상 매개변수와 혈청 NMO-IgG의 결합 친화도의 상관관계를 밝히는 데에도 유용할 것이다. NMO-IgG의 OAP와 연관한 AQP4에 대한 결합과 OAP와 연관하지 않은 AQP4에 대한 결합의 기본적인 차이는 진단적인 중요성을 가질 수 있고, 결합의 자연적이고 처리와 연관한 변화는 예후적인 중요성을 가질 수 있다.

[0233] **실시예 4 - 실험재료 및 실험방법**

[0234] **제조함 NMO-IgG와 NMO 환자 혈청.** 제조함 단일 클론 NMO 항체(rAb)는 뇌척수액(CSF)에서 클론적으로 확장한 형질모세포로부터 이전에 설명한 방법으로 생성한다(벤넷(Bennett) 등, 2009). 부위특이적 돌연변이 형성(site-

directed mutagenesis)를 위하여 IgG1 중쇄(heavy chain) 불변 부위(IgG1Fc)의 KpnI-XhoI 단편을 pSp73X에 클론(clone)한다. CDC(돌연변이 K322A), ADCC(돌연변이 K326W/E333S) 또는 양쪽(돌연변이 L234A/L235A)가 결합한 컨스트럭트(construct)를 생성하기 위하여 진테일러 부위 특이적 돌연변이 시스템(GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System)(인비트로젠(Invitrogen))을 이용하여 점 돌연변이를 IgG1Fc 서열에 유발한다(바우디노(Baudino) 등, 2008; 던컨과 윈터(Duncan and Winter), 1988; 헤자레(Hezareh) 등, 2001; 이두소기(Idusogie) 등, 2001). 돌연변이가 일어난 IgG1Fc 염기 서열의 AgeI-XhoI 단편을 rAb-53의 중쇄(heavy chain) 가변부위 염기 서열을 포함하는 pIgG1Flag에 클론하여 C-말단 플래그(Flag) 항원결정부위를 갖는 돌연변이 IgG1 Fc 염기 서열을 포함하는 아쿠아포르룸(aquaporin) 컨스트럭트(construct)를 생성한다.

[0235] 2가 rAb와 아쿠아포르룸(aquaporin)의 형성을 위해서, 짝지은 중쇄(heavy chain)과 경쇄(light chain) 컨스트럭트(construct)를 리포펙타민(lipofectamin)을 이용하여 HEK293 세포에 동시 유전자 전달감염(co-transfect) 하였다. 유전자 전달감염 후, 세포들을 DMEM 배지 + 10% FBS에서 7일간 배양하고, 상등액을 수집하고, 신선한 배지를 추가한 다음 다시 7일간 더 세포를 배양하였다. 세포 배양 상등액을 모아서, 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포들과 조직파편들을 침전시키고, 세포가 없는 상등액을 1M 트리스 pH 8.0(Tris pH 8.0)으로 pH 8.0으로 조정한다. 다음, 4°C에서 단백질-A 세파로스(protein A-Sepharose)(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)와 오버나이트(overnight)로 배양하였다. rAb를 단백질 A-세파로스로부터 0.1M 글리신(glycine)/1M NaCl(pH 3.0)를 이용하여 추출하고 0.1M 트리스-HCl(Tris-HCl), pH 8.0을 가지고 pH 7.5로 조정한다. 제조 IgG는 0.1% 단백질 분해효소가 없는 소혈청알부민(BSA)를 포함한 PBS에서 울트라셀(Ultracel) YM-30 초소형농축기(microconcentrator)(밀리포어(Millipore), 빌레리카(Billerica), MA)를 이용하여 교환하고 농축하였다. BSA는 표면플라스몬공명분광(surface plasmon resonance) 측정을 위하여 저장 용액에서 제외하였다. 항체의 통합성은 변성 및 비변성 겔 전기영동(gel electrophoresis)를 이용하여 확인하였고, IgG의 농도는 인간 IgG-포획 ELISA를 이용하여 분석하였다. NMO 항체는 개정 임상질환을 위한 진단 기준(윙거척(Wingerchuk) 등, 2006)에 맞는 총 10명의 NMO-IgG 혈청양성반응을 보인 환자로부터 획득하였다. 대조군(비-NMO) 인간 혈청은 총 3명의 비-NMO인 사람들로부터 획득하거나 또는 UCSF 세포 배양 시설로부터 구매하였다. 몇몇 연구를 위해서 전체 IgG를 순화하고 멜론 겔 IgG 순화 키트(Melon Gel IgG Purification Kit)(서모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 록포드(Rockford), IL)과 아미콘 울트라 원심분리 필터 유닛(Amicon Ultra Centrifugal Filter Units)(밀리포어(Millipore), 빌레리카(Billerica), MA)을 이용하여 혈청을 농축하였다.

[0236] **세포 배양 및 유전자 전달감염.** 인간 AQP4를 부호화하는 DNA 컨스트럭트(construct)를 전체 뇌 cDNA를 주형으로 사용한 PCR-증폭법을 이용하여 생성하였다. PCR 단편들을 포유동물용 발현 벡터 pcDNA3.1에 결합(ligate)하고 완전히 염기 서열을 결정하였다. COS-7(ATCC CRL-1651), U87MG(ATCC HTB-14), 및 CHO-K1(ATCC CCL-61) 세포주를 37°C에서 5% CO₂/95% 공기에서 10% 소태아혈청, 100U/mL 페니실린(Penicillin), 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 적절한 배지에 유지한다. CD16을 발현하는 NK92 세포(CD16-176V-NK92, 폭스 체이스 암센터(Fox Chase Cancer Center)로부터 획득)를 37°C에서 5% CO₂/95% 공기에서 10% 소태아혈청, 10% 말혈청, 0.1 mM 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol), 2mM 글루타민(glutamine), 0.2 mM 미오-이노시톨(myo-inositol), 2.5 µM 엽산(folic acid), 비필수 아미노산, 110 µg/mL 피루부산 나트륨(sodium pyruvate), 100 U/mL 페니실린(penicillin), 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 디옥시리보뉴클레오사이드(deoxyribonucleoside)와 리보뉴클레오사이드(ribonucleoside)가 첨가된 MEM에서 배양한다.

[0237] **표면플라스몬공명분광법.** rAb의 AQP4에 대한 실시간 결합을 25°C에서 비아코어 T-100기기(Biacore T-100 instrument)(GE 헬스케어 라이프 사이언스(GE Healthcare Life Sciences), 피스카타웨이(Piscataway), NJ)를 이용하여 보고된 기술법(파텔(Patel) 등, 2009)에 기초하여 표면플라스몬공명분광법에 의하여 측정하였다. 순화한 제조 인간 M1 AQP4(윌리엄 해리스와 로버트 스트라우드(William Harries and Robert Stroud), UCSF로부터 제공받음)을 95:5 L-α-포스파티딜콜린:L-α-포스파티딜세린(L-α-phosphatidylcholine: L-α-phosphatidylserine)(아반티 폴라 리피드(Avanti Polar Lipids))비율을 포함하는 단백질리포솜(proteoliposomes)의 3%(wt/wt) AQP4에서 재구성하였다. 간단하게, 지질(전체 37.5mg, 500nmol)을 375 µl의 40mM b-옥틸 배당체(b-octyl glucoside)(PBS 내)에 용해하고 AQP4(300ml, 450 mg, 15 nmol)를 첨가한다. 혼합물을 PBS로 4°C에서 48시간동안 투석한다(10,000 달톤(Dalton)에서 차단). AQP4가 없는 리포솜(AQP4-free liposomes)의 준비를 위하여, 동일 부피의 40 mM b-옥틸 배당체(b-octyl glucoside)(AQP4 대신)을 지질 용액에 첨가한다. 단백질리포솜(proteoliposome)을 6000 반응 유닛(response unit)의 단백질리포솜을 고정하기 위하여 2 µl/min의 속도로 10min/injection으로 4회의 주사로 L1 센서 칩(sensor chip)(비아코어(Biacore))에 고정한다. 표면을 100 µl/min의 속도로 50 mM NaOH의 20초 주사 2회로 세척한 다음 20 µl/min의 속도로 0.01 mg/ml

BSA를 300초간 주사하여 표면 품질을 검사한다. 유동채널 1(flow channel 1)(Fc 1)은 0% AQP4를 고정하여 기준으로 삼고, 유동채널 2는 AQP4 단백질리포솜을 넣는다. 결합 연구는 15 μ l/min의 흐름비율로 PBS를 이용하여 수행하였다. PBS 내의 rAb를 80초간 주사하고 240초의 주사후 기간(post-injection)을 유지한다. 20초간 100 μ l/min로 50 mM NaOH를 주사하여 재생(regeneration)을 수행한다. 결합 연구는 중복으로 수행한다. 얻은 데이터는 비아코어 T100 평가 소프트웨어(Biacore T100 Evaluation software)를 이용하여 분석하였다.

[0238] **세포 내에서 NMO-IgG의 AQP4에 대한 결합.** rAb-53의 AQP4에 대한 결합의 동력학은 인간 AQP4-M23을 안정적으로 발현하는 U87MG 세포에서 이전에 기술했던 것과 같이 정량적 이미징(quantitative imaging)으로 측정하였다(크레인(Crane) 등, 2011). 세포들을 생세포 차단 완충액(live-cell blocking buffer)(6 mM 포도당, 1 mM 피루브산(pyruvate), 1% 소혈청알부민, 2% 염소 혈청을 포함하는 PBS)에서 20분간 배양한 다음, NMO-IgG와 특정시간동안 배양한다. 이후 세포들을 헵구고, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에서 15분간 고정한 다음 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100)으로 투과가능(permeabilize)하게 한다. 세포들은 그 다음 다시 차단하고 30분간 0.4 μ g/mL C-말단 특이적인 다클론 토끼 항-AQP4 항체(산타크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 산타크루즈(Santa Cruz), CA)와 배양하고, PBS로 헵구다. 마지막으로 세포들을 4 μ g/mL 염소 항-인간 IgG-결합 알렉사 플루오어 488(Alexa Fluor 488)과 염소 항-토끼 IgG-결합 알렉사 플루오어 555(Alexa Fluor 555)(인비트로젠(Invitrogen))가 포함된 차단 완충액에 30분간 배양한다. NMO-IgG 결합은 이전에 기술한 것(39)처럼 비율 이미지 분석(ratio image analysis)를 통하여 정량한다. 몇몇 연구에서 rAb-53은 표준 숙시니미딜 화학(standard succinimidyl chemistry)를 이용하여 Cy3로 형광적으로 표지하였다.

[0239] **보체의존적 세포독성(complement-dependent cytotoxicity)(CDC)과 항체의존적 세포매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)(ADCC)의 분석.** CDC의 분석을 위하여 인간 AQP4를 발현하는 CHO 세포를 12.5 μ g/ml 아쿠아포르루맵(aquaporin) (또는 대조군 IgG)와 30분간 선배양(pre-incubation)한 다음, NMO-IgG(2.5 μ g/ml) 또는 대조군 IgG 및 5% 인간 보체와 37°C에서 90분간 배양한다. 칼세인-AM(Calcein-AM)과 에티디움-동종이합체(ethidium-homodimer)(인비트로젠(Invitrogen))을 첨가하여 살아있는 세포를 녹색으로, 죽은 세포를 적색으로 염색한다. 1-2% NMO 환자 혈청(및 대조군 비-NMO 혈청)에 의한 보체매개 세포독성과 5% 인간 보체에 의한 보체매개 세포독성을 유사하게 50-100 μ g/ml의 아쿠아포르루맵(aquaporin)의 존재할 때 대 존재하지 않을 때로 측정하였다. ADCC의 분석을 위하여, CD-16을 발현하는 NK-92 세포를 효과기 세포로 사용하였다. AQP4를 발현하는 CHO 세포를 15 μ g/ml 아쿠아포르루맵(aquaporin) (또는 대조군 IgG)와 30분간 선배양(pre-incubation)하고, 그 다음 37°C에서 3시간 동안 NMO-IgG(5 μ g/ml) 또는 대조군 IgG와 효과기세포(효과기:표적 비율 30:1)와 배양하였다. 세포들은 칼세인-AM(calcein-AM)과 에티디움-동종이합체(ethidium-homodimer)를 첨가하기 전에 PBS로 세척한다.

[0240] **생체 내 NMO모형.** 성체 마우스(mouse)(30-35g)을 2, 2, 2-트리브로모에탄올(2, 2, 2-tribromoethanol)(125 mg/kg i.p.)로 마취하고 정위틀(stereotactic frame)에 고정한다. 이전에 기술한 것과 같이 NMO 환자 혈청(5명의 다른 NMO 혈청반응양성 환자를 연구)으로부터 순화한 전체 IgG(14 μ L, 6-38 mg/mL) 과 인간 보체(10 μ L) 및 아쿠아포르루맵(aquaporin)(10 μ g)을 첨가하거나 제외하여 마우스에 뇌내에 주사한다.(사도운(Saadoun) 등, 2010). 대조군은 비-NMO 인간 IgG(3종의 다른 대조군 혈청을 연구), AQP4 무효화 마우스(mice), 아쿠아포르루맵(aquaporin)만 주사하는 것을 포함한다. 마우스는 주사 24시간 후 죽이고 뇌를 포르말린(formalin)으로 고정한 다음 파라핀(paraffin)으로 처리하여 이마극(frontal pole)로부터 1.6 mm 지점에서 관상으로(coronally) 절단한다. 절편은 헤마토자일린/이오신(hematoxylin/eosin)이나 룩솔 패스트 블루(Luxol Fast Blue)(수초(myelin) 용)로 염색하거나 또는 AQP4(밀리포어(Millipore), 왓포드(Watford), UK) 와 C5b-9(애브캠(Abcam), 캠브리지(Cambridge), UK)에 대한 항체로 면역염색한다. 현미경사진은 이전에 기술한 것처럼 AQP4 면역활성의 상실과 수초에 대하여 정량화 한다(사도운(Saadoun) 등, 2010, 크레인(Crane) 등, 2011).

[0241] **생체 외 NMO 모형.** 기관형적 척수 단편 배양(organotypic spinal cord slice culture)를 변형 경계-배양법(modified interface-culture method)를 이용하여 준비하였다. 생후 7일 마우스 새끼들을 침수하여 척수를 재빨리 제거한 다음 얼음으로 냉각한 헵크의 균형된 염 용액(Hank's balanced salt solution)(HBSS, pH 7.2)에 넣는다. 300 μ m 두께의 경추척수의 횡단 단편을 비브라토(vibratome)을 이용하여 절단한다(라이카 VT-1000S(Leica VT-1000S); 라이카(Leica)). 각각의 단편을 1mL 배양 배지를 넣은 6 웰(well)(35 mm) 판 내의 투명한, 코팅되지 않은 막 삼입물(밀리포어(Millipore), 밀리셀-CM(Millicell-CM) 0.4 μ m 구멍, 30mm 직경)에 넣고 배양 배지의 얇은 막으로 단편을 덮는다. 단편을 5% CO₂ 37°C에서 10일간 50% 최소 필수 배지(MEM), 25% HBSS, 25% 말 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin), 포도당(0.65%) 및 HEPES(25 mM)에서 배양한다(매 3일마다 교환). 7일에 순화한 IgG(NMO 환자 또는 대조군 혈청으로부터 분리, 300 μ g/ml)와 인

간 보체(10%)를 아쿠아포르룸(aquaporin)(L234A/L245A 또는 K322A, 10 μg/ml)과 함께 또는 아쿠아포르룸 없이 배양 배지에 첨가한다. 단편을 추가로 3일간 더 배양하고, AQP4, GFAP 및 MBP 면역형광법을 위해 고정한다. 절편은 다음과 같이 채점한다; 0, 균일하고 완전한 GFAP와 AQP4 염색을 보이는 완전한 절편; 1, GFAP 염색결과 약간의 별아교세포 증창 및 감소된 AQP4 염색을 보이는 완전한 절편; 2, 절편 내GFAP 상실 및 AQP4 염색 상실을 보이는 최소 한 개 이상의 병변; 3, 절편면적 30% 이상의 GFAP 상실과 AQP4 염색상실을 보여주는 다수의 병변; 4 절편 면적 80% 이상에 영향을 주는 광범위한 GFAP 및 AQP4 염색 상실. AQP 제거 마우스로부터의 절편은 GFAP 면역형광법으로만 계산하였다.

[0242] 실시예 5 - 결과

[0243] NMO에 대한 아쿠아포르룸(aquaporin) 요법의 이론적 근거를 도 7a에 서술하였다. AQP4의 세포의 항원결정인자에 결합하는 병원성 자가면역항체(NMO-IgG)가 실질적으로 AQP4 4량체보다 더 커서 한 개의 항체 이상과 동시에 결합하는 것을 방지한다. 그러므로 발명자들은 높은 결합 친화도와 느린 제거 속도를 가진 비병원성 항체라면 병원성 항체의 결합과 경쟁하여 이후의 별아교세포 손상과 신경염증을 방지할 수 있을 것이라고 추론하였다.

[0244] 적합한 비병원성 AQP4 항체를 설계하기 위하여, 발명자들은 3명의 NMO 환자의 CSF에서 클론적으로 확장한 형질모세포로부터 유도한 10 종의 재조합 단일 클론 NMO-IgG를 생성하고 스크린(screen)하였다. 단일 세포로부터 얻은 중쇄(heavy chain)과 경쇄(light chain) 변이 서열 짝을 PCR 증폭하고, 중쇄와 경쇄 불변 부위 염기 서열을 포함하는 발현벡터에 클론한 다음, HEK293 세포에서 같이 발현시키고, 상층액으로부터 재조합 IgG를 순화하였다. 각 재조합 단일 클론 항체의 재구성한 단백질리포솜(proteoliposome)에서 AQP4에 대한 결합을 표면 플라즈몬 공명법을 이용하여 측정하였다. 발명자들은 검사한 10 종의 재조합 항체 중에서 가장 높은 친화도와 가장 느린 제거속도를 가진 항체 rAb-53을 발견하였다(도 7b, 좌). rAb-53의 AQP4-단백질리포솜(proteoliposome)에 대한 결합은 명백한 결합 상수 27 nM로 몇분 이내에 일어나며(결합비율상수 $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), 여러 시간에 걸쳐 제거된다(제거비율상수 $3.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). 다른 재조합 NMO항체는 실제적으로 신속한 제거 속도와 감소한 결합 친화도를 나타내었다(도 7b, 우측에 예시). rAb-53의 느린 제거는 AQP4를 발현하는 살아있는 세포에서 확인할 수 있다. 도 7c는 rAb-53이 5-10분 내에 결합하고, 3시간 이상 측정가능할 정도로 제거되지 않는 것을 보여준다.

[0245] CDC(K322A), ADCC(K327W/E333S) 또는 모두(L234A/L235A) 저해하지만 AQP4와 결합하는 Fab 서열을 보존하기 위하여rAb-53의 Fc 부위의 점 돌연변이를 도입하였다(도 8a). 이러한 돌연변이의 도입은 AQP4에 대한 항체의 결합에는 영향을 주지 않으며, 돌연변이 항체들 중 하나의 대표적인 표면 플라즈몬 공명 데이터를 도 8b에 나타내었다. 예상한 것처럼, Fc 돌연변이는 현저한 결합 또는 제거 비율 상수 변화나 결합 친화도의 저하를 가져오지 않았다.

[0246] 돌연변이 rAb-53 항체가 비돌연변이 rAb-53의 결합을 방해하는지 확인하기 위하여, rAb-53을 AQP4에 대한 결합에 영향을 주지 않는 조건하에서 Cy3로 형광표지하였다. 도 8c는 각각의 돌연변이 항체가 비 돌연변이 rAb-53과 마찬가지로 5배 과다하게 존재하면 Cy3로 표지한 rAb-53이 AQP4를 발현하는 세포에 결합하는 것을 방해한다는 것을 보여준다. 비 AQP4 특이적(이소형 대조군) 단일 클론 재조합 항체는 아무 영향을 주지 않았다. 중요하게도, NMO-IgG의 다른 혼합항체를 포함하는 인간 NMO 혈청은 다른 단일 클론 NMO 항체들 처럼(도 8d의 rAb-186) Cy3 표지한 rAb-53의 결합을 방해하였다(5종의 대표적인 인간 NMO 혈청 중 하나를 도 8d에 표시). 이들 데이터는 NMO 자가면역항체들 간에 AQP4 표면 항원결정인자에 결합하는 것에 대한 경쟁이 존재함을 암시한다.

[0247] 세포 표면 AQP4에 대한 NMO-IgG 결합의 대표적인 하위 결과는 보체 매개 세포 살해이다. 도 9a는 살아있는 세포는 녹색으로 염색하고 죽은 세포는 적색으로 염색하는 생/사 세포 분석 결과를 나타낸다. AQP4 발현 세포를 rAb-53과 보체와 함께 배양하면 광범위한 세포 살상을 야기한다. 보체 C1q 활성화능을 결핍한 rAb-53 돌연변이 K322A와 L234A/L235A는 세포 살상을 거의 야기하지 않는 반면, 보체 결합능력에 손상이 없는 K326W/E333S는 세포 살상을 야기한다. 대조군 연구에서, 보체나 rAb-53만으로는 세포 살상을 야기하지 않으며, rAb-53과 보체를 함께 AQP4를 발현하지 않는 세포와 배양하여도 세포 살상은 발생하지 않는다(비공개). 도 9b는 K322A 또는 L234A/L235A의 다섯 배 물 농도 초과가 rAb-53과 보체에 의한 세포 살상을 급격하게 감소시키는 것을 보여준다.

[0248] NMO 환자 혈청 내 NMO-IgG의 다른 혼합물은 AQP4의 세포의 표면의 다양한 중첩되는 3차원적 항원결정

인자를 인식하는 것으로 믿어진다. 도 9c는 rAb-53 돌연변이 K322A와 L234A/L234A가 다른 NMO환자들로부터 얻은 NMO 혈청에 의해 보체 매개 세포 살상이 일어나는 것을 막는 것을 보여준다(6명의 환자 혈청 중 3명으로 부터 얻은 대표적인 데이터를 보여줌). 대조군(비 NMO) 혈청은 세포 살상을 야기하지 않는다. 그러므로, 아쿠아포르루맵(aquaporumab) rAb53-K322A와 L234A/L235A는 다른 NMO-IgG의 결합과 결과적인 세포 살상을 방지하는 데, 아마도 AQP4 표면에서의 입체 장애에 의한 것으로 생각할 수 있다.

[0249] 아쿠아포르루맵(aquaporumab)의 NMO-IgG 의존적 ADCC를 감소시키는 능력 또한 확인하였다. AQP4를 발현하는 세포를 rAb-53의 존재하 또는 부재하 및 rAb-53 돌연변이 L234A/L235A의 존재하 또는 부재하에 NK 세포와 배양하였다. 도 9d는 rAb-53의 존재하에서 NK 세포에 의한 현저한 살상과 대조군 항체 또는 아쿠아포르루맵의 존재하에 NK 세포에 의한 살상이 거의 일어나지 않는 것을 보여준다. NK 세포와 rAb-53의 배양 중 아쿠아포르루맵 L234A/L235A의 봉입은 세포 살상을 현저히 감소시킨다.

[0250] 아쿠아포르루맵(aquaporumab)의 NMP 병변을 감소시키는 효능을 연구하기 위하여 생체 내 및 생체 외 NMO 모형에서 개념증명 연구를 수행하였다. NMO혈청으로부터 순화한 IgG과 인간 보체를 함께 실질내(intraparenchymal) 주사하여 생체 내NMO 병변을 마우스(mouse) 뇌에 생성하였다. 주사 24시간 후, 염증세포의 침습(주로 중성구), AQP4와 수초의 상실 및 주사한 반구에서 혈관중심적 보체 활성화(vasculocentric complement activation)가 현저하였다(도 10a). 대조군 실험에서, 다음의 뇌내 주사의 경우 염증세포 침윤, 수초의 상실, AQP4의 상실 또는 보체 활성화가 거의 일어나지 않거나 아예 일어나지 않았다:(i) 대조군(비 NMO) 인간 IgG와 보체;(ii) AQP4 널 마우스(null mouse)에 보체와 NMO-IgG; 또는(iii) 아쿠아포르루맵만. NMO-IgG와 보체를 아쿠아포르루맵과 함께 주사하면 도 10b의 일련의 마우스에서 정량한 것처럼 AQP4와 수초의 상실을 급격하게 감소시킨다. 도 10c는 각기 다른 혈청반응 양성 NMO환자로부터 얻은 NMO-IgG를 아쿠아포르루맵의 존재 또는 비 존재하에 주사한 다섯 쌍의 마우스로부터 얻은 데이터를 나타낸다. 아쿠아포르루맵은 병변의 크기를 급격하게 감소시킨다.

[0251] 척수 절편 조직의 생체 외(ex vivo) 모형에서도 연구를 수행하였다. 마우스(mice)로부터 얻은 척수 절편을 7일간 배양한 다음 NMO-IgG(NMO 환자 혈청으로부터 순화한 IgG)와 인간 보체와 함께 3일간 배양하였다. 본 생체 외 모형을 이용하여 CNS 조직을 정의된 조건 하에서 항체 및 보체에 노출하는 것이 가능하다. 도 11a에서 볼 수 있는 것처럼, NMO-IgG와 보체는 보체의 부재 또는 AQP4 널 마우스(null mice)에서는 볼 수 없는 AQP4, GFAP 및 수초(myelin) 면역형광의 뚜렷한 감소를 보이는 특징적인 NMO 병변을 만들어 낸다. 아쿠아포르루맵(aquaporumab)의 주입은 NMO 병변의 심각도를 매우 감소시켜, AQP4, GFAP 및 수초를 보호한다. 아쿠아포르루맵만 또는 아쿠아포르루맵과 보체의 배양은 거의 효과를 보이지 않거나 효과를 보이지 않는다. 도 11b에서 NMO 병변 심각도의 조직학적 평가를 요약하였다. 아쿠아포르루맵에 의한 유사한 보호효과를 rAb-53 및 다른 두 NMO 환자로부터 얻은 NMO-IgG에서 확인하였다.

[0252] **실시예 6 - 고찰**

[0253] 본 출원에서 제시한 데이터는 NMO 치료법에 대한 아쿠아포르루맵(aquaporumab) 차단 항체의 유용성에 대한 증거를 제공한다. 가공한(engineered) 고-친화성, 비병원성, 재조합 단일 클론 항체는 세포배양, 생체 외 척수 및 생체 내 NMO 마우스(mouse) 모형에서 다클론 NMO-IgG의 세포표면 AQP4과의 결합을 차단하여 후속의 세포 독성과 NMO 병변의 발생을 막았다. 단일 클론 항체 요법이 다양한 목표와 질병에 사용되어 오고 있으나, 비병원성의 단일 클론 차단항체는 새로운 개념이며, 자가면역질환의 치료법으로 자가항체-항원 반응을 목표한다는 개념 또한 그러하다. NMO는 병원성 자가항체의 단일 목표 AQP4가 항체크기에 비교하여 세포외부로는 작은 흔적만을 갖는 형질막 단백질이라는 점과 병리가 항체 효과기 기능에 의존한다는 점에서 단일 클론 항체 차단제 요법에 적합한 독특한 질환이다.

[0254] 본 출원에서 사용한 돌연변이 완전한 IgG1 항체를 초반 개념입증 연구에 사용하였지만, 아쿠아포르루맵(aquaporumab)의 치료효능을 증가시키기 위하여 많은 변형이 가능하다. 단일 사슬 항체(single-chain antibody) 또는 항체 결합물(헤그마이어(Hagemeyer) 등, 2009)와 같은 항체 디자인의 변화가 아쿠아포르루맵의 안정성과 CNS 관통성(penetration)을 증가시킬 수 있고(콘터만(Kontermann) 2009) 변이 부위의 돌연변이는 AQP4 결합 강도를 증가시킬 수 있다(이가와(Igawa) 등, 2011; 니어리(Nieri) 등, 2009). IgG4와 같은 대체 항체 이소형은 IgG1 Fc 부위의 잔류 효과기 기능(residual effector function)을 제거함으로써 치료효능을 증가시킬 수 있다(카네코와 니와 (Kaneko and Niwa), 2011). NMO를 위한 정맥 내 아쿠아포르루맵 요법은 잠재적으로 급성질환 악화시 병리부의 혈관-뇌 장벽(blood-brain barrier)이 열렸을 때 NMO 병리를 감소시키기 위하여 및 아마도 악화

의 빈도와 심도를 감소시키기 위한 유지요법으로 유용하다. 아쿠아포루맵의 유리체 내 투여는 NMO의 시신경염에 의한 망막 신경절세포의 손실을 제한하는데 효과적일 수 있다.

[0255] 아쿠아포루맵(aquaporin) 자체는 CNS 병리를 발생시키지 않는다는 것이 중요하다. 아쿠아포루맵을 척수 절편과 배양하거나 또는 직접 대뇌내 주사후 병리가 발생하는 것을 볼 수 없었다. NMO 발병 심각도가 보체 활성화의 정도와 관련이 음에도 불구하고(힌슨(Hinson) 등, 2009), 보체 및 세포 비의존적인 NMO 병리의 가능성이 존재한다(마리그니에(Marignier) 등, 2010). 유전자 전달감염된 세포 모형에서 얻은 데이터에서 NMO-IgG가 NMO 병리에 기여할 수 있는 AQP4와 EAAT2 내부화(internalization)을 야기한다는 것을 제안한 경우도 있었다(힌슨(Hinson) 등, 2008). 만약 그것이 옳다면, 아쿠아포루맵에 의하여 유사한 내부화가 발생하는 것도 가능하다. 그러나, 발명자들은 무손상의 CNS의 별아교세포에서 NMO-IgG가 유도한 AQP4의 상실 또는 내부화를 거의 발견할 수 없거나 전혀 발견할 수 없었다. 사실, 마우스(mice)에서 AQP4의 완전한 부재는 CNS 구조나 기능에서 기준 이상(baseline abnormality)을 야기하지 않았다; 현저한 부하가 물 균형 변화(phenotype)(맨리(Manley) 등, 2000; 파파도폴로스(Papadopoulos) 등, 2004), 신경흥분(빈더(Binder) 등, 2006; 파드마와(Padmawar) 등, 2005), 신경아세포 흥터형성(오거스티(Auguste) 등, 2007; 사도운(Saadoun) 등, 2005) 및 신경 염증(리(Li) 등, 2011)의 표현형을 생산하였다. AQP4가 CNS 이외에서는 신장, 폐, 위장, 골격근 및 외분비선에서도 발견되지만, 마우스에서 AQP4의 결손은 병리나 심각한 기능이상을 일으키지 않는다(버크만(Verkman), 2008). 그러므로 완전한, 정식 독성 평가가 추가적인 전임상 개발에서 필요하겠지만, 아쿠아포루맵 요법 자체가 독성을 나타내지는 않을 것으로 기대한다.

[0256] 결론적으로, 아쿠아포루맵(aquaporin) 비병원성 항체에 의한 NMO-IgG와 AQP4와의 반응의 차단은 NMO 요법을 위한 새로운 접근법을 보인다. 비병원성 차단 항체는 다른 자가면역 질환에서도 치료법으로 적용이 가능할 수 있다.

[0257] * * * * *

[0258] 본 발명에서 공표하고 주장하는 모든 조성물과 실험방법은 과도한 실험 없이 본 발명에서 공개한 것에 비추어 생산하고 수행할 수 있다. 본 발명의 조성물과 실험방법을 바람직한 실시예의 형태로 기술하였지만, 본 발명이 속한 분야의 사람들에게 조성물이나 실험방법 및 본 출원에서 기술한 실험방법의 단계나 단계의 결과물이 본 발명의 개념, 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 변경이 가능하다는 것이 명백할 것이다. 좀더 구체적으로는, 동일하거나 유사한 결과를 얻으면서 화학적 및 생리학적으로 연관된 어떠한 물질들로 본 출원에 기술한 물질을 교체할 수 있다는 것이 명백하다. 모든 이러한 유사한 대체나 변경은 본 발명이 속한 분야의 사람들에게 청구한 주장에 의하여 정의한 발명의 정신, 범위 및 개념의 내에 있는 것으로 간주할 수 있음이 명백하다.

[0259] **VIII. 참고 문헌**

- [0260] 하기 참고 문헌은, 여기에서 본 발명을 설명하는데 필요한 예시적 과정 또는 상세한 보충 설명을 제공하는 한도 내에서, 본 명세서에 참고로서 삽입된다.
- [0261] 미국 특허 제3,817,837호
- [0262] 미국 특허 제3,850,752호
- [0263] 미국 특허 제3,939,350호
- [0264] 미국 특허 제3,996,345호
- [0265] 미국 특허 제4,196,265호
- [0266] 미국 특허 제4,275,149호
- [0267] 미국 특허 제4,277,437호
- [0268] 미국 특허 제4,366,241호
- [0269] 미국 특허 제4,472,509호
- [0270] 미국 특허 제4,554,101호
- [0271] 미국 특허 제4,680,338호

- [0272] 미국 특허 제4,816,567호
- [0273] 미국 특허 제4,867,973호
- [0274] 미국 특허 제4,938,948호
- [0275] 미국 특허 제5,021,236호
- [0276] 미국 특허 제5,141,648호
- [0277] 미국 특허 제5,196,066호
- [0278] 미국 특허 제5,563,250호
- [0279] 미국 특허 제5,565,332호
- [0280] 미국 특허 제5,856,456호
- [0281] 미국 특허 제5,880,270호
- [0282] "Antibodies: A Laboratory Manual," CHS Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- [0283] Abbondanzo et al., *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990.
- [0284] Allred et al., *Arch. Surg.*, 125(1), 107-113, 1990.
- [0285] Atherton et al., *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.
- [0286] Auguste et al., *FASEB J.*, 21:108-116, 2007.
- [0287] Baudino et al., *J. Immunol.*, 181:4107-4112, 2008.
- [0288] Beidler et al., *J. Immunol.*, 141(11):4053-4060, 1988.
- [0289] Bennett et al., *Ann. Neurol.*, 66:617-629, 2009.
- [0290] Binder et al., *Acta Neurochir. Suppl.*, 96:389-392, 2006.
- [0291] Binder et al., *Glia*, 53:631-636, 2006.
- [0292] Bradl et al., *Ann. Neurol.*, 66:630-643, 2009.
- [0293] Brown et al., *J. Immunol. Meth.*, 12:130(1), :111-121, 1990.
- [0294] Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984.
- [0295] Capaldi et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.
- [0296] Crane and Verkman, *Biophys. J.*, 94:702-713, 2008.
- [0297] Crane and Verkman, *J. Cell Sci.*, 122:813-821, 2009.
- [0298] Crane et al., *J. Biol. Chem.*, 2011(Epub ahead of print).
- [0299] Crane et al., *J. Biol. Chem.*, 284:35850-35860, 2009.
- [0300] Crane et al., *Mol. Biol. Cell*, 19:3369-3378, 2008.
- [0301] De Jager et al., *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.
- [0302] Dholakia et al., *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- [0303] Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.
- [0304] Duncan and Winter, *Nature*, 332:738-740, 1988.
- [0305] EP Application 125,023
- [0306] EP Application 171,496

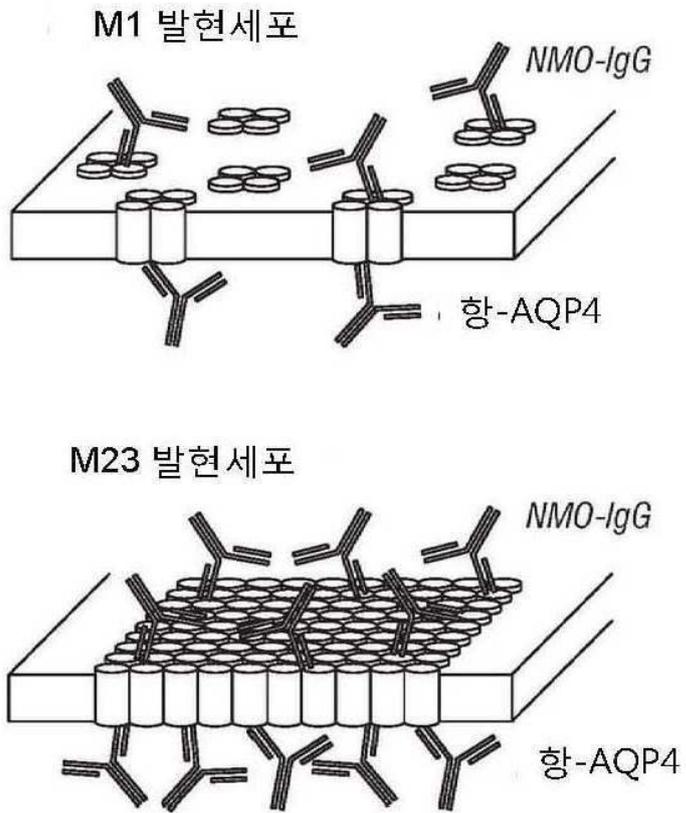
- [0307] EP Application 173,494
- [0308] EP Application 184,187
- [0309] Furman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:13609-13614, 2003.
- [0310] Gefter et al., Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977.
- [0311] Goding, In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
- [0312] Gulbis and Galand, Hum. Pathol. 24(12), 1271-1285, 1993.
- [0313] Hagemeyer et al., Thromb. Haemost., 101:1012-1019, 2009.
- [0314] Harris et al., J. Mol. Biol., 275:861-872, 1998.
- [0315] Hasegawa et al., J. Biol. Chem., 269:5497-5500, 1994.
- [0316] Hezareh et al., J. Virol., 75:12161-12168, 2001.
- [0317] Hinson et al., Arch Neurol., 66:1164-1167, 2009.
- [0318] Hinson et al., J. Exp. Med., 205:2473-2481, 2008.
- [0319] Hinson et al., Neurology, 69:2221-2231, 2007.
- [0320] Ho et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106:7437-7442, 2009.
- [0321] Idusogie et al., J. Immunol., 166:2571-2575, 2001.
- [0322] Igawa et al., MAbs., 3(3), 2011(Epub ahead of print).
- [0323] Jarius et al., Brain, 131:3072-3080, 2008.
- [0324] Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986.
- [0325] Jung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:13052-13056, 1994.
- [0326] Kaneko and Niwa, BioDrugs, 25:1-11, 2011.
- [0327] Khatoun et al., Ann. of Neurology, 26, 210-219, 1989.
- [0328] King et al., J. Biol. Chem., 269, 10210-10218, 1989.
- [0329] Kinoshita et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 394:205-210, 2010.
- [0330] Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 6, 511-519, 1976.
- [0331] Kohler and Milstein, Nature, 256, 495-497, 1975.
- [0332] Kontermann, BioDrugs, 23:93-109, 2009.
- [0333] Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157(1):105-132, 1982.
- [0334] Landis and Reese, J. Cell Biol., 60:316-320, 1974.
- [0335] Lennon et al., J. Exp. Med., 202:473-477, 2005.
- [0336] Li and Verkman, J. Biol. Chem., 276:31233-31237, 2001.
- [0337] Li et al., FASEB J., 2011(Epub ahead of print).
- [0338] Lu et al., FASEB J., 22:3216-3223, 2008.
- [0339] Lu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:10908-10912, 1996.
- [0340] Mader et al., PLoS One, 5:e10455, 2010.
- [0341] Manley et al., Nat. Med., 6:159-163, 2000.

- [0342] Marignier et al., *Brain*, 133:2578-2591, 2010.
- [0343] Martinez and Cossart, *J. Cell Sci.*, 117:5097-5106, 2004.
- [0344] Martinez et al., *Cell*, 123:1013-1023, 2005.
- [0345] Matiello et al., *Neurology*, 70:2197-2200, 2008.
- [0346] Morrison, *Science*, 229(4719):1202-1207, 1985.
- [0347] Nakamura et al., In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987.
- [0348] Neely et al., *Biochemistry*, 38:11156-11163, 1999.
- [0349] Nicchia et al., *Glia*, 57:1363-1373, 2009.
- [0350] Nieri et al., *Curr. Med. Chem.*, 16:753-779, 2009.
- [0351] O'Shannessy et al., *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- [0352] Owens and Haley, *J. Biol. Chem.*, 259, 14843-14848, 1987.
- [0353] Padmawar et al., *Nat. Methods*, 2:825-827, 2005.
- [0354] Papadopoulos et al., *FASEB J.*, 18:1291-1293, 2004.
- [0355] Patel et al., *Anal. Chem.*, 81:6021-6029, 2009.
- [0356] PCT Application PCT/US86/02269
- [0357] PCT Application WO 86/01533
- [0358] Ponten and Macintyre, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 74:465-486, 1968.
- [0359] Posner et al., *Hybridoma* 6, 611-625, 1987.
- [0360] Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- [0361] Ratelade et al., *J. Biol. Chem.*, 286(52), 45156-45164, 2011.
- [0362] Saadoun et al., *Brain*, 131:1087-1098, 2008.
- [0363] Saadoun et al., *Brain*, 133:349-361, 2010.
- [0364] Saadoun et al., *J. Cell Sci.*, 118:5691-5698, 2005.
- [0365] Schagger and Tricine, *Nat. Protoc.* 1:16-22, 2006.
- [0366] Shaw et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 80(19):1553-1559, 1988.
- [0367] Sosnick et al., *Biochemistry*, 31:1779-1786, 1992.
- [0368] Sun et al., *J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.
- [0369] Tajima et al., *J. Biol. Chem.*, 285:8163-8170, 2010.
- [0370] Tang et al., *J. Biol. Chem.*, 271(26):15682-15686, 1996.
- [0371] Verhoeyen et al., *Science*, 239(4847):1534-1536, 1988.
- [0372] Verkman, *Expert Rev. Mol. Med.*, 10:e13, 2008.
- [0373] Wawrzynczak & Thorpe, *Cancer Treat Res.*, 37:239-51, 1988.
- [0374] Wingerchuk et al., *Neurology*, 66:1485-1489, 2006.
- [0375] Wittig et al., *Nat. Protoc.*, 1:418-428, 2006.
- [0376] Wolburg, *J. Hirnforsch.*, 36:239-258, 1995.
- [0377] Wood et al., *J. Clin. Lab. Immunol.*, 17(4):167-171, 1985.

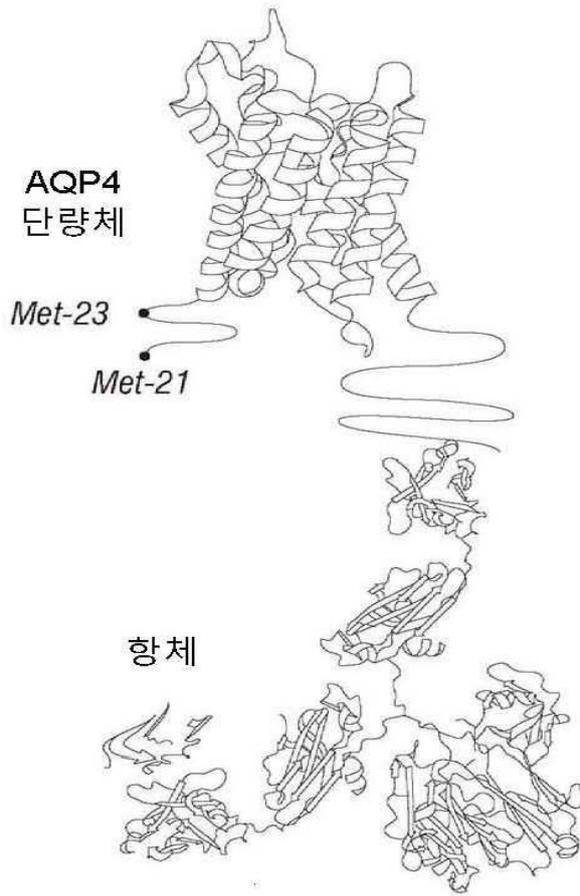
[0378] Yang et al., J. Biol. Chem., 270:22907-22913, 1995.

도면

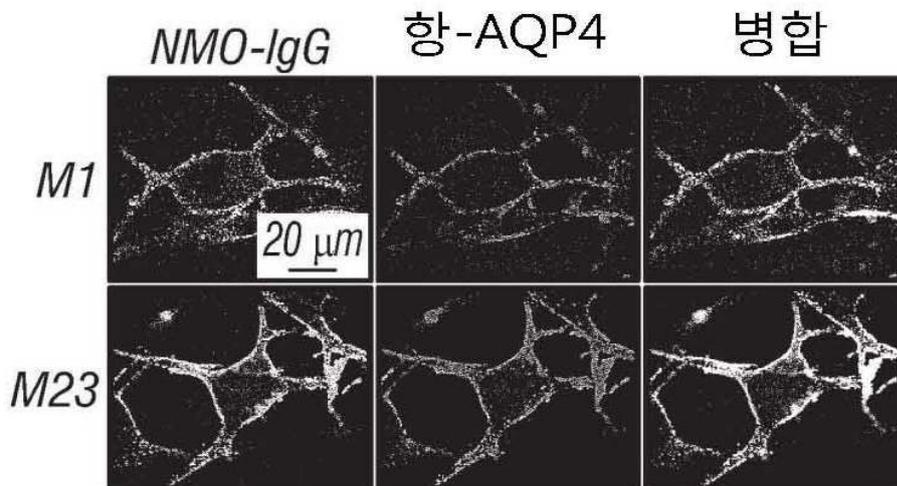
도면1a



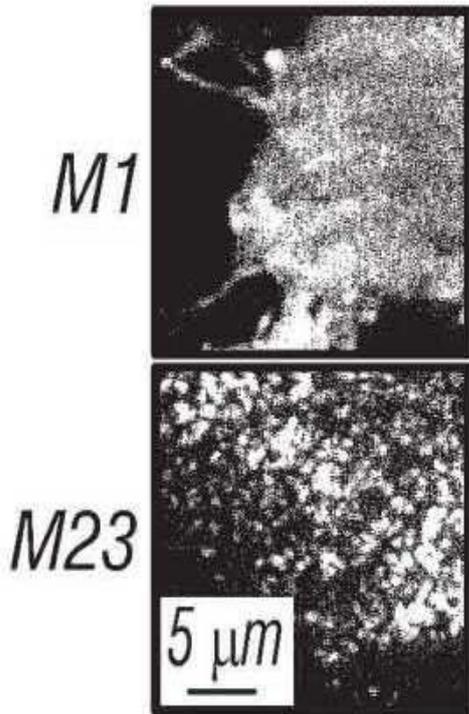
도면1b



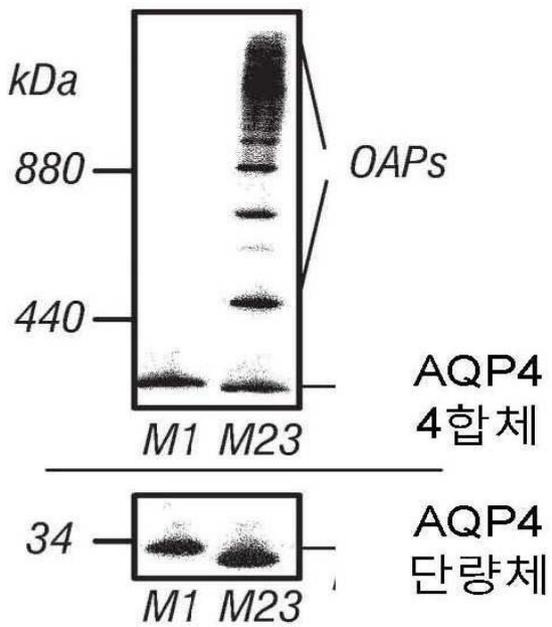
도면2a



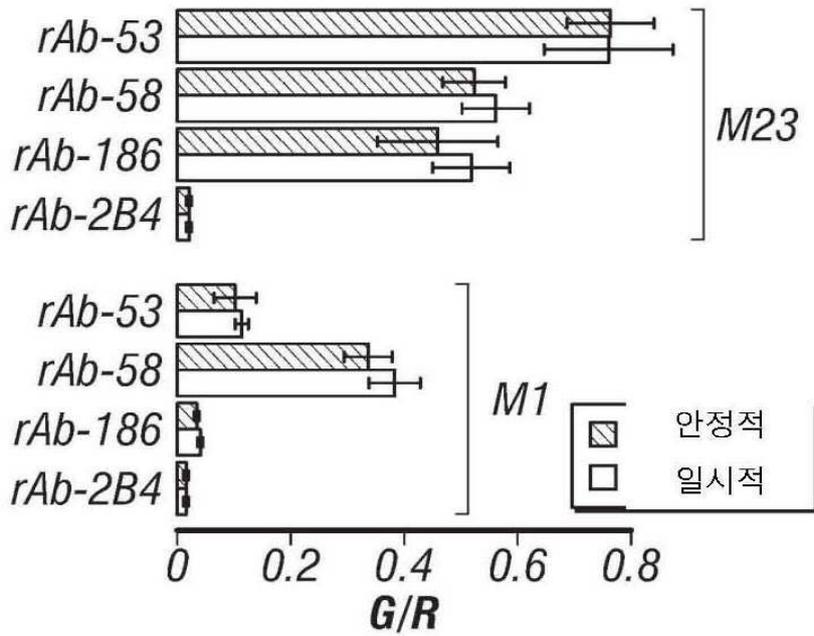
도면2b



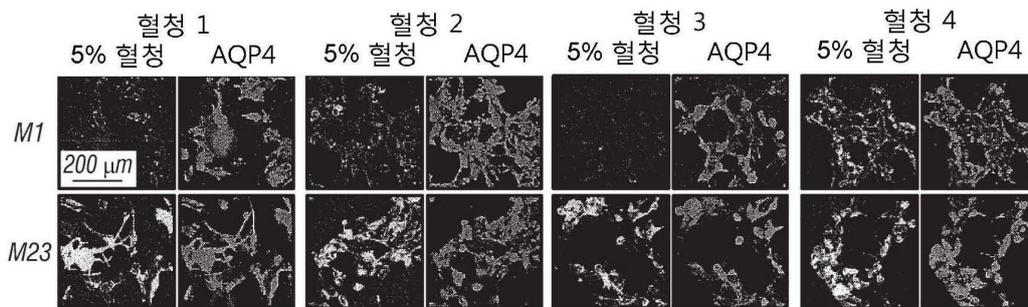
도면2c



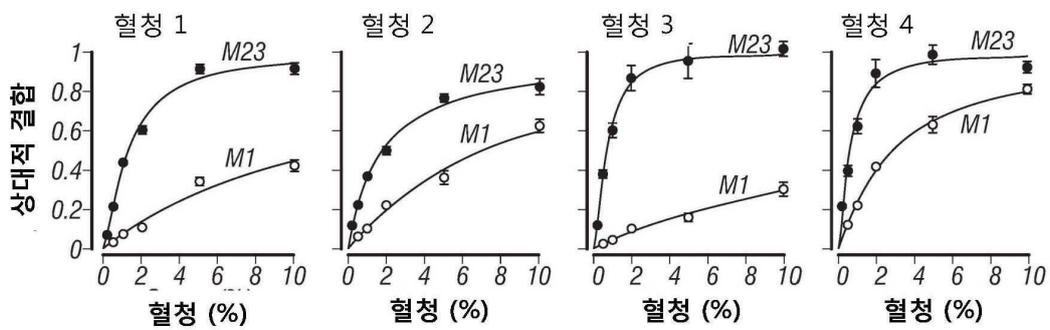
도면2d



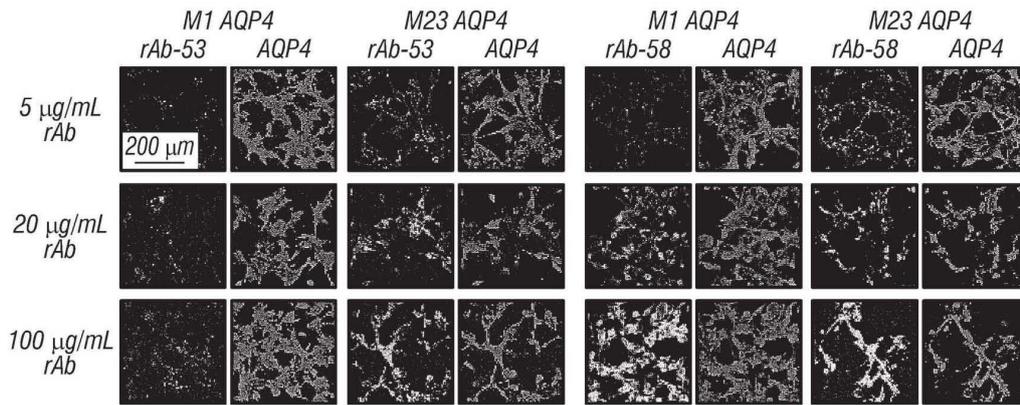
도면3a



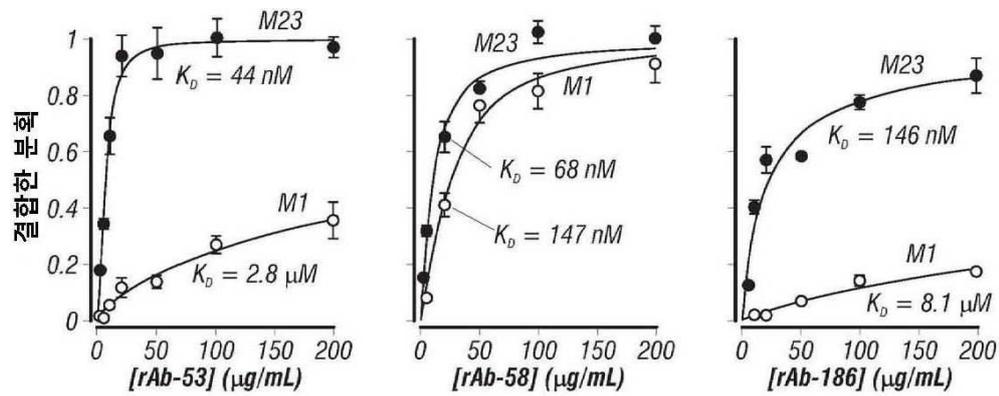
도면3b



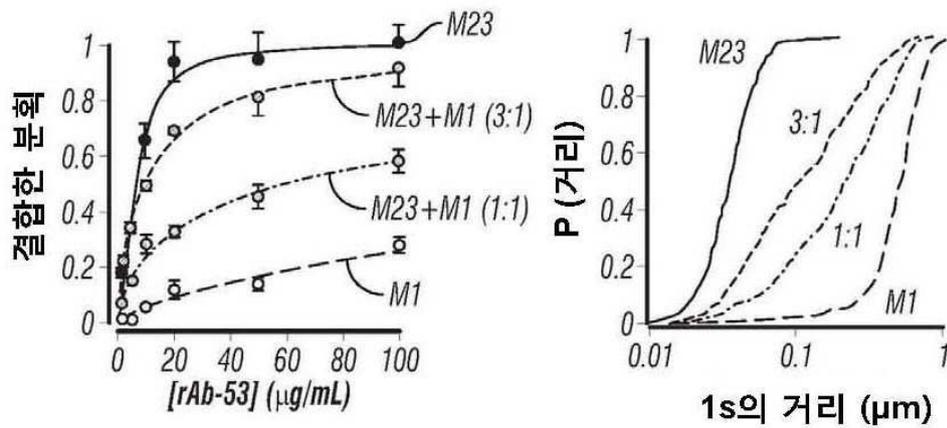
도면4a



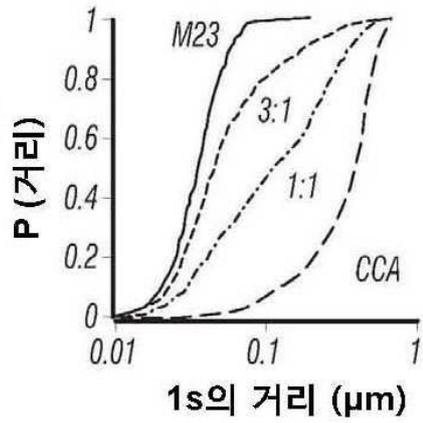
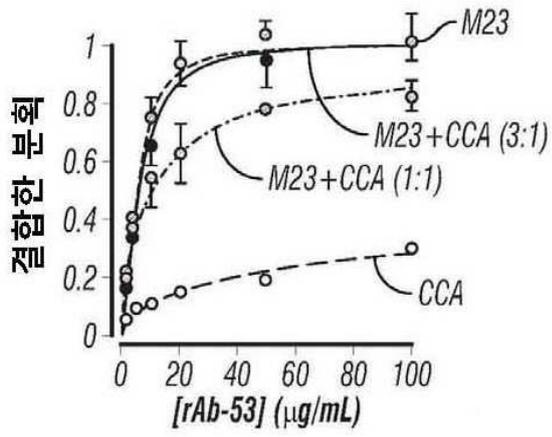
도면4b



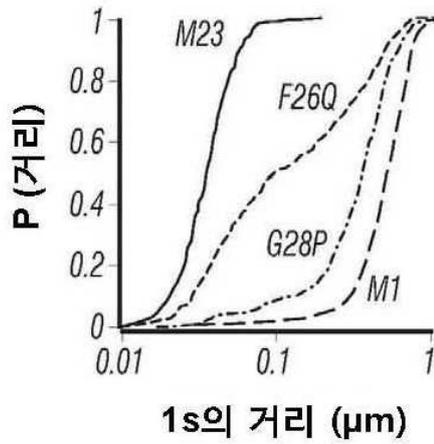
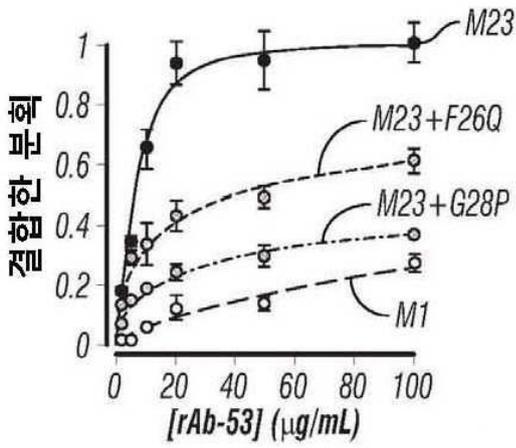
도면5a



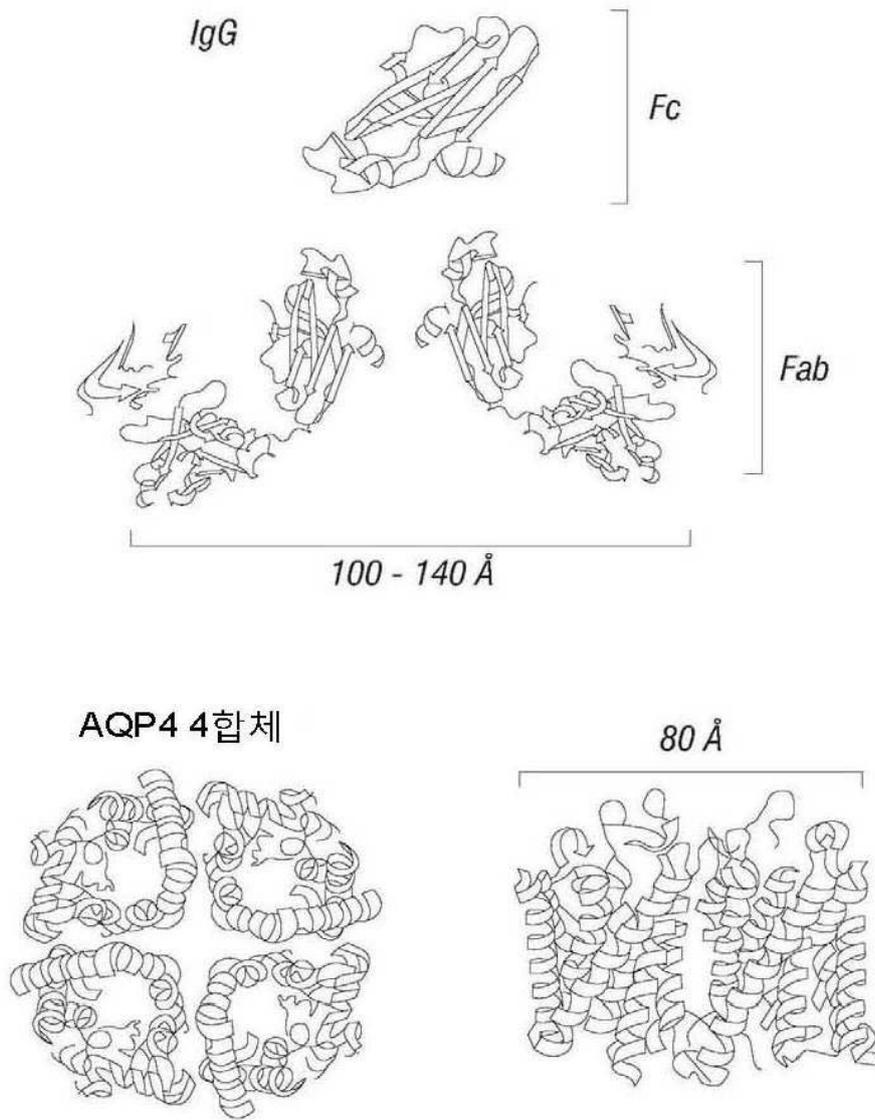
도면5b



도면5c

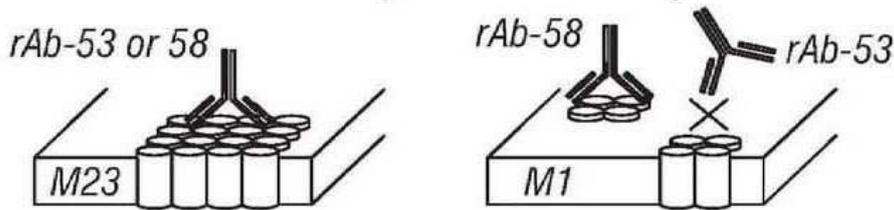


도면6a



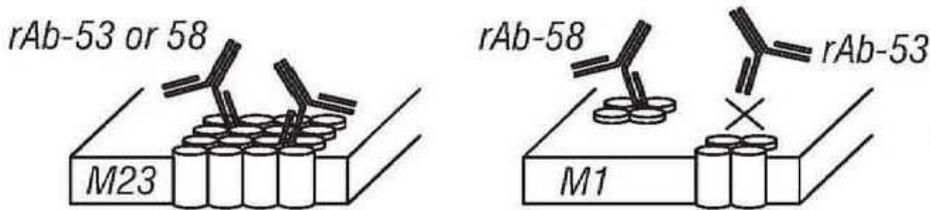
도면6b

시나리오 1: 2가적 결합이 친화도를 결정한다



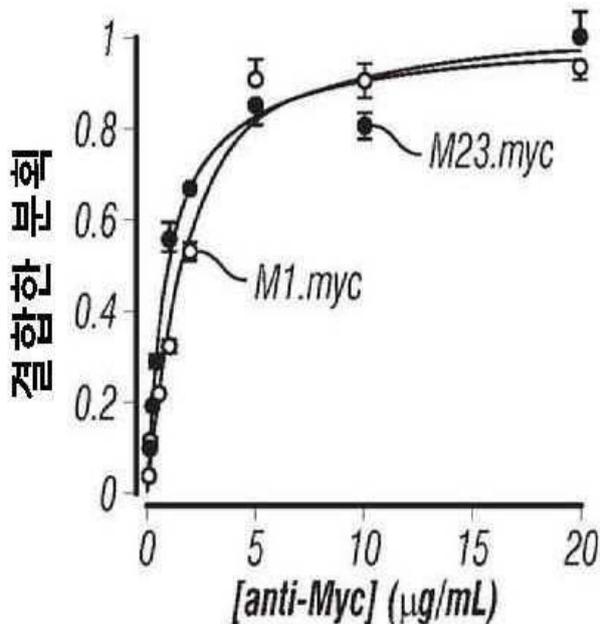
rAb-53: M23-IgG 결합 >> M1-IgG 결합
 M23-Fab 결합 = M1-Fab 결합
 rAb-58: M23-IgG 결합 = M1-IgG 결합
 M23-Fab 결합 = M1-Fab 결합

시나리오 2: 1가적 결합이 친화도를 결정한다

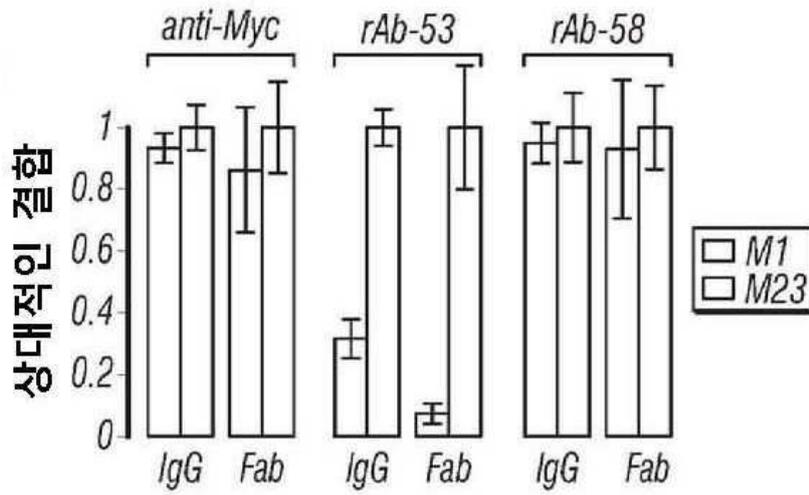


rAb-53: M23-IgG 결합 >> M1-IgG 결합
 M23-Fab 결합 = M1-Fab 결합
 rAb-58: M23-IgG 결합 = M1-IgG 결합
 M23-Fab 결합 = M1-Fab 결합

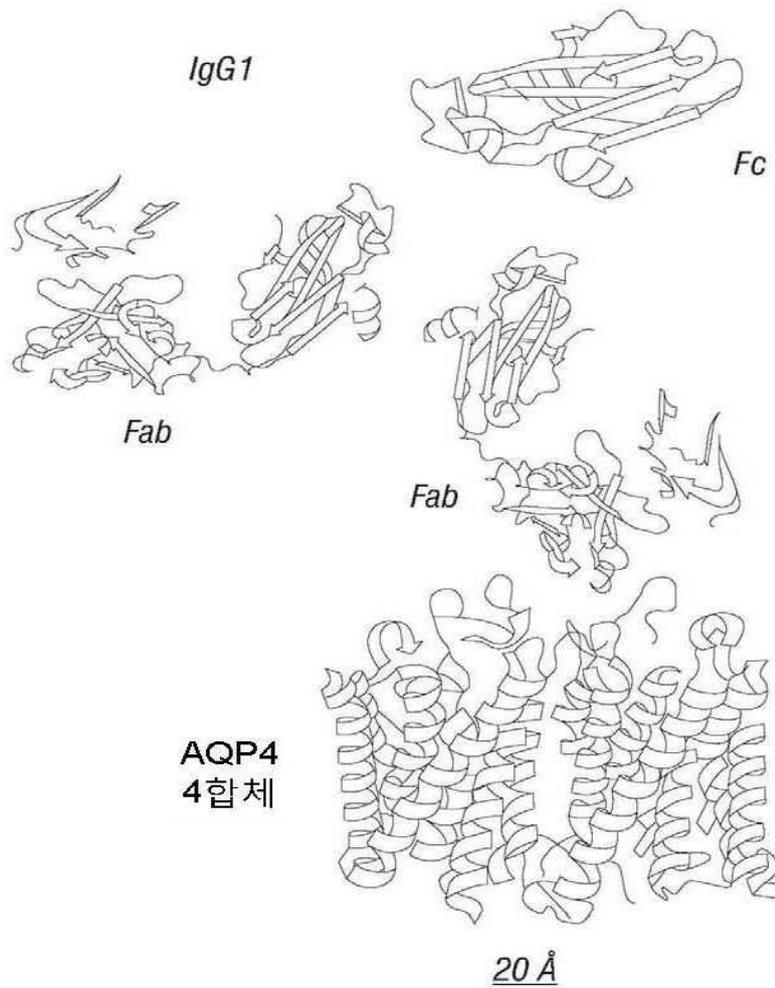
도면6c



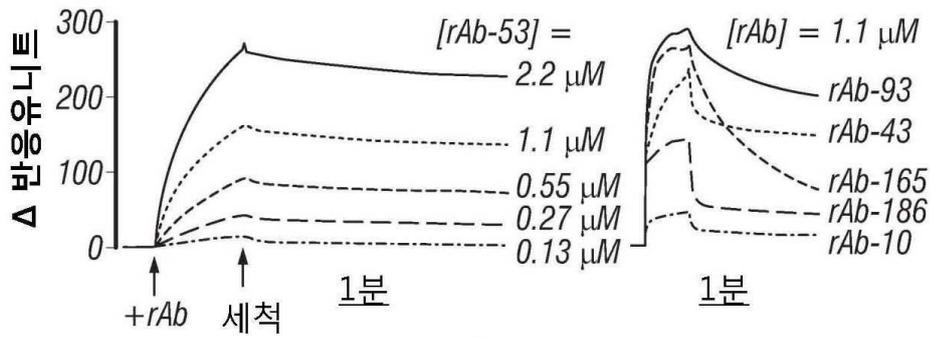
도면6d



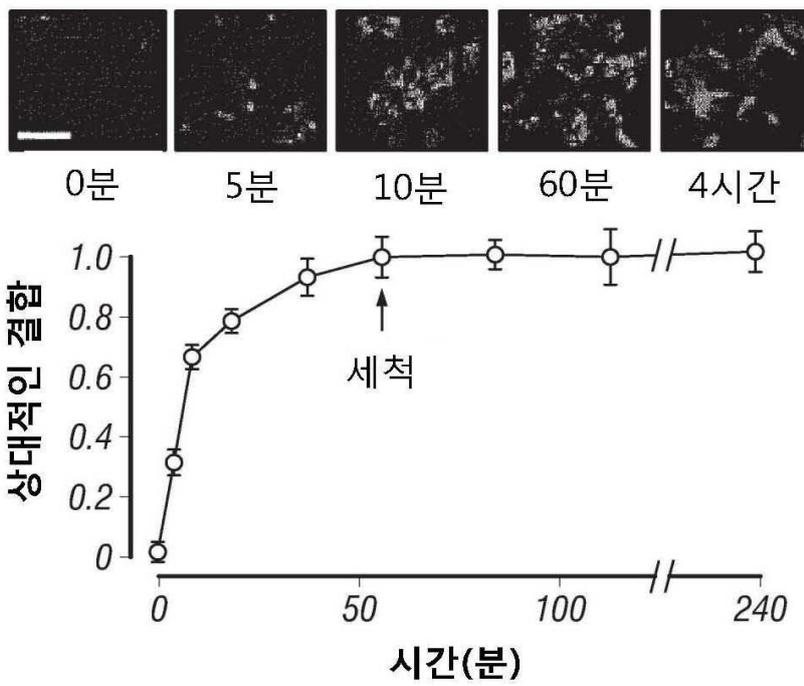
도면7a



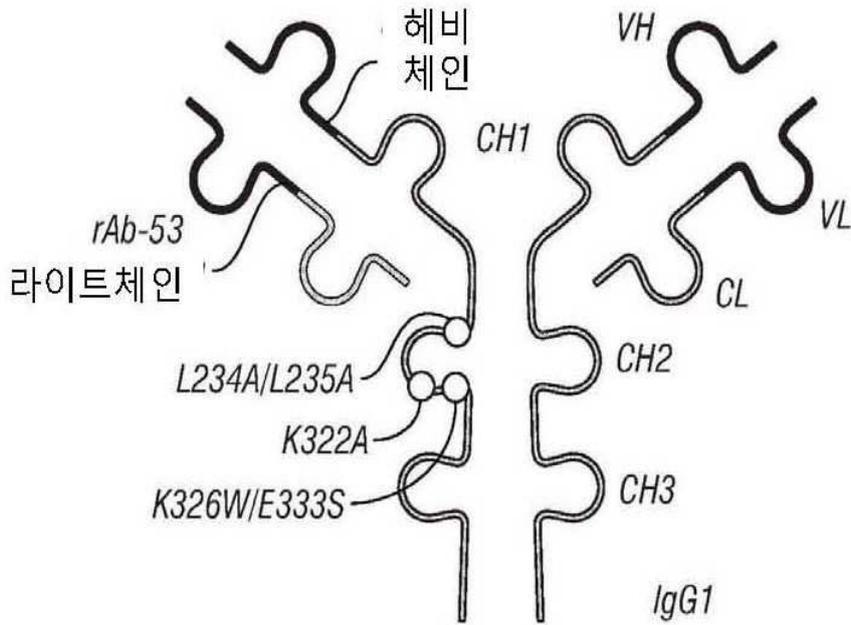
도면7b



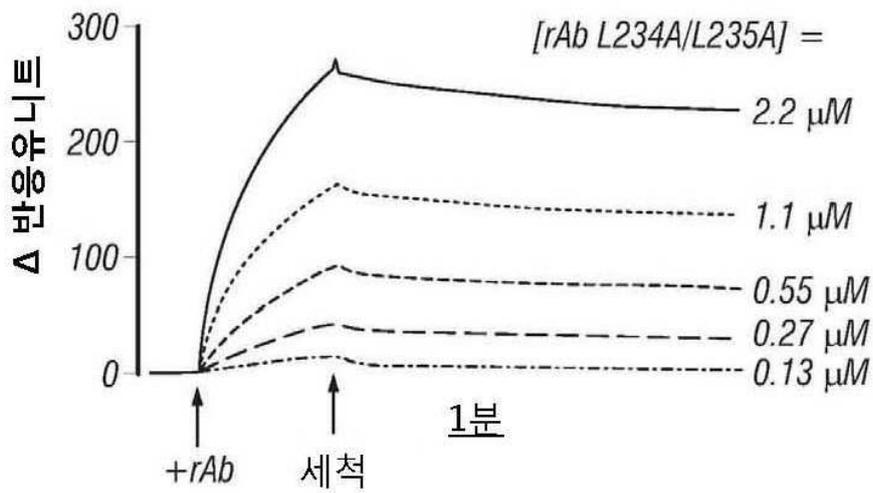
도면7c



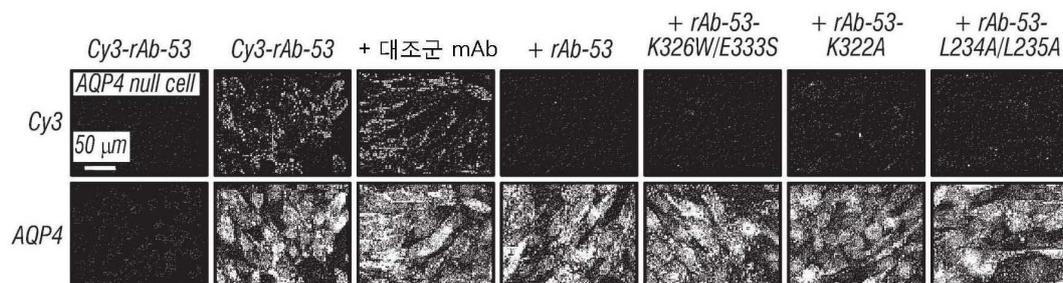
도면8a



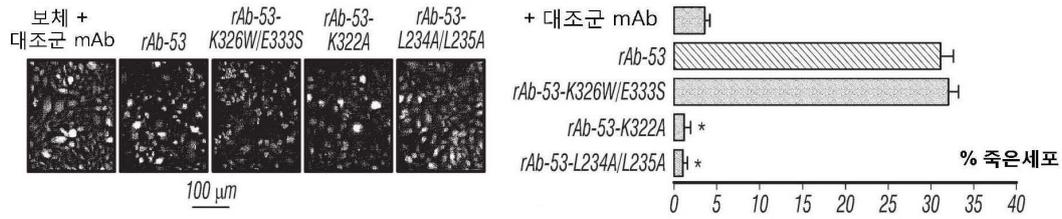
도면8b



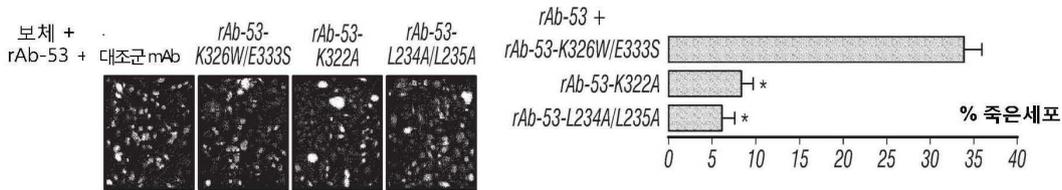
도면8c



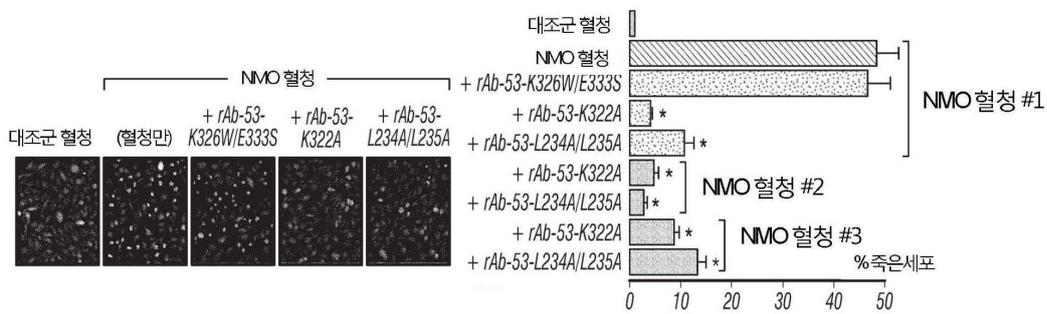
도면9a



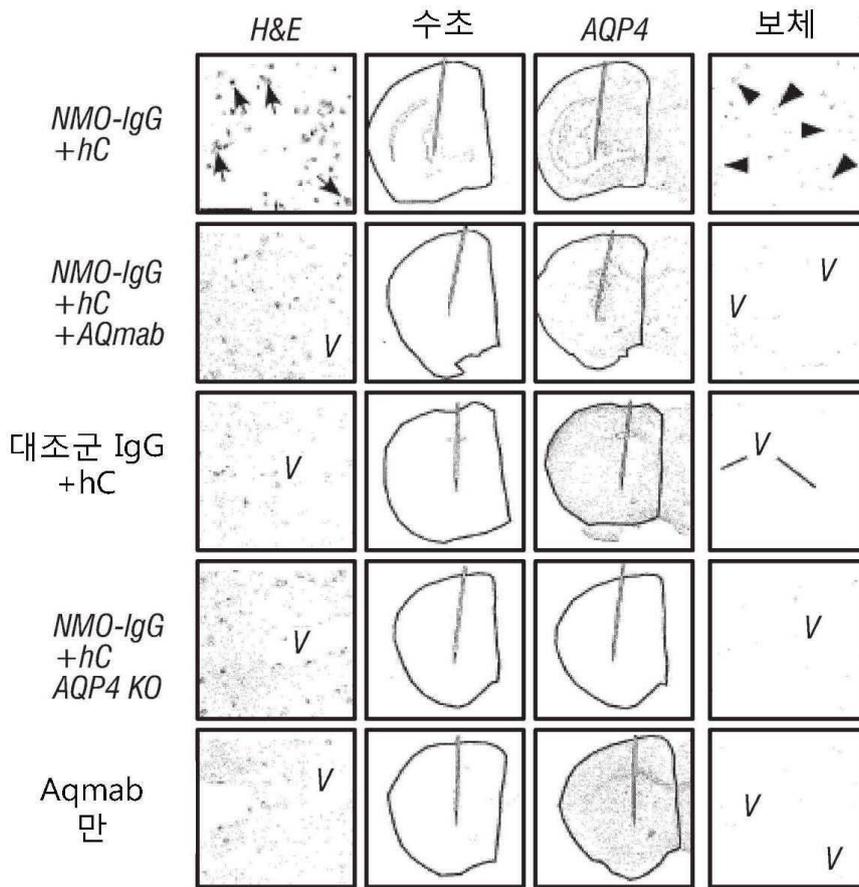
도면9b



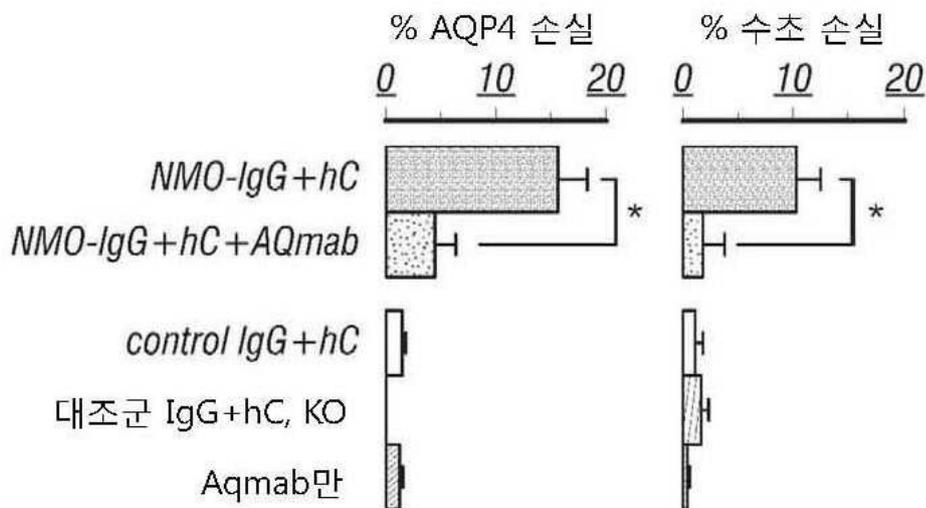
도면9c



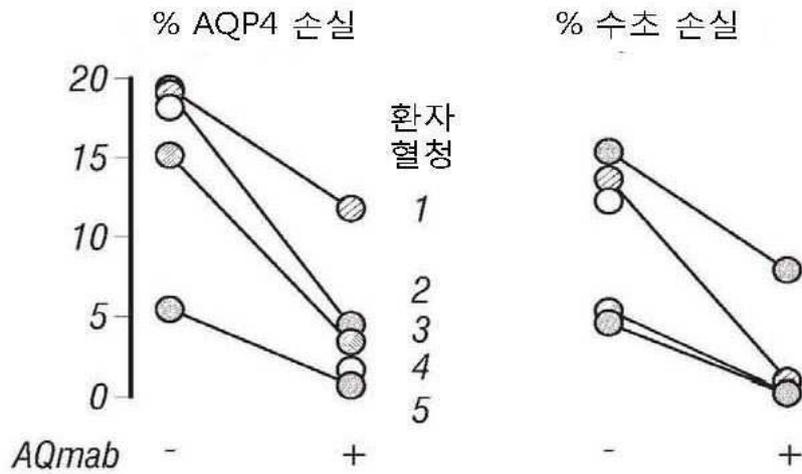
도면10a



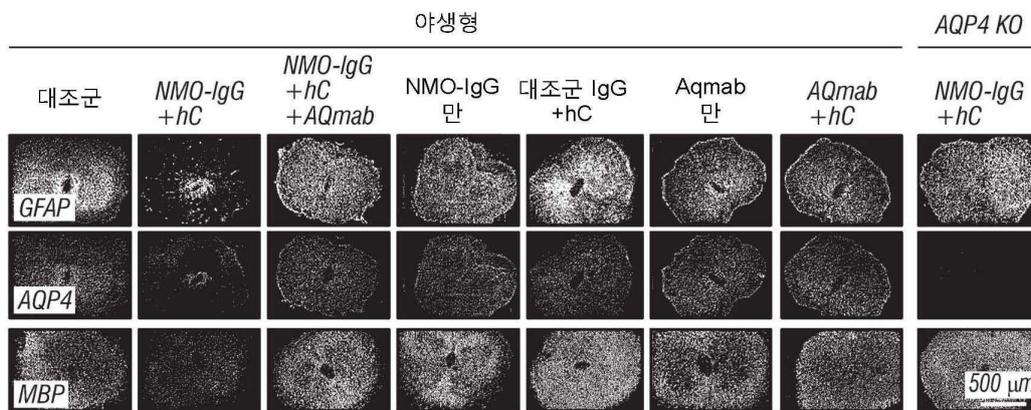
도면10b



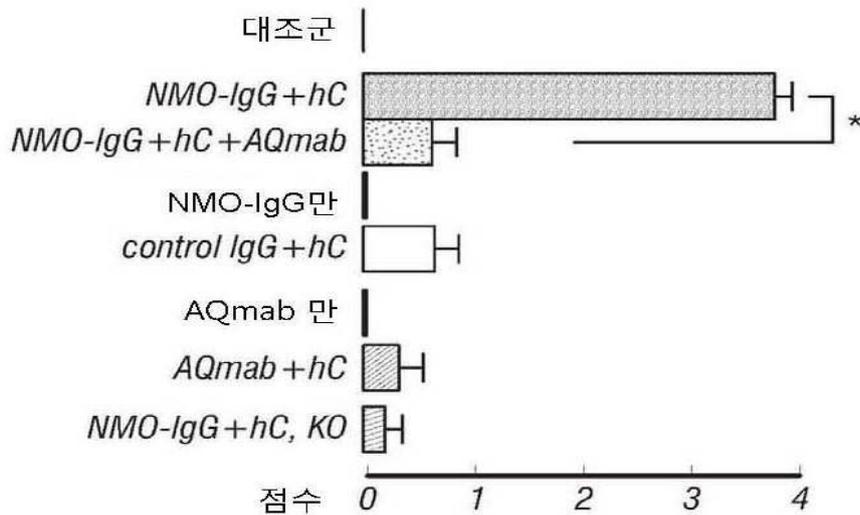
도면10c



도면11a



도면11b



서열 목록

<110> BENNETT, JEFFREY L.
 OWENS, GREGORY P.
 VERKMAN, ALAN S.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF NEUROMYELITIS
 OPTICA

<130> UTEC.P0027WO

<140> UNKNOWN

<141> 2012-04-23

<150> 61/477,955

<151> 2011-04-21

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1023

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgcct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120

tggaaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      300
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cgcgggggga      360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacce aaggacacc tcatgatctc ccggaccct      420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggtc gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc      660
aaagccaaag ggcagcccc agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag      720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg      840
ctggactccg acggctcctt ctctcttac agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg      900
    
```

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa ctcgaggact acaaggacga tgacgataag 1020

tga 1023

<210> 2

<211> 340

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccct 420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcgcggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc cgggatgag 720

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg 960
cagaagacc tctcctgtc tccgggtaaa ctcgaggact acaaggacga tgacgataag 1020
tga 1023

<210> 4
<211> 340
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Leu Glu Asp Tyr Lys Asp

325 330 335
 Asp Asp Asp Lys

340

<210> 5

<211> 645

<212> DNA

<213

> Homo sapiens

<400> 5

gaaattgtgt tgacacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctcaggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gactgttcgc accaactact tagcctggtt ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggt cctcatcttt ggtgcatcca gcaggccac tggcatcca 180
 gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgagtgta ttactgtcag cagtatggt gctcaccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca agtggaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgctgct gaataactc 420

 tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc ggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
 ggctgagtt cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 6

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Arg Thr Asn
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 7

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

caggtgcagc tgcaggagtc gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtcctc 60

acctgactg tctctggtgg ctccatcagt ggtcactact ggaactggat cggcagccc 120

ccaggaagg gactggagtg gattgggtac atccattaca gtgggagcac caactacaac 180

ccctcctca agagtcgagt caccatatca gtggacacgt ccaagaacca gtctcctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agcagagggg 300

agaggatgga gtgctttcta ctactactac atggaagtct ggggcaaagg gtccacggtc 360

tccgtctcct ca 372

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly His
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Glu Gly Arg Gly Trp Ser Ala Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Met Glu
 100 105 110
 Val Trp Gly Lys Gly Ser Thr Val Ser Val Ser Ser
 115 120

<210> 9

<211> 642

<

212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gacatccaga tgaccagtc tccatccgcc ctgtctgcat ctgtaggaga cacagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc gagtattagg agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctataag gcgtctgatt taaaaagtgg ggtcccatca 180
 agattcagcg gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccatcagcgg cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacac tataatagtt acccgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagg tggagatcag acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360

 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 600
 ctgagttcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asp Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 11
<211> 345

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

gtgcagctgg tggagtctgg gggtaggcttg gttcagccgg gggggtcct gagactctcc      60
tgtgcagcct ctggattcac ctttagaggt tatgccatga actgggtccg ccaggeccca      120
gggaaggggc tggagtgggt cgcaagtatc agtggcagtg gtagtaccac acagtacgca      180
gactccgca agggccgctt caccatcacc agagacaact ccaagagcac gctctatgcg      240
catgtgagta gctgagagc cgatgacacg gccgtatatt actgtgcaa aggggactac      300
gtctttgact actggggaca gggaacctg gtcaccgtct cctca                          345
    
```

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
  1           5           10           15
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Gly Tyr Ala
           20           25           30
Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
           35           40           45
Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ile Thr Gln Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

           50           55           60
Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Ala
  65           70           75           80
His Val Ser Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
           85           90           95
Lys Gly Asp Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
           100          105          110
Val Ser Ser
    
```

115

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 13

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 1023

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60

agcacagcgg cctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggetgtcct acagtctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300

aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc aacgtgccag cacctgaagc cgcgggggca 360

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 720

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccctg 840

ctggactccg acggctcctt ctctcttac agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg 900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg 960

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa ctcgaggact acaaggacga tgacgataag 1020

tga

1023

<210> 15
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

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

Gly Phe Asn Leu Asp Asp Tyr Asp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 35 40 45

Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val Ala Ile Leu Gln Pro Glu Glu Ser His
 50 55 60

Gln Asp Tyr Ile Asn Ser Val Arg Gly Arg Phe Ser Val Ser Arg Asp
 65 70 75 80

Ser Ser Arg Asp Thr Ile Asp Leu Gln Met His Ser Leu Arg Pro Glu
 85 90 95

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Pro Gly Leu Met Thr Thr

100 105 110

Leu Arg Gly Met Val Thr Arg Arg His Phe His Tyr Phe Thr Met Asp
 115 120 125

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 18

<211> 420

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gtaactacag gtgtccactc cgaggtgcag ctggtggagt ctgggggagg cgtggtccag 60
 cctggggggt ccctaagact ctctgtaca gcgtctggtt tcaacttaga tgactatgac 120

attcactggg tccgccagc gcccggaag gggtgcagt gggtggcaat ttgcagcct 180

gaagaaagtc atcaagacta tataaattcc gtgaggggcc gattctccgt ctccagagac 240

agttcgaggg acacaataga tctgcaaatg cacagtctta gacctgaaga cacggctata 300

tattactgta cgcgatctcc gggcctcatg actacgtgc ggggaatggt gaccaggagg 360

cactttcact acitcaccat ggacgtctgg ggcaaagga ccacggtcat cgtctctca 420

420

<210> 19

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys Asp Ile

1 5 10 15

Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro

20 25 30

Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Arg His Thr Ile Thr

35 40 45

Gly Tyr Asn Tyr Ile Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

50 55 60

Gln Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser

85 90 95

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu

100 105 110

His Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

195 200 205

His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

210 215 220

