



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0010919
(43) 공개일자 2015년01월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) **C07K 16/46** (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) **A61P 39/00** (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) **C12P 21/08** (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-0061598
(22) 출원일자 2014년05월22일
심사청구일자 2014년05월22일
- (30) 우선권주장
1020130057475 2013년05월22일 대한민국(KR)
1020130057762 2013년05월22일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
메타볼랩(주)
서울특별시 종로구 대학로 101, 부속 암연구소 6층 (연건동, 서울대학교 의과대학)
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
- (72) 발명자
강훈수
경기도 과천시 관문로 143 (중앙동, 래미안에코펠리스아파트) 1109동 902호
박소현
경기 남양주시 미금로 42
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양부현

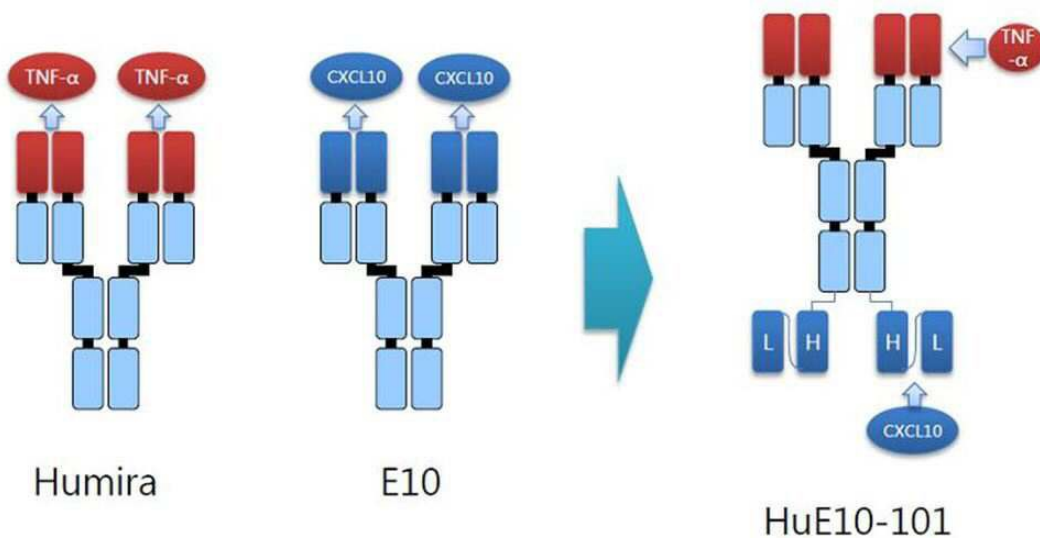
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **항 TNF-α/CXCL10 이중 타겟 항체 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 IgG 포맷 기반의 TNF-α/CXCL10 이중 타겟 항체에 관한 것으로 구체적으로 CXCL10 특이적 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 갖는 scFv를 TNF-α 특이적 항체의 중쇄 불변영역 C-말단에 결합된 형태의 항체는 TNF-α 및 CXCL10에 모두 효과적으로 결합하는 이중 특이성 항체임을 확인함으로써, 상기 항체는 TNF-α/CXCL10을 인식할 수 있는 이중 타겟 항체로서 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 TNF-α (tumor necrosis factor-alpha) 및 CXCL10(C-X-C motif chemokine 10)에 모두 효과적으로 결합하는 TNF-α/CXCL10 이중 타겟 항체를 포함한다. 본 발명의 이중 타겟 항체는 TNF-α 또는 CXCL10 단일 타겟 항체와 비교하여 우수한 TNF-α 억제능 및 파골세포 분화 억제능을 갖는다. 본 발명의 조성물은 면역질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

송영욱

서울 서초구 남부순환로 309길 67, 402호 (방배동, 방배 동양파라곤)

신기철

서울 종로구 북촌로 90, 102 (가회동, 가회동경남 빌라)

이은영

서울 용산구 유엔빌리지3길 74, 303동 G호 (한남동, UN빌리지)

이은봉

서울 강남구 압구정로 401, 55동 208호 (압구정동, 한양아파트)

박영우

대전 유성구 엑스포로 448, 506동 104호 (전민동, 엑스포아파트)

박범찬

대전 유성구 어은로 57, 106동 1305호 (어은동, 한빛아파트)

이동희

대전광역시 서구 월평동 계룡로 267 28-27 205호

김동진

대전 유성구 와룡로136번길 15, 113동 2101호 (봉산동, 하늘바람휴먼시아)

윤선하

대전 서구 월평동로 45, 106동 1206호 (월평동, 진달래아파트)

이기세

대전광역시 서구 월평동 14

이현주

대전 유성구 송강로42번길 61, 308동 611호 (송강동, 송강청솔아파트)

김경진

대전광역시 유성구 과학로 125

김희찬

대전광역시 유성구 과학로 125

유석호

대전광역시 유성구 도룡동 3-1 배재대학교 바이오진단융합센터내

장명희

대전 대덕구 홍도로 129, 402호 (중리동)

장세일

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10035615
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	한국 바이오연구조합
연구사업명	산업융합원천기술개발사업
연구과제명	류마티스관절염 치료제로서 IgG 포맷 기반 항 TNF- α /CXCL10 이중 타겟 항체 신약 개발
기여율	1/2
주관기관	메타볼랩 주식회사
연구기간	2010.06.01 ~ 2015.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	1003561520110210030000616110035615201102
부처명	지식경제부
연구관리전문기관	한국산업기술평가관리원
연구사업명	산업원천기술개발사업(산업기술)
연구과제명	류마티스관절염 치료제로서 IgG포맷 기반 항 TNF α /CXCL10 이중타겟 항체 신약 개발
기여율	1/2
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2011.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 제 1 항원 결합 부위, 및 CXCL10(C-X-C motif chemokine 10)에 특이적으로 결합하는 제 2 항원 결합 부위를 포함하며,

상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역(Heavy chain complementarity determining region, HCDR) 1, 서열번호 2의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 3의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 5의 아미노산을 포함하는 경쇄 상보성 결정영역(Light chain complementarity determining region, LCDR) 1, 서열번호 6의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 7의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며,

상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 21 및 서열번호 25 로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 22 및 서열번호 26으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 11, 서열번호 19, 서열번호 23 및 서열번호 27로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 13, 서열번호 29, 서열번호 33 및 서열번호 37로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 14, 서열번호 30, 서열번호 34 및 서열번호 38로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 15, 서열번호 31, 서열번호 35 및 서열번호 39로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 4의 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 것을 특징으로 하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 8의 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 것을 특징으로 하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 12의 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 것을 특징으로 하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 16의 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 것을 특징으로 하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 9의 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 10의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 11의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 13의 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 14의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 15의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 17의 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 18의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 19의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 29의 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 30의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 31의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 21의 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 23의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 33의 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 34의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 35의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 25의 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 26의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 27의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 37의 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 38의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 39의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체는 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 제 1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 CXCL10에 특이적으로 결합하는 제 2 전장 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 제 1 전장 항체 및 제 2 전장 항체의 중쇄 불변 영역 C-말단이 서로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체는 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 제 1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 CXCL10에 특이적으로 결합하고 제 2 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 제 2 전장 항체의 단편을 포함하고, 상기 제 1 전장 항체의 중쇄 불변 영역 C-말단에 제 2 항체의 단편이 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 항체의 단편은 단일 사슬 가변 분절(Single-chain variable fragment, scFv)인 것을 특징으로 하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 13

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서, 항체-항체 또는 항체-단편 간의 연결은 링커(linker)에 의해 연결되는 것을 특징으로 하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체.

청구항 14

제 1 항의 제 1 항원 결합 부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 제 2 항원 결합 부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 공동 형질감염(co-transfection)시킨 형질전환체.

청구항 15

다음 단계를 포함하는 TNF- α /CXCL10 이중 타겟 항체의 제조 방법:

- (a) 제 14 항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)에서 배양된 배양액으로부터 제 1 항의 항체를 정제하는 단계.

청구항 16

(a) 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역질환, 염증성질환, 세포, 조직 또는 기관의 이식거부(transplantation rejection)인 것을 특징으로 하는 면역 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 자가면역질환 또는 염증성질환은 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 염증성장질환(inflammatory bowel disease), 건선(psoriasis), 천식(asthma), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 만성폐색성 기관지 질환(chronic obstructive pulmonary disease) 및 습진(eczema)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 19

유효성분으로서 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체를 포함하는 조성물을 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) 및 CXCL10(C-X-C motif chemokine 10)에 특이적으로 결합하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

일반적으로 항체는 분자량이 큰 중쇄(중쇄)와 분자량이 작은 경쇄(경쇄)의 폴리펩티드가 이황화 결합(disulfide bond)으로 연결이 되어 이형 이중체(heterodimer)을 형성하며, 두 개의 이형 이중체가 다시 이황화 결합으로 연결이 되어 4중체(tetramer)를 형성한다. 중쇄를 만드는 폴리펩티드는 4개의 영역(domain)으로 되어 있는데 N-말단에서부터 가변영역, 불변영역 1, 불변영역 2 및 불변영역 3으로 구성되어 있으며, 경쇄를 만드는 폴리펩티드는 2개의 영역(domain)으로 되어 있는데 N-말단에서부터 가변영역, 불변영역으로 구성되어 있다. 이중에서

중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역의 결합체가 1 개의 항원과 결합하게 된다.

[0003] 세포를 표식해 주는 화학적 표식인자인 항원(antigen)과 이에 대한 항체(antibody)와의 반응은 고도의 특이성을 나타낸다. 항체와 상호작용하는 항원 부위를 항원 결정기 또는 에피토프(epitope)라 하고, 항원 결정기와 항체의 항원 결합부위인 가변영역이 특이적으로 결합하게 된다. 그러므로 항원 결합부위는 단 1개의 항원결정기와 결합할 수 있으므로 수 많은 항체들은 각자가 특정 결정기를 가진 항원에 대한 특유의 면역성을 제공할 수 있다.

[0004] 항체는 혈중에서의 안정성이 높고, 항원성도 낮기 때문에 의약품으로서 주목되고 있다. 그 중에는 두 종류의 항원을 인식할 수 있는 이중 특이성 항체(bispecific antibody)가 있다. 이중 특이성 항체는 크게 2 종류로 구분할 수 있다. 첫 번째는 재조합 DNA 기술에 의해서 항체를 변형시켜 2 개의 서로 다른 항원과 결합할 수 있는 항원 결합부위를 갖도록 하는 경우로 이 경우는 1 개의 결합부위는 어떠한 항원에 대하여 특이적이고, 제 2의 결합부위는 또 다른 항원에 대해서 특이적인 항체로 동시에 2 개의 항원과 결합할 수 있다(Beck A et. al., Nat Rev Immunology 10:345-352, 2010). 두 번째 종류의 이중 특이성 항체는 아주 최근 개발된 항체로 1 개의 항원결합부위를 갖는 정상적인 항체로서 2 개의 서로 다른 항원과 결합할 수 있는 능력을 갖는 항체로 투-인-원(two-in-one) 항체로 부른다(Bostrom, J et. al., Science 323, 1610-1614, 2009). 이러한 투-인-원 항체는 1 개의 항원결합 부위를 가지기 때문에 2 개의 항원과 결합하기보다는 한번에 1 개의 항원과 결합할 수는 있으나, 서로 다른 2 개의 항원에 결합할 수 있는 능력을 갖고있는 항체이다. 투-인-원 항체는 기존의 개발에 성공한 전형적인 항체의 형태를 갖고 있기 때문에 개발에 매우 유리하다.

[0005] 이러한 이중 특이성 항체는 특정 독성 세포 및 표적 세포에 결합하여 작용할 수 있으므로 표적 특이성이 높은 장점을 가진다.

[0006] 1990년대 후반부터 새로 개발된 항 류마티스 약제들은 류마티스 관절염의 병태생리에 대한 이해가 깊어지면서, 가장 표적이 되는 물질을 차단하여 질환을 조절하고자 하는 표적 치료(targeted therapy)의 개념이 대두되었다. 결국 특정 질환에서 표적이 되는 물질을 찾아내고, 이 표적을 차단할 수 있는 물질을 디자인하여 만들어진 (designed drug) 생물학적 제제들이 개발되어 사용됨으로써 류마티스 관절염의 치료에 있어서 큰 변화를 가져오게 된 것이다. 이러한 제제들에는 대표적으로 TNF- α 차단제(etanercept, infliximab, adalimumab 등), 재조합 interleukin-1 수용체 길항제인 anakinra와 함께 interleukin-6 antagonists(tocilizumab), CTLA4Ig(abatacept), B cell depleting agent (rituximab) 등이 있으며 실제로 임상에 사용되고 있거나 시험 중에 있다.

[0007] TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 대한 연구는 이미 100여 년 전부터 종양 및 패혈증 환자를 대상으로 시작되었다. TNF- α 는 대식세포, B와 T 림프구를 포함한 면역세포와 비면역세포, 및 다양한 종양세포에 의해 생성되며, 정상적인 생리적 염증반응과 후천성 및 선천성 면역에 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환에서 TNF- α 가 부적절하게 많이 생산되는 경우, 면역 체계의 다양한 세포를 활성화시켜 세포독성 효과를 유발하고 염증, 조직 파괴, 및 장기 손상 등의 반응들이 나타난다. TNF- α 의 주요 생물학적 작용은 첫째, 다양한 형태의 세포에서 성장, 분화, 대사를 조절하고; 둘째, 지방분해를 자극하며, 지방세포에 존재하는 지질단백 지질분해효소(lipoprotein lipase) 활성을 억제하고, 간내 지방형성(hepatic lipogenesis)을 자극하여 악액질(cachexia)을 유발하며; 및 셋째, 세포자멸사(apoptosis)를 유도한다. TNF- α 는 유리형(free form)으로 존재하기도 하고 세포막에 결합된 형태(membrane-bound form)로 존재하기도 한다. 두 가지 형태의 TNF- α 는 매우 강하게 세포의 염증 반응을 유발하고 조직 내의 질병상태를 촉진시킨다. 세포막에 결합된 TNF- α 는 세포대 세포 접촉을 통해 세포독성과 염증효과를 나타내며, TNF- α 전환효소(TACE)에 의해 세포막에서 유리형으로 떨어져 세포 밖에 존재하게 된다. TNF- α 는 혈중에서 두 가지 수용체, 즉 TNF type I 수용체 (p55) 또는 TNF type II 수용체(p75)와 결합하여 생물학적 활성을 나타낸다. 임상적으로 볼 때, 과잉 생산된 TNF- α 는 류마티스관절염 환자의 대식세포를 자극하여 염증반응을 증폭시키는 염증성 매개물질을 생산하고, 혈관내피세포에서 부착분자를 발현하게 하여 더 많은 염증세포들이 염증이 일어난 부위로 모일 수 있도록 하며, 섬유아세포로 하여금 단백분해효소를 생산하게 하여 연골, 뼈, 및 인대에 손상을 입혀 질병을 악화시킨다.

[0008] TNF- α 억제제는 1998 년 11 월 etanercept가 미국 식약청으로부터 류마티스 관절염의 치료제로 최초로 승인받아 상용화되어 판매되기 시작한 후 infliximab 및 adalimumab 등이 시판되고 있으며, 기존 약물의 효과와 부작용을 개선한 새로운 약물들이 개발되고 있다. 환자 개인별로 볼 때 TNF- α 억제제에 대한 치료 반응은 질병의 활성도와 이에 상응하는 구조적 손상, 질병에 의한 삶의 질에 대한 영향, 질병에 의해 발생된 증상과 징후가 환

자 개인에 따라 다르므로, 다양하게 나타날 수 있다. 또한 약물에 대한 감수성, 효과의 발현양상, 또는 부작용 역시 다양하게 나타날 수 있다. 다양한 종류의 TNF- α 억제제 사이에도 각각의 구성물질, 구체적인 작용기전, 약리기전, 및 생물학적 약제학적 성질(biopharmaceutical properties) 등이 다르다. TNF- α 억제제의 효능을 입증하는 동물실험에는 인간 TNF- α 트랜스제닉 (Tg) 마우스를 사용하는데, Tg197 마우스는 4 내지 5 주령 시기에 류마티스 관절염과 흡사한 관절염이 발생하며, 9 내지 10 주령부터 하지 관절의 현저한 운동범위 제한이 관찰된다.

[0009] CXCL10(C-X-C motif chemokine 10)은 인터페론 감마 유도성 단백질 10 (IP-10)이라고도 불리며 인터페론 감마 (IFN- γ)에 의해 유도되는 10 kDa 의 케모카인이다. CXCL10은 주화 활성(chemotactic activity)을 가지며, 세포 분열 활성 (mitogenic activity)에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 이는 IFN- γ 에 반응하여 내피 세포, 단핵구, 섬유아세포 및 각질 형성 세포를 비롯한 다양한 세포에 의해 분비되며 또한 인간 피부에서의 지연성 과민 반응(delayed type hypersensitivity, DTH) 에 있어서 진피 대식 세포 및 내피 세포에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 원래 IFN- γ 에 의한 유도 뿐 아니라, 수지상 세포에서 IFN- α 에 의해 유도될 수 있으며, IFN- γ , 바이러스 및 리포폴리사카라이드와 같은 자극에 의해 중추 신경계 세포에서 유도될 수 있다.

[0010] CXCL10의 수용체는 7 개의 막투과성(transmembrane) 수용체인 CXCR3로 밝혀져 있다. CXCR3은 활성화된 T 림프구와 단구, 활막세포, 내피세포, NK세포, 호산구에서 발현된다. CXCR3의 2 가지 다른 리간드인 MIG(monocyte/macrophage activating, IFN- γ -inducible protein) 및 I-TAC(IFN- γ -inducible T cell alpha chemoattractant1)도 CXCR3와 결합하는 것으로 알려져 있다. CXCL10의 CXCR3에의 결합은 활성화된 T 세포와 활성화된 NK 세포에서 칼슘 이동(calcium mobilization) 및 주화성을 매개한다. 흉선 내에서 CXCL10은 TCR α β + CD8+ T 세포, TCR γ δ + T 세포 및 NK-타입 세포에 대한 화학 유인 물질(chemoattractant)인 것으로 밝혀졌다.

[0011] CXCL10 또는 그의 수용체인 CXCR3은 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 궤양성 대장염, 간염, 염증성 근염, 척수 손상, 전신성 홍반성 루푸스, 이식 거부, 쇼그렌 증후군을 비롯한 다양한 다른 염증성 및 자가 면역 질환에서 동정된다. 그러나, 이러한 CXCL10이 이러한 질환들에서 chemotaxis이외에 염증반응이나 면역반응에 구체적으로 어떻게 작용하는지, 치료 타겟으로서 어떠한 중요성을 갖는지에 대해서는 아직 구체적으로 알려진 바가 없다.

[0012] 수많은 염증 매개물질이 병인에 기여하는 자가 면역 질환의 치료에 단일 항원을 표적으로 하는 단일클론항체 치료보다 한 종류의 항체로 여러 표적을 중화하면 보다 효과적인 치료제로 작용할 수 있다. 두 가지의 다른 항체를 조합하여 만든 항체로 두 가지 표적을 인지하려는 노력은 이미 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있다. 최근 연구에 의하면(Bostrom et al. Science 2009), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)을 인지하는 항체의 경쇄 CDRs을 변이시킨 항체 라이브러리에서 혈관내피세포 성장인자(VEGF)를 동시에 중화하는 항체를 스크리닝 하는데 성공하였다. 상기 항체는 한 질환의 병인에 기여하는 두 가지 매개물질을 모두 인지하는 (bispecific) 이중항체로서, 특히, 정상 IgG와 구조가 같고, 약물동력학 특성이 예측 가능하며, 이가 또는 일가 (bi- or monovalent) 항체를 모두 만들 수 있다는 장점이 있다.

[0013]

[0014] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명자들은 TNF- α 및 CXCL10에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항체를 개발하고자 노력한 결과, CXCL10 특이적 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지는 scFv를 TNF- α 특이적 항체의 중쇄 불변 영역 C-말단에 결합된 형태의 항체를 제조하였으며, 상기 항체는 TNF- α 및 CXCL10에 이중 특이적으로 결합하는 것을 확인하였고, TNF- α 및 CXCL10에 특이적으로 결합하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체가 TNF- α 억제능 및 파골세포 분화 억제능을 갖는다는 것을 실험적으로 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0016] 따라서, 본 발명의 목적은 TNF- α (tumor necrosis factor- α) 및 CXCL10(C-X-C motif chemokine 10)에 특이적으로 결합하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체를 제공하는데 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체를 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0018] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

[0019] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 TNF- α (tumor necrosis factor- α)에 특이적으로 결합하는 제 1 항원 결합 부위, 및 CXCL10(C-X-C motif chemokine 10)에 특이적으로 결합하는 제 2 항원 결합 부위를 포함하며,

[0021] 여기서 상기 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 중쇄 상보성 결정영역(Heavy chain complementarity determining region, HCDR) 1, 서열번호 2의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 3의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 5의 아미노산을 포함하는 경쇄 상보성 결정영역(Light chain complementarity determining region, LCDR) 1, 서열번호 6의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 7의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며,

[0022] 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 9, 서열번호 17, 서열번호 21 및 서열번호 25 로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 10, 서열번호 18, 서열번호 22 및 서열번호 26으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 11, 서열번호 19, 서열번호 23 및 서열번호 27로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 13, 서열번호 29, 서열번호 33 및 서열번호 37로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 14, 서열번호 30, 서열번호 34 및 서열번호 38로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 15, 서열번호 31, 서열번호 35 및 서열번호 39로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는,

[0023] TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체를 제공한다.

[0024]

[0025] 본 발명자들은 TNF- α 및 CXCL10에 특이적으로 결합하는 이중 특이적 항체를 개발하고자 노력한 결과, CXCL10 특이적 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지는 scFv를 TNF- α 특이적 항체의 중쇄 불변 영역 C-말단에 결합된 형태의 항체를 제조하였으며, 상기 항체는 TNF- α 및 CXCL10에 이중 특이적으로 결합하는 것을 확인하였고, TNF- α 및 CXCL10에 특이적으로 결합하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체가 TNF- α 억제 및 파골세포 분화 억제능을 갖는다는 것을 실험적으로 규명하였다.

[0026] 본 발명에서 이용되는 항체는 TNF- α (tumor necrosis factor- α) 및 CXCL10(C-X-C motif chemokine 10)에 특이적으로 결합하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체이다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 항체는 인간항체(human antibody)이다.

[0028] 본 명세서에서 용어 “인간 항체(human antibody)”는, 중쇄 및 경쇄의 가변 및 불변영역의 서열이 인간으로부터 유래한 항체를 의미. 하기의 실시예에 기재된 바와 같이 본 발명자들은 유전적 재조합 기술과 세포공학 기술을 이용하여 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 인간 항체를 제조하였다. 인간 항체는 비-인간 및 키메라 항체보다 장점을 갖는다: 인간 항체의 이펙터 부분은 인간 면역계의 다른 부분과 더 양호하게 상호작용하며(예를 들어, 상보성-의존 세포독성(CDC) 또는 항체-의존 세포 세포독성(ADCC)에 의해 더 효율적으로 표적 세포가 파괴됨), 인간 면역계가 인간 항체를 외부 물질로 인식하지 않아서 이러한 생체내로 유입된 항체에 대한 면역 반응이 전체 외래 비-인간 항체 또는 부분 외래 키메라 항체 등에 비하여 덜 하다. 또한, 주사된 비-인간 항체는 인간 항체의 반감기보다 인간 순환계에서 매우 더 짧은 반감기를 가진다는 것이 보고 되었다. 반대로, 생체내로 유입

된 인간 항체는 자연 발생 인간 항체와 실질적으로 동일한 반감기를 가지므로 투여되는 복용량과 횟수를 줄일 수 있으므로 더 유용하다.

- [0029] 본 명세서에서 용어 “가변영역”은 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 변이를 보이는 항체 분자의 부분을 의미하고, 가변영역에는 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. 상기 CDR 사이에는 프레임 워크 영역(framework region, FR) 부분이 존재하여 CDR 고리를 지지해주는 역할을 한다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 “상보성 결정 영역”은 항원의 인식에 관여하는 고리모양의 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이 결정된다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “패닝(panning)”은 파아지의 외벽(coat)에 펩타이드를 발현(display)하는 파아지 라이브러리로부터, 표적 분자(항체, 효소, 세포표면 리셉터 등)와 결합하는 성질을 지닌 펩타이드를 표면에 발현하고 있는 파아지만을 선택해 내는 과정을 일컫는다.
- [0032] 구체적으로, 상기 이중 타겟 항체는 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 제 1 항원 결합 부위, 및 CXCL10에 특이적으로 결합하는 제 2 항원 결합 부위를 포함하며,
- [0033] 상기 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 중쇄 상보성 결정영역(Heavy chain complementarity determining region, HCDR) 1, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 HCDR2, 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고,
- [0034] 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 경쇄 상보성 결정영역(Light chain complementarity determining region, LCDR) 1, 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성된 LCDR2, 서열번호 7의 아미노산 서열로 구성된 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하며,
- [0035] 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 9, 17, 21 및 25로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 10, 18, 22 및 26로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 11, 19, 23 및 27로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고,
- [0036] 서열번호 13, 29, 33 및 37로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 14, 30, 34 및 38로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 15, 31, 35 및 39로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 경쇄 또는 그의 단편을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 또한, 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 9의 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 10의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 11의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 13의 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 14의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 15의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 17의 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 18의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 19의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 29의 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 30의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 31의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 21의 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 23의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 33의 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 34의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 35의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 25의 아미노산을 포함하는 HCDR1, 서열번호 26의 아미노산을 포함하는 HCDR2, 서열번호 27의 아미노산을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하고, 서열번호 37의 아미노산을 포함하는 LCDR1, 서열번호 38의 아미노산을 포함하는 LCDR2, 서열번호 39의 아미노산을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체의 제 1 항원 결합 부위는 서열번호 4의 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열번호 8의 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [0042] 상기 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체의 제 2 항원 결합 부위는 서열번호 12, 20, 24 및 28의 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열번호 16, 32, 36 및 40의 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 상기 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체는 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 제 1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 CXCL10에 특이적으로 결합하는 제 2 전장 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 제 1 전장 항체 및 제 2 전장 항체의 중쇄 불변 영역 C-말단이 서로 연결되어 있는 것을 특징으로 하며, 구체적으로 TNF- α 에 특이적으로 결합하는 제 1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄; 및 CXCL10에 특이적으로 결합하고 제 2 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 제 2 전장 항체의 단편을 포함하고, 상기 제 1 전장 항체의 중쇄 불변 영역 C-말단에 제 2 항체의 단편이 연결되어 있는 것을 포함한다(도 1 참조).
- [0044] 상기 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체의 단편은 단일 사슬 가변 분절(Single-chain variable fragment, scFv)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 상기 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체는 항체-항체 또는 항체-단편 간의 연결은 링커(linker)에 의해 연결되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 인간 CXCL10의 유전자를 클로닝하여 CXCL10 항원 단백질을 제조하였으며(도 2 참조), 이를 라이브러리 파지에 반응시켜 CXCL10에 특이적으로 결합하는 scFv-파지를 획득하였고, 이를 대장균에 감염시켜 증폭시키는 패닝 과정을 수행하였다. 이와 같이 3차 패닝을 수행한 파지의 메트립타아제에 대한 콜로니의 역가가 5.67×10^8 로 증폭됨을 확인하였다(표 1 참조).
- [0047] 또한, 본 발명자들은 상기 결합능이 큰 3차 패닝한 다클론 파아지 항체군에서 단일 클론 항체를 선별하였으며(도 3 참조), 이의 ELISA 분석을 수행하여 단일 클론 항체를 한번 더 선별하였다(표 2 참조). 이와 같이 선별한 단일클론 파지를 분류 및 검사하기 위하여 핑거프린팅 및 서열 분석을 수행하였으며(도 4 참조), 이를 통해, 선별된 4 종류의 단일 클론 항체의 VH 및 VL의 CDR 영역의 패턴 및 폴리펩티드 서열을 확인하였다(표 5 및 표 6 참조).
- [0048] 또한, 본 발명자들은 상기 선별한 4 종류의 단일클론 파지 중 10E를 전체 형태의 IgG로 전환하여 중쇄 및 경쇄를 각각 벡터에 삽입하였으며, 이를 숙주세포에 공동-형질전환하여 형질전환체를 제조하여 이를 통해 전체 형태의 항체를 제작하여 CXCL10 항원에 대한 결합 친화도를 측정된 결과, 7×10^{-12} 의 값을 확인할 수 있었다(표 8 참조).
- [0049] 또한, 본 발명자들은 상기 선별된 10E 유전자를 항-TNF- α 단일항체인 휴미라의 플라스미드에 클로닝하여 TNF- α 및 CXCL10에 이중 특이적인 항체인 HuE10-101을 제조하였다(도 1 참조). 이와 같이 제작된 항체의 분자량은 약 187 kDa임을 확인하였으며(도 6 참조), ELISA 분석을 통해 TNF- α 및 CXCL10에 대한 결합력이 이전 선행 연구를 통해 제조된 HuE10-100과 유사한 정도임을 확인하였다(도 7 참조). 추가적으로, LAL test를 통해 제조된 HuE10-101 항체의 세포 독성이 0.1 EU/ml 이하임을 확인하였다(도 8 참조).
- [0050] 또한, 발명자들은 상기 제조한 HuE10-101의 TNF- α 또는 CXCL10의 시험관 내 억제능을 평가하였다. 구체적으로, TNF- α 수용기를 가지는 WEHI164 세포를 사용하여 HuE10-101 항체가 Humira에 비해 향상된 억제능을 가지는 것을 확인하였으며(도 41 및 도 42 참조), 세포의 주화능 및 파골 세포의 분화가 감소되는 것을 통해 CXCL10 억제능을 가지는 것을 확인하였다(도 43 참조).
- [0051] 따라서, 본 발명의 TNF- α /CXCL10 이중 특이성 항체는 TNF- α 및 CXCL10에 동시에 강한 항원 결합능을 가짐을 확인하였다.
- [0052]
- [0053] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 제 1 항원 결합 부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 제 2 항원 결합 부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 숙주 세포로 공동 형질전환(co-transfection)된 형질전환체를 제공한다.
- [0054] 본 발명의 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 항체를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 항체의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고, 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역

시 본 발명의 범위에 포함됨을 당업자는 잘 이해할 수 있을 것이다. 즉, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 이들 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 폴리뉴클레오티드의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA)분자일 수 있다.

[0055] 상기 발현벡터의 제작 시에는, 상기 항체를 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(inhancer) 등과 같은 발현조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.

[0056] 본 발명의 발현벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 발현벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 상기 시그널 서열에는 숙주가 에셰리키아속(*Escherichia* sp.)균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속(*Bacillus* sp.)균인 경우에는 α-아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모(yeast)인 경우에는 MFα 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널 서열, α-인테페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함할 수 있고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[0057]

[0058] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 2) 상기 단계에서 배양된 배양액으로부터 상기 TNF-α/CXCL-10 이중 타겟 항체를 정제하는 단계를 포함하는 TNF-α/CXCL10 이중 타겟 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0059] 본 발명에 따른 상기 발현벡터를 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 대장균 또는 효모 세포 등에 형질전환시킨 후, 형질전환된 숙주세포를 배양함으로써 본 발명에 따른 항체를 대량 생산할 수 있다. 숙주세포의 종류에 따른 적절한 배양 방법 및 배지 조건 등은 당해 분야의 통상의 기술자에게 알려진 공지 기술로부터 당업자가 용이하게 선택할 수 있다. 상기 숙주세포는 대장균(*E. coli*) 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 원핵 생물일 수 있다. 또한, 사카로마이세스 세르비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모, 곤충 세포, 식물 세포, 동물 세포로부터 유래한 진핵 세포일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 동물 세포는 자가 또는 동종 이계 동물 세포일 수 있다. 자가 또는 동종 이계 동물 세포에 도입하여 제조된 형질전환체는 개체에 투여되어 암을 치료하는 세포치료 등에 이용될 수도 있다. 상기 숙주세포로의 발현벡터 도입방법은 당업자에게 공지된 어느 방법을 사용해도 무방하다.

[0060]

[0061] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 TNF-α/CXCL-10 이중 타겟 항체의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0062] 본 발명의 TNF-α/CXCL-10 이중 타겟 항체는 TNF-α 억제능 및 파골세포 분화 억제능을 나타내므로 항체 단독 또는 통상의 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 면역질환에 대한 예방 및 치료용 약제학적 조성물로 사용가능하다.

[0063] 본 발명의 조성물은 면역 반응에 의해 매개되는 조직 또는 기관의 이식편 거부(graft rejection)를 방지하기 위한 면역억제제(immuno-suppressant)로서 유용하게 사용될 수 있다. 이식편 거부란 이식편(이식되는 생체의 일부로 세포, 조직 또는 장기)의 공여자와 수용자간의 유전적 배경이 상이하여 (1) 공여자의 이식편 유래 면역 세포가 수요자를 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환(즉, 이식편대 숙주질환) 및 (2) 수용자가 공여자의 이식편을 외부물질로 인식하여 공격함으로써 유발되는 질환(즉, 이식편 거부반응)을 포함한다. 거부 반응을 일으키는 이식된 조직 및 기관의 예로서는 심장, 신장, 간, 연골질(medulla ossium), 피부, 각막, 폐, 췌장, 소장(intestinum tenue), 사지(limb), 근육, 신경(nervus), 심이지장, 소장(small-bowel), 췌장 인슐린 생산 세포(pancreatic-islet-cell) 등 뿐만 아니라, 연골질 이식에 의해 발생하는 이식편-대-숙주 질환을 들 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명의 조성물은 자가면역질환의 치료 및 예방에도 응용될 수 있다.

- [0065] 자가면역질환이란 면역 세포가 자신과 외부물질을 구별하지 못하고 자신을 공격하여 발생하는 질병을 통칭하는 질환이다. 자가면역질환의 예로는 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 전신성홍반성낭창(systemic lupus erythematosus), E-과면역글로불린혈증증후군(hyperimmunoglobulin E), 하시모토씨 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 그레이브스 병(Grave's Disease), 다발성경화증(multiple sclerosis), 경피증(Scleroderma), 전신성 경피증(progressive systemic sclerosis), 중증근무력증(myasthenia gravis), 제1형 당뇨병(type I diabetes), 포도막염(uveitis), 알레르기성 뇌척수염(allergic encephalomyelitis), 사구체신염(glomerulonephritis), 백반증(Vitilligo), 굿패스처 신드롬(Goodpasture syndrome), 베체트병(Becet's Disease), 크론병(Crohn's Disease), 강직성 척추염(Ankylosing Spondylitis), 포도막염(Uveitis), 혈소판 감소성 자반증(Thrombocytopenic purpura), 심상성 천포창(Pemphigus vulgaris), 소아당뇨병(Diabetes), 자가면역성 용혈성 빈혈(Autoimmune Anemia), 크라이로글로불린증(Cryoglobulinemia), 부신백질이영양증(ALD), 전신성 홍반성 낭창(Systemic Lupus Erythematosus, SLE) 등이 있다.
- [0066] 또한, 본 발명의 조성물은 염증성 및 과증식성 피부질환 및 면역 매개 질환의 피부 발현의 치료 및 예방에도 사용될 수 있다. 이들 질환은 예를 들어 건선, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 습진성 피부염(eczematous dermatitis), 지루피부염(seborrhoeic dermatitis), 편평태선(lichen planus), 천포창(Pemphigus), 유천포창(Bullous pemphigoid), 수포성 표피 박리증(epidermolysis bullosa), 두드러기(urticaria), 혈관부종(angioedemas), 혈관염(vasculitides), 홍반(erythemas), 피부 호산백혈구증가증(cutaneous eosinophilias), 홍반성 낭창(Lupus erythematosus), 전신성 홍반성 낭창 (Systemic Lupus Erythematosus, SLE), 좌창(acne) 및 원형탈모증(Alopecia areata)을 포함한다.
- [0067] 또한, 본 발명의 조성물은 안질환(eye diseases) 또는 다양한 자가면역성 질환의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 이들 질환의 예는 각결막염(keratoconjunctivitis), 춘계각결막염(vernal conjunctivitis), 각막염(keratitis), 헤르페스성 각막염(herpetic keratitis), 상피각막 근위축증(dystrophia epithelialis corneae), 각막백반(corneal leukoma), 눈천포창(ocular pemphigus), 무렌각막궤양(Mooren's ulcer), 공막염(Scleritis), 그레이브스병(Graves' ophthalmopathy), 보크트-고야나기-하라다증후군(Vogt-Koyanagi-Harada syndrome), 유육종증(sarcoidosis), 다발성 골수증(multiple myeloma)을 포함한다.
- [0068] 또한, 본 발명의 조성물은 만성 폐색성 호흡기 질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 천식(asthma) (예를 들어, 기관지 천식, 알레르기성 천식, 내인성 천식, 외인성 천식 및 먼지 천식), 특히 만성 또는 고질적 천식(예를 들어, 말기 천식 및 기관지 과민성), 기관지염(bronchitis), 알러지성 비염과 같은 폐색성 기도 질환의 치료 및 예방에도 사용될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0070] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 면역질환을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0072] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현

탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0073] 본 발명의 항체 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0074] 항체는 항체-치료제 결합체 형태로 생체내로 투입하여 면역질환 치료에 이용할 수 있다. 치료제는 화학치료제, 방사성핵종, 면역치료제, 사이토킨, 케모킨, 독소, 생물작용제 및 효소 저해물질 등을 포함한다. 항생제를 항체에 결합시키는 방법은, 예를 들면 문헌 G. Gregoriadis, ed., Academic Press London, (1979); Arnon et al., Recent Results in Cancer Res.,75: 236(1980); 및 Moolton et al., Immunolog. Res., 62:47(1982))에 기재되어 있다.

[0075] 본 발명의 항체 또는 항체 단편과 커플링 시키기기에 바람직한 약품은 항세균, 구충, 항진균 및 관련 약제들이고 예를 들면 설폰아미드, 페니실린 및 세팔로스포린, 아미노글리코시드, 테트라사이클린, 클로람페니콜, 피페라진, 클로로퀸, 디아미노피라딘, 메트로니아지드, 이소니아지드, 리팜핀, 스트렙토마이신, 설폰, 에리트로마이신, 폴리믹신, 나이스타틴, 암포테리신, 5-플루오로사이토신, 5-요오드-2'-데옥시우리딘, 1-아다만타아민, 아데닌 아라비노사이드, 암만니틴, 리바바린 및 아지도티미딘(AZT)이며, 바람직하게는 리바바린이다. 약제를 특이적 표적 부위로 표적화하는데 적당하고 바람직한 여러 가지 조건은 예를 들어 문헌 Trouet et al., Plenum Press, New York and London, 19-30(1982)에 보고 되어 있다. 유효한 치료제를 미생물 항원에 대해 제조된 매우 특이성이 있는 항체를 사용하여 감염 병소에 직접 타겟팅하여 감염균을 선택적으로 죽임으로써 약품에 내성이 있는 감염을 치료할 때에 발생하는 많은 문제점들을 해결할 수 있다. 또한 병소로 타겟팅된 약품은 감염 부위에서는 높은 농도로 약효를 상승시킬 수 있다.

[0076] 상기 항체-치료제 결합체에서 치료제로 이용될 수 있는 면역조절제는 림포카인 및 사이토카인을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

발명의 효과

[0077] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0078] (a) 본 발명의 이중 타겟 항체는 TNF- α 및 CXCL10에 모두 효과적으로 결합하는 이중 특이성 항체이므로, TNF- α /CXCL10을 인식할 수 있는 이중 타겟 항체로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0079] (b) 본 발명의 조성물은 TNF- α 및 CXCL10에 모두 효과적으로 결합하는 TNF- α /CXCL-10 이중 타겟 항체를 포함한다.

[0080] (c) 본 발명의 이중 타겟 항체는 TNF- α 또는 CXCL10 단일 타겟 항체와 비교하여 우수한 TNF- α 억제능 및 파골세포 분화 억제능을 갖는다.

[0081] (d) 본 발명의 조성물은 면역질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 TNF- α /CXCL10 이중 특이적 항체의 제조 모식도이다.

도 2는 Ni-NTA 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제한 인간 CXCL10 단백질의 확인한 결과이다.

도 3은 각 패닝 후의 파지 풀을 이용한 인간 CXCL10-His의 폴리-파이지(poly-phage) ELISA 분석 결과이다.

도 4는 인간 CXCL10의 scFv 모노파지(mono-phage) 클론(clone)의 BstNI 핑거프린트(fingerprint) 결과이다. scFv 삽입체는 개별 콜로니로부터 증폭하였고, 증폭된 산물은 BstNI으로 제한하여 8 % 폴리아크릴아미드 젤로 분석하였다. 파란 글자로 표시된 클론은 다른 그룹을 보인다.

도 5는 HuE10-101 이중 항체의 배양 기간별 발현율을 평가한 결과이다.

도 6은 정제된 HuE10-101 이중 항체의 순도 분석 결과이다.

- 도 7은 HuE10-101 이중 항체의 항원에 대한 결합력을 측정한 그래프이다.
- 도 8은 정제된 HuE10-101 이중항체의 세포 독성을 조사한 결과이다.
- 도 9는 생산 세포주 구축을 위한 HuE10-101 발현 벡터의 맵이다.
- 도 10은 형질감염 조건에 따른 HuE10-101 발현양을 조사한 결과이다.
- 도 11은 DHFR를 이용하여 선별한 콜로니의 이미지이다.
- 도 12는 DHFR를 이용하여 선별한 단일 클론에서 HuE10-101 발현을 닷-블로팅을 실시하여 확인한 결과이다.
- 도 13은 ELISA 방법으로 DHFR를 이용하여 선별한 단일 클론들의 상대적인 발현양을 비교한 결과이다.
- 도 14는 도 13의 결과에서 상대적으로 높은 ELISA 스코어에 따라 선별된 29개의 클론을 나타낸 그래프이다.
- 도 15는 96웰에서 최종 6웰로 옮겨진 클론들의 HuE10-101 발현율을 나타낸 결과이다.
- 도 16은 100 nM MTX가 포함된 배지에서 자라는 예비 세포주에 대한 현미경 사진이다.
- 도 17은 100 nM MTX에서 발현율이 높은 3개의 클론에 대한 HuE10-101 발현양 측정 결과이다.
- 도 18은 배양 안정성을 확인한 결과이다.
- 도 19는 HuE10-101의 N-말단 아미노산 서열을 확인한 결과이다.
- 도 20은 HuE10-101의 펩타이드 맵핑 결과이다.
- 도 21은 HuE10-101의 구조적 특성 규명을 위해 트립신 처리 후 LCMS 펩타이드 맵핑 분석법을 이용하여 이론적 아미노산서열의 동질성을 확인한 결과이다.
- 도 22는 CD(Circular dichroism)를 이용하여 HuE10-101 단백질의 2 차 구조를 예측한 결과이다.
- 도 23은 ProteOn XPR36을 통한 Humira 와 HuE10-101의 TNF- α 및 CXCL10과의 결합력 평가한 결과이다.
- 도 24는 ELISA를 기반으로 한 KD 값을 측정하여 결합 친화도(binding affinity)를 확인한 결과이다.
- 도 25는 휴미라, 휴미라 복제항체, HuE10-101, HuIL21R-101 및 HuIL21R-100의 항TNF- α 억제능 평가 결과이다.
- 도 26은 CXCL10에 대한 HuE10-101의 주화능 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
- NC: 음성 대조군, PC: 양성 대조군(좌측: Jurkat T 세포, 우측: PBMC) NC: negative control, PC: positive control (원: Jurkat T cell, 오: PBMC)
- 도 27은 공동배양시스템을 도입한 파골 세포 분화 실험 조건을 나타낸 모식도이다.
- 도 28은 TRAP 염색을 통한 파골 세포 분화 확인한 결과이다.
- 도 29는 항-TNF- α 및 항-CXCL10 에 의한 파골세포 분화의 억제 효과를 측정한 결과이다(TRAP 양성 다핵 세포 계수 결과).
- CD4+ 세포의 RANKL 유도조건: TNF- α , CXCL10, TNF- α + CXCL10 자극
- 도 30은 생산 세포주에서 생산한 항체의 효능을 평가하기 위하여 TNF- α 중화능 평가를 진행한 결과이다.
- 도 31은 휴미라와 휴미라 복제항체를 농도 별로 투여 한 후 관절염 유발 점수를 측정한 결과이다.
- 도 32는 휴미라와 휴미라 복제항체를 농도 별로 투여 한 후 체중 변화를 측정한 결과이다.
- 도 33은 HuIL21-101을 농도 별로 투여 한 후 관절염 유발 점수를 측정한 결과이다.
- 도 34는 HuIL21-101을 농도 별로 투여 한 후 체중 변화를 측정한 결과이다.
- 도 35는 HuE10-101을 농도 별로 투여 한 후 관절염 유발 점수를 측정한 결과이다.
- 도 36은 HuE10-101을 농도 별로 투여 한 후 체중 변화를 측정한 결과이다.
- 도 37은 HuE10-101을 농도 별로 투여 한 후 조직학적 점수를 측정 한 결과이다.

- 도 38은 관절염 유발 점수와 조직학적 점수의 비교 결과한 결과이다.
- 도 39는 생산 세포주에서 생산한 HuE10-101을 농도 별로 투여 한 후 관절염 유발 (arthritis score) 점수 결과이다.
- 도 40은 생산 세포주에서 생산한 HuE10-101을 농도 별로 투여 한 후 체중 변화를 측정한 결과이다.
- 도 41은 실험이 종료된 Tg197마우스 조직을 얻어 병리학적 변화 관찰한 결과이다.
- 도 42는 생산 세포주에서 생산한 HuE10-101을 농도 별로 투여 한 후 조직학적 점수를 측정 한 결과이다.
- 도 43은 생산 세포주에서 생산한 HuE10-101을 관절염 유발 점수와 조직학적 점수의 비교 결과한 결과이다.
- 도 44는 K/BxN 혈청 트랜스퍼 관절염 마우스 모델의 관절염 유발 점수를 측정한 결과이다.
- 도 45는 K/BxN 혈청 트랜스퍼 관절염 마우스 모델의 부종 변화를 측정한 결과이다.
- 도 46은 K/BxN 혈청 트랜스퍼 관절염 마우스 모델의 부종 변화를 촬영한 결과이다.
- 도 47은 K/BxN 혈청 트랜스퍼 관절염 마우스 모델의 micro CT를 이용하여 골을 확인한 결과이다.
- 도 48은 K/BxN 혈청 트랜스퍼 관절염 마우스 모델의 조직병리학적 병변을 확인한 결과이다.
- 도 49는 LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델에서 HuE10-101의 파골세포 분화능 평가에 대한 모식도이다.
- 도 50은 LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델에서 HuE10-101의 파골세포 분화능 평가한 결과이다.
- 도 51은 LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델에서 생산세포주에서 생산한 HuE10-101의 파골세포 분화능 평가한 결과이다.
- 도 52는 LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델에서 생산세포주에서 생산한HuE10-101의 파골세포 분화능을 정량 분석한 결과이다.
- 도 53은 콜라겐 유도성 관절염 마우스 모델에서 HuE10-101의 효능평가에 대한 모식도이다.
- 도 54는 중복되지 않은 3인의 32가지 조직을 이용하여 HuE10-101의 교차 반응을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0084] **실시예**

[0085] **실시예 1: 인간 CXCL10 항원 단백질의 제조**

[0086] 인간 CXCL10에 대한 단일클론 항체를 제작하기 위하여, 인간 CXCL10 단백질을 발현 및 정제하였다. 구체적으로, 인간 CXCL10을 증폭하기 위하여 비장, 태반, 간 및 신장 cDNA 라이브러리 믹스를 주형으로 하여 pET22b 벡터에 삽입하였다. pET22b-인간 CXCL10 플라스미드를 BL21(DE3)로 형질전환한 후, 수득한 형질전환체는 암피실린(ampicillin)이 포함된 LB 플레이트에 접종하여 밤새 배양 후, 37℃에서 진탕 배양하였다.

[0087] 그런 다음, OD600 값이 0.55가 되면 IPTG를 0.5 mM 농도로 첨가하여 밤새 배양한 후, 6,500 rpm, 4℃에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 수득하였다. 수득한 상등액을 농축하여 Ni-NTA 아가로오즈를 넣어 반응시킨 후, 아가로오즈 비드를 컬럼에 충전한 후에 용출(elution)하였다. 농축 후, 15 % SDS-PAGE 겔에 걸고, 코마시에(coomassiae)로 염색하였다. 단백질의 발현 정도를 비교하기 위하여 BSA(Bovain serum albumin)을 표준정량 단백질로 함께 사용하였다. 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이, 약 15 kDa의 크기의 인간 CXCL10 단백질이 발현된 것을 확인하였다.

[0088]

[0089] **실시예 2: 단일클론 항체의 제조**

[0090] 2-1. 패닝 과정

[0091] 패닝(panning)은 파아지의 외벽(coat)에 펩타이드를 발현(display)하는 파아지 라이브러리로부터, 표적 분자(항체, 효소, 세포표면 리셉터 등)와 결합하는 성질을 지닌 펩타이드를 표면에 발현하고 있는 파아지만을 선택해 내는 과정을 일컫는다. CXCL10의 단일 클론 항체를 제조하기 위한 파지 항체군을 제조하기 위하여 파지 패닝을 수행하였다. 상기 <실시예 1>에서 수득한 정제된 인간 CXCL10 항원 100 µg을 Immunosorb 튜브(Nunc 470319)에 2 ml의 코팅 완충용액(Na₂CO₃(sigma, S7795) 1.59 g, NaHCO₃(sigma, S8875) 2.93 g, NaN₃(sigma, S2002), 0.2 g)으로 4℃에서 16 시간 정도 회전기(rotator)에서 코팅한 후, 실온에서 2 시간 동안 PBS에 녹여 4% 스킵밀크((BD, 232100)- 1X PBS에서 4%)를 사용하여 면역 튜브에서 차단하였다. 상기 면역 튜브에 라이브러리 파지 2 ml을 첨가하여 실온에서 2 시간 동안 반응시켰고 PBST(0.05%)로 5 회, PBS로 2 회 세척하였다. 세척 후 특이적으로 결합한 scFv-파지들만 100 mM TEA(Sigma T-0886)로 용출하여, 용출된 파지들을 대장균(XL1-Blue, stratagene, 200249)에 감염시켜 증폭했다. 첫 번째 패닝에서 증폭된 파지를 PBST(140 mM NaCl(sigma, S7953-5kg) 8 g, 10 mM Na₂HPO₄(Sigma, S7907-dibasic) 1.15 g, 1.8 mM MKH₂PO₄(sigma, S-5655-500 g:monobasic) 0.2 g, 2.7 mM KCl(sigma p9541) 0.2 g, 트윈20(sigma, p1379) 0.55%) 세척 단계에서 횟수만 늘려서(2차: 13번, 3차: 23번) 동일한 방법으로 2차 및 3차 패닝을 수행하였다. 그 결과, 하기 [표 1]에서 나타낸 바와 같이 3차에서 항원에 대한 파지의 콜로니 역가(titer)가 100 배 이상 증폭됨을 확인하였다(표 1).

표 1

[0092] 패닝 횟수에 따른 항-인간 CXCL10 파아지의 콜로니 타이터

표적 항원	패닝 횟수	파아지 투입수	파아지 결합수
인간 CXCL10-His	1차	2.6 x 10 ¹³	4.8 x 10 ⁶
	2차	3 x 10 ¹³	6 x 10 ⁵
	3차	1 x 10 ¹³	5.67 x 10 ⁸

[0093]

[0094] 2-2. 파아지 항체 스크리닝

[0095] 1차부터 3차까지 패닝하여 얼려두었던 세포 저장물(stock)을 5 ml의 2×YTCM, 2% 글루코오스, 5 mM MgCl₂ 배지에 OD600 값이 0.1이 되게 넣어준 다음, 37℃에서 2 내지 3 시간(OD600=0.5 내지 0.7)동안 배양하였다. 배양한 세포 저장물에 M1 헬퍼 파지를 감염시키고 2×YTCMK, 5 mM MgCl₂, 1 mM IPTG 배지에 30℃에서 16 시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포를 4500 rpm으로 15 분 동안 4℃에서 원심분리한 후 상등액(1차~3차 패닝 poly scFv-파지)을 새 튜브로 옮겼다. 96웰 면역 플레이트(NUNC 439454)에 두 종류의 항원(CXCL10, a-myc)을 웰 당 100 ng 씩 4℃에서 16시간 정도 코팅 완충용액으로 처리하여 코팅하여 PBS에 녹인 스킵 밀크(4%)를 사용하여 각 웰을 차단하였다. 각 웰 마다 PBS-트윈20(0.05%) 0.2 ml로 씻어준 다음 1차, 2차, 3차 패닝 폴리 scFv-파지를 각 웰에 100 µl씩 넣고 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 다시 각 웰마다 PBS-트윈20(0.05%) 0.2 ml를 사용하여 4 번 세척하였고 이차 항체인 항-M13-HRP(Amersham 27-9421-01)를 1:2000으로 희석하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 후에 PBS-트윈20(0.05%) 0.2 ml로 세척하고 OPD 정제(Sigma, 8787-TAB)를 PC 완충용액(C₆H₈O₇H₂O(sigma, C0706) 5.1 g, Na₂HPO₄(sigma, S7907) 7.3 g)에 녹인 기질 용액을 만들어 웰 당 100 µl씩 넣어 10 분 동안 발색시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 Spectrophotometer(MolecularDevice, 미국)로 측정하였다.

[0096] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 항원에 대한 결합능이 두 가지 항원에 대해 3차 poly scFV-파지에서 증강(enrichment)됨을 ELISA를 통해 확인하였다(도 3).

[0097]

[0098] 2-3. 단일 클론 파아지 선별

[0099] 상기 <실시예 2-2>에서 제조한 결합능이 큰 다클론 파지 항체군(3차 패닝)에서 얻은 콜로니 2×YTCM, 2% 글루코오스, 5 mM MgCl₂ 배지 1 ml이 포함된 96-deep 웰 플레이트(바이오니아, 90030)에 분주하여 37℃에서 16 시간

동안 배양하였다. 배양한 세포의 OD600 값이 0.1이 되도록 100 내지 200 μ l를 취해 1 ml의 2 \times YTCM, 2 % 글루코오스, 5 mM MgCl₂ 배지에 희석한 다음, 96-deep 웰 플레이트에 분주하여 37 °C에서 OD600 값이 0.5 내지 0.7 되도록 2 내지 3 시간 동안 배양하였다. M1 헬퍼 파지를 MOI값이 1:20이 되도록 감염시킨 후, 2 \times YTCMK, 5 mM MgCl₂, 1 mM IPTG 배지에 30 °C에서 16 시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 4,500 rpm으로 15 분 동안 4 °C에서 원심분리한 후, 상등액을 취해 4 % PEG 6,000과 3 % NaCl을 첨가하여 잘 녹여 얼음에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 8,000 rpm으로 20 분 동안 4°C에서 원심분리한 후 펠릿에 PBS를 첨가하여 녹인 다음 12,000 rpm으로 10 분 동안 4°C에서 원심분리하여 상등액을 취해 새 튜브에 옮겨 3차 패닝해서 얻은 단일 클론 scFv-파지를 4°C에서 보관하였다.

[0100]

[0101]

2-4. 단일 클론 파이지 항체군의 ELISA 분석

[0102]

96웰 면역 플레이트에 CXCL10 및 a-myc의 두가지 항원을 웰당 100 ng씩 넣어 4°C에서 16 시간 동안 코팅 완충용액으로 코팅한 후, PBS에 녹인 스킵밀크(4%)를 사용하여 각 웰을 차단하였다. 각 웰마다 PBS-트윈20(0.05%) 0.2 ml를 사용하여 세척한 다음 3차 패닝하여 얻은 단일클론 scFv-파지(각 100 scFv-파지)를 각 웰에 100 μ l씩 넣고 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 PBS-트윈20(0.05%) 0.2 ml를 사용하여 4 번 씻어준 후 2차 항체인 항-M13-HRP를 1/2000로 희석하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. PBS-트윈20(0.05%) 0.2 ml로 세척한 후에 발색하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

[0103]

그 결과, [표 2] 에서 나타난 바와 같이 각각의 항원에 대한 결합능이 강한 단일 파이지 클론들은 인간 CXCL10-His에 대해 총 59 개의 단일 파지 클론을 수득하였다(표 2).

[0104]

표 2

[0105]

항원 인간 CXCL10-His에 대한 단일 파이지 ELISA 결과

Clone name	CXCL10	a-myc	His	Ratio	Clone name	CXCL10	a-myc	His	Ratio	Clone name	CXCL10	a-myc	His	Ratio
1A	0.042	0.042	0.056	1.014	2A	1.714	1.205	0.040	1.422	3A	0.050	0.040	0.039	1.243
1B	2.754	0.402	0.039	6.846	2B	0.040	0.039	0.039	1.026	3B	2.643	0.426	0.039	6.206
1C	0.098	0.039	0.039	2.519	2C	2.913	1.117	0.040	2.608	3C	2.702	0.468	0.039	5.773
1D	0.652	0.778	0.044	0.838	2D	0.040	0.039	0.040	1.003	3D	0.067	0.041	0.039	1.639
1E	0.039	0.051	0.038	0.757	2E	1.537	0.846	0.043	1.817	3E	0.040	0.038	0.039	1.045
1F	0.038	0.051	0.038	0.735	2F	2.895	0.706	0.038	4.102	3F	0.585	0.050	0.039	11.622
1G	0.039	0.069	0.028	0.564	2G	0.039	0.044	0.040	0.890	3G	1.332	0.093	0.038	14.358
1H	0.208	0.052	0.035	4.031	2H	2.842	2.863	0.133	0.993	3H	0.051	0.040	0.027	1.298
4A	0.041	0.050	0.041	0.817	5A	2.870	0.407	0.091	7.050	6A	2.950	2.950	0.558	1.000
4B	0.040	0.045	0.048	0.893	5B	2.341	2.628	0.408	0.891	6B	2.935	2.909	0.551	1.009
4C	0.059	0.074	0.038	0.799	5C	3.067	0.261	0.046	11.754	6C	2.540	0.303	0.125	8.390
4D	0.535	0.483	0.040	1.109	5D	2.347	2.563	0.162	0.916	6D	0.058	0.041	0.063	1.426
4E	0.038	0.040	0.039	0.946	5E	0.038	0.040	0.091	0.948	6E	2.143	0.186	0.119	11.494
4F	0.972	0.068	0.044	14.335	5F	0.533	0.047	0.137	11.415	6F	2.931	0.325	0.061	9.016
4G	0.053	0.040	0.038	1.320	5G	0.450	0.047	0.060	9.624	6G	2.844	0.420	0.080	6.766
4H	0.175	0.045	0.030	3.937	5H	0.318	0.043	0.043	7.474	6H	2.474	2.748	0.136	0.900
7A	3.145	1.446	0.153	2.175	8A	2.991	2.765	0.110	1.082	9A	2.703	0.095	0.048	28.366
7B	3.024	2.409	0.061	1.255	8B	2.991	0.197	0.039	15.166	9B	2.944	0.173	0.043	17.027
7C	2.969	0.121	0.083	24.453	8C	2.996	0.144	0.062	20.832	9C	2.641	0.076	0.039	34.893
7D	3.083	0.367	0.049	8.399	8D	3.079	2.920	0.236	1.054	9D	2.422	1.504	0.040	1.610
7E	2.302	0.052	0.047	44.277	8E	3.012	0.103	0.039	29.385	9E	2.958	2.006	0.043	1.475
7F	3.084	0.374	0.043	8.255	8F	2.813	0.061	0.057	46.343	9F	1.047	2.140	0.051	0.489
7G	2.250	0.183	0.057	12.294	8G	2.636	2.730	0.072	0.966	9G	0.633	0.042	0.042	15.224
7H	1.447	0.870	0.035	1.663	8H	2.470	2.755	0.112	0.897	9H	0.339	0.191	0.073	1.773
10A	2.970	0.410	0.042	7.245	11A	2.539	0.059	0.047	43.034	12A	3.018	0.310	0.054	9.722
10B	2.844	0.098	0.045	28.991	11B	2.917	0.186	0.042	15.651	12B	2.782	0.207	0.043	13.450
10C	0.044	0.048	0.045	0.925	11C	2.669	0.071	0.049	37.862	12C	0.061	0.043	0.045	1.418
10D	2.853	3.021	0.178	0.945	11D	3.116	0.425	0.049	7.324	12D	3.015	0.888	0.049	3.396

10E	3.051	0.307	0.051	9.946	11E	3.044	2.966	0.459	1.026	12E	0.201	0.052	0.046	3.875
10F	2.989	0.347	0.043	8.613	11F	2.994	3.067	0.421	0.976	12F	2.927	0.421	0.039	6.953
10G	3.038	0.756	0.045	4.018	11G	3.041	3.090	0.491	0.984	12G	2.840	0.350	0.045	8.115
10H	2.960	3.014	0.213	0.982	11H	3.081	2.187	0.054	1.409	12H	3.009	0.529	0.037	5.690

[0106]

[0107]

실시예 3: 선별한 단일 클론 파지 분류 및 검사

[0108]

3-1. 핑거 프린팅에 의한 검증

[0109]

상기 <실시예 2>를 통해 선별된 10 개의 단일 클론 세포를 핑거프린팅으로 검증하기 위하여, 선별한 단일 클론 세포 각각 1 μ l와 Taq DNA 중합효소(젠닥스 5 U/ μ l) 0.2 μ l, 50 p/ μ l의 정방향 프라이머(pe1B5)(서열번호 41: 5'-CTAGATAACGAGGGCAAATCATG-3') 및 역방향 프라이머(c1a3)(서열번호 42: 5'-CGTCACCAATGAAACCATC-3') 각각 0.2 μ l, 10X 완충용액 3 μ l, 10 mM dNTP mix 0.6 μ l, 증류수 24.8 μ l를 혼합하여 하기 [표 3]의 PCR 프로그램의 조건으로 콜로니 PCR(iCycler iQ, BIO-RAD)을 수행하였다.

[0110]

표 3

PCR 조건

온도	시간	사이클(cycle)
95℃	5분	1
95℃	30초	30 사이클
56℃	30초	
72℃	1분	
72℃	10분	1
4℃	-	-

[0111]

[0112]

상기에서 수득한 콜로니 PCR 산물은 1% 아가로스 겔(Seakem LE, CAMERES 50004)에서 확인하였고, BstNI(Roche11288075001, 10 U/ μ l) 0.2 μ l를 가하여 37℃에서 2 내지 3 시간 동안 하기 [표 4]의 반응 조건으로 반응시켰다.

[0113]

표 4

반응 조건

10X 버퍼	3 μ l
콜로니 PCR 반응물	10 μ l
BstNI(10U/ μ l)	0.2 μ l
증류수	16.8 μ l

[0114]

[0115]

그 결과, BstNI에 의해 잘려진 상기 단일 클론 파지 항체들의 단편을 8 % DNA 폴리아크릴 아마이드 겔(30 % acrylamide(Bio-RAD, 161-0156) 2.66 ml, 10×TBE 1 ml, 증류수 6.27 ml, 10 % APS(sigma, A3678) 70 μ l, TEMED(Bio-RAD, 161-0801) 7 μ l)에서 확인하였으며, 도 3에서 나타난 바와 같이 단일 클론 파지 항체의 다양성을 확인하였다(도 4).

[0116]

[0117]

3-2. 서열 분석에 의한 검증

[0118]

상기 실시예 <3-1>에서 핑거프린팅으로 확인된 단일 파지 클론들 각각의 서열을 분석하기 위하여, 단일 클론 세포를 2×YTCM, 2 % 글루코스, 5 mM MgCl₂배지(5 ml)에 37℃에서 16 시간 동안 배양하였다. 배양한 단일 세포로부터 DNA 정제 키트(Nuclogen, 5112)를 이용하여 DNA를 수득한 후, pe1B5 프라이머(서열번호 43: 5'-

CTAGATAACGAGGGCAAATCATG-3')를 이용한 서열 분석(솔젠트, 한국)을 의뢰하여, 상기 선별된 항체의 VH 및 VL의 CDR 영역을 확인하였다. 분석된 서열을 통해 이들 항체와 생식세포 계열(germ line) 항체군의 유사성을 NCBI의 Ig BLAST 프로그램(//www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)을 이용하여 각각의 인간 항체의 중쇄 및 경쇄의 CDR3에서 사용되고 있는 폴리펩티드를 분석하였다.

[0119] 그 결과, [표 5]에서 나타낸 바와 같이 4종의 human CXCL10에 특이적인 파지 항체를 얻었으며, 이들의 아미노산 서열은 [표 6]에 나타내었다.

표 5

[0120] 인간 CXCL10-His 항원에 대해 얻은 단클론 항체목록

클론명	VH	유사성	VL	유사성	VH (CDR3-A/a 서열)	Vk (CDR3-A/a 서열)	Hu CXCL10	a-myc	His	비율
10D	VH3-30	292/296(98.65%)	V2-1	243/282(86.17%)	DKRAAFDI	MTWDVDTTSM I	2.853	3.021	0.178	0.945
10E	VH3-30	281/296(94.93%)	V1-13	283/295(95.93%)	DSGSYLDWYFDL	QSYDSRLGVV	3.051	0.307	0.051	9.946
9E	VH3-30	289/296(97.64)	V2-14	265/283(93.64%)	DSGSYLDWYFDL	QVWDSSSDRP V	2.958	2.006	0.043	1.475
12D	VH3-30	275/296(92.91%)	V2-1	243/282(86.17%)	DGLAAKLGH	MTWDVDTTSM I	3.015	0.888	0.049	3.396

[0121]

표 6

[0122] 인간 CXCL10 에 대한 단일클론들의 아미노산 서열.

클론 이름	중쇄			경쇄		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
10D	SYGMH (서열번호 17)	WVAVISYDGSNKYYADSVKG (서열번호 18)	DKRAAFDI (서열번호 19)	CSGDNLRTKYVS (서열번호 29)	QDTRRPS (서열번호 30)	MTWDVDTTSMI (서열번호 31)
12D	RYGMH (서열번호 21)	WVALISYDGSNKYYADSVKG (서열번호 22)	DGLAAKLGH (서열번호 23)	CSGDNLRTKYVS (서열번호 33)	QDTRRPS (서열번호 34)	MTWDVDTTSMI (서열번호 35)
10E	SYGMH (서열번호 9)	WVAVISYDGSNKYYADSVKG (서열번호 10)	DSGSYLDWYFDL (서열번호 11)	CTGSRNFGAGHDVH (서열번호 13)	GNNRPS (서열번호 14)	QSYDSRLGVV (서열번호 15)
9E	SYGMH (서열번호 25)	WVAVISYDGNKYYVDSVKG (서열번호 26)	DSGSYLDWYFDL (서열번호 27)	CGGGNIRDKSVH (서열번호 37)	YSDRPS (서열번호 38)	QVWDSSSDRPV (서열39)

[0123]

[0124]

[0125]

실시예 4: 전체 IgG 변환 및 분석

[0126]

4-1. 전체 형태(Whole form) IgG 변환

[0127]

상기 실시예 <3-2>의 4 종의 단일클론 파지 중 항체들을 scFv에서 IgG로 전환하기 위하여, 중쇄의 경우 단일클론 DNA 1 μ l, 중쇄 정방향 프라이머 및 중쇄 역방향 프라이머 각각 10 pmole/ μ l, 10X 버퍼 5 μ l, 10 mM dNTP mix 1 μ l, pfu DNA 중합효소(솔젠트, 2.5 U/ μ l) 및 0.5 μ l 증류수를 혼합하여 콜로니 PCR(iCycler iQ, BIO-RAD)을 수행하였다. 또한, 경쇄의 경우도 하기 경쇄 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 동일한 방법으로 콜로니 PCR을 수행하였다. 4 종의 단일클론 파지를 scFv에서 IgG로 변환하기 위해 사용한 프라이머는 [표 7]

에 나타내었다.

표 7

IgG 변환에 사용한 프라이머 서열

클론 이름	정방향 프라이머	역방향 프라이머
10D	중쇄 5'- CAGGTGCAGCTGGTGCAGTC-3' (서열 번호: 43)	5'-TGAGGAGACGGTGA-3' (서열 번호: 44)
	경쇄 5'-TCCTATGAGCTGACACAGGC-3' (서열 번호: 45)	5'-TAGGACGGTCAGCTTGGTCCC-3' (서열 번호: 46)
12D	중쇄 5'-CAGGTGCAGCTGGTGCAGTC-3' (서열 번호: 47)	5'-TGAGGAGACGGTGA-3' (서열 번호: 48)
	경쇄 5'-TCCTATGAGCTGACACAGGC-3' (서열 번호: 49)	5'-TAGGACGGTCAGCTTGGTCCC-3' (서열 번호: 50)
10E	중쇄 5'- CAGGTGCAGCTGGTGCAGTC-3' (서열 번호: 51)	5'-TGAGGAGACGGTGA-3' (서열 번호: 52)
	경쇄 5'-CAGTTCGTGCTGACTCAGCC-3' (서열 번호: 53)	5'-TAGGACGGTCAGCTTGGTCCC-3' (서열 번호: 54)
9E	중쇄 5'-CAGGTGCAGCTGGTGGAGTC-3' (서열 번호: 55)	5'-TGAGGAGACGGTGA-3' (서열 번호: 56)
	경쇄 5'-AATTTTATGCTGACTCAGCC-3' (서열 번호: 57)	5'-TAGGACGGTCAGCTTGGTCCC-3' (서열 번호: 58)

[0128]

[0129]

[0130]

[0131]

그 후, PCR로 수득한 중쇄 유전자를 DNA-겔 추출 키트(Qiagen)로 정제하여 pNATAB H 벡터 1 μ l(10 ng), 중쇄 (100 내지 200 ng) 15 μ l, 10 X 버퍼 2 μ l, 연결효소(1 U/ μ l) 1 μ l, 증류수를 혼합하여 실온에서 1 내지 2 시간 방치하여 벡터와 연결하였다. 상기 중쇄 유전자를 연결한 pNATAB H 벡터를 형질전환용 세포(*E.coli*XL1-blue)와 함께 얼음에 30 분 동안 방치한 후, 42°C에서 90 초 동안 열충격을 주어 형질도입(transfection)하고 다시 얼음에서 5 분 동안 방치한 뒤 LB 배지 1 ml을 주입하여 1 시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그 후, 압피실린이 포함된 LB 고체 배지에 도말하여 37°C에서 16 시간 동안 배양하였다. 배양 후 생성된 단일 콜로니를 압피실린이 포함된 LB 액체 배지 5 ml에 접종하여 37°C에서 16 시간 동안 배양하였다. 상기 배양액으로부터 DNA-prep 키트(Nuclogen)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 또한, 경쇄는 pNATAB L 벡터를 사용하여 상기와 같은 방법으로 DNA를 추출하였다.

[0132]

[0133]

4-2. 항-CXCL10 항체의 정제 및 항원 결합 친화도 측정

[0134]

추출한 전체 형태 항체 DNA는 293E 세포(Invitrogen)에 PEI 40 μ g, DNA 10 μ g 및 경쇄 DNA 10 μ g을 넣어 공동-형질감염을 하였다. 형질감염 후 얻은 2일 차부터 8일 차까지의 상등액을 수득하여 단백질을 이용하여 정제를 하였고, 정제된 인간 CXCL10 항체의 항원에 대한 결합력을 측정하기 위하여, ELISA를 수행하였다.

[0135]

구체적으로 ELISA는 96 웰 면역플레이트에 재조합 인간 CXCL10 단백질을 웰당 100 ng 씩 4°C에서 16 시간 동안 코팅 완충용액으로 코팅한 후, PBS에 녹인 스킵밀크(4%)를 사용하여 각 웰을 차단하였다. 각 웰마다 PBS-트윈 20(0.05%) 0.2 ml을 가하여 씻어준 다음, 단일클론 항체를 50 nM부터 1/2씩 순차적으로 희석하여 항원이 코팅된 플레이트에 100 μ l씩 넣고 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 다시 각 웰마다 PBS-트윈20(0.05%) 0.2 ml을 가하여 3 번 씻어준 후 이차 항체인 항-인간 Fc-HRP를 1:4000으로 희석하여 실온에서 50 분 동안 반응시켰다. PBS-트윈20(0.05%) 0.2 ml으로 씻어준 후에 OPD 정제를 PC 완충용액에 넣은 기질 용액을 웰당 100 μ l씩 넣어 5 분 동안 발색시켜 흡광도 490 nm에서 분광광도계(Spectrophotometer)로 측정하였고, 상기 ELISA 결과는 Graphpad prism ver.4 소프트웨어(CA 92037: Graphpad Software Inc., USA)를 사용하여 분석하였다.

[0136]

그 결과, [표 8]에서 나타난 바와 같이, 정제된 항-CXCL10 항체의 항원에 대한 결합력(KD)이 우수한 것을 확인하였다(표 8).

표 8

인간 CXCL10에 대한 정제된 전체 IgG 항체의 KD값

항체명	KD값	R ²
9E	6.1X10 ⁻¹²	0.98
10E	7X10 ⁻¹²	0.98
12D	4.7X10 ⁻¹²	0.98
10D	2.5X10 ⁻¹²	0.99

[0137]

[0138]

[0139]

실시예 5: CXCL10 및 TNF-α 이중-특이적 항체의 제조

[0140]

5-1. 이중 특이적 항체 HuE10-101의 제조 및 정제

[0141]

항-인간 CXCL10 단일항체 및 블록버스터 항-TNF-α 단일항체인 휴미라(humira)를 융합한 이중 특이적 항체를 제작하기 위하여, 상기 <실시예 3>에서 제조한 항-인간 CXCL10 단일 클론 항체 중 E10의 ScFv를 pNATABH::휴미라의 3' 말단에 클로닝하여 이를 HuE10-101로 명명하였다.

[0142]

항-TNF-α 항체인 휴미라는 중쇄 가변영역의 아미노산 서열(서열 번호: 4) 및 경쇄 가변영역의 아미노산 서열(서열 번호: 8)을 토대로 유전자 합성을 통하여 제조하였다. 그런 다음, humira의 중쇄영역을 포함하는 벡터에서 휴미라의 중쇄 및 가변영역 3'-말단에 E10 scFv를 연결하기 위해 PCR을 수행하였으며, 이를 통해 두 개의 단편을 연결하여 하나의 DNA 단편으로 만들어 이를 다시 pNATABH 벡터에 삽입하여 HuE10-101을 발현하기 위한 pNATABH::Humira/E10ScFv 벡터를 제조하였다. 그런 다음, HEK 293E 세포(Invitrogen)에 pNATABH::Humira/E10ScFv 및 pNATABH::Humira를 3:7의 비율로 공동-형질감염하였다. 형질감염 후 얻은 2일 차부터 8일 차까지의 이틀 간격으로 상등액을 4회 수득하여 항체의 발현량을 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 확인한 후(도 5), 단백질 A 비드를 이용하여 정제하였다. 웨스턴 블롯팅은 세포 배양액을 이틀간격으로 수집하여 1 ml 튜브에 각각 넣은 다음 세포를 제거하기 위해 5000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 단백질 샘플 버퍼 25 μl와 각각의 상등액 125 μl를 각각의 1 ml 튜브에 넣어서 5분간 끓였다. 10% SDS-PAGE 겔에 40 μl씩 로딩한 후 전기영동 한 다음, 멤브레인에 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 4% 스킵 밀크로 1시간 가량 블로킹한 후, 2차 항체인 항-Fc-HRP를 1/4000으로 첨가한 뒤 상온에서 4시간 가량 흔들어 주었다. 1xPBST로 3회 세척한 후 ECL 용액 1 ml을 멤브레인에 뿌린 다음 암실로 엑스-레이 필름으로 감광시켜 결과를 얻었다.

[0143]

그 결과, 도 5에서 나타낸 바와 같이 HuE10-101 항체의 발현을 확인하였으며, 최종 정제된 항체의 회수율은 7 mg/L로 일시적(transient) 발현을 통한 방법으로는 많은 양이 발현됨을 확인하였다(도 6).

[0144]

또한, 정제한 항원의 QC 분석을 위하여, Agilent 2100 Bioanalyzer(Inc, Agilent Technologies, Germany)의 Agilent Protein 230 kit(5067-1517) 칩을 이용하여 겔-유사 이미지와 절대 정량(Absolute Quantitation)을 확인하였다. 분석은 감소(reducing)와 비-감소(non-reducing) 조건에서 각각 수행하였으며, 대조군으로 휴미라를 함께 분석하였다.

[0145]

그 결과, 도 6에서 나타낸 바와 같이, 휴미라는 환원(reducing) 조건에서 중쇄와 경쇄의 분자량이 50과 25 kDa에서 나타나며, HuE10-101의 중쇄와 경쇄의 분자량은 각각 83과 25 kDa에서 나타나 휴미라의 중쇄영역에 E10의 ScFv가 융합되어 분자량은 증가됨을 확인하였다. 비-환원(non-reducing) 조건에서 HuE10-101의 분자량은 약 187 kDa 임을 확인하였다(도 6).

[0146]

[0147]

5-2. 이중 특이적 항체 HuE10-101의 CXCL10 및 TNF-α에 대한 결합력 조사

[0148]

이중 특이적 항체 HuE10-101의 CXCL10 또는 TNF-α에 대한 특이적인 결합력을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-2>와 동일한 방법으로 ELISA 분석을 수행하였다. HuE10-101의 결합력의 수준을 비교하기 위해, HuE10-100 항체와 동일한 방법으로 분석하여 비교하였다. 한편, 상기 HuE10-100 항체는 휴미라 중쇄의 가변영역 N-말단에

E10 scFv를 연결시켜 제작하였으며, HuE10-101과 같은 TNF- α 와 CXCL10에 대한 이중항체이나, HuE10-101에 비해 발현량이 극히 저조한 단점이 있다.

[0149] 그 결과, 도 7에서 나타난 바와 같이 CXCL10에 대한 결합력은 HuE10-100 및 HuE10-101 두 항체에서 각각 3.0×10^{-11} M(R2=0.99) 및 4.7×10^{-10} M(R2=0.99)을 나타냄을 확인하였으며, TNF- α 에 대한 결합력은 각각 4.1×10^{-11} M(R2=0.989)과 3.5×10^{-11} M(R2=0.99)로 유사한 결합력 정도를 가지는 것을 확인하였다(도 7).

[0150]

5-3. 이중 특이적 항체 HuE10-101의 세포 독성 조사

[0151]

[0152] 이중 특이적 항체 HuE10-101의 동물실험을 위하여 세포 독성을 조사하였다. HuE10-101은 60.28 mg을 생산하여 조사하였으며, 대조군으로 휴미라를 43.68 mg 생산하여 수행하였다.

[0153]

HuE10-101을 정제한 후, 정제된 항체의 세균내독소(bacterial endotoxin)를 측정하기 위해서 Chromo-LAL(cat# C0031, CAPE COD)을 이용하였다. 대조군으로 사용되는 기준 독소(CSE, control 스탠다드 세균내독소; cat# E0005, CAPE COD)를 1 EU/ml부터 2 배씩 희석하여 최소 농도가 0.03125 EU/ml이 되도록 준비하였다. 음성 대조군으로 LRW(LAL reagent water, cat# WP1001, CAPE COD) 100 μ l에 LAL 100 μ l을 넣어주고, 양성 대조군으로 0.125 EU/ml 농도의 기준 독소(CSE) 100 μ l에 LAL 100 μ l를 섞어 실험에 사용하였다. 분석을 위해 LRW로 50 μ g/ml의 일정 농도가 되도록 희석한 시료 100 μ l에 LAL 100 μ l를 준비하였다. 추가로 시료의 간섭확인을 위해 생성물질 양성 대조군 실험을 하는데, 상기 희석한 시료 50 μ l에 0.125 EU/ml 기준 독소(CSE) 50 μ l과 LAL 100 μ l를 넣어 준비하였다. VersaMax 마이크로플레이트 reader(Molecular devices)로 측정시 프로토콜화 한 파일(Chromo LAL setting.pda)을 이용하여 기준값을 정하였다. 플레이트는 37 $^{\circ}$ C로 10 분 정도 예열하여 준비한 후 실험을 시작하였다. LAL을 처리함과 동시에 프로토콜화 한 파일을 시작하여 OD를 측정하였다. 스탠다드 곡선의 X축은 Log EU/ml, Y축은 Log Onset time으로 작성되며, 시료의 세포내독성 수치는 측정된 OD를 소프트웨어 상에서 자동으로 계산하여 EU/ml로 표시하였다. 스탠다드 곡선의 R2 값이 0.98이상 되는 경우에 측정치에 대한 신뢰성을 두었다.

[0154]

그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이, HuE10-101 및 휴미라의 내독소 레벨을 알아보기 위하여 LAL 테스트를 수행한 결과 HuE10-101 및 휴미라의 LAL 값은 모두 0.1 EU/ml 이하임을 확인하였다(도 8).

[0155]

실시예 6: HuE10-101 생산 세포주 확립

[0156]

6-1. 세포주용 HuE10-101 발현 벡터 제조

[0157]

[0158] HuE10-101 항체의 HuE10-101 항체 증쇄와 경쇄의 발현을 위한 플라스미드는 invitrogen의 pOptiVec 시스템을 사용하였다. pOptiVec 시스템의 장점으로는 관심유전자와 선택 마커인 DHFR이 동일 전사체 상에 존재하여 유전자 증폭이 용이하다는 점이다. HuE10-101-Hc와 HuE10-101-Lc는 모두 pOptiVec 벡터에 서브-클로닝 되었으며, 형질감염시 DNA 선형화에 사용된 효소 위치는 압피실린 유전자 내부의 PvuI을 이용하였다. 플라스미드 맵은 도 9와 같다. 형질감염 시약으로 리포펙타민 2000을 사용하였고 DNA : 리포펙타민 2000 = 1 : 1, 1.5, 2의 비율로 사용하였다.

[0159]

6-2. CHO DG44 유지

[0160]

[0161] 발현 숙주로 사용된 CHO DG44 세포는 MEM-알파(w/) + 10% FBS + AA 배지를 사용하여 배양하였다. 세포 패싱(passing) 시 약 $1-2 \times 10^6$ 세포/웰을 0.25% 트립신을 사용하여 바닥에서 떼어낸 후 1/3을 2 ml의 배지가 포함된 새 웰로 트랜스퍼 하였다. 세포주 개발은 96웰 및 6웰 플레이트 수준에서 진행하였다.

[0162]

6-3. 형질감염

[0163]

[0164] 형질감염 전일 4×10^5 세포를 6웰 플레이트에 분주한 후 약 16시간 동안 배양기에서 배양하였다. 형질감염 당일 세포 상태를 관찰하고 형질감염에 적합한지 확인 후 MEM-알파 (w/) (-FBS, -AA) 배지로 2번 세척하였다. 1 ml의 MEM-알파 (w/) (-FBS, -AA) 배지를 첨가 후 약 1시간 동안 배양기에서 배양하였다. 형질감염에 필요한

DNA는 선형화한 HuE10-101-Hc와 HuE10-101-Lc를 사용하였으며 2 μg (Hc : 1 μg + Lc : 1 μg)과 리포펙타민 2000 4 μl 을 MEM-알파 (w/) (-FBS, -AA) 100 μl 에 혼합 후 상온에서 약 30분간 반응 시켰다(DNA: 리포펙타민 2000 = 1 : 1, 1.5, 2)의 세 가지 비율로 사용하였다. 위의 예시는 1:2의 비율이다. 혼합액을 웰에 떨어뜨리는 방식으로 형질감염하였으며 6시간 후 MEM-알파 (w/) + 10% FBS + AA 배지로 교환하였다. 형질감염은 모두 2배수로 진행하였다.

[0165] 형질감염이 잘 되었는지 확인하기 위하여 웨스턴 블롯을 실시하였다. 형질감염 후 2-3일 후에 6웰에 세포가 꽉 찼을 때, 배지를 수득하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 10% SDS PAGE 겔을 이용하였고, 배지는 30 μl 로딩 하였다. DNA: 리포펙타민 2000 = 1 : 2의 조건에서 형질감염이 가장 잘 이루어진 것을 확인하였다(도 10).

[0166]

[0167] 6-4. 단일 클론 선별

[0168] 약 이틀 후 형질감염된 DG44의 16개의 96웰 플레이트에서 단일 클론 선별을 진행하였다. 트립신으로 세포를 모두 떼어낸 후 카운팅 하여 1웰 당 200 세포씩 되도록 분주하였다. 이 때 DHFR에 의한 선별을 위하여 MEM-알파 (w/o) + 10% dFBS + AA 배지를 사용하였다. 2주 후 콜로니 생성 여부를 관찰하였으며 배지를 수득하여 ELISA를 통해 Hu10E-101의 발현정도를 확인하여 높은 발현율을 갖는 29개의 클론을 선별하였다.

[0169] 도 11은 96웰 플레이트에 형성된 콜로니를 촬영한 현미경 사진이다. DHFR에 의한 선별을 위하여 MEM-알파 (w/o) + 10% dFBS + AA 200 μl 에 200 세포/웰이 되게 갈아주게 되면 형질감염 된 세포들은 선별 배지에서 자라게 되어 콜로니를 형성하게 된다.

[0170] 도 12는 도 11의 콜로니의 발현확인을 위해 닷-블로팅을 실시한 결과이다. 배지는 30 μl 를 사용하였고 항-Fc-HRP로 탐지하였다. 주황색 동그라미와 같이 발현율이 높은 클론은 좀 더 진한 블롯을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0171] 도 13은 단일 클론 선별한 16 플레이트 중 3개의 플레이트에서 ELISA 방법으로 상대적인 발현량을 비교한 것이다. 항-Fab 항체를 100 ng/웰로 코팅한 ELISA 플레이트에 2시간 동안 5% 스킴밀크를 포함하는 PBS를 이용하여 블로킹 하였다. 그 후 콜로니를 선별한 배지를 수득하여 100 μl 첨가하였다. 2시간 상온에서 반응 후 0.05% PBST 200 μl 로 3번 세척해 준 후 항-Fc-HRP를 1:5,000으로 100 μl 1시간 반응시킨 후 OPD를 이용해 탐지하였다. 보라색으로 표시한 클론들이 선별된 발현율이 상대적으로 높은 클론들이다.

[0172] ELISA 정량한 것 중 발현이 높고, 단일 콜로니를 형성한 것을 한 플레이트 당 2-3개씩 골랐다. 도 14의 빨간색 점선은 평균값을 표현한 것이고, 빨간색 별표로 표시한 것이 선택한 콜로니이다.

[0173] 16개의 플레이트 중 ELISA를 통해 발현이 높은 29개의 콜로니를 선별하였고, 96웰에서 48웰, 24웰, 6웰 순으로 세포를 증폭하였다. 최종 6웰에서 5 x 10⁵ 세포/웰로 분주한 후 이틀 뒤에 세포가 꽉 찼을 때, 배지를 수득하여 ELISA를 통해 정량하였다. 도 15에서 빨간색으로 표시된 클론은 6웰에서도 발현량이 유지되어 100 nM MTX로 유전자 증폭 과정을 진행하였다.

[0174]

[0175] 6-5. 유전자 증폭

[0176] HuE10-101 항체 발현의 증폭을 위하여 MTX를 MEM-알파 (w/o) + 10% dFBS + AA 배지에 첨가하여 사용하였다. 초기 시작 농도는 100 nM부터 적응을 유도하였다. 앞에서 선별한 HuE10-101 29개의 클론을 웰당 5 x 10⁵ 세포로 분주하였다. 2일 주기로 새 배지로 교환해 주면서 콜로니 형성을 관찰하였으며, 세포가 꽉 차면 다시 새로운 세포에 5 x 10⁵ 세포로 나누었다. 세 번 패싱 한 후 ELISA를 통해 발현율을 확인하였다. 100 nM 완료된 클론 중 발현이 높은 클론은 1 μM 로 유전자 증폭을 하였다.

[0177] 도 16은 처음에 5 x 10⁵ 세포로 분주한 후 일주일 후에 콜로니가 형성된 것을 보여주는 현미경 사진이다. 이틀마다 배지를 교환하며 콜로니가 형성된 것을 확인하였고, 6웰에 꽉 차게 되면 트립신으로 세포를 떼어 새 플레이트에 나누었다. 이와 같은 방법으로 세 번 패싱한 후 ELISA를 통해 정량하였다.

[0178]

[0179] 6-6. 100 nM에서 선별된 예비 세포주들의 HuE10-101 발현율

[0180] HuE10-101 항체의 정량은 각 스텝 별 적응된 세포를 5 x 10⁵세포/T-25 플라스크/5 ml에 6일간 배양하는 방식으로 실시하였다. 100 nM 에 적응된 세포에서 배치(batch)를 실시하였다. ELISA 방법을 사용하여 정량하였다.

[0181] 100 nM에서 유전자 증폭은 클론별로 적응 속도가 다 다르기 때문에, 가장 빨리 자라는 세 개 클론부터 T-25 플라스크에 5 x 10⁵로 분주하여 6일 후 배지를 수득해 ELISA로 정량하였다. ELISA는 위에서 설명한 것과 같은 방법을 이용하였다. 그 결과 S17 클론이 40 mg/L로 가장 높은 발현율을 보이는 것으로 확인됐다. 따라서 이 S17 클론은 1 μM MTX로 유전자 증폭을 유도하였다(도 17).

[0182]

[0183] 6-7. 단일 세포주에서의 단백질 발현양 확인

[0184] 2종의 세포군 (Humira CXCL10 cell line S7 3 μM, Humira CXCL10 cell line S7 4 μM)을 이용하여 한계희석법에 의해 단일세포주 분리를 수행하였다. 단일세포주를 확보하기 위하여 1 세포/웰로 96 웰 플레이트에 시딩하여 군집을 형성한 단일세포 유래의 세포주를 획득하였다. 획득한 단일 세포주들의 단백질 발현양은 24 웰 플레이트에서 4 일간 배양한 배양액을 이용하여 ELISA로 분석하였으며 아래의 총 20 개의 단일 세포주를 선별하여 125 mL Erlenmeyer flask에서 부유배양 적응을 하였다(표 9).

표 9

세포주에서 발현양 확인

[0185]

Pool name	Single No.	μg/mL
S7 (3 μM)	1	9.5
	2	10.7
	5	9.5
	7	13
	13	10.7
	17	10.9
	18	17.9
	22	10.4
	24	14
	31	11.3
	32	8.6
S7 (4 μM)	1	9.7
	3	12.1
	21	12.6
	25	13.7
	37	12.2
	47	17.7
	57	10.4
	69	14.9
85	10.5	

[0186]

[0187] 선별된 20개의 세포주는 부유 세포에 적응 후, 5 x 세포 /mL 이 되도록 화학조성 배지에 잘 풀어서 접종하여, 34℃, 5 % CO₂배양기에서 교반속도 140 ± 10 rpm으로 6일 동안 유가식 배양하였고, 발현양을 분석하였다(표 10).

[0188]

표 10

발현양 분석

[0189]

No.	Sample	Productivity (μg/ml)
1	S7 (3 μM) 2D6	66.58

2	S7 (3 μ M) 7D6	64.19
3	S7 (3 μ M) 18D6	73.46
4	S7 (3 μ M) 24D6	64.28
5	S7 (3 μ M) 31D6	70.68
6	S7 (4 μ M) 3 D6	89.24
7	S7 (4 μ M) 21 D6	85.22
8	S7 (4 μ M) 25 D6	53.23
9	S7 (4 μ M) 47 D6	64.6
10	S7 (4 μ M) 69 D6	93.2

[0190]

[0191]

[0192]

6-8. 항체 생산 세포주의 발현 안정성

[0193]

발현량의 분석 결과를 통해서 발현량이 약 50 /mL 이상을 나타내는 10개의 세포주를 선별하여 장기 계대 배양 동안 발현 안정성을 확인하기 위한 배양을 하였다. 부유 배양 적응 후 동결 보관된 세포를 화학조성 배지에 해동한 후 125 mL Erlenmeyer flask에서 3일 간격으로 90일 동안 계대 배양 하였다. 계대 마다 배양액 일부를 수확하여 동결 보관 하였고 ELISA에 의한 발현량 분석 결과를 바탕으로 안정성을 분석하여 생산성이 높고, 계대 배양 안정성이 80% 이상 유지되는 세포주를 공정개발을 위한 세포주로 선별하였다. 분석결과를 바탕으로 S7 (4 μ M) - 3 세포주를 최종 선별하였고, S7 (4 μ M) - 3 세포주의 30 계대까지의 배양 안정성을 배양 초기 (4-9 계대) 와 26 ~ 30 계대에서의 평균 발현량을 비교 분석한 결과 계대배양 안정성이 95% 이상 유지됨을 확인하였다. 따라서 S7 (4 μ M) - 3 세포주를 공정 개발 및 10 g 생산을 위해 생산용 세포주로 사용하였다(도 18).

[0194]

[0195]

실시예 7: 항체의 물리화학적 특성 분석

[0196]

7-1. 항체의 구조 또는 구성성분에 관한 분석

[0197]

7-1-1. N-말단 아미노산 서열 확인

[0198]

N-말단 아미노산 서열분석은 항체 단백질의 중쇄와 경쇄로 나누어 분석하였다.

[0199]

통상의 항체 단백질의 N-말단 서열의 첫 번째 아미노산인 글루탐산으로 되었을 경우 글루탐산 아미노산이 피롤리돈카복실산(pyroglutamate)로 변형된 형태로 존재하는 경우가 높다. 하지만 HuE10-101의 중쇄와 경쇄는 모두 글루탐산이 아닌 글루탐산과 아스파르트산으로 되어 있어 특이적 변형이 발생할 가능성이 매우 낮다

[0200]

분석결과 중쇄의 N-말단 서열은 16개의 아미노산 서열을 확인하였고, 경쇄는 18개의 아미노산 서열을 확인하였음. 확인된 아미노산 서열은 이론적인 아미노산 서열과 동일하였다

[0201]

HuE10-101 시료를 TCA로 침전하여 저장버퍼를 제거하고 5 M 우레아를 처리하여 변성시켰다. 트립신을 처리하여 항체를 펩타이드 조각으로 절단시킨 후 PNGase-F를 넣고 탈글리코실화 시켰다. 마지막으로 DTT를 넣어 이황화결합을 제거한 후 LC-MS로 펩타이드 분석 실험을 수행하였다. 항체 단백질의 N-말단 서열은 단백질의 발현 과정에서 다른 부분의 아미노산에 비해 PTM(post-translational modification)이 발생 가능성이 높고, 항체 단백질의 활성도와 기타 면역거부 반응에도 연관될 수 있다. HuE10-101은 구조적으로 중쇄와 경쇄로 나누어져 있고, 본 실험에서는 중쇄의 N-말단과 경쇄의 N-말단을 각각 LC-MS/MS방법에 의해 최종 시퀀싱하였다. N-말단 분석을 위해 트립신을 사용하여 각각의 중쇄 N-말단 분석과 경쇄 N-말단 분석을 하였다.

[0202]

트립신에 의해 잘려진 항체 유래 펩타이드들은 LC-MS 펩타이드 맵핑과 LC-MS/MS 시퀀싱 분석방법을 수행하였고, 여기서 각각의 이론적 펩타이드 분자량을 계산하여 N-말단 펩타이드를 파악하였다(도 19a).

[0203]

동일 조건의 LC-MS를 먼저 수행하여 해당 펩타이드의 유지(retention) 시간을 확인하였고, 같은 LC 조건을 사용하여 LC-MS/MS 분석을 수행하여 펩타이드 시퀀싱을 하였다. N-말단 시퀀싱 결과 도 19a와 도 19c는 각각 LC-MS/MS분석법에 의한 HuE10-101의 중쇄와 경쇄의 N-말단 시퀀싱 결과이다. 결과에서 보듯이 HuE10-101단백질의 중쇄 및 경쇄 의 N-말단 서열은 이론적 HuE10-101단백질의 N-말단 서열과 동일한 펩타이드 분자량과 시퀀싱되었고, 중쇄의 N-말단 서열은 EVQLVESGGGLVQPGR이고, 경쇄의 N-말단 서열은 DIQMTQSPSSLSASVGR 확인되었다(도 19).

[0204] 표 11은 N-말단 서열의 이론적 분자량과 LC-MS에서 확인된 분자량, ms/ms 시퀀싱을 통해 확인된 N-말단 서열을 정리한 것이다. 통상의 단백질의 N-말단의 변형 형태인 피롤리돈카복실산 형태와 절단, 탈아미드화, 산화와 같은 변형은 HuE10-101 단백질에서는 확인되지 않았다(표 11).

표 11

Theoretical mass(TPD)					Observed mass(LC-MS)	Charge	Sequencing
Frag#	Res#	M+H	M+2H	M+3H			
HT1	1-16	1624.87	812.94	542.29	812.91	2	EVQLVESGGGLVQPGR
LT1	1-18	1878.89	939.95	626.97	939.92	2	DIQMTQSPSSLSASVGDR

[0206] HT: Heavy chain tryptic peptide

[0207] LT: Light chain tryptic peptide

[0208]

[0209] 이상의 결과에서 HuE10-101 N-말단 서열 확인 시험을 통해서 중쇄의 N-말단 서열은 EVQLVESGGGLVQPGR 확인되었고, 경쇄의 N-말단서열은 DIQMTQSPSSLSASVGDR 확인 되었고, 특이적 변형은 확인 되지 않았다.

[0210]

[0211] 7-1-2. 펩타이드 분석

[0212] HuE10-101의 구조적 특성 규명을 위해 프로테아제(트립신) 처리 후 LCMS 펩타이드 맵핑 분석법을 이용하여 이론적 아미노산서열의 동질성을 확인하였다.

[0213] 이론적 단백질 아미노산 예상 서열과 98% 이상의 동일한 서열로 확인되었고, 일부 아미노산에서 화학 결합으로 인한 변형이 발생하였지만, 이것은 실험 및 분석 과정에서 나올 수 있는 양의 아주 적은 것이었다.

[0214] HuE10-101 시료를 TCA로 침전하여 저장 버퍼를 제거하고 5 M 우레아를 처리하여 변성시켰다. 그런 다음 트립신을 처리하여 항체를 펩타이드 조각으로 절단시킨 후 PNGase-F를 넣고 탈글리코실화시켰다. 마지막으로 DTT를 넣어 이황화결합을 제거한 후 LC-MS로 펩타이드 분석 실험을 수행하였다.

[0215] HuE10-101의 전체 분자량은 약 190 KDa의 거대 단백질로 중쇄와 경쇄로 각각 구성되어 있다. 총 아미노산은 919개로 구성되며 중쇄는 705개, 경쇄는 214개로 구성되었다(서열목록 제59서열 및 제60서열). 통상의 항체 단백질은 150kDa 분자량이지만 HuE10-101 단백질은 중쇄의 C-말단 451 라이신 뒤에 추가로 중쇄의 가변 서열이 결합되었다.

[0216] HuE10-101 단백질의 중쇄/경쇄의 구조적 특성 분석을 위해 HuE10-101 단백질 서열을 프로테아제에 의해 잘려진 이론적 펩타이드 분자량과 실제 HuE10-101 단백질의 LCMS 크로마토그램 프로파일에서 나온 펩타이드 피크 어사인된 펩타이드 분자량을 기준으로 해당 펩타이드의 질량의 일치도로 분석하였다. 도 20은 분석 시료 HuE10-101의 펩타이드 맵핑 분석 결과로 HuE10-101 항체에서 유래된 트립틱 펩타이드의 용출되는 LC-MS 크로마토그램이다.

[0217] HuE10-101 단백질 유래 펩타이드의 개수가 많아서 도 20a 및 도 20b로 각각 용출되는 시간으로 나누어 펩타이드 피크의 어사인 결과를 나타내었다.

[0218] 이론적인 HuE10-101 항체 단백질의 중쇄와 경쇄 서열의 트립틱 펩타이드 분자량과 LC-MS 크로마토그램에서 검출된 펩타이드의 분자량과 시퀀싱 결과를 정리한 것이다. 트립신을 이용한 펩타이드 맵핑 분석에서 1.9%의 항체 단백질의 서열을 확인하지 못했다. 이것은 단백질을 프로테아제로 자를 경우에 잘려진 펩타이드의 크기가 아주 작거나 특정 펩타이드의 시그널이 아주 약하게 검출 되기 때문이다. 또한 항체 단백질에 예측 불가능한 PTM(posttranslational modification)이 되어 있을 경우 질량 값만을 기준으로는 확인 할 수 없다. 이런 예측 불가능한 펩타이드는 LC-MS/MS로 펩타이드 시퀀싱을 하여 최종 확인하였다. 표 16과 17에서 이론적인 트립틱 펩타이드의 분자량보다 차이를 보이는 펩타이드를 확인할 수 있었고, 중쇄에서 7개, 경쇄에서 3개의 변형 펩타이드를 확인 하였다. 표 12와 13의 변형된 펩타이드의 동정은 LC-MS/MS를 진행하여, 최종 디-노보 시퀀싱을 통해 서열 내 변화를 확인 하였다. 위 결과에서 중쇄와 경쇄는 공통적으로 아스파라긴 아미노산에 탈아민화 형태와 일부 화합물의 결합 형태 또한 확인 되었다.

표 12

펩타이드 분석결과

[0219]

Theoretical mass(TPD)							Observed mass (LC-MS)	Charge
Frag#	Res#	M+H	M+2H	M+3H	M+4H	M+5H		
HT1	1-16	1624.87	812.94	542.29	406.97	325.78	812.91	2
HT2	17-19	375.24	188.12	125.75	94.56	75.85	375.22	1
HT3	20-38	2176.96	1088.98	726.32	545.00	436.20	726.30	3
HT4	39-43	500.28	250.65	167.43	125.83	100.86	500.26	1
HT5	44-67	2662.25	1331.63	888.09	666.32	533.26	888.08	3
HT6	68-72	623.35	312.18	208.46	156.59	125.48	623.33	1
HT7	73-76	447.22	224.11	149.75	112.56	90.25	N.D	
HT8	77-87	1338.68	669.85	446.90	335.43	268.54	669.82	2
HT9	88-98	1233.55	617.28	411.85	309.14	247.52	617.26	2
HT10	99-125	2808.39	1404.70	936.80	702.85	562.49	936.77	3
HT11	126-137	1186.65	593.83	396.22	297.42	238.14	593.81	2
HT12	138-151	1264.66	632.83	422.22	316.92	253.74	632.81	2
HT13	152-214	6656.29	3328.65	2219.44	1664.83	1332.06	1332.03	5
HT14	215-217	361.21	181.11	121.07	91.06	73.05	361.19	1
HT15	218-218	175.12	88.06	59.05	44.54	35.83	-	
HT16	219-222	472.28	236.64	158.10	118.83	95.26	472.26	1
HT15-16	218-222	628.38	314.69	210.13	157.85	126.48	314.68	2
HT17	223-226	452.18	226.59	151.40	113.80	91.24	N.D	
HT18	227-252	2730.42	1365.71	910.81	683.36	546.89	683.34	4
HT17-18	223-252	3163.58	1582.29	1055.20	791.65	633.52	791.62	4
HT19	253-259	835.43	418.22	279.15	209.61	167.89	418.21	2
HT20	260-278	2082.01	1041.51	694.67	521.26	417.21	694.65	3
HT21	279-292	1677.80	839.41	559.94	420.21	336.37	559.92	3
HT22	293-296	501.31	251.16	167.78	126.08	101.07	501.29	1
HT23	297-305	1189.51	595.26	397.18	298.13	238.71	-	
HT23*	297-305	1190.51	595.76	397.50	298.38	238.90	595.73	2
HT24	306-321	1808.01	904.51	603.34	452.76	362.41	603.32	3
HT24(de)	306-321	1809.01	905.01	603.67	453.00	362.60	603.65	3
HT24(m)(de)	306-321	1851.80	926.40	617.93	463.70	371.16	926.40	2
HT25	322-324	439.22	220.11	147.08	110.56	88.65	439.20	1
HT26	325-326	250.12	125.57	84.05	63.29	50.83	-	
HT27	327-330	447.26	224.13	149.76	112.57	90.26	447.24	1
HT28	331-338	838.50	419.76	280.17	210.38	168.51	419.74	2
HT29	339-342	448.28	224.64	150.10	112.83	90.46	448.26	1
HT30	343-344	218.15	109.58	73.39	55.29	44.44	-	
HT31	345-348	457.25	229.13	153.09	115.07	92.26	457.23	1
HT30-31	343-348	656.38	328.70	219.47	164.85	132.08	656.36	1
HT32	349-359	1286.67	643.84	429.56	322.42	258.14	643.82	2
HT33	360-364	605.31	303.16	202.44	152.08	121.87	605.29	1
HT32-33	349-364	1872.97	936.99	625.00	469.00	375.40	624.97	3
HT34	365-374	1104.61	552.81	368.87	276.91	221.73	552.79	2
HT35	375-396	2544.13	1272.57	848.72	636.79	509.63	848.69	3
HT35(de)	375-396	2545.13	1273.07	849.04	637.03	509.83	1273.01	2
HT36	397-413	1873.92	937.47	625.31	469.24	375.59	937.44	2
HT37	414-418	575.34	288.17	192.45	144.59	115.87	575.32	1
HT38	419-420	262.15	131.58	88.06	66.29	53.24	262.14	1
HT39	421-443	2744.25	1372.63	915.42	686.82	549.66	686.79	4
HT40	444-451	788.45	394.73	263.49	197.87	158.50	394.72	2
HT41	452-467	1608.88	804.95	536.97	402.98	322.58	804.92	2
HT42	468-470	375.24	188.12	125.75	94.56	75.85	375.22	1
HT43	471-489	2133.96	1067.49	711.99	534.25	427.60	711.97	3
HT44	490-494	500.28	250.65	167.43	125.83	100.86	N.D	

HT45	495-509	1621.79	811.40	541.27	406.20	325.16	811.37	2
HT44-45	490-509	2103.05	1052.03	701.69	526.52	421.42	701.66	3
HT46	510-516	845.40	423.21	282.47	212.11	169.89	423.19	2
HT47	517-518	232.14	116.57	78.05	58.79	47.23	-	
HT48	519-523	623.35	312.18	208.46	156.59	125.48	N.D	
HT49	524-527	463.22	232.11	155.08	116.56	93.45	N.D	
HT50	528-538	1339.70	670.36	447.24	335.68	268.75	670.33	2
HT51	539-549	1277.55	639.28	426.52	320.14	256.32	639.26	2
HT52	550-564	1879.83	940.42	627.28	470.71	376.77	940.39	2
HT52(m)	550-564	1919.80	960.40	640.60	480.70	384.76	960.40	2
HT53	565-612	4129.06	2065.03	1377.02	1033.02	826.62	1032.99	4
HT54	613-621	923.46	462.23	308.49	231.62	185.50	462.22	2
HT55	622-642	2310.11	1155.56	770.71	578.28	462.83	770.68	3
HT56	643-658	1784.94	892.97	595.65	446.99	357.79	595.63	3
HT56(de)	643-658	1785.94	893.47	595.98	447.24	357.99	595.96	3
HT57	659-663	525.27	263.14	175.76	132.07	105.86	525.25	1
HT58	664-691	3001.30	1501.15	1001.11	751.08	601.07	1001.08	3
HT58(m)	664-691	3041.20	1521.10	1014.40	761.05	609.04	1014.40	3
HT59	692-701	934.54	467.77	312.18	234.39	187.71	467.76	2
HT59(m)	692-701	974.40	487.70	325.47	244.35	195.68	487.70	2
HT60	702-705	445.30	223.16	149.11	112.08	89.87	445.29	1

[0220]

[0221]

HT: Heavy chain tryptic peptide

[0222]

(de): Asn deamidation

[0223]

(m): modification (chemical attachment)

[0224]

* : De-glycosylated peptide

[0225]

N.D : Not detected

[0226]

표 13

펩타이드 분석결과

[0227]

Theoretical mass(TPD)							Observed mass (LC-MS)	Charge
Frag#	Res#	M+H	M+2H	M+3H	M+4H	M+5H		
LT1	1-18	1878.89	939.95	626.97	470.48	376.58	939.92	2
LT2	19-24	692.38	346.69	231.46	173.85	139.28	692.35	1
LT3	25-30	631.35	316.18	211.12	158.59	127.08	631.39	1
LT4	31-42	1495.77	748.39	499.26	374.70	299.96	499.25	3
LT5	43-45	315.20	158.11	105.74	79.56	63.85	315.19	1
LT6	46-61	1675.94	838.47	559.32	419.74	335.99	838.45	2
LT6(m)	46-61	1718.80	859.90	573.60	430.45	344.56	859.90	2
LT7	62-90	3130.43	1565.72	1044.15	783.36	626.89	1044.12	3
LT8	91-93	452.23	226.62	151.41	113.81	91.25	452.21	1
LT9	94-103	1069.53	535.27	357.18	268.14	214.71	535.25	2
LT10	104-107	488.31	244.66	163.44	122.83	98.47	486.29	1
LT11	108-108	175.12	88.06	59.05	44.54	35.83	-	
LT10-11	104-108	644.41	322.71	215.48	161.86	129.69	322.70	2
LT12	109-126	1932.01	966.51	644.68	483.76	387.21	966.48	2
LT13	127-142	1740.87	870.94	580.96	435.97	348.98	870.91	2
LT13(m)	127-142	1780.80	890.90	594.27	445.95	356.96	890.90	2
LT13(m)(de)	127-142	1781.80	891.40	594.60	446.20	357.16	891.40	2
LT14	143-145	347.19	174.10	116.40	87.55	70.24	347.18	1

LT15	146-149	560.32	280.66	187.45	140.84	112.87	560.30	1
LT16	150-169	2135.97	1068.49	712.66	534.75	428.00	712.64	3
LT17	170-183	1502.76	751.88	501.59	376.45	301.36	751.86	2
LT16-17	150-183	3619.71	1810.36	1207.24	905.68	724.75	1207.21	3
LT18	184-188	625.28	313.15	209.10	157.08	125.86	625.26	1
LT19	189-190	284.17	142.59	95.40	71.80	57.64	-	
LT20	191-207	1818.91	909.96	606.97	455.48	364.59	606.96	3
LT19-20	189-207	2084.06	1042.53	695.36	521.77	417.62	521.75	4
LT21	208-211	523.26	262.14	175.09	131.57	105.46	523.24	1
LT22	212-214	308.09	154.55	103.37	77.78	62.42	308.08	1
LT21-22	208-214	812.34	406.67	271.45	203.84	163.27	406.66	2

[0228]

[0229]

LT: Light chain tryptic peptide

[0230]

(de): Asn deamidation

[0231]

(m): modification (chemical attachment)

[0232]

[0233]

도 20에서 LC-MS/MS 디-노보 시퀀싱한 결과처럼, 펩타이드에 화합물의 결합이 확인되었다. 도 20a에서 HT24(m)(de) 펩타이드는 VVSVLTVLHQDWLNGK의 펩타이드에서 N-말단에 43Da에 해당하는 화합물이 결합 되어 있었고, 319번 아스파라긴 아미노산이 탈아민화로 변형되어 있었다. 도 20b의 LT13(m) 펩타이드는 이론적 분자량에 비해 43 Da이 증가한 화학 결합 펩타이드로 확인되었다. 펩타이드 맵핑 테이블에서 확인된 나머지 변형된 펩타이드는 위와 같은 LC-MS/MS 펩타이드 시퀀싱 방법으로 최종 확인하였다(도 21).

[0234]

따라서 전체 아미노산(중쇄와 경쇄) 919개중 902개의 아미노산이 HuE10-101 단백질의 중쇄/경쇄의 아미노산과 일치하는 것을 확인하였다. 최종 분석 후 전체 서열 커버리지는 98.1%로 확인 되었다.

[0235]

이상의 결과에서 HuE10-101에 대한 펩타이드 맵핑 분석을 통해 아미노산 중심 구조에서 98.1 % 동일한 구조를 가지며, 일부에 한해 화학 결합된 펩타이드와 아스파라긴 아미노산에 약하게 탈아민화된 것을 확인 하였다.

[0236]

[0237]

7-2-1. CD(Circular Dichroism) 분석

[0238]

본 실험은 CD(Circular dichroism)를 이용하여 시료의 2 차 구조를 예측하고자 하였다. CD 분석 하여 얻은 Far-UV 데이터를 JASCO 사의 2차구조 예측 프로그램을 이용하여 2차 구조 예측을 하였다(도 22).

[0239]

도 22에서 보듯, 300-200 nm의 far-UV 분석 결과 HuE10-101 시료는 베타 77.9%, 턴 22.1%의 비율로 존재하는 것을 확인하였다.

[0240]

[0241]

7-2-2. SPR (Surface plasmon resonance) 분석

[0242]

HuE10-101의 항원에 대한 결합력 분석을 위해 SPR 장비중의 하나인 바이오래드(Bio-Rad) 사의 ProteOn XPR36을 이용하였다. 항원인 TNF- α 또는 CXCL10을 따로 코팅하여 항체의 결합력을 분석한 결과, HuE10-101은 TNF- α 에 대해서는 0.195 nM, CXCL10에 대해서는 3.54 nM의 결합력을 보였다. 대조군으로 사용한 Humira의 경우는 TNF- α 에 대해서만 0.116 nM의 결합력을 보였을 뿐, CXCL10에 대해서는 예상대로 결합하지 않았다.

[0243]

XPR GLC 칩 2개의 채널에 100 nM의 TNF- α 또는 CXCL10을 각각 코팅하고, 항체를 흘려주는 방식으로 결합력 평가를 수행하였다. 측정을 위하여 ProteOn XPR 36에 GLC 칩을 50% 글리세롤을 사용하여 초기화 시킨 다음 25 $^{\circ}$ C 조건에서 러닝 버퍼 PBST(10 mM Na-포스페이트, 150 mM NaCl, 0.005% Tween20, pH 7.4)를 흘려주어 chip 안정화를 시켜주었다. GLC 5개 채널에 0.04 M N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)와 0.001 M sulfo-N-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS)을 1:1 비율로 30 μ l/분의 유속으로 220 μ l양을 흘려주어 채널을 활성화 시켰다. 뒤이어 100 nM의 TNF- α 또는 CXCL10은 pH 5.5 아세테이트 버퍼를 사용하여 30 μ l/분 속도로 코팅하였다. 1 M 에탄올아민-HCl(pH 8.5)로 활성화된 칩을 불활성화 시켰다. 고정화(immobilization) 레벨이

800 RU(resonance units) 임을 확인하였다. PBS/T로 기준을 정한 다음 HuE10-101 또는 Humira 항체를 5 nM로부터 1/2 씩 희석한 5가지 일련의 농도를 만들어 코팅된 곳에 흘려보냄으로써 KD 값을 구하였다.

[0244] XPR GLC 칩에 100 nM의 TNF- α 또는 CXCL10을 코팅하였고, Humira 또는 HuE10-101을 5 nM부터 1/2씩 희석하여 5개의 농도를 흘려보내준 결과 도 23과 같은 센소그램을 얻었다.

[0245] 도 23에서 보듯, Humira는 항원인 TNF- α 에는 잘 결합하나 CXCL10에는 전혀 붙지 않는 결과를 보인 반면, HuE10-101은 TNF- α 뿐만이 아니라 CXCL10에도 잘 붙는 이중항체임을 재확인 하였다.

[0246] 표 14는 도 23의 센소그램으로부터 얻어진 각 항원에 대한 항체들의 KD값 측정 결과이다. ka는 결합상수를 나타내며, kd는 해리상수, 그리고 KD는 해리상수로 kd 값을 ka로 나누어 얻어진 값이다. Humira는 항원인 TNF- α 와 결합력만이 측정되었으며 KD는 0.116 nM로 나타났다. 이와 달리 이중항체인 HuE10-101은 TNF- α 의 결합력은 Humira와 유사한 0.195 nM를 그리고 CXCL10에 대해서는 이것보다는 다소 약한 3.54 nM의 KD를 보였다. CXCL10에 대한 KD가 낮은 이유는 도 23과 표 14의 결과를 종합해서 볼 때 kd가 TNF- α 와의 그것에 비해 다소 낮은 것이 원인으로 보인다.

표 14

[0247]

Ligand	Coating	Ka ($M^{-1}S^{-1}$)	Kd (S^{-1})	KD (M)	R _{max}	Chi ²
HuE10-101	TNF- α	3.60E+06	7.01E-04	1.95E-10	63.93	10.47
	CXCL10	2.57E+06	9.11E-03	3.54E-9	116.13	10.66
Humira	TNF- α	1.43E+06	1.66E-04	1.16E-10	103.64	6.10
	CXCL10	N.D	N.D	N.D	-	-

[0248]

[0249] N.D : Not Detected

[0250] Ka : association rate constant

[0251] kd : dissociation rate constant

[0252] KD : equilibrium dissociation constant

[0253]

[0254] 7-3. 면역화학적 분석

[0255] 7-3-1. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

[0256] HuE10-101의 항원에 대한 면역 화학적 분석을 위해 ELISA를 수행하였다. 항원인 TNF- α 또는 CXCL10을 각각 따로 코팅하여 항체의 결합력을 분석한 결과, HuE10-101은 TNF- α 에 대해서는 0.495 nM, CXCL10에 대해서는 1.9 nM의 결합력을 보였다. 대조군으로 사용한 Humira의 경우는 TNF- α 에 대해서만 0.5 nM의 결합력을 보였을 뿐, CXCL10에 대해서는 예상대로 결합하지 않았다.

[0257] 96 웰의 면역플레이트에 항원인 TNF- α 또는 CXCL10을 100 ng/웰씩 넣어 4°C에서 하룻밤 동안 코팅하였다. 5% 스킵 밀크 200 μ l/웰을 넣어주고 2시간 상온에서 배양하였다. 그런 다음 HuE10-101과 Humira를 각각 50 nM부터 1/2씩 단계 희석하여 100 μ l/웰을 넣고 2시간 동안 상온에서 배양하였다. 두시간 후 0.05% PBST 200 μ l/웰로 3번 세척하였다. 그리고 항-인간 FC-HRP(in goat)를 1:1000 으로 1% 스킵 밀크 PBS에 만든 후 100 μ l/웰을 넣고 1시간 동안 상온에서 배양하였다. 그런 다음 한 시간 후 0.05% PBST 200 μ l/웰로 3번 세척하였다. OPD 용액을 만든 후 100 μ l/웰에 넣어준 후 발색이 되면, 정지 버퍼로 반응을 멈춘 후 492 nm 파장에서 측정하였다.

[0258] ELISA를 기반으로 한 KD 값을 측정한 결과 다음과 같은 결합 친화도를 확인하였다. 측정값에 대한 신뢰성을 나타내는 R2값이 0.97 이상으로 모든 실험에 대한 신뢰도가 높음을 보여주었다. 결과에서 HuE10-101은 TNF- α 와 CXCL10에 모두 잘 결합하는 이중특이성(ispecific) 항체임이 확인되었다(도 23). HuE10-측정된 항원 결합력은 각각 $4.5 \times 10^{-10} M$ (0.45nM)과 $1.9 \times 10^{-9} M$ (1.9nM)인 것을 확인하였다. 반면, 대조군인 Humira는 예상했던 대로 TNF- α 에는 잘 결합하였으나, CXCL10에는 전혀 결합하지 않는 것을 확인하였다(도 24). 그에 대한 결합 친화도는 $1.5 \times 10^{-10} M$ (0.15nM)으로 HuE10-101과 오차범위 내에서 비슷하였다(표 15).

표 15

ligand	TNF-α		CXCL10	
	Ab	Hu10-101	Humira	Hu10-101
Kd value	4.5X10 ⁻¹⁰	1.5X10 ⁻¹⁰	1.9X10 ⁻⁹	-
R2	0.97	0.98	0.99	-

[0259]

[0260]

[0261]

[0262]

실시예 8: 후보항체의 생체 외 (in vitro) 효능 평가

[0263]

8-1. TNF-α 억제능 평가

[0264]

후보 항체의 TNF-α 억제능을 확인하기 위하여 TNF-α 수용체를 가지고 있는 WEHI164 세포를 이용한 항-TNF-α 억제능 평가 기법을 확립하였다.

[0265]

대조 항체로는 휴미라(Abbott Laboratories)를 사용하였으며, 후보 항체로는 휴미라 복제항체(과제에서 개발한 것임), HuE10-101를 사용하였다. 각각의 항체 농도를 1/2 단계 희석한 다음 hTNF-α를 첨가하여 세포배양 한 다음 MTT(thiazolyl blue tetrazolium)를 첨가하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양한 후 세포를 용해시킨 다음 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다(도 25).

[0266]

분석 결과 휴미라 복제항체, HuE10-101, HuIL21R-101, HuIL21R-100(과제에서 개발한 것임)에서 양성 대조군인 휴미라보다 낮은 농도에서 TNF-α 억제능이 있음이 관찰되었다. 이러한 결과로 TNF-α에 대한 후보 항체의 억제능이 휴미라에 비해 향상되는 것을 확인하였다(도 25).

[0267]

[0268]

8-2. CXCL10 억제능 평가

[0269]

후보 항체의 효능 검증을 위하여 트랜스웰 시스템을 이용한 세포 주화능(chemotaxis) 실험 기법을 확립하였다. 본 발명자들이 선행연구를 통해 CXCL10에 의해 T 세포의 주화능이 증가된다고 밝힌 결과를 토대로 CXCL10에 의해 증가된 세포 주화능에 항-CXCL10 항체인 HuE10-101을 처리하였을 때의 주화능 변화를 관찰하였다. Jurkat T 세포를 5.0 μm 포어 사이즈 세포 배양 트랜스웰에 4시간 동안 배양하여 Jurkat T 세포의 이동을 확인하였다. 실험군에는 HuE10-101을 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml로 농도로 상부와 하부 챔버에 처리하였고, CXCL10에 의해 증가되는 주화능 조건을 만들기 위하여 하부 챔버에는 추가로 hCXCL10을 처리하였다. 양성대조군에는 하부 챔버에만 hCXCL10을 단독으로 넣어 CXCL10에 의해 주화능이 증가되는지 확인하였다. 그 결과 양성대조군(PC) 보다 실험군에서의 세포 이동이 효과적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 26).

[0270]

기존의 파골세포 분화 실험에서는 M-CSF와 RANKL을 직접 첨가하여 대식세포를 파골세포로 분화시킨다. 그러나 CXCL10 자극에 의해 CD4+ 세포로부터 방출되는 RANKL의 양에 따른 파골 세포 분화의 정도를 분석하기 위하여, 본 발명자들은 CD4+/CD14+ 동시 배양 시스템을 도입하여 파골 세포 분화를 유도하는 실험 조건을 확립하였다(도 27).

[0271]

파골세포로의 분화 억제능을 확인하기 위하여, 혈액에서 파골세포 전구세포(CD14+)와 CD4+ 세포를 분리한 후 두 세포를 동시 배양 시스템을 이용하여 파골 세포 분화를 유도하였고, TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 염색을 시행하고 현미경 관찰하였다(도 28).

[0272]

HuE10-101에 의한 파골세포 분화 억제능을 확인한 결과, 휴미라를 사용한 대조군(G-I)에 비해, TNF-α와 CXCL10 자극을 각각 단독으로 처리한 군과 TNF-α와 CXCL10을 함께 자극해 준 동시 배양 시스템에서 파골 세포 분화강도 의존적이지는 않지만 감소하는 것을 확인하였다(도 29).

[0273]

[0274]

8-4. 항체의 TNF-α 증화능 평가

[0275]

생산 세포주에서 생산한 항체의 효능을 평가하기 위하여 2차년도에 확립한 TNF-α 증화능 평가를 진행하였다. 본 실험에는 TNF-α 수용체를 가지고 있는 WEHI164 세포를 이용하였다. 대조 항체로는 humira (Abbott

Laboratories)를 사용하였고, 실험군은 HuE10-101를 사용하였다. 각각의 항체 농도를 1/2 단계 희석(serial dilution) 한 다음 재조합 인간 TNF- α 를 첨가하여 세포배양 한 다음 MTT(thiazolyl blue tetrazolium)를 첨가하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양한 후 세포를 용해시킨 다음 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 EC50 값을 분석하였다.

[0276] 분석 결과 HuE10-101 처리 군에서 대조군인 humira처리 군보다 낮은 농도에서 TNF- α 중화능이 있음이 최종 확인하였다. 또한, 2차년도에 사용되었던 항체를 비교하였을 때 새로 개발한 생산 세포주에서 생산한 항체에서의 TNF- α 중화능이 향상되는 것을 확인하였다(도 30).

[0277]

[0278] **실시에 9: 항체의 생체 내 (in vivo) 효능 평가**

[0279] 9-1. 인간화 TNF 마우스에서 이중항체의 효능평가

[0280] 9-1-1. 인간화 TNF 형질전환 마우스

[0281] 1991년 Keffer 등이 확립한 TNF 형질전환 마우스 모델은 TNF를 억제하는 역할을 하는 TNF 3' UTR(untranslated region)이 없도록 조작하여 인간 TNF 이식 유전자를 마우스에 도입하였다. 이로 인해 TNF의 발현을 증대시킴으로써 자발적으로 관절염이 유도되도록 하였다. 이와 같은 방법으로 유도된 관절염은 류마티스 관절염과 유사하게 병리학적으로 활막의 비후, 관절강 내로의 염증세포의 침윤, 파누스 형성과 연골과 뼈의 파괴를 나타내었다.

[0282] TNF 형질전환 마우스 모델은 TNF에 의해 유도되는 관절염의 발병 기전의 확인을 통하여 TNF가 관절염의 발병에 중요한 역할을 한다는 것을 증명할 수 있는 계기를 마련하였다. 현재 TNF와 관련된 치료제의 효능을 평가하는데 TNF 형질전환 마우스 모델이 유용하게 활용되고 있다.

[0283] 따라서, 본 발명자들은 TNF에 대한 이중 항체의 효능평가를 위하여 TNF 형질전환 마우스 모델을 이용하였다. TNF 형질전환 마우스 모델을 이용한 이중항체 효능평가는 그리스 소재의 CRO 전문 기관에 의뢰하여 진행하였다. 효능평가에 이용된 계통은 Tg197이며, 미국식품의약국(FDA)에서 권고한 류마티스 관절염에 대한 인간항체 평가 모델 중에 하나이다. 현재 시판 중인 TNF- α 길항제인 Infliximab (Remicade)개발에 있어 Tg197 계통을 이용하였다.

[0284] Tg197 계통 인 TNF 형질전환 마우스 모델의 관절염 진행은 성별 간에 임상적 차이가 나타나지 않으며 질병이 진행됨에 따라 일반 마우스와 비교할 때 체중 감소를 나타내는 것이 특징이다. Tg197 계통의 조직을 병리학적으로 분석해보면 류마티스 관절염과 매우 유사하게 염증성 침윤, 활막의 비후, 연골 파괴, 골의 침식 등을 관찰 할 수 있다.

[0285] Tg197 계통의 TNF 형질전환 마우스 모델은 실험 시작 3주차부터 병변이 발생하게 된다. 병변 초기인 3주차부터 6주차까지의 모델은 예방 효과를 알아보기 위하여 쓰이며, 6주차부터 9주차까지는 치료 효과를 알아보는데 주로 이용된다. 따라서 본 실험의 목적인 이중항체의 효능을 평가를 위하여 평가 기간은 3주차부터 9주차까지 진행하였다. 임상적 평가는 평가 기간 동안의 관절염 유발 점수(arthritis score)와 체중의 변화 측정을 통해 진행하였다.

표 16

관절염 유발 점수(arthritis score)

관절염 유발 점수	특징
0 / 질병아님	관절염 아님(정상적인 외견, 마우스가 매달려서 자신의 몸무게를 지탱할 수 있음)
0.5 / 가벼운 질병	관절염 발병(가벼운 관절 부기)
1.0 / 가벼운-보통 질병	가벼운 증상(부기로 인한 관절 뒤틀림, 발의 염증)
1.5 / 보통 질병	보통의 관절염(관절-발 부기, 전체 몸 유연성 감소, 잡는 힘 감소)
2.0 / 보통-심각한 질병	보통의 관절염(심각한 관절, 발 및 손가락 부기, 관절-다리 변형, 매달리지 못함, 전체 몸 유연성 없음, 잡는 힘 없음, 움직일 때 몸을 떨기 시작하나 앞으로 나아갈 수는 있음)
2.5 / 심각한 질병	심각한 관절염(상기 2.0의 증상이 심각해짐. 움직이기 어려움)

[0286]

3.0 / 매우 심각한 질병	매우 심각한 관절염(관절유착증 나타남, 움직이기 매우 어려움)
-----------------	------------------------------------

[0287] 또한, 실험 종료 후에는 조직 병리학적 평가를 통하여 관절염 병변 정도를 평가 하였다. 류마티스성 관절염의 조직 병리학적 특징으로는 관절 활막세포의 과증식과 이를 원인으로 하는 연골 조직의 파괴가 대표적인 특징이다. 마우스 무릎 조직을 분리하여 포르말린에 고정하고, 석회질 제거 단계를 거쳐 파라핀으로 블록을 제작하여 마이크로톰을 이용하여 4 μm의 조직 절편을 제작하였다. H&E(hematoxylin and eosin) 염색하여 활막 조직의 염증도(synovial inflammation), 뼈 침식정도(bone erosion), 연골세포 파괴정도(cartilage damage) 그리고 면역세포의 침윤(leukocyte infiltration) 등을 조사하였다. 이때 평가는 어떤 샘플인지 알지 못하도록 블라인드 테스트로 진행하였다. 조직병리학적 평가(Histopathological Evaluation)는 다음 표를 기준으로 평가하였다.

표 17

조직병리학적 평가표

[0288]

HISTOPATHOLOGICAL CRITERIA FOR SCORING ARTHRITIC PHENOTYPE	
SCORE ¹	CRITERIA
0	No detectable pathology
1	Hyperplasia of the synovial membrane and presence of polymorphonuclear infiltrates. Mild tendonitis may be present.
2	Pannus and fibrous tissue formation and focal subchondrial bone erosion
3	Cartilage destruction and bone erosion

[0289] 9-1-2. 인간화 TNF 형질전환 마우스를 이용한 후보 항체의 효능평가 결과

[0290] 기존에 상용화 되어 널리 사용되는 휴미라 10 mg/kg와 본 발명자들이 개발한 휴미라 복제항체를 2 mg, 10 mg/kg 용량으로 마우스에 투여한 다음, 임상적 변화 관찰 및 평가 하였다. 휴미라와 휴미라 복제항체의 관절염 유발 점수(arthritis score)를 측정한 결과, Vehicle군에서 1.48이었으며, 대조군인 휴미라가 10 mg/kg의 농도일 때 0.22이었다. 휴미라 복제항체의 농도가 각각 2 mg, 10 mg/kg일 때 0.66, 0.52의 수치를 나타내었다(도 31). TNF 형질전환 마우스 모델은 질병이 진행함에 따라 임상적으로 상당한 체중 감소를 보이는 것이 특징이다. 체중 변화 측정은 관절염 유발 점수(arthritis score) 측정 일정과 동일하게 진행하였다. Vehicle군에서 15.26 g이었으며, 대조군인 휴미라가 10 mg/kg의 농도일 때 20.23 g이었다. 휴미라 복제항체의 농도가 각각 2 mg, 10 mg/kg 일 때 18.3 g, 20.58 g의 수치를 나타내었다(도 32). 휴미라 복제항체의 임상적 평가 결과 대조군인 휴미라와 유사하게 휴미라 복제항체의 농도가 증가할수록 관절염 유발 점수(arthritis score)가 감소하였으며, 뚜렷한 체중 증가를 보였다.

[0291] HuIL21R-101의 효능 평가를 위하여 대조군으로 휴미라를 사용하였고, 실험군인 HuIL21R-101을 각각 1 mg, 3 mg, 10 mg/kg의 용량으로 마우스에 투여한 다음, 임상적 변화 관찰 및 평가하였다. HuIL21R-101의 관절염 유발 점수(arthritis score)를 측정한 결과, Vehicle군 인 인간 대조군 IgG에서 1.27이었으며, 대조군인 휴미라가 10 mg/kg의 농도일 때 0.20이었다. 실험군인 HuIL21R-101의 농도가 각각 1 mg, 3 mg, 10 mg/kg일 때 0.89, 0.73, 0.88의 수치를 나타내었다(도 33). 체중 변화를 측정한 결과, Vehicle군에서 15.4g이었으며, 대조군인 휴미라의 농도가 10 mg/kg 일 때는 20.9 g이었다. 실험군인 HuIL21R-101의 농도가 각각 1 mg, 3 mg, 10 mg/kg일 때 15.1 g, 16.0 g, 16.5 g을 나타내었다(도 34).

[0292] HuIL21R-101의 임상적 평가 결과, 대조군인 휴미라에 비하여 HuIL21R-101의 관절염 유발 점수(arthritis score)가 유의하게 감소하지 않았으며, 뚜렷한 체중 증가를 보이지 않았다. HuIL21R-101의 선행 결과와 TNF 형질전환 마우스 모델을 통한 효능평가 결과를 토대로 HuIL21R-101은 최종 후보항체 군에서 제외하였다.

[0293]

[0294] 9-1-3. 인간화 TNF 형질전환 마우스를 이용한 이중 항체의 효능 평가 결과

[0295] 대조군으로 Humira를 사용하였고, 실험군인 HuE10-101을 각각 6.9 mg, 13.8 mg/kg의 용량으로 대조군과 질량 대비 동량으로 마우스에 투여한 다음, 임상적 변화 관찰 및 평가하였다. HuE10-101의 관절염 유발 점수(arthritis score)를 측정한 결과, Vehicle군 인 Human Control IgG에서 1.65이었으며, 대조군인 Humira가 10mg/kg의 농도 일 때 0.06이었다. 실험군인 HuE10-101의 농도가 각각 6.9 mg, 13.8 mg/kg일 때 0.41, 0.07 의 수치를 나타내

었다(도 35).

- [0296] TNF 형질전환 마우스 모델은 질병이 진행함에 따라 임상적으로 상당한 체중 감소를 보이는 것이 특징이다. 체중 변화 측정은 관절염 유발 점수(arthritis score) 측정 일정과 동일하게 진행하였다. 그 결과, Vehicle군에서 18.92 g이었으며, 대조군인 Humira의 농도가 10 mg/kg 일 때는 23.38 g이었다. 실험군인 HuE10-101의 농도가 각각 6.9 mg, 13.8 mg/kg일 때 21.08 g, 22.80 g을 나타내었다(도 36).
- [0297] HuE10-101의 임상적 평가 결과, 대조군인 휴미라 복제항체와 유사하게 관절염 유발 점수(arthritis score)가 감소하였으며, HuE10-101의 농도가 증가함에 따라 관절염 유발 점수(arthritis score)가 감소하는 결과를 얻을 수 있었다. 또한, 체중 변화를 측정한 결과 병변이 진행됨에 따라 감소되었던 체중이 휴미라 복제항체군과 유사하게 HuE10-101의 투여 농도가 증가할수록 체중이 증가하는 것을 관찰하였다.
- [0298] 조직 병리학적 평가 결과, Vehicle군에서 3.75 이었으며, 대조군인 Humira의 농도가 10 mg/kg 일 때 0.75 이었다. 실험군인 HuE10-101의 농도가 각각 6.9 mg, 13.8 mg/kg일 때 1.84, 0.75의 수치를 나타내었다. 약물 투여 전 3주령 마우스는 1.33 의 수치를 나타내었다. HuE10-101와 Humira의 조직 병리학적 평가 결과 동등한 효과를 나타냄을 확인 할 수 있었다(도 37).
- [0299] HuE10-101의 조직 병리학적 평가와 관절염 유발 점수 결과를 비교 분석하였다. Vehicle군은 각각 3.75,1.65, Humira군은 각각 0.75,0.06, HuE10-101를 6.9 mg/kg의 농도로 처리한 군은 각각 1.84, 0.41, HuE10-101를 13.8 mg/kg의 농도로 처리한 군은 각각 0.75, 0.07. 약물 투여 전 3주령 마우스는 각각 1.33, 0 의 수치를 나타내었다. HuE10-101와 Humira를 치료제로 사용하였을 때 조직 병리학적 평가와 관절염 유발 점수 결과를 비교하였을 때 두 약물이 동등한 치료 효과를 나타냄을 확인 할 수 있었다(도 38).
- [0300] HuE10-101의 임상적 평가 결과 대조군 인 Humira에 비하여 관절염 유발 점수(arthritis score)가 유의하게 감소 하지 않았으나, HuE10-101의 농도가 증가함에 따라 관절염 유발 점수(arthritis score)가 감소하는 결과를 얻을 수 있었다.
- [0301] 또한, 체중 변화를 측정한 결과 병변이 진행됨에 따라 감소되었던 체중이 Humira군과 유사하게 HuE10-101의 투여 농도가 증가할수록 체중이 증가하는 것을 관찰하였다.
- [0302]
- [0303] 9-1-4. 인간화 TNF 형질전환 마우스를 이용한 생산세포주에서 생산한 이중항체의 효능 평가 결과
- [0304] 생산세포주로부터 생산한 항체의 효능 평가를 확인하기 위하여 TNF 형질전환 마우스 모델을 이용한 효능 평가를 추가로 진행하였다.
- [0305] 재시행한 실험 조건의 대조군으로 humira를 사용하였고, 실험군인 HuE10-101는 13.8 mg/kg의 용량으로 일주일에 두 번 및 세 번 투여하는 군으로 나누었다. 3.5 주차부터 9.5 주차까지의 체중 변화와 관절염 유발 점수(arthritic score)를 측정하였다. 그 결과 Vehicle 군은 1.43, Humira군은 0.34, HuE10-101을 humira와 동등한 횟수로 투여한 군은 0.28, HuE10-101를 일주일에 세 번 투여한 군은 0.19의 수치를 나타내었다(도 39).
- [0306] 체중 변화 측정은 관절염 유발 점수(arthritis score) 측정 일정과 동일하게 진행하였다. 그 결과, Vehicle군에서 15.87 g이었으며, Humira투여군은 20.50 g이었다. humira와 동등한 횟수로 투여한 군은 19.21 g, 일주일에 세 번 투여한 군은 20.58 g을 나타내었다(도 40).
- [0307] HuE10-101의 Humira군에 비하여 관절염 유발 점수(arthritis score)가 유의하게 감소하였고, HuE10-101의 농도가 증가함에 따라 관절염 유발 점수(arthritis score)가 감소하였다. 체중 변화를 측정한 결과 병변이 진행됨에 따라 감소되었던 체중이 Humira군과 유사하게 HuE10-101의 투여 농도가 증가할수록 체중이 증가하는 것을 관찰 하였다(도 42).
- [0308] HuE10-101의 조직 병리학적 평가 결과, Vehicle군에서 3.53 이었으며, Humira투여군은 1.22 이었다. humira와 동등한 횟수로 투여한 군은 1.44, 일주일에 세 번 투여한 군은 0.72 의 수치를 나타내었다. 약물 투여 전 3.5 주령 마우스는 1.44 의 수치를 나타내었다. HuE10-101와 Humira의 조직 병리학적 평가 결과 HuE10-101를 일주일에 세 번 투여한 군의 조직 병리학적 평가 수치가 낮게 측정되어 Humira보다 효과가 좋음을 확인할 수 있었다 (도 41, 42).
- [0309] HuE10-101의 조직 병리학적 평가와 관절염 유발 점수 결과를 비교 분석하였다. Vehicle군은 각각 3.53,1.435, Humira군은 각각 1.22,0.34, HuE10-101를 humira와 동등한 횟수로 투여한 군은 각각 1.44, 0.28, HuE10-101를

일주일에 세 번 투여한 군은 각각 0.72, 0.19. 약물 투여 전 3주령 마우스는 각각 1.44, 0.06의 수치를 나타내었다(도 43).

[0310] HuE10-101와 Humira를 치료제로 사용하였을 때 조직 병리학적 평가와 관절염 유발 점수 결과를 비교하였을 때 두 약물이 동등이상의 치료 효과를 나타냄을 확인 할 수 있었다.

[0311]

9-2. K/BxN 혈청을 이용한 마우스 모델에서 이중항체의 효능평가

[0312] 9-2-1. K/BxN 자발성 관절염 동물모델(K/BxN serum transfer arthritis model)

[0314] 관절염(K/BxN serum transfer arthritis) 마우스 모델은 Benoist와 Mathis 등이 확립하였으며, C57BL/6 배경하의 KRN TCR 형질전환 마우스를 NOD(non-obese diabetic) 마우스와 교배하여 얻은 모델이다. KRN TCR 형질전환 발병기전은 KRN TCR이 리보핵산 분해효소(ribonuclease)뿐만 아니라 글루코오스 6 인삼염 이성화 효소(glucose 6 phosphate isomerase, GPI) 282-294를 인지하도록 항원특이성을 바꾸어 B세포에 의해 생성되는 항-GPI 항체가 관절염의 발생에 핵심적인 역할을 하도록 만든 것이다. 이 모델은 생후 4주 무렵이 되면 저절로 관절염이 걸리게 되어 K/BxN 자발성 관절염으로 명명되었으며, 관절염의 증상은 류마티스 관절염과 유사한 양상을 보인다.

[0315] K/BxN 마우스의 관절을 병리학적으로 관찰해 보면 류마티스 관절염 환자와 콜라겐 유도 관절염 모델에서 나타나는 백혈구 침윤, 활막 세포의 증식, 파누스 형성, 활막염, 뼈와 연골의 파괴 등의 임상적 소견이 관찰되며, 면역학적 소견으로 B 세포의 다클론 활성화, 고감마글로블린혈증, 자가 항체의 생성 등의 특징을 보인다. 다만 류마티스 관절염의 한 지표로 간주되는 류마티스 인자가 나타나지 않는다는 점이 류마티스 관절염 증상과 상이한 점이다.

[0316] 본 발명자들은 K/BxN 자발성 관절염 마우스에서 채취된 혈청을 투여하면 관절염을 비교적 쉽게 유발시킬 수 있다는 점과 실험 기간이 2주 이내로 짧다는 점에 착안하여 류마티스 관절염(K/BxN serum transfer arthritis) 모델을 도입하였다.

[0317]

9-2-2. K/BxN 자발성 관절염 마우스 모델을 이용한 효능평가 결과

[0318] 실험에 이용된 K/BxN 자발성 관절염 마우스는 8주령 이상을 이용하였으며, 채취된 혈청 150 μ l을 6주령 이상의 마우스에 각각 day 0, day 2에 2회 복강 내로 투여하여 관절염을 유도하였다. day 1, day 3에는 HuE10-101을 투여하였다.

[0320] 임상적 평가는 관절염 유발 점수(arthritis score)와 부종 증가율 평가를 통해 확인하였다. K/BxN 마우스의 혈청 최종 투여일 이후 다음 날부터 관절염이 유발하였으며, 전체적으로 관절염 유발 점수(arthritis score)와 부종 증가율은 마지막 혈청 투여일로부터 약 8-9일째에 최고조에 이르렀다가 점차 감소하는 양상을 나타냈다.

[0321] 관절염 마우스 모델을 통해 얻은 관절염 유발 점수 결과, 음성대조군인 K/BxN 혈청을 투여하지 않은 군에서 0, Vehicle군에서 7.87, 대조군인 휴미라 복제 항체 10 mg/kg 농도에서는 5.83을 나타냈다. 또한, 실험군인 HuE10-101의 10 mg/kg 농도일 때 4의 수치를 나타냈다(도 44). 부종 증가율 평가 결과, 음성대조군인 K/BxN 혈청을 투여하지 않은 군에서 3.83, Vehicle군에서 23.34, 대조군인 휴미라 복제 항체 10 mg/kg 농도에서는 16.58을 나타냈다. 실험군인 HuE10-101의 10 mg/kg 농도일 때 13.67의 수치를 나타냈다(도 45). K/BxN 혈청을 이용한 마우스 모델을 이용한 HuE10-101의 임상적 평가 결과, 대조군인 휴미라 복제항체 보다 관절염 유발 점수(arthritis score)와 부종 증가율이 감소하는 것을 관찰하였다(도 46).

[0322] 또한, 실험이 종료된 K/BxN 혈청 트랜스퍼 관절염 마우스 모델의 골 관절을 상태를 분석 하기위하여 마우스 하지의 관절들을 마이크로 CT (NanoFocusRay) 장비로 분석하였다. 그 결과, 관절염을 유도한 Vehicle군은 관절 모양이 불규칙하게 변하였으며, 골 파괴가 상당히 진행되어 있음을 알 수 있었다. 이에 비해 대조군인 humira 복제 항체 처리 군, 실험군인 HuE10-101 처리한 군은 골파괴가 vehicle에 비해 현저하게 감소되었음을 확인하였다. 특히 실험군은 음성대조군인 K/BxN 혈청을 투여하지 않은 군과 비슷하게 골 파괴가 거의 관찰되지 않았다(도 47).

[0323] 형태학적인 변화가 조직병리학적 변화에서도 관찰되는지 확인하기 위하여 실험이 종료된 K/BxN 혈청 트랜스퍼 관절염 마우스 모델의 조직을 얻어 조직병리학적 분석을 진행하였다. H&E로 조직을 염색하여 확인한 결과 Vehicle군에서는 관절 주위의 부종과 다형 백혈구, 림프구 등의 침윤이 뚜렷이 나타났으며, 활막의 염증, 비후,

관절면의 연골 손실을 관찰할 수 있었다. 반면에 humira 복제 항체 처리 군, HuE10-101 처리한 군에서는 관절의 염증반응, 연골의 파괴가 현저히 억제되었다. H&E로 염색한 사진을 분석하여 활막 조직의 염증도(synovial inflammation), 골 침식정도(bone erosion), 연골세포 파괴정도(cartilage damage), 면역세포의 침윤(leukocyte infiltration)을 각각 분석하였다. 그 결과 활막 조직의 염증도(synovial inflammation), 골 침식정도(bone erosion), 연골세포 파괴정도(cartilage damage), 면역세포의 침윤(leukocyte infiltration) 4가지 모두 Vehicle 군에 비해 감소하는 양상을 보였으며 대조군인 humira를 처리한 군보다 HuE10-101을 처리한 군에서 통계적으로 유의하게 감소함을 확인하였다(도 48).

[0324]

9-3. LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델을 이용한 이중항체의 효능평가

[0325]

9-3-1. LPS-유도 두개골 골 흡수(LPS-induced calvarial bone resorption)

[0326]

1995년 Nishihara 등이 확립한 동물 모델로 염증성 골 파괴의 병인 인자인 LPS(lipopolysaccharide)를 이용하여 염증성 골 소실을 유도하는 방법이다.

[0327]

LPS에 의한 골 손실의 증가는 기전에 대하여 자세히 밝혀지지 않았으나, 조골세포에서 TLR4(Toll-Like Receptor4)를 통한 MyD88(myeloid differentiation protein88)을 활성화 시키고, 골 흡수에 관여 하는 신호 전달 물질인 IL-1(interleukin-1), IL-6, GM-CSF(granulocyte macrophage colony stimulating factor), PGE2(prostaglandin E2), NO(nitric oxide) 등의 분비를 촉진하여 조골세포에서 RANKL의 발현을 촉진하여 파골세포의 분화를 유도 하는 것으로 보고되고 있다.

[0328]

LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델의 가장 큰 장점은 관절염 마우스 모델(K/BxN serum transfer arthritis model)과 마찬가지로 비교적 단기간 내에 모델 구축이 가능하다는 점이다. LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델은 LPS를 마우스 두개골에 단회 투여하여 염증을 유도한다. 그런 다음 5일 동안 매일 HuE10-101을 두개골에 투여한다(도 49). LPS로 유도된 염증성 골 소실여부는 마이크로 CT 촬영을 통한 두개골 분석을 통해 확인하였다. 그 결과 LPS를 투여하여 골 소실을 유도한 Vehicle군과 대조군인 humira 복제 항체 처리 군, 실험군인 HuE10-101 처리한 군, 음성대조군(normal) LPS를 투여하지 않은 군의 두개골 소실 정도를 확인하였다. 그 결과, Vehicle군에서 두개골 소실이 현저하게 나타남을 확인하였다. 또한, humira 복제 항체 처리 군과 실험군인 HuE10-101를 처리한 군에서는 두개골 소실이 Vehicle에 비해 현저하게 감소됨을 확인하였다. 결론적으로, LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델을 이용하여 HuE10-101의 생체 내(in vivo)에서의 파골 세포 분화능을 평가한 결과 HuE10-101이 humira에 비해 파골 세포 분화를 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 50).

[0329]

생산세포주로부터 생산한 항체의 효능 평가를 확인하기 위하여 LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델을 이용한 효능 평가를 추가로 진행하였다.

[0330]

그 결과 LPS로 골 소실을 유도하고 항체 조성 버퍼만 넣어준 Vehicle군과 대조군인 humira처리 군, HuE10-101 처리한 군, LPS를 투여하지 않은 음성대조군(normal) 군의 두개골 소실 정도를 확인하였다. 그 결과, Vehicle 군에서 두개골 소실이 증가함을 확인하였다. humira 처리 군과 HuE10-101를 처리한 군에서 Vehicle에 비해 두개골 소실이 현저하게 감소됨을 확인하였다(도 51).

[0331]

두개골 소실에 대한 면밀한 분석을 위하여 골 소실 면적을 이미지 분석 프로그램(Image J) 을 통하여 확인하였다. 그 결과 음성대조군에 비하여 Vehicle 군은 2.35배 정도 골 소실이 증가하였고, 반면 humira를 처리한 군은 음성대조군에 비해 2.15배 정도 골 소실을 보였고, vehicle에 비해서는 0.9배였다. HuE10-101은 음성 대조군에 비해 1.2배 (P value: 0.0428) 정도 골 소실을 보였고, vehicle에 비해서는 0.5배였고, 48.79 % 정도 감소됨을 확인하였다(도 52).

[0332]

LPS로 유도된 염증성 골 소실 마우스 모델을 이용하여 생산세포주로부터 생산한 HuE10-101의 생체 내(in vivo)에서의 파골 세포 분화능을 평가한 결과 선행 연구의 결과와 마찬가지로 HuE10-101이 humira에 비해 파골 세포 분화를 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0333]

[0334]

9-5. 콜라겐 유도성 관절염 마우스 모델에서 이중항체의 효능평가

[0335]

1977년에 Trentham 등에 의해 확립된 콜라겐 유도성 관절염은 현재 가장 널리 쓰이고 있는 류마티스 관절염의

[0336]

대표적인 자가면역성 관절염모델이다. 류마티스 관절염 환자의 혈청에서 콜라겐에 대한 항체가 발견되었고, 관절에 존재하는 타입 II 콜라겐이 자가 항원으로 작용할 수 있다는 점에서 착안하였다.

[0337] 콜라겐 유도성 관절염 마우스 모델의 특징은 임상적인 소견이 사람의 류마티스 관절염과 전반적으로 유사하다는 점이다. 유사성을 갖는 것은 클래스 II MHC 단상형(haplotype)과의 연관성, 자가 항원에 특이적인 T, B세포반응에 의한 적응면역을 반영하는 발병기전, 관절 조직 파괴에 자가 항체와 보체계의 관여, 활막 세포의 증식과 림프구의 침윤 및 파누스 형성 등이 있다.

[0338] 본 발명자들은 선행연구를 통해 류마티스 관절염의 동물 모델인 콜라겐 유도성 관절염에서 CXCL10의 증가 된다는 결과를 확인 바가 있다. 또한, CXCL10 억제항체에 의한 콜라겐 유도 관절염의 증상 억제 실험을 통하여 CXCL10이 류마티스 관절염에 의한 골흡수 및 파골 세포 분화 촉진 인자에 관여함을 규명하였다.

[0339] 콜라겐 유도성 관절염 마우스 모델은 4℃ 하에서 아세트산(0.05-0.1 M)로 유형(bovine-type) II 콜라겐(2, 4 mg/mL)을 용해하고 동등한 양의 프로인트 보강제(Freund's adjuvant)로 현탁하였다. 현탁 물질 0.1 mL을 수컷 DBA/1J 마우스(5-9 주령) 꼬리 기저부에 피하투여(first injection)하며, 3주 후에 현탁 물질(0.1-0.2 ml)을 꼬리 기저부에 추가(booster or second injection)로 피하 투여하였다(도 53).

[0340] 콜라겐 유도성 관절염 마우스 모델의 임상적 평가는 TNF 형질전환 마우스 모델 이용한 효능평가와 동일 기준으로 관절염 유발 점수(arthritis score)로 평가할 것이며, 추가로 병리학적 검사 및 면역 염색, 염증성 사이토카인 등의 측정을 병행하여 평가할 예정이다.

[0341]

[0342] **실시예 10: 항체의 교차 반응성 시험**

[0343] 항체의약품은 표적세포 이외의 사람세포나 조직에 동일하거나 연관된 항원 결정 부위가 발현되었을 경우, 조직에 항체가 결합할 수도 있다.

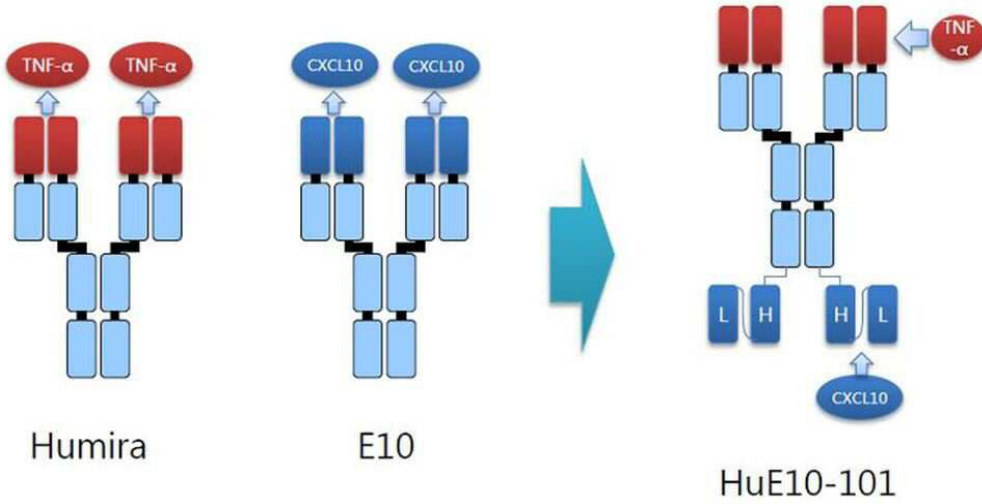
[0344] 교차 반응성 또는 비표적 조직에 대한 결합 여부를 규명하기 위하여 항상 사람 조직에 대한 교차 반응성 연구를 비임상 단계에서 수행하여야 한다고. 단클론항체 의약품의 평가가이드(KFDA, 2005)에 명시되어 있어 항체의약품의 조직교차반응 시험(KFDA, 2013) 가이드 라인을 참고하여 교차반응성 시험을 진행하였다. 면역조직화학염색법으로 EnVision Detection System을 이용하였으며 중복되지 않은 3인의 32가지 조직을 이용하여 교차 반응을 확인하였다. 그 결과 HuE10-101이 다른 조직에 비특이적으로 결합하지 않는다는 것을 확인 할 수 있었다(도 54).

[0345]

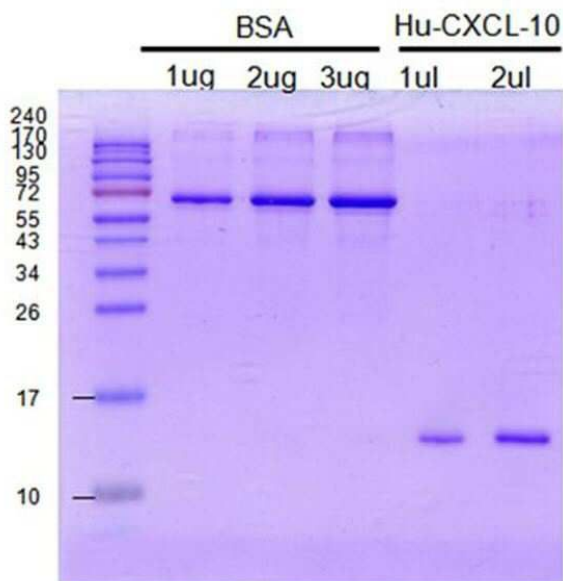
[0346] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

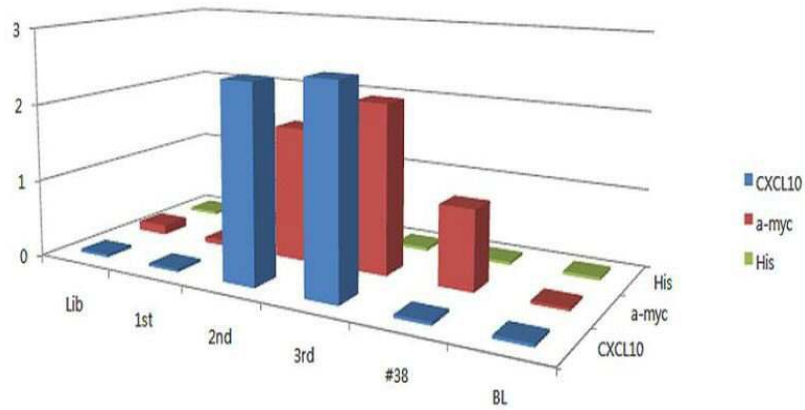
도면1



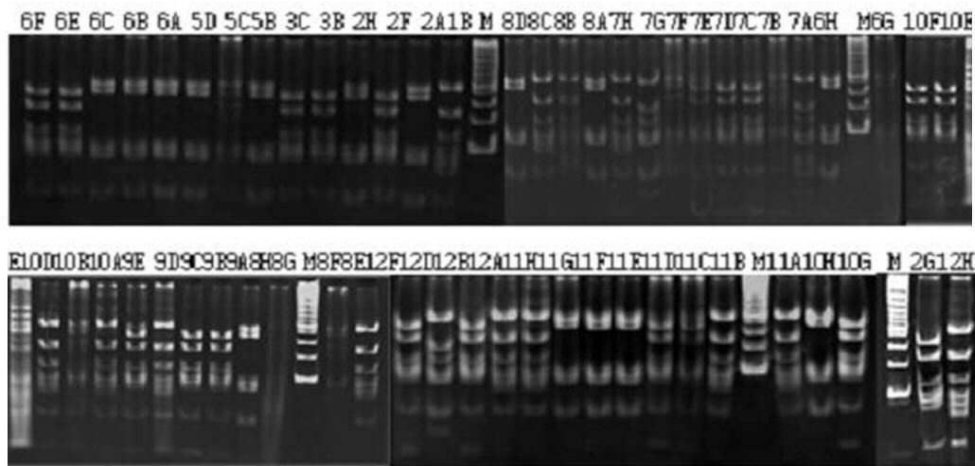
도면2



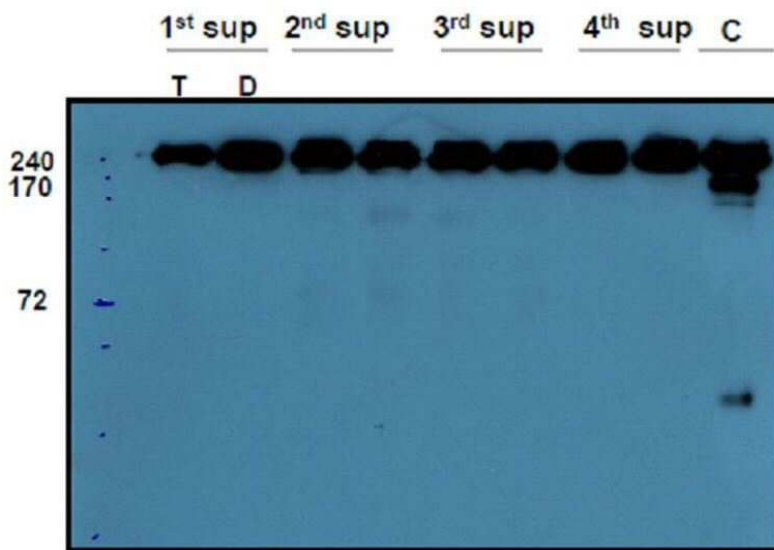
도면3



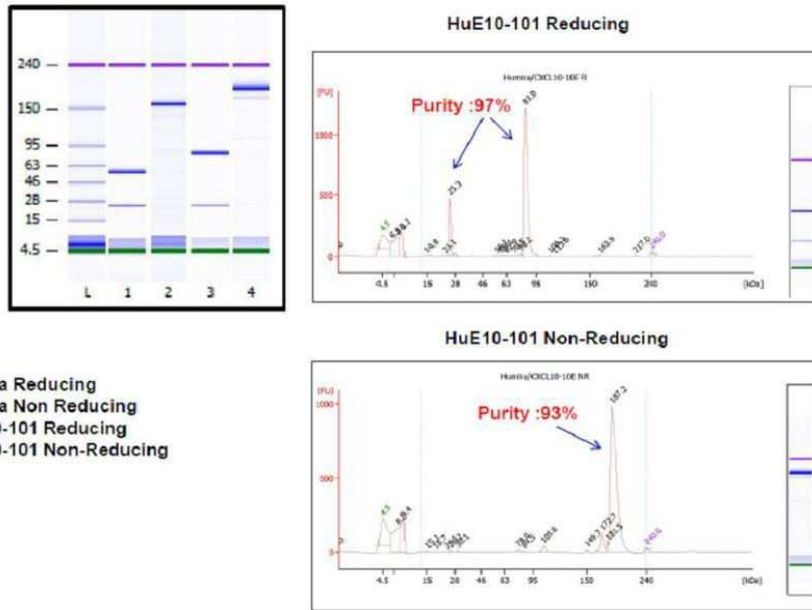
도면4



도면5

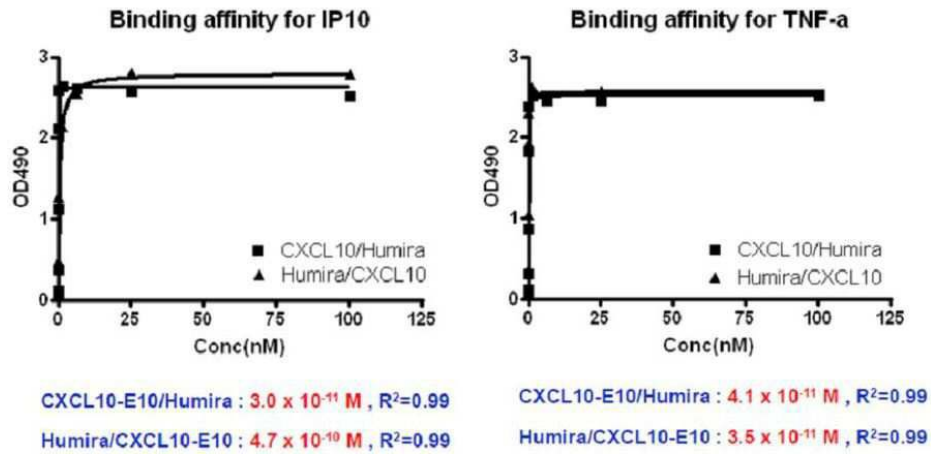


도면6



도면7

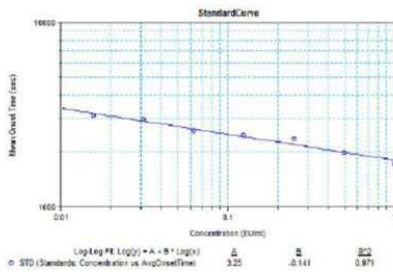
Binding affinity Test : HuE10-100 (CXCL10-E10/Humira) & HuE10-101 (Humira/CXCL10-E10)



도면8

	Antibody List	제공 Conc(mg)	Antibody Conc(mg/ml)	Endotoxin level(EU/ml)
1차	Humira/CXCL10	60.28	9.7	0.015
	Humira(Generic)	43.68	10.5	0.091
2차	Humira/CXCL10	1	8.68	0.044
	Humira/IL21R	1	4.7	0.12

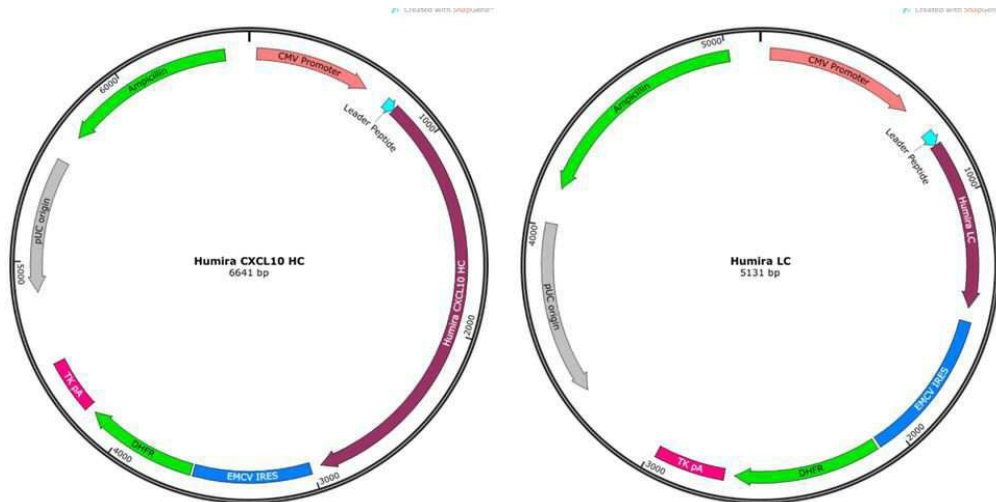
LaL Test



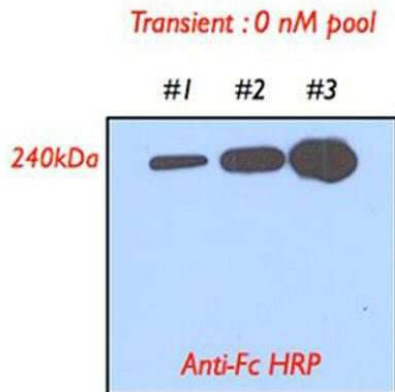
Sample	Wells	Values	R	Result	Max.Result	Std Dev	CV%	
Un01	D2	3135.857	R	0.075	0.075	0.000	0.0	Humira/CXCL10
Un02	D3	1944.105	R	0.545	0.545	0.000	0.0	
Un03	D4	2192.867	R	0.232	0.232	0.000	0.0	
Un04	D5	2578.898	R	0.073	0.073	0.000	0.0	
Un05	L6	4492.555	R	0.120	0.120	0.000	0.0	Humira/IL21R
Un06	L7	2775.571	R	0.044	0.044	0.000	0.0	Humira/CXCL10
Un07	L8	4492.558	R	0.091	0.091	0.000	0.0	Humira(Generic)
Un08	E2	2782.900	R	0.043	0.043	0.000	0.0	
Un09	E3	3705.778	R	0.006	0.006	0.000	0.0	
Un10	E4	1498.000	R	3.512	3.512	0.000	0.0	
Un11	E5	Limits-	R	Limits-	Limits-	Limits-	Limits-	
Un12	E5	Limits-	R	Limits-	Limits-	Limits-	Limits-	
Un13	E7	Limits-	R	Limits-	Limits-	Limits-	Limits-	
Un14	E8	Limits-	R	Limits-	Limits-	Limits-	Limits-	

R - Outside standard range

도면9



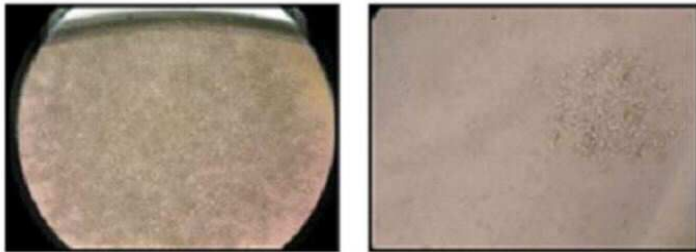
도면10



#1 : DNA : Lipofectamine = 1:1
#2 : DNA : Lipofectamine = 1:1.5
#3 : DNA : Lipofectamine = 1:2

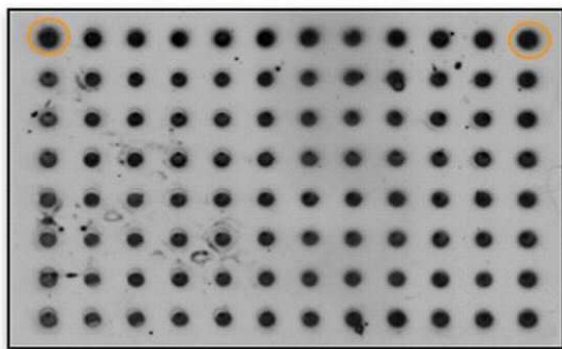
도면11

200 cells / well / 16 plates screening



도면12

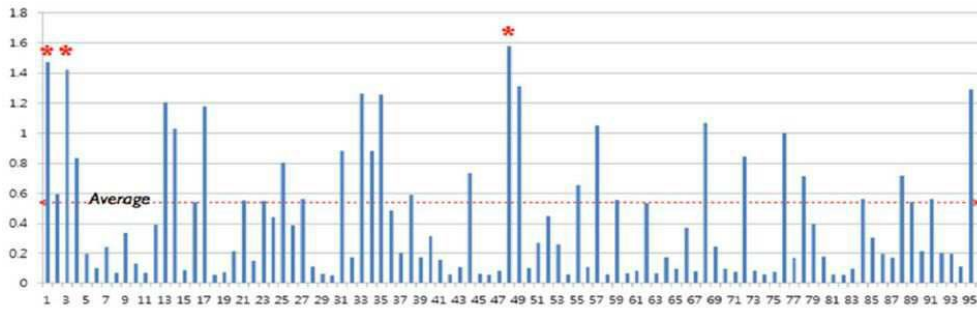
Humira cxcl10 clonal selection



도면13

<> 1-3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0761	0.8662	0.083	0.0601	0.8758	0.0695	0.538	0.4723	0.0799	0.072	0.3395	0.8112
B	0.0728	0.0554	0.0588	0.1071	0.0742	0.1147	0.1813	0.093	0.078	0.7094	0.0726	0.0835
C	0.1087	0.1505	0.0564	0.0586	0.061	0.0624	1.4934	0.0568	1.201	0.8383	0.0688	0.0716
D	0.229	0.0556	0.058	0.0604	0.0551	0.1534	0.3109	0.1793	0.0555	0.0562	0.0614	0.895
E	0.0814	0.0736	0.141	0.0574	0.0582	0.0531	0.0576	0.054	0.0573	0.0742	0.0616	1.0467
F	0.0656	0.0564	0.0557	0.057	0.0564	0.0556	0.0694	0.0592	0.0593	0.0708	0.4338	0.0676
G	0.3081	0.0581	0.0554	0.4743	0.1405	1.6006	0.064	0.0559	0.0993	0.0832	0.0685	0.1895
H	0.0824	0.0674	0.0672	0.1101	0.0733	0.3572	0.0707	0.0726	0.0666	0.11	0.0748	0.138
<> 1-2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0908	0.4939	0.1852	0.0777	0.0638	0.0709	0.0714	0.0646	0.0644	0.11	0.0603	1.3025
B	0.0628	0.3185	0.0567	0.0568	0.0525	0.0537	0.0522	0.0523	0.06	0.0536	0.641	0.0853
C	0.5807	0.815	0.1682	0.0683	0.0599	0.3348	0.0532	0.8319	0.1083	0.0674	0.0577	0.0624
D	0.1202	0.3502	0.2062	0.3499	0.0922	0.0568	0.2066	0.0616	0.3008	0.0814	0.9752	0.7959
E	0.2189	0.0557	0.0723	0.0574	0.0555	0.2698	0.0576	0.5679	0.0556	0.2006	0.0578	0.0585
F	1.0722	0.0575	0.0595	0.6287	0.0596	0.0534	0.0551	0.0711	0.0555	0.0531	0.0593	0.0572
G	0.1951	0.2041	0.1049	0.0565	0.0594	0.057	0.1803	0.0711	0.2106	0.0531	0.0885	0.0999
H	0.9556	0.1047	0.141	0.0856	0.0771	0.0732	0.0746	0.0767	0.0727	0.0826	0.0734	0.076
<> 1-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0822	0.8026	0.6534	0.0658	0.0685	0.0786	0.0706	0.0594	0.0596	0.0611	0.1104	1.2245
B	0.0711	0.0578	0.1719	0.0612	0.0714	0.071	0.0787	0.4198	0.0608	0.0593	0.0591	0.057
C	0.0752	0.0581	0.0585	0.1006	0.0589	0.0587	0.0564	0.0904	0.0551	0.2331	0.0657	0.0824
D	0.0682	0.0726	0.2444	0.1103	0.1086	0.232	0.0579	0.0835	0.0557	0.0935	0.0568	0.0557
E	0.0611	0.0815	0.0572	0.0562	0.0937	0.0571	0.3083	0.0613	0.0622	0.0541	0.0942	0.0566
F	0.2561	1.3008	0.3077	0.1248	0.0973	0.0534	0.0725	0.0534	0.105	0.0889	0.0587	0.0708
G	0.0643	0.0974	0.0615	0.3346	0.1337	0.0582	0.0768	0.0832	0.059	0.0588	0.0591	0.1114
H	0.0734	1.5449	0.8328	0.0761	0.0686	0.1076	1.3356	0.4837	0.0674	0.0569	0.0628	0.0993

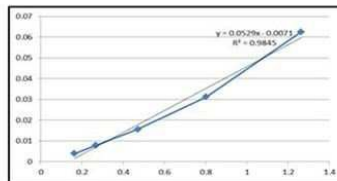
도면14



- clonal selection : 16 plates - 96 well scale
- 29 clones were selected - relative ELISA

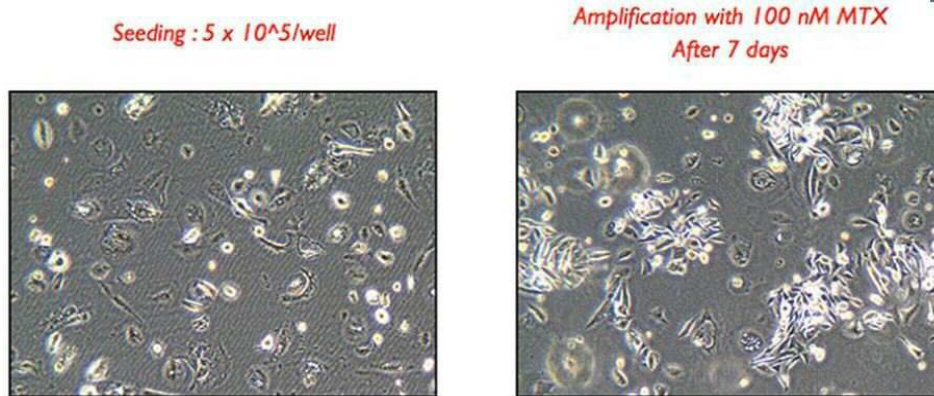
도면15

Clone	ug/ml	Clone	ug/ml
D10	0.69	S6	1.72
S21	0.11	S18	0.65
S24	3.44	S11	0.68
S19	0.78	S10	1.19
S13	0.82	S7	0.97
S9	2.90	S20	0.10
D5	1.64	S14	2.38
D2	1.50	S2	3.56
S8	1.84	S3	-0.03
S7	0.31	S23	1.15
D6	1.70	S15	0.57
S1	0.59	S12	3.34
D9	0.08	D14	0.14
D12	0.78	S5	0.90
D4	0.21		



- 9 clones were selected
- Quantification - ELISA
- Gene amplification - 100 nM

도면16



도면17

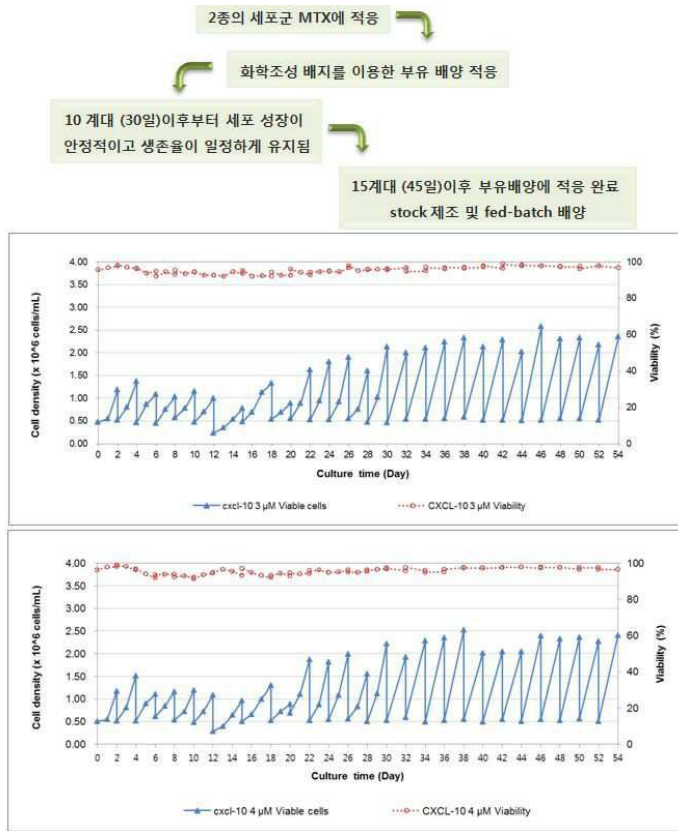


T25-6days culture

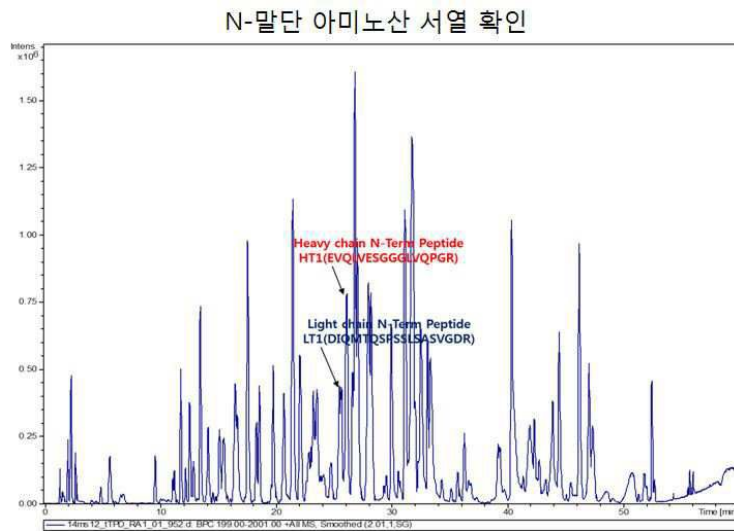
1 uM MTX adaptation

clone	S12	S6	S17
ug/ml	27.6	17.5	40.7

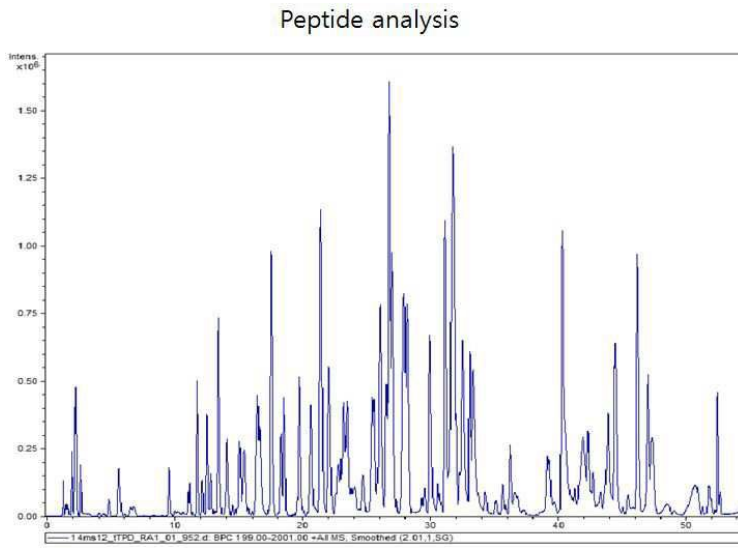
도면18



도면19a

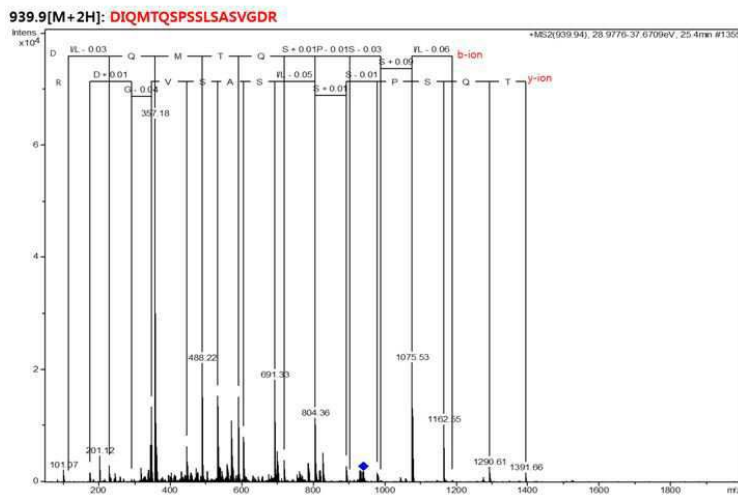


도면19b

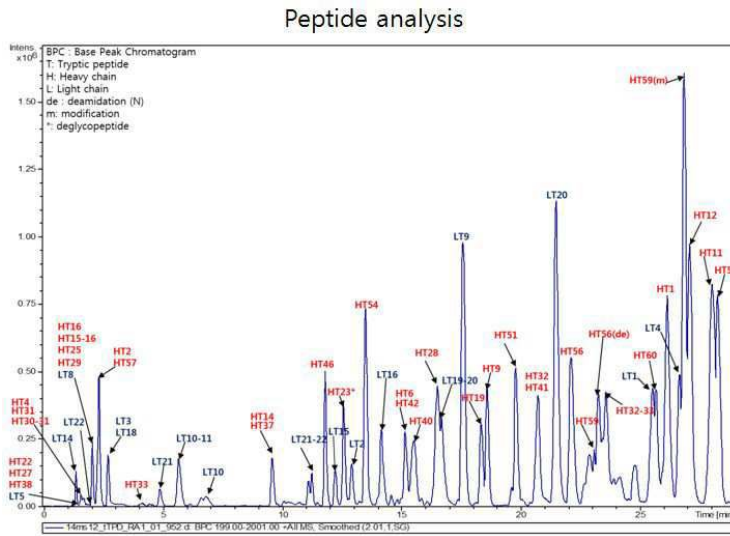


도면19c

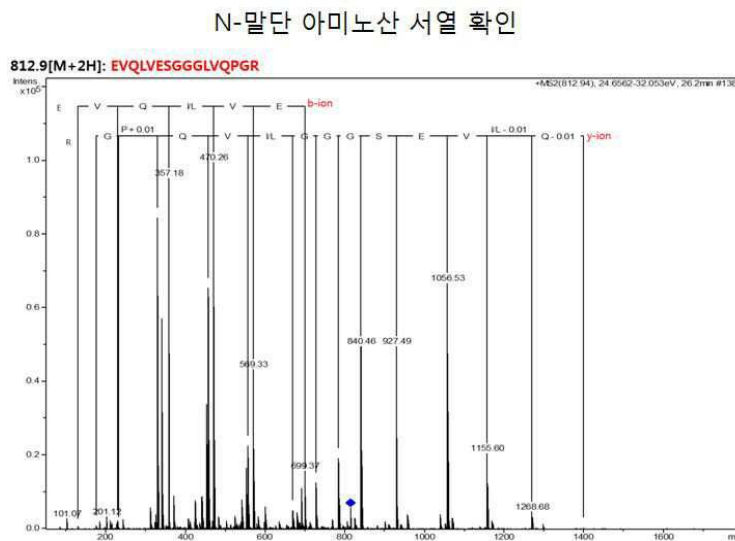
N-말단 아미노산 서열 확인



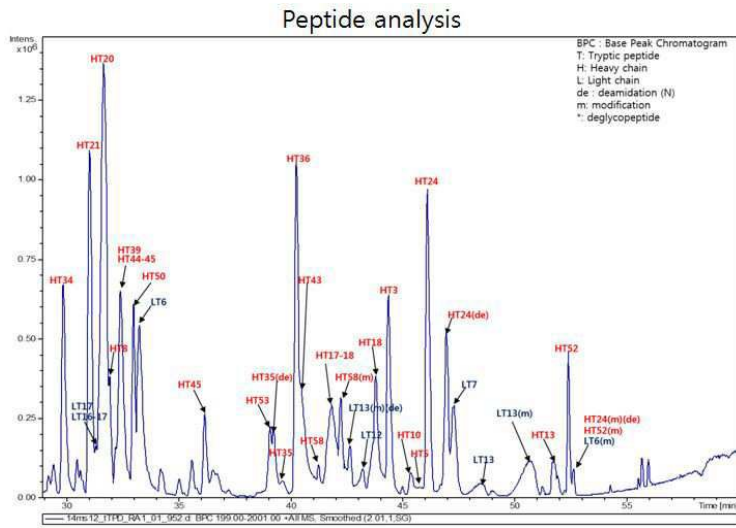
도면19d



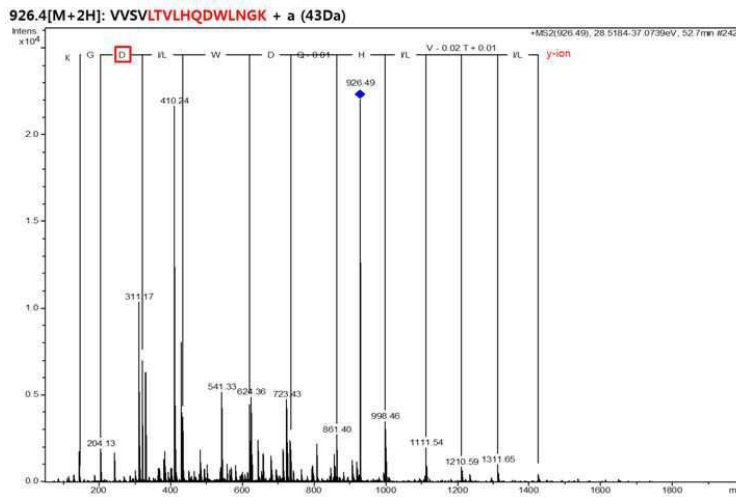
도면19e



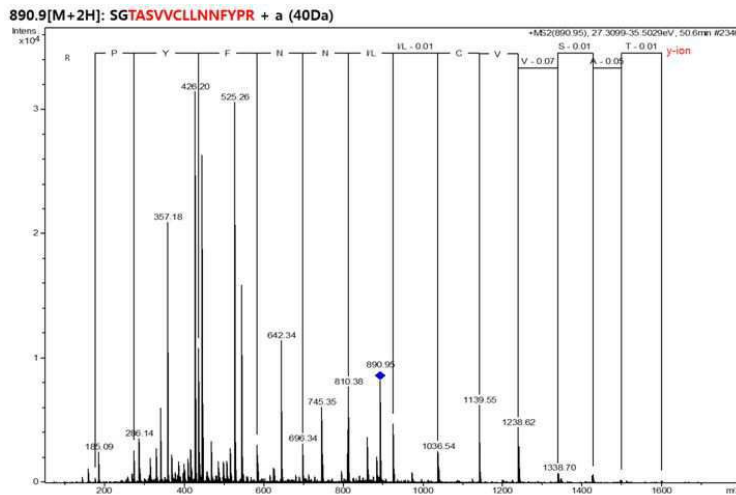
도면19f



도면20a



도면20b



도면21

<Heavy chain>

```

1 EVQLV ESGGG LVQPG RSLRL SCAAS GFTFD DYAMH WVRQA PGKGL EWVSA
51 ITWNS GHIDY ADSVE GRFTI SRDNA KNSLY LQMNS LRAED TAVYY CAKVS
101 YLSTA SSLDY WQQT LVTVS SASTK GPSVF PLAPS SKSTS GGTAA LGCLV
151 KDYFP EPVTV SWNSG ALTSG VHTFP AVLQS SGLYS LSSVV TVPSS SLGTQ
201 TYICN VNHKP SNIKV DKRVE PKSCD KHTHC PPCPA PELLG GPSVF LFPFK
251 PKDTL MISRT PEVTC VVVDV SHEDF EVKFN WYVDG VEVHN ARTKP REEQY
301 NSTYR VVSVL TVLHQ DWLNG KEYKC KVSNK ALPAP IEKTI SKAKG OPREP
351 QVYTL PPSRD ELTKN QVSLT CLVRG FYPSD IAVEW ESNQO PENNY KTHPP
401 VLDSG GSFFL YSKLF VDKSR WQOQN VFSCS VMHEA LHNHY TQKSL SLSPG
451 KQVOL VQSGG GVVQP GRSLR LSCAA SGFTF NSYGM HWVRO APGKG PEWVA
501 VISYD GNSKY YADSV KGRFT ISRDN SKTTL YLQMN SLRSE DTAVY YCARD
551 SGSYL DWYFD LWGRG TLVTV SGLG GLGGG GSGGG SGVGS QVFLF
601 QPPSV SGAPG QRVTI SCTGS RSNFG AGHDV HWYQQ LPGTA PKLLI YGNNN
651 RPSGV PDRFS GSKSG TSASL AITGL QAEDF ADYYC QSYDS RLGTV FGGGT
701 RLTVL
    
```

<Light chain>

```

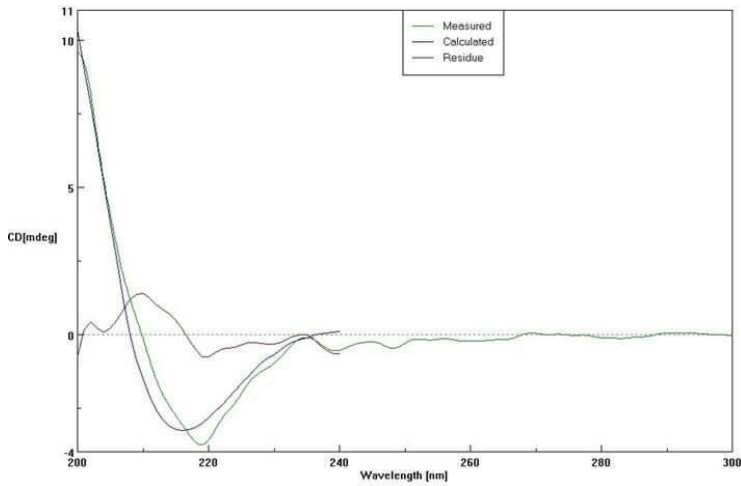
1 DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQGIR NYLAW YQKRP GKAPK LLIYA
51 ASTLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDVAT YYCOR YNRAP YTFGQ
101 GTKVE IKRSV AAPSV FIFPP SDEQL KSGTA SVVCL LNNFY PREAK VQWKV
151 DNALQ SGNLQ ESVTE QDSKD STYSL SSTLT LSKAD YEKHK VIACE VTHQG
201 LSSPV TKSFN RGEK
    
```

Matched amino acid : 902/919

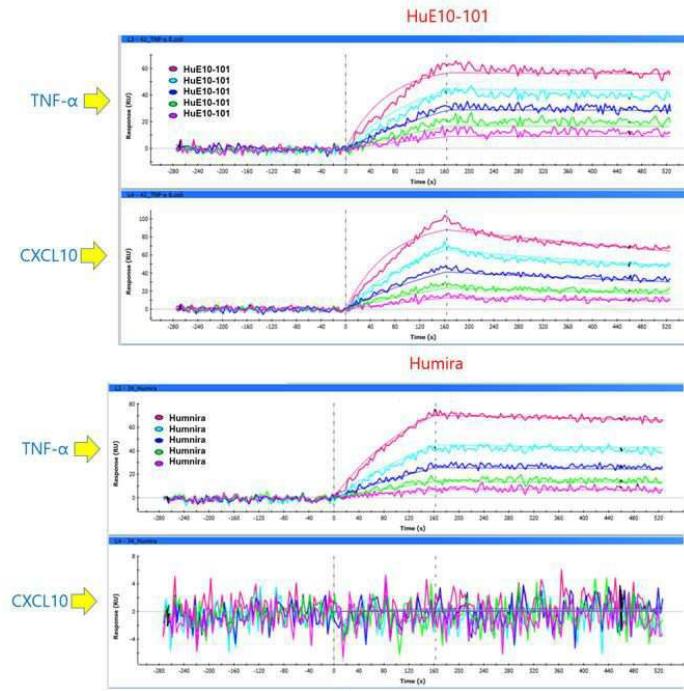
Sequence coverage : 98.1%

도면22

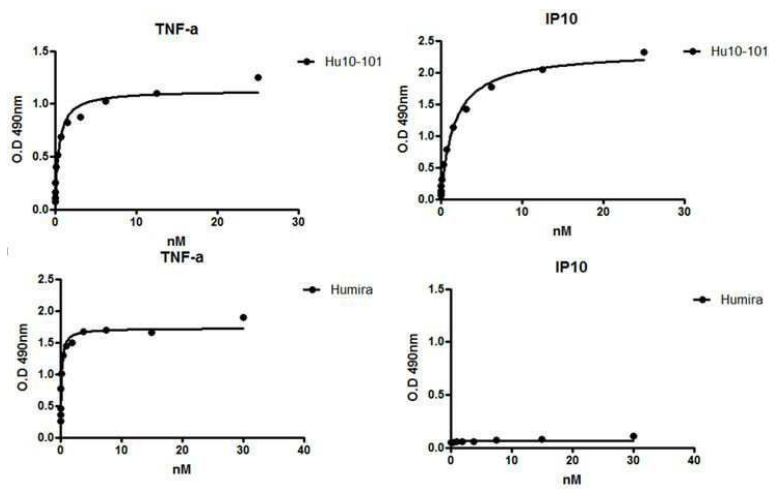
CD(Circular Dichroism) analysis



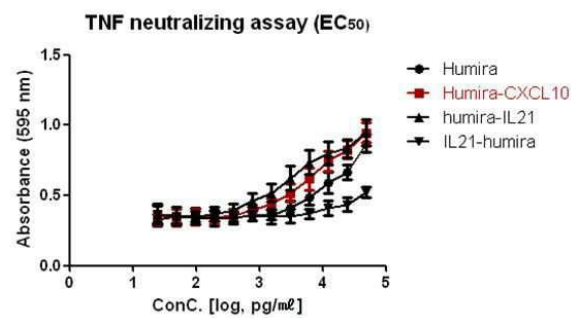
도면23



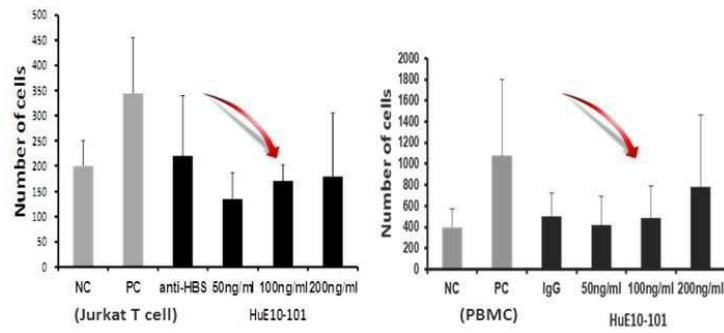
도면24



도면25



도면26



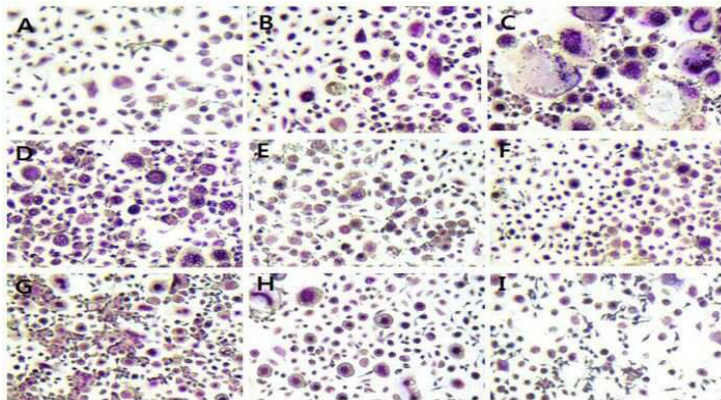
도면27

❖ CD4+/CD14+ co-culture system

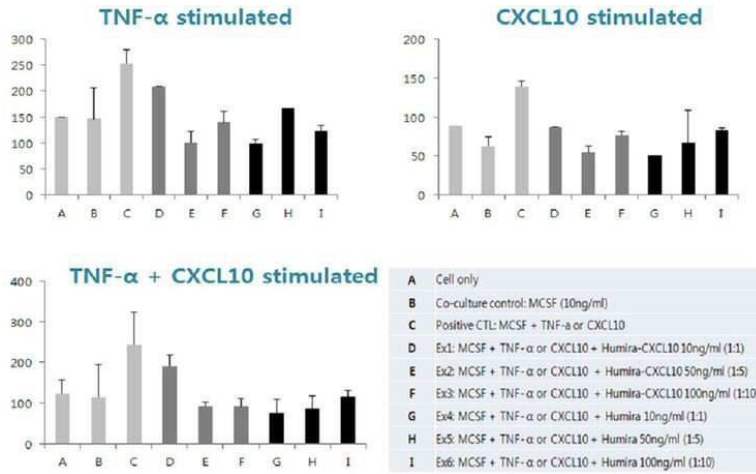


- Isolation of osteoclast precursors(CD14+) & activated CD4+T cells MACS-purified from peripheral blood.
- Identifying/counting TRAP+ multinucleated cells.

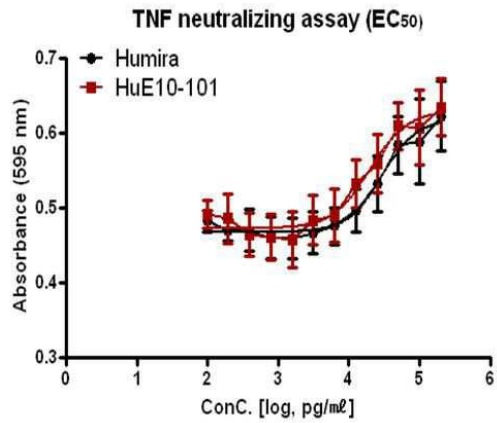
도면28



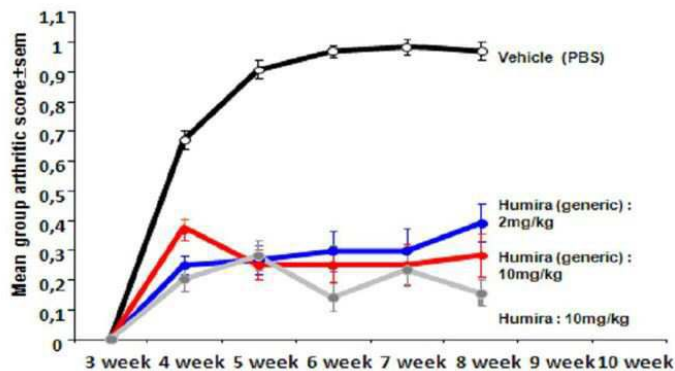
도면29



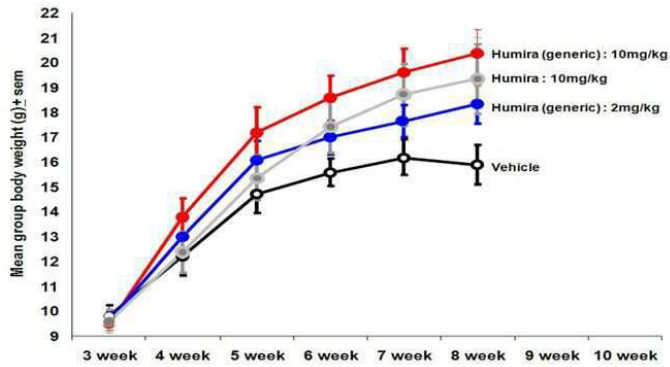
도면30



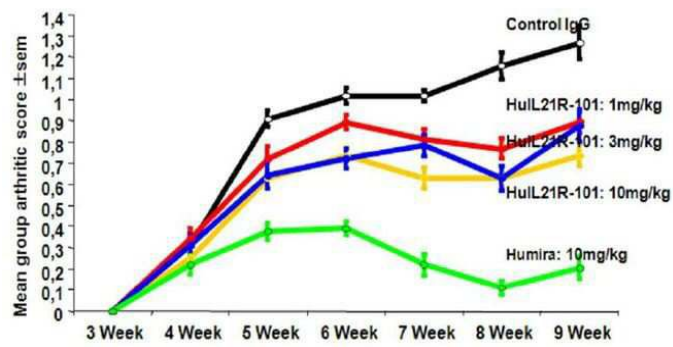
도면31



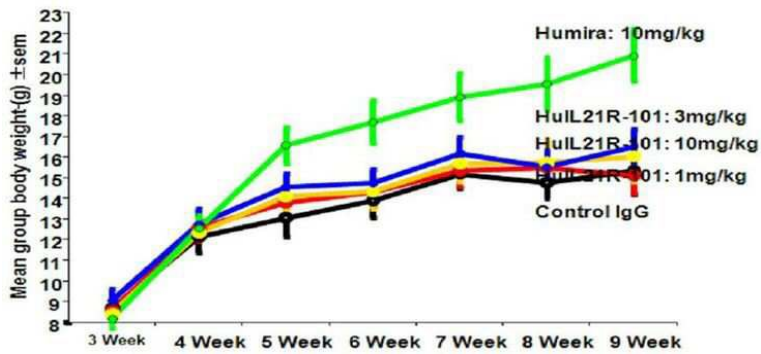
도면32



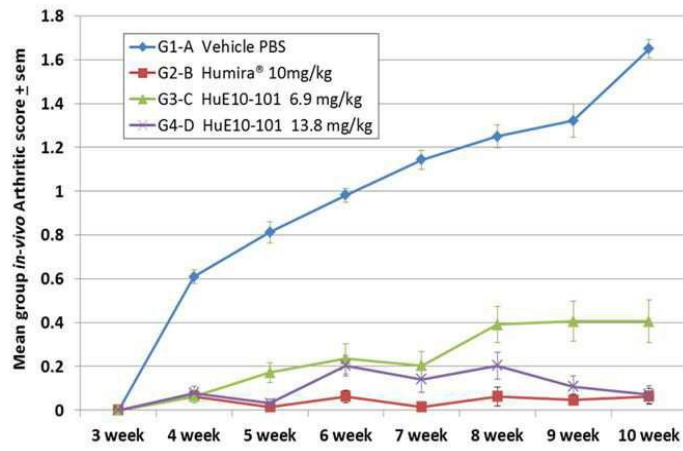
도면33



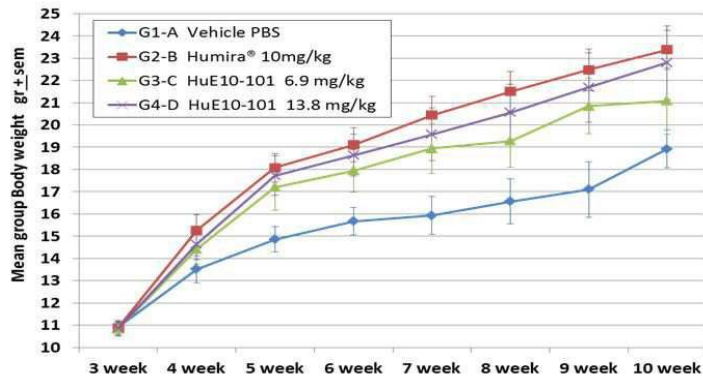
도면34



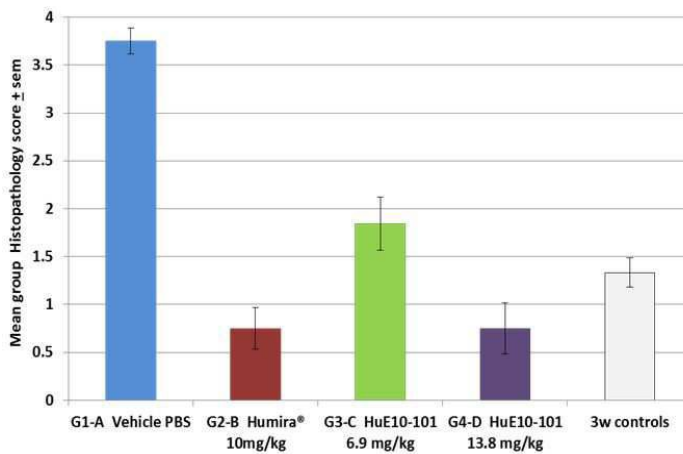
도면35



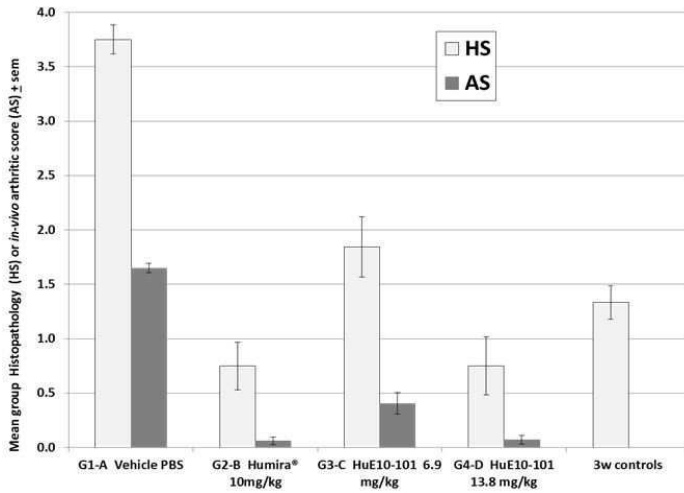
도면36



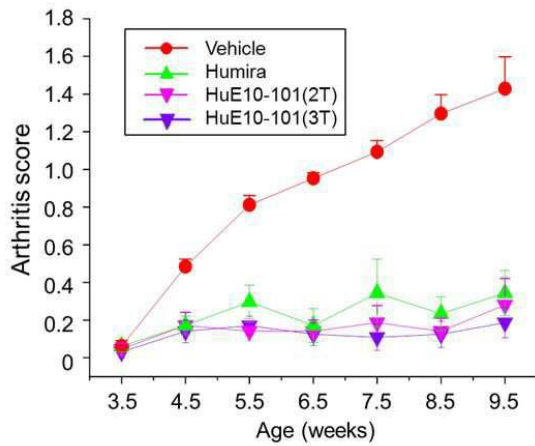
도면37



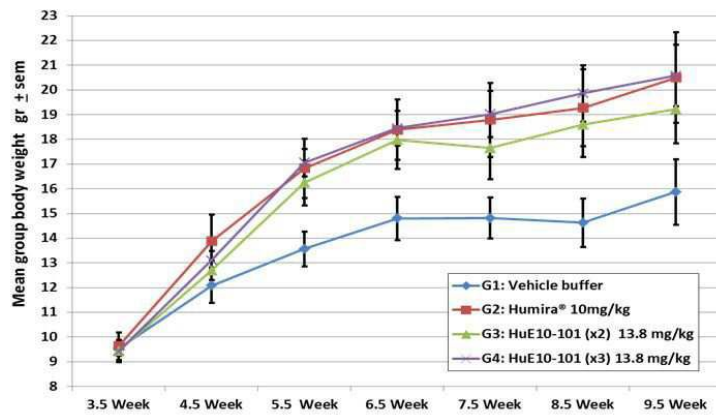
도면38



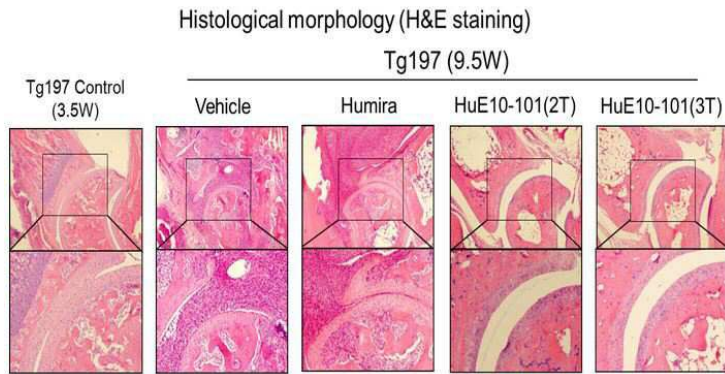
도면39



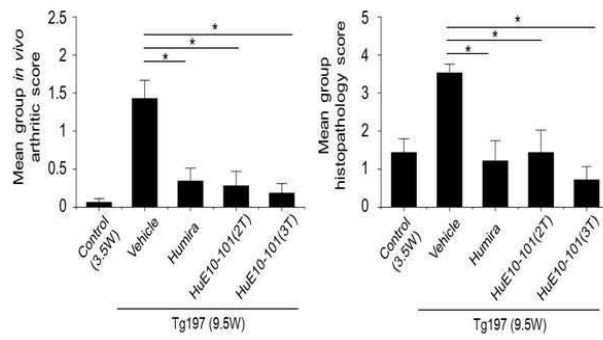
도면40



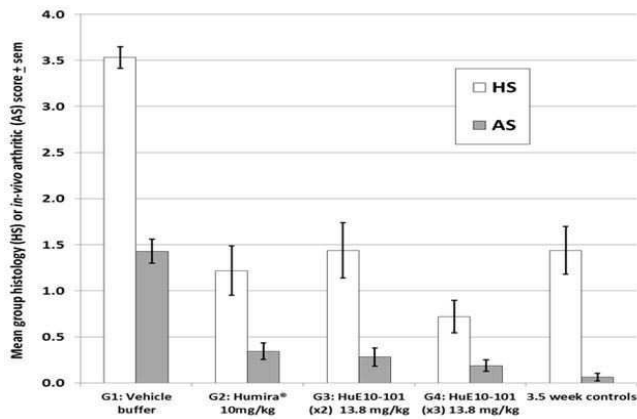
도면41



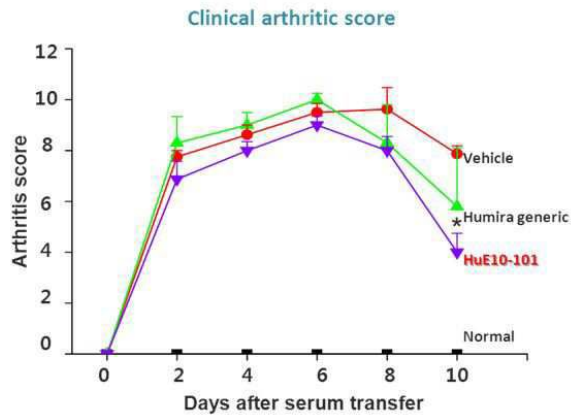
도면42



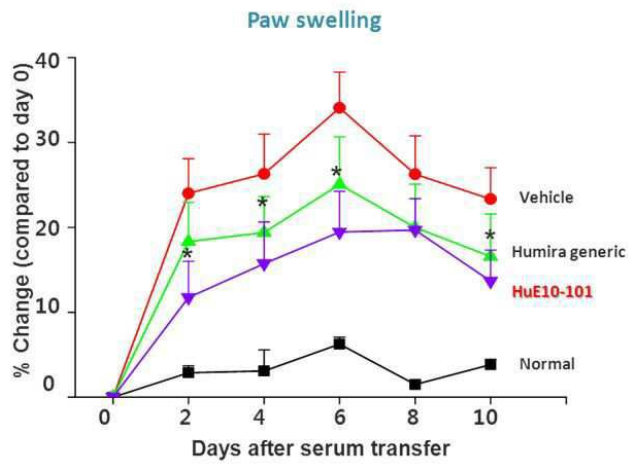
도면43



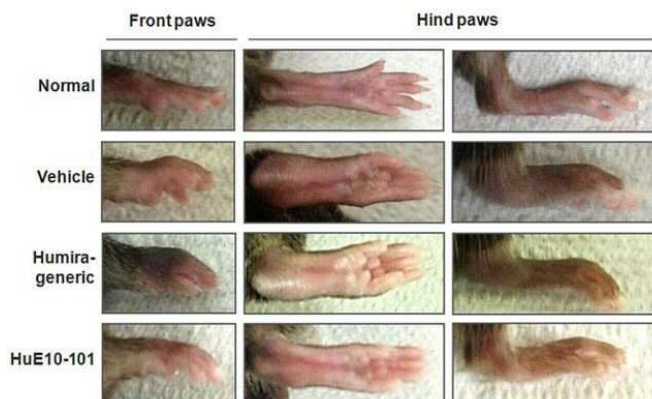
도면44



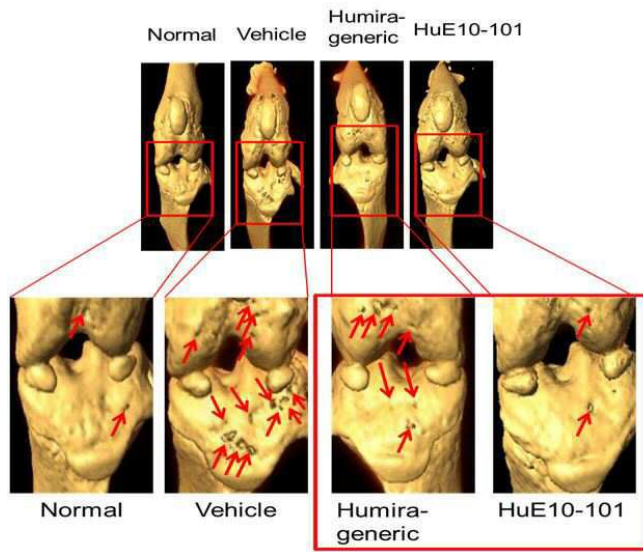
도면45



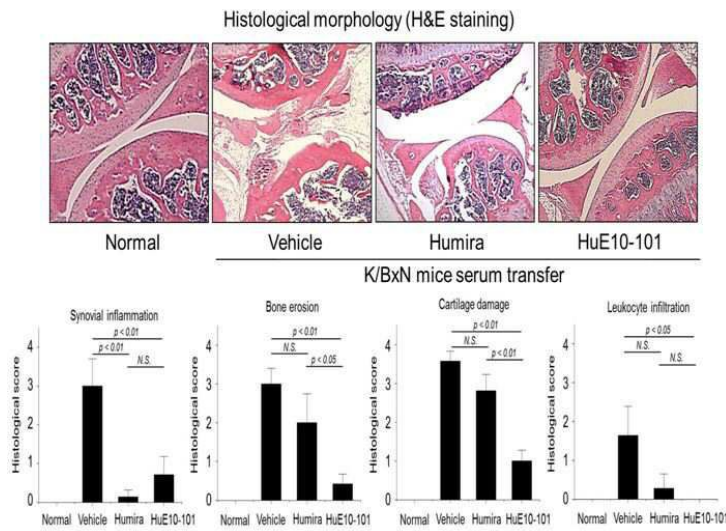
도면46



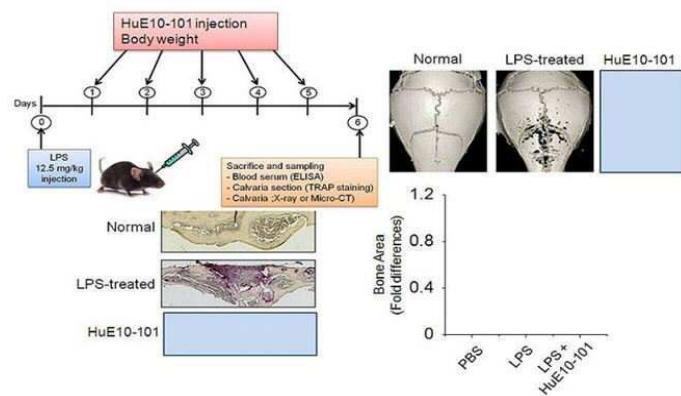
도면47



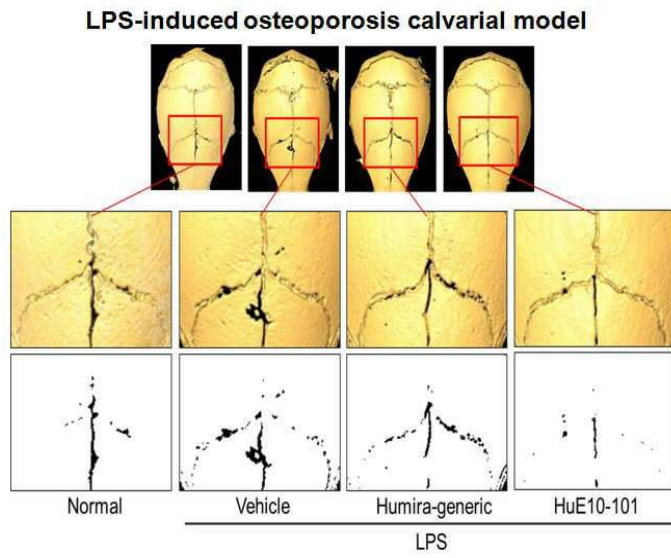
도면48



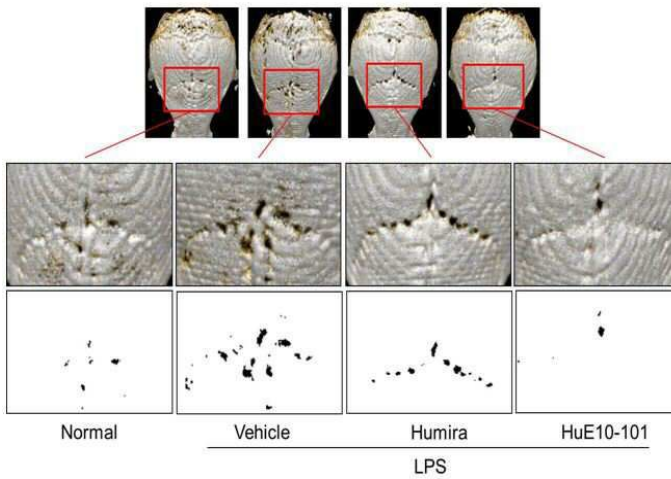
도면49



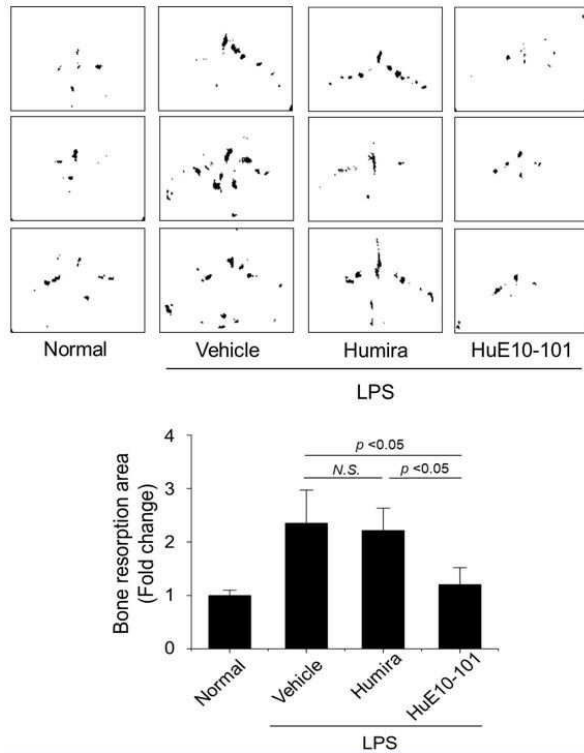
도면50



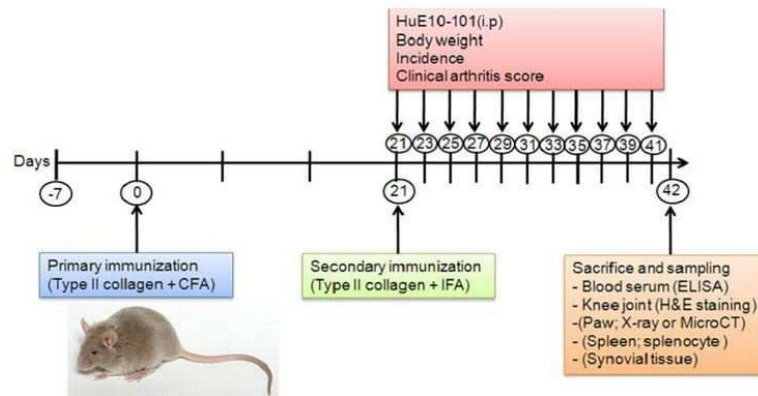
도면51



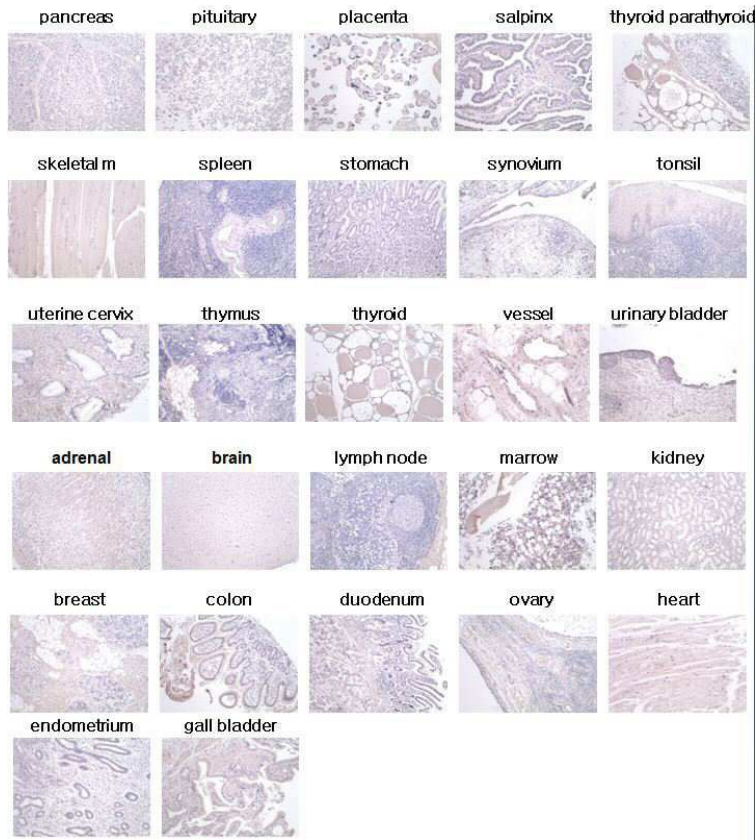
도면52



도면53



도면54



서열목록

- <110> METABOLIC ENGINEERING LABORATORIES CO., LTD.
KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY
SNU R & DB FOUNDATION
- <120> Bispecific antibody of TNF- α and CXCL10 and Uses Thereof
- <130> PN130278P
- <150> KR KR 13/0057475
- <151> 2013-05-22
- <150> KR KR 13/0057762
- <151> 2013-05-22
- <160> 60
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> TNF_VH_CDR1

<400> 1

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF_VH_CDR2

<400> 2

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF_VH_CDR3

<400> 3

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp

1 5 10

<210> 4

<211

> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF_VH_total

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210

> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF_VL_CDR1

<400> 5

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF_VL_CDR2

<400> 6

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF_VL_CDR3

<400> 7

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro

1 5
 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF_VL_total
 <400> 8

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

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

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> 10E_VH_CDR1
 <400> 9

Ser Tyr Gly Met His
 1 5
 <210> 10
 <211> 20

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10E_VH_CDR2
 <400> 10
 Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly
 20

<210> 11
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10E_VH_CDR3
 <400> 11
 Asp Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 12
 <211> 121

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10E_VH_total
 <400> 12
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10E_VL_CDR1

<400> 13

Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Phe Gly Ala Gly His Asp Val His

1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10E_VL_CDR2

<400> 14

Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10E_VL_CDR3

<400> 15

Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Leu Gly Val Val

1 5 10

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10E_VL_total

<400> 16

Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser

1 5 10 15

Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Phe Gly Ala Gly His Asp Val His Trp

20 25 30

Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn

35 40 45

Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser

50 55 60

Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu

65 70 75 80

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Leu Gly Val Val Phe

85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10D_VH_CDR1

<400> 17

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10D_VH_CDR2

<400> 18

Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp

1 5 10 15

Ser Val Lys Gly

20

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220<223> 10D_VH_CDR3

<400> 19

Asp Lys Arg Ala Ala Phe Asp Ile

1 5

<210> 20

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10D_VH_total

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Lys Arg Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Lys Met

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 21

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D_VH_CDR1
 <400> 21
 Arg Tyr Gly Met His
 1 5
 <210> 22
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D_VH_CDR2
 <400> 22
 Trp Val Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly
 20
 <210> 23
 <211> 9
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D_VH_CDR3
 <400> 23
 Asp Gly Leu Ala Ala Lys Leu Gly His
 1 5
 <210> 24
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D_VH_total
 <400> 24
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Ala Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9E_VH_CDR3
 <400> 27
 Asp Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9E_VH_total
 <400> 28
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 10D_VL_CDR1

<400> 29

Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg Thr Lys Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10D_VL_CDR2

<400> 30

Gln Asp Thr Arg Arg Pro Ser

1 5

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10D_VL_CDR3

<400> 31

Met Thr Trp Asp Val Asp Thr Thr Ser Met Ile

1 5 10

<210> 32

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10D_VL_total

<400> 32

Gln Ala Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Asn Ile Ile

1 5 10 15

Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg Thr Lys Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln

20 25 30

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr Gln Asp Thr Arg Arg

35 40 45

Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D_VL_total
 <400> 36
 Gln Ala Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Asn Ile Ile
 1 5 10 15
 Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg Thr Lys Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr Gln Asp Thr Arg Arg
 35 40 45
 Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr
 50 55 60
 Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Glu Arg Glu Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Cys Met Thr Trp Asp Val Asp Thr Thr Ser Met Ile Phe Gly Gly
 85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100

<210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9E_VL_CDR1

<400> 37
 Cys Gly Gly Gly Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9E_VL_CDR2

<400> 38
 Tyr Asp Ser Asp Arg Pro Ser

1 5
 <210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 9E_VL_CDR3
 <400> 39
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Arg Pro Val

1 5 10

<210> 40
 <211> 104
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 9E_VL_total

<400> 40

Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Arg Ile Ala

1 5 10 15

Cys Gly Gly Gly Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln

20 25 30

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Phe Tyr Asp Ser Asp Arg

35 40 45

Pro Ser Gly Ile Pro Lys Arg Leu Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr

50 55 60

Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Gly Asp Tyr

65 70 75 80

Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Arg Pro Val Phe Gly Gly

85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100

<210> 41

<

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> pelB5
 <400> 41
 ctagataacg agggcaaadc atg 23
 <210> 42
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cla3
 <400> 42
 cgtcaccaat gaaaccatc 19
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10D_VH_F
 <400> 43
 caggtgcagc tggcagtc 20

 <210> 44
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10D_VH_R
 <400> 44
 tgaggagacg gtga 14
 <210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10D_VL_F
 <400> 45
 tcctatgagc tgacacaggc 20
 <210> 46
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10D_VL_R
 <400> 46
 taggacggtc agcttgggcc c 21

<210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D_VH_F
 <400> 47
 caggtgcagc tggcgcagtc 20

<210> 48
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D_VH_R
 <400> 48
 tgaggagacg gtga 14

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D_VL_F
 <400> 49
 tcctatgagc tgacacaggc 20

<210> 50
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D_VL_R
 <400> 50
 taggacggtc agcttgggcc c 21

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10E_VH_F
 <400> 51
 caggtgcagc tggcgcagtc 20
 <210> 52
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10E_VH_R
 <400> 52
 tgaggagacg gtga 14

 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10E_VL_F
 <400> 53
 cagttcgtgc tgactcagcc 20
 <210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 10E_VL_R
 <400> 54
 taggacggtc agcttggccc c 21
 <210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9E_VH_F
 <400> 55

caggtgcagc tgggtggagtc 20

<210> 56
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9E_VH_R

<400> 56
 tgaggagacg gtga 14

<210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9E_VL_F

<400> 57
 aattttatgc tgactcagcc 20

<210> 58
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 9E_VL_R

<400> 59
 taggacggtc agcttgggcc c 21

<210> 1
 <211> 705
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HuE10-101 Heavy Chain

<400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 450 455 460
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 465 470 475 480
 Asn Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro
 485 490 495
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Ser Lys Tyr Tyr Ala
 500 505 510
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr
 515 520 525
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 530 535 540

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