

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/12
A61K 39/395
C07K 14/075

(45) 공고일자 2004년07월23일
(11) 등록번호 10-0426113
(24) 등록일자 2004년03월25일

(21) 출원번호	10-1996-0704244	(65) 공개번호	10-1997-0700765
(22) 출원일자	1996년08월03일	(43) 공개일자	1997년02월12일
번역문제출일자	1996년08월03일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1995/000237	(87) 국제공개번호	WO 1995/21251
(86) 국제출원일자	1995년02월06일	(87) 국제공개일자	1995년08월10일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 라트비아 몽고 마다가스 카르 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 미 국 우즈베키스탄 베트남 에스토니아 그루지야 AP ARIPO특허 : 말라위 수단 케냐 EA 유라시아특허 : 벨라루스 카자흐스탄 러시아 아르메니아 EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 룩셈부르크 네덜란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		

(30) 우선권주장	08/192,480 1994년02월04일 미국(US)
(73) 특허권자	아더 앨런 반덴바크 미국, 오레곤 97221, 포트랜드, 에스더블유 48 플레이스 4317 앤드류 데일 웨인버그
(72) 발명자	미국, 오레곤 97201, 포트랜드 에스더블유, 패어마운트 볼바드 3266 앤드류 데일 웨인버그
(74) 대리인	미국, 오레곤 97201, 포트랜드 에스더블유, 패어마운트 볼바드 3266 아더 앨런 반덴바크 미국, 오레곤 97221, 포트랜드, 에스더블유 48 플레이스 4317 신정건, 김성기, 나영환, 이상섭

심사관 : 임혜준

(54) 티(T)-세포항원, 및 티(T)-세포매개증상의진단및치료에있어서의이용도

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 활성화된 T-임파구, 특히 CD4⁺ 아중에 속하는 것을 특이적으로 고갈시키는 방법에 관한 것이다. 그러한 활성화된 T-임파구, 예를 들면 CD4⁺ T-임파구는 다발성경화증 및 이식 거부반응을 비롯한 다수의 인체 증상에 관련되어 있다. 구체적으로, 본 발명은 활성화된 T-임파구, 예를 들면, 특정 질병 또는 증상에 관련된 CD4⁺ T-세포를 고갈시키면서 비활성화된 T-임파구, 예를 들면, CD4⁺ T-세포 레퍼토리에는 영향을 끼치지 않는 치료 방법을 제공한다.

배경기술

- <2> CD4⁺ T-임파구(이하 CD4⁺ T-세포로 언급함)는 그것이 감염 및 잠재성 암세포와 싸우는 데 있어 다른 백혈구를 함께 제공하는 역할로 인해 면역계에서 중추적 역할을 한다. CD4⁺ T-세포는 체액성 및 세포-매개 면역에서 필수적인 역할을 하며, 추가로 상기 세포는 기생충 감염시 호산구 및 비만 세포(mast cell)의 분화를 촉진하는 작용을 한다. CD4⁺ T-세포 군집이 고갈되면(AIDS 환자의 경우처럼), 숙주는 보통은 숙주에게 위험하지 않은 다수의 병원체 및 종양에 민감하게 된다.

- <3> 따라서, CD4⁺ T-세포가 질병 예방에 중요하고 유익한 역할을 하지만, 이들 세포의 비정상적 기능은 심각한 문제를 일으킬 수 있다. 일부 개체에서, CD4⁺ T-세포의 비정상적 기능은 자가면역 및 기타 질병 상태를 야기한다(문헌 참조: Swanborg, R.H., 1984: Cush, J.J., 및 Lipsky, P.E., 1988: Caspi 등, 1988). CD4⁺ T-세포가 관련된 자가면역 질병으로는 다발성경화증, 류마티스성 관절염 및 자가면역성 포도

막역을 들 수 있다(문헌 참조: Steinman, L., 1993). 본질적으로 이들 질병은 면역계가 침입성 병원체를 공격하는 정상적인 역할로부터 벗어나 대신에 숙주의 체조직을 공격하여 병 및 심지어 사망에도 이르는 비정상적인 면역 반응을 포함한다. 목표가 되는 숙주 조직은 자가면역 질병들에 따라 다른데, 예를 들면, 다발성경화증에서는 면역계가 뇌 및 척수의 백질을 공격하며, 류마티스성 관절염에서는 면역계가 관절의 활액 내벽을 공격한다. 활성화된 $CD4^+$ T-세포는 또한 이식 조직 및 기관의 거부를 포함하는 다른 질병에 그리고 $CD4^+$ T-세포 임파종의 진행에 관련하기도 한다.

- <4> 비정상적 $CD4^+$ T-세포 활성화에 의해 야기되는 상태에 관한 연구는 몇가지 동물 모델에 그리고 구체적으로 다수의 실험적으로 유도되는 자가면역 질병에 집중되고 있다. 동물에서의 상기 실험적으로 유도되는 질병에 관한 연구는 상응하는 인체의 질병 치료에 유용한 정보를 제공할 것이란 생각을 전제로 하고 있다. 이 목표를 추구하는 과정에서, $CD4^+$ T-세포가 동물에서의 몇가지 실험적으로 유도되는 자가면역 질병, 예를 들면 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis), 콜라겐 유도 관절염(CIA: collagen induced arthritis) 및 실험적 자가면역 포도막염(EAU: experimental autoimmune uveitis)의 원인이 되는 것으로 나타났다.
- <5> EAE는 미엘린 염기성 단백질(MBP, 뇌 및 척수의 백질의 성분)에 대해 동물을 자가면역시키므로써 유도되며, 다발성경화증, 탈수질 및 마비에서 관찰되는 것과 동일한 임상적 징후를 나타낸다. 다발성경화증의 비교 모델로서 EAE 모델의 가치는 이들 증상이 공통된 인과관계를 가진다는 것을 보여주는 증거에 의해 입증되며; Steinman과 그 공동연구자들은 다발성경화증 환자의 뇌 병변에서 발견되는 주도적인 세포 형이 $CD4^+$ T-세포이고(문헌 참조: Oksenberg, J. R. 등, 1990), 이들 뇌 병변의 세포와 연합되는 T-세포 수용기(항원 인지를 담당하는 분자)가 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE)을 일으키는 $CD4^+$ T-세포상의 것과 동일한 3개의 항원 인지용 아미노산 결합 모티프(motif)를 가진다(문헌 참조: Oksenberg, J. R. 등, 1993)는 것을 알아냈다. 따라서, 모든 증거는 EAE 모델이 다발성경화증 치료시험에 유용하다는 것을 제시한다.
- <6> EAE, CIA 및 EAU와 같은 다수의 실험적으로 유도되는 자가면역 질병에 관한 연구는 생체내에 주입될 때 $CD4^+$ T-세포에 결합하는 항체가 상기 질병의 진행을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 이식 거부반응을 억제할 수 있음을 밝혀냈다(문헌 참조: Swanborg, R.H., 1983, Cobbold, S.P. 등, 1984; Steinman, L., 1993). 이러한 항체-매개 효과는 체내의 모든 $CD4^+$ T-세포를 고갈 또는 불활성화시킨다($CD4^+$ T-세포에 결합하는 항체는 아마도 세포의 활성을 차단하며, $CD4^+$ T-세포가 면역계에 의해 파괴되도록 한다). 이러한 전략이 류마티스성 관절염의 경우 약간의 성공을 거둔 것으로 나타났고, 현재 다발성경화증에 대해 시험하고 있다(문헌 참조: Steinman, L., 1993).
- <7> $CD4^+$ T-임파구 군집을 파괴하는 치료 방법이 상기 자가면역 질병의 개선에 효과적인 것으로 보이나, 이 방법에는 한가지 매우 중대한 결점이 있다. 상기 치료방법은 항원 반응성이고 따라서 자가면역 질병의 진행에 관련된 상기 $CD4^+$ T-세포의 기능을 억제할 뿐만 아니라, 무반응성이고 상기 질병에 관련되지 않은 $CD4^+$ T-세포의 기능도 억제한다. $CD4^+$ T-세포가 일반 면역 반응(감염체에 대해 신체를 보호함)에서 중요하기 때문에, 전체 $CD4^+$ T-세포 군집의 파괴는 환자를 심각한 면역타협 상태로 만들고 따라서 감염에 매우 민감하게 만든다. 바람직한 방법은 능동자가면역 반응에 관계하는 $CD4^+$ T-세포만을 제거하여 잔존 $CD4^+$ T-세포가 면역계에서 그 정상적인 역할을 할 수 있도록 하는 것이다.
- <8> 이러한 치료 방법은 아직 성공하지 못했다. 그러므로 본 발명의 목적은 무반응성 $CD4^+$ T-세포 군집에 영향을 끼치지 않으면서 환자에게서 활성화된 $CD4^+$ T-세포 군집을 특이적으로 고갈시키는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 상세한 설명

- <9> 일양태로 본 발명은 T-세포의 무반응성 군집, 특히 예를 들면, 불활성화된 $CD4^+$ T-세포를 손상되지 않게 유지하면서, 자가항원 특이적 T-세포, 특히 예를 들면, 활성화된 $CD4^+$ T-세포를 생체내에서 특이적으로 제거하는 방법을 제공한다. 그러므로 본 발명은 T-세포 매개, 특히 예를 들면, 활성화된 $CD4^+$ T-세포 매개자가면역 질병, 예를 들어 다발성경화증, 류마티스성 관절염, 이식편대숙주 질병(GVHD: graft versus host disease) 및/또는 장염 질병에 유용한 치료 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 활성화된 T-세포에 의해 야기되는 다른 바람직하지 못한 면역 반응, 특히 예를 들면, 이식체 수용자의 이식된 조직 및 기관의 거부와 같은 활성화된 $CD4^+$ T-세포에 의해 야기되는 면역 반응을 제거하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 신체로부터 활성화된 $CD4^+$ T-세포 임파종을 특이적으로 제거하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 자가면역 병변 및 잠재적으로 유해한 T-세포 임파종 부위에서 자가반응성 T-세포의 존재를 검출함으로써 활성화된 T-세포, 특히 예를 들면, 활성화된 $CD4^+$ T-세포에 의해 매개되는 상태의 초기 진단 방법을 제공한다. 이 초기 진단 방법은 본 발명에 의해 제공되는 치료 방법이 효과적이며 달리 가능한 것보다 증상의 보다 빠른 치료를 용이하게 함을 제시한다.
- <10> 본 발명은 또한 OX-40(이하 OX-40 항원으로 언급함)으로 명명된 특정 단백질 항원이 항원 활성화된 T-세포, 특히 예를 들면, 활성화된 $CD4^+$ T-세포의 표면에 특이적으로 발현된다는 발견에 기초한 것이다. 구체적으로, 래트에서의 EAE 질병 모델을 사용하여, 이 항원은 염증 부위(이 질병 모델에서는 척수)에는 존재하나 비염증 부위의 $CD4^+$ T-세포상에는 부재하는 활성화된 자가항원 특이적 $CD4^+$ T-세포의 표면에 발현되는 것으로 나타났다. 또한, 자가면역의 임상적 징후의 개시전날에 상기 $CD4^+$ T-세포에서 상기 항

원이 최고로 발현되고; 질병이 진행됨에 따라 상기 항원의 발현이 감소하는 것으로 확인되었다. 본 발명에서 최초로 나타난, OX-40 항원의 발현 특이성 및 이 발현의 일시적 성질로 인해 T-세포 매개된 상태에 있는 인체와 같이 동물에서의 활성화된 T-세포의 항체 매개된 고갈에 대한 유력한 표적으로서 상기 항원을 시험할 수 있게 되었다.

- <11> 본 발명자들은 OX-40 항원을 암호화하는 cDNA를 클로닝하고 서열분석하였다. 따라서, 본 발명은 항원성 폴리펩티드를 암호화하는 서열번호 1 또는 서열번호 1의 세부서열에 도시한 서열을 가진 핵산; 이것의 변형체 또는 대립인자; 또는 이들중 어느 것에 상보적인 가닥을 제공한다. 서열번호 1의 특정 세부서열은 서열번호 1에 도시한 뉴클레오티드 염기 15 내지 848 또는 그 상보 가닥을 포함한다.
- <12> 본 발명에 따라 추가로 전술한 핵산이 암호화하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 그 유도체가 제공된다. 적합하게는 이 폴리펩티드가 항원성 결정인자를 포함하는 서열번호 1에 도시한 서열의 세부서열이 암호화하는 아미노산 서열을 포함한다.
- <13> 본 발명에 의해 의도되는 핵산 서열 및 폴리펩티드의 변형체 중에는 (예컨대) 암호화된 아미노산 서열에 변화를 부여하지 않는 DNA 서열 변형체가 있다. 추가의 예로 당해 분야에 널리 공지된 바와 같이, "보존적" 아미노산 변화, 예를 들면, 하나의 산성 아미노산에서 다른 하나의 산성 아미노산으로, 하나의 방향족 아미노산에서 다른 하나의 방향족 아미노산으로, 하나의 지방족 소수성 측쇄에서 다른 하나의 지방족 소수성 측쇄로의 변화를 부여하는 서열 변형체가 있다. 암호화된 폴리펩티드에서의 대립인자 변형체에 상응하는 변형체가 있으며, 항원 교차반응성 및/또는 유사한 결합 특이성을 가진 폴리펩티드를 산출하는 변형체도 있다.
- <14> 본원에서 언급되는 폴리펩티드 및 변형체의 항원성은 서열번호 1이 암호화하는 OX-40 항원과 공유되거나 교차 반응성이 있는 항원성 결정인자, 예를 들면, OX-40이 세포 표면에 존재하는 경우 특이 결합체에 접근가능한 OX-40의 결정인자를 공유하는 결정인자를 지닌 항원성 폴리펩티드를 포함한다.
- <15> 특정 세포형 상에서 표적 항원을 단순히 발견한다고 해서 특정 세포형의 고갈을 필요로 하는 치료 방법의 근거가 제시되는 것은 아니다. 따라서, 다수의 항원은 세포 표면에서 탈락되며, 치료용 표적으로 적합하지 못하다. 본 발명의 또다른 양태는 OX-40 단백질에 대해 형성되고 세포독소에 접합된 항체와 같은 특이 결합체가 항원 활성화된 CD4⁺ T-세포의 시험관내 증식을 억제할 수 있다는 발견에 근거한다. 이 발견은 OX-40 항원이 CD4⁺ T-세포에 의해 신속히 흡수(internalized)된다는 것을 의미한다. 이 발견에 근거한 추가의 연구는 본 발명의 중요한 초점; 즉 OX-40 항원에 대해 형성된 항체와 같은 특이 결합체를 세포독소와 접합시켜 면역독소를 생성시키고 이 면역독소를 숙주에 투여함으로써, 항원 활성화된 CD4⁺ T-세포 군집을 생체내에서 고갈시킬 수 있다는 증명을 유도하였다. 이러한 방식으로, 상기 항체는 활성화된 CD4⁺ T-세포의 표면상의 OX-40 항원에 결합한다. 면역독소가 흡수되면 세포독소가 세포내로 유입되어 세포 사멸을 초래한다. 그러므로, 이 면역독소를 활성화된 T-세포(예, CD4⁺ T-세포) 매개 염증을 앓고 있는 숙주에 투여함으로써, 염증 부위 또는 기타 부위에서 활성화된 T-세포, 특히 예를 들면, CD4⁺ T-세포를 고갈시켜(아니면 불활성화시켜) 후속 염증 및/또는 질병의 기타 임상적 징후를 개선시킨다.
- <16> 그러므로 본 발명의 또 하나의 양태는 활성화된 T-세포(예; CD4⁺ T-세포)에 의해 매개되는 증상을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 이 방법은 전술한 바와 같이 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 특이 결합제, 예를 들면, 세포독성제와 접합된 항체의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 이 때 항체는 T-세포, 특히 예를 들면, 활성화된 CD4⁺ T-세포의 표면에 존재하는 OX-40 항원을 인지하여 결합한다.
- <17> 본 발명의 방법의 구체적인 예로는 인체 숙주에서 OX-40 항원을 발현시키는 T-세포 군집(예; CD4⁺ T-세포 군집)을 감소시키는 방법, 및 다발성경화증을 앓고 있는 환자에서 재발성 자가면역 염증을 억제하는 방법이 있으며, 이들 방법은 본 발명의 특이 결합제의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- <18> 구체적으로, 상기 방법들에 사용되는 특이 결합제는 세포독성제와 접합된 항체(면역독소)로서 이 항체는 T-세포, 특히 예를 들면, 활성화된 CD4⁺ T-세포의 표면에 존재하는 OX-40 항원을 인지하여 결합한다. 한편 이 방법은 T-세포 표면에서 발현될 때 OX-40 항원을 인지할 수 있는 단일클론 항체의 Fab, F(ab')₂, 또는 Fv 단편을 포함하는 특이 결합제를 이용할 수 있다. 상기 방법에 유용한 기타 특이 결합제는 표면에 OX-40을 보유하는 세포에 세포독성 효과를 나타낼 수 있는 면역 글로불린, 또는 쥐형 IgG2a 또는 인체형 IgG1 또는 IgG3의 면역글로불린의 Fc 영역의 구조 특징을 가지거나 관련된 특이 결합제와 같은, 항체-의존성 세포독성을 고정하거나 상보하거나 매개할 수 있는 임의의 특이 결합제이다.
- <19> 본 발명의 방법은 활성화된 CD4⁺ T-세포와 같은 활성화된 T-세포에 의해 매개되는 임의의 증상에 적용할 수 있는 데, 상기 증상의 예로는 다발성경화증, 유육종증, 류마티스성 관절염, 자가면역성 포도막염, T-세포 임파종 및 이식된 기관 또는 조직의 거부반응을 들 수 있다. 이 방법을 적용할 수 있는 추가의 증상으로는 이식편 대 숙주 질병 또는 반응 및 장염 질환이 있다.
- <20> T-세포는 예를 들면, 항원, 초항원, 유사분열유발인자(mitogen) 또는 단일 클론 항체에 의해 활성화될 수 있다.
- <21> 상기에 제시한 치료 방법은 본 발명의 폴리펩티드를 사용하여 형성시킬 수 있는 특이 결합제, 예컨대 단일클론 항체 또는 그 단편을 사용하여 실시하는 것이 바람직하다. 보다 바람직한 양태에서, 단일클론 항체는 인체화된 단일클론 항체이다. 또다른 양태에서, 상기 방법은 세포독성 접합제를 이용하는데, 이 접합제는 예를 들면, 세포독성제와 접합된 단일클론 항체의 Fab, F(ab')₂ 또는 Fv 단편과 같은 단편을 포함하며, 이 때, 단일클론 항체의 단편은 OX-40 항원을 인지한다.

- <22> 본 발명은 또한 활성화된 CD4⁺ T-세포와 같이 거의 항원에 의해서만 활성화되는 T-세포에 대한 세포내 결합 특이성을 가진 단일클론 항체와 같은 특이 결합제를 포함한다. 바람직한 양태에서, 특이 결합제는 본 발명의 폴리펩티드에 특이적으로 결합한다. 상기 OX-40이 활성화된 세포 표면에 존재하는 경우, 특정 특이 결합제는 서열번호 1의 핵산 서열의 암호 영역에 의해 암호화된 아미노산 서열의 인체 OX-40 에 특이적으로 결합한다.
- <23> 상기 특이 결합제는 항체 결합 도메인을 포함하는 것이 적합하며, 단일클론항체 또는 그 결합 단편이 바람직하다. 전술한 바와 같이, 항체들은 적어도 부분적으로 인체화된 것이 바람직하고, 인체화된 단일클론 항체가 가장 바람직하다.
- <24> "특이 결합(specific binding)"이란 항체와 상응하는 항원 또는 햅텐(hapten)(그 "결합 파트너")사이 및 기타 특정화된 결합 분자와 그 결합 파트너 사이의 결합과 같이 특이적 비공유 분자결합을 의미한다.
- <25> "적어도 부분적으로 인체화된"이란 말은 항체와 그 결합 도메인에 관한 것으로서, 불변부(CH 및 CL)만이 인체 폴리펩티드에 상응할 수도 있으며; 한편, 불변부 및 가변부가 둘다 "인체화된(humanised)" 것일 수도 있음을 의미한다.
- <26> 본 발명의 또다른 양태는 분자적으로 결합된, 예를 들면, 공유적으로 접합된 세포독소를 추가로 포함하는 전술한 단일클론 항체와 같은 특이 결합제를 제공한다. 항체-세포독소 접합체(면역독소로도 알려짐)가 전술한 치료 방법에 사용하기에 적합하다. 그러한 특이 결합제의 예로는 세포독성제와 접합된 단일클론 항체의 Fab, F(ab')₂ 또는 Fv 단편을 들 수 있다.
- <27> 치료용으로, 본 발명의 특이 결합제는 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물 형태로 투여하는 것이 적합하다. 담체는 고체일 수 있으며, 이 분야에서는 통상적인 물 또는 염수와 같은 액체 담체가 바람직하다.
- <28> 본 발명의 또 하나의 양태는 환자에서 활성화된 T-세포(예; CD4⁺ T-세포)에 의해 매개되는 증상을 검출하는 방법을 제공하는 데, 이 방법은 전술한 특이 결합제를 상기 T-세포와 접촉시키는 단계와 활성화된 T-세포 레벨을 정량분석하는 단계를 포함한다. 적합하게는 이 방법은 환자의 생검 샘플, 예를 들면, 이식편대숙주 질병이 있는 것으로 의심되는 환자의 피부 또는 장 생검 샘플 또는 혈액 샘플, 장염 질환이 있는 것으로 의심되는 환자의 장 생검 샘플, 또는 대뇌척수액 샘플상에서 수행한다.
- <29> 본 발명의 또하나의 양태는 환자에서 활성화된 T-세포, 특히 예를 들면, 활성화된 CD4⁺ T-세포에 의해 매개되는 염증 증상을 검출하는 방법인 데, 이 방법은 환자로부터 적합한 생검 샘플을 수득하는 단계, 및 OX-40 항원에 특이적으로 결합하는 항체와 같은 특이 결합제를 사용하여 생검 샘플내 활성화된 T-세포, 특히 예를 들면, 활성화된 CD4⁺ T-세포의 비율을 정량분석하는 단계를 포함한다. 본 발명의 기타 양태로는 활성화된 T-세포, 특히 예를 들면, 활성화된 CD4⁺ T-세포에 의해 매개되는 상태를 검출하기 위한 시험 키트, 적합한 부형제 및 용기와 함께 약학적으로 투여가능한 형태 및 양으로 항체를 포함하는 치료용 키트를 포함한다.
- <30> 구체적으로 본 발명은 환자에서 활성화된 T-세포, 특히 예를 들면, 활성화된 CD4⁺ T-세포에 의해 매개되는 증상을 검출하기 위한 표지된 전술한 특이 결합제를 포함하는 키트를 제공한다. 바람직하게는 본 발명은 전술한 폴리펩티드 또는 특이 결합제를 포함하는 피분석물의 검출 또는 정량분석용 특이 결합 분석을 수행하는 키트를 제공하는 데, 이 키트는 피분석물을 인지할 수 있는 특이 결합제를 포함하는 제1 시약, 피분석물에 또는 제1 시약에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 포함하는 제2 시약, 및 제2 시약에 대한 표지를 포함한다.
- <31> 상기 키트에서 제1 시약은 피분석물에 특이적인 항체를 포함하며, 제2 시약은 제1 시약에 특이적인 표지된 항글로불린을 포함한다.
- <32> 한편, 제1 시약은 피분석물에 대해 고정화된 특이 결합 시약을 포함할 수 있으며, 제2 시약은 피분석물이 제1 시약에도 결합하는 경우에 피분석물에 결합할 수 있는 특이 결합제이다.
- <33> 또 다른 양태에서 제2 시약은 제1 시약에 결합하는 피분석물과 경쟁할 수 있는 물질을 포함한다.
- <34> 상기 방법에 사용하기 위해, 특이 결합제는 추가로 방사성 표지 또는 형광성 표지와 같은 표지를 포함하며, 이들 특이 결합제는 본 발명의 또 다른 양태를 이룬다.
- <35> 본 발명의 특이 결합제는 통상의 방법으로 클로닝하고 서열분석할 수 있다. 따라서, 본 발명은 전술한 특이 결합제의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 제공한다.
- <36> 재조합 기술을 사용하여 본 발명의 폴리펩티드 및 특이 결합제를 둘다 제조할 수 있다. 따라서, 적합한 발현 벡터, 형질전환된 숙주 유기체, 및 숙주 유기체를 배양하는 것을 포함하는 제조 방법이 본 발명의 추가의 양태를 이룬다.
- <37> OX40 결합제, 예를 들면, 항-OX40 단일클론 항체를 활성화된 T-세포에 의해 매개되는 질병, 예를 들면, 이식편대숙주 질병을 앓고 있는 환자에게 투여할 수 있다. 투여되는 양은 환자의 징후에서 부분적 또는 전체적인 개선을 나타내는 데 필요한 양에 따라 좌우될 것이다. 이것은 증상의 경중 및 투여 경로 뿐만 아니라, 기타 치료제(예: 글루코코르티코이드, 시클로스포린 A, 프레드니솔론)의 투여에 따라 좌우될 것이다. OX40 결합제는 전신으로(예; 정맥내로) 또는 국부적으로(예; 근육내로) 주사할 수 있다. 논급하는 바와 같이, OX40 결합제는 최대 치료 효과를 위해 독성 물질에 결합시킬 수 있다.
- <38> **OX-40 및 이식편대숙주 질병(GVHD)**
- <39> GVHD의 경우, 공여체 조직 또는 세포에서 유래한 면역적격성 T 세포는 그 정상 기능을 수행하는 능력에 있어 심각할만큼 타협된, 피부, 장 및 간을 포함한 수용체 조직을 공격한다. 그러한 공격은 제어

되지 않으면 환자의 사망을 초래할 수도 있다. 본 발명의 치료제를 사용하여 공여체 T 세포의 활성화를 차단하거나 또는 공여체 T 세포를 제거함으로써 질병의 진행을 예방하거나 또는 질병 진행을 정지시킬 수 있다.

<40> OX-40 및 GVHD: 진단학

<41> 본 발명은 진단 시험 및 시험관내 절차에 사용할 수 있다. 예를 들면, OX40 결합제를 사용하여 환자의 생검 샘플내 OX40 + T 세포의 존재를 측정할 수 있다. 생검 샘플은 조직 샘플 또는 혈액 샘플일 수 있다. 단핵 세포는 표준 기술(참조 문헌: Practical Immunology, L. Hudson 및 F.C. Hay 편집, 옥스포드 블랙웰 사이언티픽 퍼블리케이션즈)에 따라 혈액 또는 조직으로부터 분리하며, 항-OX40 항체 또는 OX40 결합제 용합 단백질로 염색한다. OX40 결합제의 존재는 플루오로세인 이소티오시아네이트 또는 피코에리트린과 같은 형광색소와 결합된 항-글로불린 시약으로 검출하며, 양성 세포수는 유동 세포계수기로 또는 형광 현미경으로 분석한다(참조 문헌: Practical Flow Cytometry, Shapiro, H.M.편집, Alan R Liss, 뉴욕, Practical Immunology, L. Hudson 및 F.C. Hay 편집, 옥스포드 블랙웰 사이언티픽 퍼블리케이션즈). 한편, 조직 샘플은 표준 기술(참조 문헌: Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology, J. Polak 및 S. van Noorden 편집, 브리스톨 존 라이트 앤드 선즈)에 의해 면역조직화학적 염색을 위해 처리한다. 세포의 OX40+ 군집은 추가로 2색 또는 3색 유동 세포계수법 또는 면역조직화학으로 특성규명한다(참조 문헌: Practical Flow Cytometry, Shapiro, H.M.편집, Alan R. Liss, 뉴욕, Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology, J. Polak 및 S. van Noorden 편집, 브리스톨 존 라이트 앤드 선즈). OX40 + 세포는 활성화된 T 세포에 의해 야기되는 질병(예: 장염, 질병 및 GVHD)의 진단 및 취급에 유용하며, 질병의 경과를 추적하는 데 사용할 수 있는데; OX40 + 세포 비율의 증가는 질병의 악화를 암시하며, 투여되고 있는 치료제의 용량을 증가시킬 필요가 있음을 나타내는 것인 반면에 OX40 + 세포 비율의 감소는 개선을 암시하며, 따라서 투여되고 있는 치료제의 양을 감소시킬 필요가 있음을 나타낸다.

<42> GVHD의 위험이 있는 환자(예, 동종이계골수 이식 후)의 혈액내 OX40+ 세포의 레벨을 측정함으로써 GVHD의 발병 순간을 예측할 수 있다. GVHD를 제어하기 위한 면역억제제의 초기 투여는 치료의 성공 가능성을 향상시킬 것이다.

<43> 본 발명은 진단 시험 및 생체내 절차에 사용할 수 있다. 예를 들면, 방사성 동위원소에 결합된 OX40 결합제의 투여는 면역성광조영술의 목적으로 사용할 수 있다.

<44> 본 발명의 상기 및 기타 양태는 첨부 도면 및 하기의 설명으로부터 보다 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

<45> 도 1은 RT7.2 및 MRC OX-40 항원의 조직 특이적 2중 발현을 나타내는 형광 활성화된 세포 분류(FACS) 장치로부터 얻은 점 플롯을 도시한 것이다. EAE의 발병중에 도면에 표시된 다양한 조직 구획들로부터 임파구를 분리하였다. 세포들을 x-축상에 나타낸 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)에 접합된 OX-40 항체로 염색하고, y-축상에 나타낸 RT7.2 항체에 접합된 R-피코에리트린(PE)으로 대비염색시켰다. 아이소타이프와 짝을 이룬 대조용 항체를 사용하여 FITC 및 PE 접합된 Ab에 대해 사분면을 그렸다. OX-40 항체는 척수로부터 분리된 공여체 T-세포에 대해서는 50%가 양성이었으며, CSF, 비장 및 혈액으로부터 분리된 공여체 세포에 대해서는 각각 8, 2 및 1.8%가 양성이었다.

<46> 도 2는 EAE가 있는 래트의 척수로부터 분리된 공여체 T-세포상에서의 OX-40 발현의 시간 경과를 나타내는 FACS 장치로부터 얻은 점 플롯을 도시한 것이다. 질병의 시간 경과중에 래트의 척수로부터 임파구를 분리하였다. 세포들을 OX-40 항체(FITC)로 염색하고, PE 접합된 RT7.2 항체로 대비염색시켰다. 아이소타이프와 짝을 이룬 대조용 항체를 사용하여 FITC 및 PE 접합된 Ab에 대해 사분면을 그렸다. 각 점 플롯에 대해 EAE의 시간 경과일수를 그래프의 위쪽에 나타내고 질병 등급(임상적 징후의 경중 및 질병 등급은 "EAE의 면역전달(adoptive transfer)" 항목의 방법에 제시되어 있음)은 질병일수 다음에 괄호안에 나타냈다. RT7.2+세포의 비율은 질병 발병후 0, 1, 2, 3 및 5일째에 각각 77, 75, 81, 37 및 52%였다. OX-40+ 항체는 공여체 T-세포에 대해 발병전날에 54%가 양성이었으며, 1, 2, 3 및 5일째에 각각 41, 30, 18 및 12%가 양성이었다. 5일째에 "+"의 EAE 등급은 동물이 마비의 최소 임상 징후(1 미만)를 가지지만 완전히 회복된 것은 아님을 의미한다.

<47> 도 3은 EAE가 있는 루이스 래트의 척수로부터 분리된 OX-40 양성 및 음성 분류된 군집에서의 TCR V β 발현을 도시한 것이다. 루이스 래트는 CFNA 미엘린 염기성 단백질로 능동 면역화시켰다. 척수 임파구를 발병시 분리하였다. 그 세포들을 OX-40 분리후 즉시 용해시키고, RNA를 분리하고, V β T 세포 수용기 유전자 사용량에 대해 분석하였다. 아래의 두 패널에서는 세포들을 FACStar(캘리포니아 산호세 소재의 벡턴-딕킨슨사)로 분류하였고, 위의 패널은 분류하지 않은 군집을 비교한다. 분류하지 않은 세포 군집을 V β 8.2-FITC 항체로 염색하고, 패널 A내 PCR 데이터로 관찰한 것과 유사한 양성 비율을 나타냈다.

<48> 도 4는 척수 및 임파결절로부터 분리된 OX-40 양성 세포에 대한 항원 반응을 도시한 것이다. 루이스 래트들은 CFNA내 MBP로 능동 면역화하고, 척수 임파구 및 임파결절 세포를 EAE 발병시에 분리하였다. 그 세포들을 OX-40⁺ 및 OX-40⁻ 분획으로 분류하고 IL-2에서 5일 동안 배양하고, 상응하는 항원으로 자극하였다. 비분류된 척수 군집은 IL-2에서 5일 동안 배양하고 직접 분석하였다. 세포들을 조사된 흥선세포(APC) 및 항원과 항원처리하고, ³[H]-티미딘을 48 시간후에 첨가하였다. 표지를 첨가한 후 18 시간 후에 3중 웰을 유리섬유 필터상에 수집했다. 모든 세포형(비분류된 군집 제외)을 대조군으로서 Con A로 자극하고, 각 군에 대해 약 100,000 CPM을 나타냈다(데이터는 나타내지 않았음).

<49> 도 5는 OX-40-dgA 접합체에 의한 항원 특이적 CD4⁺ T-세포 증식의 용량 의존성 억제를 나타내는 그래프이다. 다양한 농도의 OX-40 면역독소를 F1 T-세포, 항원 제공 세포(APC) 및 MBP(미엘린 염기성 단백질)의 일정량에 첨가하였다. 빈 막대(그래프 오른쪽)는 면역독소를 첨가하지 않은 항원을 가진 T-세포와 그 항원을 가지지 않은 T-세포(각각 양성 및 음성)의 증식(³[H]-티미딘 혼입량으로 표시함)을

나타낸다. 분석은 200 μ l의 부피로 수행하였다.

<50> 도 6A 및 도 6B는 OX-40-외독소 접합체에 의해 항원 특이적 CD4⁺ T-세포 증식의 용량에 따른 억제제를 나타내는 두 그래프이다. 다양한 농도의 OX-40-외독소를 F1 T-세포(도 4A) 또는 루이스 T-세포(도 4B), APC, 및 MBP의 일정량에 첨가하였다. 빈 막대(그래프 오른쪽)는 항원을 가진 T-세포와 항원을 가지지 않은 T-세포(각각 양성 및 음성)의 증식(³H]-티미딘 혼입량으로 표시함)을 나타낸다. 분석은 200 μ l의 부피로 수행하였다.

<51> 도 7은 OX-40-dgA 접합체에 의한 PPD 항원 특이적 CD4⁺ T-세포 증식의 용량에 따른 억제제를 나타내는 그래프이다. 다양한 농도의 OX-40 면역독소를 F1 T-세포, 항원 제공 세포(APC) 및 PPD(항원)의 일정량에 첨가하였다. 빈 막대(그래프 오른쪽)는 항원을 가진 T-세포와 그 항원을 가지지 않은 T-세포(각각 양성 및 음성)의 증식(³H]-티미딘 혼입량으로 표시함)을 나타낸다. 분석은 200 μ l의 부피로 수행하였다.

<52> 도 8A 및 도 8B는 400 μ g 용량의 OX-40-dgA로 처리한 래트(도 6A) 또는 비처리 래트(도 6B)의 척수로부터 분리된 임파구의 특성을 나타내는 FACS 장치에서 얻은 두개의 점 플롯이다. F1 MBP 특이적 CD4⁺ T-세포를 조사된 루이스 수용체로 전이시키고, OX-40-dgA를 전이시킨 날에 제공했다. 전이 군집은 PE(y-축상에 나타냄)에 접합된 RT7.2 항체로 검출하고, 대조용 항체 항-래트 IgM-FITC로 대비염색시켰다.

<53> 도 9는 질병 발병 첫날에 투여되는 OX-40 면역독소 처리를 도시한 것이다. F1 MBP 특이 T 세포를 8 마리의 조사된 래트에게 전이시켰다. 질병 발병 첫날에 4 마리의 래트를 400 μ g의 OX-40 면역독소로 처리하고, 비처리된 "대조군" 래트와 비교하였다. 처리후, 두 군은 EAE의 임상적 징후가 사라졌을 때까지 매일 등급을 기록하였다. 그래프상의 각 점들은 처리군 및 대조군에 대한 4 마리의 평균 임상 등급을 나타낸다. 임상 등급은 전술한 도면들에서 기술한 것과 동일한 규모로 처리하였다.

<54> 도 10은 OX-40 면역독소로 처리한 동물의 척수로부터 분리된 공여체 양성(MBP 특이적) T 세포에 대한 효과를 도시한 것이다. 조사된 루이스 래트를 F1(루이스 x 버팔로) MBP 특이 T 세포로 주사하였다(1×10^7 세포/동물). 패널 A, C 및 E에서는 동물들을 "대조군"으로 사용하고, 뇌염 발생성 세포만을 수용하였다. 패널 B, D 및 F에서, 동물들은 뇌염 발생성 세포와 OX-40 면역독소 단일 용량(400 μ g/동물)을 복강 내로 수용하였다. 패널 B는 세포 전이일에 제공된 처리의 효과를 도시한 반면, 패널 D 및 F는 질병 발병 전일(세포 전이후 4일째)에 제공된 처리의 효과를 도시한 것이다. 모든 동물들은 패널 D 및 F에서 처리후 24 시간째인 질병 발병 첫날에 희생시켰다. 그후 척수 임파구를 RT7.2-PE로 염색하고, 양성 세포의 비율을 위쪽 오른쪽 모서리에 나타냈다. RT7.2⁺ 척수 임파구의 총수 역시 나타냈는데, RT7.2⁺ 세포의 비율을 척수 제제에서 분리된 임파구의 총수와 곱하여 계산했다. EAE 임상 등급은 위쪽 좌측 모서리에 나타내고, 동물들을 다음 기준에 따라 등급을 매겼다: 0, 징후 없음; 1, 꼬리의 약화; 2, 뒷다리 약화, 운동실조; 3, 뒤쪽 1/4 마비; 4, 앞발 및 뒷발 마비, 빈사 상태. 이 기준에서 절반의 값(0.5)은 동물들이 그 기준수치의 경중 사이에 있음을 의미한다.

<55> 도 11은 인체 OX-40 cDNA의 암호 영역 및 인체 OX-40 항원의 이론적인 아미노산 서열을 도시한 것이다. 이들 서열은 첨부하는 서열표에 나타난 서열번호 1에 포함된다.

<56> 발명의 상세한 설명

<57> 본 발명은 최초로, 항원에 의해 활성화된 T-세포, 특히 활성화된 CD4⁺ T-세포들에 의해 유발되는 바람직하지 않은 면역 반응을 제거하는 방법을 제공한다. 이론적으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 본 발명자들은 본원에서 OX-40 항원이라고 지칭되는 세포 표면 항원이 염증 부위에서 발견되는 활성화된 CD4⁺ T-세포와 같은 활성화된 T-세포에 의해 유일하게 또는 우선적으로 상승조절되고, 이 세포 표면 항원이 신속하게 내면화되는 것으로 나타남을 암시하는 발견에 의해 본 발명을 완성했다. 이러한 발견을 기초로 하여, OX-40 항원을 발현하는 세포를 파괴하기 위해 세포독소에 결합된 OX-40 단백질(본원에서는 OX-40 항체라 지칭함)에 결합하는 항체를 이용하는 치료방법을 개발하였다. 이러한 유형의 치료법은 활성화된 T-세포, 특히 활성화된 CD4⁺ T-세포만을 표적으로 하고 나머지 T-세포 레퍼토리는 손상되지 않고 남기 때문에 매우 유용할 것이다.

<58> 활성화된 T-세포, 특히 활성화된 CD4⁺ T-세포는 수많은 항원 활성화 자가면역 질환과 관련이 있으며, 그 예로는 다발성 경화증, 유육종증, 류마티스성 관절염, 및 자가면역 포도막염, 및 이식 거부 반응을 포함한다(Swanborg, R.H., 1984; Cush, J.J. 및 Lipsky, P.E., 1988; Caspi et al., 1988; Cobbold, S.P. et al., 1984). 또한 CD4⁺ T-세포 임파종도 활성화된 표현형을 나타내는 것으로 밝혀졌다(Gootenberg, J.E. et al., 1981). 본 발명은 활성화된 T-세포, 특히 활성화된 CD4⁺ T-세포에 의해 매개되는 이들 증상 및 기타 증상의 진단방법 및 치료방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명에 사용된 관련 재료 및 방법에 대한 설명에 이어, 본 발명의 개발중에 얻은 데이터를 제시한다. 이 데이터는 OX-40 단백질이 마이엘린 염기성 단백질(MBP) 활성화 CD4⁺ T-세포의 표면에 EAE에 걸린 래트종의 자가면역 염증 부위에서만 독점적으로 발현한다는 것을 입증한다. 또한, MBP 활성화 CD4⁺ T-세포의 증식은 라이신(Ricin) dgA 세포독소에 접합된 OX-40 항체를 사용하여 시험관내에서 억제시킬 수 있다는 것을 밝혀주고 있다. 이 억제 활성은 MBP 활성화된 세포에만 제한될 뿐만 아니라 마이코박테리움 튜베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)로부터 유래된 항원을 비롯하여 기타 다른 항원들에 의해 활성화된 CD4⁺ T-세포의 증식을 억제하는데 효과적인 것으로 나타났다. OX-40 항체-세포독소 접합체는 생체내에서 효과적인 것으로 나타났고; 상기 접합체를 사용함으로써 EAE의 임상적 전개를 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 이에 따라, 인체 OX-40 동족체를 클로닝함과 동시에 인체 OX-40 단백질에 대한 단일클론 항체를 생산했다.

<59> 또한, 본 발명의 용도를 나타내는 다양한 실시예들도 제공한다. 특히, 실시예 1은 본 발명에 의해 실시가능한 인체 OX-40 cDNA의 바람직한 제조방법을 기술한 것이다. 실시예 2는 정제된 인체 OX-40 단

백질의 제조 방법을 기술하고 있고, 실시예 3은 상기 인체 단백질을 인식하는 단일클론 및 다클론 항체의 제조방법을 기술한다. 실시예 4는 상기 단일클론 항체를 기초로 하고, 인체에 치료용으로 적합한 면역독소의 제조방법 및 진단용으로 적합한 기타 다른 항체 접합체를 기술하고 있다. 실시예 5는 활성화된 CD4⁺ T-세포 매개의 증상을 진단하는데 인체 OX-40 단일클론 항체를 사용하는 방법을 기술하고 있고, 실시예 6은 상기 면역독소의 치료용으로서의 용도를 기술하고 있다. 실시예 7은 활성화된 CD4⁺ T-세포 매개 증상의 진단 및 치료용 키트에 대해 설명한 것이다.

<60> <재료 및 방법>

<61> **동물** : 루이스(Lewis) 및 버팔로(Buffalo) 래트는 미국 인디애나주 인디애나폴리스에 소재하는 할란 스프라그-다우리, 인코오포레이티드로부터 얻었다. 12주령의 루이스 암컷 래트를 12주령의 버팔로 수컷 래트와 교배시켜 F1 루이스 x 버팔로 하이브리드 동물을 형성하였다. 이 F1 자손을 8주 내지 12주령으로 성장시킨뒤, MBP 면역화시켰다. 제도에 따라 이 래트를 미국 오레곤주 포트랜드에 소재하는 VA 메디칼 센터 동물 보호 기관에서 무배아 조건하에서 사육하였다.

<62> **MBP 특이적인 F1 및 루이스 CD4⁺ 임파구 선별**

<63> **세포주(Lines) T 임파구** 세포주는 미엘린 염기성 단백질(MBP)로 면역화한 후 12일째 선별하였다. 이 절차의 상세한 설명은 종래 기술된 바 있다(Vanderbark, A.A., et al., 1985). 이를 간략히 요약해보면, 임파구결 세포 현탁액을 1% 자가유래의 래트 혈청을 함유한 RPMI 1640중의 MBP(30 µg/ml)와 함께 항온처리하였다. 37°C하의 7% CO₂ 대기중에서 3일 후, 그 세포를 10% 말혈청과 IL-2를 함유하는 RPMI중에서 배양했다. 이 배지중에서 상기 T-세포주를 분열 속도가 느려질때까지 유지시켰다. 이 때(MBP 자극 7 내지 14일 후), 세포를 방사능조사된 루이스 흥선세포에 의해 제공된 MBP 10 µg/ml로 재자극시키고, 이어서 IL-2 함유 배지중에서 증식시켰다.

<64> **EAE의 면역전달(adoptive transfer)** : 수동적인 EAE의 전달을 위한 F1 또는 루이스 T-세포주의 활성화는 배지 10ml 중에 함유된 5 x 10⁶ T-세포, 100 x 10⁶ 방사선조사된 APC, 및 10 µg/ml MBP를 사용하여 10 cm² 배양 접시내에서 수행하였다. 3일간 활성화시킨 후, 아세포를 계수하고, 5~10 x 10⁶ T-세포 아세포를 이와 관련성이 있는 APC 개체군과 함께 방사선조사된 래트(루이스 면역전달물내로 F1에 대해 600 라드) 또는 방사선조사되지 않은 천연 루이스 래의 복강내로 주사하였다. 천연의 동종이계 수용체는 면역전달 바로 전날 방사선조사했다. 이 수용체 래트를 매일 검사했고, 질환의 임상적 증후를 기록하여 다음과 같은 EAE로 등급을 매겼다:

<65> 0 = 증후 없음; 1 = 꼬리 이완; 2 = 운동실조증; 3 = 후부 1/4 마비; 사지마비/빈사상태.

<66> **세포 수집** : 뇌척수액(CSF)을 8" 관이 장착된 27 ga x 3/8" 주사바늘(애보트 호스피탈스 인코포레이티드, 일리노이 시카고 소재)을 사용하여 대조(大槽) 천공을 통해 수집하였다. 이 CSF를 RPMI 1:4로 희석하고 생세포수를 계수했다. 평균, 100 µl/래트를 수집했다. 이 샘플들중에서 RBC/WBC 비가 2:1이 초과하는 샘플은 제외시켰다. 혈액은 심장 천공을 통해 얻었고 이 혈액을 문헌[Kruisbeek, A.M., 1992]에 기술된 바와 같이 Ficoll-Hypaque 상에서 임파구를 분리시켰다. 비장 세포를 와이어 메시 체를 통해 장입시키고, RBC를 NH₄Cl 법으로 용해시켰다(Kruisbeek, A.M. 1992).

<67> **척수 임파구 분리** : 척수 단핵 세포는 공지된 프로토콜(Bourdette, D.N. et al.1991)의 변법에 따라 분리했다. 이를 간략히 요약해보면, 척수를 통기법으로 분리하고 이를 RPMI로 3회 세정하여 임의의 오염성 혈액 세포를 제거하고, 균질화한뒤, 와이어 메시 체를 통해 통과시켰다. 이 세포를 그 다음 세정하고 등장성 퍼콜(Percol:80%)에 재현탁시켰다. 각각의 척수를 10 ml 다단 구배식으로 15 ml 원추형 튜브에 유입시켰다. 각 다단 구배는 100%(2ml), 80%(4ml), 및 40%(4ml) 등장성 퍼콜로 형성시켰고, 세포는 80% 분획의 일부로서 총 형성시켰다. 80/40% 퍼콜 단계들 사이의 계면을 수거하여 세포를 직접 침강시키고, 이를 세정하였다. 이 계면에서 얻은 임파구는 전진형 산란으로 측정되는 바와 같은 휴지기 세포 및 아세포를 모두 함유하고 있었다. EAE에 걸린 동물의 척수로부터 얻은 임파구의 통상적인 수율은 보통 0.5 ~ 1.5 x 10⁶ 세포였다. 임파구의 회수율은 질환 과정동안 꽤 일정하였으며, EAE 회복단계의 마지막날 최대 세포수의 1/2 또는 1/3로 감소하였다.

<68> **형광성 활성화 세포 분류(FACS) 분석** : 도 1 및 도 2에 도시한 바와 같은 이중 형광 분석에 있어서, 사용된 항체는 RT7.2-PE 항체(미국 캘리포니아 라즐라에 소재하는 파밍겐 제품) 및 MRC OX-40-FITC 항체(미국 캘리포니아 라즐라에 소재하는 파밍겐 제품)였다. 모든 분석은 FACScan Research 소프트웨어 버전 A(캘리포니아 산요세에 소재하는 벡톤 디킨슨 제품)가 입력된 FACScan을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 조작 실시하였다.

<69> **항원 특이적인 증식 분석** : 증식 분석은 종래 기술된 바와 같은 96웰 평판상에서 수행했다(Vanderbark, A.A. et al., 1985). 이를 간단히 요약해보면, 2 x 10⁴ CD4⁺ T-세포 및 1 x 10⁶ 방사선조사된 흥선세포/웰을 200 µl 부피의 OX-40 면역독소 단독 또는 다양한 농도의 OX-40 면역독소 및 항원과 함께 1% 래트 혈청 및 RPMI 중에서 항온처리했다. 이 배양물을 72시간동안 항온처리했고, 마지막 18시간은 0.5 Bq [³H]-티미딘의 존재하에서 항온처리했다. 세포를 유리 섬유 필터상에 수거한뒤, 액체 신타레이션으로 [³H]-티미딘의 흡수량을 측정했다. 평균 cpm은 3중 웰로부터 계산했다. 복제 웰로부터의 SD는 평균값으로부터 10%미만으로 변화했다.

<70> **EAE의 OX-40 면역독소 억제** : 천연의 루이스 래트의 한쪽 측복부로 뇌염발생성 투여량의 MBP 특이적인 CD4⁺ T-세포를 주사하고, 이와 동시에 다른쪽 측복부로 면역독소를 주입했다. 면역독소의 투여량 곡선을 최초로 설정하고, 최적 투여량은 8주령의 래트 1마리당 300 내지 500 µg 사이인 것으로 밝혀졌다. 대조군으로서 동물량의 독소(dgA)만을 상기와 같이 래트에게 주입했다.

<71> <실험 결과>

<72> 자가항원 특이적인 T-세포가 자가-조직을 파괴하는 기작(들)을 이해할 수 있는 방법의 하나는 영증 부위 대 비영증 부위에 존재하는 자가반응적인 T-세포와 관련된 차이점을 연구하는 것이다. 이러한 목적을 위해, EAE에서 실험 모델 시스템을 설정하여 생체내에서 질병을 유발시키는 세포를 검출하였다.

<73> EAE는 시험관내에서 활성화된 MBP 특이적인 CD4⁺ T-세포를 천연의 수용체 래트내로 면역전달시키므로써 유도될 수 있다. 면역전달한 후 4일째, 동물은 EAE의 마비 증후를 나타내기 시작한다. 숙주내에 존재하는 공여 개체를 검출하기 위해, MBP 특이적인 F1(루이스 x 버팔로) CD4⁺ T-세포를 천연의 방사선조사된 루이스 수용체내로 전달시켰다. 루이스 및 버팔로 래트는 CD45 세포 표면 분자내 존재하는 에피토프의 대립형질 변형체를 발현한다. 이 대립형질 변형체들을 RT7.1(루이스) 및 RT7.2(버팔로)라고 지칭한다. 따라서, RT7.2 대립형질 마커는 루이스 숙주내의 F1 T-세포를 검출하는데 사용될 수 있는데 그 이유는 상기 세포는 대립형질의 두 형태를 모두 발현하지만 루이스 래트는 대립형질의 RT7.1 형태만을 발현하기 때문이다. CD45 분자는 백혈구상에서만 발현되며, 전체 표면 단백질의 약 10%를 구성한다.

<74> 도 1은 발명 1일째 MBP 특이적으로 전달된 개체(R7 7.2p)의 50%가 영증 부위(척수)에 있는 활성화 마커 OX-40에 대해 양성이나, 면역전달된 개체는 비영증 부위(혈액 및 비장)에 있는 상기 세포 표면 항원에 대해 음성임을 나타내고 있다. 이러한 결과는 MBP 항원이 혈액이나 비장이 아닌 척수중의 T-세포 상에 존재하기 때문에, OX-40 항원은 생체내에서 항원 인식시 자가반응성 CD4⁺ T-세포의 세포표면상에서 발현됨을 제시하였다. 척수로부터 분리된 공여체상에 존재하는 OX-40 항원의 최대 발현은 EAE의 임상 증후 바로 전날 나타났고, 질환이 진행됨에 따라, 이 세포 표면 분자는 사라졌다(도 2).

<75> Vβ8.2 T 세포 수용체(TCR) 성분은 루이스 래트내에 존재하는 미엘린 염기성 단백질(MBP)의 주요 뇌염발생성 에피토프에 대한 항원 특이적인 CD4⁺ T-세포 반응과 관련된 우세한 Vβ 유전자 생성물인 것으로 생각된다. 루이스 래트를 MBP로 능동 면역화시켰고, OX-40 양성 및 음성 세포를 항원 반응성 및 TCR Vβ 이용성에 대해 분석했다(도 3 및 도 4). 척수로부터 분리한 선별된 OX-40⁺ T-세포를 상당히 증식시켜 Vβ8.2 T 세포 수용체 성분의 발현에 대해 OX-40⁻ 또는 선별되지 않은 척수 세포와 비교했다(도 3 참조). 도 4는 MBP 및 PPD 반응성 T세포가 배출된 임파결절의 OX-40⁺ 분획내에서 농축된 응답반응을 나타내는 반면, MBP에만 반응성인 T-세포는 영증성 CNS 중의 OX-40⁺ 분획중에서 발견되었다. 이 데이터는 EAE에 감염된 표적 기관내에 존재하는 자가항원 반응적인 병원성 T세포를 표지하는 OX-40 항체의 선택적인 작용력을 입증하는 것이다. 이 데이터는 Ag 특이적인 T 세포가 OX-40 항체를 가지고 영증부위에서 분리 및 특성규명될 수 있으며, 이로써 자가항원 인식에 의해 유발되는 영증과 관련된 세포 유형을 직접 진단할 수 있음을 강력히 암시하고 있다. 이 데이터는 또한 OX-40⁺ 세포를 분리하므로써 항원 특이성이 알려지지 않은 영증 조직내에서도 자가항원 특이적인 세포 및 Vβ 편중을 확인하는데 유용함을 암시한다.

<76> 따라서, OX-40 항원은 생체외, 항원 활성화된 CD4⁺ T-세포상에서 발현되는 것으로 확인되었으며, 더욱이 이 항원은 이것이 존재하는 영증 부위의 세포상에서만 배타적으로 발현되는 것으로 나타난다(OX-40은 항원의 부재하에 비영증 부위의 세포상에서는 발현되지 않음). 이러한 결과(OX-40 마커의 일시적인 특성 및 표적 기관 형질발현)는 OX-40이 활성화된 자가면역 CD4⁺ T-세포의 항체 매개 결실에 대한 적절한 표적이며 진단 마커일 수 있음을 제시하였다.

<77> 선택적인 임파구 아군의 결실은 생체내에서 항체 또는 다른 결합 단백질에 의해 매개될 수 있다. 이것은 OX-40을 발현하는 세포에 결합시 면역계의 단백질이나 다른 작동인자 세포를 활성화시켜 표적 세포를 파괴하는 항체 또는 기타 다른 결합 분자를 선택하므로써 수행될 수 있다: 그 예로서 항체-의존적인 세포의 세포 독성(ADCC)을 자극하거나 또는 보체 캐스케이드의 활성화를 통한 세포의 용해(Hale et al., 1983, Blood 62:873-82; Greenwood et al., 1993, Eur. J. Immunology 23:1098-1104); 또는 결합 및 섭취시 세포를 사멸시키는 독성제가 부착되도록 분자를 결합시키거나 항체를 변형시키는 것에 의한 세포 용해를 포함한다.

<78> 다양한 방법을 사용하여 결합 단백질, 단일클론 항체 또는 이의 단편을 변형시킬 수 있다. 예컨대, 독소인 융합 단백질부를 암호하는 cDNA를 작제하는 표준 분자 생물학적 기법을 사용할 수도 있다(예, Williams et al., 1987, Protein Engineering 1:493-98).

<79> 대안적으로, 표준 화학적 결합 절차, 예를 들면 티오에테르 결합을 통해 독소, 약물 또는 다른 분자를 단백질에 결합시킬 수 있다(Glennie et al., 1987, J. Immunology 139 : 2367).

<80> 몇개의 군은, 독소 분자(일명 면역독성)와 결합된 항체가 적절한 항원을 발현하는 세포군을 고갈시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다(Fulton, R.J., et al., 1988 참고). 면역 독소의 잇점은, 이들의 표적 세포 특이성에 있어서 고도의 선택성을 지닌다는 점과, 소량만 투여해도 원치 않는/잠재적 유해 세포를 제거할 수 있다는 점이다.

<81> 각종 세포 독소는 면역 독소를 제조하는데 사용할 수 있다. 라이신 A쇄-항체 접합체는 정상의 임파구 및 종양 임파구를 생체내 및 시험관내에서 모두 제거할 수 있다(Fulton, R.J. et al., 1988; Street, N.E. et al., 1987). 슈도모나스 외독소 A 및 디프테리아 독소와 같은 다른 독소도 또한 항체에 접합시켜 특이적 세포군을 제거하는데 사용될 수 있다(May, R.D., and Fulton, R.J. 1992).

<82> 1980년대 말 및 1990년대 초기에는, 라이신 A 쇄에 접합된 항체를 사용하여 수차례의 인체 I/II 기 임상 실험을 수행하였다(Weiner, L.M., et al., 1989 Splitter, L.E. et al., 1987; Vitetta, E.S., et al., 1991), 대부분의 실험에서는 암 환자의 종양을 줄이기 위해 암 항원에 특이적인 항체를 사용하였다. 최근에는, "제2 세대" 면역 독소가 개발되었는데, 이것은 치료받은 환자의 비특이적 면역원성 및 독성과 관련된 일부 문제점을 극복한 것이다. 이 방법에서는 종양 특이적 항체에 접합된 라이신 A(dgA) 쇄의 탈글리코실화된 형태를 사용한다. 그러한 I기 연구에서는 15명의 환자에서 B-세포 임파종에 대한 면역 독소

의 변성된 형태를 사용하였다(Vitetta, E.S., et al., 1991). 약 40%의 환자에서는, 총 종양이 50% 또는 그 이상 감소하는 부분적인 차도를 보였다. 종양 세포의 제거는, 치료가 완료된 후 1주일 이내에 급속히 이루어진다.

- <83> 본원에 제시된 모든 생체내 연구에서는 OX-40 항체-dgA 접합체를 사용한다. 항체- 라이신 A의 접합은 문헌[May, R.D. and Fulton, R.J. (1992)]에 기재된 방법을 통해 헤테로 2작용성 가교결합체 SPDP 또는 SMPT를 사용하여 수행하였다. 간략하게, OX-40 항체상의 유리된 아미노기는 가교 결합제와 반응하고 거대고분자는 정제되었다. 이어서 정제된 OX-40 항체 생성물은 환원된 라이신 A 쇠(이것은 하나의 유리된 시스테인을 가짐)와 반응하고, 하이브리드 분자는 정제되었다.
- <84> 먼저 래트의 OX-40 항체를 dgA 형태의 라이신과 접합시키고, 이 헤테로 접합체를 사용하여 항원 특이적 CD4⁺ T-세포주의 시험관내 증식을 억제시켰다. 사용된 T-세포주는 MBP에 특이성을 지니며, 면역 전달시 원래 수용자에게 EAE가 유발되었다. 도 5는, OX-40 헤테로접합체가 약 20ng/웰에서 투여량 의존적 방식으로 MBP 특이적 T-세포주의 항원 특이적 증식을 50%의 억제율로 억제시킴을 나타낸 것이다. 라이신 A만을 사용한 대조 실험에서는, 보다 높은 농도인 500ng/웰 및 그 이상에서만 억제 효과를 보였으며, 이 보다 낮은 농도에서는 억제율에 영향을 미치지 못했다(자료는 제시하지 않음). OX-40 항체만을 사용하고, dgA에 접합된 아이소타이프와 짝을 이룬 비관련 항체를 사용한 대조 실험에서도 또한 억제 효과는 나타나지 않았다(자료는 제시하지 않음).
- <85> 이어서, OX-40 항체를 슈도모나스 외독소에 접합시키고, 이 접합체를 항체 특이적(MBP) CD4⁺ T-세포 증식에 미치는 억제 효과에 대해서 테스트하였다(제6A 도 및 제6B 도). 이 헤테로 접합체는 시험관내 측정시에는 약 4배 이상의 억제 효과를 보였으며, 독소 단독으로는 어떤 농도에서도 측정시 억제효과를 보이지 않았다. 이 분석은 루이스 MBP 특이성 주(도 6B) 및 F1(루이스 x 버팔로) MBP 특이성 주(도 6A)를 사용하여 수행하였고 이들은 동일한 결과를 보였는데, 이는 증식의 억제가 종에 특이성을 지니지 않음을 의미한다.
- <86> OX-40-dgA는 또한 EAE 또는 자가 면역과 무관한 항원에 의해 활성화된 CD4⁺ T-세포의 시험관내 증식을 억제하는데 사용하였다. 사용된 항원은, 마이코박테리움 투베르쿨로시스의 정제된 단백질 유도체(PPD) 항원이었다. 이 항원은, OX-40 항원이 MBP 항원에 의해 활성화된 CD4⁺ T-세포에 특이성을 지니는지의 여부, 또는 T-세포 수용체 특이성과 무관하게 모든 항원 표면상에 활성화된 CD4⁺ T-세포가 존재하는지의 여부를 확인하는데 사용하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, PPD 활성화된 T-세포주의 증식 억제가 투여량에 의존적으로 이루어지며, MBP 활성화된 세포주에 대해서는 상응하여 50%의 억제를 보였다. 이는, OX-40 면역 독소가 항원 특이성과는 무관하게 임의의 활성화된 CD4⁺ T-세포주의 증식을 억제함을 제시하는 것이다.
- <87> OX-40 면역독소는 시험관내에서 MBP 특이적 자가 면역 CD4⁺ T-세포의 증식을 억제하는데 효과적이기 때문에, 실험을 통해 시험관내에서 MBP 특이적 CD4⁺ T-세포를 죽이는 이 면역 독소의 효능을 측정하였다. 이를 위해서 먼저 조사된 래트를 사용하였다; 이들 동물에는 MBP 특이적 F1 T-세포를 뇌염 유발성 투여량으로 투여하였다. 동시에, 이 동물에는 OX-40-라이신 A 접합체 또는 라이신 A만을 투여하였다. 조사의 효과는, 래트의 면역 시스템을 고갈시킴으로써 대립 유전자 변형 F1 공여 T-세포를 인식하고 고갈시키지 못하게 하는 것이다. 조사된 래트를 사용하면, 공여 T-세포의 전달 후, 숙주의 RT7.2 항체를 가진 공여 T-세포를 보다 쉽게 검출하여, 이들 전달된 세포의 운명을 결정할 수 있다(도 1, 도 2, 도 8A 및 도 8B 참고).
- <88> 표 1에 제시된 바와 같이, 실험 1 및 2에서는 OX-40 면역독소를 투여한 1/8 동물만이 임상적 질병 징후를 나타낸 반면, 비접합된 라이신 A를 투여한 8마리의 동물은 모두 EAE가 완화되었다. 면역독소의 억제적 효과는 OX-40 항체에 의해 매개되는 것으로 추측되는데, 이는 라이신 A 쇠만을 사용한 경우에는 뇌염 유발성 CD4⁺ T-세포만을 투여한 동물에 비해 동일한 질환 등급을 보이기 때문이다(자료는 제시하지 않음).

<89> [표 1]

실험적 자가 면역 뇌척수염에 대한 OX-40 라이신 A 면역독소의 효과				
전달 투여량 ^a	치료제 ^b	발생 빈도	발병일	EAE 등급 ^c
실험 1				
6.5x10 ^b	OX-40-라이신 A	1/3	6	0.66
6.5x10 ^b	라이신 A	3/3	4	6.33
실험 2				
10x10 ^b	OX-40-라이신 A	0/5	--	--
10x10 ^b	라이신 A	5/5	5	4.90
실험 3				
10x10 ^b	OX-40-라이신 A	0/2	--	--
10x10 ^b	비처리	3/3	4	6.50

^a MBP 특이적 CD4⁺ T-세포를 3일동안 시험관내에서 항원 및 항원 공여 세포로 자극한

후 원래의 수용체에 전달시켰다.

^b 400 μ g의 OX-40-라이신 A 또는 동일 물량의 라이신 A만을 투여하고, 동시에 이 세포를 전달시켰다.

^c 이 값은 각 군의 평균 누적 EAE 등급을 나타낸 것으로서; 0는 징후가 없는 것이고; 1은 꼬리의 늘어짐; 2는 뒷다리의 약화; 3은 후부의 1/4 마비; 4는 빈사상태.

<92> 표 1에 제시된 자료는, F1 MBP T-세포주(루이스 x 버팔로)를 루이스(모체 숙주) 수용체에 투여한 EAE 모델을 사용하여 산출하였다. 따라서, 전달된 T-세포군은 RT7.2(버팔로) 항체를 가진 이들 동물의 척수에서 검출하였다. 도 8A 및 도 8B에는, 발병 첫날 치료된 개체(임상적으로 양호하게)와 대조군(마비된) 개체의 척수로부터 분리한 공여 세포의 수로 측정된 결과인 OX-40-dgA 치료의 결과를 제시한 것이다. 대조군으로 부터는 총 200,000개의 척수 임파구를 분리하였는데, 이중의 80%가 유도된 공여체인 것으로 밝혀졌다. 이와는 대조적으로 치료된 군으로 부터는 80,000개의 척수 임파구를 분리하였는데, 이중의 15%만이 유도된 공여체인 것으로 밝혀졌다. 이들 2개군 사이에는 척수(염증부)로부터 분리된 공여체 유도 MBP 반응성 CD4⁺ T-세포의 총수에 있어서 대수 배율 이상의 차이가 있었다(160,000 대 12,000). 이는 OX-40 dGA 접합체가 생체내에서 MBP-반응성 CD4⁺ T-세포를 특이적으로 제거함을 시사해준다.

<93> 도 9에 제시된 바와 같이, 평균 임상적 등급이 1인 경우, 양군을 발병 첫날째에 OX-40 면역 독소로 처리하였다. 처리 후 모든 대조군 동물은 완전한 꼬리의 마비 징후를 나타낸 반면(등급=3); 치료된 동물은 단지 약간만이 진행되었다(등급=1.5). 처리후 평균 누적 등급은, 대조군의 경우 8.0이고, 치료된 군의 경우 3.75였다.

<94> 별도의 실험에서는 동물을 발병 첫날째 치료하고, 24시간 후 희생시켰다. 이어서 비장 및 척수로부터 임파구를 분리하였다. 3개 군에 대해, 생체내 OX-40 항체의 표지화를 분석하였다. 대조군은 치료하지 않았고, 제2 군은 비접합된 OX-40만을 투여하였으며, 제3군에는 OX-40 면역 독소를 투여하였다. 비장으로부터는 동일한 수의 세포를 수거하였으나, 대조군 및 비접합된 OX-40 처리된 군에 비해 OX-40 면역 독소-처리된 동물로부터는 절반량의 척수 임파구를 수거하였다. 생체내에서는, 항-마우스 Ig-FITC로써 OX-40항체의 결합을 검출하였다. OX-40 및 OX-40 면역 독소 처리된 래트의 척수에서 분리한 임파구의 약 15 내지 20%는 항-마우스 Ig에 양성반응을 보였다. 상기 임파구의 18%가 OX-40에 양성을 띠어도 불구하고, 대조군 래트의 척수로부터 분리한 세포는 마우스 Ig에 음성 반응을 보였다(표 1a 참고). 임의의 군중의 비장에서는 매우 극소의 항-마우스 Ig-FITC 양성 세포를 분리하였다. OX-40 및 OX-40 면역독소 군의 척수에서는 유사한 비율의 OX-40⁺ 세포 및 항-마우스 Ig⁺ 세포를 분리하였다. 대부분의 항-마우스 Ig

양성 세포는 척수로부터 분리된 공여군과 연관이 있었다(RT7.2⁺/항-마우스 Ig⁺; 표 1a). 이들 결과는, OX-40 항체를 생체내에 투여한 결과 염증 조직으로부터 분리된 자가항원 특이 세포의 독점적 결합을 입증한다.

<95> [표 1a]

OX-40 양성 T-세포의 생체내 표지화			
처리 ^a			
세포 분리, 마우스의 Ig ⁺	OX-40 ⁺	α -마우스 Ig ⁺	공여체 ⁺ /공여체 ⁺ α -
대조군			
척수 0.3%	17.9% ^b	0.2%	54.4%
비장 0.2%	0.5%	0.3%	2.4%
OX-40			
척수 13.5%	17.7%	17.5% ^c	53.2%
비장 0.3%	0.3%	0.4%	4.6%
OX-40-라이신 A ^d			
척수 18.0%	19.0%	18.1%	50.3%
비장 0.4%	0.7%	0.5%	2.3%

^a MBP에 특이성을 가진 F1 T 세포는 조사된 루이스 숙주로 전달되었고, 400 μ g의 OX-40 면역 독소 또는 OX-40 ab 만을 발병 첫날째 복강내 투여하였다.

^b 모든 양성 세포는 음성 비교를 위한 사분면을 그리기 위해서 아이소타이프의 대조군 항체를 사용하여 FACs 분석을 통해 측정하였다.

^c α -마우스 Ig⁺ 세포의 평균 형광 강도(MFI)는 OX-40 FITC 염색된 세포의 MFI와 매우 유사하였다.

^d OX-40 면역독소 동물로부터 분리한 척수 임파구의 총수는 OX-40 및 대조군의 절반이었다.

<97> 처리에 대한 효과를 측정하기 위해, 척수 임파구를 분리한 후 OX-40 면역 독소 처리된 래트 대조군 래트(조사된 루이스 수용체에 전달된 F1 공여체 세포)의 RT7.2 항체를 가진 BP 반응성 공여체 세포의 양을 분석하였다.

<98> 도 10A 및 도 10B는 척수로부터 분리한 미엘린 반응성 공여체 T 세포의 수로 측정된 대로 세포 전달과 동일한 날에 투여된 OX-40 면역 독소의 배출 결과를 제시한 것이다. RT 7.2-양성 세포는 발병 첫날째 분석하고; 처리된 동물은 임상적으로 양호한 반면(EAE 등급 = 0, 1.2×10^4 의 공여체⁺ 척수 임파구를 가짐), 대조군 동물은 마비증상을 보였다(EAE 등급 = 1, 1.6×10^5 의 공여체⁺ 척수 임파구를 가짐). 도 10C, D, E 및 F에서는 발병 전날에 처리하였는데, 이때 래트에서 분리한 OX-40 양성 공여체 T-세포만을 척수로부터 분리하였다(도 1). 척수 및 비장 임파구는, 처리한지 24시간 후에 분리하였다. 수용체로 분리된 공여체-유도된 비장 세포의 수는 처리에 의해 영향을 받지 않았다(자료는 제시하지 않음). 모든 비교시, 척수로부터 분리된 공여체⁺ 세포의 수는 처리된 동물의 로그 이상씩 감소하였다(도 10). 이들 자료는, OX-40 면역독소가 생체내에서 MBP 반응성 공여체 세포를 특이적으로 제거하므로, 결과적으로 처리된 동물의 척수로부터는 보다 적은 뇌염 유발성 세포가 분리됨을 입증해준다.

<99> 이어서, 생체내에서의 동일한 실험을 비-조사된 숙주에 대해 수행하였다: 루이스 MBP 활성화된 T-세포주는 루이스 숙주내로 전달시켰다. 비조사된 루이스 숙주를 사용한 이유는 동일한 종류의 자가 면역 질환을 앓는 사람 환자와 보다 유사한 손상되지 않은 면역계를 가지기 때문이다. 이들 실험에서는, T-세포의 전달시 접합체를 1회 투여했을때 질병의 잇따른 진행이 단지 부분적으로만 억제되었음이 초기에 관찰되었다. 따라서, 각기 다른 시간에 2회 투여하는 실험을 수행하였다.

<100> 3마리의 동물에 대해 0일 및 3일째에 주사한 후 3마리의 대조군 동물과 비교하였다(표 2). 이들 결과는, (1) 3일째(발병 전날) OX-40 항원을 발현하는 공여체 T-세포만이 척수 분획(도 1)내에 있고, (2) 척수중의 공여체 T-세포에 대한 OX-40 발현의 최고율은 발병 전날이기 때문에(도 2), 면역 독소가 3일째 염증부위의 자가 면역 T-세포를 인식하고 이들을 죽임을 시사해준다.

<101> [표 2]

실험적 자가면역 뇌척수염에 대한 OX-40-라이신 A 면역독소의 효과(비-조사된 숙주)				
전달량 ^a	처리 ^b	투여 일수	발병일	EAE 등급 ^c
9.0x10 ⁶	OX-40-라이신 A	0/3	5	1.33
9.0x10 ⁶	비처리	--	4	8.25

^a 루이스 MBP 특이성 CD4⁺ T-세포를 시험관내에서 3일동안 항원 및 항원 공여 세포로 자극시킨 후 루이스 수용체에 전달시켰다.

^b 400 μ g의 OX-40-라이신 A 또는 등물량의 라이신 A만을 세포 전달과 동시에 투여하였다.

^c 이 값은 3마리 동물로 구성된 각군의 평균 누적 EAE 등급을 제시한 것으로서, 0은 징후가 없는 것이고; 1은 꼬리의 늘어짐; 2는 뒷다리의 약화; 3은 후부의 1/4 마비; 4는 빈사상태이다.

<103> 제시된 자료로부터 유추할 수 있는 결론은, OX-40 면역 독소는 시험관내 및 생체내에서 모두 항원 특이성 CD4⁺ T-세포 기능을 죽이고/억제하는데 극히 효과적이라는 것이다. 이 특이적 면역 독소의 효과는 중 또는 항원 특이성에 의해 제한되는 것으로는 보이지 않으며 생체내에서는 광범위한 용도를 가질 것으로 추측된다.

<104> 상기 실험은 래트 모델계 및 래트의 OX-40 단백질에 대한 항체를 사용하여 수행하였다. 그러나, 래트의 OX-40 항체는 인체 또는 쥐의 활성화된 CD4⁺ T-세포를 인식하지 못한다(자료는 제시하지 않음). 본 발명을 인체 치료 용도로서 보다 용이하게 개발하기 위해서는 인체 OX-40 단백질에 대한 항체를 제조할 필요가 있다.

<105> 이를 위해, 인체 OX-40 동족체를 암호화하는 인체 cDNA를 클로닝하였다. 먼저, 폴리머라제 쇠 반응(PCR)에 사용하기 위해 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 합성하였다. 이들 프라이머는 전체 길이의 OX-40 cDNA 서열을 증폭시키도록 고안된 것으로서; 한 프라이머는 래트 cDNA 서열의 출발 코돈 영역의 암호화 가닥과 유사한 것이고; 나머지 프라이머는 래트 cDNA 서열의 중지 코돈 영역의 암호화 가닥의 역보충물이었다.

<106> 놀랍게도, 이들 PCR 프라이머를 인체의 활성화된 CD4⁺ T 세포 임파구로부터 분리된 RNA와 함께 사용한 경우에는 생성물이 얻어지지 않았다.

<107> 인체 OX-40 cDNA를 클로닝하는 표준 방법은 비성공적이기 때문에, 대안적인 방법이 요구된다. 맨 처음, PCR 프라이머는 콘카나발린 A로써 활성화된 쥐의 CD4⁺ T-세포로부터 분리된 RNA로부터 PCR을 통해 쥐의 OX-40 cDNA를 클로닝하는데 성공적으로 사용되었다. 그 후에는, 쥐의 OX-40 cDNA를 사용하여 인체의 활성화된 T 임파구로부터 cDNA 램다 gt11 라이브러리를 검색하였다(캘리포니아주 팔로알토 소재의 클론 테크에서 구입한 No. HL10316). 유사한 크기의 5개의 양성 클론(1050-1200 bp)을 구입하였다. 이들 5개의 재조합 램다 클론을 블루스크립트 플라스미드(스트라티진, 라 졸라)로 서브클로닝한 후 370A 자동 서열분석기(캘리포니아주 파사데나 소재의 어플라이드 바이오시스템스)상에서 서열을 판독하였다. 인체 OX-40 cDNA의 서열은 첨부된 서열표의 서열번호 1에 제시하며, 도 11에 도시되어 있다.

<108> 겐뱅크 데이터베이스의 펩티드 서열과 인체 OX-40 단백질의 추정된 아미노산 서열을 비교한 결과, 쥐의 OX-40과 래트 OX-40 서열이 고도의 상동성을 가짐을 알 수 있고; 서열번호 1에 제시된 인체 OX-40 단백질의 추정된 아미노산 서열이 쥐 또는 래트의 OX-40 아미노산 서열과 관련이 없을 확률은 각각 3.4×10^{-58} 및 2.9×10^{-56} 인 것으로 추정된다. 다음 가장 밀접한 관련이 있는 펩티드 서열은 확률이 1.1×10^{-11} 이다. 또한, 사람 및 래트 OX-40 cDNA와 래트 서열의 아미노산 31에서 출발하는 64개의 아미노산(192개의 염기쌍) 영역에 걸친 아미노산 서열간의 상동성을 비교한 결과, 아미노산 상동성은 62.5%이고,

뉴클레오티드의 상동성은 67.5% 인 것으로 밝혀졌다. 이 64개의 아미노산 스트레치내의 10개의 시스템인 잔기는 모두 보존되었다.

<109> GVHD에서의 OX-40 발현

<110> T-세포상의 OX-40의 발현은 이식편 대 숙주 질환(GVHD)을 가진 환자를 대상으로 연구하였다.

<111> 동종이계의 골수 이식을 받은 3명의 환자에게 GVHD를 발병시켰다. GVHD 발병 일자는 이식후 7일 내지 50일로서 환자들간에 차이가 있었다. 표 3은 GVHD 에피소드 과정동안 OX-40 발현을 요약한 것이다. 모든 환자는, 질병 진행 초기 단계동안 OX-40을 발현하는 CD4⁺ 말초 혈구의 비율이 향상되는 것으로 나타났다. 모든 환자에서, 처음 임상적 에피소드 후(GVHD후 7 내지 14일째), OX-40⁺ T-세포의 비율은 감소하였다. 이 자료는 EAE 진행 초기 단계동안 관찰된 OX-40의 일시적 발현과 일치한다(도 2). GVHD에서의 OX-40 발현은 임상적 징후의 초기 진행과 상호 관련이 있으며, GVHD 및 인체의 다른 이식/자가면역 장애를 위한 직접적인 진단 및 치료적 용도에 사용할 수 있다.

<112> [표 3]

환자	GVHD 경과 일수	CD4 ⁺ (%)	CD4의 OX-40 ⁺ (%) ^a	경중 ^b
#1	3	5.8 ^c	24.0 ^c	4 등급
	7	5.0	0.5	
	14	4.0	1.6	
#2	1	12.1	10.5	2 등급
	10	6.6	0.5	
#3	2	41.0	10.0	2 등급
	8	8.3	0.6	

^a 공여체와 수용체의 말초 혈액 임파구는 이식 과정이전에 OX-40 발현에 대해 검색하고, CD4⁺ T-세포는 1% 미만의 OX-40⁺이었다.

^b 이 값은 GVHD의 임상 징후(피부 증상 포함)동안 나타난 각 환자의 최대 경중을 나타낸 것이다. 이때, 0는 징후가 없는 것이고; 1은 피부 질환이 없거나 25% 미만의 피부질환; 2는 >25% 및 <50%의 피부 질환; 3은 >50%의 피부 질환 수반; 4는 수포를 동반한 >50%의 피부질환 수반; 5는 사망.

^c GVHD 환자의 말초 혈액으로부터의 임파구를 하이파크-피콜을 통해 분리하였다. 샘플은 분리하여 GVHD후 각기 다른 일수에 분석하였다. 샘플에는 항-인체 CD4-PE 항체와 항-인체 OX-40 항체로 2중으로 염색하였다. OX-40 항체는 항-마우스 IgG₁-FITC로써 검색하고 음성 대조군으로는 간접적인 항체만을 사용하였다.

<115> OX40 및 IBD

<116> OX-40은 IBD와 함께 사용할 수 있음을 발견하였다.

<117> OX-40의 조직 발현은 간접적인 알칼리성 인산염 면역 조직화학적 염색의 표준 기법을 통해 연구하였다(예를 들면, Immunocytochemistry : Practive Applications in Pathology and Biology, J. Polak and S. van Noorden, eds. John Wright and Sons, Bristol). 궤양성 대장염 크론병 환자들 모두의 장 조직검사 샘플을 항-OX40 항체로써 양성적으로 염색하였다. 염증부의 임파구중에서는 얇은 프로프리나 층을

침투하는 OX40⁺ 세포 덩어리를 발견하였다. 정상 장 조직 샘플 또는 환자로부터 분리된 비-관련 장 조직에서는 분산된 OX-40⁺ 세포가 관찰되었다.

실시에

<118>

실시에 1

<119>

본원에서 인체의 OX-40 cDNA의 서열을 제공하기 때문에, 당업자는 이제 상기 전길이의 cDNA 클론을 표준방법에 의해 쉽게 제조할 수 있다고 인식할 것이다. 상기 방법은 예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 포함하는 데, 이 반응은 DNA 서열을 증폭시킬 수 있는 반응이다. DNA의 PCR 증폭을 위한 방법 및 조건은 Innis 등의 문헌(1990) 및 Sambrook 등의 문헌에 기술되어 있다.

<120>

인체의 OX-40 cDNA의 증폭을 위한 PCR 프라이머는 증폭할 cDNA의 일부에 따라 선택될 것이다. cDNA 또는 전체 cDNA 분자의 소형 단편을 증폭시키는 프라이머를 선택할 수 있다. 다른 길이의 프라이머를 수용하기 위해 증폭 조건의 변형을 요할 수 있다: 이러한 고찰은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, Innis 등의 문헌(1990)에 논의되어 있다. 실시예만에 의하면, 상기 인체의 OX-40 cDNA에 상응하는 전체 cDNA 분자는 하기 프라이머를 사용하여 증폭시킬 수 있다. 프라이머 1 및 2는 첨부한 서열표에 서열번호 2 및 서열번호 3에 각각 기재되어 있다.

프라이머 1 . 5' ATGTGCGTGGGGGCTCGGCGGCTG 3'

프라이머 2 . 5' TCAGAACTTGACCAGGGTGGAGTG 3'

<122>

인체의 OX-40 cDNA를 생성하는 PCR 증폭용 주형 DNA를 클론테크(캘리포니아주 팔로 알토) (카탈로그 제HL10316호)에 의해 제조된 인체의 활성화된 T림파구에서 유래한 상기 람다 GT11 cDNA 라이브러리로부터 추출할 수 있다.

<123>

선택적으로, 인체의 OX-40 cDNA는 역전사 RNA(RT-PCR)의 PCR 증폭에 의해 얻을 수 있다(Veres 등, 1987 ; Kawasaki 등, 1990).

<124>

필수적으로 Sambrook 등(1989) 및 Ausubel 등(1987)의 문헌에 기술된 바와 같이 통상의 다양한 방법중의 하나를 사용하여 활성화된 인체의 CD4 T-세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 적당한 인체의 CD4 T-세포는 Gootenberg 등(1981)의 문헌에 기술된 인체의 CD4 T-세포 임파종 세포주를 포함한다. 선택적으로, Kruisbeek(1992)에 의해 기술된 바와 같이 인체의 말초 혈액으로부터 활성화된 CD4⁺ T-세포를 분리할 수 있다. 그 후, 상기 추출된 RNA를 인체의 OX-40 cDNA의 RT-PCR 증폭을 수행하기 위한 주형으로 사용하였다.

<125>

PCR 생성물을 정제 및 클로닝하기 위한 표준 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며 이는 Innis 등(1990) 및 Sambrook 등(1989)의 문헌에 기술되어 있다.

<126>

실시에 2

<127>

인체의 OX-40 cDNA의 제공으로, 이제 인체의 OX-40 단백질 발현 및 정제는 표준 실험실 기법에 의해 가능하다. 상기 정제된 단백질은 항체 형성 및 환자의 치료에 사용될 수 있다.

<128>

목적 단백질을 암호화하는 cDNA 서열의 부분적인 길이 또는 총 길이는 박테리아 발현 벡터내로 연결될 수 있다. 에스케리치아 콜리(E. coli)내로 도입된 클로닝된 유전자로부터 다량의 단백질을 발현시키는 방법을 인체의 OX-40 cDNA 단백질의 정제에 대해 사용할 수 있다. 예를 들면, 인체의 OX-40 단백질의 일부 또는 전부에 연결된 E. coli lacZ 또는 trpE 유전자의 일부에 의해 암호화된 아미노말단 펩타이드로 이루어진 융합 단백질은 상기 인체의 OX-40 단백질을 인식하는 다클론 및 단일클론 항체를 제조하는 데 사용할 수 있다. 손상되지 않은, 고유 단백질은 작용 연구를 위해 다량으로 E. coli 내에서 생성할 수도 있다. 융합 단백질 및 완전한 고유 단백질을 박테리아 내에서 생성하기 위한 방법 및 플라스미드 벡터는 Sambrook(1989)등의 문헌(제17 장, 본 명세서에 참고로 인용됨)에 기술되어 있다. 이러한 융합 단백질은 다량으로 제조될 수 있으며, 정제가 용이하고 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 강한 조절된 촉진제와, 클로닝된 유전자 상방에 효과적인 리보솜 결합 부위를 높음으로써 박테리아내에서 천연 단백질을 제조할 수 있다. 단백질이 저수준으로 제조되는 경우, 추가 단계를 수행하여 단백질 생산을 증가시킬 수 있으며 : 단백질이 다량으로 생성되는 경우, 비교적 정제가 용이하다. 적당한 방법은 Sambrook 등(1989)의 문헌에 기술되어 있으며 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 종종, 다량으로 발현된 단백질은 불용성 침입체내에서 발견된다. 이러한 응집물로부터 단백질을 추출하는 방법은 Sambrook 등(1989)(제17 장)의 문헌에 기술되어 있다. lacZ 융합 유전자의 발현에 적당한 벡터 시스템은 벡터들의 pUR 시리즈(러쎈 및 윌러-힐, 1983), pEX1-3(스탠리 및 루지오, 1984) 및 pMR100(그레이 등., 1982)를 포함한다. 완전한 천연 단백질의 제조에 적당한 벡터는 pKC30(시마타케 및 로젠버그, 1981), pKK177-3(아만 및 브로지우스, 1985) 및 pET-3(스튜디오 및 모파트, 1986)을 포함한다. 인체의 OX-40 융합 단백질은 단백질 겔로부터 분리하고, 동결건조하고, 분말로 갈아서 항원제제로서 사용한다.

<129>

포유류의 세포내 발현을 위해, 상기 cDNA 서열을 pSV2 벡터내의 시미안 바이러스(SV)40 프로모터와 같은 이중 프로모터에 연결할 수 있으며(멀리간 및 베르그, 1981), 그리고 원숭이 COS-1 세포(글루즈만, 1981)와 같은 세포내로 도입시켜서 일시적인 발현 또는 장기적인 발현을 이룩할 수 있다. 상기 cDNA 서열(또는 그것으로부터 유도된 일부) 또는 미니 유전자(인트론 및 그 자신의 프로모터를 갖고 있는 cDNA)를 종래의 방법에 의해 진핵 발현 벡터내로 도입시킨다. 이 벡터들은 cDNA의 전사를 개시시키고 그것의 전사를 강화시키는 조절 서열을 제공함으로써 상기 cDNA 진핵 세포의 전사를 가능하게 하도록 고안된 것이다. SV40의 프로모터 또는 인핸서(enhancer) 영역, 또는 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복 서열(LTR) 및 SV40으로부터의 플리아데닐화 및 스플라이싱 신호를 함유하는 벡터는 구입이 용이하다(멀리간

등 1981 : 골만 등., 1982). 상기 cDNA의 낮은 발현 수준은 상이한 활성(예를 들면, 바콜로바이러스 pAC373은 에스. 프루지페르다(*S. frugiperda*) 세포내에서 cDNA를 다량 발현시킬 수 있음(섬머 및 스미쓰, 1985))을 갖는 프로모터를 사용하거나 또는 조절이 가능한 프로모터, 예를 들면 마우스 포유류 종양 비루스로부터의 글루코코르티코이드-반응성 프로모터를 함유하는 벡터를 사용함으로써(리 등, 1982) 상기 벡터 유형에 따라 조직할 수 있다.

<130> 또한, 몇가지 벡터는 *gpt*(멀리간 및 베르그, 1981) 또는 *neo*(써던 및 베르그, 1982)와 같은 선택성 마커를 함유한다. 이같은 선택성 마커로 인해 안정한, 장기 발현 벡터(및 cDNA)를 보여주는 형질 감염된 세포의 선택이 가능하다. 상기 벡터는 유두종(사르버 등., 1981) 또는 엡스타인-바르(서그덴 등., 1985)와 같은 비루스의 조절 요소를 사용함으로써 에피존성, 자유 복제용 단위로서 세포내에서 유지될 수 있다. 선택적으로, 계능성 DNA 내로 상기 벡터를 통합시키는 세포주를 생성할 수도 있다. 이러한 유형의 세포주는 둘다 연속적으로 유전자 생성물을 생성한다. 또한 벡터(및 cDNA)의 사본수를 증폭시켜서 유전자 생성물을 높은 수준으로 생성하는 세포주를 생성할 수도 있다(알트 등, 1978).

<131> 특히 인체 또는 기타 포유류 세포내에서 DNA를 진핵 세포내로 전달시키는 것은 종래 기술이다. 상기 벡터를 예컨대, 인산 칼슘(그라함 및 반더 Eb, 1973) 또는 인산 스트론튬(브라쉬 등., 1987)을 사용한 침전, 전기천공(뉴만 등., 1982), 리포펙션(펠그너 등., 1987), DEAE 덱스트란(맥커탄 등., 1968), 미세 주사법(멀러 등., 1978), 원형질 융합(스카프너, 1980), 또는 펠릿 건(클레인 등, 1987)에 의해 순수한 DNA(형질감염)로서 수용체 세포내로 도입한다. 선택적으로, 상기 cDNA(형질감염)로서 벡터를 사용하여 감염에 의해 도입시킬 수 있다. 시스템은 예컨대, 레트로바이러스(번스타인 등., 1985), 아데노바이러스(아마드 등., 1986) 또는 헤르페스바이러스(스파에테 등., 1982)를 사용하여 개발한다.

<132> 진핵 세포내에서 발현되는 상기 인체의 OX-40 단백질은 정제하여 항체를 형성하는 데 사용할 수 있다. 상기 인체의 OX-40 단백질은 상청액내로 단백질을 방출한 후 추출하거나 또는 cDNA 서열을 진핵 발현 벡터내로 도입하여 예컨대, β -글로빈에 의해 키메라 단백질을 발현될 수 있다. β -글로빈에 대한 항체를 이후에 사용하여 상기 키메라 단백질을 정제한다. 그 후, β -글로빈 유전자와 cDNA 사이에 유전자 조작된 상응하는 단백질 효소 절단 부위는 해독후 두개의 폴리펩티드 단편을 서로 분리하는 데 사용된다. β -글로빈 키메라 단백질을 발생시키는 하나의 유용한 발현 벡터는 pSG5(스트라타겐, 라 졸라, CA)이다. 이 벡터는 토끼의 β -글로빈을 암호화한다.

<133> 본 발명은 인체의 OX-40 cDNA 서열 또는 그 일부를 함유하는 재조합 클로닝 벡터를 포함한다. 상기 인체의 OX-40 cDNA는 벡터내에서 인체의 OX-40 cDNA 폴리펩티드, 또는 그것의 일부를 발현시킬 수 있도록 재조합 DNA 분자내에서 발현 조절 서열에 작용적으로 연결되어 있다. 상기 발현 조절 서열은 원핵 세포 또는 진핵 세포 유전자 및 그것들의 비루스 및 그것의 조합물의 발현을 조절하는 서열들로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 발현 조절 서열은 구체적으로 *lac* 시스템, *trp* 시스템, *tac* 시스템, *trc* 시스템, 파지 람다의 주된 작동자 및 프로모터 영역, fd 코우트 단백질의 조절 영역, SV40의 초기 및 후기 프로모터, 폴리오마, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 바콜로바이러스 및 시미안 비루스로부터 유도된 프로모터, 3-포스포글리세레이트 키나아제에 대한 프로모터, 효모의 산 포스파타아제의 프로모터, 효모 α -교배 인자의 프로모터 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

<134> 본 발명의 벡터로 형질 감염될 수 있는 숙주 세포는 *E. coli*, 슈도모나스, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 스테아로써모필러스 또는 기타 바실러스, 기타 박테리아, 효모, 진균류, 곤충, 마우스 및 기타 조직 세포, 예컨대 인체의 조직 배양세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

<135> 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 도 9에 도시된 인체의 OX-40 cDNA 전길이(개시 코돈으로부터 중지 코돈까지)를 배콜로바이러스 벡터내로 연결하고 상기 재조합 인체 단백질을 적당한 곤충 세포내에서 생성하였다. 적당한 배콜로바이러스 발현 시스템은 클론테크(캘리포니아주 팔로 알토 소재)에 의해 제조된 BacPAK™ 바콜로바이러스 발현 시스템을 포함한다. 그러므로 실시예에 의하면, 인체의 OX-40 cDNA 전길이를 제조자의 지시에 따라 상기 플라스미드 pBacPAK1 내로 결합시키고 스포도테라 프루지페르다 세포내에서 발현시켰다.

<136> 곤충 세포내에서 생성되는 인체의 OX-40 단백질을 그후 표준 방법에 따라 정제하였다. 상기 재조합 생성물을 분리하는 바람직한 기법은 상기 재조합 단백질에 히스티딘의 추가 6 개의 잔기를 첨가하는 벡터를 사용하는 것이다. 이러한 방법으로 융합 단백질은 킬레이트 금속을 생성하는 데, 이것은 대규모 단백질 정제를 용이하게 한다. 그러므로, 예를 들면, 고농도의 염중에 폴리히스티딘 융합 단백질은 금속 킬레이트 매트릭스에 고친화도로 결합하는 반면, 숙주 단백질의 대부분은 전혀 결합하지 않는다. 낮은 친화도로 결합하는 숙주 단백질은 pH를 6.0 까지 감소시키므로써 매트릭스로부터 닦아낼 수 있다. 폴리히스티딘-함유 융합 단백질의 특이적 용출은 pH 6.0에서 300 mM의 이미다졸 완충액을 사용하여 수행할 수 있다.

<137> 실시예 3

<138> 단일클론 항체는 치료용의 인체 OX-40 단백질로 제조할 수 있다. 면역원으로서 사용하기에 적합한, 실질적으로 순수한 인체 OX-40 단백질은 상기 실시예 2에서 설명한 바와 같이 형질감염되거나 형질전환된 세포로부터 분리된다. 최종 제제중의 단백질농도는 예를들면 아미콘(Amicon) 여과장치로 농축시켜서 수 mg/ml 수준으로 조정한다. 이어서 단일클론 항체를 다음과 같이 단백질로 제조할 수 있다:

<139> A. 하이브리도마 융합에 의한 단일클론 항체의 제조

<140> 전술한 바와 같이 동정 및 분리한 인체 OX-40 단백질의 에피토프에 대한 단일클론 항체는 콜러 및 밀스타인(1975)의 고전적인 방법 또는 그 유사방법에 따라 쥐의 하이브리도마로부터 제조할 수 있다. 간단히 설명하면, 마우스를 선정된 순수 단백질 수 μ g으로 수 주일에 걸쳐 반복적으로 접종시킨다. 이어서 마우스를 죽이고, 비장의 항체-생산세포를 분리해낸다. 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 비장세포를 마우스의 흑색종 세포와 융합시키고, 아미노플테린을 포함하는 선택성 매질(HAT매질)에서 상기 융합계를 성장시켜서 과잉량의 미융합세포를 파괴시킨다. 성공적으로 융합된 세포를 희석시키고 희석액중 일정량을 미세역가 평판 웰에 넣어 배양액의 성장을 유지시킨다. 문헌[Engvall(1988)]에 개시되어 있는 ELISA 및

그 유사방법과 같은 면역분석법을 이용하여 웰의 상정액중의 항체를 검출함으로써 항체-생산 클론을 동정한다. 선별된 양성 클론을 성장시키고 단일클론 항체 생성물을 수확하여 사용할 수 있다. 상세한 단일클론 항체의 제조방법은 문헌[Harlow and Lane(1989)]에 기술되어 있다.

<141>

B. 합성 펩티드에 대해 생성된 항체

<142>

인체 OX-40 단백질에 대한 항체를 생성시키는 다른 방법은 도 11에 도시된 인체 OX-40 단백질의 예상 아미노산 서열에 근거한 시판 펩티드 합성기로 합성된 합성펩티드를 사용하는 것이다.

<143>

본 발명의 바람직한 실시예에서는, 인체 OX-40단백질을 인식하는 단일클론 항체가 제조된다. 인체 OX-40 단백질에 대해 제조된 단일클론 항체는 인체 OX-40 단백질을 특이적으로 검출하는 것이 가장 적합하다. 즉, 이러한 항체는 인체 OX-40 단백질을 인식하여 결합하며 인체 세포에서 발견되는 다른 단백질은 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는다. 달리 말하면, 이러한 항체는 인체내에서 실질적으로 인체 OX-40 단백질에 대해서만, 결합 특이성을 가지며, 따라서 실질적으로 활성화된 CD4⁺ T-세포에 대해서만 결합 특이성을 갖는다.

<144>

항체가 인체 OX-40단백질을 특이적으로 검출하는지에 대한 판단은 다수의 표준면역분석법 중 어느 하나, 예를 들면 웨스턴 블롯팅 기법(Sambrook 등, 1989)에 의해 수행한다. 소정의 항체 제제(예를 들면, 마우스에서 제조된 것)가 인체 OX-40 단백질을 웨스턴 블롯팅기법에 의해 특이적으로 검출하는지를 판단하고자 하는 경우, 비-활성화된 임파구와 같은 OX-40항원을 발현하지 않는 인체 세포로부터 총 세포성 단백질을 추출한다. 양성 대조예로서, 활성화된 T-세포, 특히 CD4⁺ T-세포로부터 총 세포성 단백질을 추출한다. 이어서 이러한 단백질제제를 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔상에서 전기영동처리한다. 이어서 단백질을 웨스턴 블롯팅기법에 의해 막(예를 들면, 니트로셀룰로오스)에 전달시키고, 항체제제를 막과 함께 배양시킨다. 막을 세정하여 비-특이적으로 결합된 항체를 제거한후, 알카리성 포스파타제와 같은 효소에 결합된 항-마우스 항체를 사용하여 특이적으로 결합된 항체의 존재를 검출하고, 기질 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트/니트로 블루 테트라졸륨에 적용시키면 면역-편재화된 알카리성 포스파타제에 의해 청색의 고밀도화합물이 제조된다. 인체 OX-40 단백질을 특이적으로 검출하는 항체는 이러한 기술에 의해 인체 OX-40 단백질 밴드(분자량에 의해 검출된 소정의 위치에 편재화되어 있음)에 결합하는 것으로 확인된다. 항체가 다른 단백질에 비특이적으로 결합하는 것도 일어날 수 있으며 이것은 웨스턴 블롯상의 약한 신호에 의해 검출할 수 있다. 이러한 결합의 비특이성은 특이성 항체-인체 OX-40 단백질 결합으로부터 발생하는 강한 주신호에 비해 웨스턴 블롯상에서 산출되는 약한 신호로서 당업자들에게 의해 인식될 수 있다. 비활성화된 T-세포, 특히 CD4⁺ T-세포로부터 추출된 단백질에 결합하는 항체는 없는 것으로 밝혀졌다.

<145>

추출된 단백질을 사용하여 결합분석을 수행함과 더불어, 인체 OX-40 단백질에 대해 제조한 단일클론 항체를, 인체 OX-40항체를 형광 태그(예를 들면, FITC)에 결합시키고 전술한 바와 같은 FACS에 의해 세포군집을 분석하여 적합한 세포형태(활성화된 인체 T-세포, 특히 활성화된 CD4⁺ T-세포)를 인식하는 능력을 확인하는 시험을 수행한다. 인체 OX-40 항체는 활성화된 T-세포, 특히 활성화된 CD4⁺ T-세포를 인식하는 것이 바람직하다. 따라서, 활성화된 T-세포 군집을 CD4-PE와 OX-40-FITC로 2중 염색하면 2중으로 양성을 띠는 세포가 나타나야 한다.

<146>

본 발명에 유용한 단일클론 항체는 일반적으로 IgM 또는 IgG 아이소타입이며, 마우스, 인체 또는 기타 포유동물의 기원으로부터 유래하는 것이 바람직하다.

<147>

본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 인체 OX-40 항원을 인식하는 단일클론 항체는 "인체화된" 마우스의 단일클론 항체이다. 이러한 인체화된 항체는 마우스 세포내에서 생산되는 단일클론 항체를 비변형시킬 수 있는 인간 환자에 보다 안전하게 투여할 수 있다. 마우스세포와 같은 비-인체세포에서 생산되는 단일클론 항체는 일반적으로 인체 숙주에 투여되는 경우 면역반응을 일으키기 때문에 단일클론 항체의 생물학적 효능의 지속시간은 제한된다(미국 특허 제4,731,244호 및 WO 89/06976 참조). 인체화된 항체는 재조합 DNA기술에 의해 제조되며 일반적으로 표적 항원(이 경우에는 인체 OX-40 단백질)을 인식하는 마우스 단일클론 항체로부터의 가변(항원인식)영역과 혼합된 인체 단일클론 항체로부터의 항체일정영역을 포함한다. 가변영역만이 마우스로부터 유래하기 때문에, 인체화된 단일클론 항체는 인간 환자에 투여할 때 면역반응이 거의 유도되지 않는다.

<148>

항체를 인체화하는 방법은 문헌[Riechmann 등 (1988)]에 기술되어 있다. 리치먼 등은 래트 항체의 중쇄 및 경쇄 도메인으로부터의 6개의 추가변성 영역을 인체 임파구에 대해 유도된 인체 IgG1 항체에 도입하였다. 리치먼 등은 "인체화된" 항체는 항-면역글로불린 면역반응을 일으키지 않아 생체내에서 표적 항원에 결합할 수 있다고 밝혔다.

<149>

본 발명의 바람직한 실시예에서는, 온전한 단일클론 항체를 사용한다. 그러나, 당업자들은 인체 OX-40 단백질을 인식하고 결합할 수 있는 단일클론 항체 부분을 사용할 수 있다는 알 것이다. 이러한 항체 단편에는 일반적으로 인체 OX-40 단백질을 인식하는 항체의 Fab, f(ab')₂ 및 Fv 단편이 포함된다. 항체 단편을 포함하는 면역독소는 CD4 항원을 발현하는 모든 세포를 인식하는 항체를 사용하여 생체내 및 생체외에서 CD4⁺ T-세포를 결실시키는데 효과적인 것으로 밝혀졌다.

<150>

실시예 4

<151>

전술된 실시예에서 설명한 바와 같이, 본발명은 인체에 있어서 인체의 OX-40 단백질에만 실질적으로 결합하는 단일 클론 항체를 생산할 수 있다. 이러한 단일 클론 항체는 후술하는 바와 같이 항체-라이신-A 접합체 같은 세포독성 분자와 접합체 형태로서 치료적 용도에 사용될 수 있다. 이들 접합체는 통상 면역독소라 불린다. 면역독소는 2개의 성분, 즉 세포독성제와 운반매체로 구성되는데, 이 중 세포독성제는 세포에 결합 또는 흡수시 세포에 일반적으로 치명적인 성분이고, "운반매체"는 표적 세포 유형에 세포독소가 운반되도록 돕는 성분이다. 본발명에 있어서, 표적 세포 타입이란 활성화된 T-세포, 특히 활성

화된 CD4⁺ T-세포이며, 운반매체는 하기 실시예 5에서 기술된 인체 OX-40 항원을 인식하여 결합하는 항체 또는 그의 단편이다.

- <152> 다수의 적합한 세포독소가 종래기술에 공지되어 있다. 이의 예로는 A쇄, 이의 디글리코실화된 형태(dgA), 슈도모나스 외독소와 같은 세포독성 단백질; 요오드-131, 이트륨-90, 레늄-188 및 비스무트-212 같은 방사성 핵종; 빈데신, 메토크세이트, 아드리아마이신 및 시스-플래티늄 같은 화학요법 약물이 있다(참조, Olsnes and Phil(1982), and Baldwin and Byers(1985)). 본발명의 일양태에 있어서, 세포독소는 미국특허 제4,590,071호에 기술된 바와 같이 라이신 A 사슬의 디글리코실화된 형태이다.
- <153> 선택된 세포독소는 항-인체 OX-40 항체와 접합하여 본 발명에서 사용될 수 있는 면역독소를 생산한다. 항체와 세포독소와의 결합은 Thorpe 등에 일반적으로 개시되어 있는 수많은 공지된 기술에 따라 수행할 수 있다. 예를 들면, 세포독성제가 단백질(예, 라이신 A 쇠)이고, 운반매체가 완전한 단일 클론 항체인 경우, 결합은 카르보디이미드, 또는 글루타라알데하이드같은 헤테로작용성 가교제에 의해 수행될 수 있다. 디글리코실화된 라이신 A 쇠를 사용하여 면역독소를 생산하는 방법은 미국 특허 제4,590,071호 및 WO 89/06967에 기술되어 있다. 이들 특허는 본 명세서에 참고적으로 제시된 것들이다.
- <154> 본 발명에 의해 제공되며 상술된 바에 따라 생산된 면역독소를 이후에 시험관내에서 효능을 확인하기 위해 테스트한다. 이러한 시험관내 테스트는 인체 CD4⁺ T-세포 및 전술된 방법을 사용하여 수행한다. 예를 들면, 본 발명에 따라 생산된 면역독소(즉, 인체 OX-40 단백질에 특이적인 것으로 나타난 단일클론 항체에 접합된 세포독소)를 다발성 경화증 환자로부터 얻은 MBP 특이적 CD4⁺ T-세포주에 대한 시험관내 억제 연구를 사용하여 테스트한다. 인체요법에 사용하기에 잠재적으로 적합한 가능성을 갖고 있는 면역독소들은 이러한 세포들이 시험관내에서 증식하는 것을 억제할 수 있는 것들이다.
- <155> 이들 면역독소들은 다발성 경화증 환자로부터 얻은 활성화된 CD4⁺ T-세포들이 시험관내에서 증식되는 것을 억제할 수 있기 때문에, 이들은 기원과는 무관하게 모두 활성화된 CD4⁺ T-세포들의 증식을 억제할 수 있어야 한다. 이러한 결론은 전술된 증거에 의하여 입증되는 것이다. 이들 증거들은 래트의 OX-40-dgA 면역독소가 MPB 활성화된 래트의 CD4⁺ T-세포 및 PPD 활성화된 래트의 CD4⁺ T-세포에 대하여 효능이 있다는 것을 입증하고 있다. 인체 OX-40 면역독소가 이러한 일반적인 활성을 갖는 가를 확인하기 위하여 전술한 바와 비슷한 시험관내 증식연구가 다른 항원(예, 헤르페스 심플렉스 바이러스)에 특이적인 인체 CD4⁺ T-세포들을 사용하여 또한 수행될 수 있다.
- <156> 후술되는 실시예 5에 기술된 본 발명의 다른 일양태에 있어서, 항-인체 OX-40 항체들은 활성화된 CD4⁺ T-세포와 같은 활성화된 T-세포가 매개하는 증상을 진단하는 데 사용될 수 있다. 이러한 적용을 위해서, 항체의 검출을 용이하게 하는 적당한 화학약품인 "태그(tag)"에 항체를 접합시킬 수 있다. 본발명에 사용될 수 있는 적합한 분자는 형광성 분자인 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 및 R-피코에리트린(PE)이다.
- <157> **실시예 5**
- <158> 본 발명의 일양태에 있어서, 인체 OX-40 단백질을 특이적으로 결합하는 단일 클론 항체는 활성화된 CD4⁺ T-세포같은 활성화된 T-세포가 매개하는 증상을 검출하는 데 사용된다. 이러한 목적을 위해서 인체 OX-40 항체들은 형광성 표지같은 다른 분자와 접합한다.
- <159> 생검 시료를 염증조직으로부터 취하여 분석하였다. 당업자라면 생검 시료가 여러가지 증상에 따라 가변적이라는 것을 알 수 있을 것이다. 다발성 경화증에 있어서, 임파구는 CSF로부터 분리되는 반면, 류마티스성 관절염의 경우는 임파구는 염증 관절 활액으로부터 분리된다. 조직 거부 생검 거부반응 에피소드에 표적 조직으로부터 직접 취한다.
- <160> 바람직한 일양태에 있어서, 환자로 부터 취한 생검 시료는 임파구 분취물로 분별화된다.(전술된 방법에 의함: 재료 및 방법 참조). 정제된 임파구를 OX-40 FITC 항체로 염색하면 양성 임파구의 양(%)이 FACScan 장치상에 정량화된다. 이러한 양을 건강한 개체에서 발견되는 양(%)과 비교한다. 통계적으로 보았을 때, 상당량이 증가한 것은 염증이 발생하고 있다는 것을 초기에 나타냄으로써 자기면역장애라는 진단을 초기에 내리게끔 한다.
- <161> **실시예 6**
- <162> 치료 용도 예컨대 다발성 경화증과 관련된 자기면역 염증을 치료하기 위한 치료적인 용도를 위해, 염증 부위에서 활성화된 CD4⁺ T-세포같은 활성화된 T-세포의 존재는 치료 개시 전에 검출되는 것으로 예측된다. 이들 세포의 존재는 상기 실시예 5에서 기술한 진단 테스트를 사용하여 검출될 수 있다. 진단 테스트가 염증부위에서 활성화된 CD4⁺ T-세포같은 활성화된 T-세포의 존재를 나타내는 결과를 양산하는 경우, 면역독소의 치료 용도는 적합하다.
- <163> 활성화된 CD4⁺ T-세포같은 활성화된 T-세포가 매개하는 증상을 치료하기 위해 면역독소를 치료학적으로 투여하기 위해서는 면역독소를 사용하는 치료 요법에서 규정하고 있는 표준 공인된 프로토콜을 사용할 수 있다. 이들은 Vitetta 등(1991) 및 WO/06967에서와 같은 프로토콜을 포함한다. 이들 문헌은 본 명세서에 참고적으로 제시된 것들이다.
- <164> 일반적으로, 활성화된 CD4⁺ T-세포같은 항원-활성화된 T-세포가 매개하는 증상으로 인해 고통받는 환자를 치료하는 방법은 환자에게 세포독성제가 접합된 유효량의 항체(또는 일부의 항체)를 투여하는 것이다. 이 항체는(또는 일부의 항체) 인체 OX-40 항원을 인식하고 이에 결합한다. 전술된 바와 같이, 세포독성제와 결합된 항체 및 일부의 항체는 통상 면역독소로 칭한다. 이들 면역독소의 유효량을 일반적으로 적당량의 면역독소라고 한다.

<165> 당업자라면 면역독소의 양이 0보다 큰 경우 어떠한 양도 환자에게 있어서 활성화된 CD4⁺ T-세포에 어느정도 영향을 끼칠 것이라는 것을 알 수 있을 것이다. 하지만, 다량의 면역독소는 부작용이 있기 때문에 적당량의 범위가 한정된다. WO 89/06987에 기술된 바와 같이, 라이신 A 쇄와 접합된 단일 클론 항체를 함유하는 면역독소의 경우, 적당량은 14일 이하의 기간동안 일일 0.05~1.0mg/kg의 범위내에 있다. Vitetta등(1991)에 의해 기술된 바와 같이 화학적으로 디글리코실화된 라이신 A쇄에 결합된 항체(예 Fa b' 단편)를 함유하는 면역독소의 경우 용량은 25~150mg/m²의 범위에 있다.

<166> **실시예 7**

<167> 본 발명의 일양태는 인체 0X-40 항원을 인식하는 단일 클론 항체를 함유하는 키트이다. 이러한 키트는 단일 클론 항체가 함유된 용기를 포함한다.

<168> 이러한 키트의 일양태에 있어서, 키트는 dgA같은 세포독소와 접합된 형태로 단일 클론 항체를 포함함으로써, 키트는 활성화된 CD4⁺ T-세포같은 활성화된 T-세포가 매개하는 증상으로 인해 고통받는 환자를 치료하는데 사용할 수 있다. 이러한 항체-세포독성 접합체는 바람직하게는 주사에 의해 환자에게 투여하기에 적합한 형태로 제공된다. 따라서, 키트는 적당한 약학적 부형제에 현탁된 것과 같은 현탁된 형태로 항체-세포독소를 함유할 수 있다. 대안으로서, 접합체는 재조직에 알맞도록 고품분 형태로 존재할 수도 있다.

<169> 대안적인 양태에 있어서, 키트는 형광성 표지에 접합된 것과 같은 진단 용도에 적합한 형태로 단일 클론 항체를 함유할 수 있다. 이러한 키트는 활성화된 CD4⁺ T-세포 같은 활성화된 T-세포가 매개하는 염증상태를 검진하는 데 사용될 수 있다.

<170> 전술된 실시예는 본 발명을 구체화하는 것에 불과하며 본 발명이 이에 의해서 국한되는 것은 아니다. 본 발명의 취지와 범위를 벗어나지 않는 범주에서 수 많은 변경과 수정이 가능하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

항원성 폴리펩티드를 암호화하는 서열번호 1에 도시한 서열 또는 서열 번호 1의 뉴클레오티드 염기 15 내지 848을 포함하는 세부서열(subsequence)을 가진 핵산, 이것의 변형체 또는 대립인자(allele), 또는 이들에 대해 상보적인 가닥(여기에서, 상기 변형체는 암호화된 항원성 폴리펩티드에 아미노산 변화를 부여하지 않거나 보존적 아미노산 변화를 부여하는 서열, 또는 상기 암호화된 항원성 폴리펩티드와 유사한 결합 특이성 및/또는 항원 교차반응성을 갖는 폴리펩티드 또는 대립인자 변형체를 암호화하는 서열을 가짐).

청구항 2

제1항에 기재된 핵산이 암호화하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 1에 도시한 서열의 세부서열이 암호화하는 아미노산 서열을 포함하고, 항원성 결정인자를 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 4

문헌[S. Miura 등의 Mol. Cell Biol. 11(3) (1991) 1313-1325면]에 명시된 인체 gp34 단백질의 전체 서열로 이루어진 단백질 이외에, 제3항에 기재된 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 특이 결합제(specific binding agent)로서,

항체 또는 항체 단편, 세포독소와 접합된 항체 또는 항체 단편을 포함하는 면역독소, 세포독성 효과를 나타낼 수 있는 면역글로불린, 및 항체-의존성 세포독성을 매개하거나 상보하거나 고정하는 결합제로 구성된 군에서 선택되는 것인 특이 결합제.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열번호 1의 핵산 서열의 암호 영역이 암호화하는 아미노산 서열의 인체 0x-40에 특이적으로 결합하는 특이 결합제로서, 상기 0x-40은 활성화된 T-세포의 표면에 존재하는 것인 특이 결합제.

청구항 6

제2항에 기재된 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있고, 항체 결합 도메인을 포함하는 특이 결합제.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 단일클론 항체 또는 그 결합단편을 포함하는 것인 특이 결합제.

청구항 8

제7항에 있어서, 적어도 부분적으로 인체화된(humanised) 것인 특이 결합제.

청구항 9

제8항에 있어서, 인체화된 단일클론 항체를 포함하는 것인 특이 결합제.

청구항 10

제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 분자적으로 결합된 세포독소를 추가로 포함하는 것인 특이 결합제.

청구항 11

제10항에 있어서, 세포독성제와 접합된 단일클론 항체의 Fab, F(ab')₂ 또는 Fv 단편을 포함하는 것인 특이 결합제.

청구항 12

제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 표지(label)를 추가로 포함하는 것인 특이 결합제.

청구항 13

제12항에 있어서, 표지가 방사성 표지인 것인 특이 결합제.

청구항 14

제12항에 있어서, 형광성 표지에 접합된 항체를 포함하는 것인 특이 결합제.

청구항 15

제4항에 기재된 특이 결합제의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열.

청구항 16

제1항 또는 제15항에 기재된 핵산 서열을 포함하는 복제성 발현 벡터.

청구항 17

제16항에 기재된 벡터를 사용하여 형질전환시킨 원핵 또는 인간을 제외한 진핵 숙주 유기체.

청구항 18

제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 기재된 특이 결합제의 유효량과 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물로서,

활성화된 T-세포에 의해 매개되는 증상으로서 다발성경화증, 유육종증, 류마티스성 관절염, 자가 면역성 포도막염, T-세포 임파종, 이식된 기관 또는 조직의 거부증, 이식편대숙주(graft-versus-host) 질병 또는 반응, 및 장염 질환으로 구성된 군에서 선택된 증상을 앓고 있는 환자의 치료용 약학 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 특이 결합제가 세포독성 유효량의 세포독성제와의 접합체 형태로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 특이 결합제가 CD4⁺ T-세포 표면에 발현될 때 0x-40 항원을 인지할 수 있는 단일클론 항체의 Fab, F(ab')₂ 또는 Fv 단편을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서 특이 결합제가 그 표면에 0x-40을 보유하는 세포에 세포독성 효과를 일으킬 수 있는 면역글로불린인 것인 약학 조성물.

청구항 22

제18항에 있어서, 특이 결합제가 보체(complement)를 고정시키거나 또는 항체-의존적 세포독성을 매개할 수 있는 것인 약학 조성물.

청구항 23

제18항에 있어서, 특이 결합제가 쥐형 IgG2a 또는 인체형 IgG1의 면역글로불린의 Fc 영역의 구조 특성을 가지거나 또는 그 특성과 연관되어 있는 것인 약학 조성물.

청구항 24

제18항에 있어서, 환자가 이식편대숙주 질병 또는 반응을 가진 것인 약학 조성물.

청구항 25

제18항에 있어서, 환자가 장염 질환을 가진 것인 약학 조성물.

청구항 26

제18항에 있어서, 환자가 다발성경화증을 앓고 있는 것인 약학 조성물.

청구항 27

제18항에 있어서, 환자가 유육종증을 앓고 있는 것인 약학 조성물.

청구항 28

제18항에 있어서, 환자가 이식된 기관 또는 조직의 거부증을 앓고 있는 것인 약학 조성물.

청구항 29

제18항에 있어서, 환자가 류마티스성 관절염을 앓고 있는 것인 약학 조성물.

청구항 30

제18항에 있어서, 환자가 자가면역성 포도막염을 앓고 있는 것인 약학 조성물.

청구항 31

제18항에 있어서, 환자가 CD4⁺ T-세포 임파종을 앓고 있는 것인 약학 조성물.

청구항 32

제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 기재된 유효량의 특이 결합제와 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물로서, 인체 숙주에서 0x-40 항원을 발현시키는 T-세포 군집을 감소시키는 용도의 약학 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 특이 결합제가, 세포독성적으로 유효한 양으로 투여된, 거의 0x-40 항원에만 결합하는 항체-세포독소 접합체를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 34

제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 기재된 치료학적 유효량의 특이 결합제와 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물로서, 다발성경화증을 앓고 있는 환자에서 재발성 자가면역 염증을 억제하는 용도의 약학 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 특이 결합제가 거의 0x-40 세포 표면 항원에만 결합하는 유효량의 면역독소를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 36

제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 기재된 특이 결합제와 약학적 허용담체를 포함하는 약학 조성물로서, 환자에게서 활성화된 T-세포에 의해 매개되는 증상을 검출하는 용도의 약학 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 특이 결합제가 거의 인체 0x-40 항원에만 결합하는 단일 클론 항체를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 38

제12항에 기재된 특이 결합제를 포함하는 키트로서, 환자에게서 활성화된 T-세포에 의해 매개되는 증상을 검출하는 용도의 키트.

청구항 39

제2항에 기재된 폴리펩티드 또는 제4항에 기재된 특이 결합제를 포함하는 피분석물의 검출 또는 정량분석을 위해 특이 결합 분석을 수행하기 위한 키트로서, 피분석물을 인지할 수 있는 특이 결합제를 포함하는 제1 시약, 피분석물 또는 제1 시약에 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 포함하는 제2 시약, 및 제2 시약용 표지를 포함하는 키트.

청구항 40

제39항에 있어서 제1 시약이 피분석물에 특이적인 항체를 포함하고, 제2 시약은 제1 시약에 특이적인 표지된 항글로불린을 포함하는 것인 키트.

청구항 41

제39항에 있어서, 제1 시약이 피분석물에 고정된 특이적 결합 시약을 포함하고, 제2 시약은 피분석물이 제1 시약에도 결합할 경우 피분석물에 결합할 수 있는 특이 결합제인 것인 키트.

청구항 42

제39항에 있어서, 제2 시약이 제1 시약에 결합하기 위해 피분석물과 경쟁할 수 있는 물질을 포함하는 것인 키트.

청구항 43

약학적 허용 부형제내에 제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 기재된 적합한 양의 항체를 함유하는 용기를 포함하는 키트로서, 활성화된 T-세포에 의해 매개되는 증상을 치료하기 위한 키트.

청구항 44

제2항 또는 제3항에 있어서, 제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 기재된 특이 결합제의 제조에 사용하기 위한 폴리펩티드.

청구항 45

제17항에 기재된 숙주 유기체를 배양하는 단계를 포함하는 방법으로서, 제2항 또는 제3항에 따른 폴리펩티드, 또는 제4항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 기재된 특이 결합제를 제조하는 방법.

청구항 46

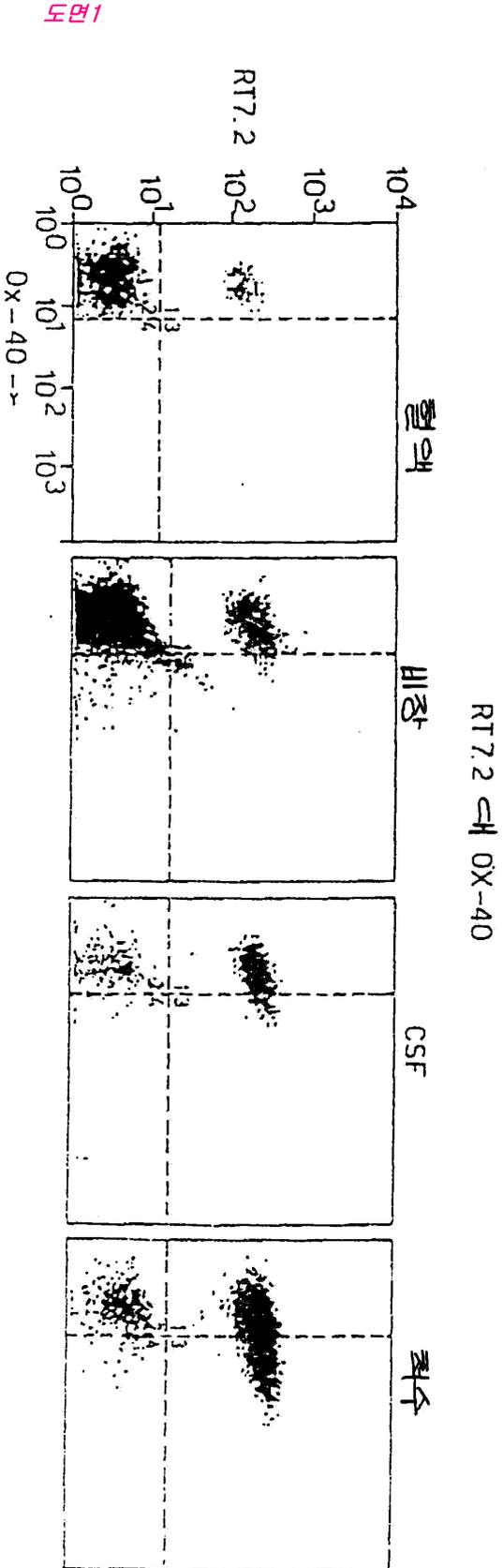
거의 인체 OX-40 항원에만 결합하는 항체로서, 검출 또는 정량분석용 표지를 보유하는 항체.

요약

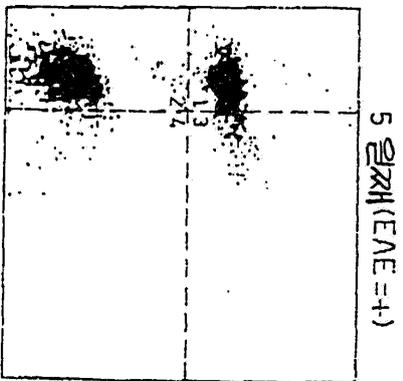
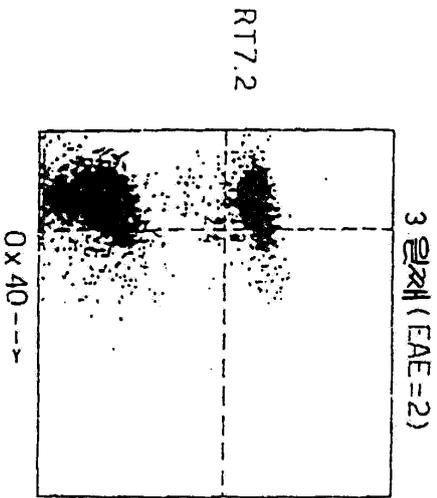
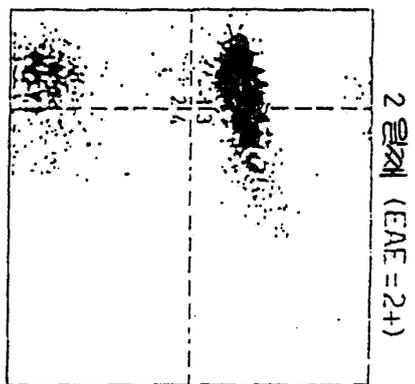
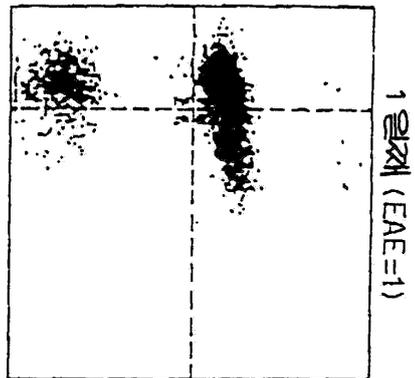
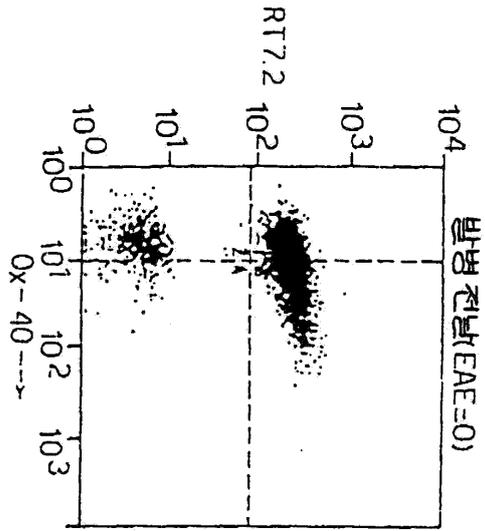
본 발명은 OX-40 항원을 특성 분석하고 그 변형체 및 유도체를 함께 청구한다. 이 항원의 결합제, 및 이들의 진단 및 치료에의 용도도 개시한다.

그러한 용도의 예로는 독성 분자(예; 라이신-A 쇠)에 접합된 OX-40 항체를 포함하는 면역독소를 사용하여 생체내에서 활성화된 $CD4^+$ T-세포를 선택적으로 고갈시키는 방법을 들 수 있다. 이들 특이적 면역독소의 투여 방법을 사용하여 다발성경화증, 류마티스성 관절염, 유육종증 및 자가면역성 포도막염, 뿐만 아니라 장염 질병 및 이식편대숙주 질병과 같은 질병들에 관련된 자가면역 반응성 $CD4^+$ T-세포를 고갈시킨다. 이 유형의 치료법은 또한 이식 반응과 관련된 이종반응성 $CD4^+$ T-세포 및 $CD4^+$ T-세포 임파종을 근절시키는 데 유익하다. OX-40 항체의 인체형을 사용하여 전술한 모든 질병을 초기에 진단할 수 있다.

도면



특수 OX-40 발현의 시간에 따른 경과

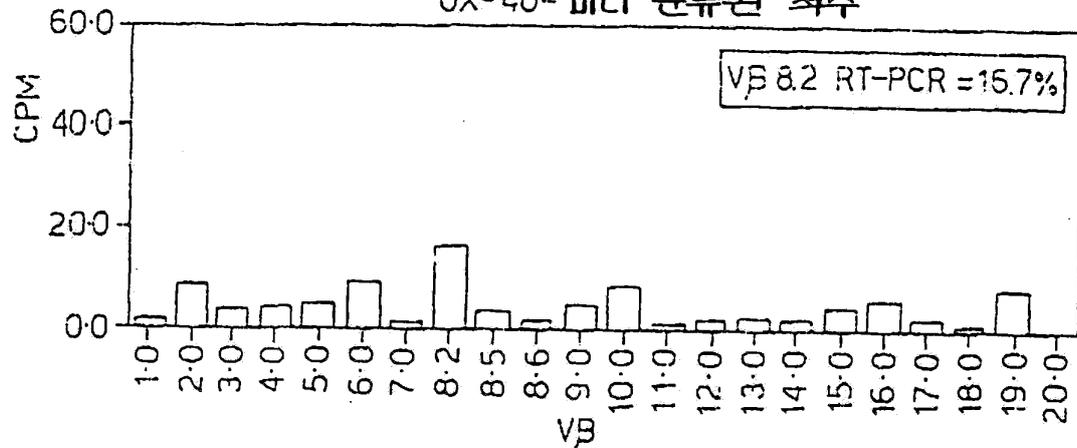


도면2

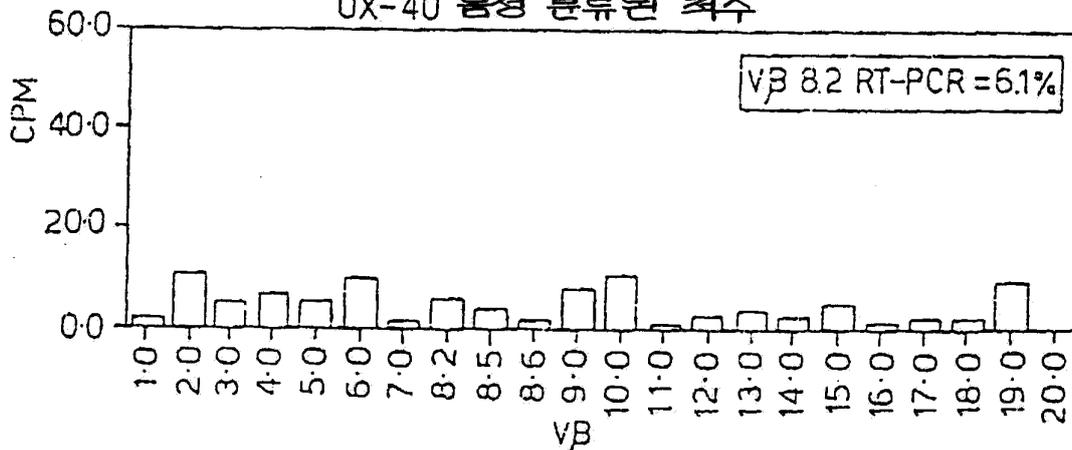
도면3

EAE의 발현시 OX-40의 미리 분류된 음성 및 양성 Vβ 양상

OX-40- 미리 분류된 척수



OX-40 음성 분류된 척수

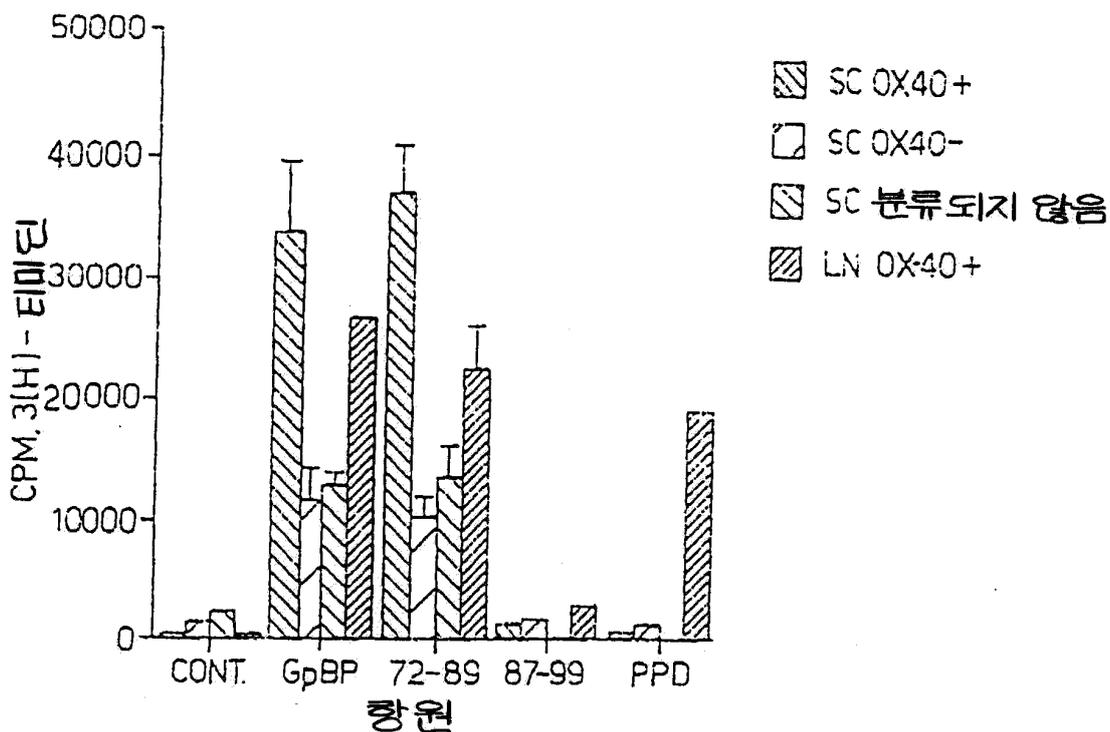


OX-40 양성 분류된 척수



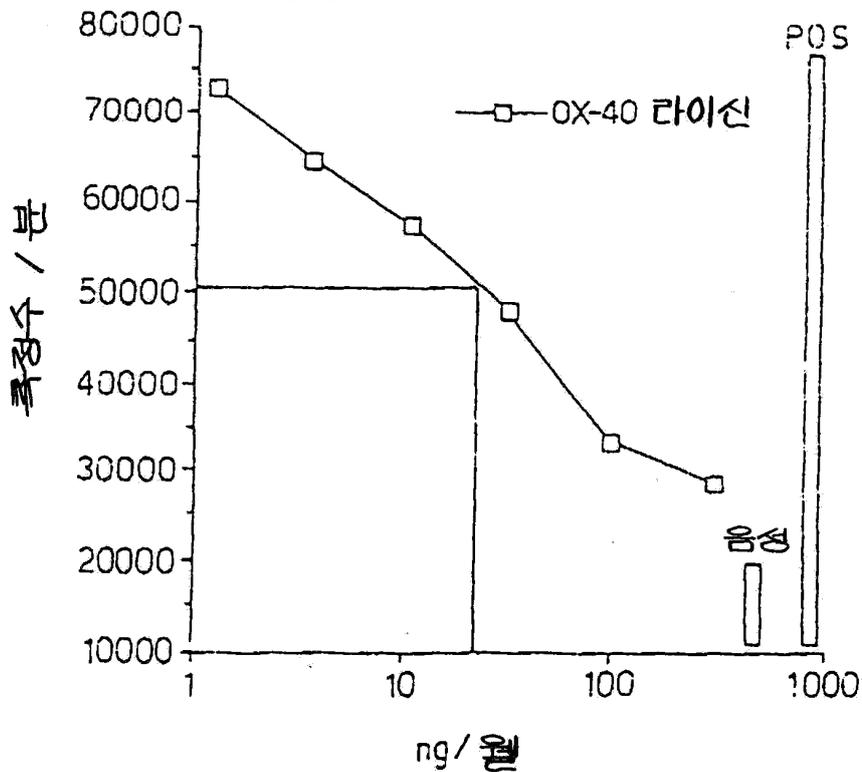
도면4

OX-40 분류: 칩수 대 림프절

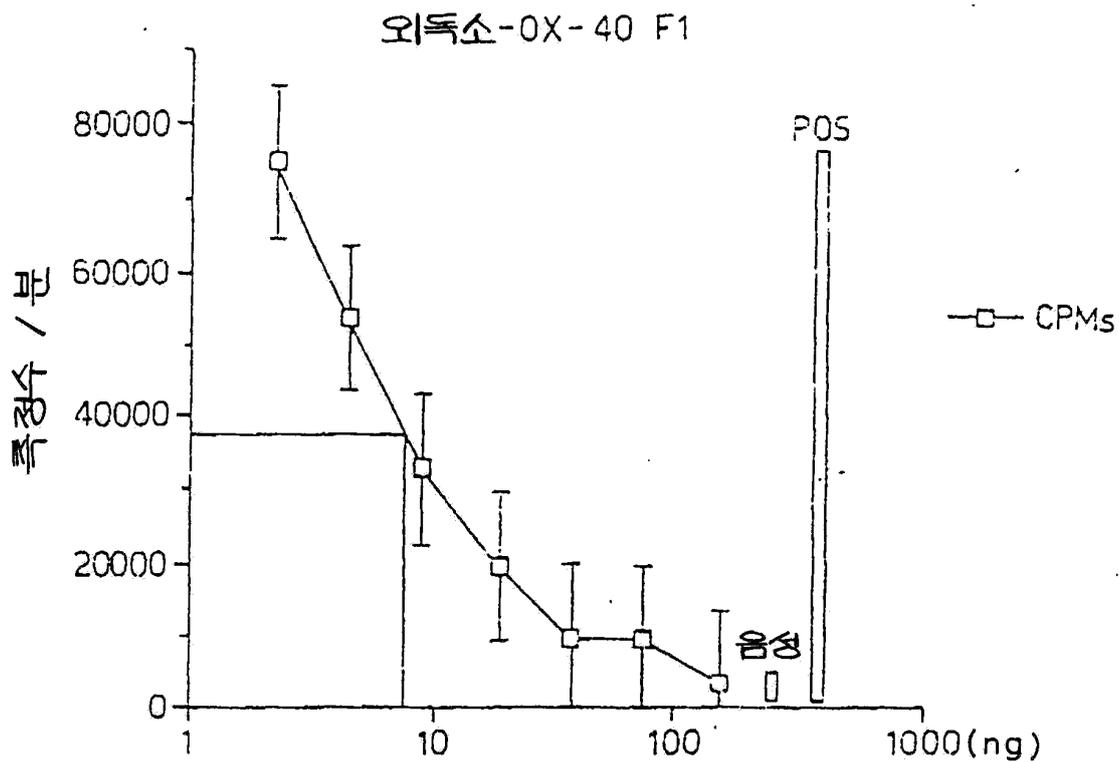


도면5

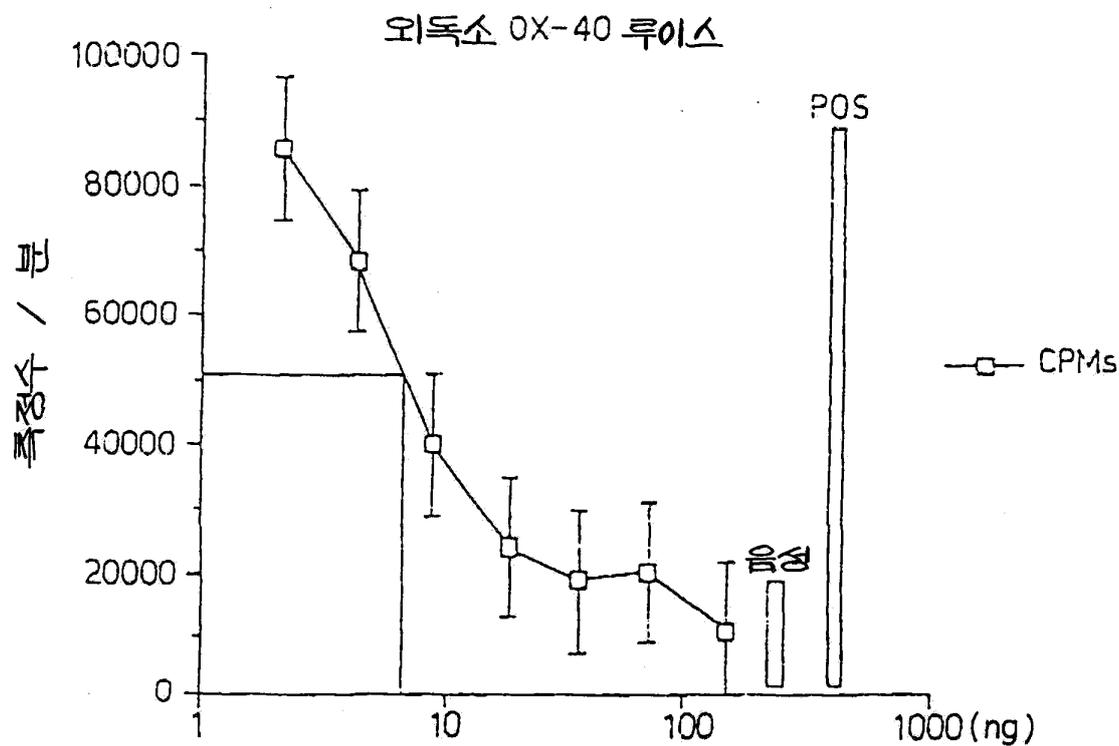
미엘린 염기성 단백질 T-세포 증식의 억제도



도면6a

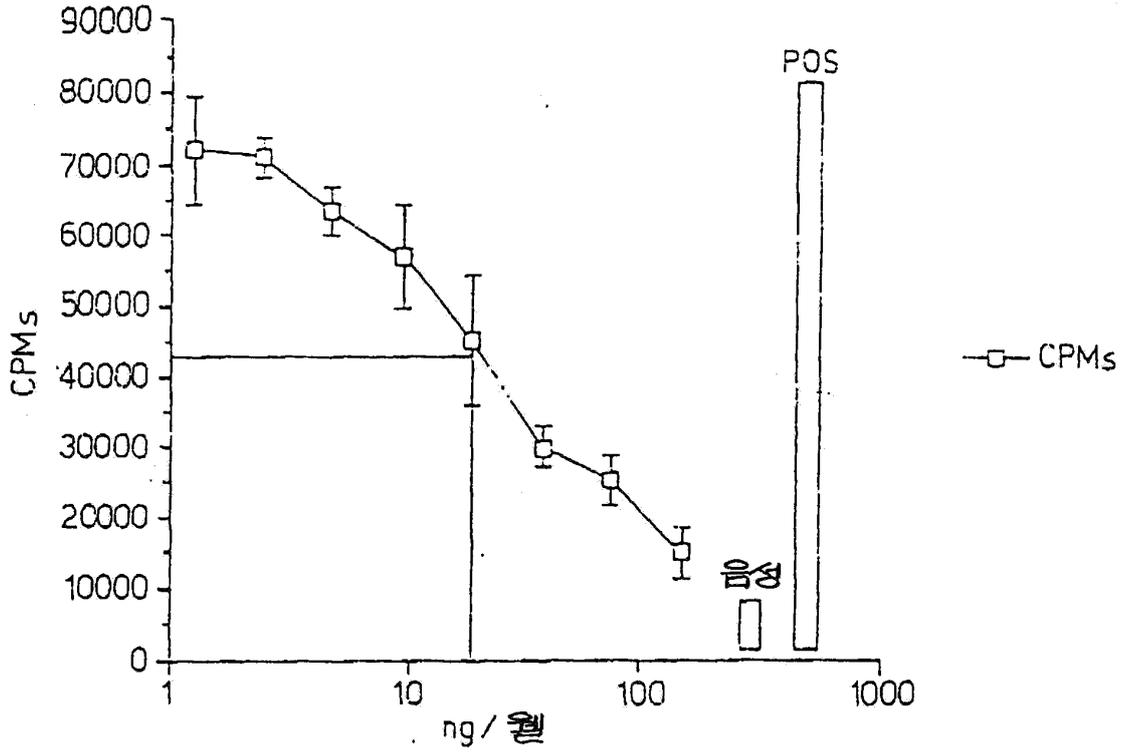


도면6b



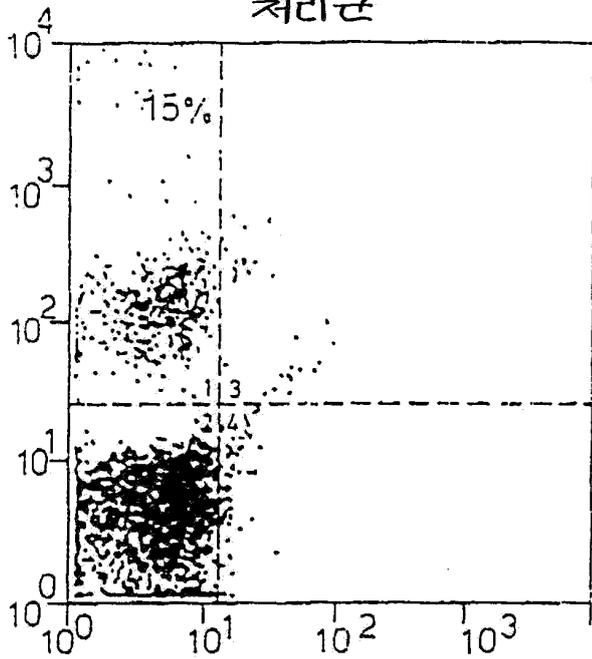
도면7

PPD T 세포 증식의 억제도

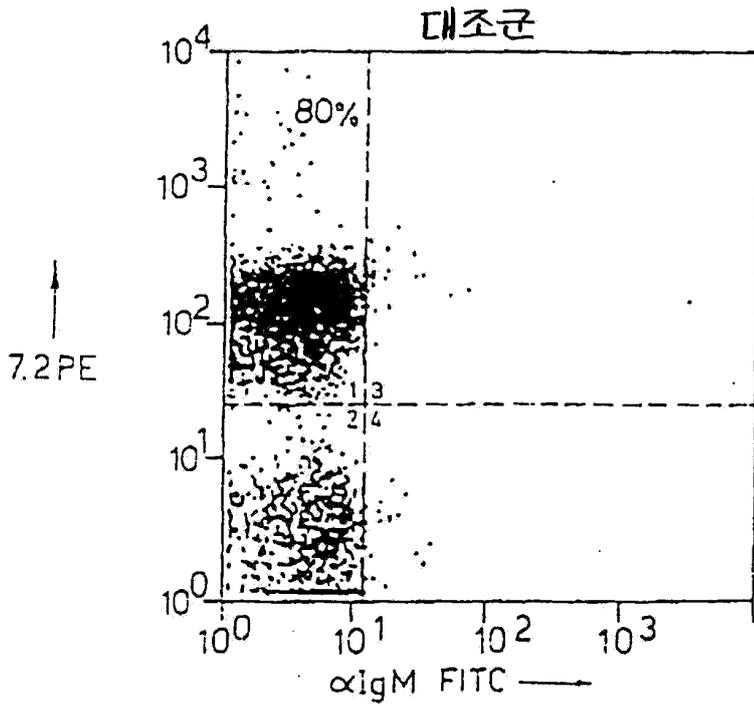


도면8a

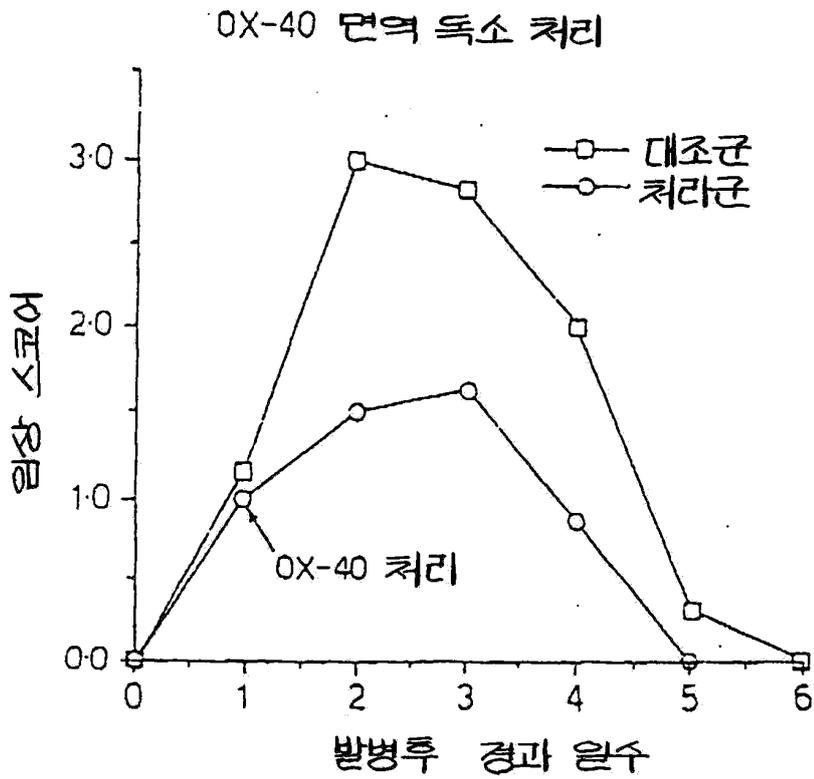
처리군



도면8b



도면9

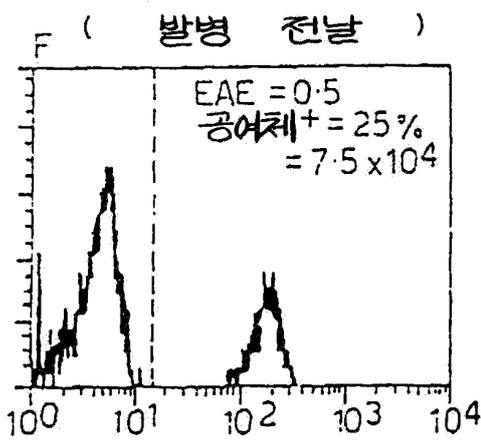
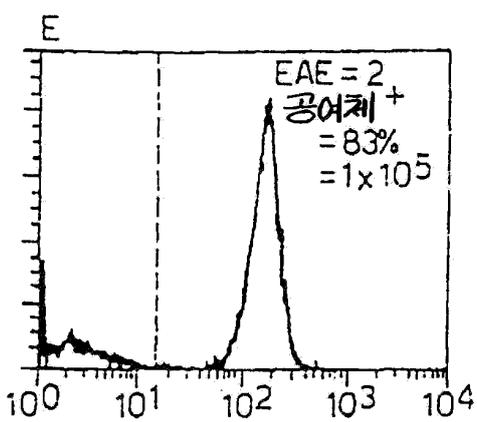
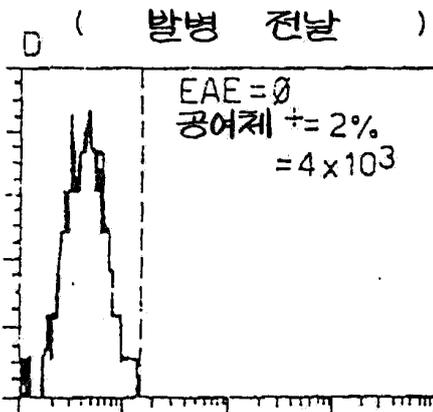
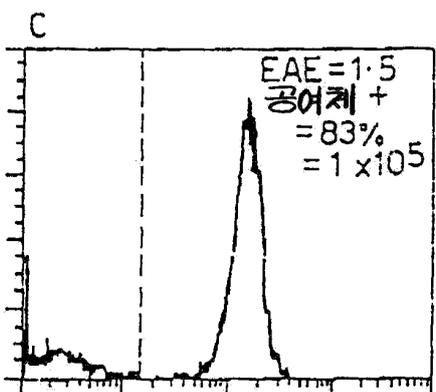
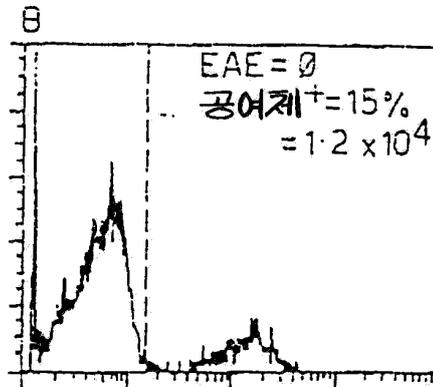
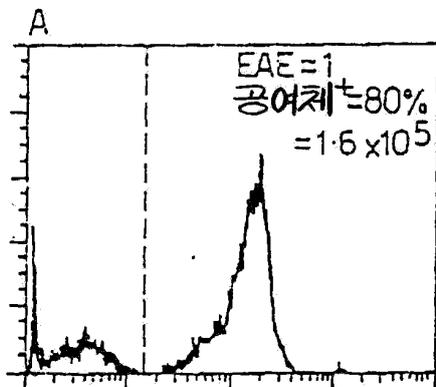


도면 10

척수에서 분리한 공여체⁺ T-세포에 대한
OX-40 면역 독소처리의 효과

대조군

척리군
(전이 당일)



RT 7.2 —

5B11a

ATG TGC GTG GGG GCT CGG CGG CTG GGC CGC GGG CCG TGT GCG GCT CTG CTC CTC GGC
 met cys val gly ala arg arg leu gly arg gly pro cys ala ala leu leu leu leu gly
 CTG GGG CTG AGC ACC GTG ACG GGG CTC CAC TGT GTC GGG GAC ACC TAC CCC AGC AAC GAC
 leu gly leu ser thr val thr gly leu his cys val gly asp thr tyr pro ser asn asp
 CGG TGC TGC CAC GAG TGC AGG CCA GGC AAC GGG ATG GTG AGC CGC TGC AGC CGC TCC CAG
 arg cys cys his glu cys arg pro gly asn gly met val ser arg cys ser arg ser gln
 AAC ACG GTG TGC CGT CCG TGC GGG CCG GGC TTC TAC AAC GAC GTG GTC AGC TCC AAG CCG
 asn thr val cys arg pro cys gly pro gly phe tyr asn asp val val ser ser lys pro
 TGC AAG CCC TGC ACG TGG TGT AAC CTC AGA AGT GGG AGT GAA CGG AAG CAG CTA TGC ACG
 cys lys pro cys thr trp cys asn leu arg ser gly ser glu arg lys gln leu cys thr
 GCC ACA CAG GAC ACA GTC TGT CGC TGC CGG GCG GGC ACC CAG TCC CTG GAC AGC TAC AAG
 ala thr gln asp thr val cys arg cys arg ala gly thr gln ser leu asp ser tyr lys
 CCT GGA GTT GAC TGT GCC CCC TGC CCT CCA GGG CAC TTC TCC CCA GGC GAC AAC CAG GCC
 pro gly val asp cys ala pro cys pro pro gly his phe ser pro gly asp asn gln ala

TGC AAG CCC TGG ACC ACC TGT ACC TTG GTT GGG AAG CAC ACC CTG CAG CCG GCC AGT AAT
 cys lys pro trp thr thr cys thr leu val gly lys his thr leu gln pro ala ser asn
 AGC TCG GAC GCA ATC TGT GAG GAC AGG GAC CCC CCA GCC ACG CAG CCC CAG GAG ACC CAG
 ser ser asp ala ile cys gln asp arg asp pro pro ala thr gln pro gln glu thr gln
 GGT CCC CCG GCC AGG CCC ATC ACT GTC CAG CCC ACT GAA GCC TGG CCC AGA ACC TCA CAG
 gly pro pro ala arg pro ile thr val gln pro thr glu ala trp pro arg thr ser gln
 GGA CCC TCC ACC CCG TCC GTG GAG GTC CCC GGG GGC CGT GCG GTT GCC GCC ATC CTG GGA
 gly pro ser thr arg ser val glu val pro gly gly arg ala val ala ala ile leu gly
 CTG GGA CTG CTG CTG GGG CTG CTG GCA CCC CTG GAC ATC CTG CTG GCC CTG TAC CTG ATC
 leu gly leu val leu gly leu leu gly pro leu asp ile leu leu ala leu leu tyr leu ile
 CGG AAG GAC CAG AAG CTG CCC CCC GAT GCC CAC AAG CCC CCT GGG GGA GGT AGC TTC CGG
 arg arg asp gln arg leu pro pro asp ala his lys pro pro gly gly gly ser phe arg
 ACC CCC ATC CAA GAG GAG CAG GCC GAC GCC CAC TCC ACC CTG GTC AAG TTC TGA
 thr pro ile gln gln glu gln gln ala asp ala his ser thr leu val lys phe opa

5B11b