(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년11월05일
(11) 등록번호 10-1566539
(24) 등록일자 2015년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0088647
(22) 출원일자 2012년08월13일
심사청구일자 2013년10월29일
(65) 공개번호 10-2013-0138064
(43) 공개일자 2013년12월18일
(30) 우선권주장
1020120061791 2012년06월08일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
WO2006078911 A2
WO2007133822 A1
WO2011028683 A1

(73) 특허권자
국립암센터
경기도 고양시 일산동구 일산로 323 (마두동)
(72) 발명자
권병세
경기도 고양시 일산서구 하이파크3로 61 402동 2503호 (덕이동, 하이파크시티 일산 파밀리에 4단지)
(74) 대리인
특허법인리온

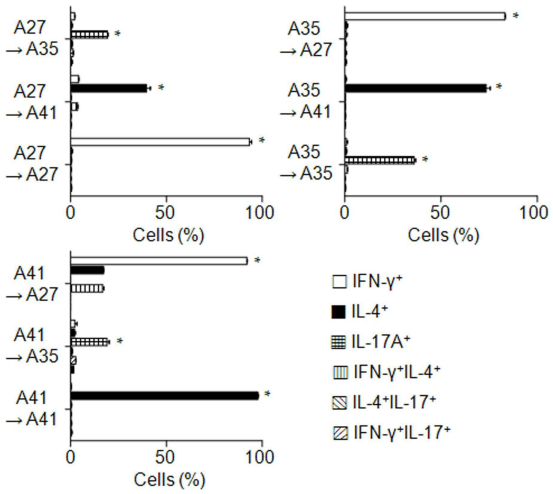
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **신규한 T h2 세포 전환용 에피토프 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 T 세포를 T_H2 세포(Helper T cell 2)로 전환하기 위한 에피토프에 관한 것으로서, 구체적으로 AITR(activation-inducible tumor necrosis factor receptor)의 세포 외 도메인(Extracellular domain, ECD)의 20번 내지 30번 아미노산 부위(서열번호 2)인 에피토프, 상기 에피토프를 인지하는 항체, 상기 에피토프를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 벡터가 도입된 형질전환체, 상기 항체를 포함하는, T 세포의 T_H2 세포로의 전환용 조성물 및 전환방법, 상기 항체를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 항체를 이용하여 자가면역질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 10317102
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오,의료기술개발사업
연구과제명 인간배아줄기세포로부터 면역세포의 분화 및 동물모델에서의 기능검증
기 여 율 1/1
주관기관 국립암센터
연구기간 2011.08.01 ~ 2012.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2로 기재된 AITR(activation-inducible tumor necrosis factor receptor)의 에피토프(epitope)를 특이적으로 인지하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 6으로 기재된 중쇄 CDR1(complementarity-determining region 1); 서열번호 7로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 8로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역과 서열번호 10으로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 11로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 12로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 것인 항체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항체는 서열번호 5로 기재된 중쇄 가변영역 아미노산 서열 및 서열번호 9로 기재된 경쇄 가변영역 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 4

서열번호 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, T 세포를 T_H2 세포(Helper T cell 2)로 전환하기 위한, AITR(activation-inducible tumor necrosis factor receptor)의 에피토프(epitope)인 폴리펩타이드.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제4항의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

제5항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 8

제7항의 벡터가 도입된 형질전환체.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체를 T 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관내(in vitro)에서 T 세포의 T_H2 세포(보조 T 세포 2)로의 전환 방법.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스성 관절염, 전신성 경피증, 전신 홍반성 낭창, 아토피 피부염, 건선, 원형탈모증, 천식, 크론씨병, 베체시병, 쇼그렌 증후군, 길리아-바레 증후군, 만성 갑상선염, 다발성 경화증, 다발성 근염, 강직성 척추염, 뇌척수염, 섬유조직염 및 결절성 다발성 동맥염으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 항체는 T 세포의 T_H2 세포(보조 T 세포 2)로 전환시키는 것을 특징으로 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 T 세포는 AITR(activation-inducible tumor necrosis factor receptor) 단백질을 발현하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 T 세포를 T_H2 세포(Helper T cell 2)로 전환하기 위한 에피토프에 관한 것으로서, 구체적으로 AITR(activation-inducible tumor necrosis factor receptor)의 세포 외 도메인(Extracellular domain, ECD)의 20번 내지 30번 아미노산 부위(서열번호 2)인 에피토프, 상기 에피토프를 인지하는 항체, 상기 에피토프를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 벡터가 도입된 형질전환체, 상기 항체를 포함하는, T 세포의 T_H2 세포로의 전환용 조성물 및 전환방법, 상기 항체를 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 항체를 이용하여 자가면역질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] TNFR 슈퍼 패밀리(tumor necrosis factor receptor superfamily)에 속하는 다양한 수용체들은 세포 증식, 분화, 사멸에 연관되어 있고, 면역 반응의 발달, 종양 사멸 및 자가면역 질환에 대한 보호 등에 있어 중요한 역할을 수행하고 있다. 상기 TNFR 슈퍼 패밀리에 속하는 수용체의 예로, CD28, 4-1BB, OX40, CD40 또는 CD27이 있다.

[0003] 인간 활성-유도성 종양 괴사 인자 수용체(activation-inducible tumor necrosis factor receptor, AITR)는

TNFR 슈퍼 패밀리의 한 구성원으로서, GITR(glucocorticoid-induced TNFR-related protein), TNFRSF18(Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18) 또는 CD357로도 명명된다. AITR은 제1형TNFR 슈퍼 패밀리에 속하는 막관통 단백질(transmembrane protein)이다. 면역 조절 T 세포(T_{reg} 세포 또는 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포)는 AITR을 지속적으로 높은 수준으로 발현하고, 말초혈액 단핵세포(PBMCs, peripheral blood mononuclear cell)가 활성화되면 GITR을 빠르게 높인다. 특히, AITR을 통한 신호전달은 T_{reg} 세포의 억제 기능(suppressive function)을 저해시키는 것으로 알려져 있고, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 T_{reg} 세포의 억제에 대한 저항성을 높여, 상기 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포들을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 또한, GITR에 특이적으로 결합하는 단일클론항체(예:DTA-1) 또는 이것의 생리학적 리간드인 GITRL는 *in vivo*의 다양한 모델에서 항암 면역(antitumor immunity)을 강화시키는 것으로 알려져 있다. 반면, GITR의 활성은 자가면역반응에서는 자가반응성 T 세포를 억제하는 능력을 가진 T_{reg} 세포을 억제하여 자가면역 반응을 촉진하기도 한다고 알려져 있다.

[0004] AITR 및 AITR 리간드에 대한 생물학적 기능에 대한 정보는 아직 많이 밝혀지지 않았으나, AITR은 휴지기 T 세포(resting T cell)에서 낮은 수준으로 발현되나, T 세포가 활성화된 후에는 그 발현이 급격히 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한, 요추 디스크 탈출증(lumber disc herniation) 환자에서 탈출된 디스크 조직의 세포에서 AITR의 발현 수준이 증가되어 있으며, 활성 전신성 홍반성 루프스(active systemic lupus erythematosus)와 같은 자가면역 질환을 가진 환자의 T_{reg} 세포에서 AITR의 발현 수준이 높은 것으로 알려져 있다.

[0005] AITR은 TRAF(TNFR-associated factor)1, TRAF2 및 TRAF3과 같은 TRAF 단백질들과 결합하며, AITR에 리간드가 상호작용하는 경우, 세포 내에서 TRAF2를 동원하고, 결국 NF-kB/NIK를 활성화시키는 것으로 알려져있다(Kwon, B. et al., J Biol Chem 274, 6056-6061, 1999). TRAF 단백질들은 세포 내 어댑터 단백질 종류에 속하며, 세포 밖 증식(extracellular proliferation), 분화, 활성화 및 이동 신호 전달에 관여한다. TRAF 단백질의 N-말단 지역은 매우 다양하며, TRAF1을 제외한 모든 TRAF 단백질들은 RING-핑커 모티프(RING-finger motif)를 N-말단에 가진다. RING-핑거는 TRAF에 의해 매개되는 신호전달에 매우 필수적인 것으로 알려져 있다. 6 종류의 모든 TRAF 단백질들에 대한 유전자를 마우스에서 유전자 타겟팅으로 결실시킨 결과, 다양한 표현형을 나타내어, TRAF 단백질이 매우 다양한 생물학적 기능을 할 것이라고 알려진바 있다(Ha, H., Curr Protoc Immunol. Chapter 11:Unit11.9D, 2009).

[0006] NFAT(nuclear factor of activated T cells)로 알려진, Ca^{2+} 의존성 전사인자는 T 세포뿐만 아니라, 많은 종류의 성장 인자, 사이토카인을 조절하는 것으로 알려져 있다. 또한, 세포 간 상호작용 분자(cell-to-cell interaction molecule)로서 다양한 세포 및 기관에서 형태발생(morphogenesis), 발생(development) 및 여러 기능에 관여하고 있다. 최근, NFAT는 T-bet(T_H1), GATA-3(T_H2), RORγt(T_H17) 및 Foxp3(T_{reg})와 같은 T_H 계통특이적인 전사인자(T_H lineage specific transcription factor)의 전사조절을 통하여 T_H 계통으로의 분화 및 기능 조절을 유도하는 특정 유전자 프로그램의 중요한 인자로 알려져 있다. 또한, NFAT 패밀리는 다양한 사이토카인 및 이들의 사이토카인 수용체의 전사를 조절한다고 보고된바 있다(Macian, F. Nat Rev Immunol. 5, 472-484, 2005).

[0007] $CD4^+$ T 세포의 운명을 결정하는 데 있어 가장 중요한 요인 중 하나는 미접촉 TCR에 의한 $CD4^+$ T 세포(naive $CD4^+$ T cell)가 활성화될 때 존재하는 주변의 사이토카인 환경이다. 사이토카인에 의해 유도되는 주요한 신호전달경로는 STAT(signaling transducer and activator of transcription) 패밀리 단백질의 활성화이다. 상기 STAT 단백질들은 T_H 세포의 분화 및 확장(expansion)에 있어 중요한 역할을 하며, 특히, IFN-γ/NFAT1/STAT-1 경로는 T_H1 세포로 분화하게 하는 전사인자 T-bet을 활성화시키고, NFAT1/STAT-3 경로는 T_H17 세포로 분화하게 하는 전사인자 RORγt를 활성화시킨다. 또한, IL-4/NFAT2/STAT-6 경로는 T_H2 세포로 분화하게 하는 GATA-3를 활성화시키고, NFAT1/STAT-5 경로는 T_{reg} 세포로 분화하게 하는 Foxp3를 활성화를 촉진시킨다. 이렇게 복잡한 세포 내 신호전달 캐스케이드(cascade)가, T_H 세포의 분화 및 기능 결정에 있어 주요하게 작용하게 된다.

[0008] 비접촉 T 세포(naive CD4 T cell)는 T_H1, T_H2, T_H17 및 유도된 T_{reg} 세포, 4가지로 분화될 수 있는 가능성을 가지고 있다. 상기 T 세포들은 각기 다른 기능을 수행하며, 그 중 IL-4, 5, 9, 10, 13, 25 등을 생산하는 T_H2 세포

는 기생충(helminths)과 같은 세포외 기생충에 대한 면역 반응을 매개하는 것으로 알려져 있다. 또한, T_{reg} 세포는 면역 반응의 조절에 관여하며, 자기관용(self-tolerance)을 유지하는 것에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 상기 T_{reg} 세포의 수를 증가시키거나 T_{reg} 세포의 억제 기능(suppressive function)을 촉진시키는 것은 자가면역 질환의 치료 및 동종이식 거부(allograft rejection)의 예방에 있어서 중요한 요소로 알려져 있다(Jinfang Zhu et al., Blood, 112, 1557-1569, 2008).

[0009] 이에 본 발명자들은, 다양한 T 세포를 T_H2 세포로 전환시킬 수 있는 AITR의 신규한 에피토프를 규명하였고, 상기 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체가 T 세포를 T_H2 세포로 효율적으로 전환시킬 수 있을 뿐만 아니라, T_{reg} 세포에서는 TGF-β 생산을 촉진시킬 수 있음을 확인하였다. 이에 본 발명의 항체가 T_H2 세포로의 전환 및 자가면역질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, T 세포를 T_H2 세포로 전환하기 위한, AITR(activation-inducible tumor necrosis factor receptor)의 에피토프(epitope)인 폴리펩타이드를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 2로 기재된 AITR의 에피토프를 특이적으로 인지하는 항체를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 에피토프 또는 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터가 도입된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는, T 세포의 T_H2 세포로의 전환용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 T 세포에 처리하는 단계를 포함하는, T 세포의 T_H2 세포로의 전환 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항체를 이용하여 자가면역질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열로 정의되는, T 세포를 T_H2 세포(Helper T cell 2)로 전환하기 위한, AITR(activation-inducible tumor necrosis factor receptor)의 에피토프(epitope)인 폴리펩타이드를 제공한다.

[0019] 본 발명에서 용어, "AITR(activation-inducible tumor necrosis factor receptor)"은 TNFR 슈퍼 패밀리에 속하는 수용체의 일종을 의미하며, GITR(glucocorticoid-induced TNFR-related protein), TNFRSF18(tumor necrosis factor receptor superfamily member 18) 또는 CD357과 혼용될 수 있다. 상기 AITR 은 바람직하게는 인간 AITR을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. AITR에 대한 정보는 NCBI GenBank와 같은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 NP_004186일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 AITR은 활성화된 T 세포 또는 T_{reg} 세포에서 지속적으로 높은 수준으로 발현한다.

[0020] 본 발명에서 용어, "에피토프(epitope)"란, 항원 분자에 존재하는 항원 특이성을 결정하는 부위를 의미하며, 항

원결정기 또는 항원결정부위와 혼용되어 사용될 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 에피토프는 AITR의 세포 외 도메인의 20번 내지 30번 부위로서, T 세포를 T_H2 세포로 전환시킬 수 있거나 T_{reg} 세포의 억제 기능(suppressive function)을 강화시킬 수 있는 부위를 의미하나, 동일한 활성을 나타내는 부위인한, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 활성과 동일한 활성을 나타내는 서열인한, 상기 서열과 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 서열도 제한없이 포함될 수 있다. 상기 AITR의 세포 외 도메인의 20번 내지 30번 부위를 도 3 및 표 2에 나타내었고, 서열번호 2로 명명하였다. 서열번호 2의 아미노산 서열로 기재된 에피토프가 T 세포를 T_H2 세포로 전환시키거나 T_{reg} 세포의 억제 기능을 강화시킬 수 있는 부위임은 본 발명자들에 의해서 최초로 규명되었다. 본 발명자들은 139개의 아미노산으로 이루어진 AITR의 세포 외 도메인(서열번호 1)에서 T 세포를 T_H2 세포로 특이적으로 전환시킬 수 있는 특정 부위를 찾기 위하여 예의 노력한 결과, 서열번호 2로 기재된 20번 내지 30번 아미노산 부위를 에피토프로 하는 경우, 특이적으로 T_H2 세포로 전환시킬 수 있음을 확인하였다. 20번 내지 30번 아미노산 부위에 인접한 다른 부위의 경우에는 T_H2 세포로의 전환 활성을 보여주지 않아, 상기 부위가 T_H2 세포로 전환에 있어 매우 특이적인 부위임을 규명하였다(실험예 2 및 4 내지 8).

[0021] 본 발명에서 용어, "T 세포를 T_H2 세포(Helper T cell 2)로 전환"이란, 서열번호 2로 기재된 AITR의 특정 에피토프에 항체가 결합하거나 특이적인 비항체 단백질 등이 결합하여 T 세포를 T_H2 세포로 전환하는 것을 의미하며, 바람직하게는 T 세포에 존재하는 서열번호 2로 기재된 AITR의 에피토프에 항체가 결합하여 IL-4를 생산하는 T_H2 세포로 전환시키는 것을 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 T_H2 세포는 1L-4를 생산하는 면역 세포로서, 세포외 기생충 등에 대한 면역 반응을 매개하는 세포로 알려져 있다. 따라서 T 세포를 T_H2 세포로 전환시킬 수 있는 본 발명의 서열번호 2로 기재된 AITR의 에피토프인 폴리펩타이드는 T_H2 세포 전환용 항체 등의 개발에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

[0022] 상기 T 세포의 T_H2 세포로의 전환에서, 상기 T 세포는 다양한 종류의 T 세포를 포함하며, 그 예로 $CD4^+$ T 세포, T_H1 세포 또는 T_H17 세포가 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 $CD4^+$ T 세포가 T_H2 세포로 전환될 수 있음을 확인하였고(도 4 및 도 6), 뿐만 아니라 계열이 정해진 T_H1 세포 또는 T_H17 세포가 본 발명의 상기 서열번호 2의 에피토프에 결합하는 대표적인 항체인 A41에 의해 T_H2 세포로 전환될 수 있음을 확인하여(도 10 및 11), 본 발명의 서열번호 2의 AITR의 에피토프가 다양한 T 세포의 T_H2세포로의 전환에 중요한 부위임을 확인하였다.

[0023] 상기 T_{reg} 세포의 T_H2 세포로의 전환에는 T_H2 분화에 관련된 신호전달경로 및 전사인자가 관련한다. 특히, Foxp3 전사인자는 T_{reg} 세포에 특이적인 세포내 마커로서, T_{reg} 세포가 T_H2 세포로 분화되는 경우에는 Foxp3의 세포 내 수준이 저하될 수 있다. 반면, T_H2 세포의 분화에 관여하는 전사인자인 GATA-3는 IL-4/NFAT2/STAT-6 경로 등에 의하여 그 수준이 증가된다.

[0024] 본 발명에서 용어, "T_{reg} 세포의 억제 기능(suppressive function)"이란, 면역반응을 억제하는 기능으로서, CD8+ T 세포, NK(natural killer) 세포, B 세포와 같은 다양한 종류의 면역세포들의 활성, 증식 또는 기능을 억제할 수 있는 것을 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 T_{reg} 세포는 면역 시스템을 저하(down-regulation)시킬 수 있는 T 세포의 일종을 의미하며, T_{reg} 세포, $CD4^+CD25^{high}$ 세포 또는 $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ 세포와 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 T_{reg} 세포는 자연 조절 T 세포(natural or constitutive regulatory T cell) 및 적응 조절 T 세포(adaptive or inducible regulatory T cell)를 모두 포함한다.

[0025] 상기 T_{reg} 세포의 억제 기능은 다양한 경로를 통해 수행될 수 있다. 구체적으로, ⅰ) IL-10, IL-35 또는 TGF-β와 같은 억제 사이토카인을 분비하여 면역 반응을 억제하거나, ii) CTLA4를 통하여 이펙터 T 세포 또는 APC에 발현하는 CD80/CD86과 결합하여 이들의 기능을 억제하거나, iii) 미접촉 T 세포에 존재하는 IL-2 수용체보다 현저하게 높은 친화도를 가지는 IL-2 수용체로 IL-2가 미접촉 T 세포의 수용체에 결합하는 것을 막음으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 2의 에피토프를 특이적으로 인지하는 본 발명의 대표적인 항체인 A41에 의하여, T 세포가 T_H2 세포로 분화됨을 확인하였다. 특히, 서열번호 2의 에피토프 이외의 부위를 인지하는 AITR에 특이적인 항체의 경우에는 상기와 같은 전환 효과를 나타내지 못하였다. 구체적으로, 56번 내지 65번 아미노산 부위를 인지하는 A27과 41번 내지 50번 아미노산 부위를 인지하는 A35 항체는 에피토프 부위가 AITR의 세포 외 도메인 20번 내지 30번 부위와 근접함에도 불구하고, T_H2 세포로 전환효과를 가져오지 못하였다(도 3 및; 도 10 내지 도 12). 특히, A27 또는 A35를 처리하여 특정 사이토카인을 분비하는 세포로 전환시켰더라 하더라도, 본 발명의 서열번호 2의 에피토프를 인지하는 대표적인 항체인 A41 항체를 처리하는 경우, 다시 IL-4를 분비하는 세포로 전환되었다. 이러한 결과는 서열번호 2의 에피토프가 T_H2 세포로의 전환에 있어 매우 중요한 부위임을 시사하는 결과이다(도 10 및 11). 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 2의 에피토프를 통한 T_H2 세포로의 전환에 대한 분자적인 메커니즘을 규명하였다. T_H2 세포로의 전환에 있어, NFAT2가 관여하며, STAT-5 및 6 단백질의 인산화 수준을 증가시킴을 확인하였다(도 7 내지 9). 또한, 본 발명의 대표적인 항체 A41은 T_H2 세포에 특이적인 마커인 GATA-3를 증가시킴을 보여(도 7 D), 이를 통하여 T 세포를 T_H2 세포로 효율적으로 전환시킬 수 있음을 확인하였다.

[0027] 또 다른 양태로서, 본 발명은 서열번호 2의 AITR의 에피토프를 특이적으로 인지하는 항체를 제공한다.

[0028] 본 발명에서 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미하며, 다클론항체, 단일클론항체, 전체(whole) 항체 및 항체 단편을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 이가(bivalent) 또는 양특이성 분자(예를 들어, 양특이성 항체), 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디를 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG를 포함하며, IgG는 아형(subtype)으로, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 상기 항체 단편은 항원결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 등을 포함한다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')2 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중쇄Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')2 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 용어, "단일클론항체"는 실질적으로 동일한 항체 집단에서 수득한 단일 분자 조성의 항체 분자를 지칭하고, 이러한 단일클론항체는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.

[0030] 전형적으로, 면역글로불린은 중쇄 및 경쇄를 가지며 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역(상기 부위는 도메인으로 또한 알려져 있음)을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은, 상보성 결정 영역(complementarity-determining region, 이하 "CDR"이라 함)이라 불리우는 3개의 다변가능한 영역 및 4개의 구조 영역(framework region)을 포함한다. 상기 CDR은 주로 항원의 에피토프(epitope)에 결합하는 역할을 한다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 불리우고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.

[0031] 본 발명에서 용어, "인간 항체"는 인간 면역글로불린으로부터 유래하는 분자로서, 상보성 결정영역, 구조 영역을 포함한 항체를 구성하는 모든 아미노산 서열 전체가 인간 면역글로불린의 아미노산 서열로 구성되어 있는 것을 의미한다. 인간 항체는 통상적으로 인간의 질병의 치료에 사용되는데, 이는 3가지 이상의 잠재적인 장점을 가질 수 있다. 먼저, 이는 인간 면역 체계와 보다 양호하게 상호작용하여, 예를 들어 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 또는 항체-의존성 세포성 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)에 의하여 목적 세포를 보다 효율적으로 파괴시킬 수 있다. 둘째로, 인간 면역 체

계가 상기 항체를 외래의 것으로 인식하지 않는 이점이 있다. 셋째로, 더 적은 양, 보다 적은 빈도의 약물을 투여하였을 때에도 인간 순환계 내 반감기가 천연 발생 항체와 유사하다는 이점이 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 2의 에피토프를 특이적으로 인지하는 인간 단일클론항체가 AITR에 대하여 강한 친화력을 나타내며, T 세포를 T_H2 세포로 효과적으로 전환시킬 수 있음을 확인하였으며, T_{reg} 세포의 억제 기능을 강화시킬 수 있음을 확인하였다(도 1 및 10 내지 12). T 세포의 T_H2 세포로의 전환 및 T_{reg} 세포의 억제 기능 강화 효과를 가지는 본 발명의 항체는 중쇄 및 경쇄 도메인 모두가 인간 유래이기 때문에 낮은 면역원성을 나타내므로 의 치료에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명에서 용어, "서열번호 2의 AITR(activation-inducible tumor necrosis factor receptor)의 에피토프를 특이적으로 인지하는 항체"는 서열번호 2의 에피토프를 특이적으로 인지하여 T 세포를 T_H2 세포로 전환시키거나 T_{reg} 세포의 억제 기능을 강화시킬 수 있는 항체를 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 항체는 특히 T_{reg} 세포의 억제 기능, 예컨대 억제 사이토카인인 TGF-β 생산을 증대시킴으로써 자가면역질환의 예방 또는 치료 및; 면역 증강에 있어서 유용하게 사용될 수 있다.

[0033] 상기 서열번호 2로 기재된 에피토프를 특이적으로 인지하는 항체는 바람직하게는 서열번호 6으로 기재된 중쇄 CDR1(complementarity-determining region 1); 서열번호 7로 기재된 중쇄 CDR2; 및 서열번호 8로 기재된 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역과 서열번호 10으로 기재된 경쇄 CDR1; 서열번호 11로 기재된 경쇄 CDR2; 및 서열번호 12로 기재된 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 5로 기재된 중쇄 가변영역 아미노산 서열 및 서열번호 9로 기재된 경쇄 가변영역 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 서열번호 5로 기재된 중쇄 가변영역 아미노산 서열 및 서열번호 9로 기재된 경쇄 가변영역 아미노산 서열을 포함하는 인간 단일클론항체를 A41로 명명하였다. 또한, 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 13으로 기재된 중쇄 가변영역 핵산 서열 및 서열번호 14로 기재된 경쇄 가변영역 핵산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 또한, 본 발명의 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 불변 영역을 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명에서 용어, "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 불변 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 그 예로, IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 불변 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 불변 영역으로부터 이량체 또는 다량체를 형성할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 용어, "하이브리드(hybrid)"란 단쇄 면역 글로불린 중쇄 불변 영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 중쇄 불변 영역에 해당하는 서열이 존재함을 의미하며, 그 예로 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하다. 한편, IgG의 아형인 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 중쇄 불변영역의 조합 또는 혼성화도 가능하다. 상기 조합 및 혼성화에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0037] 또한, 본 발명의 항체가 경쇄 불변영역을 포함하는 경우, 상기 경쇄 불변영역은 람다(λ) 또는 카파(κ) 경쇄 유래일 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 2의 AITR의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체인 A41을 인간 항체 라이브러리로부터 선별해내었으며(실험예 1), AITR에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였고(도 1), 상기 항체들이 인지하는 AITR 세포 외 도메인 부분을 규명하였다(도 3 및 표 2). 또한, 상기 항체들이 다른 AITR의 부위를 인지하는 항체들과 달리, T 세포를 T_H2 세포로 전환시킬 수 있으며, 이미 특정 T 세포로 분화된 경우에도 T_H2 세포로 다시 전환시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 7 내지 8, 및 도 10 및 11). 또한, T_{reg} 세포에 본 발명의 항체가 작용하는 경우에는 T_{reg} 세포의 TGF-β 생산량을 증가시켜 T_{reg} 세포의 억제 기능을 강화시킬 수 있음을 확인하였다(도 12 B). 이러한 결과는 본 발명의 서열번호 2의 에피토프를 인지하는 AITR에 특이적인 항체가 T 세포의 T_H2 세포로의 효율적인 전환 및 T_{reg} 세포의 억제 기능 강화를 통한 자가면역질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 뒷받침하는 결과이다.

[0039] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0040] 본 발명의 항체는 공지의 항체 제조기술로 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 단일클론항체를 제조하는 방법은 면역된 동물로부터 얻은 B 림프구를 사용하여 하이브리도마를 제조함으로써 수행될 수 있거나(Koeher and Milstein, 1976, Nature, 256:495), 파아지 디스플레이(phage display) 기술을 이용함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 다클론항체의 제조방법은 공지의 항체 제조기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있으며, 본 발명의 에피토프를 포함하는 항원을 이용하여 제조할 수 있다.

[0041] 파아지 디스플레이 기술을 이용한 항체 라이브러리는 하이브리도마를 제작하지 않고 바로 B 림프구로부터 항체 유전자를 얻어 파아지(phage) 표면에 항체를 발현시키는 방법이다. 파아지 디스플레이 기술을 이용하면 B-세포 불멸화(immortalization)에 의해 단일클론항체를 생성하는데 관련된 기존의 많은 어려움이 극복될 수 있다. 일반적으로 파아지 디스플레이 기술은 1) 파아지의 외피 단백질(coat protein) pⅢ (또는 pⅣ) N-말단에 해당하는 유전자 부위에 무작위 서열의 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 삽입하는 단계; 2) 천연형의 외피 단백질 일부와 상기 무작위 서열의 올리고뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 융합 단백질을 발현시키는 단계; 3) 상기 올리고뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드와 결합할 수 있는 수용체 물질을 처리하는 단계; 4) 수용체에 결합된 펩티드-파아지 입자들을 낮은 pH나 결합 경쟁력 있는 분자를 이용하여 용출시키는 단계; 5) 패닝(panning)에 의하여 용출된 파아지를 숙주 세포 내에서 증폭시키는 단계; 6) 원하는 양을 얻기 위해 상기 방법을 반복하는 단계; 및 7) 패닝에 의해 선별된 파지 클론들의 DNA 서열로부터 활성이 있는 펩티드의 서열을 결정하는 단계로구성된다.

[0042] 바람직하게 본 발명의 단일클론항체의 제조방법은 파아지 디스플레이 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 당업자는 공지의 파아지 디스플레이 기술, 예를 들어 Barbas 등(METHODS : A Companion to Methods in Enzymology 2:119, 1991 및 J. Virol. 2001 Jul;75(14):6692-9) 및 Winter 등(Ann. Rev.Immunol. 12:433, 1994) 의 논문 등에 공지된 방법을 참고하여 상기 본 발명의 제조방법의 각 단계를 용이하게 수행할 수 있다. 항체 라이브러리를 구축하기 위해 사용될 수 있는 파아지는, 예를 들어 필라멘트성 파아지(filamentous phage)로 fd, M13, f1, If1, Ike, Zj/Z, Ff, Xf, Pf1 또는 Pf3 파아지가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 필라멘트성 파아지의 표면상에 이종 유전자의 발현을 위해 사용될 수 있는 벡터에는 예를 들어, fUSE5, fAFF1, fd-CAT1 또는 fdtetDOG 등의 파아지 벡터 또는 pHEN1, pComb3, pComb8 또는 pSEX 등의 파아지미드 벡터가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 증폭을 위한 재조합 파아지의 성공적인 재감염을 위해 요구되는 야생형 외피 단백질을 제공하기 위해 사용될 수 있는 헬퍼 파아지에는, 예를 들어 M13K07 또는 VSCM13 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 하이브리도마 유래의 단일클론항체 또는 파아지 디스플레이 클론을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 통상적인 절차를 사용하여 쉽게 단리되고 서열분석될 수 있다. 그 예로, 하이브리도마 또는 파아지 주형 DNA로부터 당해 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 디자인된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용할 수 있다. 일단 상기 폴리뉴클레오티드가 단리되면, 이를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 그 후 상기 발현 벡터를 적당한 숙주세포에 도입하여, 형질전환된 숙주세포(즉, 형질전환체)로부터 원하는 단일클론항체을 생산할 수 있다. 따라서 본 발명의 상기 항체의 제조 방법은 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 증폭시키는 단계를 포함하는, 항체의 제조방법일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0044] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 에피토프 또는 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

[0045] 상기 항체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0046] 본 발명에서 제공하는 상기 에피토프 또는 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 특별히 이에 제한되지 않으나, 포유류 세포(예를 들어, 사람, 원숭이, 토끼, 래트, 햄스터, 마우스 세포 등), 식물 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 등)를 포함하는 진핵 또는 원핵세포에서 상기 폴리뉴클레오티드를 복제 및/또는 발현할 수 있는 벡터가 될 수 있고, 바람직하게는 숙주세포에서 상기 뉴클레오티드가 발현될 수 있도록 적절한 프로모터에 작동가능하도록 연결되며, 적어도 하나의 선별마커를 포함하는 벡터가 될 수 있다. 그 예로 파아지, 플라스미드, 코스미드, 미니-염색체, 바이러스 또는 레트로바이러스벡터 등에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 형태가 될 수 있다.

[0047] 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터는 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 포함하는 발현벡터 또는 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하는 발현

벡터일 수 있다.

[0048] 본 발명에서 제공하는 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현벡터가 도입되어 형질전환된 대장균, 스트렙토미세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류세포; 드로조필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO(중국 햄스터 난소 세포, chinese hamster ovary cells), SP2/0(마우스 골수종), 인간 림프아구(human lymphoblastoid), COS, NSO(마우스 골수종), 293T, 보우 멜라노마 세포, HT-1080, BHK(베이비 햄스터 신장세포, baby hamster kidney cells), HEK(인간 배아신장 세포, human embryonic kidney cells), PERC.6(인간망막세포) 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 용어, "도입"은 상기 에피토프 또는 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포에 전달하는 방법을 의미한다. 이와 같은 도입은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 트랜스펙션법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포좀 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당 분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 형질도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 입자를 사용하여 목적물을 세포 내로 전달시키는 것을 의미한다. 아울러, 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 본 발명에서 도입은 형질전환과 혼용되어 사용될 수 있다.

[0050] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 포함하는, T 세포의 T_H2 세포로의 전환용 조성물을 제공한다.

[0051] 상기 항체, T 세포, T_H2 세포 및 T 세포의 T_H2 세포로의 전환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 본 발명의 서열번호 2의 AITR의 에피토프를 특이적으로 인지하는 항체는 T 세포를 T_H2 세포로 특이적으로 전환시킬 수 있으므로, 상기 항체를 포함하는 조성물은 T 세포의 T_H2 세포로의 전환에 있어 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 이미 분화가 완료된 세포를 다시 T_H2 세포로 전환시킬 수 있으므로 목적에 따라 다양하게 이용될 수 있다.

[0052] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 T 세포에 처리하는 단계를 포함하는, T 세포의 T_H2 세포로의 전환 방법을 제공한다.

[0053] 상기 항체, T 세포, T_H2 세포 및 T 세포의 T_H2 세포로의 전환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 본 발명의 항체를 T 세포, 예컨대 $CD4^+$ T 세포, T_H1 세포 또는 T_H17 세포에 처리하는 경우 T_H2 세포로 효과적으로 전환되므로, 상기 항체를 이용하여 T 세포를 T_H2 세포로 전환시켜 T_H2 세포가 필요한 질병 등에 있어서 유용하게 사용할 수 있다.

[0054] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0055] 상기 항체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0056] 본 발명에서 용어, "자가면역질환"은 병적인 개체의 자체 항원에 대한 면역 반응이 직간접적 원인으로 나타나는 질환을 총칭하는 의미로서, 그 종류에 제한없이 포함되나, 그 예로 류마티스성 관절염, 전신성 경피증, 전신 홍반성 낭창, 아토피 피부염, 건선, 원형탈모증, 천식, 크론씨병, 베체시병, 쇼그렌 증후군, 길리아-바레 증후군, 만성 갑상선염, 다발성 경화증, 다발성 근염, 강직성 척추염, 뇌척수염, 섬유조직염 또는 결절성 다발성 동맥염일 수 있다.

[0057] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 자가면역질환을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0058] 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 자가면역질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0059] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0061] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0062] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0063] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0064] 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0065] 자가면역질환에 있어, T_{reg} 세포는 면역 반응의 억제에 중심 역할을 수행하고 있으므로, 자가면역질환을 치료하기 위하여 T_{reg} 세포의 수를 증가시키거나 T_{reg} 세포의 억제 기능을 증대시키기 위해 많은 노력이 이루어지고 있다(Kim et al., Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg, 53:737-48, 2010). 본 발명의 서열번호 2의 AITR의 에피토프를 인지하는 항체는 면역 억제 기능을 가진 T_{reg} 세포의 억제 사이토카인인 TGF-β의 생산 증대를 가져오므로, 본 발명의 항체를 사용하는 경우 T_{reg} 세포의 억제 기능 증대를 통하여 자가면역질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 2의 에피토프에 결합하는 본 발명의 항체가 T_{reg} 세포의 억제 사이토카인인 TGF-β의 생산 증대를 가져옴을 확인하여, 자가면역질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있음을 확인하였다(도 12 B).

[0067] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 항체를 이용하여 자가면역질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0068] 상기 항체 및 자가면역질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 상기 자가면역질환을 치료하는 방법은 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약학적 조성물을 자가면역질환이 발병되거나 발명 의심이 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자가면역질환을 치료하는 방법일 수 있으며, 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 상기에서 설명한 바와 동일하다. 상기 자가면역질환을 치료하는 방법은 바람직하게는 항체를 포함하

는 조성물을 자가면역질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역질환을 치료하는 방법일 수 있다.

[0069] 상기 개체는 소, 돼지, 양, 닭, 개, 인간 등을 포함하는 포유 동물, 조류 등을 포함하며, 본 발명의 상기 조성물의 투여에 의해 자가면역질환이 치료되는 개체는 제한없이 포함된다.

[0070] 이때, 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 이때, 조성물은 액제, 산제, 에어로졸, 캡슐제, 장용피 정제 또는 캡슐제 또는 좌제의 형태로 투여할 수 있다. 투여 경로는 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 내 투여, 내피 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0071] 본 발명의 약학적 조성물은 서열번호 2의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 상기 항체는 T_{reg} 세포의 억제 사이토카인인 TGF-β의 생산 증대를 가져와 T_{reg} 세포의 억제 기능을 강화시킬 수 있다. 따라서, 상기 항체를 포함하는 약학적 조성물을 인체 내에 투여하여, 자가면역질환의 발생 또는 진행을 막아 자가면역질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

발명의 효과

[0072] 본 발명에서는 T 세포를 T_H2 세포로 전환시킬 수 있는 서열번호 2의 AITR의 신규한 에피토프를 규명하여, 상기 에피토프에 특이적으로 인지하는 항체가 T 세포를 T_H2 세포로 효과적으로 전환시킬 수 있음을 확인하였다. 이에 본 발명에서 새롭게 규명한 T_H2 세포 전환용 에피토프는 T_H2 세포가 필요한 다양한 질환의 치료 또는 연구 목적에 사용할 수 있다. 아울러, 본 발명의 항체는 T 세포를 T_H2 세포로 전환시킬 뿐만 아니라, T_{reg} 세포의 억제 기능을 효과적으로 증대시키므로, 자가면역질환의 예방 또는 치료에 있어 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은, 인간 항체 라이브러리로부터 얻은 항-AITR 단일클론항체의 제조에 관한 도이다. A는 파지 디스플레이(phage displaying)에 의해 선별된 항-AITR fab 클론 및; 일시적으로 형질전환시킨 HEK 293 세포에서 생성된 이가 형태(bivalent form)의 항-AITR 단일클론항체를 쿠마시 블루 염색(commassie blue staining)을 통하여 보여주는 도이다. B는 AITR을 과발현시킨 Jurkat 세포에서 항-AITR 단일클론항체들이 AITR과 결합하는 것을 PE-컨쥬게이션된 항-AITR 단일클론항체로 염색한 다음, 유세포 분류기로 확인한 결과이다. C는 PBMCs를 항-CD3 및 IL-2 또는 LPS(Lipopolysaccharide)로 2일 동안 자극시킨 후, PE-컨쥬게이션된 항-AITR 단일클론항체(클론 A41)로 염색시킨 다음, 이를 $CD4^+$, $CD8^+$ 및 $CD19^+$로 분류한 결과이다. D는 항-CD3 및 IL-2로 3일 동안 자극시킨 정제된 $CD4^+$T 세포를 보여주는 것으로, 활성화된 $CD4^+$T 세포에서의 AITR의 발현을 PE-컨쥬게이션된 항-AITR 단일클론항체들로 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는, 활성화에 의존적인 방식으로 $CD4^+$ T 세포가 AITR을 발현함을 보여주는 도이다. 분리한 PBMCs를 항-CD3/IL-2 또는 LPS로 2일 동안 자극시켰다; A는 PE-컨쥬게이션된 항-AITR 단일클론항체(클론 A41)로 염색한 세포들을 $CD4^+$, $CD8^+$ 및 $CD19^+$ 세포로 분류한 결과이다. $CD8^+$ T(중간 판넬) 또는 $CD19^+$ 세포(아래쪽 판넬)에 대해 $CD4^+$ T 세포(위쪽 판넬)에서 AITR의 발현(화살표)을 염색하여 나타내었다; B는 PE-컨쥬게이션된 항-AITR 단일클론항체로 염색한 세포들을 $CD11c^+CD14^+$ 세포, $BDCA\text{-}2^+$ 세포 및 $CD56^+$ 세포로 분류한 결과이다. 비처리군(왼쪽) 또는 활성화된 군(오른쪽)에 대해 AITR의 발현을 염색한 다음, 확인하였다. 대표적인 유세포 분류기 프로파일을 도트-플롯 다이아그램을 나타내었다. 각 군에서 AITR을 발현하는 세포의 비율을 나타내었다. 3번의 독립적인 실험 중 한 번의 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 3은, 본 발명의 항-AITR 단일클론항체의 에피토프 맵핑(epitope mapping)에 관한 도이다. A는 전장 AITR(Full-length AITR) 및 항체의 유도 및 에피토프 맵핑에 사용된 재조합 GST 단백질 용해물에 대한 모식도를 나타낸 것이다. Top: AITR의 ICD(intracellular domain) 및 ECD(extracellular domain); Bottom: 12개의 AITR

재조합 단백질인 R1, R2 및 R3 내지 R12(R3-R12); B는 항-AITR 단일클론항체가 전체 AITR-ECD의 각 단편에 특이적으로 결합하는 능력을 보여주는 웨스턴 블랏팅 결과이다. 쿠마시 블루 염색으로 AITR-GST 단백질의 단편(Top 및 left 판넬)을 나타내었고, 분자량 마커 및 재조합 GST 단백질 크기를 왼쪽에 나타내었다.

도 4는, 본 발명의 각기 다른 AITR의 세포 외 도메인 부분을 인지하는 항 AITR 단일클론항체가 서로 다른 표현형을 가진 $CD4^+$ T 세포로의 분화를 유도하는 것을 보여주는 도이다. A는 정제된 $CD4^+$ T 세포에 항-CD3 및 항-AITR 단일클론항체(A27, A35 또는 A41)를 3일 동안 처리한 다음, 인간 T_H1/T_H2 사이토카인 비드 어세이 및 IL-17A ELISA 어세이로 분비된 사이토카인을 분석한 결과를 나타내는 도이다. B는 정제된 $CD4^+$ T 세포에 항-CD3 및 IL-2를 3일 동안 처리하고, 항-AITR 단일클론항체 또는 AITR 리간드를 7일간 처리하였다. 배양한 세포에 대하여 세포 내 IL-4, IFN-γ 및 IL-17A에 대해 염색한 다음, 이를 유세포 분류기로 분석하였다. $IL\text{-}4^+$ 세포, $IFN\text{-}\gamma^+$ 세포 및 $IL\text{-}17A^+$ 세포의 비율(%)를 계산하였다. 이때, 바 그래프(Bar graph, mean ± SD)는 3번의 독립적인 실험을 수행한 것으로 나타낸 것이다. *$p<0.05$

도 5는, 항-AITR 단일클론항체에 의해 $CD4^+$ T 세포에서 세포 분열(cell division)이 유도됨을 나타내는 도이다. CFSE-라벨된 $CD4^+$ T 세포를 항-CD3 및 IL-2가 코팅되어 있는 바닥이 납작한 96 웰 조직 배양 플레이트에 깔고, 항-AITR 단일클론항체를 3일 동안 처리하였다. 유세포 분류기로 세포 분열의 최대 5 사이클까지 해상도(resolution)을 히스토그램으로 나타내었다. 3번의 독립적인 실험 중 한 번의 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 6은, $CD4^+$ T 세포에서 T_H 계열 마커(T_H lineage marker)의 유도를 나타낸 도이다. 정제된 $CD4^+$ T 세포를 항-CD3/IL-2로 3일동안 자극하였고(A), 항-AITR 단일클론항체(B) 또는 AITR 리간드(C)를 7일 동안 처리하였다. 배양한 세포들의 세포 내 IL-4, IFN-γ 및 IL-17A을 염색하였고, 표면을 PE-컨쥬게이션된 AITR 단일클론항체(클론 A41)로 염색한 다음, 유세포 분류기로 분석하였다. 3번의 독립적인 실험 중 한 번의 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 7은, 각기 다른 AITR의 세포 외 도메인 부분을 인지하는 본 발명의 항-AITR 단일클론항체들이 $CD4^+$T 세포에서 서로 다른 신호전달 단백질을 동원하여 서로 다른 활성을 나타내는 것을 보여주는 도이다. 정제된 $CD4^+$T 세포를 항-CD3 및 IL-2로 3일 동안 자극하였고, 항-AITR 단일클론항체들을 2, 6, 12 및 24시간 별로 처리하였다. A는 24시간동안 세포를 배양한 후에, 세포를 용해시킨 후, 세포 용해물(Cell lysate)를 항-TRAF1, 2, 3, 5 및 6 또는 항-AITR 단일클론항체들로(A27, A35 및 A41) 단백질 G에 대해 면역 침강을 한 다음, 웨스턴 블랏팅을 수행한 결과를 나타내는 도이다; B는 항-AITR 단일클론항체을 시간대 별로 처리한 세포의 용해물에 대해 항-NFAT1/2, p-p38, p-ERK1/2, p-JNK1/2, p-NF-kB을 사용하여 웨스턴 블랏팅을 수행한 결과를 나타낸 도이다. 이때, 베타-액틴에 특이적인 항체를 사용하여 정상화(Normalization)하였다; C는 세포를 24시간 동안 배양한 후에, p-STAT-1, 3, 4, 5, 및 6에 대한 항체를 이용하여 유세포 분석을 수행한 결과를 나타낸 결과이다; D는 24시간 동안 세포를 배양한 후에, T-bet, GATA-3 및 RORγt 항체로 각각 염색한 다음, 유세포 분석기로 분석한 결과를 나타내는 도이다; STAT 단백질의 발현 및 마스터 전사 인자의 발현을 나타내었다(검은색(filled histogram) 및 화살표 표시); 각 패널에 기재된 대표적인 양의 숫자는(mean±SD) 세 개의 독립된 실험으로부터 얻어진 것이다(흰색 선(Open histogram)은 대조군을 나타냄).

도 8은, $CD4^+$ T 세포 및 T_{reg} 세포에서 항-AITR 단일클론항체에 의한 TRAF 단백질 동원 및 신호 전달 분자의 활성화를 나타내는 도이다.

도 9는, $CD4^+$ T 세포 및 T_{reg} 세포에서 항-AITR 단일클론항체에 의한 STAT 단백질의 활성화 및 마스터 전사인자의 유도를 나타낸 도이다.

도 10은, $CD4^+$ T 세포에서의 항-AITR 단일클론항체에 의한 전환 효과(switching effect)를 나타낸 도이다; 정제된 $CD4^+$ T 세포를 항-CD3 및 IL-2로 3일 동안 자극하여 활성화시키고, 항-AITR 단일클론항체들을 7일 동안 처리하였다. 그 다음, 배양한 세포를 세척한 다음, 다른 또는 같은 에피토프를 가진 항체를 포함하는 배지로 7일 동안 재자극시켰다. 세포내 사이토카인(IFN-γ, IL-4, IL-17A)에 대하여 염색한 다음, 이펙터 표현형(Effector phenotype)을 확인하였다. 또한, 세포군의 수를 측정하였으며, 상기 데이터들은 3번의 독립적인 실험 결과를 나

타내는 것이다(mean±SD). *p<0.05(다른 그룹과 비교)

도 11은, $CD4^+$ T 세포에서 항-AITR 단일클론항체에 의한 스위칭 효과(switching effect)를 나타낸 도이다.

도 12는, AITR에 의해 매개되는 T_{reg} 세포의 T_H 세포로의 전환 및 A41에 의한 T_{reg} 세포의 면역 억제 기능 강화 효과를 보여주는 도이다; 정상인과 암환자에게서 분리한 $CD4^+$ T 세포에 항-CD3/IL-2을 2일 동안 처리하여, 활성화시켰다; A는 정상인으로부터 분리한 $CD4^+CD25^{high}$ 세포에 항-AITR 단일클론항체를 7일 동안 처리하였다. 세포내 사이토카인(IFN-γ, IL-4, IL-17A)에 대하여 염색한 다음, 유세포 분류기로 이펙터 표현형을 확인하였다. B는 시간대 별로 세포를 모은 다음, 배양액에 있는 TGF-β, IFN-γ, IL-4 및 IL-17A 사이토카인을 측정한 결과이다; C는 분리한 $CD4^+CD25^{high}$ 세포(sorting $CD4^+CD25^{high}$ cell)를 항-AITR 단일클론항체로 자극시켰다. 각 시간대 별로 세포를 모은 다음, T-bet, RORγt, GATA-3 및 Foxp3의 항체를 이용하여 각각 염색하였다. 그 다음, 발현 및 MFI(mean fluorescence intensity)를 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다; D는 암환자에서 분리한 $CD4^+CD25^{high}$ 세포에 항-AITR 단일클론항체를 7일 동안 처리하였다. 그 다음, 세포 내 사이토카인(IFN-γ, IL-4, IL-17A)에 대하여 염색한 다음, 유세포 분류기로 이펙터 표현형을 확인하였다. 유세포 분리기를 이용해서 분리하였고, 항-AITR 단일클론 항체들을 7일 동안 처리하였다. 배양된 세포의 내에 있는 IFN-, IL-4, IL-17A 사이토카인을 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다. 세포군의 수를 계산하였다. 상기 결과들은 3번의 독립적인 실험에 대한 결과를 나타내는 것이다(mean±SD). *p<0.05(다른 그룹과 비교)

도 13은, AITR에 의해 매개되는 정상인으로부터 분리한 인간 T_{reg} 세포의 T_H 세포로의 전환 여부를 확인한 실험 결과를 나타낸 도이다. 정상인으로부터 정제된 $CD4^+$ T 세포를 항-CD3/IL-2로 5일간 자극시켰다. A는 유세포 분석기인 FACS 분류기(sorter)를 이용하여 분류한 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포(R1) 및 $CD4^+CD25^-$(R2) T 세포를 나타낸 도이다. 분류한 세포들의 AITR 및 Foxp3의 발현을 확인하였다; B는 분류한 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포 및 $CD4^+CD25^-$ 세포에 항-AITR 단일클론항체를 처리하여 자극시켰다. 자극된 세포의 이펙터 표현형은 세포 내 사이토카인(IL-4, IFN-γ 및 IL-17A) 염색한 다음, 유세포 분류기로 확인하였다. 3번의 독립적인 실험 중 한 번의 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 14는, 항-AITR 단일클론항체에 의한 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포에서의 TRAF 단백질의 동원 및 다른 신호 전달 분자의 활성을 나타낸 도이다. 분류한 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포는 항-AITR 단일클론항체로 6, 12 또는 24시간 동안 자극하였다. A는 24시간 동안의 배양 후, 세포 용해물을 준비하고 이를 단백질 G에 대해 면역 침강한 다음 항-TRAF1, 2, 3, 5 및 6 또는 항-AITR 단일클론항체로 웨스턴 블랏한 결과를 나타내는 것이다. B는 각 시간대별 세포 용해물을 준비한 다음, 이를 NFAT1/2, p-p38, p-ERK1/2, p-JNK1/2, p-NF-kB 또는 β-ACTIN에 항체를 사용하여 웨스턴 블랏한 결과를 나타내는 것이다. β-ACTIN 발현은 대조군으로 사용되었다. 상기 결과들은 3번의 독립적인 실험 결과를 나타내는 것이다.

도 15는, 항-AITR 단일클론항체에 의한 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포에서의 STAT 단백질 및 마스터 전사인자의 유도 및 활성화를 나타낸 도이다. 분류한 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포를 항-AITR 단일클론항체로 자극시켰다. A는 24시간 동안의 배양 후, 세포를 준비하고, p-STAT-1, -3, -4, -5 및 -6에 대한 항체를 사용하여 유세포 분류기로 분석한 결과를 나타낸다. 대조군(채워지지 않은 히스토그램)에 대한 STAT 단백질의 발현(채워진 히스토그램, 화살표)을 표시하였다. 상기 결과들은 3번의 독립적인 실험들의 결과를 나타내는 것이다(mean±SD). b는 표시한 시간대별로 세포를 모아 T-bet, GATA-3, RORγt 및 Foxp3 항체로 염색한 다음, 유세포 분류기로 분석한 결과를 나타낸다. 3번의 독립적인 실험들 중 한 번의 실험 결과를 표시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0075] **실시예 1: 세포의 분리(Cell isolation)**

[0076] 정상인과 암환자로부터 갓 채취한 말초 정맥혈(peripheral venous blood)에 헤파린(heparin)을 처리한 다음, Ficoll-paque(GE Healthcare, Piscataway, NJ) 농도 구배 원심분리하여 말초혈 단핵 세포(peripheral-blood mononuclear cells, PBMCs)를 분리하였다. 분리한 PBMCs를 1% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지에서 2일 동안 재현탁하였다. 그 다음, 항-$CD4^+$(miltenyibiotec, gladbach, germany) 항체를 이용하여 미접촉 $CD4^+$ T 세포 아형(naive $CD4^+$ T cell subsets)을 양성 선별(positive selection)하여 준비하였다. 상기 준비된 $CD4^+$ T 세포 분획의 정제 수준은 ~97%였다.

[0077] 고순도의 $CD4^+CD25^{high/-}$ T 세포를 얻기 위하여, 분리한 상기 $CD4^+$ T 세포를 7일 동안 0.1㎍/㎖의 항-CD3(HIT3a; BD PharMingen, San Diego, CA) 항체로 자극하였고, 100U/㎖의 IL-2(Interleukin-2, Peprotech, Rocky Hill, NJ)를 2일마다 첨가하였다. 그 다음, 배양한 $CD4^+$ T 세포를 PE-cy5-컨쥬게이트 항-CD25 항체(PE-cy5-conjugated anti-CD25 antibody) 및 FITC-컨쥬게이트 항-CD4 항체(FITC-conjugated anti-CD4 antibody)로 염색한 다음, FACS Aria(BD Biosciences, San Jose, CA)를 이용하여 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포 또는 $CD4^+CD25^-$ T 세포를 분리하였다.

[0078] **실시예 2: 항체 및 유세포 분석(Flow cytometry)**

[0079] 본 발명자들은 유세포 분석에 CD4, CD8, CD11c, IFN-γ, Foxp3, CTLA-4, CD62L, CD45RO, CD45RA(BD Bioscience), CD19, CD56, CD14, CD127, IL-4, IL-17A, GATA-3, T-bet, RORγt(ebioscience, San Diego, CA) 및 BDCA-2(Miltenyi Biotec)에 대한 형광색소가 컨쥬게이션된 항체(fluorochrome-conjugated antibodies)를 이용하였다. 또한, 항-AITR 항체의 경우, 비오틴화된(biotinylated) AITR-특이적 항체(클론 A27, A35, A41, B32 및 B62)을 이용하였다. 사이토카인(Cytokine)의 세포내 수준은 50ng/㎖의 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich, St Louis. MO), 10㎍/㎖의 이오노마이신(ionomycin, Sigma-Aldrich, St Louis. MO) 및 10㎍/㎖ 브레펠딘 A(Brefeldin A, Sigma-Aldrich, St Louis. MO)을 5시간 전처리(pre-incubation)한 후, 측정하였다. 유세포 분석은 모두 FACSCalibur 유세포 분석기(BD Bioscience)를 이용하였고, WinMDI 소프트웨어, Ver2.9(Scripps. Institute)로 분석하였다.

[0080] **실시예 3: 수용성 AITR 및 AITR 과발현 세포의 제조**

[0081] AITR에 특이적인 인간 단일클론항체의 특이적인 결합은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 또는 FACS를 이용하여 측정하였다. 수용성인 AITR-ECD(Extracellular domain, 26번-139번 아미노산) GST 융합 단백질을 제조하기 위해, 활성화된 CD4+ T 세포로부터 추출한 cDNA를 주형으로 하여, 하기 표 1의 AITR 코딩 서열에 대한 프라이머를 이용하여 PCR 증폭한 다음, 이를 BamH1/Xho1 제한효소로 절단(digestion)하고, pGEX-6p-1 벡터에 클로닝하여, GST-태그된 AITR-ECD 발현 벡터(pGEX-6p-1/AITR-ECD)를 제작하였다.

표 1

[0082]

	서열(5'→3')	서열번호
정방향 프라이머	AAGCTTGGTCAGCGCCCCACCGGG	49
역방향 프라이머	CCGGCAGAGCCGCCTTAACTCGAG	50

[0083] 상기 pGEX-6p-1/AITR-ECD를 대장균(BL21-DE3-pLyss)에 형질전환하여, IPTG(0.2mM)를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 상기 대장균에서 발현한 재조합 AITR-GST 단백질은 글루타티온 아가로스 4B 비드 컬럼(glutathione agarose 4B bead column)을 이용하여 정제하였다.

[0084] AITR 과발현 세포를 제조하기 위하여, AITR-TM(transmembrane domain)-ECD를 포유동물 벡터(mammalian vector)인 pCDNA3.1(+)에 cd51 서열에 in-frame으로 넣었다(pcDNA3.1(+)/CD5L-AITR-TM-ECD). pcDNA3.1(+)/Empty vector 또는 pcDNA3.1(+)/CD5L-AITR-TM-ECD을 전기천공법(electroporation)을 이용하여 Jurkat 세포에 일시적 형질감염(transient transfection)하였다. AITR의 세포 표면에서의 발현은 바이오틴-컨쥬게이션된 항-AITR 단일클론항체를 이용하여 염색하여 확인하였다.

[0085] **실시예 4: 항-AITR 단일클론항체(anti-AITR mAbs)의 제조**

[0086] 인간 Fab 항체 cDNA 라이브러리를 포함하는 pCANTAB5E 파지미드 벡터(phagemid vector)를 대장균 TG1에 형질전환하였다. 그 다음, 상기 형질전환체를 100㎍/㎖ 앰피실린 및 50㎍/㎖ 카나마이신을 포함하는 2 x YT 브로스(broth)에서 배양하였고, M13K07 헬퍼 파지(helper phage)로 초감염(superinfect)시켰다. 30℃에서 24시간 동안 배양한 다음, 배양액을 원심분리하여 배양 상등액(culture supernant)만 취한 다음, 3.3%(w/w) 폴리에틸렌글라이콜(시그마) 및 2.3%(w/w) 염화나트륨(NaCl)을 첨가하여 재조합 파지 입자(recombinant phage particles)를 침전시킨 후, 침전된 파지를 다시 2 x YT 브로스에 재현탁하였다.

[0087] 파지 디스플레이(phage display)로 인간 AITR-GST 융합 단백질에 특이적인 파지를 선별하기 위하여, 상기 현탁액을 라이브러리로 사용하여 바이오패닝(biopanning)을 수행하였다(1-4회 바이오패닝). ELISA를 이용하여 각각의 클론의 배양 상등액에서 생성된 상기 재조합 파지 입자에서 인간 AITR-GST 융합 단백질 양성 클론(positive clone)을 선별하였다.

[0088] 또한, 2가(bivalent) 형태의 항체를 생성하기 위하여, 파지 디스플레이로부터 얻어진 Fab(VH 및 VL)유전자를 PCR로 제조한 다음, 이를 발현 벡터인 pDCMV-dhfr의 제한 효소 자리를 이용하여 삽입하였다. 그 결과, 5 가지 서로 다른 클론(A27, A35, A41, B32 및 B62)의 항체 유전자 및 이의 작제물(construct)를 얻을 수 있었다. 2가 형태의 항-인간 AITR 단일클론항체를 생산하기 위하여, 상기 작제물을 HEK293 및 CHO 세포에 일시적 형질감염시켰고, 단백질 G 컬럼을 이용하여 배양 상등액으로부터 정제하였다(GE healthcare).

[0089] **실시예 5: 항-AITR 단일클론항체(anti-AITR mAbs)의 에피토프 맵핑**

[0090] 본 발명의 항-AITR 단일클론항체가 인지하는 정확한 에피토프를 규명하기 위하여 AITR 세포 외 도메인(AITR extracellular domains)에 대한 12개의 단편(R1 내지 R12)을 제작하였고, 이를 GST-벡터인 pGEX-6p-1에 클로닝하였다(도 3 A).

[0091] pGEX-6p-1/R1-R12를 대장균(BL21-DE3-pLyss)에 형질전환한 다음, IPTG(0.20mM)을 첨가하여 단백질의 발현을 유도하였다. 상기 대장균에서 발현된 재조합 R1 내지 R12 GST 융합 단백질은 글루타티온 아가로스 4b 비드 컬럼(Peptron)을 이용하여 정제하였고, 이때, horseradish peroxidase-coupled anti-human IgG(sigma aldrich, st louis, missouri, USA)를 1:10,000으로 희석(dilution)하여 이용하였다. 또한, SuperSignal West Pico 화학 발광 기질(chemiluminescence substrate, Pierce, Rockford, IL)을 화학 발광을 검출하였다.

[0092] **실시예 6: 세포 분열(Cell division) 및 사이토카인(cytokine) 분석**

[0093] 본 발명에서는, CFSE(Molecular Probes, Invitrogen)를 $CD4^+$ T 세포에 부착시켰다. 항-CD3 항체(0.1㎍/㎖)/IL-2(100U/㎖) 및 5㎍/㎖의 항-AITR 단일클론 항체을 72시간 동안 처리하여 상기 CFSE가 부착된 $CD4^+$ T 세포($5x10^5$ 세포/웰)의 증식을 촉진시켰다. 72시간 동안 상기 세포를 배양한 다음, 세포 상등액을 분리하여 T_h1/T_h2 사이토카인 비드 어레이 키트(BD Bioscience), 인간 TGF-β1 Quantikine ELISA 키트(R&D 시스템, Minneapolis, MN) 및 인간 IL-17A ELISA 키트(Abcam, Cambridge, UK)로 사이토카인을 분석하였다.

[0094] **실시예 7: 분화된 이펙터(Effector) $CD4^+$ T 세포 실험**

[0095] 정제한 $CD4^+$ T 세포($5x10^5$ 세포/웰)를 0.1㎍/㎖ 항-CD3 항체 및 100U/㎖ IL-2로 3일 동안 자극시켰다. 그 다음, 상기 배양된 세포에 다시 7일 동안 5㎍/㎖의 항-AITR 단일클론항체 또는 0.1㎍/㎖ AITR 리간드(AITRL)를 처리하였다.

[0096] 그 다음, 분화된 이펙터 T 세포 아형(Effector T cell subsets)을 1xPBS로 세척한 다음, 처음 처리한 AITR 항체와 다른 에피토프를 인지하는 AITR 항체 5㎍/㎖를 포함하는 새 배지로 7일 동안 다시 배양하였고, 100U/㎖의 IL-2를 이틀마다 첨가하였다. 그 다음, 세포를 모으고, 세포 내 IFN-γ, IL-4 및 IL-17A를 염색하고, 3색 유세

포 분석기(three-color flow cytometry)로 분석하였다.

[0097] **실시예 8: AITR과 TRAF 간의 상호작용 분석**

[0098] 정제된 $CD4^+$ T 세포(5 x 10^5 세포/웰)를 0.1㎍/㎖ 항-CD3 항체 및 100U/㎖ IL-2로 2일 동안 자극하였다. 상기 배양된 세포를 5㎍/㎖ 항-AITR 단일클론항체로 24시간 동안 처리하였다. 배양된 세포를 100㎕ RIPA 버퍼(50mM Tris-HCL(pH 7.4), 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.25% Na-디옥시콜레이트, 1mM PMSF, 프로테아제 억제제 및 포스파타제 억제제)로 용해하였다.

[0099] 면역 침강(Immunoprecipitation)을 위해, 세포 용해물(cell lysate)에 20㎕의 단백질 G-세파로스(sepharose)의 1:1 슬러리(slurry)를 넣고, 한 시간동안 배양하였다. 그 다음, 침전물을 1XPBS로 세척하고, 단백질 복합체를 용출시켰다. 항-TRAFs(1, 2, 3, 5 및 6)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 또는 항-AITR 단일클론 항체로 웨스턴 블랏 분석을 수행하였고, Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG 또는 항-인간 IgG를 2차 항체로 사용하였다.

[0100] 다른 실험에서는, 분류한 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포(5x10^5세포/웰)를 5㎍/㎖ 항-AITR 단일클론항체로 24시간 동안 자극시켰고, 상기와 같은 방법으로 AITR 및 TRAF 간의 상호작용을 확인하였다.

[0101] **실시예 9: 세포내 신호전달 경로 단백질의 인산화 분석**

[0102] 정제한 $CD4^+$ T 세포(1x10^6세포/웰)를 항-CD3 항체 및 IL-2를 처리하여 3일 동안 자극하였다. 상기 세포들에 항-AITR 단일클론항체를 2, 6, 12 및 24시간 동안 처리하였다. 그 다음, 상기 세포들의 현탁액을 준비하여 phospho-STATs(1, 3, 4, 5, 및 6), 및 마스터 전사 인자(T-bet, GATA-3, RORɣt 및 Foxp3)를 유세포 분석기로 분석하였다. 상기 배양에서 세포들은 RIPA 완충액으로 용해시켰다. 그 다음, 전체 단백질 추출물로 8 내지 12% SDS-PAGE를 수행한 다음, NFAT1/2(Cell signaling, Danvers, MA, USA), p-p38(Cell signaling, Danvers, MA, USA), p-ERK1/2(Cell signaling, Danvers, MA, USA), p-JNK1/2(Cell signaling, Danvers, MA, USA) 및 NF-kB(Cell signaling, Danvers, MA, USA)에 대한 항체를 이용하여 면역 블롯(immunoblot)을 수행하였다. 또한, 동량의 단백질을 로딩했는지 확인하기 위하여 항-β 액틴 항체를 사용하였다.

[0103] 다른 실험에서는, 분류한 $CD4^+CD25^{high}$ T 세포(5x10^5세포/웰)를 5㎍/㎖의 항-AITR 단일클론항체를 처리하여 자극하였고, 상기와 같은 방법으로 세포 내 신호전달 경로에 관여하는 단백질의 인산화를 분석하였다.

[0104] **실시예 10: 인간 $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$(T_{reg}) 세포의 다른 서브셋(subset)으로의 표현형(phenotype) 전환**

[0105] 정상인 및 암환자로부터 분리한 인간 조절 T 세포(T_{reg} cells)는 실시예 1에서 설명한 방법으로 분류하였다. 상기 세포들은 5㎍/㎖ 항-AITR 단일클론항체로 7일 동안 자극시켰고, 100U/㎖ IL-2를 2일마다 첨가하였다. 그 다음, 세포들을 모으고 AITR, CTLA-4, CD62L, CD127, CD45RO 및 CD45RA의 세포 표면 발현을 확인하였고, 세포내 IFN-ɣ, IL-4 및 IL-17A, 및 마스터 전사 인자에 대해 염색하고 유세포 분류기로 분석하였다. 또한, 배양 상등액(Culture supernants)를 모은 다음, IFN-ɣ, IL-4 및 IL-17A, 및 TGF-β의 발현을 확인하였다.

[0106] 다른 실험에서는, 분류한 $CD4^+CD25^-$(non-T_{reg}) 세포들(5x10^6세포/웰)을 5㎍/㎖ 항-AITR 단일클론항체로 자극시켰다. 배양한 세포에서 세포 내 IFN-ɣ, IL-4 및 IL-17A를 염색하였고, 3색 유세포 분석기(three-color flow cytometry)로 분석하였다.

[0107] **실시예 11: 통계학적 분석**

[0108] 모든 실험 데이터는 통계 프로그램인 Prism 5.0 GraphPad(San Diego, CA)로 분석하였다. Student's t-test는 그룹 간의 통계학적으로 유의한 차이점을 결정하기 위하여 사용하였다.

[0109] **실험예 1: 항-AITR 단일클론항체의 제조**

[0110] 상기 실시예 4에 기재한 바와 같이, 인간 Fab 항체 라이브러리로부터 AITR에 대한 5개의 Fab 항체를 선별하였으며, 각각 A27, A35, A41, B32 및 B62로 명명하였다. 상기 항체 각각은 서열번호 5인 중쇄 가변영역과 서열번호 9인 경쇄 가변영역(A41), 서열번호 15인 중쇄 가변영역과 서열번호 19인 경쇄 가변영역(A27), 서열번호 25인 중쇄 가변영역과 서열번호 29인 경쇄 가변영역(B32), 서열번호 35인 중쇄 가변영역과 서열번호 39인 경쇄 가변영역(A35), 및 서열번호 45인 중쇄 가변영역과 서열번호 46인 경쇄 가변영역(B62)을 포함하였다.

[0111] 또한, 항-AITR 유전자는 VH 및 VL DNA 서열을 인간 IgG1 백본에 이식(grafting)하여 제작하였다. 항-AITR 단일클론항체 A27, A35, A41, B32 및 B62는 상기 항체 작제물(construct)를 HEK293 세포에 일시적인 형질감염하여 생산하였다(도 1 a). 상기 항체들은 AITR을 과발현시킨 Jurkat 세포에서 각각 유사한 정도의 친화도(affinity)를 나타내었다(도 1 b).

[0112] **실험예 2: 항-AITR 단일클론항체의 에피토프 맵핑(epitope mapping)**

[0113] 상기 실험예 1에서 선별한 AITR에 대한 인간 단일클론항체 5가지의 에피토프를 확인하였다. 에피토프를 확인하기 위하여, R1 내지 R12로 명명한 AITR-GST 융합 단백질을 이용하였다(도 3). 항-AITR 단일클론항체와 R0 내지 R12-GST 단백질 간의 면역 블롯 결과, 상기 5가지 항체가 서로 구별되는 3 종류의 에피토프를 인지하는 AITR에 특이적인 단일클론항체로 분류될 수 있었다.

[0114] A27 및 B32는 R1 및 R2 부위에 특이적으로 결합했으며, A35 및 B62는 R1-R4 및 R8-R11에 특이적으로 결합하였고, A41은 R1-R6, R8 및 R9에 특이적으로 결합하는 결과를 나타내었다(도 3 B). AITR이 결합하는 에피토프 부위를 더욱 명확하게 조사한 결과, A27 및 B32는 AITR ECD의 56번 내지 65번 아미노산 부위(AA 56-65)를 특이적으로 인지하였으며, A35 및 B62는 41번 내지 50번 아미노산 부위(AA 41-50)를 특이적으로 인지하였고, A41은 20번 내지 30번 아미노산 부위(AA 20-30)를 특이적으로 인지하였다(도 3 C 및 표 2). A41이 인지하는 에피토프 부위를 서열번호 2로, A27 및 B32가 인지하는 에피토프 부위를 서열번호 3으로, A35 및 B62가 인지하는 에피토프 부위를 서열번호 4로 각각 표시하였다.

표 2

[0115]

항체	에피토프	서열번호
A41	GTDARCCRVHT (AA 20-30)	2
A27&B32	HCGDPCCTTC (AA 56-65)	3
A35&B62	ECCSEWDCMC (AA 41-50)	4

[0116] **실험예 3: 면역 세포(Immune cell)에서의 AITR의 발현**

[0117] PBMCs를 자극시킨 후에는 AITR의 발현이 증가되었으나, 자극되지 않은 경우에는 AITR의 mRNA는 검출되지 않았다. 또한, T 세포에서 CD3 자극(CD3 stimulation)을 준 경우에는 AITR의 발현이 매우 증가되었다. 유세포 분석기로 T 세포, B 세포, NK 세포 및 단핵구(monocytes)에서 AITR의 발현을 조사한 결과, 본 발명의 항-AITR 인간 단일클론항체들은 대부분 약 40배가량 높은 발현을 나타내는 활성화된 $CD4^+$ T 세포에 존재하는 AITR을 인지하는 결과를 나타내었다. $CD8^+$ T 세포, B 세포, NK 세포 및 단핵구에서 상기 항체들을 사용한 경우에는 휴지기(resting) 또는 활성화된 AITR이 검출되지 않았다(도 1 C).

[0118] 이와 같은 결과는, 본 발명의 항-AITR 단일클론항체가 TCR-매개 활성화된 신호에 의해, 활성화된 $CD4^+$ T 세포군에서의 빠르게 증가된 AITR의 발현을 인식한다는 것을 나타내는 결과이다.

[0119] **실험예 4: AITR 신호전달에 의한 $CD4^+$ T 세포군(cell population)에서의 세포 분열 및 사이토카인 생산의 동시 자극(co-stimulation) 확인**

[0120] 활성화된 $CD4^+$ T 세포에서 AITR이 주로 발현된다는 것을 확인하여(도 1 C), 증식 및 사이토카인 분비에 있어서

공동자극 분자(costimulatory molecule)로서 AITR의 역할을 분석하였다. 정제된 CFSE-라벨된 $CD4^+$ T 세포(CFSE-labeled $CD4^+$ T cell)을 고정된 항-CD3로 자극하고, 항-AITR 단일클론항체의 존재하에 배양하였다. 이때, 항-CD3 단독으로 배양한 경우와 달리, 항-AITR 단일클론항체 및 항-CD3로 함께 배양한 경우 활성화된 $CD4^+$ T 세포의 증식이 현저히 증가하는 결과를 나타내었다(도 5).

[0121] 그 다음, 항-AITR 단일클론항체의 종류에 따른 분비하는 사이토카인의 종류를 배양 상등액으로부터 분석하였다. 그 결과, AITR의 서로 다른 부분을 인지하는 본 발명의 항체들은 각각 서로 다른 사이토카인의 수준을 변화시켰다. 비교군인 A27을 처리한 경우, T_H1 사이토카인인 IL-2 및 IFN-γ 수준이 현저히 증가하였으며, 비교군인 A35를 처리한 경우에는 A27과 달리 T_H17 사이토카인인 IL-17A의 수준을 증가시켰다. 반면, 본 발명의 A41을 처리한 경우에는 T_H2 사이토카인인 IL-2, IL-4 및 IL-5의 수준을 현저히 증가시키는 결과를 보였다(도 4 A).

[0122] 또한, 본 발명의 항-AITR 항체 또는 AITR 리간드를 처리하는 경우, 활성화된 $CD4^+$ T 세포에서 IFN-γ, IL-17A 및 IL-4의 발현에 대한 표현형 $CD4^+$ T 세포 마커를 분석하였다. 그 결과, 본 발명의 A41은 IL-4를 생산하는 $CD4^+$ T 세포를 증가(91.5±6.21%)시킨 반면, 비교군인 A27을 처리한 경우에는 IFN-γ를 생산하는 $CD4^+$ T 세포(IFN-γ producing $CD4^+$T cell)를 증가(90.2±0.50%)시켰고, 비교군인 A35를 처리한 경우에는 IL-17A을 생산하는 $CD4^+$ T 세포를 증가(37.8±0.11%)시켰다. 또한, 이들의 리간드인 AITRL은 T_H1 $CD4^+$ T 세포에서 IFN-γ의 생산을 유도하는 결과를 나타내었다(도 4 B).

[0123] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 항-AITR 단일클론항체가 $CD4^+$ T 세포에서 공동자극 신호(costimulatory signal)로서 작용할 수 있으며, 특정 T_H 세포로의 분화 및 사이토카인 분비를 촉진시킬 수 있음을 나타내는 결과이다. 특히, 상기의 결과들은 본 발명의 항체가 인지하는 AITR 부위에 따라 서로 다른 효과를 가져올 수 있다는 것을 나타낸다. 그 중에서도 본 발명의 A41 항체가 $CD4^+$ T 세포에 존재하는 AITR의 여러 부위 중에서도 서열번호 2의 에피토프를 인지함으로써, 여러 사이토카인 중에서도 T_H2 세포의 사이토카인인 IL-4를 생산할 수 있도록 분화시킬 수 있음을 뒷받침하는 것이다.

[0124] **실험예 5: AITR과 TRAF family 단백질 간의 상호작용 및 하위 신호전달**

[0125] TRAF(tumor necrosis factor receptor-associated factor) 단백질은 NF-kB 활성화에 관여하고 있으며, TNFR 패밀리 멤버에 의해 ERK1/2, JNK1/2, p38과 같은 하위 신호전달분자가 활성화될 수 있음이 보고된 바 있다. 또한, AITR의 세포내 도메인(cytoplasmic domain)은 마우스 또는 인간에 보존되어 있는 산성 잔기(acidic residue)를 가지고 있고, 이는 TRAF 단백질과의 결합에 관여한다. AITR은 TRAF1, TRAF2 및 TRAF3와는 상호작용하는 것이 알려져 있으나, TRAF5 및 6와는 상호작용하지 않는다(Kwon B et al., J Biol Chem 274, 6056-6061, 1999; Ha, H et al., Curr Protoc Immunol. Chapter11:Unit11.9D, 2009). 이에 본 발명자들은 활성화된 $CD4^+$ T 세포에서 본 발명의 항-AITR 단일클론항체에 의해 AITR이 활성화되는 경우 어떤 TRAF 단백질과 상호작용하는지를 확인하였다.

[0126] AITR-TRAF 복합체는 항-AITR 단일클론항체를 이용하여 활성화된 $CD4^+$ T 세포의 용해물로부터 Protein G로 면역침전시켰고, 항-TRAF 항체 및 항-AITR 단일클론항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과, 각기 다른 AITR의 부위를 인지하는 본 발명의 항체들은 서로 다른 종류의 TRAF 단백질을 AITR에 동원(Recruitment)하는 결과를 나타내었다(도 7 A).

[0127] 즉, 본 발명의 서열번호 2의 에피토프를 인지하는 A41의 경우, TRAF3 및 5를 동원하는 결과를 나타낸 반면, 비교군인 서열번호 3의 에피토프를 인지하는 A27의 경우, TRAF1 및 2를 AITR로 동원하였고, 비교군인 서열번호 4

의 에피토프를 인지하는 A35의 경우, TRAF6를 동원하였다. 이러한 결과는 AITR을 항체가 인식하는 부위에 따라 서로 다른 세포 내 신호전달을 가져올 수 있음을 나타내었다. 또한, TRAF3 및 5를 동원하는 본 발명의 A41의 경우, p-ERK1/2를 활성화시키는 결과를 나타낸 반면, 비교군인 TRAF 1 및 2를 동원하는 A27의 경우, p-JNK1/2 및 p-NF-kB를 활성화하는 결과를 나타내었고, 비교군인 TRAF6를 동원하는 본 발명의 A35 항체의 경우, p-p38 및 p-NF-kB를 활성화시키는 결과를 나타내었다(도 7 A, B 및 도 8).

[0128] T 세포는 NFAT1, NFAT2 및 NFAT3를 발현하며, NFAT 단백질들은 T_H 세포의 TCR이 활성화되었을 때 이펙터 사이토카인(effector cytokine)을 생산하는데 필수적인 역할을 하며, T_H 세포 분화 조절에 관여하고 있다. 이에 본 발명자들은 본 발명의 항-AITR 단일클론항체를 $CD4^+$ T 세포에 처리하였을때, NFAT1 또는 2의 활성화를 가져올 수 있는 지를 확인하였다. 그 결과, 비교군인 서열번호 3의 에피토프를 인지하는 A27 항체 및 서열번호 4의 에피토프를 인지하는 A35 항체의 경우 활성화된 NFAT1을 시간에 의존적으로 증가시켰으나, 본 발명의 A41의 경우에는 A27 및 A35와 달리, NFAT1이 아닌 NFAT2의 발현을 증가시키는 결과를 나타내었다(도 7 B).

[0129] 상기와 같은 결과들은 AITR이 TRAFs 또는 하위 신호전달을 활성화시킬 수 있는 어댑터 세포 내 분자가 결합할 수 있는 결합 도메인을 가지고 있음을 나타내는 것이다. 또한, AITR 항체가 인지하는 AITR의 특정 부위에 따라, 다른 종류의 TRAF 단백질을 동원할 수 있으며, 서로 다른 TRAF 단백질이 동원됨에 따라 세포 내 신호전달도 달라지게 됨을 보여주었다. 본 발명의 서열번호 2의 에피토프에 특이적인 AITR 항체는 다른 부위를 인식하는 항체들과 비교하여 TRAF 단백질뿐만 아니라, 서로 다른 NFAT 활성도 또한 나타낼 수 있으므로, 이러한 결과는 AITR 항체가 인지하는 부위에 따라 다른 NFAT가 핵 내로 이동(translocation)하고, NFAT-의존적인 유전자 발현이 다른 양상으로 나타날 수 있음을 보여주는 것이다.

[0130] 이와 같은 결과들은 특히, 본 발명의 A41이 AITR의 여러 부위 중에서 서열번호 2의 에피토프를 인지함으로써 다양한 종류의 TRAF 단백질 중 TRAF 3 및 5를 동원하고 p-ERK1/2에 의해 매개되는 세포 내 신호전달을 가져올 수 있으며, 이를 통하여 T_H2 사이토카인인 IL-4의 생산세포로의 전환에 관여할 수 있을 것이라는 것을 뒷받침하는 결과이다.

[0131] **실험예 6: 항-AITR 단일클론항체에 의한 전사인자 및 STAT 단백질에 의한 $CD4^+$ T 세포의 분화 확인**

[0132] T_H 세포의 운명 결정(fate determination) 및 사이토카인 생산에 있어, STAT(signaling transducer and activatin of transcription) 단백질 및 마스터 전사인자는 필수적인 것으로 알려져 있다(Hermann-Kleiter, N. & Baier G, Blood. 15, 2989-2997, 2010). 이에, 본 발명의 항-AITR 단일클론항체에 의해 활성화된 $CD4^+$ T 세포에서의 STAT 단백질 및 마스터 전사 인자의 활성을 분석하였다.

[0133] p-STATs(1, 3, 4, 5, 및 6) 및 T-bet, GATA-3 및 RORγt에 대한 항체를 사용하여 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 항-AITR 항체를 처리하지 않고, 항-CD4 및 IL-2만을 처리한 군에 비하여, A27을 처리한 군은 활성화된 p-STAT-1(52.8±0.25%), pSTAT-4(54.2±0.19%), 및 T-bet(80.2±0.08%)을 증가시켰고, A35을 처리한 군은 활성화된 p-STAT-3(63.1±1.24%), RORγt(53.4±2.18%)을 증가시켰고, A41을 처리한 군은 활성화된 p-STAT-5(85.1±0.38%), p-STAT-6(79.2±0.12%) 및 GATA-3(76.5±0.11%)을 증가시켰다(도 7 C, D 및 도 9).

[0134] 이러한 결과들은 AITR의 서로 다른 부위를 인지하는 본 발명의 AITR 항체는 서로 다른 AITR에 의해 매개되는 신호 전달을 $CD4^+$ T 세포에 가지고 온다는 것을 나타내는 것이다. 특히, 서열번호 2의 에피토프를 인지하는 본 발명의 A41 항체가 T_H 세포의 운명 결정에 관여할 때, STAT-5 및 6, 그리고 GATA-3에 의해 매개되는 신호 전달이 관여할 수 있음을 나타내는 결과이다.

[0135] **실험예 7: 항-AITR 단일클론 항체에 의한 T 세포의 T_H2 세포로의 전환 확인**

[0136] 상기 실험예 5 및 6은 특정 에피토프를 인지하는 본 발명의 서열번호 2의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-AITR 항체가 $CD4^+$ T 세포에서 T_H 세포 운명 결정에 관여하는 특이적인 신호 전달 인자를 조절함을 보여주었다. 즉, AITR 내의 에피토프의 위치가 변화하면 전혀 다른 T_H 세포로 전환시킬 수 있음을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 본 발명의 항-AITR 단일클론항체가 인지하는 에피토프 부위에 따라 $CD4^+$ T 세포의 기능적인 표현형(functional phenotype)을 전환시킬 수 있을 것으로 판단하여, $CD4^+$ T 세포에 AITR의 서로 다른 세 부위를 인지하는 대표적인 항체인 A27, A35 및 A41를 처리하여 그 전환능력을 확인하였다.

[0137] 그 결과, 비교군인 서열번호 2의 에피토프에 특이적인 A27에 의해 유도된 IFN-γ 생산세포(99.2±0.21%)는 비교군인 A35에 의해 IL-17A 생산세포로 전환되었고(18.8±0.23%), 본 발명의 A41에 의해서는 IL-4 생산세포(38.7±0.32%)로 전환되었다. 비교군인 A35에 의해 유도된 IL-17A 생산세포(35.2±0.60%)는 비교군 항체인 A27에 의해 IFN-γ 생산 세포(82.6±1.21 %)로 전환되었고, 본 발명의 A41에 의해 IL-4 생산세포(70.5±0.62%)로 전환되었다. 본 발명의 A41에 의해 유도된 IL-4-생산세포(98.2±0.29%)는 A27에 의해 IFN-γ 생산세포(90.1±0.42%)로 전환되었고, 비교군인 A35에 의해 IL-17A 생산세포(16.9±0.58%)로 전환되었다(도 10 및 11).

[0138] 상기와 같은 결과들은, 본 발명의 서열번호 2의 AITR 에피토프에 특이적인 항체는 AITR의 특정 부위 즉, 서열번호 2의 에피토프(AA 20-30)를 인지함으로써 특정 사이토카인 생산 세포로 전환시킬 수 있음을 보여주는 결과로, 비교군인 A27이 IFN-γ를 생산하는 T_H1 세포로, 비교군인 A35는 IL-17A를 생산하는 T_H17 세포로 전환시키는 것과 달리, 본 발명의 서열번호 2의 에피토프를 인지하는 본 발명의 A41은 IL-4를 생산하는 T_H2 세포로 특이적으로 전환시킬 수 있음을 뒷받침하는 결과이다.

[0139] **실험예 8: 항-AITR 항체의 $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+(T_{reg})$ 세포의 억제 능력(suppressive function) 강화 확인**

[0140] GITR 또는 AITR은 T_{reg} 세포에서 공동자극 분자(co-stiumulatory molecule)인 것으로 알려져 있으며, T_{reg} 세포에는 활성화시키지 않아도 본질적으로 GITR이나 AITR 발현이 높게 유지된다고 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 항-AITR 단일클론항체들에 대한 T_{reg} 세포에서 AITR의 역할을 조사하였다. 항-CD3 및 IL-2로 자극시킨 후, 정상인 및 암환자로부터 T_{reg} 세포($CD4^+CD25^{high}$ cell) 및 비-T_{reg} 세포($CD4^+CD25^-$ cell)를 FACS 분류기를 이용하여 분리하였다. 정상인 및 암환자로부터 분리한 T_{reg} 세포는 모두 Foxp3 및 AITR을 지속적으로 발현하고 있었으며, 비-T_{reg} 세포의 경우, T_{reg} 세포에 비하여 낮은 수준의 AITR을 발현하고 있는 결과를 보였다. 다만, 암환자로부터 분리한 T_{reg} 세포의 수는 정상인에 비하여 3배 가량 높은 수치를 나타내었다.

[0141] 상기 실험예의 결과에 비추어 본 발명의 항-AITR 단일클론항체가 T_{reg} 세포를 전환할 수 있는지 여부를 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 서열번호 2의 에피토프를 인지하는 A41은 정상인 및 암환자로부터 분리한 T_{reg} 세포 모두에 대해 전환능력을 보이지 않았다. 반면, 비교군인 A35는 정상인으로부터 분리한 T_{reg} 세포를 IL-17A 생산세포로 전환시켰으나(10.4±0.32%), 암환자로부터 분리한 T_{reg} 세포를 전환시키지는 못하였고, 비교군인 A27은 정상인 및 암환자로부터 분리한 T_{reg} 세포를 모두 IFN-γ 생산 세포로 전환시켰다(각각 93.9±0.12% 및 88.2±0.43%)(도 12 A 및 D, 도 13 B). 또한, 분비하는 사이토카인을 분석한 결과, A27 및 A35의 경우에는 TGF-β를 낮추고, IFN-γ 및 IL-17A를 각각 높인 반면, 본 발명의 A41은 T_{reg} 세포의 억제 기능에 관여한다고 알려진 TGF-β를 시간별로 높이는 결과를 나타내었다(도 12B). 상기 결과는 본 발명의 서열번호 2의 AITR의 에피토프를 특이적으로 인지하는 A41이 T_{reg} 세포에서 TGF-β의 분비를 증가시킴으로써 T_{reg} 세포의 억제 기능을 강화시킬 수 있다는 것을 뒷받침하는 것이다.

[0142] T_{reg} 세포에 있어서 이러한 차이점을 나타내는 이유를 메커니즘을 통하여 알아보기 위하여 신호전달 메커니즘 분석을 하였다. 그 결과, 비교군인 A27 및 A35는 실험예 5에 나타낸 결과와 같이, A27은 TRAF1 및 2를 동원하고 NFAT1의 발현을 증가시켰으며, p-JNK1/2, p-NF-kB 신호전달경로를 활성화시키는 결과를 나타내었고, A35는

TRAF6를 동원하였고 p-p38 및 p-NF-kB 신호전달경로를 활성화시킴을 나타내었다(도 7 및 도 14). 이러한 결과들은 비교군인 A27 및 A35는 각각 상기 신호전달경로를 통하여 Foxp3의 발현을 감소시키고 T-bet 또는 RORγt 발현을 증가시켜, 비교군인 A27의 경우에는 T_{reg} 세포를 T_H1 세포로, 본 발명의 A35의 경우에는 T_{reg} 세포를 T_H17 세포로 전환시킬 수 있었음을 뒷받침하는 것이다(도 9, 도 12 C 및 도 15).

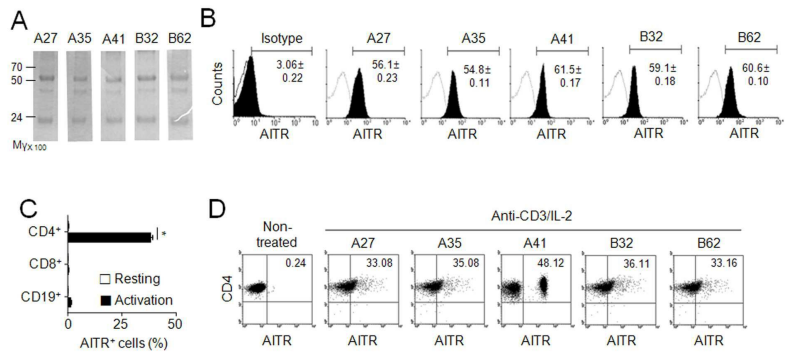
[0143] 반면, 본 발명의 A41의 경우에는 T_{reg} 세포에 처리하였을 때, T_{reg} 세포의 마커인 Foxp3의 발현을 T_{reg} 세포에서 거의 유지시키는 결과를 보였으며, GATA-3의 수준을 거의 변화시키지 않았다(도 9, 도 12 C 및 도 15). 또한, T_{reg} 세포에서는 A41이 TRAF 단백질을 AITR에 동원될때, TRAF5에 비하여 TRAF3을 강하게 동원하며, ERK1/2 및 NF-kB를 활성화시키고 STAT5를 활성화시켜, NFAT1 전사인자 등을 통하여 신호전달 캐스케이드를 가져오는 것을 보여, 본 발명의 항체와 다른 에피토프를 인지하는 항체들과는 신호전달 캐스케이드를 가져오는 것으로 판단되었다(도 9 및 14).

[0144] 이러한 결과들은 서열번호 2의 특정 에피토프를 인지하는 본 발명의 항체는 다른 부위의 에피토프와는 다른 신호전달경로를 통하여, T_{reg} 세포의 억제 기능을 강화시킬 수 있음을 뒷받침하는 것이다.

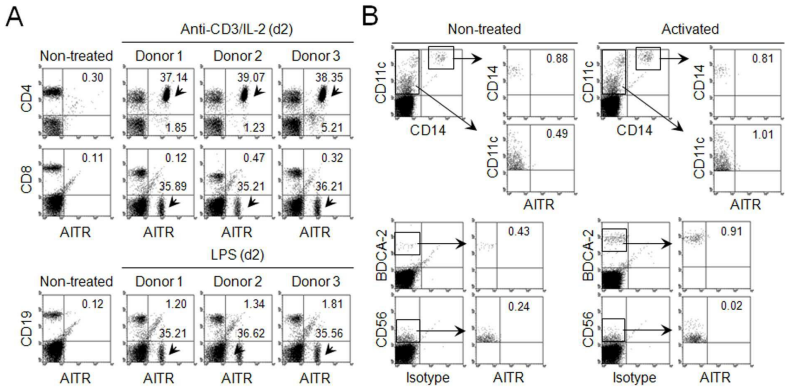
[0145] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그 리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범 위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

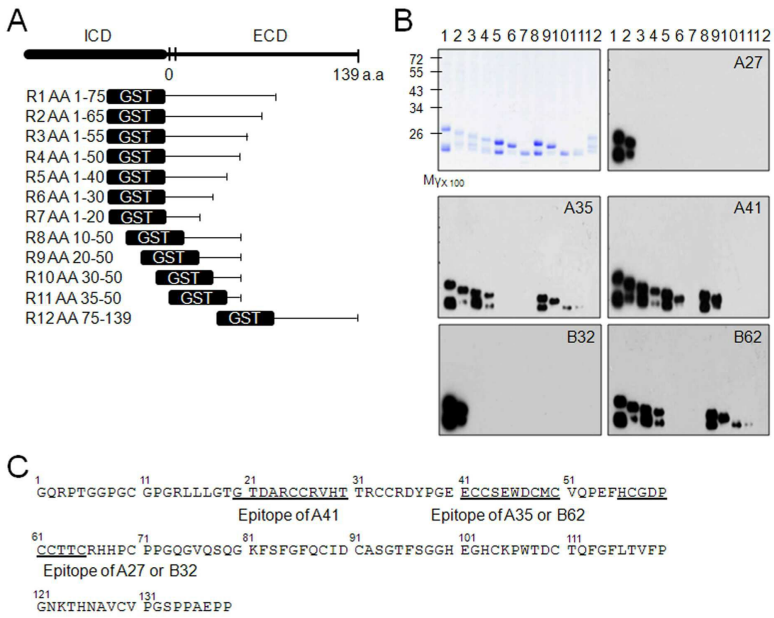
도면1



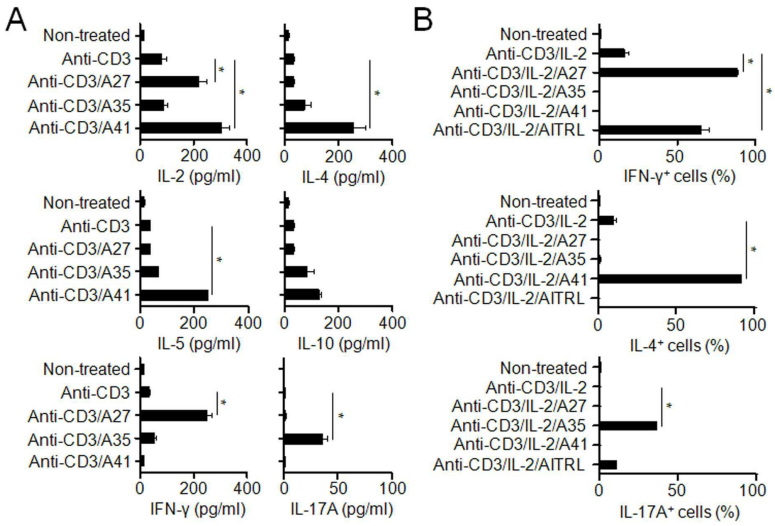
도면2



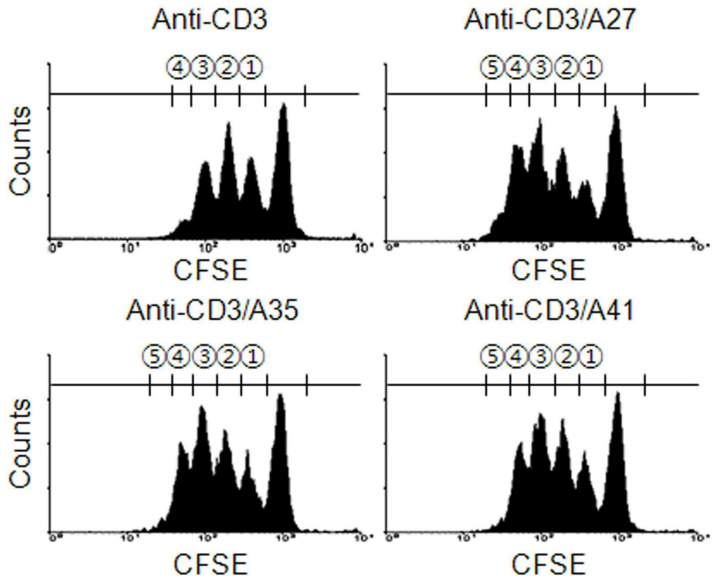
도면3


A
ICD
ECD
0
139 a.a
R1 AA 1-75 GST
R2 AA 1-65 GST
R3 AA 1-55 GST
R4 AA 1-50 GST
R5 AA 1-40 GST
R6 AA 1-30 GST
R7 AA 1-20 GST
R8 AA 10-50 GST
R9 AA 20-50 GST
R10 AA 30-50 GST
R11 AA 35-50 GST
R12 AA 75-139 GST
B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
72
55
43
34
26
MγX 100
A27
A35
A41
B32
B62
C
1 GQRPTGGPGC 11 GPGRLLLGTG 21 TDARCCRVHT 31 TRCCRDYPGE 41 ECCSEWDCMC 51 VQPEFHCGDP
Epitope of A41
Epitope of A35 or B62
61 CCTTCRHHPC 71 PPGQGVQSQG 81 KFSFGFQCID 91 CASGTFSGGH 101 EGHCKPWTDC 111 TQFGFLTVFP
Epitope of A27 or B32
121 GNKTHNAVCV 131 PGSPPAEPP

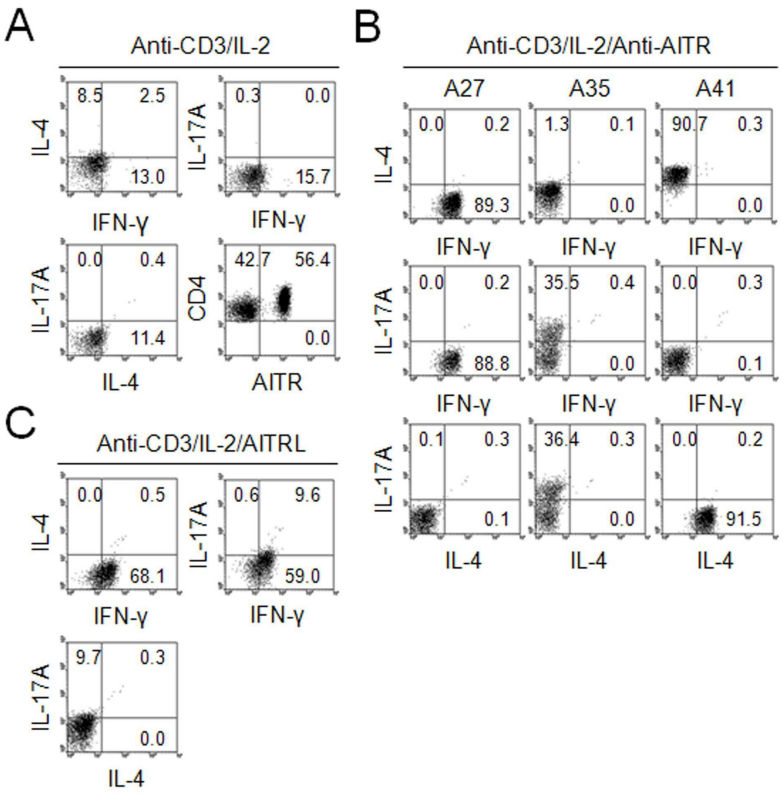
도면4


A
Non-treated
Anti-CD3
Anti-CD3/A27
Anti-CD3/A35
Anti-CD3/A41
IL-2 (pg/ml)
IL-4 (pg/ml)
IL-5 (pg/ml)
IL-10 (pg/ml)
IFN-γ (pg/ml)
IL-17A (pg/ml)
B
Non-treated
Anti-CD3/IL-2
Anti-CD3/IL-2/A27
Anti-CD3/IL-2/A35
Anti-CD3/IL-2/A41
Anti-CD3/IL-2/AITRL
IFN-γ+ cells (%)
IL-4+ cells (%)
IL-17A+ cells (%)

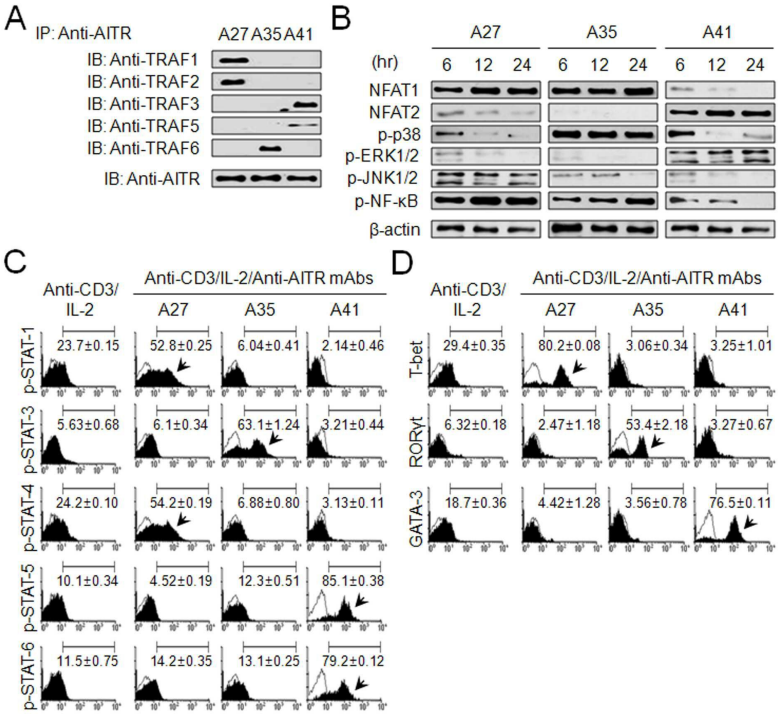
도면5


Anti-CD3
Anti-CD3/A27
Anti-CD3/A35
Anti-CD3/A41
Counts
CFSE
④③②①
⑤④③②①

도면6


A
Anti-CD3/IL-2
B
Anti-CD3/IL-2/Anti-AITR
A27
A35
A41
C
Anti-CD3/IL-2/AITRL
IL-4
IL-17A
IFN-γ
CD4
AITR

도면7



도면8

Signaling Transduction Molecules	A27	A35	A41
Human CD4⁺ T cells			
TRAF1	+++ (via TRAF2)	-	-
TRAF2	+++	-	-
TRAF3	-	-	+++
TRAF5	-	-	+
TRAF6	-	+++	-
NFAT1	+++	+++	-
NFAT2	+	-	+++
p38	+	+++	+
ERK1/2	-	-	++
JNK1/2	++	+ (JNK1)	-
NF-κB	+++	++	+
Human T_{reg} cells			
TRAF1	+++ (via TRAF2)	-	-
TRAF2	++	-	-
TRAF3	-	-	++
TRAF5	-	-	+++
TRAF6	-	+	-
NFAT1	+++	+++	+++
NFAT2	+	-	-
p38	+	+++	-
ERK1/2	-	-	+++
JNK1/2	+	+ (JNK1)	-
NF-κB	+++	+	++

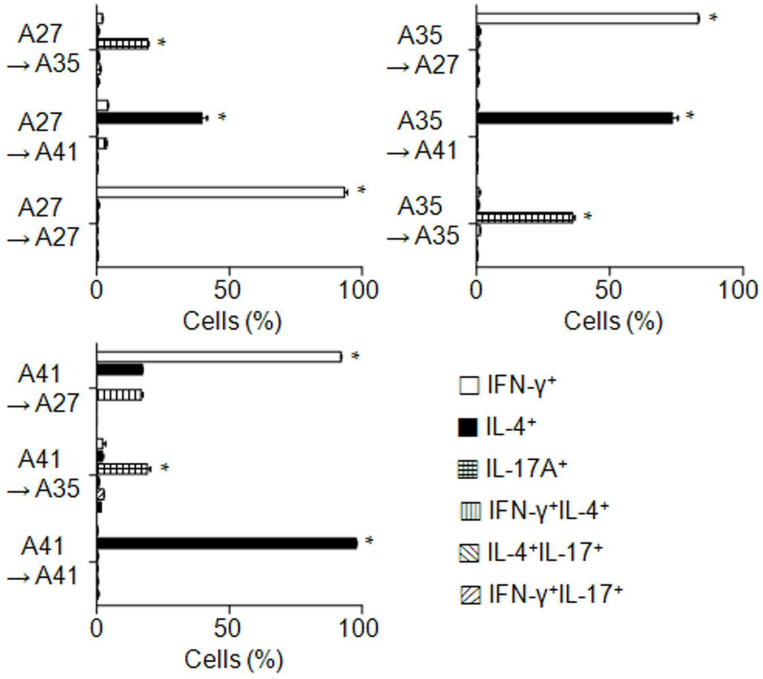
Association listed include only those verified to occur between endogenous TRAFs and downstream signaling transduction molecules and AITR in CD4⁺ T cells and T_{reg} cells. +++ = Strong signals; ++ = middle signal; + = weaker but reproducibly detectable signals; - = no signals detected by immunoblotting experiments

도면9

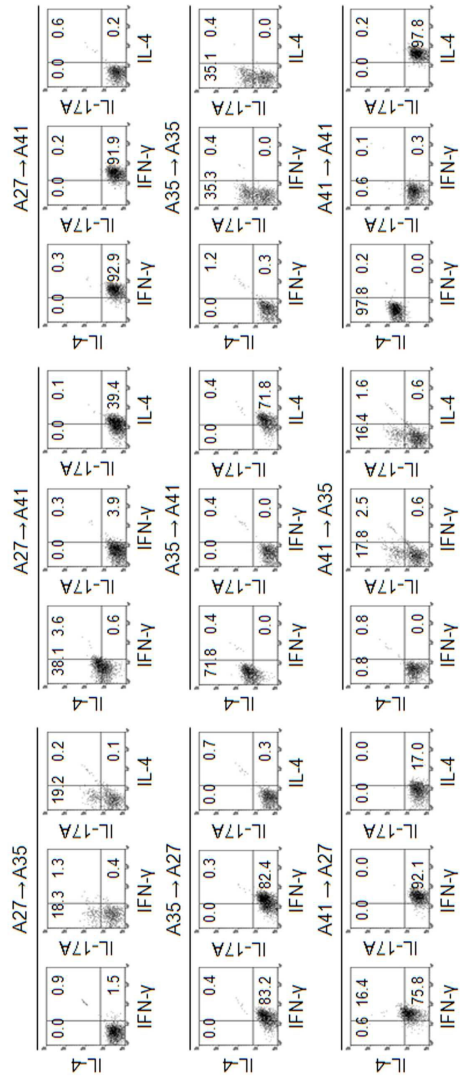
Signaling Transduction Molecules	A27	A35	A41
Human CD4⁺ T cells			
STAT1	+++	-	-
STAT3	-	+++	-
STAT4	+++	-	-
STAT5	-	-	+++
STAT6	-	-	+++
T-bet	↑	↓	↓
GATA-3	↓	↓	↑
RORγt	↓	↑	↓
Foxp3	no	no	no
Human T_{reg} cells			
STAT1	+++	-	-
STAT3	-	+++	-
STAT4	+++	-	-
STAT5	-	-	+++
STAT6	-	-	+
T-bet	↑	↓	↓
GATA-3	↓	↓	↓
RORγt	↓	↑	↓
Foxp3	↓	↓	↑

Association listed include only those verified to occur between endogenous STATs and master transcription factors in CD4⁺ T cells and T_{reg} cells. +++ = Strong signals; ++ = middle signal; + = weaker but reproducibly detectable signals; - = no signals detected by FACS cytometry experiments

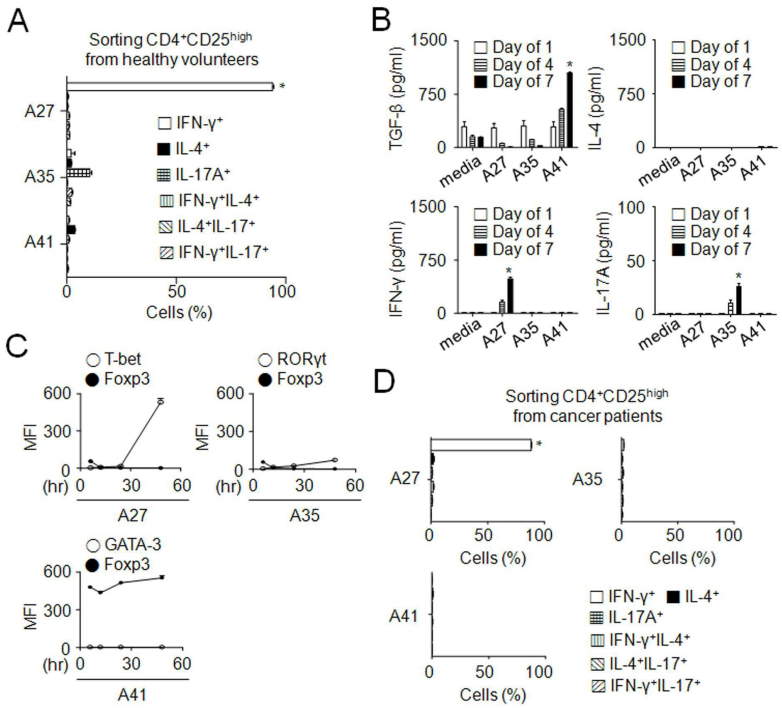
도면10



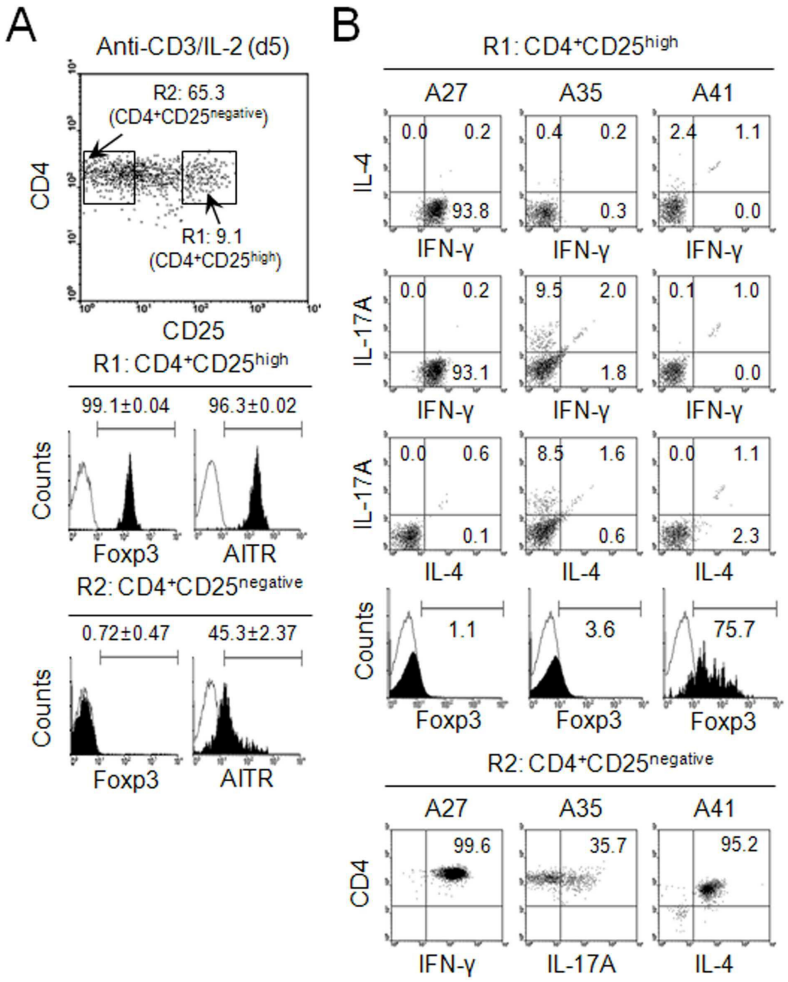
도면11


A27→A35
A27→A41
A41→A35
A41→A27
A35→A27
A35→A41
A35→A35
A41→A41
IL-4
IFN-γ
IL-17A
IL-4

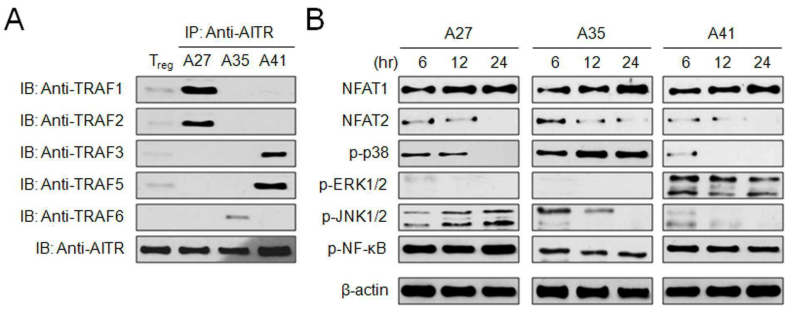
도면12


A
Sorting CD4+CD25high
from healthy volunteers
A27
A35
A41
IFN-γ+
IL-4+
IL-17A+
IFN-γ+IL-4+
IL-4+IL-17+
IFN-γ+IL-17+
0
50
100
Cells (%)
B
TGF-β (pg/ml)
IL-4 (pg/ml)
IFN-γ (pg/ml)
IL-17A (pg/ml)
Day of 1
Day of 4
Day of 7
1500
750
100
50
media
A27
A35
A41
C
T-bet
Foxp3
RORγt
GATA-3
MFI
600
300
(hr) 0 30 60
D
Sorting CD4+CD25high
from cancer patients

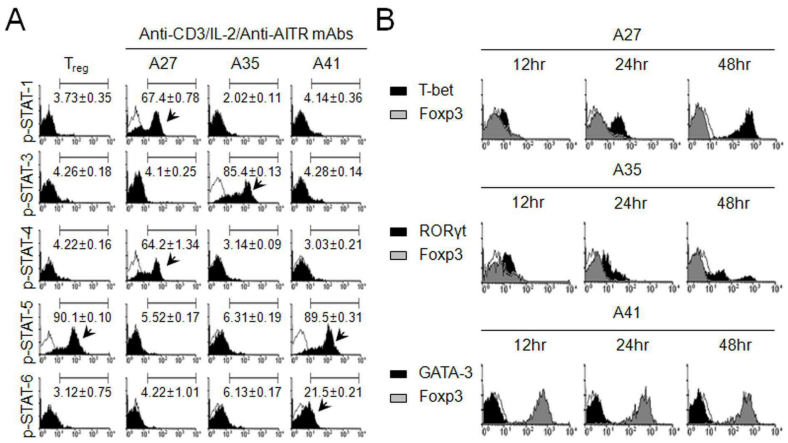
도면13


A
Anti-CD3/IL-2 (d5)
R2: 65.3
(CD4+CD25negative)
R1: 9.1
(CD4+CD25high)
CD4
CD25
R1: CD4+CD25high
99.1±0.04
96.3±0.02
Counts
Foxp3
AITR
R2: CD4+CD25negative
0.72±0.47
45.3±2.37
Counts
Foxp3
AITR
B
R1: CD4+CD25high
A27
A35
A41
IL-4
IFN-γ
0.0
0.2
93.8
0.4
0.2
0.3
2.4
1.1
0.0
IL-17A
IFN-γ
0.0
0.2
93.1
9.5
2.0
1.8
0.1
1.0
0.0
IL-17A
IL-4
0.0
0.6
0.1
8.5
1.6
0.6
0.0
1.1
2.3
Counts
Foxp3
1.1
3.6
75.7
R2: CD4+CD25negative
A27
A35
A41
CD4
IFN-γ
99.6
IL-17A
35.7
IL-4
95.2

도면14


A
IP: Anti-AITR
Treg
A27
A35
A41
IB: Anti-TRAF1
IB: Anti-TRAF2
IB: Anti-TRAF3
IB: Anti-TRAF5
IB: Anti-TRAF6
IB: Anti-AITR
B
A27
A35
A41
(hr)
6
12
24
NFAT1
NFAT2
p-p38
p-ERK1/2
p-JNK1/2
p-NF-κB
β-actin

도면15



서 열 목 록

<110> NATIONAL CANCER CENTER

<120> Novel epitope for switching to Th2 cell and use thereof

<130> PA120681KR

<150> KR 10-2012-0061791

<151> 2012-06-08

<160> 50

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Extracellular domain(ECD) of AITR

<400> 1

Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu
1 5 10 15

Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg

20 25 30

Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys

35 40 45

Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr

50 55 60

Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly
65 70 75 80

Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe
85 90 95

Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln
100 105 110
Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val
115 120 125
Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala Glu Pro Pro
130 135

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Epitope of A41
<400> 2
Gly Thr Asp Ala Arg Cys Cys Arg Val His Thr
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Epitope of A27 or B32
<400> 3
His Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys
1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Epitope of A35 or B62
<400> 4
Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys
1 5 10

<210> 5

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a heavy chain variable region of A41

<400> 5

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

Ala 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ile Ala Ala Ala Gly Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> CDR1 of a heavy chain variable region of A41

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of a heavy chain variable region of A41

<400> 7

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of a heavy chain variable region of A41

<400> 8

Ala Arg Gly Ile Ala Ala Ala Gly Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Met Asp Val

20

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of A41

<400> 9

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 Thr Ile Tyr Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Gly Gly

50 55 60

Arg Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDR1 of a light chain variable region of A41
<400> 10
Gln Thr Ile Tyr Asn Tyr
1 5
<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDR2 of a light chain variable region of A41
<400> 11
Ala Ala Ser
1
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDR3 of a light chain variable region of A41
<400
> 12
Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro Leu Thr
1 5
<210> 13
<211> 381
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> a heavy chain variable region of A41
<400> 13
caggtccagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggaata 300

gcagcagctg ggccccccta ctactactac tactactaca tggacgtctg gggcaaaggg 360

accacggtca ccgtctcctc a 381

<210> 14

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of A41

<400> 14

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gaccatttac aactatctaa attggtatca gcagaagcca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcggtg gccgtggata tgggacagat ttcactctca ccatcaacag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttactt ctgtcaacag agttacacga gtcctctcac ttttggccag 300

gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 15

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a heavy chain variable region of A27

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Thr Gln Val Lys Met Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Thr His Arg Thr Asn Ser Ser Pro Lys Leu

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Asp Asn
100 105 110

Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of a heavy chain variable region of A27

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of a heavy chain variable region of A27

<400> 17

Ile Ser Pro Tyr Thr His Arg Thr
1 5

<210> 18

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of a heavy chain variable region of A27

<400> 18

Ala Arg Asp Gly Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Phe Asp Asn
1 5 10 15

Gly Ala Phe Asp Ile
20

<210> 19

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of A27

<400> 19

Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Tyr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Arg
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Asn Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of a light chain variable region of A27

<400> 20

Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr
1 5

<210> 21

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of a light chain variable region of A27

<400> 21

Asp Asn Tyr

1

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of a light chain variable region of A27

<400> 22

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Asn Ala Trp Val

1 5 10

<210> 23

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a heavy chain variable region of A27

<400> 23

caggtccagc tggtgcagtc tggaactcag gtgaagatgc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggtta cacctttgac gactatggta tcggctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgaatg gatgggatgg atcagccctt acactcatag gacaaattct 180

tcaccgaagc tccaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 300

acgtattacg atttttggag tggttatttc gacaatggtg ctttgatat ctggggccaa 360

ggcaccctgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 24

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of A27

<400> 24

cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tcctgctctg gaagcacctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcaactc 120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaattata agcgaccctc tgggattcct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccgg 240

actggggacg aggccgatta tttctgcgga acatgggata gtagcctgaa tgcttgggtg 300

ttcggcgggg ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 25

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a heavy chain variable region of B32

<400> 25

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Ala Gly Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Lys Gly Tyr Ser Ser Asn Trp Arg Ser Ala Phe Asp Ile

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of a heavy chain variable region of B32

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly

1 5

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of a heavy chain variable region of B32

<400> 27

Ile Thr Gly Ser Ala Gly Gly Gly Ser Thr

1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of a heavy chain variable region of B32

<400> 28

Ala Lys Gly Tyr Ser Ser Asn Trp Arg Ser Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of B32

<400> 29

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

1 5 10 15

Thr Ala Gly Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr

85 90 95

Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of a light chain variable region of B32

<400> 30

Ala Leu Pro Lys Gln Tyr

1 5

<210> 31

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of a light chain variable region of B32

<400> 31

Lys Asp Thr

1

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of a light chain variable region of B32

<400> 32

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Pro Val

1 5 10

<210> 33

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a heavy chain variable region of B32

<400> 33

gaggtccagc tgttggagtc tgggggaggc ttgatacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc acctacggca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attactggta gtgctggtgg tggtagcaca 180

aattacgcag actccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtttatta ctgtgcgaag 300

gggtatagca gcaactggcg gtcagctttt gatatctggg gccaagggac aatggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 34

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of B32

<400> 34

tcctatgagc tgatgcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacagac ggccgggatc 60

acctgctctg gagatgcatt gccaaagcaa tatgcttatt ggtaccagca gaggccaggc 120

caggcccctg tgttgctcat atataaagac actgagaggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccagctcagg gacaacagtc acgttgacca tcagtggagt ccaggcagaa 240

gacgaggctg actattactg tcaatcagca gacagcagtg gtacttatcc ggtgttcggc 300

ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 35

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a heavy chain variable region of A35

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Thr

100 105 110

Asp Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120 125

Ser Ser

130

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of a heavy chain variable region of A35 or A62

<400> 36

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of a heavy chain variable region of A35 or A62

<400> 37

Ile Ser Asp Asn Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 38

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of a heavy chain variable region of A35 or A62

<400> 38

Ala Arg Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Thr
1 5 10 15

Asp Glu Asp Ala Phe Asp Ile
20

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of A35

<400> 39

Glu Ile Val 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 Ser Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Leu Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> CDR1 of a light chain variable region of A35 or A62

<400> 40

Gln Ser Ile Asn Asn Tyr

1 5

<210> 41

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2 of a light chain variable region of A35 or A62

<400> 41

Ala Thr Ser

1

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3 of a light chain variable region of A35 or A62

<400> 42

Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 43

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a heavy chain variable region of A35

<400> 43

gaagtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc ttggtccagc cgggggggtc cctaagactc 60

tcctgttcag cctctggatt cagcttcagt agttatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg gactggaata tgtctcaggt attagtgata atggaggtag cacaaagtac 180

gcagactcag tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attcccagaa cacgctgtat 240

cttcaaatga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggcggg 300

cccacgtatt acgatttttg gagtggttat ataccgacg aagatgcttt tgatatctgg 360

ggccaaggca ccctggtcac cgtctcctcg 390

<210> 44

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of A35

<400> 44

gaaattgtaa tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagtattaac aactatttaa actggtatca gcaaaaaccc 120

gggaaagccc ctaagctcct aatctatgct acatccaggt tgcagagtgg cgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtggatc tggggcagat ctcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatgttg caacttatta ctgtcaacag agctacagtt tcccgtggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 45

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a heavy chain variable region of B62

<400> 45

Glu Val Gln Leu Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val
1 5 10 15

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser

20 25 30

Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
35 40 45

Leu Glu Tyr Val Ser Gly Ile Ser Asp Asn Gly Gly Ser Thr Lys Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln
65 70 75 80

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser
100 105 110

Gly Tyr Tyr Thr Asp Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser

130

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of B62

<400> 46

Glu Ile Val 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 Ser Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Phe Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 47

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a heavy chain variable region of B62

<400> 47

gaagtgcagc tggaagtgca gctggtgcag tctgggggag gcttggtcca gccgggggggg 60

tccctaagac tctcctgttc agcctctgga ttcagcttca gtagttatgc tatgcactgg 120

gtccgccagg ctccagggaa gggactggaa tatgtctcag gtattagtga taatggaggt 180

agcacaaagt acgcagactc agtgaagggc agattcacca tctccagaga caattcccag 240

aacacgctgt atcttcaaat gagcagcctg agatctgagg acacggccgt gtattactgt 300

gcgagaggcg ggcccacgta ttacgatttt tggagtggtt attataccga cgaagatgct 360

tttgatatct ggggccaagg caccctggtc accgtctcct cg 402

<210> 48

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> a light chain variable region of B62

<400> 48

gaaattgtaa tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagtattaac aactatttaa actggtatca gcaaaaaccc 120

gggaaagccc ctaagctcct aatctatgct acatccaggt tgcagagtgg cgtcccatcc 180

aggttcagtg gcagtggatc tggggcagat ctcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatgttg caacttatta ctgtcaacag agctacagtt tcccgtggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 49

aagcttggtc agcgccccac cggg 24

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 50

ccggcagagc cgccttaact cgag 24