



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0141666
(43) 공개일자 2014년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) C12N 15/19 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7029417(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년09월09일
심사청구일자 2014년10월21일
(62) 원출원 특허 10-2010-7007193
원출원일자(국제) 2008년09월09일
심사청구일자 2012년09월14일
(85) 번역문제출일자 2014년10월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/010510
(87) 국제공개번호 WO 2009/035577
국제공개일자 2009년03월19일
(30) 우선권주장
60/971,178 2007년09월10일 미국(US)
61/091,676 2008년08월25일 미국(US)

(71) 출원인
암젠 인코퍼레이티드
미국 91320-1799 캘리포니아주 사우전드 오크스
원 암젠 센터 드라이브
(72) 발명자
코머우, 마이클, 알.
미국 98110 워싱턴 베인브릿지 아일랜드 하이스쿨
로드 엔이 1044
스모더스, 제임스, 에프.
미국 02169 메사추세츠 퀸시 힐탑 스트리트 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이재민

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **홍선 기질 림프구형성소를 결합할 수 있는 항원 결합 단백질**

(57) 요약

본 발명의 상제는 인간 홍선 기질 림프구형성소(TSLP)에 결합하는 항원 결합 단백질들에 연관되는, 항체들을 포함하는 조성물들 및 방법들을 제공한다. 특정의 구체예들에 있어서, 본 발명의 상제는 완전한 인간, 인간화된 그리고 키메라 항-TSLP 항체들 및 이러한 항체들의 유도체들을 제공한다. 본 발명의 상제는 이러한 항체들 및 항체 단편들 그리고 유도체들을 인코딩하는 핵산들 및 이러한 항체들의 제조방법 그리고 TSLP-연관 염증성 및 섬유증 장애를 치료하고 그리고 예방하는 방법들을 포함하여 이러한 항체들을 사용하는 방법들을 더 제공한다.

대표도 - 도1a

가변경쇄 CDRs

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A1 NA	CAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTA TGCAAGC (SEQ ID NO: 5)	GGTAAAACTACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 52)	AACTCCCGGGACAGAAGTGGTAACCATCTGGT TT (SEQ ID NO: 97)
AA	QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO: 6)	GKNYRPS (SEQ ID NO: 53)	NSRDRSGNHLV (SEQ ID NO: 98)
A2 NA	CAAGGAGACAGCCTCAGAACCTATTA TGCAAGC (SEQ ID NO: 7)	GATAAAAACAACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 54)	AACTCCCGGGACAGCAGTGATAACCATCTAGT GTAT (SEQ ID NO: 99)
AA	QGDSLRTYYAS (SEQ ID NO: 8)	DKNNRPS (SEQ ID NO: 55)	NSRDSSDNHLVV (SEQ ID NO: 100)
A3 NA	ACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGC AGGTTTTGATGTACAC (SEQ ID NO: 9)	GATAACAACAATCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 56)	CAGTCCTATGACAGCAACCTGAGTGGTTCGATT GTGGTTT (SEQ ID NO: 101)
AA	TGSSSNIGAGFDVH (SEQ ID NO: 10)	DNNNRPS (SEQ ID NO: 57)	QSYDSNLGSIVV (SEQ ID NO: 102)
A4 NA	ACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGC AGGTTTTGATGTGCAC (SEQ ID NO: 11)	GATAACAACAATCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 58)	CAGTCCTATGACAGCAACCTGAGTGGTTCGATT GTGGTAT (SEQ ID NO: 103)
AA	TGSSSNIGAGFDVH (SEQ ID NO: 10)	DNNNRPS (SEQ ID NO: 57)	QSYDSNLGSIVV (SEQ ID NO: 102)
A5 NA	GGGGGAAACAACCTTGAAGTAAAA GTGTGCAC (SEQ ID NO: 12)	GATGATAGCGACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 59)	CAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGATCATGTGGTA T (SEQ ID NO: 104)
AA	GGNNLGSKSVH (SEQ ID NO: 13)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 60)	QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO: 105)

(72) 발명자

윤, 보-린 피.

미국 98177 워싱턴 시애틀 노쓰웨스트 서드 애비뉴
13728

메린, 크리스토퍼

미국 98107 워싱턴 시애틀 61 스트리트 엔더블유
2806

특허청구의 범위

청구항 1

돌연변이된 TSLP의 임의의 그룹에 결합하는 항원 결합 단백질보다 더 큰 친화성으로 SEQ ID NO: 2의 29-159번째 아미노산들에 따른 야생형의 성숙한 인간 TSLP 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항원 결합 단백질로서, 상기 돌연변이된 TSLP의 그룹은 야생형 TSLP 내의 돌연변이가 SEQ ID NO: 2로 나타내는 TSLP의 K12E, D22R, S40R, R122E, N124E, R125E 및 K129E로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 돌연변이로 이루어지는 돌연변이된 TSLP를 포함하는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 야생형 TSLP 내의 돌연변이는 K12E로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 야생형 TSLP 내의 돌연변이는 D22R로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 야생형 TSLP 내의 돌연변이는 S40R로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 야생형 TSLP 내의 돌연변이는 R122E로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 야생형 TSLP 내의 돌연변이는 N124E로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 야생형 TSLP 내의 돌연변이는 R125E로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 야생형 TSLP 내의 돌연변이는 K129E로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 항원 결합 단백질은 야생형 TSLP에 대한 친화성과 비교하여 돌연변이된 TSLP의 그룹의 임의의 2 이상의 멤버에 대해 더 낮은 결합 친화성을 갖는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 항원 결합 단백질은 야생형 TSLP에 대한 친화성과 비교하여 돌연변이된 TSLP의 그룹의 모든 멤버에 대해 더 낮은 결합 친화성을 갖는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 항원 결합 단백질은 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 모노클로날 항체, 재조합 항체, 항원-결합 항체 단편, 단일쇄 항체, 단량체성 항체, 다이어바디(diabody), 트라이어바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), Fab 단편, IgD 항체, IgE 항체, IgM 항체, IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체 및 IgG4 항체로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 항원 결합 단백질은 인간 항체인 단리된 항원 결합 단백질.

청구항 13

청구항 제 11 항의 항체를 포함하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 연관된 출원들의 교차 참조

[0002] 본 출원은 미국특허법 119조(35 U.S.C. § 119) 하에서 2008년 8월 25일자로 출원된 미합중국 가특허출원 제 61/091,676호 및 2007년 9월 10일자로 출원된 동 제60/971,178호의 우선권을 주장하며, 이들을 본 명세서에 참조로 인용한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명의 분야는 인간 흉선 기질 림프구형성소(human thymic stromal lymphopoietin)를 결합할 수 있는 항체들을 포함하는 항원 결합 단백질들의 조성물들 및 마찬가지로 연관된 방법들에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 최근, 특히 선진국들에서, 천식(asthma), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 아토피 피부염(atopic dermatitis) 및 음식 알러지(food allergies) 등과 같은 알러지성 질병들의 보급이 놀라운 정도의 인구비율에서의 증가로 증가하고 있는 것으로 나타나고 있다(카이(Kay)의 N Engl. J. Med. 344:30-37(2001)). 흉선 기질 림프구형성소(TSLP ; thymic stromal lymphopoietin)는 전구염증 자극들(pro-inflammatory stimuli)에 반응하여 생성된 사이토카인 유도 상피세포(epithelial cell)이다. TSLP는 일차적으로는 수지상 세포 및 비만 세포(dendritic and mast cells)들에 대한 그들의 활성을 통하여 알러지성 염증성 반응들을 촉진한다는 것이 밝혀졌다(소우멜리스와 그의 동료들(Soumelis et al.)의 Nat Immun 3(7): 673-680 (2002); 알라카베르디(Allakhverdi)와 그의 동료들의 J. Exp. Med. 204(2):253-258 (2007)). 천식환자의 기도 내에서 질병의 심각성에 상관하여 인간 TSLP 발현이 증가하는 것으로 보고되었다(잉(Ying)과 그의 동료들의 J. Immunol. 174: 8183-8190 (2005)). 게다가, TSLP 단백질 수준들은 천식 환자들 및 알러지성 장애들을 앓는 다른 환자들의 농축된 기관지경 폐포 세척 검사(bronchoalveolar lavage ; BAL) 유체 내에서 검출가능하다. 또한, TSLP 단백질 및 mRNA의 증가된 수준들이 아토피성 피부염(AD) 환자들의 병소 피부(lesional skin) 내에서 발견되었다. 따라서, TSLP 길항제(TSLP antagonists)들이 염증성 장애들을 치료하는 데 유용할 수 있다.

[0006] 게다가, TSLP는 또한 미합중국 특허출원 제 11/344,379호에서 보고하고 있는 바와 같이 섬유증(fibrosis)을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 섬유질병(Fibrotic disease)은 상기 섬유증 단계(fibrosis phase)가 확인되지 않은 채 계속되는 경우에서 조직복구과정(tissue repair process) 동안에 과도한 조직 재형성(tissue remodeling) 및 영구적인 흉터 조직(scar tissue)의 형성을 야기하는 결과를 가져온다((윈(Wynn)의 Nature Rev. Immunol. 4, 583 (2004)). 미합중국 내에서의 사망의 45% 정도가 섬유증성 질환(fibroproliferative disease)들에 기인할 수 있는 것으로 예상되고 있으며, 이는 많은 조직들 및 기관계들에 영향을 미칠 수 있다(윈의 상기 문헌

595페이지).

[0007] 섬유증이 특발성 폐섬유증(idopathic pulmonary fibrosis), 진행성 신장질환(progressive kidney disease) 및 간경변증(liver cirrhosis) 등과 같은 많은 지속성 염증성 질병들에 공통적이기 때문에, 현재 항-염증성 치료들이 섬유질병들을 치료하는 데 사용되고 있다. 그러나, 섬유증의 조절에 포함되는 메카니즘들은 염증의 메카니즘들과는 구별되는 것으로 나타나며, 항-염증요법들이 항상 섬유증의 감소 또는 예방에서 효과적인 것은 아니다(원의 상기 문헌). 따라서, 섬유증을 감소시키고 그리고 예방할 수 있는 치료법들을 개발하여야 할 필요성이 잔존하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서, TSLP에 대한 길항제들이 이들 염증성 및 섬유증 장애(fibrotic disorders)들을 치료하는 데 유용할 것으로 기대되고 있다. 본 발명의 상세한 설명은 이러한 치료법들 및 치료방법들을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 (a) (i) A1 내지 A27의 경쇄 CDR3 시퀀스들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 CDR3와는 총 2개 이하의 아미노산 부가들(additions), 치환들(substitutions) 및/또는 결실들(deletions)로 다른 경쇄 CDR3 시퀀스; (ii) QQAX₈SFPLT(SEQ ID NO: 251);들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 경쇄 CDR3 시퀀스; 및 (b) (i) A1 내지 A27의 중쇄 CDR3 시퀀스들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 CDR3와는 총 3개 이하의 아미노산 부가들, 치환들 및/또는 결실들로 다른 중쇄 CDR3 시퀀스; (ii) GGGIX₁₂VADYYX₁₃YGMDV(SEQ ID NO: 255); 및 (iii) DX₂₁GX₂₂SGWPLFX₂₃Y(SEQ ID NO: 259);들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 중쇄 CDR3 시퀀스들을 포함하여 이루어지는 단리된 항원 결합 단백질을 제공하며, 여기에서 X₈은 N잔기(N residue) 또는 D잔기이고; X₁₂는 P잔기 또는 A잔기이고; X₁₃은 Y잔기 또는 F잔기이고; X₂₁은 G잔기 또는 R잔기이고; X₂₂는 S잔기 또는 T잔기이고; X₂₃은 A잔기 또는 D잔기이고, 그리고 여기에서 상기 항원 결합 단백질은 TSLP에 특이적으로 결합한다.

[0010] 다른 관점에 있어서, 본 발명의 상기 단리된 항원 결합 단백질은 (a) (i) A1 내지 A27의 경쇄 CDR1과는 3개 이하의 아미노산 부가들, 치환들 및/또는 결실들로 다른 경쇄 CDR1 시퀀스; (ii) RSSQSLX₁YSDGX₂TYLN(SEQ ID NO: 246); (iii) RASQX₄X₅SSWLA(SEQ ID NO: 249);들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 경쇄 CDR1; (b) (i) A1 내지 A27의 CDR2와는 2개 이하의 아미노산 부가들, 치환들 및/또는 결실들로 다른 경쇄 CDR2 시퀀스; (ii) KVSX₃(SEQ ID NO: 247의 잔기 1 내지 4들); (iii) X₆X₇SSLQS(SEQ ID NO: 250); 또는 (iv) QDX₉KRPS (SEQ ID NO: 252);들로부터 선택되는 경쇄 CDR2 시퀀스; 및 (c) (i) A1 내지 A27의 CDR1 시퀀스와는 2개 이하의 아미노산 부가들, 치환들 및/또는 결실들로 다른 중쇄 CDR1 시퀀스; (ii) X₁₀YGMH(SEQ ID NO: 253); 및 (iii) X₁₅X₁₆YMX₁₇(SEQ ID NO: 257);들로부터 선택되는 중쇄 CDR1 시퀀스; 및 (d) (1) A1 내지 A27의 CDR2 시퀀스와는 3개 이하의 아미노산 부가들, 치환들 및/또는 결실들로 다른 중쇄 CDR2 시퀀스; (ii) VIWX₁₁DGSNKYYADSVKG(SEQ ID NO: 254); (iii) VISYDGSX₁₄KYYADSVKG(SEQ ID NO: 256); 및 (iv) WINPNSGGTNX₁₈X₁₉X₂₀KFQG(SEQ ID NO: 258)들로부터 선택되는 중쇄 CDR2;들 중의 적어도 하나를 더 포함하며, 여기에서 X₁은 V잔기 또는 I잔기이고; X₂는 N잔기 또는 D잔기이고; X₃은 Y잔기 또는 N잔기이고; X₄는 G잔기 또는 S잔기이고; X₅는 L잔기 또는 I잔기이고; X₆은 N잔기 또는 T잔기이고; X₇은 T잔기 또는 A잔기이고; X₉는 K잔기 또는 N잔기이고; X₁₀은 S잔기 또는 N잔기이고; X₁₁은 Y잔기 또는 F잔기이고; X₁₄는 Y잔기 또는 N잔기이고; X₁₅는 D잔기 또는 G잔기이고; X₁₆은 Y잔기 또는 D잔기이고; X₁₇은 Y잔기 또는 H잔기이고; X₁₈은 Y잔기 또는 H잔기이고; X₁₉는 V잔기 또는 A잔기이고; X₂₀은 Q잔기 또는 R잔기이고; 그리고 여기에서 상기 항원 결합 단백질은 TSLP에 특이적으로 결합한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 청구항 제1항의 상기 단리된 항원 결합 단백질은 (a) (i) A1 내지 A27들로부터 선택되는 경쇄 CDR1; (ii) A1 내지 A27들로부터 선택되는 경쇄 CDR2; (iii) A1 내지 A27들로부터 선택되는 경쇄 CDR3;들을 포함하는 경쇄 가변도메인(light chain variable domain); 또는 (b) (i) A1 내지 A27들로부터

선택되는 중쇄 CDR1; (ii) A1 내지 A27들로부터 선택되는 중쇄 CDR2; (iii) A1 내지 A27들로부터 선택되는 중쇄 CDR3;들을 포함하는 중쇄 가변도메인(heavy chain variable domain); 또는 (c) (a)의 상기 경쇄 가변도메인과 (b)의 중쇄 가변도메인을 포함한다.

[0012] 또 다른 관점에 있어서, 상기 단리된 항원 결합 단백질은 (a) (i) L1 내지 L27들로부터 선택되는 경쇄 가변도메인 시퀀스에 적어도 80%로 동일한 시퀀스를 갖는 아미노산들; (ii) L1 내지 L27의 상기 경쇄 가변도메인 시퀀스를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 시퀀스에 적어도 80%로 동일한 폴리뉴클레오티드 시퀀스에 의해 인코딩된 아미노산들의 시퀀스; (iii) 적절하게 가혹한 조건들(moderately stringent conditions) 하에서 L1 내지 L27의 경쇄 가변도메인 시퀀스로 이루어지는 폴리뉴클레오티드의 보체(complement)로 잡종화(hybridizes)하는 폴리뉴클레오티드 시퀀스에 의해 인코딩된 아미노산들의 시퀀스;들로부터 선택되는 경쇄 가변도메인 시퀀스; (b) (i) H1 내지 H27의 중쇄 가변도메인 시퀀스에 적어도 80%로 동일한 시퀀스를 갖는 아미노산들의 시퀀스; (ii) H1 내지 H27의 상기 중쇄 가변도메인 시퀀스를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 시퀀스에 적어도 80%로 동일한 폴리뉴클레오티드 시퀀스에 의해 인코딩된 아미노산들의 시퀀스; (iii) 적절하게 가혹한 조건들 하에서 H1 내지 H27의 중쇄 가변도메인 시퀀스로 이루어지는 폴리뉴클레오티드의 보체로 잡종화하는 폴리뉴클레오티드 시퀀스에 의해 인코딩된 아미노산들의 시퀀스;들로부터 선택되는 중쇄 가변도메인 시퀀스; 또는 (c) (a)의 상기 경쇄 가변도메인 및 (b)의 상기 중쇄 가변도메인들을 포함하여 이루어지며, 여기에서 상기 항원 결합 단백질은 TSLP에 특이적으로 결합한다.

[0013] 또 다른 관점에 있어서, 본 발명의 단리된 항원 결합 단백질은 (a) L1 내지 L27들로부터 선택되는 경쇄 가변도메인 시퀀스; (b) H1 내지 H27들로부터 선택되는 중쇄 가변도메인 시퀀스; 또는 (c) (a)의 상기 경쇄 가변도메인 및 (b)의 상기 중쇄 가변도메인;을 포함하여 이루어지며, 여기에서 상기 항원 결합 단백질은 TSLP에 특이적으로 결합한다.

[0014] 또 다른 관점에 있어서, 상기 단리된 결합 단백질은 L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13.1H13, L13.2H13, L14.1H14, L14.2H14, L15.1H15, L15.2H15, L16.1H16, L16.2H16, L17H17, L18.1H18, L18.2H18, L19.1H19, L19.2H19, L20.1 H20, L20.2H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26 및 L27H27들로부터 선택되는 경쇄 가변도메인 시퀀스 및 중쇄 가변도메인 시퀀스를 포함한다.

[0015] 또 다른 관점에 있어서, 상기 단리된 항원 결합 단백질은 A2, A3, A4 및 A5들로부터 선택되는 대조 항체(reference antibody)와 실질적으로 동일한 Kd로 TSLP에 결합하는 결합 단백질을 포함한다. 또 다른 관점에 있어서, 상기 단리된 항원 결합 단백질은 일차세포 오스테오프로테린 분석법(primary cell OPG assay)에 따라 A2, A3, A4 및 A5들로부터 선택되는 대조 항체와 실질적으로 동일한 IC50으로 TSLP 활성을 저해하는 결합 단백질을 포함한다.

[0016] 또 다른 관점에 있어서, 상기 단리된 항원 결합 단백질은 TSLP에의 결합에 대하여 대조 항체와 교차-경쟁(cross-competes)한다. 또 다른 관점에 있어서, 상기 단리된 항원 결합 단백질은 대조 항체, 예를 들면 A2, A4, A5, A6, A7, A10, A21, A23 또는 A26와 동일한 에피토프(epitope)를 결합한다.

[0017] 하나의 관점에 있어서, 상기 단리된 항원 결합 단백질은 인간 항체(human antibody), 인간화된 항체(humanized antibody), 키메라 항체(chimeric antibody), 모노클로날 항체(monoclonal antibody), 폴리클로날 항체(polyclonal antibody), 재조합 항체(recombinant antibody), 항원-결합 항체 단편(antigen-binding antibody fragment), 단일쇄 항체(single chain antibody), 다이어바디(diabody), 트라이어바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), Fab 단편(Fab fragment), F(fa')x 단편(F(fa')x fragment), 도메인 항체(domain antibody), IgD 항체(IgD antibody), IgE 항체(IgE antibody) 및 IgM 항체(IgM antibody) 및 IgG1 항체(IgG1 antibody)와 IgG2 항체와 IgG3 항체와 IgG4 항체 및 H-쇄 내 이황화 결합(intra H-chain disulfide bonds)들에 대한 경향을 완화하는 힌지영역(hinge region) 내에 적어도 하나의 돌연변이(mutation)를 갖는 IgG4 항체들로부터 선택된다. 하나의 관점에 있어서, 상기 단리된 항원 결합 단백질은 인간 항체이다.

[0018] 본 발명의 상기 항원결합제(antigen binding agents)의 상기 경쇄 가변도메인, 중쇄 가변도메인 또는 둘 다를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 시퀀스를 포함하는 단리된 핵산 분자가 또한 제공된다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 경쇄 가변시퀀스(light chain variable sequence) L1 내지 L27 및/또는 중쇄 가변시퀀스 H1 내지 H27 또는 둘 다를 포함한다.

[0019] 본 발명의 상기 폴리뉴클레오티드들을 포함하는 벡터(vectors)들이 또한 제공된다. 하나의 구체예에 있어서,

상기 벡터는 발현벡터(expression vector)이다. 상기 벡터를 포함하는 숙주세포(host cell)가 또한 제공된다. 본 발명의 상기 항원 결합 단백질을 생성할 수 있는 하이브리도마(hybridoma)가 또한 제공된다. 숙주세포가 상기 항원 결합 단백질을 발현하도록 하는 것을 허용하는 조건들 하에서 상기 숙주세포를 배양하는 것을 포함하는 상기 항원 결합 단백질의 제조방법이 또한 제공된다.

[0020] 본 발명의 상기 항원 결합 단백질들을 포함하는 약제학적 조성물(pharmaceutical composition)이 또한 제공된다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 인간 항체를 포함한다. 대상체에 상기 조성물의 치료적 유효량(therapeutically effective amount)을 투여하는 것을 포함하는 치료를 필요로 하는 대상체 내에서의 TSLP-연관 염증성 상태의 치료방법이 또한 제공된다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 염증성 상태는 알러지성 천식(allergic asthma), 알러지성 비부비동염(allergic rhinosinusitis), 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis) 또는 아토피 피부염이다. 대상체에 상기 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 치료를 필요로 하는 대상체 내에서의 TSLP-연관 섬유증 장애의 치료방법이 또한 제공된다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 섬유증 장애는 경피증(scleroderma), 간질성 폐 질환(interstitial lung disease), 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 만성 B형 또는 C형 간염으로부터 야기되는 섬유증, 방사능-유도 섬유증(radiation-induced fibrosis) 및 상처 치료로부터 야기되는 섬유증이다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 인간 흉선 기질 림프구형성소(human thymic stromal lymphopoietin)를 결합할 수 있는 항체들을 포함하는 항원 결합 단백질들의 조성물들 및 마찬가지로 연관된 방법들을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a 내지 도 1f들은 A1 내지 A27의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들의 아미노산 시퀀스를 제공한다. 또한, 각 CDR을 인코딩하는 예시적인 뉴클레오타이드 시퀀스들이 제공된다.

도 2a 내지 도 2f들은 A1 내지 A27의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역들의 아미노산 시퀀스를 제공한다. 또한, 각 CDR을 인코딩하는 예시적인 뉴클레오타이드 시퀀스들이 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 길항적인 TSLP 항체들, 항체 단편들 및 항체 유도체들 등과 같은 TSLP 결합 및 신호화(signaling)를 저해하는 항원 결합 단백질들을 포함하여 사이토카인 인간 흉선 기질 림프구형성소(TSLP)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질들을 포함하는 항원결합제들에 관한 것이다. 상기 항원결합제들은 TSLP의 그의 수용체(receptor)에의 결합을 저해 또는 차단하고, 그리고 염증성 질병들, 섬유질병들 및 다른 연관된 상태들을 치료하는 데 유용하다.

[0024] 본 발명은 TSLP에 결합하는 항원 결합 단백질들에 연관되는 조성물들, 키트(kits)들 및 방법들을 더 제공한다. 항-TSLP 항체, 항체 단편 또는 항체 유도체의 전부 또는 일부를 인코딩하는 핵산 등과 같은 TSLP에 결합하는 폴리펩티드의 전부 또는 일부를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드들의 시퀀스를 포함하는 핵산 분자들 및 그의 유도체들과 단편들이 또한 제공된다. 본 발명은 이러한 핵산들을 포함하는 벡터들 및 플라스미드들 그리고 이러한 핵산들 및/또는 벡터들 및 플라스미드들을 포함하는 세포들 또는 세포주들을 더 제공한다. 상기 제공된 방법들에는, 예를 들면, 항-TSLP 항체 등과 같은 인간 TSLP에 결합하는 항원 결합 단백질을 제조, 동정(identifying) 또는 분리하는 방법들, 항원 결합 단백질이 TSLP에 결합하는 지의 여부를 결정하는 방법들, TSLP에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물 등과 같은 조성물들을 제조하는 방법들, 및 예를 들어 TSLP에 의해 매개되는 상태를 치료하는 방법들 및 생체 내 또는 시험관 내에서 TSLP 신호화와 연관되는 생물학적 활성을 조절(modulating)하는 방법들 등과 같이 대상체 내에서의 TSLP에 결합하는 항원 결합 단백질을 투여하는 방법들이 포함된다.

[0025] TSLP

[0026] 흉선 기질 림프구형성소(TSLP)는 인터루킨-2족(IL-2 family)이기는 하나 인터루킨-7에 더 긴밀하게 연관되는 4개의 알파-나선형 다발 I형 사이토카인(α -helical bundle type I cytokine)이다. 사이토카인들은 특정의 자극에 대응하여 분비되는 저분자량의 조절단백질(regulatory proteins)들이며, 이는 표적세포(target cells)들의 막 상에서 수용체들로서 작용한다. 사이토카인들은 다양한 세포상 반응(cellular responses)들을 조절한다. 사이토카인들은 종합적으로 문헌 사이토카인(Cytokines, A. Mire-Sluis and R. Thorne, ed., Academic Press,

New York, (1998)) 등과 같은 참조문헌들에 기술되어 있다.

[0027] TSLP는 본래 쥐과 동물의 흉선 기질 세포주(murine thymic stromal cell line ; 심스(Sims)와 그의 동료들의 J. Exp. Med 192 (5), 671-680 (2000))들로부터 복제되었으며, 초기 B세포 및 T세포 발달을 지지하는 것으로 밝혀졌다. 인간 TSLP는 나중에 복제되었으며 쥐과 동물의 상동체(murine homolog)에 대하여 아미노산 시퀀스에 있어서 43%의 동일성을 갖는 것으로 밝혀졌다(쿠엔트마이어(Quentmeier)와 그의 동료들의 Leukemia 15, 1286-1292 (2001) 및 미합중국 특허 제6,555,520호, 이들은 본 명세서에서 참조로 인용됨). 인간 TSLP의 폴리뉴클레오티드 및 아미노산 시퀀스들은 각각 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 2 내에 제공된다. TSLP는 TSLP 수용체(TSLPR)로 불리는 조혈소 수용체족(hematopoietin receptor family)으로부터의 수용체쇄(receptor chain)에 낮은 친화성(affinity)으로 결합하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 미합중국 특허출원 제09/895,945호(공개번호 제2002/0068323)에 기술되어 있다(SEQ ID NO: 3 및 4). 인간 TSLPR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 시퀀스는 본 특허출원의 SEQ ID NO: 3로 제공되며, 상기 아미노산 시퀀스는 본 출원의 SEQ ID NO: 4로 각각 제공된다. 상기 TSLPR의 가용성 도메인(soluble domain)은 대략적으로 SEQ ID NO: 4의 아미노산 25 내지 231들이다. TSLP는 TSLPR의 이중이량체성의 착체(heterodimeric complex) 및 인터루킨 7 수용체 알파 IL-7R α 에 높은 친화성으로 결합한다(박(Park)과 그의 동료들의 J. Exp. Med 192:5 (2000), 미합중국 특허출원 제09/895,945호, 공개번호 제U.S. 2002/0068323호). IL-7 수용체 알파는 미합중국 특허 제5,264,416호의 도 2에 나타나 있으며, 본 명세서에서는 이를 참조로 인용한다. 상기 IL-7 수용체 알파의 상기 가용성 도메인의 시퀀스는 미합중국 특허 제5,264,416호 내의 도 2의 아미노산 1 내지 219이다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "TSLP 폴리펩티드"들은 면역원(immunogens)들로서 유용한 TSLP의 여러 형태들을 의미한다. 이들에는 변형된 형태로 발현된 TSLP가 포함되며, 여기에서 국제공개특허공보 제WO 03/032898호에서 기술된 바와 같은 아미노산 시퀀스의 변형(modification)을 통하여 퓨린 개열(furin cleavage)이 제거되었다. 변형된 TSLP는 활성을 보류하나, 그 전장 시퀀스(full length sequence)는 CHO 세포들 등과 같은 포유동물 세포들 내에서 보다 쉽게 발현된다. TSLP 폴리펩티드들의 예들에는 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 373 및 SEQ ID NO: 375들이 포함된다.

[0029] 게다가, 사이노몰거스(cynomolgus) TSLP가 동정되었으며, 또한 이하의 실시예 1에 나타내었으며, 이는 예를 들면 SEQ ID NO: 380으로 규정된다.

[0030] 정량적 mRNA 분석(소우멜리스(Soumelis)와 그의 동료들의 Nature Immunol. 3 (7) 673- 680 (2002))에 의해 결정된 바와 같이, TSLP는 피부 세포, 기관지 세포(bronchial cells), 기도 세포(tracheal cells) 및 폐와 진피의 섬유아세포들(lung and dermal fibroblasts)들을 포함하여 인간 상피세포(human epithelial cells)들 내에서 생성된다. 쥐과의 동물 및 인간 TSLP들 둘 다는 알러지성 염증을 촉진하는 데 포함된다.

표 1

[0031]

단백질명	종	동의어	데이터베이스(들) (또는 특허출원)	기탁번호
TSLP	인간 (Homo sapiens)	흉선 기질 림프구형성소 단백질	젠뱅크(GenBank)/미합중국 특허 제6555520호의 SEQ ID NO: 2	AAK67490/
변형된 TSLP	인간 (Homo sapiens)	흉선 기질 림프구형성소	국제공개특허공보 제WO 03/032898호의 SEQ ID NOS: 10, 12, 14, 16, 17, 18	
TSLP	생쥐 (Mus musculus)	흉선 기질 유도 림프구형성소; 흉선 기질 유도 림프구형성소	젠뱅크	AAF81677
TSLPR	인간 (Homo sapiens)	사이토카인 수용체-형 2(CRL2); IL-XR; 흉선 기질 림프구형성소 단백질 수용체	미합중국 특허출원 제2002/0068323호의 SEQ ID NO: 5	
TSLPR	생쥐 (Mus)	사이토카인 수용체-형 인자 2; I형 사이토카인 수용체 델타 1; 사이토카인 수용체-형 분자 2(CRLM-2); 흉선 기질 림프구형성소 단백질 수용체	젠뱅크, SWISSPROT	Q8CI19

IL-7R	인간 (Homo sapiens)	인터루킨-7 수용체	유전자은행/미합중국 제5264416호	특허	NM_002185
-------	----------------------	------------	-------------------------	----	-----------

[0032] TSLP 활성

[0033] 국제공개특허공보 제W0 03/032898호에서 기술된 바와 같이, TSLP 활성들은 인간 TSLPR을 발현하는 BAF 세포 (BAF/HTR)들의 증식을 포함한다. BAF/HTR 생물검정(BAF/HTR bioassay)은 쥐과의 동물의 프로 B 림프구 세포주 (pro B lymphocyte cell line)을 활용하며, 이는 상기 인간 TSLP 수용체에 형질감염(transfected)되었다. 상기 BAF/HTR 세포들은 성장에 대하여 huTSLP에 의존적이며, 시험 샘플들에 첨가된 활성의 huTSLP에 반응하여 증식한다. 배양 기간에 후속하여, 알라마르 블루 염료 I(Alamar Blue dye I) 또는 삼중수소 티미딘(tritiated thymidine)에 의하여 세포 증식이 측정된다. 증식은 또한 사이퀀트 세포 증식 분석 키트(CYQUANT cell proliferation assay kit ; 인비트로젠(Invitrogen)) 등과 같은 상용적으로 획득가능한 키트(kit)를 사용하여 측정될 수 있다.

[0034] huTSLP 활성에 대한 별도의 분석법들에는, 예를 들면, 미합중국 특허 제6,555,520호에서 기술된 바와 같은 TSLP 에 의한 인간 골수로부터의 T세포 성장의 유도를 측정하는 분석이 포함된다. 다른 TSLP 활성은 레빈(Levin)과 그의 동료들의 J. Immunol. 162:677-683 (1999) 및 국제공개특허공보 제W0 03/032898호에서 기술된 바와 같은 STAT5를 활성화시키는 능력이다.

[0035] 별도의 분석법들에는 미합중국 공개특허 제2006/0039910호(출원번호 제11/205,909호)에서 기술된 바와 같은 일차 인간 단핵구들(primary human monocytes) 및 수지상 세포(dendritic cells)들로부터의 TSLP 유도 CCL17/TARC 생산이 포함된다.

[0036] TSLP 활성을 측정하는 데 유용한 세포 기반의 분석법들은 이하의 구체예들에서 기술된다. 이들에는 이하에서 기술되는 일차 인간 수지상 세포들로부터의 TSLP 유도 오스테오프로테게린(OPG) 생산을 측정하는 일차세포분석법과 마찬가지로 위에서 기술된 BAF 세포 증식 분석법이 포함되며, 마찬가지로 사이노몰거스 말초혈 단핵구 세포분석법(cynomolgus peripheral blood mononuclear cell assay)이 또한 이하에서 기술된다. TSLP 활성에는 생체 내 활성들이 더 포함된다. 이들은, 예를 들면, 조우(Zhou)와 그의 동료들의 Nat Immunol 6(10), 1047-1053 (2005) 및 유(Yoo)와 그의 동료들의 J Exp Med. 202 (4), 541-549 (2005)들에서 기술된 바와 같은 생쥐 모델들에서 측정될 수 있다. 예를 들면, 난자-천식 모델(Ova-asthma model)에서의 항-쥐과의 동물의 TSLP 항체 (anti-murine TSLP antibody)는 BALF 세포질(BALF cellularity) 및 IL-5의 BALF 수준들 및 I1-13을 감소시키는 것으로 나타났다(조우와 그의 동료들의 위의 문헌).

[0037] 정의들

[0038] 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 시퀀스들은 표준의 하나 또는 3개의 문자 약어들을 사용하여 나타낸다. 달리 표시하지 않는 한, 폴리펩티드 시퀀스들은 왼쪽에 그들의 아미노 말단들을 그리고 오른쪽에 카복시 말단들을 가지며, 단일-가닥의 핵산 시퀀스들 및 이중-나선의 핵산 시퀀스들의 상부 가닥(top strand)들은 왼쪽에 그들의 5' 말단들을 그리고 오른쪽에 그들의 3' 말단들을 갖는다. 특정의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오타이드 시퀀스는 또한 그들이 대조 시퀀스와 어떻게 다른 지를 설명하는 것에 의해 기술될 수 있다.

[0039] 특정의 경쇄 및 중쇄 가변도메인들 L1("경쇄 가변도메인 1"), H1("중쇄 가변도메인 1") 등의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 시퀀스들. 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체들은 상기 경쇄의 가변도메인들의 명칭 및 상기 중쇄 가변도메인들의 명칭을 결합하는 것에 의해 표시된다. 예를 들면, "L4H7"은 L4의 경쇄 가변도메인과 H7의 중쇄 가변도메인을 포함하는 항체를 나타내고 있다.

[0040] 본 명세서에서 달리 정의하지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학적 및 기술적인 용어들은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 통상적으로 이해될 수 있는 의미들을 갖는다. 더욱이, 문맥(context)에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수단어들은 복수를 포함하며, 복수단어들은 단수를 포함할 수 있다. 일반적으로, 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질과 핵산 화합물과 관련하여 사용된 명명법 및 기술들 그리고 본 명세서에서 기술된 잡종형성(hybridization)들은 당해 기술분야에서 공지된 것이며 또한 통상적으로 사용되는 것들이다. 본 발명의 방법들 및 기술들은 달리 표시되지 않는 한, 대체로 당해 기술분야에서 공지되고 그리고 여러 일반적인 본 명세서를 통하여 언급되고 그리고 기술된 보다 특이한 참조문헌들에 따라 수행된다. 예를 들면, 본 명세서에서 참조로 인용되는 샘브룩(Sambrook)과 그의 동료들의 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

(1989), 오우수벨(Ausubel)과 그의 동료들의 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992) 및 하로우와 레인(Harlow and Lane)의 Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990)들을 참조하십시오. 효소반응들 및 정제기술들은 당해 기술분야에서 통상적으로 수행되거나 또는 본 명세서에서 기술되는 바와 마찬가지로 제조업자들의 사용들에 따라 수행되었다. 본 명세서에서 기술된 분석화학, 합성유기화학 및 약리화학과 제약화학들과 관련되어 사용된 용어 및 실험적인 절차들과 기술들은 당해 기술분야에서 공지되고 그리고 통상적으로 사용되는 것들이다. 화학적 합성, 화학적 분석, 제약학적 제조, 제형 및 공급 및 환자들의 치료에 대해서는 표준의 기술들이 사용될 수 있다.

[0041] 달리 표시되지 않는 한, 이하의 용어들은 이하의 의미들을 갖는 것으로 이해되어야 할 것이다: 용어 "단리된 단백질"(여기에서 상기 분자는, 예를 들면, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 항체임)은 그의 유래(origin) 또는 유도의 원천(source of derivation)의 덕택으로 (1) 분자의 본래의 상태(native state)로 분자를 수반하는 자연적으로 연관된 구성요소(components)들과 연관되지 않거나, (2) 동일한 종들로부터의 다른 분자들이 실질적으로 없거나, (3) 서로 다른 종들로부터의 세포에 의해 발현되거나, 또는 (4) 자연에서는 발생되지 않는 분자이다. 따라서 화학적으로 합성되거나, 또는 자연적으로 유래되는 세포와는 다른 세포계(cellular system)에서 발현되는 분자가 그의 자연적으로 연관되는 구성요소들로부터 "단리"될 수 있을 것이다. 분자는 또한 당해 기술분야에서 공지된 정제 기술들을 사용하는 단리에 의해 자연적으로 연관되는 구성요소들이 실질적으로 제거될 수 있을 것이다. 분자 순도(molecule purity) 또는 동종성(homogeneity)은 당해 기술분야에서 잘 알려진 여러 수단들에 의해 분석될 수 있을 것이다. 예를 들면, 폴리펩티드 샘플의 순도는 폴리아크릴아미드 겔 전기이동(polyacrylamide gel electrophoresis)을 사용하고 그리고 당해 기술분야에서 잘 알려진 기술들을 사용하여 상기 겔을 염색하여 분석될 수 있을 것이다. 특정의 목적들을 위하여는, 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 또는 정제용으로 당해 기술분야에서 잘 알려진 다른 수단들을 사용하는 것에 의해 보다 높은 해상도가 제공될 수 있을 것이다.

[0042] 용어 "TSLP 저해제(TSLP inhibitor)" 및 "TSLP 길항제(TSLP antagonist)"들은 상호교환되어 사용될 수 있다. 각각은 TSLP 시그널링을 검출가능하게 저해하는 분자이다. TSLP 저해제에 의해 야기되는 저해는 그것이 분석을 사용하여 검출가능한 한 완전할 필요는 없다. 예를 들면, 이하의 실시예 4에서 기술되는 세포-기반 분석이 TSLP 시그널링 저해에 유용한 분석임을 입증하고 있다.

[0043] 용어 "펩티드" "폴리펩티드" 및 "단백질"들 각각은 펩티드 결합들에 의해 서로 결합되는 둘 또는 그 이상의 아미노산 잔기들을 포함하는 분자를 의미한다. 이들 용어들은, 예를 들면, 전사후적으로 또는 공유적으로 또는 비-공유적으로 변형된 단백질들과 마찬가지로 자연 및 인공의 단백질들, 단백질 단편들 및 단백질 시퀀스의 폴리펩티드 유사체들(polypeptide analogs)(돌연변이 단백질(mutins), 변종 및 융합 단백질들 등과 같은)을 포함한다. 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질은 단량체성이거나 또는 다량체성일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "폴리펩티드 단편"은 대응하는 전장의 단백질(full-length protein)에 비하여 아미노-말단 및/또는 카복시-말단 결실을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 단편들은, 예를 들면, 길이에 있어서 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 또는 200개의 아미노산들이 될 수 있다. 단편들은 또한, 예를 들면, 길이에 있어서 최대 1,000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 또는 10개의 아미노산들이 될 수 있다. 단편은 또한 그들의 단부들 중 어느 하나 또는 둘 다에서 하나 또는 그 이상의 부가의 아미노산들, 예를 들면, 서로 다른 자연적으로-발생하는 단백질(예를 들면, Fc 또는 류신 지퍼 도메인(leucine zipper domain)으로부터의 아미노산들의 시퀀스 또는 인공의 아미노산 시퀀스(예를 들면, 인공의 링커 시퀀스(linker sequence)를 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 폴리펩티드들은 어떠한 방법으로 그리고 어떠한 이유로, 예를 들면, (1) 단백질가수분해(proteolysis)에 대한 감수성을 감소시키고, (2) 산화에 대한 감수성을 감소시키고, (3) 단백질 착체(protein complexes)들의 형성에 대한 결합 친화성을 변경, (4) 결합 친화성을 변경하고 그리고 (4) 다른 물리화학적 또는 기능적인 특성들을 부여 또는 변형시키도록 변형된 폴리펩티드들을 포함한다. 유사체들에는 폴리펩티드의 돌연변이 단백질들이 포함된다. 예를 들면, 자연적으로 발생하는 시퀀스(예를 들면, 분자간 접촉들을 형성하는 도메인(들)의 외측의 폴리펩티드의 부분 내)에서 단일 또는 다중의 아미노산 치환들(예를 들면, 보존적 아미노산 치환들)이 이루어질 수 있다. "보존적 아미노산 치환"은 부모 시퀀스(parent sequence)의 구조적 특징들을 실질적으로 변형시키지 않는 것이다(예를 들면, 치환 아미노산은 부모 시퀀스에서 발생하는 나선을 파괴하거나 또는 부모 시퀀스를 특정하거나 또는 그의 관능성에 필수적인 이차구조의 다른 형태들을 방해하는 경향들을 갖지 않아야 한다). 기술분야에서 인식된 폴리펩티드 2차 및 3차구조들의 예들이 단백질들, 구조들 및 분자상 원

리들(Structures and Molecular Principles ; (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York(1984))); 단백질 구조의 입문(Introduction to Protein Structure ; (C. Branden and Tooze, eds., Garland Publishing, New York(1991))); 및 소른톤(Thornton)과 그의 동료들의 Nature 354:105(1991)들에서 기술되어 있으며, 이들을 각각 본 명세서에서 참조로 인용한다.

[0045] 폴리펩티드의 "변종(variant)"에는 다른 폴리펩티드 시퀀스에 비하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들이 상기 아미노산 시퀀스들 내로 삽입되거나, 상기 시퀀스들로부터 결실되거나 및/또는 치환되는 아미노산 시퀀스가 포함된다. 본 발명의 변종들에는 융합 단백질들이 포함된다. 본 명세서에서 기술되는 항체들의 변종들에는 또한 가공으로부터 얻어지는 것들이 포함된다. 이러한 변종들에는 예를 들면 불충분한 시그널 시퀀스 개열(inefficient signal sequence cleavage)의 결과로서 경쇄 또는 중쇄의 N-말단에서의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 또는 그 이상의 부가의 아미노산들을 갖는 것들이 포함된다. 이러한 변종들에는 또한 경쇄 또는 중쇄의 N-말단 또는 C-말단으로부터의 하나 또는 그 이상의 아미노산들을 손실(missing)한 것들이 포함된다.

[0046] 폴리펩티드의 "유도체"는 예를 들면 폴리에틸렌글리콜, 알부민(예를 들면, 인간 혈청 알부민) 등과 같은 다른 화학적 부분(chemical moiety)에로의 공액화(conjugation), 인산화(phosphorylation) 및 글리코실화(glycosylation)를 통하여 화학적으로 변형된 폴리펩티드(예를 들면, 항체)이다. 달리 표시하지 않는 한, 용어 "항체"에는 2개의 전장 중쇄들 및 2개의 전장 경쇄들을 포함하는 항체들에 더해 그들의 유도체들, 변종들, 단편들 및 돌연변이 단백질들이 포함되며, 그의 예들을 이하에서 기술한다.

[0047] 본 명세서에 따른 "항원 결합 단백질"은 항원에의 상기 항원 결합 단백질의 결합을 촉진시키는 형태(conformation)를 채택하는 것을 허용하는 항원 및 선택적으로 스캐폴드(scaffold) 또는 골격부/framework portion)에 결합할 수 있는 단백질이다. 하나의 구체예에 있어서 본 발명의 항원 결합 단백질은 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 항원 결합 단백질들의 예들에는 항체 단편들(예를 들면, 항체의 항원결합부(antigen binding portion)), 항체 유도체들 및 항체 유사체들이 포함된다. 상기 항원 결합 단백질은, 예를 들면, 분지된 CDRs 또는 CDR 유도체들을 갖는 대안의 단백질 스캐폴드 또는 인공의 스캐폴드를 포함할 수 있다. 이러한 스캐폴드들에는 예를 들어 생체적합성의 중합체(biocompatible polymer)를 포함하는 전체적으로 합성인 스캐폴드들과 마찬가지로 상기 항원 결합 단백질의 3차원의 구조를 안정화시키기 위하여 도입된 돌연변이들을 포함하는 항체-유도 스캐폴드들이 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 예를 들면, 콘도르퍼(Korndorfer)와 그의 동료들의 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1 : 121-129; 로크(Roque)와 그의 동료들의 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654들을 참조하시오. 게다가, 스캐폴드로서 파이프프로텍션 구성요소(fibronectin components)들을 활용하는 항체 모방체들에 기초하는 스캐폴드들과 마찬가지로 펩티드 항체 모방체들(peptide antibody mimetics ; "PAMs")이 사용될 수 있다.

[0048] 항원 결합 단백질은, 예를 들면, 자연적으로 발생하는 면역글로블린의 구조를 가질 수 있다. "면역글로블린"은 사량체성의 분자(tetrameric molecule)이다. 자연적으로 발생하는 면역글로블린에 있어서, 각 사량체(tetramer)는 폴리펩티드쇄들의 2개의 동일한 쌍들로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경"쇄(약 25kDa) 및 하나의 "중"쇄(약 50 내지 70kDa)를 갖는다. 각 쇄의 아미노-말단부(amino-terminal portion)는 항원 인식에 대하여 일차적인 책임이 있는 약 100 내지 110 또는 그 이상의 아미노산들의 가변영역을 포함한다. 각 쇄의 카르복시-말단부는 효과기 기능(effector function)에 대하여 일차적인 책임이 있는 불변영역을 한정한다. 인간 경쇄들은 카파(kappa) 및 람다(lambda) 경쇄들로 분류된다. 중쇄들은 뮤(mu), 델타(delta), 감마(gamma), 알파(alpha) 또는 입실론(epsilon)으로 분류되며, 상기 항체의 아이소타입들을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로 정의한다. 경쇄 및 중쇄들 내에서, 상기 가변 및 불변영역들은 대략 10 또는 그 이상의 아미노산들의 "디(D)" 영역들을 포함하는 중쇄와 함께 대략 12 또는 그 이상의 아미노산들의 "제이(J)" 영역에 의해 결합된다. 예를 들면, 기초 면역학(Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))(전체 목적들을 위하여 그의 전체로서 본 명세서에 참고로 인용됨)을 참조하시오. 각 경쇄/중쇄 쌍의 상기 가변영역들은 손상되지 않은 면역글로블린이 2개의 결합사이트(binding sites)들을 갖도록 하여 항체를 결합하는 사이트를 형성한다.

[0049] 자연적으로 발생하는 면역글로블린쇄들은 3개의 고도가변영역(hypervariable regions)들에 의해 결합되는 상대적으로 보존되는 골격영역/framework regions ; FR)들을 포함하여 대체로 동일한 전체 구조를 나타내며, 또한 상보적 결정 영역들 또는 CDRs라 불리운다. N-말단으로부터 C-말단까지, 경쇄 및 중쇄들 둘 다는 상기 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4들을 포함한다. 각 도메인에서의 아미노산들의 할당은 면역학적 대상체의 단백질들의 시퀀스들(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991)에서의 카바트(Kabat)와 그의 동료들의 정

의들에 따른다. 손상되지 않은 항체들에는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 전장의 중쇄 및 경쇄들을 갖는 완전한 인간 항체들이 포함된다.

[0050] "항체"는 달리 언급되지 않은 한 특정의 결합을 위하여 상기 손상되지 않은 항체와 경쟁하는 손상되지 않은 면역글로블린 또는 그의 항원결합부를 의미한다. 항원 결합 단백질들은 재조합 DNA 기술들에 의하거나 또는 손상되지 않은 항체들의 효소적 또는 화학적 개질들에 의해 생산될 수 있다. 항원 결합 단백질들에는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편 및 도메인 항체들(dAbs) 및 상보적 결정 영역(CDR ; complementarity determining region) 단편들, 단일쇄 항체들(single-chain antibodies ; scFv), 다이어바디(diabodies), 트라이어바디(triabodies), 테트라바디(tetrabodies) 및 상기 폴리펩티드에 대한 특이적인 항원 결합을 부여하기에 충분한 면역글로블린의 적어도 일부를 포함하는 폴리펩티드들이 포함된다.

[0051] Fab 단편은 상기 V_L, V_H, C_L 및 C_{H1} 도메인들을 갖는 1개의 단편(monovalent fragment)이고; F(ab')₂ 단편은 힙지영역(hinge region)에서 이황화결합(disulfide bridge)에 의해 연결되는 2개의 Fab 단편들을 갖는 2개의 단편이고; Fd 단편은 V_H 및 C_{H1} 도메인들을 가지고; Fv 단편은 항체의 단일의 아암(arm)의 V_L 및 V_H를 갖고; 그리고 dAb 단편은 V_H 도메인, V_L 도메인 또는 V_H 도메인이나 V_L 도메인의 항원-결합 단편을 갖는다(미합중국 특허 제6,846,634호, 동 제6,696,245호, 미합중국 공개특허공보 제05/0202512호, 동 제04/0202995호, 동 제04/0038291호, 동 제04/0009507호, 동 제03/0039958호, 와드(Ward)와 그의 동료들의 Nature 341:544-546, 1989).

[0052] 단일쇄 항체(scFv)는 V_L 및 V_H 영역들이 링커(linker ; 예를 들면, 아미노산 잔기들의 합성 시퀀스)를 통하여 결합되어 연속적인 단백질쇄(protein chain)를 형성하는 항체이며, 여기에서 상기 링커는 상기 단백질쇄가 그 자체로 중첩되도록 하고 그리고 1개의 항원결합사이트(antigen binding site)를 형성하도록 하는 것을 허용하기에 충분하게 길다(예를 들면, 버드(Bird)와 그의 동료들의 1988, Science 242:423-26 및 휴스턴(Huston)과 그의 동료들의 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83)들을 참조하시오). 다이어바디들은 2개의 폴리펩티드쇄들을 포함하는 2개의 항체들이며, 여기에서 각 폴리펩티드쇄는 동일한 쇄 상의 2개의 도메인들 사이에서의 페어링(pairing)을 허용하기에는 너무 짧으며, 따라서 각 도메인이 다른 폴리펩티드쇄 상의 상보적 도메인(complementary domain)과 짝이 되도록 하는 것을 허용하는 링커에 의해 연결되는 V_H 및 V_L 도메인들을 포함한다(예를 들면, 홀리거(Holliger)와 그의 동료들의 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 및 폴작(Poljak)과 그의 동료들의 1994, Structure 2:1121-23)들을 참조하시오. 다이어바디의 상기 2개의 폴리펩티드쇄들이 동일한 경우, 그들의 페어링으로부터 야기되는 다이어바디는 2개의 동일한 항원결합사이트들을 가질 수 있을 것이다. 서로 다른 시퀀스들을 갖는 폴리펩티드쇄들은 2개의 서로 다른 항원결합사이트들을 갖는 항체를 제조하는 데 사용될 수 있다. 유사하게, 트라이바디들 및 테트라바디들은 각각 3개 및 4개의 폴리펩티드쇄들을 포함하며, 각각 3개 및 4개의 항원결합사이트들을 형성하는 항체들이며, 동일하거나 또는 다른 것들이 될 수 있다.

[0053] 주어진 항체의 상보적 결정 영역(CDRs)들 및 골격영역(FR)들은 면역학적 대상체의 단백질들의 시퀀스들(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991)에서 카바트와 그의 동료들에 의해 기술된 시스템을 사용하여 동정될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 CDRs들이 공유적으로나 또는 비공유적으로 분자 내로 내포되어 이를 항원 결합 단백질로 만들도록 할 수 있다. 항원 결합 단백질은 보다 큰 폴리펩티드쇄의 일부로서 상기 CDR(s)(들)을 포함할 수 있거나, 상기 CDR(s)(들)을 다른 폴리펩티드쇄에 공유적으로 연결시킬 수 있거나 또는 상기 CDR(s)(들)을 비공유적으로 내포할 수 있다. 상기 CDRs들은 상기 항원 결합 단백질이 대상체의 특정의 항원에 특이적으로 결합하는 것을 허용한다.

[0054] 항원 결합 단백질은 하나 또는 그 이상의 결합사이트(binding sites)들을 가질 수 있다. 하나 이상의 결합사이트가 존재하는 경우, 상기 결합사이트들은 다른 하나와 동일하거나 또는 다른 것이 될 수 있다. 예를 들면, 자연적으로 발생하는 인간 면역글로블린은 전형적으로 2개의 동일한 결합사이트들을 갖는 반면에, "양특이성(bispecific)" 또는 "이관능(bifunctional)"의 항체는 2개의 서로 다른 결합사이트들을 갖는다.

[0055] 용어 "인간 항체"에는 인간 면역글로블린 시퀀스들로부터 유도되는 하나 또는 그 이상의 가변영역들 및 불변영역들을 갖는 모든 항체들이 포함된다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 가변영역들 및 불변영역들 모두는 인간 면역글로블린 시퀀스들(전장의 인간 항체)로부터 유도된다. 이들 항체들은 다양한 방법으로 제조될 수 있으며, 그의 예들에는 인간 중쇄 및/또는 경쇄-인코딩 유전자들을 발현하도록 유전학적으로 변형된 생쥐의 대상체의 항

원에 대한 면역화(immunization)를 통하는 것을 포함하여 이하에서 기술되는 것들이 포함된다.

[0056] 인간화된 항체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환들, 결손들 및/또는 삽입들에 의하여 비-인간의 종들로부터 유도된 항체의 시퀀스와는 다른 시퀀스를 가져서, 인간 대상체에 투여되는 경우에, 상기 인간화된 항체가 상기 비-인간의 종들의 항체들과 비교하여 면역반응을 덜 유도하거나 및/또는 덜 심각한 면역반응을 유도하도록 한 것이다. 하나의 구체예에 있어서, 골격(architecture) 내에서의 특정의 아미노산들 및 상기 비-인간의 종들의 항체의 상기 중쇄 및/또는 경쇄들의 불변영역들이 상기 인간화된 항체를 생성하도록 돌연변이된다. 다른 구체예에 있어서, 인간 항체로부터의 상기 불변영역(들)은 비-인간의 종들의 상기 가변영역(들)에 융합된다. 다른 구체예에 있어서, 비-인간의 항체의 하나 또는 그 이상의 CDR 시퀀스들 내의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들은 인간 대상체에 투여되는 경우에 상기 비-인간의 항체의 면역원성(immunogenicity)을 감소시키도록 변형되며, 여기에서 상기 변형된 아미노산 잔기들은 그의 항원에 대한 상기 항체의 면역특이적 결합(immunologic binding)에 대하여 절대적이지 않거나 또는 상기 아미노산 시퀀스에 대하여 이루어진 상기 변형들이 보존적 변형들이어서 상기 항원에 대한 상기 인간화된 항체의 결합이 상기 항원에 대한 상기 비-인간의 항체의 결합 보다 명백하게 더 나쁘지 않은 것이 되도록 하는 것이 될 수 있다. 인간화된 항체들을 어떻게 만드는 지에 대한 예들은 미합중국 특허 제6,054,297호, 동 제5,886,152호 및 동 제5,877,293호들에서 발견될 수 있을 것이다.

[0057] 용어 "키메라 항체"는 하나의 항체로부터의 하나 또는 그 이상의 영역들 및 하나 또는 그 이상의 다른 항체들로부터의 하나 또는 그 이상의 영역들을 포함하는 항체를 의미한다. 하나의 구체예에 있어서, 하나 또는 그 이상의 상기 CDRs들은 인간 항-TSLP 항체로부터 유도된다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 CDRs들 전부는 인간 항-TSLP 항체로부터 유도된다. 또 다른 구체예에 있어서, 하나 이상의 인간 항-TSLP 항체들로부터의 상기 CDRs들이 이 키메라 항체 내에서 혼성되고 그리고 매칭된다. 예를 들면, 하나의 키메라 항체는 제1인간 항-TSLP 항체의 상기 경쇄로부터의 CDR1, 제2인간 항-TSLP 항체의 상기 경쇄로부터의 CDR2 및 CDR3 그리고 제3 항-TSLP 항체로부터의 상기 CDRs들을 포함할 수 있다. 더욱이, 상기 골격영역들은 인간 항체 등과 같은 동일한 항-TSLP 항체들 중의 하나로부터 또는 하나 또는 그 이상의 서로 다른 항체들 또는 인간화된 항체로부터 유도될 수 있다. 키메라 항체의 하나의 구체예에 있어서, 상기 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정의 종들로부터의 항체와 동일하거나 또는 동종이거나 또는 그로부터 유도되거나 또는 특정의 항체 클래스(class) 또는 서브클래스(subclass)에 속하는 반면에 상기 채(들)의 잔여부는 다른 종들과 동일하거나 또는 동종이거나 또는 그로부터 유도되거나 또는 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 것(들)이다. 원하는 생물학적 활성(즉, 상기 인간 TSLP 수용체에 특이적으로 결합하는 능력)을 나타내는 이러한 항체들의 단편들이 또한 포함된다.

[0058] 항체들의 단편들 또는 유사체들은 본 명세서의 교시들에 따라 그리고 당해 기술분야에서 공지된 기술들을 사용하여 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 쉽게 제조될 수 있을 것이다. 바람직한 단편들 또는 유사체들의 아미노-말단 및 카르복시-말단들은 기능적인 도메인들의 경계(boundaries)들 근처에서 발생한다. 구조적 도메인들 및 기능적 도메인들은 공공의 또는 사유의 시퀀스 데이터베이스에 대한 뉴클레오타이드 및/또는 아미노산 시퀀스 데이터의 비교에 의해 동정될 수 있다. 공지의 구조 및/또는 기능의 다른 단백질들에서 발생하는 시퀀스 모티프(sequence motifs)들 또는 예측된 단백질 형태 도메인들(protein conformation domains)을 동정하는 데 컴퓨터화된 비교 방법들이 사용될 수 있다. 공지의 3차원의 구조로 절첩되는 단백질 시퀀스들을 동정하기 위한 방법들이 공지되어 있다. 예를 들면, 보피(Bowie)와 그의 동료들의 1991, Science 253:164를 참조하시오.

[0059] "CDR 분지 항체(CDR grafted antibody)"는 특정의 종들 또는 아이소타입(isotype)의 항체로부터 유도되는 하나 또는 그 이상의 CDRs들 및 동일하거나 또는 다른 종들 또는 아이소타입의 다른 항체의 골격을 포함하는 항체이다.

[0060] "다중-특이성 항체(multi-specific antibody)"는 하나 또는 그 이상의 항원들에 대한 하나 이상의 에피토프를 인식하는 항체이다. 항체의 이러한 형태의 서브클래스는 동일하거나 또는 서로 다른 항원들에 대한 2개의 뚜렷한 에피토프들을 인식하는 "양특이성 항체(bi-specific antibody)"이다.

[0061] 항원 결합 단백질은 10^{-7} M 또는 그 이하의 Kd(또는 이하에서 기술되는 바와 같은 Kb에 대응하는 Kb) 값으로 결정되는 바와 같은 높은 결합 친화성으로 항체가 항원에 결합하는 경우의 TSLP 등과 같이 항원에 대해 "특이적으로 결합하는" 항체를 포함한다. "항원 결합 도메인", "항원 결합 영역" 또는 "항원 결합 사이트"는 항원과 상호작용하고 그리고 상기 항원 결합 단백질의 특이성(specificity) 및 상기 항원에 대한 친화성에 기여하는 아미노산 잔기들(또는 다른 부분들)을 포함하는 항원 결합 단백질의 일부이다. 그의 항원에 특이적으로 결합하는 항체에 대하여서는, 이는 그의 CDR 도메인들의 적어도 하나의 적어도 일부를 포함할 것이다. 2개의 폴리뉴클레오타이드

또는 2개의 폴리펩티드 시퀀스들의 "동일성 백분율(percent identity)"은 그의 디폴트 변수(default parameters)들을 사용하는 GAP 컴퓨터 프로그램(GAP computer program ; GCG Wisconsin Package, 버전 10.3의 일부(미합중국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 액셀라이스(Accelrys))을 사용하여 상기 시퀀스들을 비교하는 것에 의해 결정된다.

[0062] 용어 "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산"들은 전체를 통하여 상호교환적으로 사용되며, DNA 분자들(예를 들면, cDNA 또는 유전체(genomic DNA), RNA 분자들(예를 들면, mRNA), 뉴클레오티드 유사체들을 사용하여 생성된 상기 DNA 또는 RNA의 유사체들(예를 들면, 펩티드 핵산들 및 비-자연적으로 발생하는 뉴클레오티드 유사체들) 및 이들의 하이브리드들이 포함된다. 상기 핵산 분자는 단일-가닥(single-stranded) 또는 이중-가닥(double-stranded)이 될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 본 발명의 상기 핵산 분자들에는 본 발명의 항체, 이들의 단편, 유도체, 돌연변이 단백질(mutagen) 또는 변종들을 인코딩하는 인접하는 열린 해독틀(open reading frame)을 포함한다. 2개의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드들은 갭(gaps)들의 도입 없이 그리고 둘 중의 어느 하나의 시퀀스의 5' 또는 3' 단부에서 짝지워지지 않은 뉴클레오티드(unpaired nucleotides)들 없이 하나의 폴리뉴클레오티드 내의 모든 뉴클레오티드들이 다른 폴리뉴클레오티드 내의 그의 상보적인 뉴클레오티드들에 대향되도록 반-평행 배향(anti-parallel orientation)으로 정렬될 수 있는 경우 이들 시퀀스들이 서로 "상보적"이다.

[0063] 적절하게 가혹한 조건(moderately stringent conditions)들 하에서 2개의 폴리뉴클레오티드들이 다른 하나에 대하여 잡종화(hybridize)될 수 있는 경우, 하나의 폴리뉴클레오티드는 다른 폴리뉴클레오티드에 "상보적"이다. 따라서, 폴리뉴클레오티드는 그의 보체가 없이 다른 폴리뉴클레오티드에 상보적이 될 수 있다.

[0064] "벡터"는 핵산에 연결된 다른 핵산을 세포 내로 도입하는 데 사용될 수 있는 핵산이다. 벡터의 하나의 형태(type)는 "플라스미드(plasmid)"이며, 이는 그 안으로 부가의 핵산 단편들이 결합될 수 있는 선형 또는 원형의 이중 나선의 DNA 분자를 의미한다. 벡터의 다른 형태는 바이러스성 벡터(viral vector ; 예를 들면, 복제-결핍 레트로바이러스(replication defective retroviruses), 아데노바이러스들 및 아데노-연관 바이러스들(adenovirus-associated viruses))이며, 여기에서 부가의 DNA 단편들은 상기 바이러스성 게놈(viral genome) 내로 도입될 수 있다. 특정의 벡터들은 그 안으로 이들이 도입되는 숙주세포(host cell ; 예를 들면, 복제의 박테리아성 유래(bacterial origin) 및 에피솜의 포유동물 벡터들(episomal mammalian vectors)을 포함하는 박테리아성 벡터들(bacterial vectors)) 내에서의 자가복제(autonomous replication)를 할 수 있다. 다른 벡터들(예를 들면, 비-에피솜의 포유동물 벡터들(non-episomal mammalian vectors))이 숙주세포 내로의 도입에 의한 숙주세포의 게놈 내로 통합(integrated)되고 그리고 그에 의하여 상기 숙주 게놈과 함께 복제된다. "발현벡터(expression vector)"는 선택된 폴리뉴클레오티드의 발현을 지향할 수 있는 벡터의 한 형태이다.

[0065] 하나의 뉴클레오티드 시퀀스는, 조절 시퀀스가 상기 뉴클레오티드 시퀀스의 발현(예를 들면, 수준, 타이밍 또는 발현의 위치)에 영향을 주는 경우, 상기 조절 시퀀스(regulatory sequence)에 "작동가능하게 연결"된다. "조절 시퀀스"는 그것이 작동가능하게 연결되는 핵산의 발현(예를 들면, 수준, 타이밍 또는 발현의 위치)에 영향을 주는 핵산이다. 상기 조절 시퀀스는, 예를 들면, 조절된 핵산에 직접적으로 또는 하나 또는 그 이상의 다른 분자들(예를 들면, 상기 조절 시퀀스 및/또는 상기 핵산에 결합하는 폴리펩티드들)의 작용을 통하여 그의 영향이 미치도록 할 수 있다. 조절 시퀀스의 예들에는 프로모터(promoters), 인핸서(enhancers) 및 다른 발현 조절 요소들(expression control elements ; 예를 들면, 다중아데닐화 신호(polyadenylation signals)들)이 포함된다. 조절 시퀀스들의 다른 예들은, 예를 들면, 괴델(Goeddel)의 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 및 바론(Baron)과 그의 동료들의 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06에 기술되었다.

[0066] "숙주세포"는 핵산, 예를 들면, 본 발명의 핵산을 발현하는 데 사용될 수 있는 세포이다. 숙주세포는 원핵생물, 예를 들면, 대장균이 될 수 있거나 또는 이는 진핵생물, 예를 들면, 단세포의 진핵생물들(예를 들면, 효모 또는 다른 균류(fungus)), 식물 세포(예를 들면, 담배 또는 토마토 식물 세포), 동물 세포(예를 들면, 인간 세포, 원숭이 세포, 햄스터(hamster) 세포, 집쥐 세포(rat cell), 생쥐 세포(mouse cell) 또는 곤충 세포) 또는 하이브리도마가 될 수 있다. 숙주세포들의 예들에는 차이나이스 햄스터 난소(CHO . Chinese hamster ovary) 세포주들 또는 DHFR에서 결핍인 CHO 스트레인 DXB-11(우르라우브(Urlob)와 그의 동료들의 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20), 무-혈청배지(serum-free media)에서 성장한 CHO 세포주들(라스무센(Rasmussen)과 그의 동료들의 1998, Cytotechnology 28:31), DXB-11 CHO 세포들의 유도체인 CS-9 및 AM-1/D 세포들(미합중국 특허 제6,210,924호에서 기술됨)을 포함하는 그들의 유도체들이 포함된다. 다른 CHO 세포주들에는 CHO-K1(ATCC# CCL-61), EM9 (ATCC# CRL-1861) 및 UV20(ATCC# CRL-1862)들이 포함된다. 다른 숙주세포들의 예들에

는 원숭이 신장 세포들의 COS-7 세포주(ATCC CRL 1651 ; 글루즈만(Gluzman)과 그의 동료들의 1981, Cell 23:175를 참조하시오), L 세포들, C127 세포들, 3T3 세포들(ATCC CCL 163), 헬라세포(HeLa cells), BHK(ATCC CRL 10) 세포주들, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주 CV1 으로부터 유도된 CV1/EBNA 세포주(ATCC CCL 70 ; 맥마한(McMahan)과 그의 동료들의 1991, EMBO J. 10:2821을 참조하시오), 293, 293 EBNA 또는 MSR 293 등과 같은 인간 배아 신장 세포들, 인간 상피의 A431 세포들, 인간 Colo205 세포들, 다른 형질전환된 영장류의 세포주들(transformed primate cell lines), 정상 2배체 세포들(normal diploid cells), 1차조직(primary tissue)의 시험관 내 배양에서 유도된 세포 스트레인들(cell strains), 일차 이식편들(primary explants), HL-60, U937, HaK 또는 유르카트 세포들(Jurkat cells)이 포함된다. 전형적으로, 숙주세포는 폴리캡티드-인코딩 핵산으로 형질전환되거나 또는 형질감염(transfected)될 수 있는 배양된 세포이고, 이는 계속해서 상기 숙주세포 내에서 발현될 수 있다. 어구 "재조합 숙주세포"는 발현되어야 할 핵산으로 형질전환되거나 또는 형질감염된 숙주세포를 나타내는 데 사용될 수 있다. 숙주세포는 또한 상기 핵산을 포함하나, 그러나 조절 시퀀스가 상기 핵산에 작동 가능하게 연결되도록 상기 숙주세포 내로 도입되지 않는 한 이를 원하는 수준으로 발현하지 않는 세포가 될 수 있다. 용어 숙주세포는 특정의 대상체 세포 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손(progeny) 또는 잠재적 자손(potential progeny)을 의미한다는 것은 이해될 수 있는 것이다. 세대들을 이어가면서 예를 들어 돌연변이 또는 환경적인 영향들로 인하여 특정의 변형들이 일어날 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로 그 부모 세포와 동일하지 않을 수 있기는 하나 여전히 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어의 범주 내에 포함된다.

[0067] 항원 결합 단백질들

[0068] 하나의 관점에 있어서, 본 상세한 설명은 인간 TSLP에 결합하는 항체들, 항체 단편들, 항체 유도체들, 항체 돌연변이 단백질들 및 항체 변종들 등과 같은 항원 결합 단백질들을 제공한다. 본 상세한 설명에 따른 항원 결합 단백질들에는 인간 TSLP에 결합하고 그에 의하여 TSLP 활성을 감소시키는 항원 결합 단백질들이 포함된다. 예를 들면, 항원 결합 단백질들은 TSLP의 그의 수용체와의 결합을 간섭하고 그에 의하여 TSLP 활성을 감소시킬 수 있다.

[0069] 하나의 구체예에 있어서, 본 발명은 5, 4, 3, 2, 1 또는 0개 이하의 아미노산 잔기들에 의하여 도 1a 내지 도 1f 또는 도 2a 내지 도 2f들에 나타낸 CDR 시퀀스와는 다른 하나 또는 그 이상의 CDR 시퀀스들을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0070] 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 CDR3 시퀀스의 적어도 하나가 도 1a 내지 도 1f 또는 도 2a 내지 도 2f들로부터의 시퀀스이다. 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질의 경쇄 CDR3 시퀀스는 A1 내지 A27로부터의 경쇄 시퀀스이고, 그리고 상기 항원 결합 단백질의 중쇄 CDR3 시퀀스는 A1 내지 A27로 T-터의 중쇄 CDR3 시퀀스이다. 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 각각이 A1 내지 A27의 CDR 시퀀스로부터 5, 4, 3, 2, 1 또는 0개의 단일 아미노산 부가들, 치환들 및/또는 결실들로 독립적으로 다른 1, 2, 3, 4 또는 5개의 CDR 시퀀스들을 더 포함한다. 예시적인 항원 결합 단백질들 A1 내지 A27들의 경쇄 CDR들 및 예시적인 결합 단백질들 A1 내지 A27들의 중쇄 CDR들을 각각 도 1a 내지 도 1f 및 도 2a 내지 도 2f들에 나타내었다. 상기 CDRs들의 아미노산 시퀀스들을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 시퀀스들을 나타내었다. 게다가, 상기 CDR 시퀀스들의 합치 시퀀스들이 이하에서 제공된다.

[0071] CDR 합치 시퀀스들

[0072] 가변경쇄 CDRs

[0073] 그룹 1a

[0074] 경쇄 CDR1 합치

							X ₁					X ₂					
A16.1	R	S	S	Q	S	L	V	Y	S	D	G	N	T	Y	L	N	
A18.1							V					N					
A13.1							V					D					
A19.1							V					D					
A20.1							V					D					
A14.1							V					N					
A15.1							I					N					

R S S Q S L X₁ Y S D G X₂ T Y L N (SEQ ID NO : 246)

[0075]

[0076] X₁은 V(발린) 잔기 또는 I(이소류신) 잔기이고,

[0077] X_2 는 N(아스파라긴) 잔기 또는 D(아스파르트) 산 잔기이고;

[0078] 경쇄 CDR2 합치

				X_3				
A16.1	K	V	S	Y	W	D	S	
A18.1				Y				
A13.1				N				
A19.1				N				
A20.1				N				
A14.1				N				
A15.1				N				

[0079] KVSX₃WDS (SEQ ID NO: 247)

[0080] X_3 은 Y(티로신) 잔기 또는 N(아스파라긴) 잔기이고;

[0081] 경쇄 CDR3 합치

A16.1	M	Q	G	T	H	W	P	P	A
A18.1									
A13.1									
A19.1									
A20.1									
A14.1									
A15.1									

[0082] MQGTHQPPA (SEQ ID NO: 248)

[0083] 그룹 1b

[0084] 경쇄 CDR1 합치

					X_4	X_5						
A13.2	R	A	S	Q	G	L	S	S	W	L	A	
A14.2					G	L						
A19.2					G	L						
A20.2					G	L						
A16.2					S	L						
A18.2					S	L						
A15.2					G	I						

[0085] RASQX₄X₅SSLWA (SEQ ID NO: 249)

[0086] X_4 는 G(글리신) 잔기 또는 S(세린) 잔기이고;

[0087] X_5 는 L(류신) 잔기 또는 I(이소류신) 잔기이고;

[0088] 경쇄 CDR2 합치

	X_6	X_7						
A13.2	N	T	S	S	L	Q	S	
A14.2	N	T						
A19.2	N	T						
A20.2	N	T						
A16.2	N	A						
A18.2	N	A						
A15.2	T	T						

[0089] X₆X₇SSLQS (SEQ ID NO: 250)

[0090] X_6 은 N(아스파라긴) 잔기 또는 T(트레오닌) 잔기이고;

[0091] X_7 은 T(테오닌) 잔기 또는 A(알라닌) 잔기이고;

[0092] 경쇄 CDR3 합치

				X ₈					
A13.2	Q	Q	A	N	S	F	P	L	T
A14.2				N					
A19.2				N					
A20.2				N					
A16.2				N					
A18.2				N					
A15.2				D					

[0093] QQAX₈SFPLT (SEQ ID NO: 251)

[0094] X₈은 N(아스파라긴) 잔기 또는 D(아스파르트산) 잔기이고;

[0095] 그룹 2

[0096] 경쇄 CDR1 합치

A6	S	G	D	K	L	G	D	K	Y	A	C
A8											

[0097] SGDKLGDKYAC (SEQ ID NO: 15)

[0098] 경쇄 CDR2 합치

			X				
A6	Q	D	K	K	R	P	S
A8			N				

[0099] QDX₉KRPS (SEQ ID NO: 252)

[0100] X₉는 K(리신) 잔기 또는 N(아스파라긴) 잔기이고;

[0101] 경쇄 CDR3 합치

A6	Q	A	W	D	S	S	T	V	V
A8									

[0102] QAWDSSTVV (SEQ ID NO: 107)

[0103] 그룹 3

[0104] 경쇄 CDR1 합치

A3	T	G	S	S	S	N	I	G	A	G	F	D	V	H
A4														

[0105] TGSSSNIGAGFDVH (SEQ ID NO: 10)

[0106] 경쇄 CDR2 합치

A3	D	N	N	N	R	P	S
A4							

[0107] DNNNRPS (SEQ ID NO: 57)

[0108] 경쇄 CDR3 합치

A3	Q	S	Y	D	S	N	L	S	G	S	I	V	V
A4													

[0109] QSYDSNLSGSIVV (SEQ ID NO: 102)

[0110] 가변중쇄 CDRS

[0111] 그룹 1

[0112] 중쇄 CDR1 합치

	X_{10}				
A13	S	Y	G	M	H
A14	S				
A19	S				
A20	S				
A16	N				
A18	N				
A15	N				

[0113] X_{10} YGMH (SEQ ID NO: 253)

[0114] X_{10} 은 S(세린) 또는 N(아스파라긴) 잔기이고;

[0115] 중쇄 CDR2 합치

				X_{11}												
A13	V	I	W	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K
A14				Y												
A19				Y												
A20				Y												
A16				Y												
A18				Y												
A15				F												

[0116] VIWX₁₁DGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 254)

[0117] X_{11} 은 Y(티로신) 잔기 또는 F(페닐알라닌) 잔기이다.

[0118] 중쇄 CDR3 합치

					X_{12}							X_{13}				
A13	G	G	G	I	P	V	A	D	Y	Y	Y	Y	G	M	D	V
A14					P							Y				
A19					P							Y				
A20					P							Y				
A16					A							Y				
A18					A							Y				
A15					A							F				

[0119] GGGIX₁₂VADYYX₁₃YGMDV (SEQ ID NO: 255)

[0120] X_{12} 는 P(프롤린) 잔기 또는 A(알라닌) 잔기이고;

[0121] X_{13} 은 Y(티로신) 잔기 또는 F(페닐알라닌) 잔기이다.

[0122] 그룹 2

[0123] 중쇄 CDR1 합치

A6	S	Y	G	I	H
A8					

[0124] SYGIH (SEQ ID NO: 147)

[0125] 중쇄 CDR2 합치

						X_{14}									
A6	V	I	S	Y	D	Y	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G
A8						N									

[0126] VISYDGSX₁₄KYYADSVKG (SEQ ID NO: 256)

[0127] X_{14} 는 Y(티로신) 잔기 또는 N(아스파라긴) 잔기이다.

[0128] 중쇄 CDR3 합치

A6	G	D	S	W	N	D	R	L	N	Y	Y	F	Y	D	M	D
A8																

[0129] GDSWNDRLNYYFYDMDV (SEQ ID NO: 214)

[0130] 그룹 3

[0131] 중쇄 CDR1 합치

	X ₁₅	X ₁₆			X ₁₇
A3	D	Y	Y	M	Y
A4	G	D			H

[0132] X₁₅X₁₆YMX₁₇ (SEQ ID NO: 257)

[0133] X₁₅는 D(아스파르트산) 잔기 또는 G(글리신) 잔기이고;

[0134] X₁₆은 Y(티로신) 또는 D(아스파르트산) 잔기이고;

[0135] X₁₇은 Y(티로신) 또는 H(히스티딘) 잔기이다.

[0136] 중쇄 CDR2 합치

										X ₁₈	X ₁₉	X ₂₀					
A3	W	I	N	P	N	S	G	G	T	N	Y	V	Q	K	F	Q	G
A4											H	A	R				

[0137] WINPNSGGTNX₁₈X₁₉X₂₀KFQG (SEQ ID NO: 258)

[0138] X₁₈은 Y(티로신) 또는 H(히스티딘) 잔기이고;

[0139] X₁₉는 V(발린) 또는 A(알라닌) 잔기이고;

[0140] X₂₀은 Q(글루타민) 또는 R(아르기닌) 잔기이다.

[0141] 중쇄 CDR3 합치

		X ₂₁		X ₂₂							X ₂₃	
A3	D	G	G	S	S	G	W	P	L	F	A	Y
A4		R		T							D	

(SEQ ID NO: 259)

[0142]

[0143] X₂₁은 G(글리신) 또는 R(아르기닌) 잔기이고; X₂₂는 S(세린) 또는 T(트레오닌) 잔기이고; X₂₃은 A(알라닌) 또는 D(아스파르트산) 잔기이다.

[0144] 하기 표 2는 각각 예시적인 TSLP 항원 결합 단백질들 A1 내지 A27에 대한 가변중쇄 도메인들(H#) 및 가변경쇄 도메인들(L#) 및 상기 가변중쇄 및 가변경쇄 도메인들의 아미노산 시퀀스들을 인코딩하는 핵산(DNA) 시퀀스들을 제공한다. 각 가변 도메인들에 대한 CDRs 1, 2 및 3들은 각 시퀀스의 단부에서의 시작에서부터 순차적이다. 골격(Fr) 영역들은 밑줄로 표시하였다. 각 가변 도메인들에 대한 골격 1, 2, 3 및 4들은 각 시퀀스의 단부에서의 시작에서부터 순차적이다(예를 들면, 각 시퀀스 내에서 상기 시퀀스의 첫번째의 밑줄 친 부분은 Fr1이고, 두 번째는 Fr2이고, 세번째는 Fr3이고 그리고 마지막은 Fr4이다).

표 2

H1 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAACTACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGTCT
AGTGGGAGCTACCAACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCG
TCTCCTCA

(SEQ ID NO: 260)

H1 단백질

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVROAPGKGLEWVA
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLVGATNYYGMDVWGQGT
TVSS

(SEQ ID NO: 261)

L1 DNA

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATC
ACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGG
ACAGGCCCTGTACTTGTCTCTCTGGTAAAACTACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCG
ATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGA
AGATGAGGCTGACTACTACTGTAACTCCCGGACAGAAGTGGAACCATCTGGTGT
TTTCCGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

(SEQ ID NO: 262)

L1 단백질

SSELTQDPVSVVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQOKPGOAPVLVISGKNYRPSGIPDRFSG
SSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDRSGNHLVFGGGTKLTVL

(SEQ ID NO: 263)

H2 DNA

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGTCGTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTTTACCATGCACTGGGTCCGTCAAGCT
CCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCTCTTATTAGTTGGGATGGTGGTAGCACATACTAT
GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACAGCAAAACTCCCTGTA
TATGCAAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACAGCGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGGTC
CTTACTACTACTTCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT
CA (SEQ ID NO: 264)

H2 단백질

EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDFTMHWVROAPGKGLEWVSLISWDGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNKNSLYMQMNSLRTEDSLALYYCARGPYYYFYGMDVWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 265)

L2 DNA

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATC
ACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGG
ACAGGCCCTATACCTTGTCTCTCTGATAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCG

[0146]

[표 2 계속]

ATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGA
AGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGACAGCAGTGATAACCATCTAGTGGTATT
TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
 (SEQ ID NO: 266)

L2 단백질

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRTYYASWYQQKPGQAPILVISDKNNRPSGIPDRFSG
SSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSDNHLVVFGGGKLTVL
 (SEQ ID NO: 267)

H3 DNA

CAGGTGACAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGACTACTATATGTAAGTGGGTGCGACAGGC
CCCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACT
ATGTACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCC
TACATGGAGCTGAGCAGGATGAGATCCGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGA
TGGGGGTAGCAGTGGCTGGCCCCCTCTTTCCTACTGGGGCCTGGGAACCTGGTCACCGT
CTCCTCA (SEQ ID NO: 268)

H3 단백질

QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMYWVROAPGOGPEWMGWINPNSGGTN
YVQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRMRSDDAVYYCARDGGSSGWPLFAYWGLGLTVTV
SS (SEQ ID NO: 269)

L3 DNA

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCACCAT
CTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTTTGATGTACACTGGTACCAGCA
GCTTCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGATAACAACAATCGGCCCTCAGGGGT
CCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCT
CCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAACCTGAGTGTTT
GATTGTGGTTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 270)

L3 단백질

QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAFDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNRPSGVDPDR
FSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSNLSGSIVVFGGGKLTVL (SEQ ID NO: 271)

H4 DNA

CAGGTGACAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGATACATCTTCACCGGCGACTATATGCACTGGGTGCGACAGGC
CCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAAACC
ATGCACGGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCC
TACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGTGAGAGA
TAGGGGTACCAAGTGGCTGGCCACTCTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGT
CTCCTCA (SEQ ID NO: 272)

H4 단백질

QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGDYMHVWVROAPGOGLEWMGWINPNSGGTN
HARKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRMRSDDAVYYCVRDRGTSWPLFDYWQGGTLTVTV
SS (SEQ ID NO: 273)

L4 DNA

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCACCAT
CTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTTTGATGTGCACTGGTACCAGCT
GCTTCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTTTGATAACAACAATCGCCCCCTCAGGGGT
CCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCT
CCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAACCTGAGTGTTT
GATTGTGGTATTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 274)

[0147]

[0148] [표 2 계속]

L4 단백질

QSVLTQPPSVSGAPGORVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQLLPGTAPKLLIFDNNNRPSGVPDR
FSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSNLSGSIVVFGGGKLTVL (SEQ ID NO: 275)

H5 DNA

CAGATGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGAACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGTTATGATGGAAGTAATAAACA
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCACAGAGACAATCCAAGAACA
AATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGC
CCCTCAGTGGGAGCTAGTTCATGAAGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAC
CGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 360)

H5 단백질

QMQLVESGGGVVOPGRSLRLSCAASGFTERTYGMHWVRQAPGKLEWVA
YADSVKGRFTITRDNSKNTLNLMNSLRAEDTAVYYCARAPQWELVHEAFDIWGQGTMTV
VSS (SEQ ID NO: 361)

L5 DNA

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATT
ACCTGTGGGGGAAACAACCTTGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGG
CCAGGCCCCCTGTGCTGGTCTGCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCATGGATCCCTGAGCG
ATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGGCGAAGCCG
GGGATGAGGCCGACTATTACTGTACAGTGTGGGATAGTAGTAGTATGATCATGTGGTATTTC
GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 362)

L5 단백질

SYVLTQPPSVSVAPGOTARITCGGNLGSKSVHWYQOKPGQAPVLVYDDSDRPSWIPERFS
GSNSGNTATLTISRGEAGDEADYYCQVWDSSDHVVFGGGKLTVL
(SEQ ID NO: 363)

H6 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAATTTTCAGTAGCTATGGCATTCAC
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTTATAAATACTA
TGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACA
ATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG
GACTCTGGAACGACAGATTAAACTACTTCTACGATATGGACGCTTGGGGCCAAGG
GACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 276)

H6 단백질

QVQLVESGGGVVOPGRSLRLSCAASGFISSYGIHWVRQAPGKLEWVA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDSWNDRLNYYFYDMDVWGQGT
TVT
VSS (SEQ ID NO: 277)

L6 DNA

TCCTATGAGCTGACTCAGGCACCCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATC
ACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGCTGGTATCAGCAGAAGCCAGG
CCAGTCCCCTGTGCTGGTCTATCAAGATAAGAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCG
ATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTAT
GGATGAGGCTGACTATTACTGTACAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTATTTCGGCGGA
GGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 278)

[0149]

[0150] [표 2 계속]

L6 단백질

SYELTQAPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQOKPGOSPVLVIYQDKKRPSGIPERFSG
SNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 279)

H7 DNA

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCT
CACCTGCAGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCG
CCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTTCATCCATTACAGTGGGACCACCT
ACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGACTTACCCTATCAGTAGACACGTCTAAGAGCCAGT
TCTCCCTGAAGCTGAAGTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
AAGTTGGCAGCTCGTCGGGTAAGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACC
GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 280)

H7 단백질

QVQLQESGPGLVKPSOTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGFIHYSGTTYNP
SLKSRLTSLVDTSKSFSLKLSNVTAADTAVYYCAREVGSSTGNWFDPWGQGLTVTVSS
 (SEQ ID NO: 281)

L7 DNA

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATC
ACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGCTGGTATCAGCAGAAGCCAGG
CCAGTCCCCTGTGGTGGTCACTATCAAGATAACAAGCGGCCCTCAGGGATCCCCTGAGCG
ATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTTTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTAT
GGATGAGGCTGACTATTACTGTACGGCGTGGGACAGCACCACCTGCGATATTTCGGCGGA
GGGACCAAGCTGACCGTCCTA
 (SEQ ID NO: 282)

L7 단백질

SYELTOPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQOKPGOSPVVVIYQDNKRPSGIPERFSG
SNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSTTAIFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 283)

H8 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATTCACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGCGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GGACTCCTGGAACGACAGATTAACTACTACTTCTACGATATGGACGTCTGGGGCCAAAG
GGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
 (SEQ ID NO: 284)

H8 단백질

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGIHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDSWNRNLNYYFYDMDVWGQGT
TVTIVSS (SEQ ID NO: 285)

L8 DNA

TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATC
ACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGCTGGTATCAGCAGAAGCCAGG
CCAGTCCCCTGTACTGGTCACTATCAAGATAACAAGCGGCCCTCAGGGATCCCCTGAGCG
ATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTTTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTAT
GGATGAGGCTGACTATTACTGTACGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTATTTCGGCGGA
GGGACCAAGCTGACCGTCCTA
 (SEQ ID NO: 286)

[0151]

[0152] [표 2 계속]

L8 단백질

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQOKPGOSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSG
SNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTLVL
 (SEQ ID NO: 287)

H9 DNA

CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATATACCTTCAATAGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATACATACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACATTTCCAAGAACACTCTGT
ATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
GTCCGGGCGTATAGCAGTGGCTGGTACGCCGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTT
GGTCACCGTCTCCTCA
 (SEQ ID NO: 288)

H9 단백질

QVQLVESGGGVVOPGRSLRLSCAASGYTFNSYGMHWVROAPGKGLEWVAVIWDGSDNTY
YADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVRAYSSGWYAAFVYWGQGLT
VTVSS (SEQ ID NO: 289)

L9 DNA

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATC
ACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAATCTTTATGCAAACCTGGTACCAGCAGAACGCCAGG
ACAGGCCCCGTGAGTTGTCTTCTATGGTAAAAACAACCGCCCTCAGGGATCCAGACCG
ATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGCGGGCTCAGGCGGA
AGATGAGGCTGACTATTATTGTAACCTCCCGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTTCG
GCGGAGGGACACGCTGACCGTCCTA
 (SEQ ID NO: 290)

L9 단백질

SSELTQDPAVSVALGOTVRITCQGDLSRIFYANWYQOKPGOAPVVVFYGKNNRPSGIPDRFS
GSSSGNTASLTITAAQAEDEADYYCNSRDSSGNHVVFGGGTTLTLVL
 (SEQ ID NO: 291)

H10 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAACGTCTGGATTACCTTCAGTAGTTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAGTAAATACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGT
AAGAAGTGGGAGCTACTACGAACAGTATTACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAAAGGGA
CCACGGTCGCCGTCTCCTCA
 (SEQ ID NO: 292)

H10 단백질

QVQLVESGGGVVOPGRSLRLSCATSGFTFSSYGMHWVROAPGKGLEWVAVIWDGSSKYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRSGSYQEYQYYGMDVWGQGTI
VAVSS (SEQ ID NO: 293)

L10 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCCGGCAAAATCAGTACATTAGCACCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCTAAGGTCTGATTTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATTTGAGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGACGAGCTACACTACCCCGATCACCTTTTCGGCCA
AGGGACACGACTGGAGATTAAA
 (SEQ ID NO: 294)

[0153]

[0154] [표 2 계속]

L10 단백질

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRANQYISTYLNWYQOKPGKAPKVLIIYAASSLQSGVPSRFS
SGSFETDFTLTISSLOPEDFATYYCQSYTTPITFGQGRLEIK
(SEQ ID NO: 295)

H11 DNA

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTATAGCATGAAGTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTGGTCGTAAGTAGCGTATACTA
CGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGT
ATCTGCACATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGT
GGGATCTACTACGACTACTACGGTATGGACGCTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT
CTCCTCA (SEQ ID NO: 296)

H11 단백질

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVSYISGRTSSVYYA
DSVKGRFTISRDNKNSLYLHMNSLRDEDTAVYYCARSGIYYDYWGMDVWGQGTITVSS
(SEQ ID NO: 297)

L11 DNA

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCCC
ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAAACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGACATCCACCCGG
GAAGGCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATTTTACTAC
TCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 298)

L11 단백질

DIVMTQSPDSLAVSLGERAPINCKSSQSVLNSSNNKNYLAWYQOKPGOPPKLLIYWTSTREG
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLAEDVAVYYCQQYFTTPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 299)

H12 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GGCAGCCACTGCTATAGATTACTACTCTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCTAGGGAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 300)

H12 단백질

QVQLVESGGGVVOPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAIVIWDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAATAIDYYSYGMDVWGLGTT
VTSS (SEQ ID NO: 301)

L12 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGTAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCGGAAACCA
GGAAAAGCCCCTAAGTTCCCTGATCTATACTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTCTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTGACAGTTTCCCGCTCACTTTTCGGCGG
AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
(SEQ ID NO: 302)

[0155]

[0156]

[표 2 계속]

L12 단백질

DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGISSWLAWYQRKPGKAPKFLIYTASSLQSGVPSRFS
SGSGGTDFTLTISSLOPEDSATYYCQQAQSFPLTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 303)

H13 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GGGGGGTATACCACTAGCTGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 304)

H13 단백질

QVQLVESGGGVVOPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVROAPGKGLEWYAVIWIYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGIPVADYYYYGMDVWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 305)

L13.1 DNA

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTCTACAGTATGGAGACACCTACTTGAATTGG
TTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAACTGGGAC
TCTGGGGTCCCATAACAGATTTCAGCGCCAGTGGGTTCAGGCAGTATTTACACTGCAAAATC
AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTACTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCC
TCCGGCCTTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEQ ID NO: 306)

L13.1 단백질

DVYMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGDTYLNWFQORPGQSPRLIYKVSINWDSG
VPYRFSGSGSGTDFTLQISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPPAFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 307)

L13.2 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTTCGGGCGAGTCAGGGTCTTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATGTATAACACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC
AAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTCAGTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGC
CTGAAGATTTTGCAAGTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCTCTCACTTTTCGGCG
GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
(SEQ ID NO: 308)

L13.2 단백질

DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGLSSWLAWYQOKPGKAPKLLMYNTSSLQSGVPSRF
SGSGGTDFSLTISSLOPEDFASYCQQAQNSFPLTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 309)

H14 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GGGGGGTATACCACTAGCTGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 304)

[0157]

[0158] [표 2 계속]

H14 단백질

QVQLVESGGGVVOPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGIPVADYYYYGMDVWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 305)

L14.1 DNA

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTCTACAGTGATGGAAACACCTACTTGAATTGG
TTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAACTGGGAC
TCTGGGGTCCCAGACAGATTACAGCGCATTTGGGTCAGGCACTGACTTCACACTGAAAATC
AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTACTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCC
TCCGGCCTTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEQ ID NO: 310)

L14.1 단백질

DVYMTQSPPLSLPTLGOPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQORPGQSPRRLIYKVSNWDSG
VPDRFSGISGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQGTHWPPAFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 311)

L14.2 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTCTTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCAAGCTCCTGATGTATAACACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC
AAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGC
CTGAAGATTTTGCAAGTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCTCTCACTTTTCGGCG
GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
(SEQ ID NO: 312)

L14.2 단백질

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGLSSWLAWYQQKPGKAPKLLMYNTSSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFASYYCQQANSFPLTFGGGTKEIK
(SEQ ID NO: 309)

H15 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCCCCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGACTGGAAATGGGTGGCAGTTATATGGTTTGATGGAAGTAATAAATACT
ATGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GGGGGGTATAGCAGTGGCTGACTACTACTTCTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 313)

H15 단백질

QVQLVESGGGVVOPGKSLRLSCAASGFPSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNPKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGIAVADYYFYGMDVWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 314)

L15.1 DNA

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTTGGACAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCATATACAGTGATGGAAACACTTACTTGAATTGG
TTTCAACAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAACTGGGAC
TCTGGGGTCCCAGACAGATTACAGCGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTACACTGAAAAT
CAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGC
CTCCGGCCTTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEQ ID NO: 315)

[0159]

[0160]

[표 2 계속]

L15.1 단백질

DVVMTQSPSLPVTLGOPASISCRSSQSLIYSDGNTYLNWFQORPGQSPRRLIYKVSNWDSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQGTHWPPAFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 316)

L15.2 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATTACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCATAAGGTCCTGACCTATACTACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCTACTTACTTTTGTCAACAGGCTGACAGTTCCCTCTCACTTTTCGGCGGG
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 317)

L15.2 단백질

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLA WYQOKPGKAPKVLTYTTSSLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYFCQQADSFPFTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 318)

H16 DNA

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAAGTATGGCATGCAGTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GGGGGGTATAGCAGTGGCTGACTACTACTACTACGGTATGGACGCTTGGGGCCAAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 319)

H16 단백질

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGIAVADY YYYGMDVWGQG
TTVTVSS (SEQ ID NO: 320)

L16.1 DNA

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAGTGATGAAACACCTACTTGAATTGG
TTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTTACTGGGAC
TCTGGGGTCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAAGCACTGATTTCACTGAAAAT
CAGTAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGC
CTCCGGCCTTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEQ ID NO: 321)

L16.1 단백질

DVVMTQSPSLPVTLGOPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQORPGQSPRRLIYKVSYWDSG
VPDRFSGSGSSTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQGTHWPPAFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 322)

L16.2 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGAGTCTTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCATAAAGTCTGCTCCATAATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGTAATAATTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTCCCTCTCACTTTTCGGCGGA
GGGACCAGGGTGGAGATCAAA
(SEQ ID NO: 323)

L16.2 단백질

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQSLSSWLA WYQOKPGKAPKLLHNASLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLOPEDFVNYYCQQANSFPFTFGGGTRVEIK
(SEQ ID NO: 324)

[0161]

[0162] [표 2 계속]

H17 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTAAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTAAGTAGTTATGGCATGCTCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTTATGGTTTGATGGAAGTTATAAAAACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGCGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA
TAGTACAACATATGGCCCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTC
A (SEQ ID NO: 325)

H17 단백질

QVQLVESGGGVVOPGRSLRLSCAASGFTLSSYGMLWVRQAPGKGLEWVAVLWFDGSYKNY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSTTMAHFDYWGQGLVTVSS
(SEQ ID NO: 326)

L17 DNA

CAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCCTGGAGGGACAGTCACACTC
ACTTGTGGCTTGAACCTGAGTCTCTACTAGTTACTTCCCAGCTGGTACCAGCAG
ACCCAGGCCAGGGCTCCACGCACGCTCATCTACAGCACAAACAGTCGCTCTTCTGGGGTC
CCTGATCGCTTCTCTGGCTCCATCCTTGGGAACAAAGCTGCCCTCACCATCACGGGGGCC
CAGGCAGATGATGAATCTGATTATTACTGTGTGCTGTATATGGGTAGAGGCATTTGGGTG
TTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 327)

L17 단백질

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLNSGSVSTSYFPSWYQOTPGQAPRTLIYSTNSRSSGVPDRF
SGSILGNKAALTITGAQADDES DYCVLYMGRGIWVFEGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 328)

H18 DNA

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GGGGGTATAGCAGTGGCTGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 319)

H18 단백질

QVQLVESGGGVVOPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGIAVADY YYYGMDVWGQG
TTVTVSS (SEQ ID NO: 320)

L18.1 DNA

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAGTGATGGAAACACCTACTTGAATTGG
TTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTTACTGGGAC
TCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTCACACTGAAAAAT
CAGTAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGC
CTCCGGCCTTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 329)

L18.1 단백질

DVVMTQSPLSLPVTLGOPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQORPGQSPRRLIYKVS YWDSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCMQGT HWP PAFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 330)

L18.2 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC

[0163]

[0164] [표 2 계속]

ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGAGTCTTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAACTCCTGCTCTATAATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGCCCCATCA
AGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGTAACCTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCTCTCACTTTTCGGCGGA
GGGACCAGGTGGAGATCAAA
 (SEQ ID NO: 331)

L18.2 단백질

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQSLSSWLAWYQQKPGKAPKLLYNASSLQSGAPSRFS
SGSGTDFLTISLQPEDFVTYYCQANSFPLTFGGGTRVEIK
 (SEQ ID NO: 332)

H19 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT
ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GGGGGGTATACCAGTAGCTGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCCTCA
 (SEQ ID NO: 304)

H19 단백질

QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVA
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGIPVADY
VTVSS (SEQ ID NO: 305)

L19.1 DNA

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCCTTGGACAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTCTACAGTGATGGAGACACCTACTTGAATTGG
TTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAACTGGGAC
TCTGGGGTCCCATACAGATTACAGCGGCAGTGGGTACGGCACTGATTTCACACTGCAAAATC
AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTACTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCC
TCCGGCCTTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA (SEQ ID NO: 306)

L19.1 단백질

DVVMTQSPSLPVTLGOPASISCRSSQSLVYSDGDTYLNWFQORPGQSPRRLIYKVS
WDSGVPYRFSGSGTDFLTQISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPPAFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 307)

L19.2 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCGGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTCTTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCAAGCTCCTGATGTATAACACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC
AAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGC
CTGAAGATTTTGCAAGTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCTCTCACTTTTCGGGC
GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 (SEQ ID NO: 308)

L19.2 단백질

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGLSSWLAWYQQKPGKAPKLLMYNTSSLQSGVPSRF
SGSGTDFSLTISLQPEDFASYYCQANSFPLTFGGGTVKVEIK
 (SEQ ID NO: 309)

H20 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT

[0165]

[0166] [표 2 계속]

ATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGCGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GGGGGGTATACCAGTAGCTGACTACTACTACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCTCTCA
 (SEQ ID NO: 304)

H20 단백질
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAIVWYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGIPVADY YYYGMDVWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 305)

L20.1 DNA
GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCCTTGGACAGCCGGCCTCC
ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTCTACAGTGATGGAGACACCTACTTGAATTGG
TTTCAGCAGAGGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCCTAATTTATAAGGTTTCTAACTGGGAC
TCTGGGGTCCCATACAGATTACAGCGGCAGTGGGTGTCAGGCACTGATTTACACTGCAAAATC
AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTACTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCC
TCCGGCCTTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (SEQ ID NO: 306)

L20.1 단백질
DVVMTQSPSLSLPVTLGOPASISCRSSQSLVYSDGDTYLNWFQORPGQSPRRLIYKVS NWDSG
VPYRFSGSGSGTDFTLQISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPPAFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 307)

L20.2 DNA
GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGTGCGGCGAGTCAGGGTCTTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCCAAGCTCCTGATGTATAACACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC
AAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGC
CTGAAGATTTTGCAAGTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCTCTCACTTTTCGGGC
GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 (SEQ ID NO: 333)

L20.2 단백질
DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGLSSWLAWYQQKPGKAPKLLMYNTSSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFSLTISSLOPEDFASYYCQANSPFLTFGGGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 309)

H21 DNA
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCAATTAGTGGTAGTGGTGGAAGTACACACT
ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGA
TCTCAACTGGGGAGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
 (SEQ ID NO: 334)

H21 단백질
EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTHYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLNWGAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ
 ID NO: 335)

L21 DNA
CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCACCAT
CTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATTGGGGCGGGTTATGTTGTACATTGGTACCAGCA
GCTTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGT
CCCTGACCAATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGACT

[0167]

[0168] [표 2 계속]

CCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCAAAGCATGGGATAACAGCCTGAATGCTC
AAGGGGTATTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO: 336)

L21 단백질

QSVLTQPPSVSGAPGQRTVISCTGSSSNIGAGYVHVWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDO
FSGSKSGTSASLAITGLQSEADYYCKAWDNSLNAQGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 337)

H22 DNA

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGCACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGGCTCTGGATTCTCCTTTAGAGGCTATGTCATGACTTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGAATTAGTGGTGTGGTGGTAGCACATACTA
CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT
GTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGA
GACAGCTCGAACTACTACTCCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCATCGT
CTCCTCA (SEQ ID NO: 338)

H22 단백질

EVOLLESGGGLAOPGGSLRLSCAGSGFSFRGYVMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLCLOMNSLRAEDTAVYYCAKGDSSNYYS GMDVWGQGTTVIVSS
(SEQ ID NO: 339)

L22 DNA

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTATACAACTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT
TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCTTCTACCCGG
GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTCTACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAGGATGTGGCAATTTATTACTGTGAGCAATTTATGTGCTCT
CCTCTCATTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAATCAAA (SEQ ID NO: 340)

L22 단백질

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYNSNNKNYLA WYQOKPGOPP KLLIYWASTRES
GVPRDFSGSGSDFTLTISSLQAEDVAIYYCQQFYGPPLTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 341)

H23 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
CTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGACTGGGTGCGACAGGC
CCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCTAACAATGGTGGCACAACCT
ATGGACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCC
TACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGG
GAACTGGAACGACGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTC
A (SEQ ID NO: 342)

H23 단백질

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNGGTN
YGQKFPQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARGNWNDDAFDIWGQGTMTVTVSS
(SEQ ID NO: 343)

L23 DNA

TCCTATGAGCTGACTCAGTCAACCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATC
ACCTGTTCTGGTGATAAATTGGGGGATAAATTTGCTTTCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGC
CAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAGATAGCAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGA
TTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATG
GATGAGGCTGACTATTACTGTGAGCGTGGGACAGCAGCGCCGGGGGGTATTTTCGGCG
GAGGGACCAAGTTGACCGTCCTA
(SEQ ID NO: 344)

[0169]

[0170]

[표 2 계속]

L23 단백질

SYELTQSPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKFAFWYQOKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSAGGVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 345)

H24 DNA

CAGGTGCAACTGGAGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT
ATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAT
GGGGTTTACTATGGTTCGGGGAGCCCTCTACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 346)

H24 단백질

QVQLEESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYY
VDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARMGFTMVRGALYYGMDVWGQGT
TVT VSS (SEQ ID NO: 347)

L24 DNA

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATC
ACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATCATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAAGCCAGG
ACAGGCCCTGTACTTGTCTATATGGTGAACAAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCG
ATTCTCTGACTCCAGTTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGA
AGATGAGGCTGACTATTATTGTAATTATCGGGACAACAGTGGTAACCATCTGGTGTTCG
GCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
(SEQ ID NO: 348)

L24 단백질

SSELTQDP AVSVALGOTVRITCQGDSLRSYHASWYQOKPGQAPVLVIYGENNRPSGIPDRFSD
SSSGNTASLTITGAAAEADYYCNYRDN SGNHLVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 349)

H25 DNA

GAGGTGCAGCTGTTGGAATCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTCGTAGTGGTAGTACCACATACT
ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGTGGAACC
GAGATATTTTGA CTGTTATTAGGCGACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTC
A (SEQ ID NO: 350)

H25 단백질

EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISRSGSTTYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC VEP RYFDWLLGDWGQGLTVTVSS (SEQ
ID NO: 351)

L25 DNA

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTATTTATACAACCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT
TGGTACCAGCAGAAACAGGACAGCCTCCTAAGCTGTCTATTTACTGGGCTTCTACCCGG
GAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCA GTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGGCTGAGGATGTGGCAATTTATTACTGT CAGCAATTTATGGTCCT
CCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 340)

[0171]

[0172] [표 2 계속]

L25 단백질
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYNSNNKNYLAWYQOKPGOPPRLIYWASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLSQAEDVAIYYCQQFYGPPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 341)

H26 DNA
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGTCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAAATGGTATGAAGGAAGTAATAAATACT
ATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTG
TATTTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCGAGGATACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGG
CGCCACGACTACGGTGACTTCTACTACGGTATGGACGCTTGGGGCCAAGGGACCACGG
TCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 352)

H26 단백질
QVQLVESGGGVVOPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVROAPGKGLEWVAVKWEYSNKY
YGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRGEDIAVYYCARGAHDYGFYYGMDVWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 353)

L26 DNA
TCCTATGAACTGACTCAGCCAGCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGATAGCCAGCATC
ACCTGCTCTGGAGATAATTTGGGGGATAAATATATTTGCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGC
CAGTCCCCTGTGCGGTCTATCAAGATAACAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGT
TTCTCTGGCTCCAATCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATG
GATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTATTTCGGCGGAG
GGACCAAGCTGACCGTCTCA (SEQ ID NO: 354)

L26 단백질
SYELTOPASVSVSPGQIASITCSGDNLDKICYWYQOKPGQSPVRVIYQDNKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGKLTVL
(SEQ ID NO: 355)

H27 DNA
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
TCCTGTGTCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTTATAGTGGCGGTAGCACATACT
ACGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGGTTCAACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTG
TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGA
TCGGGAGGGAGCGACTTGGTACTACGGTATGGACGCTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 356)

H27 단백질
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVROAPGKGLEWVSAISYSGGSTYYA
GSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDREGATWYYGMDVWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 357)

L27 DNA
TCCTATGAACTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATC
ACCTGCTCTGGAGATAAATTTGGGGGAAAGCTATGCTTGTGGTATCAGCAGAAGCCAGG
CCAGTCCCCTGTACTGGTCTATCTATCAAGATTACAAGCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCG
CTTCTCTGGCTCCAATCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTAT
GGATGAGGCTGACTATTACTGTACAGGCGTGGGACAGAAGTACTGTACTATTTCGGCGGA
GGACCAAGCTGACCGTCTCA (SEQ ID NO: 358)

[0173]

[0174] [표 2 계속]

L27 단백질
SYELTOPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGESYACWYQOKPGQSPVLVIYQDYKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRSTVLFGGGKLTVL
(SEQ ID NO: 359)

[0175]

[0176] 본 발명의 항원 결합 단백질들의 특징의 구체예들에는 하나 또는 그 이상의 CDRs들의 상기 아미노산 시퀀스들과 동일한 하나 또는 그 이상의 아미노산 시퀀스들이 포함되며, 앞서 나타난 하나 또는 그 이상의 FRs들이 더 포함될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타난 하나의 경쇄 CDR1 시퀀스를 포함한다. 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타난 하나의 경쇄 CDR2 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타난 하나의 경쇄 CDR3 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타난 하나의 중쇄 CDR1 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타난 하나의 중쇄 CDR2 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타난 하나의 중쇄 CDR3 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타난 하나의 경쇄 FR1 시퀀스를 더 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타난 하나의 경쇄 FR2 시퀀스를 더 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원

결합 단백질은 앞서 나타낸 하나의 경쇄 FR3 시퀀스를 더 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타낸 하나의 경쇄 FR4 시퀀스를 더 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타낸 하나의 중쇄 FR1 시퀀스를 더 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타낸 하나의 중쇄 FR2 시퀀스를 더 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타낸 하나의 중쇄 FR3 시퀀스를 더 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질은 앞서 나타낸 하나의 중쇄 FR4 시퀀스를 더 포함한다.

[0177] 하나의 구체예에 있어서, 본 상세한 설명은 단지 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 또는 0 개의 잔기들에서 L1 내지 L27들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 경쇄 가변 도메인의 시퀀스와는 다른 아미노산들의 시퀀스를 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하며, 여기에서 이러한 시퀀스 차이 각각은 독립적으로 하나의 아미노산 잔기의 결실, 삽입(insertion) 또는 치환 중의 하나이다. 다른 구체예에 있어서, 상기 경쇄 가변도메인은 L1 내지 L27들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 경쇄 가변도메인의 시퀀스와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산들의 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 경쇄 가변도메인은 L1 내지 L27들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 경쇄 가변도메인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 시퀀스와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 뉴클레오타이드 시퀀스에 의해 인코딩되는 아미노산들의 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 경쇄 가변도메인은 적절하게 가혹한 조건들 하에서 L1 내지 L27들의 경쇄 폴리뉴클레오타이드의 보체로 잡종화하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩되는 아미노산들의 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 경쇄 가변도메인은 적절하게 가혹한 조건들 하에서 L1 내지 L27들의 경쇄 폴리뉴클레오타이드의 보체로 잡종화하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩되는 아미노산들의 시퀀스를 포함한다.

[0178] 또 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 단지 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 또는 0 개의 잔기들에서 H1 내지 H27로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 중쇄 가변도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 제공하며, 여기에서 이러한 시퀀스 차이 각각은 독립적으로 하나의 아미노산 잔기의 결실, 삽입 또는 치환 중의 하나이다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 중쇄 가변도메인은 H1 내지 H27들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 중쇄 가변도메인의 시퀀스와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산들의 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 중쇄 가변도메인은 H1 내지 H27들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 중쇄 가변도메인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 시퀀스와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 동일한 뉴클레오타이드 시퀀스에 의해 인코딩되는 아미노산들의 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 중쇄 가변도메인은 적절하게 가혹한 조건들 하에서 H1 내지 H27들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 중쇄 폴리뉴클레오타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 보체로 잡종화하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩되는 아미노산들의 시퀀스를 포함한다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 중쇄 가변도메인은 적절하게 가혹한 조건들 하에서 H1 내지 H27들로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 중쇄 폴리뉴클레오타이드의 보체로 잡종화하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩되는 아미노산들의 시퀀스를 포함한다.

[0179] 상기 표 2에서 제공되는 상기 구체예들의 일부에 있어서, 예를 들어, L-12.1, L-12.2 등과 같이 동정된 2 개의 경쇄들이 단일의 중쇄와 연관된다. 이들 대안의 경쇄들은 각각이 단일의 중쇄와 짝지어진다. 이들 구체예들에 있어서, 경쇄 및 중쇄 조합(combination)은 이하에서 기술되는 바와 같이 분석될 수 있으며, 또한 보다 큰 TSLP 중화 활성을 제공하는 경쇄와 중쇄의 조합이 선택될 수 있다.

[0180] 부가의 구체예들에는 L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26 및 L27H27 조합들을 포함하는 항원 결합 단백질들이 포함된다.

[0181] 본 발명의 항원 결합 단백질들(예를 들면, 항체들, 항체 단편들 및 항체 유도체들)은 당해 기술분야에서 공지된 임의의 불변영역을 더 포함한다. 예를 들면, 경쇄 불변영역은 카파-형 또는 람다-형 경쇄 불변영역들, 예를 들면, 인간 카파-형 또는 람다-형 경쇄 불변영역들이 될 수 있다. 예를 들면, 중쇄 불변영역은 알파-형, 델타-형, 입실론-형, 감마-형 또는 뮤-형 중쇄 불변영역들, 예를 들면, 인간 알파-형, 델타-형, 입실론-형, 감마-형 또는 뮤-형 중쇄 불변영역이 될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 경쇄 또는 중쇄 불변영역은 자연적으로 발생하는 불변영역의 단편, 유도체, 변종(variant) 또는 돌연변이 단백질이다.

[0182] 하나의 구체예에 있어서, 상기 항원 결합 단백질들은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 등과 같은 IgG를 포함한다.

[0183] 대상체의 항체와는 다른 서브클래스 또는 아이소타입의 항체를 유도하기 위한 기술들, 즉, 서브클래스 스위칭

(subclass switching)이 공지되어 있다. 따라서, IgG 항체들이 IgGM 항체로부터 또는 그의 역으로 유도될 수 있다. 이러한 기술들은 주어진 항체(부모 항체)의 상기 항원-결합 특성들을 보유하기는 하나, 또한 부모 항체의 그것과는 다른 항체 아이소타입 또는 서브클래스와 연관되는 생물학적 특성들을 나타내는 새로운 항체들의 제조를 허용한다. 재조합 DNA 기술들이 사용될 수 있다. 특정의 항체 폴리펩티드들을 인코딩하는 복제된 DNA, 예를 들면, 원하는 아이소타입의 항체의 상기 불변도메인을 인코딩하는 DNA가 이러한 절차들에 사용될 수 있다. 또한 란토(Lantto)와 그의 동료들의 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16를 참조하시오.

[0184] 하나의 구체예에 있어서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 상기 IgG1 중쇄 불변도메인 또는 상기 IgG1 중쇄 도메인의 단편을 포함한다. 하나의 구체예에 있어서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 불변의 경쇄 카파 또는 람다 도메인들 또는 이들의 단편을 더 포함한다. 경쇄 가변영역들 및 이들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드들이 하기 표 3에 제공된다. 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 하기 표 3에서 나타난 상기 IgG2 중쇄 불변영역 등과 같은 중쇄 불변도메인 또는 그들의 단편을 더 포함한다.

[0185] 불변의 중쇄 및 불변의 경쇄 도메인들을 인코딩하는 핵산(DNA) 및 중쇄와 경쇄 도메인들의 아미노산 시퀀스들이 이하에서 제공된다. 람다 가변도메인들은 람다 불변도메인들에 융합될 수 있고, 그리고 카파 가변도메인들은 카파 불변도메인들에 융합될 수 있다.

표 3

IgG2 중쇄 불변 도메인 DNA (SEQ ID NO: 364)

```
gctagcaccaggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagggccctggcctgctgtaaggact
acttccccgaaccgggtgacgggtgctgctggaactcaggcgctctgaccagcgcgctgcacacctcccagctgtcctacagtcctcaggactctact
ccctcagcagcggtggtgaccgtgcccctccagcaacttcggcaccagacctacacctgcaacgtagatcacaaagccagcaacccaagggtgga
caagacaggttgagcgcaaatgttgtgctgagtgcccacgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagttctcttccccccaaacccaa
ggacacctctatgatctccggacccctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtccagtccaactggtacgtg
gacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccagggagagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgctcctcaccgtgtgcacc
aggactggctgtaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaggcctccagccccatcgagaaaacacatctccaaaccaaagggc
agccccgagaaacacaggtgtacacctgcccccatccggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgctcaaaaggctcta
ccccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggagcagccggagagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctctt
cttctctacagaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctctatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccacta
cagcagaagagcctctcctgctccgggtaaatga
```

IgG2 중쇄 불변 도메인 단백질 (SEQ ID NO: 365)

```
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLT
VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK*
```

카파 경쇄 불변 도메인 DNA (SEQ ID NO: 366)

[0186]

[0187] [표 3 계속]

```
cgtacgggtgctgcaccatctgtcttctctccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctcctgctgaataactctatcc
cagagaggccaaagtacagtggaaggttgatacgcctccaatcggtgaactcccagagagtgctcacagagcaggagacagcaagacagca
cctacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgccaagtcacccatcaggcctgagctc
gcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag
```

카파 경쇄 불변 도메인 단백질 (SEQ ID NO: 367)

```
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
```

람다 경쇄 불변 도메인 DNA (SEQ ID NO: 368)

```
ggccaaccgaaagcgccgctcctgctcactctgttcccgccctcctctgagcagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtac
ttctaccgggagcgtgacagtggtcctggaaggcagatagcagcccgtaaggcgaggagtgagaccacacacctccaacaagaagcaa
caacaagtacgcggccagcagctatgagcctgacgcctgagcagtggaagtgccacagaagctacagctgccaaggtcacgcatgaaggag
caccgtggagaagacagtgccccctacagaatgtcatag
```

람다 경쇄 불변 도메인 단백질 (SEQ ID NO: 369)

```
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSN
NKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS*
```

[0188]

[0189] 본 발명의 상기 항원 결합 단백질들은 예를 들면, 원하는 아이소타입(예를 들면, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE 및 IgD)을 갖는 가변도메인 조합들 L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13.1H13, L13.2H13, L14.1H14, L14.2H14, L15.1H15, L15.2H15, L16.1H16, L16.2H16,

L17H17, L18.1H18, L18.2H18, L19.1H19, L19.2H19, L20.1H20, L20.2H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26 및 L27H27들 및 마찬가지로 이들의 Fab 또는 F(ab')₂들이 포함된다. 더욱이, IgG4가 요구되는 경우, 블룸(Bloom)과 그의 동료들의 1997, Protein Science 6:407(본 명세서에서 참고로 인용됨)에서 기술된 바와 같이 힌지영역(hinge region) 내에서의 점돌연변이(point mutation)를 도입하여 상기 IgG4 항체를 내에서의 이종성(heterogeneity)을 야기할 수 있는 인트라-H 쇠 이황화 결합들(intra-H chain disulfide bonds)을 형성하는 경향을 완화시키도록 하는 것이 또한 소망될 수 있다.

[0190] 항체들 및 항체 단편들

[0191] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 본 명세서의 정의 부분에서 기술된 바와 같이 손상되지 않은 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 의미한다. 항체는 완전한 항체 분자(전장(full length)의 중쇄 및/또는 경쇄들을 갖는 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, 인간화된 또는 인간 버전들)를 포함할 수 있거나 또는 이들의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.

[0192] 항체 단편들에는 F(ab')₂, Fab, Fab', Fv, Fc 및 Fd 단편들이 포함될 수 있으며, 단일의 도메인 항체들, 1가의 항체들(monovalent antibodies), 단일-쇄 항체들, 맥시바디(maxibodies), 미니바디(minibodies), 인트라바디(intrabodies), 다이어바디(diabodies), 트라이아바디(triabodies), 테트라바디(tetrabodies), v-NAR 및 bis-scFv들 내로 합체될 수 있다(예를 들면, 홀링거(Hollinger))와 허드슨(Hudson)의 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136를 참조하시오). 항체 폴리펩티드들은 또한 피브로넥틴 폴리펩티드 모노바디(fibronectin polypeptide monobodies)를 포함하는 미합중국 특허 제6,703,199호에서 기술되어 있다. 다른 항체 폴리펩티드들은 미합중국 특허 공개공보 제2005/0238646호에서 기술되어 있으며, 이는 단일-쇄 폴리펩티드들이다. 1가의 항체 단편들은 미합중국 특허 공개공보 제20050227324호에서 기술되어 있다.

[0193] 항체로부터 유도되는 항원 결합 단편들이, 예를 들면, 항체의 단백질 가수분해(proteolytic hydrolysis), 예를 들면, 통상의 방법들에 따른 전체 항체들의 펩신 또는 파파인 소화(papain digestion)에 의하여 수득될 수 있을 것이다. 예로서, 항체 단편들은 F(ab')₂로 정의되는 5S 단편을 제공하는 펩신으로의 항체들의 효소적 개열(enzymatic cleavage)에 의해 생산될 수 있다. 이 단편은 3.5S Fab' 1가 단편들을 생성하는 티올 환원제(thiol reducing agent)를 사용하여 더 개열될 수 있다. 선택적으로, 상기 개열반응(cleavage reaction)은 이황화 결합(disulfide linkages)들의 개열이라는 결과를 가져오는 설프하이드릴기(sulfhydryl groups)들에 대한 차단(blocking)을 사용하여 수행될 수 있다. 대안으로서, 파파인을 사용하는 효소적 개열은 직접적으로 2개의 1가의 Fab 단편들 및 하나의 Fc 단편을 생성한다. 이들 방법들은, 예를 들면, 골덴버그(Goldenberg)의 미합중국 특허 제4,331,647호, 니소노프(Nisonoff)와 그의 동료들의 Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; 포터(Porter)의 Biochem. J. 73:119, 1959; 에델만(Edelman)과 그의 동료들의 in Methods in Enzymology 1:422(Academic Press 1967); 및 앤드류스(Andrews, S.M.)와 타이투스(Titus)의 J.A. in Current Protocols in Immunology (콜리간(Coligan J.E.)과 그의 동료들의 편저), John Wiley & Sons, New York (2003), pages 2.8.1-2.8.10 및 2.1 OA.1-2.10A.5.에 의해 기술된다. 단편들이 손상되지 않은 항체에 의해 인식되는 항원에 결합하는 한, 1가의 경쇄-중쇄 단편들(Fd)을 형성하도록 하는 중쇄들의 개열, 단편들의 추가의 개열 등과 같은 항체들을 개열하거나 또는 다른 효소적, 화학적 또는 유전적 기술들 등과 같은 다른 방법들이 또한 사용될 수 있다.

[0194] 항체 단편은 또한 임의의 합성 또는 유전적으로 조작된 단백질이 될 수 있다. 예를 들면, 항체 단편들에는 상기 경쇄 가변영역으로 이루어지는 단리된 단편들, 상기 중쇄 및 경쇄들의 가변영역들로 이루어지는 "Fv" 단편들, 경쇄 및 중쇄 가변영역들이 펩티드 링커(peptide linker ; scFv 단백질들)에 의해 연결되는 재조합 단일쇄 폴리펩티드 분자들이 포함된다.

[0195] 항체 단편의 다른 형태는 항체의 하나 또는 그 이상의 상보적 결정 영역들(CDRs)을 포함하는 펩티드이다. CDRs들(또한 "최소의 인식 단위들(minimal recognition units)" 또는 "고도가변영역(hypervariable region)"이라고도 칭하여짐)은 대상체의 상기 CDR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드들을 구축하는 것에 의해 수득될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드들은, 예를 들면, 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction)을 사용하여 템플릿(template)으로서 항체-생산 세포들의 mRNA를 사용하는 가변영역을 합성하는 것에 의하여 제조된다(예를 들면, 라릭(Larrick)과 그의 동료들의 Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; 커티리-룩(Courtenay-Luck)의 "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, 리터(Ritter)와 그의 동료들(편저), 166페이지(Cambridge

University Press 1995); 및 와드(Ward)와 그의 동료들의 "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, 버치(Birch)와 그의 동료들(편저), 137페이지(Wiley-Liss, Inc. 1995)들을 참조하시오).

[0196] 따라서, 하나의 구체예에 있어서, 결합제(binding agent)는 본 명세서에서 기술되는 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 상기 결합제는 본 명세서에서 기술되는 적어도 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR들을 포함할 수 있다. 상기 결합제는 본 명세서에서 기술되는 항체의 적어도 하나의 가변영역 도메인을 더 포함할 수 있다. 상기 가변영역 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성이 될 수 있으며, 또한 대체로 TSLP에의 결합에 책임이 있는 적어도 하나의 CDR 시퀀스, 예를 들면, 특별히 본 명세서에서 기술되며 또한 하나 또는 그 이상의 골격 시퀀스(frame sequences)들을 갖는 골격에 인접하거나 또는 그 안에 존재하는 중쇄 CDR1, CDR2, CDR3 및/또는 경쇄 CDRs들을 포함할 것이다. 일반적인 용어들에 있어서, 가변(V) 영역 도메인은 면역글로블린 중쇄(VH) 및/또는 경쇄(VL) 가변 도메인들의 임의의 적절한 배열이 될 수 있다. 따라서, 예를 들면, V영역 도메인은 1가가 단량체성(monomeric)일 수 있으며, VH 또는 VL 도메인일 수 있으며, 이는 독립적으로 이하에서 기술되는 바와 같이 적어도 1×10^{-7} M 또는 그 이하의 친화성으로 인간 TSLP에 결합할 수 있다. 달리, 상기 V 영역 도메인은 이량체성(dimeric)일 수 있으며, VH-VH, VH-VL 또는 VL-VL 이량체들을 포함할 수 있다. 상기 V 영역 이량체(V region dimer)는 비-공유적으로 연관되는(이하에서는 Fv라 언급함) 적어도 하나의 VH 및 적어도 하나의 VL쇄를 포함한다. 원하는 경우, 상기쇄들은, 예를 들면, 2개의 가변 도메인들 사이의 이황화결합(disulfide bond)을 통하거나 또는 링커 예를 들어 펩티드 링커를 통하여 서로 직접적으로 공유적으로 결합되어 단일쇄 Fv(scFv)를 형성할 수 있다.

[0197] 상기 가변영역 도메인은 임의의 자연적으로 발생하는 가변 도메인 또는 그들의 조작된 버전(engineered version)이 될 수 있다. 조작된 버전은 재조합 DNA 조작기술들을 사용하여 생성된 가변영역 도메인을 의미한다. 이러한 조작된 버전들에는 예를 들면 특정의 항체의 아미노산 시퀀스들 (내)에서의 삽입, 결실 또는 변화들에 의하여 상기 특정의 항체 가변영역으로부터 생성된 것들이 포함된다. 특정의 예들에는 적어도 하나의 CDR 및 선택적으로 제1의 항체로부터의 하나 또는 그 이상의 골격 아미노산들 및 제2의 항체로부터의 가변영역 도메인의 잔여부들을 포함하는 조작된 가변영역 도메인들이 포함된다.

[0198] 상기 가변영역 도메인은 C-말단의 아미노산에서 적어도 하나의 다른 항체 도메인 또는 그의 단편에 공유적으로 부착될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 상기 가변영역 도메인 내에 존재하는 VH 도메인은 면역글로블린 CH1 도메인 또는 그의 단편에 연결될 수 있다. 유사하게, VL 도메인은 C_K 도메인 또는 그의 단편에 연결될 수 있다. 이러한 방법으로, 예를 들면, 상기 항체는 Fab 단편이 될 수 있으며, 여기에서 상기 항원 결합 단백질은 그들의 C-말단에서 각각 CH1 및 C_K 도메인에 공유적으로 연결되는 연관된 VH 및 VL 도메인들을 포함한다. 상기 CH1 도메인은 예를 들어 그 이상의 아미노산들로 연장되어 Fab' 단편 내에서 발견되는 바와 같은 힌지영역(hinge region) 또는 힌지영역 도메인(hinge region domain)의 일부를 제공하거나 또는 항체 CH2 및 CH3 도메인들과 같은 다른 도메인들을 제공하도록 할 수 있다.

[0199] 항원 결합 단백질들의 유도체들

[0200] 도 1a 내지 도 1f, 도 2a 내지 도 2f 및 상기 표 2에서 나타난 상기 뉴클레오타이드 시퀀스들은 예를 들면 무작위 돌연변이(random mutagenesis)에 의하거나 또는 사이트-지향적인 돌연변이(site-directed mutagenesis; 예를 들면, 올리고뉴클레오타이드-지향적 사이트-특이적 돌연변이)에 의해 변형되어 돌연변이되지 않은 폴리뉴클레오타이드에 비하여 하나 또는 그 이상의 특정의 뉴클레오타이드 치환들, 결실들 또는 삽입들을 포함하는 변형된 폴리뉴클레오타이드를 생성할 수 있다. 이러한 변형들을 일으키기 위한 기술들의 예들은 왈더(Walder)와 그의 동료들의 1986, Gene 42:133; 바우어(Bauer)와 그의 동료들의 1985, Gene 37:73; 크레이크(Craik)의 BioTechniques, January 1985, 12-19; 스미스(Smith)와 그의 동료들의 1981, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press; 및 미합중국 특허 제4,518,584호 및 동 제4,737,462호에 기술되어 있다. 이들 및 다른 방법들은 예를 들어 원하는 특성, 예를 들면, 유도되지 않은 항원 결합 단백질들에 비하여 TSLP에 대한 증가된 친화성, 상호작용의 힘(avidity) 또는 특이성, 생체 내 또는 시험관 내에서의 증가된 활성 또는 안정성 또는 감소된 생체 내 부작용들을 갖는 TSLP 항원 결합 단백질들의 유도체들을 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0201] 본 발명의 범주 내의 항체들을 포함하는 항-TSLP 항원 결합 단백질들의 다른 유도체들에는 항-TSLP 항체 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 융합되는 이중기원의 폴리펩티드들을 포함하는 재조합 융합 단백질들(recombinant fusion proteins)의 발현에 의하는 것과 같은 다른 단백질들 또는 폴리펩티드들과 항-TSLP 항체들 또는 그들의

단편들의 공유적 또는 집합적 콘주게이트(aggregative conjugates)들이 포함된다. 예를 들면, 콘주게이트된 펩티드는 이중기원의 시그널(heterologous signal)(또는 리더(leader)) 폴리펩티드들, 예를 들면, 효모 알파-인자 리더(yeast alpha-factor leader) 또는 에피토프 태그(epitope tag) 등과 같은 펩티드가 될 수 있다. 항원 결합 단백질-함유 융합 단백질들은 항원 결합 단백질의 정제 또는 동정을 용이하게 하도록 하기 위하여 첨가되는 펩티드들을 포함할 수 있다(예를 들면, poly-His). 항원 결합 단백질은 또한 호프(Hopp)와 그의 동료들의 Bio/Technology 6:1204, 1988 및 미합중국 특허 제5,011,912호에 기술된 바와 같이 FLAG 펩티드에 연결될 수 있다. 상기 FLAG 펩티드는 고도로 항원성(antigenic)이며, 특정의 모노클로날 항체(mAb)에 의해 가열적으로 결합하는 에피토프를 제공하여 신속한 분석 및 발현된 재조합 단백질의 정제를 용이하게 하는 것을 가능하게 한다. 상기 FLAG 펩티드가 주어진 폴리펩티드에 융합되는 융합 단백질들의 제조에 유용한 시약들은 상용적으로 획득가능하다(미합중국 미주리주 세인트루이스 소재의 시그마(Sigma)).

[0202] 하나 또는 그 이상의 항원 결합 단백질들을 포함하는 올리고머들은 TSLP 길항제들로서 사용될 수 있다. 올리고머들은 공유적으로 연결되거나 또는 비-공유적으로 연결된 이량체들, 삼량체들 또는 그 이상의 올리고머들의 형태가 될 수 있다. 2 또는 그 이상의 항원 결합 단백질들을 포함하는 올리고머들이 동형이량체(homodimer)의 하나의 구체예로 사용되는 것이 고려된다. 다른 올리고머들에는 이형이량체(heterodimers), 동형삼량체(homotrimer), 이형삼량체(heterotrimer), 동형사량체(homotetramer), 이형사량체(heterotetramer) 등이 포함된다.

[0203] 하나의 구체예가 항원 결합 단백질들에 융합된 펩티드 부분(peptide moieties)들 사이에서 공유적 또는 비-공유적 상호작용들을 통하여 결합되는 다중의 항원 결합 단백질들을 포함하는 올리고머들로 지향된다. 이러한 펩티드들은 펩티드 링커(스페이서(spacers)) 또는 올리고머화(oligomerization)를 촉진하는 특성을 갖는 펩티드들이 될 수 있다. 이하에서 보다 상세하게 기술되는 바와 같이 그에 부착되는 항원 결합 단백질들의 올리고머화를 촉진할 수 있는 펩티드들 중에서도 류신 지퍼(leucine zippers)들 및 항체들로부터 유도되는 특성의 폴리펩티드들이 있다.

[0204] 특성의 구체예들에 있어서, 상기 올리고머들은 TSLP에 결합될 수 있는 2 내지 4개의 항원 결합 단백질들을 포함한다. 상기 올리고머들의 상기 항원 결합 단백질들은 앞서 기술된 형태들 중의 임의의 것, 예를 들면 변종들 또는 단편들 등과 같은 임의의 형태가 될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 올리고머는 면역글로불린들로부터 유도되는 폴리펩티드들을 사용하여 제조된다. 항체-유도 폴리펩티드들의 여러 부분들에 융합되는 특성의 이중기원의 폴리펩티드들을 포함하는 융합 단백질들의 제조가 예를 들면 애쉬케나지(Ashkenazi)와 그의 동료들의 1991, PNAS USA 88: 10535; 바이른(Byrn)과 그의 동료들의 1990, Nature 344:677; 및 홀렌바우(Hollenbaugh)와 그의 동료들의 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, 10.19.1-10.19.11페이지에 기술되어 있다.

[0205] 본 발명의 하나의 구체예는 항체의 Fc 영역에의 항-TSLP 항체의 단편의 융합에 의하여 생성되는 2개의 융합 단백질들을 포함하는 이량체로 지향된다. 상기 이량체들은, 예를 들면, 융합 단백질(fusion protein)을 인코딩하는 융합 유전자(gene fusion)를 적절한 발현 벡터(expression vector) 내로 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질 전환된 숙주세포들 내에서 상기 융합 유전자를 발현시키고, 그리고 발현된 융합 단백질이 항체 분자들과 더 유사하게 조립되도록 허용하며, 그에 의하여 상기 Fc 부분들 사이에서 쇠간의 이황화결합(interchain disulfide bonds)을 형성하여 상기 이량체를 수득하도록 하는 것에 의하여 만들어질 수 있다.

[0206] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "Fc 폴리펩티드"에는 항체의 상기 Fc 영역으로부터 유도되는 자연적인 그리고 돌연변이 단백질 형태들이 포함된다. 이량체화(dimerization)를 촉진하는 상기 힌지영역을 포함하는 이러한 폴리펩티드들의 끝이 절단된 형태들(truncated forms)이 또한 포함된다. Fc 부분들을 포함하는 융합 단백질들(및 그들로부터 형성되는 올리고머들)은 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼 상에서의 친화도 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의한 용이한 정제의 잇점을 제공한다.

[0207] 특허협력조약 공개특허 제W093/10151호(본 명세서에서 참조로 인용됨)에서 기술된 하나의 적절한 Fc 폴리펩티드는 인간 IgG1 항체의 상기 Fc 영역의 N-말단의 힌지영역으로부터 자연의 C-말단까지 연장되는 단일쇄 폴리펩티드이다. 다른 유용한 Fc 폴리펩티드는 미합중국 특허 제5,457,035호 및 바움(Baum)과 그의 동료들의 1994, EMBO J. 13:3992-4001에서 기술된 Fc 돌연변이 단백질이다. 이 돌연변이 단백질의 아미노산 시퀀스는 아미노산 19가 Leu에서 Ala로 변화되고 그리고 아미노산 20이 Leu에서 Glu로 변화되고 그리고 아미노산 22가 Gly가 Ala로 변화되는 것을 제외하고는 특허협력조약 공개특허 제W093/10151호에서 제공되는 자연의 Fc 시퀀스의 아미노산 시퀀스와 동일하다. 상기 돌연변이 단백질은 Fc 수용체들에 대하여 감소된 친화성을 나타낸다.

- [0208] 다른 구체예들에 있어서, 항-TSLP의 중쇄 및/또는 경쇄의 가변부(variable portion)는 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 가변부로 치환될 수 있다.
- [0209] 달리, 상기 올리고머는 펩티드 링커(스페이서 펩티드)들을 갖거나 또는 갖지 않는 다중의 항원 결합 단백질들을 포함하는 융합 단백질이다. 적절한 펩티드 링커들 중에서는 미합중국 특허 제4,751,180호 및 동 제4,935,233호들에서 기술된 것들이다.
- [0210] 올리고머성 항원 결합 단백질들을 제조하기 위한 다른 방법들에는 류신 지퍼의 사용이 포함된다. 류신 지퍼 도메인들은 이들이 발견되는 단백질들의 올리고머화를 촉진하는 펩티드들이다. 류신 지퍼들은 원래 여러 DNA-결합 단백질들 내에서 동정되었으며(랜드슐츠(Landschulz)와 그의 동료들의 1988, Science 240:1759), 그 후에 다양한 서로 다른 단백질들 내에서 발견되었다. 공지된 류신 지퍼들 중에는 이량체화 또는 삼량체화하는 자연적으로 발생하는 펩티드들 및 이들의 유도체들이다. 가용성의 올리고머성 단백질들을 제조하는 적절한 류신 지퍼 도메인들의 예들은 특허협력조약 공개특허 제W094/10308호에서 기술되어 있으며, 페의 표면활성단백 D(SPD ; surfactant protein D)는 호페(Hoppe)와 그의 동료들의 1994, FEBS Letters 344:191에 기술되어 있으며, 이들은 여기에 참조로 인용되었다. 그에 융합되는 이중기원의 단백질의 안정한 삼량체화를 허용하는 변형된 류신 지퍼의 사용이 팬슬로우(Fanslow)와 그의 동료들의 1994, Semin. Immunol. 6:267-78에 기술되어 있다. 하나의 접근법에 있어서, 류신 지퍼 펩티드에 융합되는 항-TSLP 항체 단편 또는 유도체들을 포함하는 재조합 융합 단백질들이 적절한 숙주세포들 내에서 발현되며, 형성되는 상기 가용성의 올리고머성 항-TSLP 항체 단편들 또는 유도체들이 배양 상청액(culture supernatant)로부터 회수된다.
- [0211] 본 명세서에서 기술되는 바와 같이, 항체들은 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 CDR들이 공지된 항체 골격영역들(IgG1, IgG2 등) 내로 내포되거나 또는 적절한 비히클(vehicle)에 콘주게이트되어 그들의 반감기를 강화시킨다. 적절한 비히클들에는 Fc, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 알부민, 트랜스페린(transferrin) 등이 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 이들 및 다른 적절한 비히클들이 당해 기술분야에서 공지되어 있다. 이러한 콘주게이트된 CDR 펩티드들은 단량체성, 이량체성, 삼량체성 또는 다른 형태가 될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 하나 또는 그 이상의 수용성의 폴리머가 하나 또는 그 이상의 특정의 위치, 예를 들면, 결합체의 아미노 말단에서 결합된다.
- [0212] 특정의 바람직한 구체예들에 있어서, 항체는 폴리에틸렌글리콜, 폴리옥시에틸렌글리콜 또는 폴리프로필렌글리콜 등을 포함하나 이들에 제한되지는 않는 하나 또는 그 이상의 수용성 중합체 부착물(attachments)들을 포함한다. 예를 들면, 미합중국 특허 제4,640,835호, 동 제4,496,689호, 동 제4,301,144호, 동 제4,670,417호, 동 제4,791,192호 및 동 제4,179,337호들을 참조하시오. 특정의 구체예들에 있어서, 유도결합제(derivative binding agent)에는 하나 또는 그 이상의 모노메톡시-폴리에틸렌글리콜(monomethoxy-polyethylene glycol), 덱스트란(dextran), 셀룰로오스(cellulose), 또는 다른 탄수화물 기반 중합체들, 폴리-(N-비닐피롤리돈)-폴리에틸렌글리콜(poly-(N-vinylpyrrolidone)-polyethylene glycol), 프로필렌글리콜 호모중합체(propylene glycol homopolymers), 폴리프로필렌옥사이드/에틸렌옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(polyoxyethylated polyols ; 예를 들면, 글리세롤(glycerol)) 및 폴리비닐알코올들 및 마찬가지로 이러한 중합체들의 혼합물들이 포함된다. 특정의 구체예들에 있어서, 하나 또는 그 이상의 수용성 중합체는 하나 또는 그 이상의 측쇄들에 불규칙하게 부착된다. 특정의 구체예들에 있어서, PEG(폴리에틸렌글리콜)는 항체 등과 같은 결합체에 대한 치료적 용량(therapeutic capacity)을 개선시키는 작용을 할 수 있다. 특정의 이러한 방법들은, 예를 들면, 미합중국 특허 제6,133,426호에서 논의되어 있으며, 본 명세서에는 임의의 목적에 대하여 참조로 인용한다. 항체가 결합 특이성을 보유하는 경우, 본 발명의 항체가 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 가질 수 있음은 이해될 수 있을 것이다. 따라서, 항체 구조들의 변형들은 본 발명의 범주 내에 속한다. 이들에는 아미노산 치환이 포함될 수 있으며, 이는 항체의 인간 TSLP 결합 능력을 파괴하지 않는 보존적 또는 비-보존적 치환이 될 수 있다. 보존적 아미노산 치환들은 비-자연적으로 발생하는 아미노산 잔기들을 포함할 수 있으며, 이들은 전형적으로는 생물체들에 의해서라기 보다는 화학적 펩티드 합성에 의해 내포된다. 이들에는 펩티도미메틱(peptidomimetics) 및 다른 아미노산 부분들의 보존되거나 또는 역전된 형태들이 포함된다. 보존적 아미노산 치환은 또한 그 위치에서의 아미노산 잔기의 극성 또는 전하에 대하여 영향이 거의 없거나 또는 전혀 없도록 하여 자연적인 아미노산 잔기의 규범적인 잔기로의 치환이 포함될 수 있다.
- [0213] 비-보존적 치환들에는 아미노산들 또는 아미노산 모방체(mimetics)들의 하나의 클래스의 멤버의 다른 물리적인 특성들(예를 들면, 크기, 극성, 소수성, 전하)을 갖는 다른 클래스의 멤버로의 교환이 포함될 수 있다. 이러한 치환된 잔기들은 비-인간 항체들과 동종인 인간 항체의 영역들 내로 또는 상기 분자의 비-동종의 영역들 내로

도입될 수 있다.

- [0214] 더욱이, 당해 기술분야에서 숙련된 자는 각 원하는 아미노산 잔기에서의 단일의 아미노산 치환을 포함하는 시험 변종들을 생성시킬 수 있을 것이다. 계속해서 상기 변종들은 당해 기술분야에서 숙련된 자들에게 공지된 활성 분석법(activity assays)을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 이러한 변종들은 적절한 변종들에 대한 정보를 수집하는 데 사용될 수 있다. 예를 들면, 특정의 아미노산 잔기에 대한 변화가 파괴되거나, 원치않게 감소되거나(reduced) 또는 부적절하게 활성이거나 하는 결과를 가져온다는 것을 발견하는 경우, 이러한 변화를 갖는 변종들은 피할 수 있다. 환언하면, 이러한 통상적인 실험들로부터 수집된 정보에 기초하여, 당해 기술분야에서 숙련된 자는 단독으로 또는 다른 돌연변이들과 함께 그 이상의 치환들이 회피되어야 하는 아미노산들을 쉽게 결정할 수 있을 것이다.
- [0215] 숙련된 기술자는 공지의 기술들을 사용하여 본 명세서에서 규정된 바에 따른 폴리펩티드의 적절한 변종들을 결정할 수 있을 것이다. 특정의 구체예들에 있어서, 당해 기술분야에서 숙련된 자는 활성에 대해 중요한 것으로 여겨지지 않는 영역들을 표적으로 하는 것에 의하여 활성을 파괴함이 없이 변화될 수 있는 분자의 적절한 영역들을 동정할 수 있을 것이다. 특정의 구체예들에 있어서, 유사한 폴리펩티드들 중에서 보존되는 분자들의 잔기들 및 부분들을 동정할 수 있을 것이다. 특정의 구체예들에 있어서, 심지어 생물학적 활성에 대하여 또는 구조에 대하여 중요한 것일 수 있는 영역들이 상기 생물학적 활성을 파괴함이 없이 또는 폴리펩티드 구조에 역으로 영향을 끼침이 없이 보존적 아미노산 치환들에 적용시킬 수 있을 것이다.
- [0216] 게다가, 당해 기술분야에서 숙련된 자는 활성 또는 구조에 중요한 유사한 폴리펩티드들 내의 잔기들을 동정하는 구조-기능 연구들을 검토할 수 있을 것이다. 이러한 비교의 관점에 있어서, 유사한 단백질들 내에서 활성 또는 구조에 대하여 중요한 아미노산 잔기들에 대응하는 단백질 내의 아미노산 잔기들의 중요성을 예측할 수 있을 것이다. 당해 기술분야에서 숙련된 자들은 이러한 예측된 중요한 아미노산 잔기들에 대하여 화학적으로 유사한 아미노산 치환들을 선택할 수 있을 것이다. 당해 기술분야에서 숙련된 자는 또한 유사한 폴리펩티드들에서의 구조에 관한 3차원의 구조 및 아미노산 시퀀스를 분석할 수 있을 것이다. 이러한 정보의 관점에 있어서, 당해 기술분야에서 숙련된 자는 그의 3차원 구조에 대한 항체의 아미노산 잔기들의 배열(alignment)을 예측할 수 있을 것이다. 특정의 구체예들에 있어서, 당해 기술분야에서 숙련된 자는 단백질의 표면 상에 존재할 것으로 예측되는 잔기들이 다른 분자들에 대한 중요한 상호작용들에 포함될 수 있기 때문에 이러한 잔기들에 대하여 급격한 변화들이 이루어지지 않도록 선택할 수 있을 것이다.
- [0217] 2차구조의 예상에 관한 다수의 과학출판물들이 있다. 모울트(Moult J.)의 Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427(1996); 추와 그의 동료들의 Biochemistry, 13(2):222-245(1974); 추와 그의 동료들의 Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); 추와 그의 동료들의 Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148(1978); 추와 그의 동료들의 Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 및 추와 그의 동료들의 Biophys. J., 26:367-384(1979)들을 참조하시오. 더욱이, 2차구조를 예견하는 것에 대해 보조하는 컴퓨터 프로그램들이 현재 획득가능하다. 2차구조를 예상하는 하나의 방법은 동종성 모델화(homology modeling)에 기초하는 것이다. 예를 들면, 30% 이상의 시퀀스 동일성, 또는 40% 이상의 유사성을 갖는 2개의 폴리펩티드들 또는 단백질들은 유사한 구조적 위상학(structural topologies)들을 가질 수 있다. 단백질구조데이터베이스(protein structural database ; PDB)의 최근의 성장은 폴리펩티드들 또는 단백질들의 구조 내의 꺾(folds)들의 잠재적인 수를 포함하여 2차구조의 증가된 예견성을 제공한다. 홀름과 그의 동료들의 Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247(1999)를 참조하시오. 주어진 폴리펩티드 또는 단백질 내에 제한된 수의 꺾들이 존재하고 그리고 일단 구조들의 절대값(critical number)이 해결되면 구조적인 예상이 극적으로 보다 정확해질 수 있다는 것이 제안되었다(브레너(Brenner)와 그의 동료들의 Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376(1997)).
- [0218] 2차구조를 예상하는 별도의 방법들에는 "스레딩(threading)"(존스(Jones, D)의 Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87(1997); 시플(Sippl)과 그의 동료들의 Structure, 4(1):15-19(1996)), "프로파일 분석(profile analysis)" (보위(Bowie)와 그의 동료들의 Science, 253:164-170(1991); 그립스코프(Gribskov)와 그의 동료들의 Meth. Enzym., 183:146-159(1990); 그립스코프와 그의 동료들의 Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358(1987)), 및 "혁신적 연결(evolutionary linkage)" (홀름의 위의 문헌(1999) 및 브랜너의 위의 문헌(1997)들을 참조)들이 포함된다.
- [0219] 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 항체들과 같은 일부 단백질들이 다양한 전사후 변형(post-translational modifications)들을 수행할 수 있다는 것은 이해될 수 있는 것이다. 이들 변형들의 형태 및 정도는 종종 상기 단백질을 발현하는 데 사용되는 숙주세포주(host cell line) 및 마찬가지로 배양조건들에 의존적이다. 이러한

변형들에는 글리코실화(glycosylation)에서의 변이(variations)들, 메티오닌 산화(methionine oxidation), 디케토피페리진 형성(diketopiperazine formation), 아스파르트산염 이성체화(aspartate isomerization) 및 아스파라긴 디아미드화(asparagine deamidation)들이 포함될 수 있다. 빈번한 변형은 카르복시펩티다아제(carboxypeptidases)들의 작용으로 인한 카르복시-말단 염기성 잔기(리신 또는 아르기닌 등과 같은)의 손실로 이어진다(해리스(Harris, R.)의 J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995에서 기술된 바와 같음).

[0220] 특정의 구체예들에 있어서, 항체들의 변종들에는 글리코실화 변종들이 포함되며, 여기에서 글리코실화 사이트(glycosylation site)의 개수 및/또는 형태는 부모 폴리펩티드의 아미노산 시퀀스들과 비교하여 변형되었다. 특정의 구체예들에 있어서, 변종들은 자연의 단백질에 비해 보다 많거나 또는 보다 적은 수의 N-연결된 글리코실화 사이트들을 포함한다. 달리, 이 시퀀스를 제거하는 치환들은 현존하는 N-연결된 탄수화물쇄를 제거할 것이다. 또한 N-연결된 탄수화물쇄들의 재배열(rearrangement)이 제공되며, 여기에서 하나 또는 그 이상의 N-연결된 글리코실화 사이트(전형적으로는 자연적으로 발생하는 것들)들이 제거되고 그리고 하나 또는 그 이상의 새로운 N-연결된 사이트들이 생성된다. 별도의 바람직한 항체 변종들에는 시스테인 변종들이 포함되며, 여기에서 부모 아미노산 시퀀스와 비교하여 하나 또는 그 이상의 시스테인 잔기들이 제거되거나 또는 다른 아미노산(예를 들면, 세린)으로 치환된다. 시스테인 변종들은 불용성의 봉입체(inclusion bodies)들의 단리 후 등과 같이 항체들이 생물학적으로 활성인 형태로 재중첩(refold)되어야 하는 경우에 유용할 수 있다.

[0221] 시스테인 변종들은 대체로 본래의 단백질에 비해 보다 적은 시스테인 잔기들을 가지며, 전형적으로는 짝수를 가져 짝지워지지 않은 시스테인들로부터의 상호작용을 최소화한다.

[0222] 소정의 아미노산 치환들(보존적이거나 또는 비-보존적이거나 간에)은 이러한 치환들이 희망되는 때에 당해 기술 분야에서 숙련된 자에 의해 결정될 수 있을 것이다. 특정의 구체예들에 있어서, 아미노산 치환들은 인간 TSLP에 대한 항체들의 중요한 잔기들을 동정하거나 또는 본 명세서에서 기술된 인간 TSLP에 대한 항체들의 친화성을 증가시키거나 감소시키는 데 사용될 수 있다.

[0223] 특정의 구체예들에 따르면, 바람직한 아미노산 치환들은 (1) 단백질 가수분해(proteolysis)에 대한 감수성을 감소, (2) 산화에 대한 감수성을 감소, (3) 단백질 착체(protein complexes)들의 형성에 대한 결합 친화도를 변경, (4) 결합 친화성을 변경 및/또는 (4) 이러한 폴리펩티드들에 대한 다른 물리화학적(physiochemical) 또는 기능적인 특성들을 부여 또는 변형시키는 것이다. 특정의 구체예들에 따르면, 단일 또는 다중의 아미노산 치환들(특정의 구체예들에 있어서는, 보존적 아미노산 치환들)이 자연적으로 발생하는 시퀀스 내에서(특정의 구체예들에 있어서는, 분자간 접촉(intermolecular contacts)들을 형성하는 상기 도메인(들)의 외측의 폴리펩티드의 부분 내에서) 이루어질 수 있다. 특정의 구체예들에 있어서, 보존적 아미노산 치환은 전형적으로는 부모 시퀀스의 구조적인 특성들을 실질적으로 변화시키지 않을 수 있다(예를 들면, 대체 아미노산(replacement amino acid)은 부모 시퀀스에서 발생하는 나선(helix)을 파괴하지 않거나 또는 부모 시퀀스를 특징하는 2차구조의 다른 형태들을 파괴하지 않는 경향이 있다). 당해 기술분야에서 인식된 폴리펩티드 2차 및 3차구조들의 예들은 Proteins, Structures and Molecular Principles(크레이튼(Creighton), 편저., W. H. Freeman and Company, New York(1984)); Introduction to Protein Structure (씨. 브랜든(C. Branden)과 제이. 투즈(J. Tooze) 편저, Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 및 쏜튼(Thornton)과 그의 동료들의 Nature 354:105(1991)들에 기술되어 있으며, 이들은 각각 본 명세서에서 참조로 인용되었다.

[0224] 특정의 구체예들에 있어서, 본 발명의 항체들은 중합체, 지질 또는 다른 부분들에 화학적으로 결합될 수 있다.

[0225] 게다가, 상기 항원 결합 단백질들은 생체적합성 골격 구조(biocompatible framework structure) 내로 내포되는 본 명세서에서 기술되는 CDRs들 중의 적어도 하나를 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 생체적합성 골격 구조에는 형태학적으로 안정한 구조적인 지지체(support) 또는 골격 또는 스캐폴드(scaffold)들을 형성하기에 충분한 폴리펩티드 또는 그의 부분들이 포함되며, 이는 편재화된 표면 영역(localized surface region) 내의 항원(예를 들면, CDRs들, 가변영역 등)에 결합하는 하나 또는 그 이상의 아미노산들의 시퀀스들을 나타낼 수 있다. 이러한 구조들은 자연적으로 발생하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 "중첩"(구조적인 모티프)이 될 수 있거나 또는 자연적으로 발생하는 폴리펩티드 또는 중첩에 대하여 아미노산들의 부가, 결실 또는 치환 등과 같은 하나 또는 그 이상의 변형들을 가질 수 있다. 이들 스캐폴드들은 인간, 다른 포유동물, 다른 척추동물, 무척추동물, 식물, 박테리아 또는 바이러스 등과 같은 임의의 종들의(또는 하나 이상의 종들의) 폴리펩티드로부터 유도될 수 있다.

[0226] 전형적으로 상기 생체적합성 골격 구조들은 면역글로블린 도메인들 이외의 단백질 스캐폴드들 또는 뼈대(skeletons)들에 기초한다. 예를 들면, 피브로넥틴(fibronectin), 안키린(ankyrin), 리포칼린(lipocalin), 네

오카지노스타인(neocarzinostatin), 씨토크롬 비(cytochrome b), 씨피1 징크 핑거(CP1 zinc finger), PST1, 코일드코일(coiled coil), LACI-D1, 젯트도메인(Z domain) 및 텐다미스태트 도메인(tendamistat domains)들에 기초하고 있는 것들이 사용될 수 있다(예를 들면, 나이그렌(Nygren)과 울렌(Uhlen)의 1997, Current Opinion in Structural Biology, 7,463-469을 참조하시오).

[0227] 게다가, 다른 구체예에 있어서, 당해 기술분야에서 숙련된 자는 항체가 비-치환된 CDR의 결합 특이성을 보유한 다면 상기 항원 결합 단백질들이 하나의 아미노산 치환을 갖는 하나 또는 그 이상의 중쇄 CDR1, CDR2, CDR3 및/또는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3들을 포함할 수 있다는 것을 인식할 수 있을 것이다. 상기 항체의 상기 비-CDR 부분은 비단백질 분자(nonprotein molecule)가 될 수 있으며, 여기에서 상기 결합체는 본 명세서에서 기술된 항체의 인간 TSLP에의 결합을 교차-차단(cross-blocks) 하거나 및/또는 TSLP 활성을 저해한다. 상기 항체의 비-CDR 부분은 비단백질 분자가 될 수 있으며, 여기에서 상기 항체는 항체들 A1 내지 A27들 중의 적어도 하나에 의해 나타난 바와 같이 경쟁 결합 분석(competition binding assay)에서 인간 TSLP 단백질들에 대하여 유사한 결합 패턴을 나타내거나 및/또는 TSLP의 활성을 중화시킨다. 상기 항체의 비-CDR 부분은 아미노산들로 이루어질 수 있으며, 여기에서 상기 항체는 재조합 결합 단백질 또는 합성 펩티드이고, 그리고 상기 재조합 결합 단백질은 본 명세서에서 기술된 항체의 인간 TSLP에의 결합을 교차-차단하거나 및/또는 시험관 내 또는 생체 내에서 TSLP를 중화한다. 상기 항체의 비-CDR 부분은 아미노산들로 이루어지며, 여기에서 상기 항체는 재조합 항체이고, 그리고 상기 재조합 항체는 항체들 A1 내지 A27들 중의 적어도 하나에 의해 나타난 바와 같이 경쟁 결합 분석에서 인간 TSLP 폴리펩티드들에 대하여 유사한 결합 패턴을 나타내거나 및/또는 TSLP의 활성을 중화시킨다.

[0228] 항원 결합 단백질들, 특히 항체들의 제조방법

[0229] 하나 또는 그 이상의 앞서 기술된 바와 같은 중쇄 CDR1, CDR2, CDR3 및/또는 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 항체 등과 같은 항원 결합 단백질은 이들 시퀀스들을 코딩(coding)하는 DNA를 포함하는 숙주세포로부터의 발현에 의하여 획득될 수 있다. 각 CDR 시퀀스를 코딩하는 DNA는 상기 CDR의 아미노산 시퀀스에 기초하여 결정될 수 있으며, 또한 적절한 것으로서 올리고뉴클레오타이드 합성 기술들, 사이트-지향적인 돌연변이 및 중합효소 연쇄반응(PCR ; polymerase chain reaction) 기술들을 사용하여 임의의 원하는 항체 가변영역 골격 및 불변영역 DNA 시퀀스들과 함께 합성될 수 있다. 가변영역 골격 및 불변영역들에 대한 DNA 코딩은 당해 기술분야에서 숙련된 자에게는 젠뱅크®(GenBank®) 등과 같은 유전자 시퀀스 데이터베이스(genetic sequences databases)들로부터 광범위하게 획득가능하다.

[0230] 별도의 구체예들에는 키메라 항체들, 예를 들면, 비-인간(예를 들면, 쥐와 같은 동물)의 모노클로날 항체들의 인간화된 버전들이 포함된다. 이러한 인간화된 항체들은 공지 기술들에 의해 제공될 수 있으며, 항체들이 인간들에 투여되는 경우에 감소된 면역원성의 잇점을 제공한다. 하나의 구체예에 있어서, 인간화된 모노클로날 항체는 쥐와 같은 동물의 항체의 가변 도메인(또는 그의 항원 결합 사이트의 전부 또는 일부) 및 인간 항체로부터 유도되는 불변 도메인을 포함한다. 달리, 인간화된 항체 단편은 쥐와 같은 동물의 모노클로날 항체의 항원 결합 사이트 및 인간 항체로부터 유도되는 가변 도메인 단편(항원-결합 사이트를 결여)을 포함할 수 있다. 키메라 및 후속의 조작된 모노클로날 항체들의 생산을 위한 절차들에는 라이크만(Riechmann)과 그의 동료들의 1988, Nature 332:323, 류(Liu)와 그의 동료들의 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439, 라릭(Larrick)과 그의 동료들의 1989, Bio/Technology 7:934 및 윈터(Winter)와 그의 동료들의 1993, TIPS 14:139들에 기술된 것들이 포함된다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 키메라 항체는 CDR 분지화된 항체이다. 항체들의 인간화에 대한 기술들은, 예를 들면, 미합중국 특허 제5,869,619호, 동 제5,225,539호, 동 제5,821,337호, 동 제5,859,205호, 동 제6,881,557호, 파드란(Padlan)과 그의 동료들의 1995, FASEB J. 9:133-39 및 타무라(Tamura)와 그의 동료들의 2000, J. Immunol. 164:1432-41들에 기술되어 있다. 인간화된 항체들을 생산하기 위한 부가 기술(addition techniques)들로는 장(Zhang, W.)과 그의 동료들의 Molecular Immunology. 42(12):1445-1451, 2005; 황(Hwang W.)과 그의 동료들의 Methods. 36(1):35-42, 2005; 달라쿠아(Dall'Acqua WF)와 그의 동료들의 Methods 36(1):43-60, 2005; 및 클라크(Clark, M.)의 Immunology Today. 21(8):397-402, 2000)들에서 기술된 것들 같은 것들이 있다.

[0231] 비-인간 동물들 내에서의 인간 또는 부분적으로 인간 항체들을 생성하기 위한 절차들이 개발되었다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 내인성 면역글로블린 유전자들이 여러 수단들에 의해 비활성화된 생쥐들이 준비되었다. 인간 면역글로블린 유전자들은 상기 비활성화된 생쥐 유전자들을 대체하기 위하여 상기 생쥐 내로 도입되었다. 상기 동물 내에서 생산된 항체들은 상기 동물 내로 도입된 인간 유전자 물질(human genetic material)에 의해 인코딩된 인간 면역글로블린 폴리펩티드들을 내포한다. 하나의 구체예에 있어서, 이식유전자를 가진 생쥐(transgenic mouse) 등과 같은 비-인간의 동물은, 예를 들면, 여러 TSLP 폴리펩티드들에 대하여 지향되는 항

체들이 상기 동물 내에서 생산되도록 TSLP 단백질로 면역화된다. 적절한 면역원들의 예들이 이하의 실시예들에서 제공된다.

[0232] 인간 또는 부분적으로 인간 항체들의 생산을 위한 이식유전자를 가진 동물들의 생산 및 사용에 대한 기술들의 예들은 미합중국 특허 제5,814,318호, 동 제5,569,825호 및 동 제5,545,806호, 데이비스(Davis)와 그의 동료들의 2003, *Production of human antibodies from transgenic mice in Lo*, ed. *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Humana Press, NJ: 191-200, 켈레르만(Kellermann)과 그의 동료들의 2002, *Curr Opin Biotechnol.* 13:593-97, 러셀(Russel)과 그의 동료들의 2000, *Infect Immun.* 68: 1820-26, 갈로(Gallo)와 그의 동료들의 2000, *Eur J Immun.* 30:534-40, 데이비스와 그의 동료들의 1999, *Cancer Metastasis Rev.* 18:421-25, 그린(Green)의 1999, *J Immunol Methods.* 231:11-23, 자코보비츠(Jakobovits)의 1998, *Advanced Drug Delivery Reviews* 31:33-42, 그린과 그의 동료들의 1998, *J Exp Med.* 188:483-95, 자코보비츠(Jakobovits A)의 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 7:607-14, 츠다(Tsuda)와 그의 동료들의 1997, *Genomics.* 42:413-21, 멘데즈(Mendez)와 그의 동료들의 1997, *Nat Genet.* 15:146-56, 자코보비츠의 1994, *Curr Biol.* 4:761-63, 아르본스(Arbones)와 그의 동료들의 1994, *Immunity.* 1:247-60, 그린과 그의 동료들의 1994, *Nat Genet.* 7:13-21, 자코보비츠와 그의 동료들의 1993, *Nature.* 362:255-58, 자코보비츠와 그의 동료들의 1993, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2551-55, 첸(Chen, J.), 트라운스타인(M. Trounstein), 알트(F. W. Alt), 영(F. Young), 쿠라하라(C. Kurahara), 로링(J. Loring), 허스짜르(D. Huszar)의 "Immunoglobulin gene rearrangement in B-cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus." *International Immunology* 5(1993):647-656, 최(Choi)와 그의 동료들의 1993, *Nature Genetics* 4:117-23, 피쉬와일드(Fishwild)와 그의 동료들의 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-51, 하딩(Harding)과 그의 동료들의 1995, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 론버그(Lonberg)와 그의 동료들의 1994, *Nature* 368:856-59, 론버그의 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies in Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101, 론버그와 그의 동료들의 1995, *Internal Review of Immunology* 13:65-93, 뉴버거(Neuberger)의 1996, *Nature Biotechnology* 14:826, 테일러(Taylor)와 그의 동료들의 1992, *Nucleic Acids Research* 20:6287-95, 테일러와 그의 동료들의 1994, *International Immunology* 6:579-91, 토미주카(Tomizuka)와 그의 동료들의 1997, *Nature Genetics* 16:133-43, 토미주카와 그의 동료들의 2000, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:722-27, 투와일론(Tuailon)과 그의 동료들의 1993, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:3720-24 및 투와일론과 그의 동료들의 1994, *Journal of Immunology* 152:2912-20들에 기술되어 있다.

[0233] 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은 인간 TSLP에 결합하는 모노클로날 항체들을 제공한다. 모노클로날 항체들은 당해 기술분야에서 공지된 임의의 기술, 예를 들면, 면역화 스케줄(immunization schedule)의 완료 후에 이식유전자를 가진 동물(transgenic animal)로부터 수확된 비장 세포들의 불멸화(immortalizing)에 의하여 생산될 수 있다. 상기 비장 세포들은 당해 기술분야에서 공지된 임의의 기술을 사용하여, 예를 들어, 이들을 골수종 세포(myeloma cells)들과 융합시켜 하이브리도마를 생성하는 것에 의하여 불멸화될 수 있다. 하이브리도마-생성 융합 절차들에서 사용되기 위한 골수종 세포들은 바람직하게는 비-항체-생성이고, 높은 융합 효율을 가지고, 그리고 원하는 융합된 세포(하이브리도마)들의 성장을 뒷받침하는 특성의 선택 매질(media) 내에서의 이들의 성장을 불가능하게 하는 효소 결핍된 것들이다. 생쥐 융합들에서 사용하기에 적절한 세포주들의 예들에는 Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NS0/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 및 S194/5XX0 Bul들이 포함되고; 집쥐 융합들에서 사용되는 세포주들의 예들에는 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210들이 포함된다. 세포 융합들에 사용될 수 있는 다른 세포주들은 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 및 UC729-6들이다.

[0234] 하나의 구체예에 있어서, 동물(예를 들면, 인간 면역글로블린 시퀀스들을 갖는 이식유전자를 가진 동물)을 TSLP 면역원으로 면역화시키고; 상기 면역화된 동물로부터 비장 세포들을 수확하고; 상기 수확된 비장 세포들을 골수종 세포주에 융합시키고, 그에 의하여 하이브리도마 세포들을 생성시키고; 상기 하이브리도마 세포들로부터 하이브리도마 세포주들을 구축하고; 그리고 TSLP 폴리펩티드에 결합하는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 동정하는 것에 의하여 하이브리도마 세포주가 생성된다. 이러한 하이브리도마 세포주들 및 TSLP 모노클로날 항체들이 본 발명에 포함된다.

[0235] 하이브리도마 세포주에 의해 분비되는 모노클로날 항체들은 당해 기술분야에서 공지된 임의의 기술을 사용하여 정제될 수 있다. 하이브리도마들 또는 mAbs들은 더 스크리닝되어 일차 인간 수지상 세포로부터의 오스테오포로테게린(OPG) 생산 등과 같은 TSLP 활성을 차단하는 것 등과 같은 특성의 특성들을 갖는 mAbs를 동정할 수 있다. 이러한 분석법들의 예들이 이하의 실시예들에서 제공된다.

- [0236] 상기 항체 결합 사이트의 중심에서의 상보적 결정 영역들(CDRs)의 분자상 혁명(molecular evolution)은 또한, 예를 들면, 스킨(Schier)와 그의 동료들의 1996, J. Mol. Biol. 263:551에 의해 기술된 바와 같이, 증가된 친화성을 갖는 항체들을 분리하는 데 사용되었다. 따라서, 이러한 기술들이 인간 TSLP에 대한 항체들을 제조하는 데 유용하다.
- [0237] 인간 TSLP에 대해 지향되는 항원 결합 단백질들은 예를 들어 시험관 내 또는 생체 내에서 TSLP의 존재를 검출하기 위한 분석법들에서 사용될 수 있다.
- [0238] 비록 인간, 부분적으로 인간, 또는 인간화된 항체들이 많은 응용예들, 특히 인간 대상체에의 항체의 투여를 포함하는 응용예들에 대하여 적절할 것이기는 하나, 항원 결합 단백질들의 다른 형태들은 특정의 응용예들에 대해 적절할 것이다. 본 발명의 비-인간 항체들, 예를 들면, 생쥐, 집쥐, 토끼, 염소, 당나귀 또는 비-인간의 영장류(예를 들면, 사이노몰거스 또는 레서스 원숭이(rhesus monkey) 또는 유인원(예를 들면, 침팬지) 등과 같은 임의의 항체-생성 동물들로부터 유도될 수 있다. 본 발명의 비-인간의 항체들은, 예를 들면, 시험관 내 세포 배양 및 세포-배양 기반 응용예들, 또는 본 발명의 상기 항체에 대한 면역반응이 일어나지 않거나 또는 불분명하거나, 방지되거나, 문제되지 않거나 또는 소망되는 임의의 다른 응용예에 사용될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 본 발명의 비-인간 항체는 비-인간 대상체에 투여된다. 다른 구체예에 있어서, 상기 비-인간 항체는 상기 비-인간 대상체 내에서 면역반응을 끌어내지 않는다. 또 다른 구체예에 있어서, 상기 비-인간 항체는 상기 비-인간 대상체와 동일한 종들로부터 유래하며, 예를 들면, 본 발명의 생쥐 항체는 생쥐에 투여된다. 특정의 종들로부터의 항체는, 예를 들면, 그 종들의 동물을 원하는 면역원으로 면역화시키거나 또는 그 종들의 항체들을 생성하기 위한 인공적인 시스템(예를 들면, 특정의 종들의 항체들을 생산하기 위한 박테리아 또는 파지 디스플레이-기반의 시스템(phage display-based system)을 사용하는 것에 의하거나, 또는 하나의 종들로부터의 항체를 대체하는 것에 의하여 예를 들어 상기 항체의 불변영역을 다른 종들로부터의 불변영역으로 대체하는 것에 의하여 다른 종들로부터의 항체로 전환시키는 것에 의하거나, 또는 상기 항체의 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들을 대체하여 다른 종들로부터의 항체의 시퀀스에 보다 더 긴밀하게 유사하게 되도록 하는 것에 의하여 제조될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 상기 항체는 둘 또는 그 이상의 다른 종들로부터의 항체들로부터 유도되는 아미노산 시퀀스들을 포함하는 키메라 항체이다.
- [0239] 항원 결합 단백질들은 임의의 수의 통상적인 기술들에 의하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 이들은 이들을 자연적으로 발현하는 세포들로부터 정제되거나(예를 들면, 항체는 이를 생산하는 하이브리도마로부터 정제될 수 있다), 또는 당해 기술분야에서 공지된 임의의 기술을 사용하여 재조합 발현 시스템들 내에서 생산될 수 있다. 예를 들면, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, 케네트(Kennet)와 그의 동료들 (공저), Plenum Press, New York (1980); 및 Antibodies: A Laboratory Manual, 하로우(Harlow)와 랜드(Land) (공저), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)들을 참조하시오.
- [0240] 당해 기술분야에서 공지된 임의의 발현 시스템이 본 발명의 상기 재조합 폴리펩티드들을 제조하는 데 사용될 수 있다. 대체로, 숙주세포들이 원하는 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된다. 사용될 수 있는 숙주세포들 중에는 원핵생물들(prokaryotes), 효모 또는 보다 고등한 진핵세포(eukaryotic cells)들이 있다. 원핵생물들에는 그람 음성 유기체들 또는 그람 양성 유기체들, 예를 들면, 대장균 또는 간균(bacilli)들이 포함된다. 보다 고등한 진핵세포들에는 곤충 세포들 및 포유동물 유래의 구축된 세포주들이 포함된다. 적절한 포유동물 숙주세포주들의 예들에는 원숭이 신장 세포들의 COS-7 라인(ATCC CRL 1651)(글루즈만(Gluzman)과 그의 동료들의 1981, Cell 23:175), L 세포들, 293 세포들, C 127 세포들, 3T3 세포들(ATCC CCL 163), 차이나이스 햄스터 난소(Chinese hamster ovary ; CHO) 세포들, HeLa 세포들, BHK(ATCC CRL 10) 세포주들 및 맥마한(McMahan)과 그의 동료들의 1991, EMBO J. 10:2821에 의해 기술된 바와 같은 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주(African green monkey kidney cell line) CVI(ATCC CCL 70)으로부터 유도되는 CVI/EBNA 세포주들이 포함된다. 박테리아, 곰팡이, 효모 및 포유동물 세포상 숙주들에 대하여 사용하기에 적절한 복제 및 발현 벡터들이 포우웰스(Pouwels)와 그의 동료들(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985)에 의해 기술되었다.
- [0241] 형질전환된 세포들은 상기 폴리펩티드의 발현을 촉진하는 조건들 하에서 배양될 수 있으며, 또한 상기 폴리펩티드는 통상의 단백질 정제 절차들에 의해 회수될 수 있다. 하나의 이러한 정제 절차가 이하의 구체예들에서 기술된다. 본 명세서에서 사용하기 위하여 고려되는 폴리펩티드들에는 실질적으로 내인성의 물질(endogenous materials)들로 오염되지 않은, 실질적으로 동종의 재조합 포유동물 항-TSLP 항체 폴리펩티드들이 포함된다.
- [0242] 항원 결합 단백질들은 임의의 수의 공지된 기술들에 의해 원하는 특성들로 제조되고 그리고 스크리닝될 수

있다. 특정의 상기 기술들에는 대상(예를 들면, TSLP 항체)의 항원 결합 단백질의 폴리펩티드쇄(또는 그 부분)를 인코딩하는 핵산을 단리하는 것과 재조합 DNA 기술을 통하여 상기 핵산을 조작하는 것들이 포함된다. 상기 핵산은 대상의 다른 핵산에 융합되거나 또는 예를 들어 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들의 부가, 결실 또는 치환하도록 변형(예를 들면, 돌연변이 생성 또는 다른 통상적인 기술들에 의하여)될 수 있다.

[0243] 단일쇄 항체들은 단일의 폴리펩티드쇄라는 결과를 야기하는 아미노산 다리(amino acid bridge)(짧은 펩티드 링커(peptide linker))를 통하여 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(Fv 영역) 단편들을 연결하는 것에 의하여 형성될 수 있다. 이러한 단일-쇄 Fvs(scFvs)는 상기 두 가변도메인 폴리펩티드들(V_L 및 V_H)을 인코딩하는 DNA들 사이의 펩티드 링커를 인코딩하는 DNA를 융합하는 것에 의해 제조된다. 그 결과의 폴리펩티드들은 그 자체 상으로 다시 중첩되어 항원-결합 단량체들을 형성하거나 또는 이들은 상기 두 가변 도메인들 사이의 가요성의 링커의 길이에 따라 복합체(multimers ; 예를 들면, 이량체, 삼량체 또는 사량체들)들로 형성될 수 있다(코르트(Kortt)와 그의 동료들의 1997, Prot. Eng. 10:423; 코르트와 그의 동료들의 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). 서로 다른 V_L 및 V_H -함유 폴리펩티드들을 결합하는 것에 의하여, 서로 다른 에피토프들에 결합하는 복합체성 scFvs를 형성할 수 있다(크리앙쿰(Kriangkum)과 그의 동료들의 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). 단일쇄 항체들의 생산을 위하여 개발된 기술들에는 미합중국 특허 제4,946,778호; 버드의 1988, Science 242:423; 허스톤과 그의 동료들의 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879; 와드(Ward)와 그의 동료들의 1989, Nature 334:544, 드 그라아프(de Graaf)와 그의 동료들의 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87들에 기술된 것들이 포함된다. 본 명세서에서 제공되는 항체들로부터 유도되는 단일쇄 항체들에는 본 발명에 의해 포함되는 경쇄 도메인 조합들 L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26 및 L27H27들을 포함하는 scFvs들이 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0244] 일단 합성되면, 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 인코딩하는 상기 DNA는 임의의 수의 공지된 발현 벡터들을 사용하는 핵산 절개(excision), 결찰(ligation), 형질전환(transformation) 및 형질감염(transfection)에 대한 임의의 다양한 공지된 절차들에 따라 전개되고 그리고 발현될 수 있다. 따라서, 특정의 구체예들에 있어서, 항체 단편의 발현은 대장균 등과 같은 원핵 숙주 내에서 선호될 수 있다(예를 들면, 플룩트훈(Pluckthun)과 그의 동료들의 1989 Methods Enzymol. 178:497-515를 참조하십시오). 특정의 다른 구체예들에 있어서, 상기 항체 또는 그의 단편의 발현은 효모(예를 들면, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 슈츠사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)), 동물 세포들(포유동물 세포들을 포함) 또는 식물 세포들 내에서 선호될 수 있다. 적절한 동물 세포들의 예들에는 골수종(myeloma ; 생쥐 NSO 세포주 등과 같은), COS, CHO 또는 하이브리도마 세포들이 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 식물 세포들의 예들에는 담배(tobacco), 옥수수(corn), 대두(soybean) 및 쌀(rice)의 세포들이 포함된다. 항체 가변영역 및/또는 불변영역을 인코딩하는 DNA를 포함하는 하나 또는 그 이상의 대체가능한 발현벡터들이 제조되고 그리고 예를 들어 생쥐 NSO 세포주 등과 같은 비-생산 골수종 세포주 또는 대장균(*E. coli*) 등과 같은 박테리아 등과 같은 적절한 세포주로 형질전환될 수 있으며, 여기에서 상기 항체의 생산이 일어날 수 있다. 효율적인 전사 및 번역을 얻기 위하여, 각 벡터 내의 상기 DNA 시퀀스는 적절한 조절시퀀스들, 특히 상기 가변도메인 시퀀스에 작동가능하게 연결되는 프로모터(promoter)와 선도시퀀스(leader sequence)를 포함하여야 한다. 이러한 방법으로 항체들을 생산하는 특별정의 방법들은 대체로 공지되어 있으며 통상적으로 사용된다. 예를 들면, 기본적인 분자생물학 절차들이 마니아티스(Maniatis)와 그의 동료들(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; 또한 마니아티스와 그의 동료들의 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001)을 참조하십시오)에 의해 기술되었다. DNA 시퀀싱(DNA sequencing)은 생거(Sanger)와 그의 동료들의 PNAS 74:5463, (1977) 및 Amersham International pic sequencing handbook에서 기술된 바와 같이 수행될 수 있으며, 사이트 지향 돌연변이생성은 당해 기술분야에서 공지된 방법들에 따라 수행될 수 있다(크라머(Kramer)와 그의 동료들의 Nucleic Acids Res. 12:9441, (1984); 쿤켈(Kunkel)의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-92 (1985); 쿤켈과 그의 동료들의 Methods in Enzymol. 154:367-82 (1987); the Anglian Biotechnology Ltd. handbook). 게다가, 여러 공보들이 DNA의 조작, 발현벡터들의 분비 및 적절한 세포들의 형질전환과 배양에 의한 항체들의 제조에 적절한 기술들을 기술하고 있다(마운틴(Mountain A)과 아데어(Adair)의 J R in Biotechnology and Genetic Engineering Reviews (ed. Tombs, M P, 10, Chapter 1, 1992, Intercept, Andover, UK); "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F.M. Ausubel (ed.), Wiley Interscience, New York).

[0245] 하나 또는 그 이상의 앞서 언급된 CDRs들을 포함하는 본 발명에 따른 항체들의 친화성을 증강시키는 것이 요구

되는 경우에, 상기 CDRs들의 유지(양(Yang)과 그의 동료들의 J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), 체인셔플링(chain shuffling ; 마크스(Marks)와 그의 동료들의 Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), 대장균의 돌연변이 스트레인들의 사용(로우(Low)와 그의 동료들의 J. Mol. Biol., 250, 350-368, 1996), DNA셔플링(파텐(Patten)과 그의 동료들의 Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), 파지 디스플레이(phage display ; 톰슨(Thompson)과 그의 동료들의 J. Mol. Biol., 256, 7-88, 1996) 및 중합효소 연쇄반응(크라메리(Cramer)와 그의 동료들의 Nature, 391,288-291, 1998)들을 포함하여 다수의 친화성 성숙 프로토콜(affinity maturation protocols)들이 수득될 수 있다. 친화성 성숙의 이들 방법들 모두는 바우한(Vaughan)과 그의 동료들(Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998)에 의해 논의되었다.

[0246] 본 발명에 따른 다른 항체들은 본 명세서에서 기술되고 그리고 당해 기술분야에서 공지된 통상적인 면역화 및 세포 융합 절차들에 의해 수득될 수 있다. 본 발명의 모노클로날 항체들은 다양한 공지 기술들을 사용하여 생성될 수 있다. 대체로, 특정의 항원들에 결합하는 모노클로날 항체들은 당해 기술분야에서 숙련된 자들에게 공지된 방법들에 의하여 수득될 수 있다(예를 들면, 콜러와 그의 동료들의 Nature 256:495, 1975; 콜리간(Coligan)과 그의 동료들(편저)의 Current Protocols in Immunology, 1:2.5.12.6.7(John Wiley & Sons 1991); 미합중국 특허 제RE 32,011호, 동 제4,902,614호, 동 제4,543,439호 및 동 제4,411,993호; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, 케넬트(Kennett), 맥키어른(McKearn) 및 베크톨(Bechtol) (편저) (1980); 그리고 Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); 픽슬리(Picksley)와 그의 동료들, "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al. (eds.), 93페이지 (Oxford University Press 1995)들을 참조하시오). 항체 단편들은 단백질가수분해 등과 같은 임의의 적절한 표준 기술들을 사용하거나 또는 선택적으로 이황화결합들의 완전한 환원 및 알킬화가 뒤따르는(후속하는) 단백질 가수분해 소화에 의하여 항체들로부터 유도될 수 있다. 달리, 이러한 단편들은 또한 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 재조합 유전자 조작 기술들에 의해 생성될 수 있다.

[0247] 모노클로날 항체들은 당해 기술분야에서 공지되고 그리고 본 명세서에서 기술된 바에 따라 동물, 예를 들면, 예를 들어 당해 기술분야에서 공지된 것과 같은 유전자 이식된 생쥐(transgenic mouse) 또는 녹아웃 생쥐(knock-out mouse)를 포함하여 집쥐, 햄스터, 토끼 또는 바람직하게는 생쥐에 SEQ ID NO: 2의 인간 TSLP, 본 명세서에서 기술되는 것과 같은 다른 TSLP 폴리펩티드 시퀀스들 또는 그들의 단편을 주사하는 것에 의하여 수득될 수 있다. 특정의 항체 생산의 존재는 초기 접종(initial injection) 후 및/또는 보강 접종(booster injection) 후에 혈청 샘플을 수득하고 그리고 당해 기술분야에서 공지되고 그리고 본 명세서에서에서 기술되는 여러 면역검출방법들(immunodetection methods) 중의 임의의 하나를 이용하여 인간 TSLP에 결합하는 항체 또는 그의 단편의 존재를 검출하는 것에 의해 감지될 수 있다. 소정의 항체들을 생성하는 동물들로부터, 비장(spleen) 또는 림프절(lymph node)로부터 가장 흔한 세포들인 림프성의 세포들(lymphoid cells)이 제거되어 B-림프세포(B-lymphocytes)들이 수득된다. 계속해서 상기 B-림프세포들은 약물-감수성의 골수종 세포 융합 파트너(drug-sensitized myeloma cell fusion partner), 바람직하게는 상기 면역화된 동물과 동질유전자(syngenic)이고 그리고 선택적으로 다른 원하는 특성들(예를 들면, 내인성의 Ig 유전자 생성물들 예를 들어 P3X63-Ag8.653(ATCC No. CRL 1580); NS0, SP20)을 발현하는 것이 불능임을 갖는 것에 융합되어 하이브리도마들을 생성하며, 이들은 불멸의 진행세포주들이다.

[0248] 상기 림프성(예를 들면, 비장) 세포들 및 상기 골수종 세포들은 폴리에틸렌글리콜 또는 비이온성의 세제 등과 같은 막융합-촉진제(membrane fusion-promoting agent)로 수 분 동안에 결합되고 그리고 계속해서 하이브리도마 세포들의 성장을 지지하기는 하나 융합되지 않은 골수종 세포들의 성장은 지지하지 않는 선택배지(selective medium) 상에서 낮은 밀도로 플레이팅 될 수 있다. 바람직한 선택배지는 HAT(하이포크산틴(hypoxanthine), 아미노프테린(aminopterin), 티미딘(thymidine))이다. 충분한 시간 이후, 대개 약 2주 후, 세포들의 콜로니들이 관측되었다. 단일의 콜로니들을 분리해내고, 그리고 상기 세포들에 의해 생성된 항체들을 당해 기술분야에서 공지되고 그리고 본 명세서에서 기술된 다양한 면역분석법들 중의 임의의 하나를 사용하여 인간 TSLP에 대한 결합 활성에 대하여 시험하였다. 상기 하이브리도마들을 복제하고(예를 들면, 제한희석복제(limited dilution cloning)에 의하여거나 또는 연한천 플라크 단리(soft agar plaque isolation)에 의하여) 그리고 인간 TSLP에 특이적인 항체를 생산하는 양성 클론(positive clones)들을 선택하고 그리고 배양하였다. 상기 하이브리도마 배양물들로부터의 상기 모노클로날 항체들이 하이브리도마 배양물들의 상청액들로부터 분리될 수 있다.

[0249] 쥐의 동물의 모노클로날 항체의 생산을 위한 대안의 방법은 상기 하이브리도마 세포들을 동질유전자의 생쥐,

예를 들면, 상기 모노클로날 항체를 포함하는 복수(ascites fluid)의 형성을 촉진하도록 처치된(예를 들면, 프리스탄-프라이밍(pristane-primed)된) 생쥐의 복강(peritoneal cavity) 내로 주사하는 것이다. 모노클로날 항체들은 다양한 잘-구축된 기술들에 의해 분리되고 그리고 정제될 수 있다. 이러한 분리 기술들에는 단백질-A 세파로스(Protein-A Sepharose)를 갖는 친화도 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 및 이온교환 크로마토그래피들이 포함된다(예를 들면, 콜리건의 위의 문헌 2.7.1-2.7.12 페이지들 및 2.9.1-2.9.3 페이지들; 베인스(Baines)와 그의 동료들의 "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, 79-104페이지 (The Humana Press, Inc. 1992)를 참조하시오). 모노클로날 항체들은 상기 항체의 특성의 특성(예를 들면, 중쇄 또는 경쇄 아이소타입, 결합 특이성 등)들에 기초하여 선택되는 적절한 리간드를 사용하는 친화도 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 고체 지지체(solid support) 상에 부동태화(immobilized)된 적절한 리간드의 예들에는 단백질 A, 단백질 G, 항불변영역(anticonstant region) (중쇄 또는 경쇄) 항체, 항-이디오형(anti-idiotypic) 항체 및 TSLP 또는 이들의 단편이나 변종들이 포함된다.

[0250] 본 발명의 항체는 또한 완전한 인간 모노클로날 항체가 될 수 있다. 완전한 인간 모노클로날 항체들은 앞서 이미 기술된 것들과 같은 다수의 기술들에 의해 생성될 수 있다. 이러한 방법들에는 인간 말초혈액세포들(예를 들면, B 림프구들을 포함하는)의 엡스타인 바 바이러스(EBV ; Epstein Barr Virus) 형질전환, 인간 B-세포들의 시험관 내 면역화, 삽입된 인간 면역글로블린 유전자들을 수반하는 면역화된, 유전자이식된 생쥐로부터의 비장 세포들의 융합, 인간 면역글로블린 V 영역 파지 라이브러리들로부터의 분리 또는 당해 기술분야에서 공지되고 그리고 본 명세서에서 기술된 바에 기초하는 다른 절차들이 더 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 예를 들면, 완전한 인간 모노클로날 항체들은 항원성의 도발(antigenic challenge)에 응답하여 특성의 인간 항체들을 생산하도록 조작된 유전자조작된 생쥐로부터 수득될 수 있다. 유전자이식된 생쥐로부터 완전한 인간 항체들을 수득하는 방법들은 예를 들면 그린과 그의 동료들의 *Nature Genet.* 7:13, 1994; 론버그와 그의 동료들의 *Nature* 368:856, 1994; 테일러와 그의 동료들의 *Int. Immun.* 6:579, 1994; 미합중국 특허 제5,877,397호; 브루게만(Bruggemann)과 그의 동료들의 1997 *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-58; 자코비비츠와 그의 동료들의 1995 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:525-35들에 기술되어 있다. 이 기술에 있어서, 상기 인간 중쇄 및 경쇄 로커스의 구성요소(elements)들이 내인성의 중쇄 및 경쇄 로커스들(loci)의 표적화된 분열들(targeted disruptions)을 포함하는 배아줄기세포주(embryonic stem cell lines)들로부터 유도되는 생쥐의 스트레인들 내로 도입된다(또한 브루게만과 그의 동료들의 *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-58 (1997)을 참조하시오). 예를 들면, 인간 면역글로블린 유전자이식은 미니-진 구축물들(mini-gene constructs) 또는 효모 인공 크로모좀(yeast artificial chromosomes)들 상의 트랜스로커스들(transloci)이 될 수 있으며, 이들은 생쥐 림프구 조직 내에서 B-세포-특이적 DNA 재배열(rearrangement) 및 초돌연변이(hypermutation)를 수행한다. 완전한 인간 모노클로날 항체들은 상기 유전자이식된 생쥐를 면역화시키는 것에 의해 수득될 수 있으며, 계속해서 이는 인간 TSLP에 특이적인 인간 항체들을 생산한다. 상기 면역화된, 유전자이식된 생쥐들의 림프구 세포들은 본 명세서에서 기술되는 방법들에 따라 인간 항체-분비 하이브리도마들을 생산하는 데 사용될 수 있다. 완전한 인간 항체들을 포함하는 폴리클로날 혈청들(polyclonal sera)이 또한 상기 면역화된 동물들의 혈액으로부터 수득될 수 있다.

[0251] 본 발명의 인간 항체들을 생성하기 위한 하나의 예시적인 방법에는 예를 들어 미합중국 특허 제4,464,456호에서 기술된 바와 같이 인간 말초혈액세포들을 EBV 형질전환에 의해 불멸화시키는 것이 포함된다. 인간 TSLP에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 생산하는 이러한 불멸화된 B-세포주(또는 림프아구양 세포주(lymphoblastoid cell line)는 본 명세서에서 제공된 바와 같은 면역검출 방법들, 예를 들면, 효소면역측정법(ELISA)에 의해 동정되고 그리고 계속해서 표준 복제 기술들에 의해 분리될 수 있다. 항-TSLP 항체를 생산하는 상기 림프아구양 세포주의 안정성은 당해 기술분야에서 공지된 방법(예를 들면, 글라스키(Glasky)와 그의 동료들의 *Hybridoma* 8:377-89 (1989)를 참조하시오)들에 따라 상기 형질전환된 세포주를 쥐의 동물의 골수종과 융합시키는 것에 의하여 생쥐-인간 잡종세포주를 생산하는 것에 의하여 개선될 수 있다. 인간 모노클로날 항체들을 생산하는 또 다른 방법은 시험관 내 면역화이며, 이는 인간 비장의 B-세포들을 인간 TSLP로 프라임(priming)하고, 후속하여 프라임된 B-세포들을 이종잡종(heterohybrid) 융합 파트너로 융합시키는 것이 포함된다. 예를 들면, 보에르너(Boerner)와 그의 동료들의 1991 *J. Immunol.* 147:86-95을 참조하시오.

[0252] 특성의 구체예들에 있어서, 항-인간 TSLP 항체를 생산하는 B-세포가 선택되고, 그리고 당해 기술분야에서 공지된(국제공개특허공보 제WO 92/02551호; 미합중국 특허 제5,627,052호; 밥콕(Babcock)과 그의 동료들의 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-48 (1996)) 및 본 명세서에서 기술된 분자생물학 기술들에 따라 상기 경쇄 및 중쇄 가변영역들이 상기 B-세포로부터 복제된다. 면역화된 동물로부터의 B-세포들은 TSLP를 특이적으로 결합하는 항체를 생산하는 세포를 선택하는 것에 의하여 비장, 림프절 또는 말초혈액 샘플들로부터 분리될 수 있다.

B-세포들은 또한 인간들, 예를 들면, 말초혈액 샘플로부터 분리될 수 있다. 원하는 특이성을 갖는 항체를 생산하는 단일의 B-세포들을 검출하기 위한 방법들은 당해 기술분야에서 공지된 것들, 예를 들면, 플라크 형성(plaque formation), 형광-활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting) 시험관 내 자극 후의 특성의 항체의 검출들 등이다. 특성의 항체-생성 B-세포들을 선택하는 방법들에는 예를 들면 인간 TSLP를 포함하는 연한천(soft agar) 내에서의 B-세포들의 단일 세포 현탁을 준비하는 것이 포함된다. 상기 B-세포에 의해 생산된 상기 특이적인 항체의 상기 항원에의 결합은 착체(complex)의 형성이라는 결과를 가져오며, 이는 면역침강(immunoprecipitate)으로서 가시화될 수 있다. 소정의 항체를 생산하는 상기 B-세포들의 선택 후, 상기 특성의 항체 유전자들이 당해 기술분야에서 공지되고 그리고 본 명세서에서 기술된 방법들에 따라 DNA 또는 mRNA를 분리하는 것에 의하여 복제될 수 있다.

[0253] 본 발명의 항체들을 수득하는 부가적인 방법은 파지 디스플레이이다. 예를 들면, 윈터(Winter)와 그의 동료들의 1994 Annu. Rev. Immunol. 12:433-55; 버톤(Burton)과 그의 동료들의 1994 Adv. Immunol. 57:191-280들을 참조하시오. 인간 또는 쥐의 동물의 면역글로블린 가변영역 유전자 조합라이브러리(combinatorial libraries)들은 스크리닝되어 TSLP 또는 그들의 변종이나 단편에 특이적으로 결합하는 Ig 단편들(Fab, Fv, sFv 또는 이들의 복합체들)을 선택할 수 있는 파지 벡터(phage vectors)들 내에서 생성될 수 있다. 예를 들면, 미합중국 특허 제5,223,409호; 휴즈(Huse)와 그의 동료들의 1989 Science 246:1275-81; 사스트리(Sastry)와 그의 동료들의 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-32 (1989); 알팅-미스(Alting-Mees)와 그의 동료들의 Strategies in Molecular Biology 3:1-9 (1990); 강(Kang)과 그의 동료들의 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363-66; 후겐봄(Hoogenboom)과 그의 동료들의 1992 J. Molec. Biol. 227:381-388; 쉴레부쉬(Schlebusch)와 그의 동료들의 1997 Hybridoma 16:47-52 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌들을 참조하시오. 예를 들면, 파지 코트 단백질(phage coat protein)을 인코딩하는 시퀀스에 대한 프레임(frame) 내에서 Ig 가변영역 단편들을 인코딩하는 복수의 폴리뉴클레오티드 시퀀스들을 포함하는 라이브러리가 M13 또는 그의 변종 등과 같은 섬질의 박테리오파지(filamentous bacteriophage)의 유전자 내로 삽입될 수 있다. 융합 단백질은 상기 코트 단백질과 상기 경쇄 가변영역 도메인 및/또는 상기 중쇄 가변영역 도메인의 융합이 될 수 있다. 특성의 구체예들에 따르면, 면역글로블린 Fab 단편들은 또한 파지 입자(phage particle ; 예를 들면, 미합중국 특허 제5,698,426호를 참조하시오) 상에 디스플레이될 수 있다.

[0254] 중쇄 및 경쇄 면역글로블린 cDNA 발현 라이브러리들은 또한 람다 파지(lambda phage), 예를 들면, 람다임뮤노젵™(H)(λ ImmunoZap™(H)) 및 람다임뮤노젵™(L)(미합중국 캘리포니아주 라졸라 소재 스트라타진(Stratagene) 제품) 내에서 준비될 수 있다. 간단하게, mRNA는 B-세포 인구로부터 분리되고, 그리고 상기 람다임뮤노젵(H) 및 람다임뮤노젵(L) 벡터들 내에서 중쇄 및 경쇄 면역글로블린 cDNA 발현 라이브러리들을 생성하는 데 사용된다. 이들 벡터들은 개별적으로 스크리닝되거나 또는 공동-발현되어 Fab 단편들 또는 항체들을 형성할 수 있다(휴즈와 그의 동료들의 위의 문헌 및 사스트리와 그의 동료들의 위의 문헌들을 참조하시오). 양성의 플라크들이 후속적으로 대장균으로부터의 모노클로날 항체의 높은 수준의 발현을 허용하는 비-용균성의 플라스미드(non-lytic plasmid)로 전환될 수 있다.

[0255] 하나의 구체예에 있어서, 하이브리도마 내에서 대상체의 모노클로날 항체를 발현하는 유전자의 상기 가변영역들이 뉴클레오티드 프라이머(nucleotide primers)들을 사용하여 증폭된다. 이들 프라이머들은 당해 기술분야에서 숙련된 자에 의하여 합성되거나 또는 상용적으로 획득가능한 공급원들로부터 구입할 수 있다. (예를 들면, 생쥐 및 인간 가변영역들에 대한 프라이머들, 다른 것들 중에서도, $V_{H\alpha}$, $V_{H\beta}$, $V_{H\epsilon}$, $V_{H\delta}$, C_{H1} , V_L 및 C_L 영역들에 대한 프라이머들을 판매하는 스트라타진(미합중국 캘리포니아주 라졸라 소재)을 참조하시오.) 이들 프라이머들은 중쇄 또는 경쇄 가변영역들을 증폭하는 데 사용될 수 있으며, 이는 계속해서 개별적으로 임뮤노젵™H 또는 임뮤노젵™L(스트라타진) 등과 같은 벡터들 내로 삽입될 수 있다. 계속해서 이들 벡터들은 대장균, 효모 또는 발현을 위한 포유동물-기반의 계들 내로 도입될 수 있다. 상기 V_H 및 V_L 도메인들의 융합을 포함하는 대량의 단일쇄 단백질들이 이들 방법들을 사용하여 생산될 수 있다(버드와 그의 동료들의 Science 242:423-426, 1988를 참조하시오).

[0256] 일단 본 발명에 따른 항체들을 생산하는 셀들이 앞서 기술된 면역화 및 다른 기술들 중의 임의의 것을 사용하여 수득되면, 상기 특성의 항체 유전자들은 본 명세서에서 기술되는 바와 같은 표준의 절차들에 따라 그들로부터 DNA 또는 mRNA를 분리하고 그리고 증폭하는 것에 의하여 복제될 수 있다. 그들로부터 생산된 상기 항체들은 시퀀싱되고 그리고 상기 CDRs들이 동정되고 그리고 상기 CDRs들에 대한 DNA 코딩이 앞서 기술한 바와 같이 조작되어 본 발명에 따른 다른 항체들을 생성할 수 있다.

- [0257] 본 발명의 항원 결합 단백질들은 바람직하게는 본 명세서에서 기술된 세포-기반의 분석법의 하나에서 TSLP 활성을 조절하거나 및/또는 본 출원에서 기술된 상기 항체들 중의 하나의 결합을 교차-차단하거나 및/또는 본 출원에서 기술된 상기 항체들 중의 하나에 의하여 TSLP를 결합하는 것을 교차-차단한다. 본 명세서에서 기술된 예시적인 항체와 교차-경쟁, 즉, 본 출원에서 기술된 상기 예시적인 항체들 중의 하나의 결합을 교차-차단하고 그리고 상기 예시적인 항체들 중의 하나에 의하여 예시적인 TSLP로부터 교차-차단하는 항원 결합 단백질들이 특히 유용하다. 따라서 이러한 결합체들은 본 명세서에서 기술된 상기 분석법들을 사용하여 동정될 수 있다.
- [0258] 특정의 구체예들에 있어서, 항체들은 먼저 TSLP에 결합하거나 및/또는 본 명세서에서 기술된 세포-기반의 분석법들에서 중화하거나 및/또는 본 출원에서 기술된 상기 항체들을 교차-차단하거나 및/또는 본 출원에서 기술된 상기 항체들 중의 하나에 의하여 TSLP를 결합하는 것을 교차-차단하는 항체들을 동정하는 것에 의해 생성된다. 그 다음에, 이들 항체들로부터의 상기 CDR 영역들이 적절한 생체적합성의 골격들 내로 삽입되는 데 사용되어 항원 결합 단백질들을 생성하도록 한다. 상기 결합체의 비-CDR 부분은 아미노산들로 이루어지거나 또는 비-단백질 분자가 될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 상기 분석법들은 결합체들의 특성화(characterization)를 허용한다. 바람직하게는 본 발명의 상기 결합체들은 본 명세서에서 정의된 항체들이다.
- [0259] 본 발명의 항원 결합 단백질들에는 본 명세서에서 기술된 예시적인 항체로서의 동일한 에피토프에 결합하는 것들이 포함된다. 실시예 9에서 논의된 바와 같이, 에피토프들은 구조적이거나 또는 기능적인 것일 수 있다. 구조적인 에피토프들은 상기 항체에 의해 덮여지는 표적의 패치(patch)로서 고려될 수 있다. 기능적인 에피토프들은 구조적인 에피토프들의 서브세트(subset)이고, 그리고 상호작용(예를 들면, 수소결합들, 이온 상호작용들)의 친화성에 직접적으로 기여하는 잔기들을 포함한다. 항체의 상기 에피토프를 결정하는 방법은 표적 분자 내에서의 돌연변이의 스캐닝을 사용하고 그리고 결합에 대한 상기 돌연변이의 영향을 측정하는 것에 의한 것이다. 상기 항체 결합 영역의 3차원의 구조가 주어지는 경우, 상기 에피토프에서의 돌연변이들은 상기 돌연변이된 표적에 대한 상기 항체의 결합 친화성을 감소시키거나 또는 증가시킬 수 있다.
- [0260] 항원 결합 단백질들은 그들의 에피토프들에 의해 정의될 수 있다. 표 6에 나타난 바와 같이, 비록 상기 항체들이 모두 TSLP에 결합하기는 하나, 이들은 TSLP 내에서의 특정의 잔기들의 돌연변이에 의해 다르게 영향을 받으며, 그들의 개별적인 에피토프들이 완전하게 중첩하지 않는다는 것을 나타낸다. 바람직한 항원 결합 단백질들에는 본 명세서에서 기술되는 대조 항체(reference antibody)의 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것들이 포함된다.
- [0261] 예를 들면, 바람직한 항원 결합 단백질은 A2와 동일한 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것이다. 이는 TSLP가 돌연변이 K67E, K97E, K98E, R100E, K101E 또는 K103E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP(wild-type TSLP)에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 증가에 의해 입증된다. 이는 또한 TSLP가 돌연변이 K21E, T25R, S28R, S64R 또는 K73E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 감소에 의해 입증된다. 비록 상기 항원 결합 단백질과 A2가 다른 것들은 아니고 동일한 돌연변이들에 의해 유사하게 영향을 받을 수 있기는 하나, TSLP의 특정의 잔기들에서의 돌연변이들의 영향에 대한 상기 항원 결합 단백질과 A2 사이에 동일성이 더할 수록, 상기 항원 결합 단백질과 대조 항체가 구조적인 에피토프를 더 공유한다.
- [0262] 다른 바람직한 항원 결합 단백질은 A4와 동일한 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것이다. 이는 TSLP가 돌연변이 K97E, K98E, R100E, K101E 또는 K103E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 증가에 의해 입증된다. 이는 또한 TSLP가 돌연변이 K10E, A14R, K21E, D22R, K73E, K75E 또는 A76R들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합친화성에서의 감소에 의해 입증될 수 있다.
- [0263] 다른 바람직한 항원 결합 단백질은 A5와 동일한 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것이다. 이는 TSLP가 돌연변이 K12E, D22R, S40R, R122E, N124E, R125E 또는 K129E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 감소에 의해 입증된다.
- [0264] 다른 바람직한 항원 결합 단백질은 A6와 동일한 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것이다. 이는 TSLP가 돌연변이 S40R, S42R, H46R, R122E 또는 K129E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 감소에 의해 입증된다.
- [0265] 다른 바람직한 항원 결합 단백질은 A7과 동일한 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것이다. 이는 TSLP가 돌연변이 K101E를 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 증가에 의해 입증된다. 이는 또한 TSLP가 돌연변이 D2R, T4R, D7R, S42R, H46R, T49R, E50R, Q112R, R122E, R125E 또는 K129E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 감소에 의해 입증될 수 있다.

- [0266] 다른 바람직한 항원 결합 단백질은 A10과 동일한 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것이다. 이는 TSLP가 돌연변이 K97E, K98E, R100E, K101E 또는 K103E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 증가에 의해 입증된다. 이는 또한 TSLP가 돌연변이 N5R, S17R, T18R, K21E, D22R, T25R, T33R, H46R, A63R, S64R, A66R, E68R, K73E, K75E, A76R, A92R, T93R, Q94R 또는 A95R들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 감소에 의해 입증될 수 있다.
- [0267] 다른 바람직한 항원 결합 단백질은 A21과 동일한 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것이다. 이는 TSLP가 돌연변이 K97E, K98E, R100E, K101E 또는 K103E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 증가에 의해 입증된다. 이는 또한 TSLP가 돌연변이 K21E, K21R, D22R, T25R, T33R, S64R, K73E, K75E, E111R 또는 S114R들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 감소에 의해 입증될 수 있다.
- [0268] 다른 바람직한 항원 결합 단백질은 A23과 동일한 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것이다. 이는 TSLP가 돌연변이 K67E, K97E, K98E, R100E, K101E 또는 K103E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 증가에 의해 입증된다. 이는 또한 TSLP가 돌연변이 E9R, K10E, K12E, A13R, S17R, S20R, K21E, K21R, K73E, K75E, N124E 또는 R125E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 감소에 의해 입증될 수 있다.
- [0269] 다른 바람직한 항원 결합 단백질은 A26과 동일한 구조적인 에피토프의 적어도 일부를 공유하는 것이다. 이는 TSLP가 돌연변이 K97E, K98E, R100E, K101E 또는 K103E들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 증가에 의해 입증된다. 이는 또한 TSLP가 돌연변이 A14R, K21E, D22R, A63R, S64R, K67E, K73E, A76R, A92R 또는 A95R들을 갖는 경우에, 야생형 TSLP에 대한 것과 비교하여 결합 친화성에서의 감소에 의해 입증될 수 있다.
- [0270] 상기 항체들 중에서 결합에 영향을 주는 돌연변이들을 비교하면, TSLP의 특정의 잔기들이 TSLP에 결합하고 그리고 TSLP 활성을 차단하는 항체 능력의 일부가 되는 경향이 있음을 암시하고 있다. 이러한 잔기들에는 K21, D22, K73 및 K129들이 포함된다. 따라서, 바람직한 항원 결합 단백질에는 돌연변이 K21E를 포함하는 TSLP에 비해 야생형 TSLP에 대해 더 높은 친화성을 갖는 것들, 돌연변이 D21R을 포함하는 TSLP에 비해 야생형 TSLP에 대해 더 높은 친화성을 갖는 것들, 돌연변이 K73E를 포함하는 TSLP에 비해 야생형 TSLP에 대해 더 높은 친화성을 갖는 것들, 그리고 돌연변이 K129E를 포함하는 TSLP에 비해 야생형 TSLP에 대해 더 높은 친화성을 갖는 것들이 포함된다.
- [0271] 더욱이, 본 명세서에서 기술된 상기 예시적인 항원 결합 단백질들의 많은 것들이 위치 97 내지 103들에서의 아미노산들의 염기성의 패치(basic patch)가 산성의 아미노산들로 변화되는 경우에 TSLP에 대한 친화성이 증가하는 것들의 기여를 공유한다.
- [0272] 핵산들
- [0273] 하나의 관점에 있어서, 본 발명은 단리된 핵산 분자들을 제공한다. 상기 핵산들에는, 예를 들면, 항원 결합 단백질의 전부 또는 일부 예를 들어 본 발명의 항체의 하나 또는 2가지의쇄들을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그들의 단편, 유도체, 돌연변이 단백질 또는 변종들, 잡종화 탐침(hybridization probes), 중합효소 연쇄 반응 프라이머들 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 동정하거나, 분석하거나, 돌연변이시키거나 또는 증폭하기 위한 시퀀싱 프라이머(sequencing primers), 폴리뉴클레오타이드의 발현을 저해하기 위한 항-감작 핵산들 및 앞서의 상보적 시퀀스들이 포함된다. 상기 핵산들은 임의의 길이가 될 수 있다. 이들은, 예를 들면, 길이에 있어서 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1,000, 1,500, 3,000, 5,000 또는 그 이상의 뉴클레오타이드가 되거나 및/또는 예를 들면 하나 또는 그 이상의 부가의 시퀀스들, 조절 시퀀스들을 더 포함하거나 및/또는 보다 큰 핵산 예를 들어 벡터의 일부가 될 수 있다. 상기 핵산들은 단일-나선(single-stranded) 또는 이중-나선이 될 수 있으며, 또한 RNA 및/또는 DNA 뉴클레오타이드들 및 이들의 인공의 돌연변이들(예를 들면, 펩티드 핵산들)을 포함할 수 있다.
- [0274] 항체 폴리펩티드들(예를 들면, 중쇄 또는 경쇄, 가변도메인 단독 또는 전장의)을 인코딩하는 핵산들은 TSLP 항원으로 면역화된 생쥐의 B-세포들로부터 단리될 수 있다. 상기 핵산은 중합효소 연쇄반응(PCR) 등과 같은 통상의 절차들에 의해 단리될 수 있다.
- [0275] 상기 중쇄의 가변영역들 및 경쇄 가변영역들을 인코딩하는 핵산 시퀀스들을 이하에서 나타내었다. 유전암호(genetic code)의 축퇴(degeneracy)로 인하여, 본 명세서에서 기술된 상기 폴리펩티드 시퀀스들 각각은 다수의

다른 핵산 시퀀스들에 의해 인코딩된다는 것은 숙련된 기술자들에게는 이해될 수 있을 것이다. 본 발명은 본 발명의 각 항원 결합 단백질을 인코딩하는 각 축퇴 뉴클레오티드 시퀀스를 제공한다.

[0276] 본 발명은 특정의 잡종화 조건들 하에서 다른 핵산들(예를 들면, A1 내지 A27들 중의 임의의 뉴클레오티드 시퀀스를 포함하는 핵산들)로 잡종화하는 핵산들을 더 제공한다. 핵산들을 잡종화하는 방법들은 당해 기술분야에서 공지된 것이다. 예를 들면, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6를 참조하시오. 본 명세서에서 정의된 바와 같이, 완전하게 가혹한 잡종화 조건은 5배량의 염화나트륨/구연산나트륨(5X sodium chloride/sodium citrate ; SSC), 0.5% 도데실황산나트륨(SDS), 1.0mM EDTA(pH 8.0)를 포함하는 전세척 용액(prewashing solution), 약 50%의 포름아미드, 6배량의 SSC의 잡종화 완충제(hybridization buffer) 및 55℃의 잡종화 온도(hybridization temperature)(또는 42℃의 잡종화 온도를 가지며, 약 50%의 포름아미드를 포함하는 것과 같은 다른 유사한 잡종화 용액들) 및 0.5배량의 SSC, 0.1% SDS 내에서의 60℃의 세척조건들을 사용한다. 엄격한 잡종화 조건은 45℃에서의 6배량의 SSC에서 잡종화 및 후속하는 68℃에서 0.1배량의 SSC, 0.2% SDS 내에서의 1회 또는 그 이상의 세척들에 의해 잡종화시킨다. 더욱이, 당해 기술분야에서 숙련된 자는 상기 잡종화 및/또는 세척 조건들을 조작하여 잡종화의 가혹화 정도(stringency)를 증가시키거나 또는 감소시켜 핵산들이 서로에 대해 적어도 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 동일한, 전형적으로는 서로에 대해 잡종화되어 잔류하는 뉴클레오티드 시퀀스들을 포함하도록 할 수 있다. 잡종화 조건들의 선택에 영향을 주는 기본적인 변수(parameters)들 및 적절한 조건들을 고안하기 위한 지침(guidance)들은 예를 들면 샘브룩(Sambrook), 프리쉬(Fritsch) 및 마니아티스(Maniatis)의 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 9장 및 11장; 및 Current Protocols in Molecular Biology, 1995, 아우수벨(Ausubel)과 그의 동료들 편저의 John Wiley & Sons, Inc., 2.10절 및 6.3-6.4절들에 의해 규정되며, 또한 당해 기술분야에서 통상적인 기술을 갖는 자들에게는 예를 들어 상기 DNA의 길이 및/또는 기본 조성(base composition)에 기초하여 용이하게 결정될 수 있을 것이다.

[0277] 돌연변이에 의해 변화들이 핵산 내로 도입되고, 그에 의하여 핵산이 인코딩하는 폴리펩티드(예를 들면 항원 결합 단백질)의 아미노산 시퀀스 내에서의 변화를 야기할 수 있다. 돌연변이들은 당해 기술분야에서 공지된 임의의 기술들을 사용하여 도입될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 하나 또는 그 이상의 특정의 아미노산 잔기들이 예를 들어 사이트-지향의 돌연변이 생성 프로토콜(mutagenesis protocol)을 사용하여 변화될 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 하나 또는 그 이상의 불규칙하게 선택된 잔기들이 예를 들어 불규칙 돌연변이 생성 프로토콜(random mutagenesis protocol)을 사용하여 변화될 수 있다. 어떻게 돌연변이가 이루어지거나 간에, 돌연변이 폴리펩티드는 소정의 특성들에 대하여 발현되고 그리고 스크리닝될 수 있다.

[0278] 돌연변이들은 핵산을 인코딩하는 폴리펩티드의 생물학적 활성을 뚜렷하게 변화시키지 없이 핵산 내로 도입될 수 있다. 예를 들면, 비-필수적인 아미노산 잔기들에서 아미노산 치환들을 야기하는 뉴클레오티드 치환들을 이룰 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, A1 내지 A27들에 대하여 본 명세서에서 제공되는 뉴클레오티드 시퀀스 또는 이들의 소정의 단편, 변종 또는 유도체는 이것이 본 명세서에서 A1 내지 A27들에 대하여 나타난 아미노산 잔기들이 2 또는 그 이상의 시퀀스들이 다른 잔기들이 되도록 하나 또는 그 이상의 아미노산 시퀀스들의 결실들 또는 치환들을 포함하는 아미노산 시퀀스를 인코딩하도록 돌연변이 된다. 다른 구체예에 있어서, 상기 돌연변이 생성은 본 명세서에서 A1 내지 A27들에 대해 나타난 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기들에 인접하는 아미노산이 2 또는 그 이상의 시퀀스들이 다른 잔기들이 되도록 아미노산을 삽입한다. 달리, 핵산을 인코딩하는 폴리펩티드의 생물학적 활성(예를 들면, TSLP에의 결합)을 선택적으로 변화시키는 핵산 내로 하나 또는 그 이상의 돌연변이들이 도입될 수 있다. 예를 들면, 돌연변이는 생물학적 활성을 정량적으로 또는 정성적으로 변화시킬 수 있다. 정량적인 변화들의 예들에는 활성의 증가, 감소 또는 제거가 포함된다. 정성적인 변화들의 예들에는 항원 결합 단백질의 항원 특이성의 변화가 포함된다.

[0279] 다른 관점에 있어서, 본 발명은 본 발명의 핵산 시퀀스들의 검출을 위한 프라이머 또는 잡종화 탐침으로서 사용하기에 적절한 핵산 분자를 제공한다. 본 발명의 핵산 분자는 본 발명의 전장의 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 시퀀스, 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드의 활성부(active portion)(예를 들면, TSLP 결합부)를 인코딩하는 탐침 또는 프라이머 또는 단편으로서 사용될 수 있는 단편의 단지 일부만을 포함할 수 있다.

[0280] 본 발명의 핵산의 시퀀스에 기초하는 탐침들은 상기 핵산 또는 유사한 핵산들, 예를 들면, 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 전사체들을 검출하는 데 사용될 수 있다. 상기 탐침은 표지기(label group ; 예를 들면, 방사성 동위원소(radioisotope), 형광화합물(fluorescent compound), 효소 또는 효소 보조인자(enzyme co-factor)를 포함할 수 있다. 이러한 탐침들은 상기 폴리펩티드를 발현하는 세포를 동정하는 데 사용될 수 있다.

- [0281] 다른 관점에 있어서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 또는 그들의 부분을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터들을 제공한다. 벡터들의 예들에는 플라스미드, 바이러스벡터(viral vectors), 비-에피솜의 포유동물 벡터들 및 발현 벡터들, 예를 들면, 재조합 발현 벡터들이 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- [0282] 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터들은 숙주세포 내의 상기 핵산의 발현에 적절한 형태의 본 발명의 핵산을 포함할 수 있다. 상기 재조합 발현 벡터들은 발현을 위하여 사용될 상기 숙주세포들을 기반으로 선택되는 하나 또는 그 이상의 조절 시퀀스들을 포함하며, 이는 발현될 상기 핵산 시퀀스에 작동가능하게 연결된다. 조절 시퀀스들에는 여러 형태들의 숙주세포들 내에서의 뉴클레오티드 시퀀스의 직접적 구성 발현을 하는 것들(예를 들면, SV49 초기 유전자 인핸서, 로우스 육종 바이러스 프로모터(Rous sarcoma virus promoter) 및 거대세포바이러스 프로모터(cytomegalovirus promoter)), 단지 특성의 숙주세포들 내에서의 상기 뉴클레오티드 시퀀스의 직접적 발현을 하는 것들(예를 들면, 조직-특이성의 조절 시퀀스들, 본 명세서에서 그들 전체들을 참조로 인용하는 보스(Voss)와 그의 동료들의 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, 마니아티스(Maniatis)와 그의 동료들의 1987, Science 236:1237들을 참조) 및 특성의 처리 또는 조건에 대응하는 뉴클레오티드 시퀀스의 직접적 유도가능 발현을 하는 것들(예를 들면, 포유동물 세포들 내에서의 메탈로티오닌 프로모터(metallothionin promoter) 및 원핵계 및 진핵계 둘 다에서의 티타-반응성(tet-responsive) 및/또는 스트렙토마이신 반응성 프로모터(동일 문헌 참조)들이 포함된다. 당해 기술분야에서 숙련된 자들에게는 상기 발현 벡터의 설계가 형질전환되어야 할 숙주세포의 선택, 원하는 단백질의 발현의 수준 등의 선택에 따라 이러한 인자들에 의존적일 수 있다는 것은 이해될 수 있는 것이다. 본 발명의 상기 발현 벡터들은 숙주세포들 내로 도입될 수 있으며, 그에 의하여 본 명세서에서 기술된 바와 같은 핵산들에 의해 인코딩된 융합 단백질 또는 펩티드들을 포함하는 단백질을 생산할 수 있다.
- [0283] 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은 재조합 발현 벡터가 그 안으로 도입된 숙주세포들을 제공한다. 숙주세포는 임의의 원핵세포(예를 들면, 대장균) 또는 진핵세포(예를 들면, 효모, 곤충 또는 포유동물 세포들(예를 들면, CHO 세포들))이 될 수 있다. 벡터 DNA는 통상의 형질전환 또는 형질변환 기술들을 통하여 원핵세포 또는 진핵세포들 내로 도입될 수 있다. 포유동물 세포들의 안전한 형질변환을 위하여, 발현 벡터 및 사용되는 형질변환 기술에 따라, 세포들의 단지 작은 부분이 그들의 게놈 내로 상기 외래 DNA와 통합(integrate)될 수 있다. 이들 통일체 구성부분(integrants)들을 동정하고 그리고 선택하기 위하여, 선택가능한 마커(marker)를 인코딩하는 유전자(예를 들면, 항생제에 대한 저항을 위한)가 대체로 대상의 상기 유전자와 함께 상기 숙주세포들 내로 도입된다. 바람직한 선택가능한 마커들에는 G418, 하이그로마이신(hygromycin) 및 메토폭세이트(methotrexate) 등과 같이 약물에 대한 저항성을 부여하는 것들이 포함된다. 상기 도입된 핵산들로 안정하게 형질변환된 세포들은 다른 방법들 중에서도 약물선택(drug selection; 예를 들면, 상기 선택가능한 마커 유전자가 내포된 세포들은 생존할 수 있는 반면에 다른 세포들은 사멸한다)에 의해 동정될 수 있다.
- [0284] 징후들
- [0285] TSLP는 여러 염증성 장애(inflammatory disorders)들, 특히 알러지성 염증성 장애(allergic inflammatory disorders)들에 관여된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 상기 용어 "알러지성 염증"은 면역 글로블린 E(IgE)-연관 면역반응들의 징후들을 의미한다(Manual of Allergy and Immunology, Chapter 2, 알빈(Alvin M. Sanico), 브루스(Bruce S. Bochner) 및 사비지트(Sarbjit S. Saini), 아델만(Adelman)과 그의 동료들의 편저, 리핀코트(Lippincott), 윌리엄스(Williams), 윌킨스(Wilkins)의 Philadelphia, PA, (2002)). 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 알러지성 염증은 2형 헬퍼 T세포들(TH2 세포들)의 감염된 조직 내로의 침투(infiltration)에 의하여 대체로 특징지워진다(카이의 위의 문헌). 알러지성 염증에는 아토피성 피부염(atopic dermatitis) 등과 같은 염증성 피부 상태들에 더해 알러지성 부비동염(allergic rhinosinusitis), 천식, 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis) 등과 같은 폐의 염증성 질환들(pulmonary inflammatory diseases)들이 포함된다(위의 Manual of Allergy and Immunology 문헌). 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 상기 용어 "TSLP-연관 알러지성 염증"은 TSLP가 상향조절(upregulated)되거나 또는 달리 포함되는 것으로 입증되는 알러지성 염증성 상태들을 의미한다.
- [0286] 알러지성 천식은 기도 호산구 증가증(airway eosinophilia), 높은 수준들의 혈청 IgE 및 비만세포 활성화(mast cell activation)으로 특징지워지는 기도들의 만성 염증성 장애이며, 이는 기도과민증(airway hyperresponsiveness), 상피 손상(epithelial damage) 및 점액 과분비(mucus hypersecretion)에 기여한다(윌리스-카프(Wills-Karp, M)의 Ann. Rev. Immunol. 17:255-281 (1999). 위의 문헌 Manual of Allergy and

Immunology). 심지어 무징후의 기간(symptom-free periods)들에서조차 모든 천식환자들의 기도들 내에서 다양한 중증도들의 만성 염증들이 존재하는 것이 연구들에 의해 입증되었다. 감수성의 개체들에 있어서, 이러한 염증은 천명(wheezing), 숨가쁨(breathlessness), 흉부압박감(chest tightness) 및 기침(coughing)의 사건(episodes)들을 야기한다(위의 문헌 Manual of Allergy and Immunology).

- [0287] 아토피성 피부염은 상승된 혈청 총 IgE, 호산구 증가증 및 호염기성 세포(basophils)들 및 비만세포들로부터의 히스타민의 증가된 방출의 특징의 피부 병소(skin lesions)들로 특징지어지는 만성 소양성 염증성 피부 질환(chronic pruritic inflammatory skin disease)이다. 아토피성 피부염을 앓는 사람들은 지나친 TH2 반응들을 나타내며, 아토피성 피부염 병소들의 개시는 높은 수준들의 IL-4, IL-5 및 IL-13을 방출하는 TH2 림프구(TH2 lymphocytes)들의 초기 피부 침투의 수단들에 의해 증대되는 것으로 여겨지고 있다(룽(Leung)의 J. Allergy Clin Immunol 105:860-76 (2000)). TSLP와 다른 염증성 사이토카인(cytokines)들 사이의 관계는 미합중국 특허출원 제11/205,904호, 공개공보 제2006/0039910호들에서 기술되어 있으며, 이들은 본 명세서에서 참조로 인용된다.
- [0288] 잡종화 그 자리에서 검출되는 바와 같은 인간 TSLP 발현이 질병 중증도(disease severity)와 연관되는 천식성의 기도(asthmatic airways)들 내에서의 증가되는 것으로 보고되었다(잉(Ying)과 그의 동료들의 J. Immunology 174:8183-8190 (2005)). 천식환자 폐 샘플들 내에서의 TSLP mRNA의 분석은 대조군들에 비하여 TSLP의 증가된 발현을 나타내고 있다. 게다가, TSLP 단백질 수준들은 천식 환자들, 폐이식 환자들 및 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 환자들의 농축된 기관지경 폐포 세척 검사 유체 내에서 검출된다. TSLP는 최근 미생물들 및 염증 등과 같은 손상(trauma)에 대응하여 방출되고 그리고 비만세포들을 활성화시키는 것으로 밝혀졌다(알라크베르디((Allakhverdi)와 그의 동료들의 J Exp. Med 20492:253-258 (2007)).
- [0289] 인간 TSLP 단백질은 경증/중증의 천식 및 만성폐쇄성질환(COPD)을 앓는 대상체들의 기관지 점막(bronchial mucosa) 및 BAL 유체 내의 질병과 연관되는 것으로 나타났다(잉과 그의 동료들의 J Immunol 181(4):2790-8 (2008)).
- [0290] 유전자이식된 생쥐의 폐들 내에서의 TSLP의 과-발현(over-expression)은 천식-유사의 기도 염증(asthma-like airway inflammation)을 야기한다(조우(Zhou)와 그의 동료들의 Nat. Immunol 10:1047-1053 (2005)). 게다가, TSLPR 결핍 생쥐가 OVA-천식 모델들에서 천식을 발달시키는 데 실패하여 TSLP가 기도 염증 모델들 내에서 천식의 발달에 요구된다는 것을 입증하고 있다는 것이 보고되었다(조우와 그의 동료들의 위의 문헌, 카피노(Carpino)와 그의 동료들의 Mol. Cell Biol. 24:2584-2592 (2004)).
- [0291] 천식에 더해, 아토피성 피부염(AD) 환자들의 병소 피부 내에서 그리고 염증이 발달된 편도선의 상피세포들(inflamed tonsillar epithelial cells) 내에서의 TSLP 및 mRNA의 증가된 수준들이 발견되었다(소우멜리스(Soumelis)와 그의 동료들의 Nature Immunol: 3 (7):673-680 (2002)). 유전자이식된 생쥐의 피부에서의 TSLP의 과-발현이 AD-유사의 표현형(phenotype)을 야기한다(유(Yoo)와 그의 동료들의 J Exp Med 202:541-549 (2005)).
- [0292] 따라서, TSLP 길항제들, 특히 본 출원의 상기 TSLP 항원 결합 단백질들 및 항체들은 알러지성 염증, 특히, 천식 및 아토피성 피부염에 대한 치료적인 처치로 유용하다.
- [0293] 게다가, TSLP 길항제들, 특히 본 출원의 상기 TSLP 항원 결합 단백질들 및 항체들은 또한 섬유증 장애들을 치료하는 데 유용하다. 미합중국 특허 출원 제11/344,379호에서 기술된 바와 같이, TSLP가 섬유증 장애들을 촉진시키는 데 관여한다는 것이 입증되었다. TSLP는 동물들에서의 섬유아세포(fibroblast) 축적 및 콜라겐 침착(collagen deposition)을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 생쥐들의 피하조직(subcutis) 내의 섬유증의 결과를 야기하는 쥐과와 동물의 TSLP의 주사, 예를 들어 생쥐 내로의 피내 주사는 섬유아세포 증식 및 콜라겐 침착으로 특징지어진다. TSLP 활성의 길항화(antagonizing)은 조직 내에서의 섬유아세포 증식 및 콜라겐 침착을 방지하거나 또는 감소시키는 결과를 가져올 수 있다.
- [0294] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "섬유증성 질환(fibroproliferative disease)" 또는 "섬유증 질환 또는 장애"는 하나 또는 그 이상의 조직들 내에서의 섬유증을 포함하는 상태들을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "섬유증"은 기관 또는 조직의 정상 구성요소(normal constituent)로서라기 보다는 오히려 치유과정(reparative process) 또는 반응과정(reactive process))으로서의 섬유상 조직(fibrous tissue)의 형성을 의미한다. 섬유증은 임의의 특징의 조직 내에서의 정상적인 퇴적을 초과하는 섬유아세포 축적 및 콜라겐 침착에 의해 특징지어진다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "섬유증"은 "섬유아세포 축적 및 콜라겐

침착"과 동의적으로 사용된다. 섬유아세포들은 결합조직세포(connective tissue cells)들이며, 이들은 전신을 통하여 결합조직 내에 분산되어 있다. 섬유아세포들은 I형 및/또는 III형 콜라겐을 포함하는 비경질의 세포외 기질(nonrigid extracellular matrix)을 분비한다. 조직에 대한 손상에 대응하여, 근처의 섬유아세포들이 상처 상처 내로 이동하고, 증식하고 그리고 대량의 콜라겐성의 세포외 기질(collagenous extracellular matrix)을 생산한다. 콜라겐은 세포외 기질과 결합조직, 연골(cartilage) 및 뼈의 주요 구성요소인 글리신과 프롤린 풍부한 섬유상 단백질이다. 콜라겐 분자들은 알파-쇄(α -chains)들이라 불리우는 삼중-가닥 나선 구조들(triple-stranded helical structures)이며, 이들은 로프형의 나선(ropelike helix) 내에서 다른 하나의 주위에 감겨진다. 콜라겐은 여러 형태들 또는 타입들로 존재하며, 이들 중에서 가장 흔한 I형은 피부, 힘줄(tendon) 및 뼈 내에서 발견되고; 그리고 II형은 피부, 혈관들 및 내장기관들 내에서 발견된다.

[0295] 섬유증 장애들에는 전신성 및 국소적 경피증(systemic and local scleroderma), 흉터종과 비대성 흉터(keloids and hypertrophic scars), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 재협착(restenosis), 폐의 염증과 섬유증(pulmonary inflammation and fibrosis), 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 간경변증(liver cirrhosis), 만성 B형 또는 C형 간염 감염의 결과로서의 섬유증, 신장질환, 흉터 조직으로부터 야기되는 심장질환 및 황반변성 및 망막과 유리체의 망막병증(retinopathy) 등과 같은 안질환들이 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 추가의 섬유증 질환들에는 화학요법적 약물들(chemotherapeutic drugs)로 야기되는 섬유증, 방사선-유도 섬유증(radiation-induced fibrosis) 및 부상들과 화상들이 포함된다.

[0296] 경피증은 피부 및 다른 기관들 내에서의 섬유아세포들에 의한 새로운 콜라겐의 과생산(overproduction)에 의해 야기되는 피부의 후박화(thickening)와 경결(induration)에 의해 특징지어지는 섬유증 장애이다. 경피증은 국소적 또는 전신성 질환으로서 발생할 수 있다. 전신성 경피증은 다수의 기관들에 영향을 줄 수 있다. 전신성 경피증은 피부의 후박화 및 그 아래의 조직들, 특히 손과 안면의 부착을 수반하는 유리질화(hyalinized)되고 그리고 후박화된 콜라겐성의 섬유상 조직의 형성으로 특징지어진다. 상기 질병은 또한 식도의 연동운동의 손실 및 점막하 섬유증(submucosal fibrosis)로 인한 연하곤란(dysphagia), 폐의 섬유증으로 인한 호흡장애(dyspnea), 심근 섬유증(myocardial fibrosis) 및 신장혈관의 변화들(renal vascular changes)로 특징지어질 수 있다(Stedman's Medical Dictionary, 26th Edition, Williams & Wilkins, 1995)). 폐의 섬유증은 경피증 환자들의 30 내지 70%에 영향을 주며, 종종 제한적인 폐질환을 야기한다(아타마스(Atamas)와 그의 동료들의 Cytokine and Growth Factor Rev 14:537-550 (2003)). 특발성 폐섬유증은 만성적, 진행성의 그리고 대개는 치명적인 폐장애(lung disorder)이며, 만성 염증성 진행의 결과로 고려된다(켈리(Kelly)와 그의 동료들의 Curr Pharma Design 9:39-49 (2003)).

[0297] 따라서, TSLP 길항제들, 특히 본 출원의 상기 TSLP 항원 결합 단백질들 및 항체들은 경피증, 간질성 폐질환(interstitial lung disease), 특발성 폐섬유증, 만성 B형 또는 C형 간염으로부터 야기되는 섬유증, 방사선-유도 섬유증 및 상처 치료로부터 야기되는 섬유증들을 포함하나 이들에 제한되지 않는 섬유상 질환들에 대한 치료적인 처치로 유용하다.

[0298] 비록 앞서의 징후들이 바람직하기는 한, 다른 질환, 장애 또는 상태들이 대상체로의 항원 결합의 투여로 치료될 수 있거나 또는 예방될 수 있을 것이다. 이러한 질환들, 장애들 및 상태들에는 염증, 자가면역질환(autoimmune disease), 연골염증(cartilage inflammation), 섬유상 질환 및/또는 골 감성(fibrotic disease and/or bone degradation), 관절염(arthritis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 소아 관절염(juvenile arthritis), 소아 류마티스성 관절염(juvenile rheumatoid arthritis), 소수관절형 소아 류마티스성 관절염(pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis), 다관절형 소아 류마티스성 관절염(polyarticular juvenile rheumatoid arthritis), 전신성 개시 소아 류마티스성 관절염(systemic onset juvenile rheumatoid arthritis), 소아 강직성 척추염(juvenile ankylosing spondylitis), 소아 장병증성 관절염(juvenile enteropathic arthritis), 소아 반응성 관절염(juvenile reactive arthritis), 소아 라이터 증후군(juvenile Reter's Syndrome), 에스이에이 증후군(SEA Syndrome ; 혈청반응음성(Seronegativity), 골근부착부병변(Enthesopathy), 관절증(Arthropathy) 증후군, 소아 피부근염(juvenile dermatomyositis), 소아 건선성 관절염(juvenile psoriatic arthritis), 소아 경피증(juvenile scleroderma), 소아 전신성 홍반성 낭창(juvenile systemic lupus erythematosus), 소아 혈관염(juvenile vasculitis), 소수관절형 류마티스성 관절염, 다관절형 류마티스성 관절염, 전신성 개시 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 장병증성 관절염, 반응성 관절염, 라이터 증후군(Reter's Syndrome), 에스이에이 증후군, 피부근염, 건선성 관절염, 경피증, 전신성 홍반성 낭창, 혈관염, 근염(myolitis), 다발성근염(polymyolitis), 피부근염(dermatomyolitis), 골관절염(osteoarthritis), 결절성 다발동맥염(polyarteritis nodosa), 베게너육아종증(Wegener's granulomatosis), 동맥염(arteritis),

류마티스성 다발성 근육통(polyomyalgia rheumatica), 유육종증(sarcoidosis), 경피증, 경화증(sclerosis), 원발성 담즙성 경화증(primary biliary sclerosis), 경화성 담관염(sclerosing cholangitis), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 건선, 판상형 건선(plaque psoriasis), 적상 건선(guttate psoriasis), 간찰부 건선(inverse psoriasis), 농포성 건선(pustular psoriasis), 홍피성 건선(erythrodermic psoriasis), 피부염(dermatitis), 아토피성 피부염, 죽상동맥경화증, 낭창(lupus), 스틸씨병(Still's disease), 전신성 홍반성 낭창(Systemic Lupus Erythematosus ; SLE), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease ; IBD), 크론씨병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 소아 지방병증(셀리악병 ; celiac disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis ; MS), 천식, 만성폐쇄성질환(COPD), 길랭-바레 증후군(Guillain-Barre disease), I형 당뇨병(Type I diabetes mellitus), 그레이브즈병(Graves' disease), 애디슨병(Addison's disease), 레이노 현상(Raynaud's phenomenon), 자가면역 간염(autoimmune hepatitis), 이식편대숙주병(GVHD) 등이 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 특정의 구체예들에 있어서, 치료적으로 유효한 양의 TSLP 항원 결합 단백질들을 포함하는 약제학적 조성물들이 제공된다.

[0299] 용어 "치료(treatment)"는 적어도 하나의 증후군 또는 장애의 다른 관점의 완화(alleviation) 또는 예방 또는 질병의 중증도의 감소 등을 포함한다. 항원 결합 단백질은 완전한 치료를 발휘하거나 또는 질병의 모든 증후군 또는 징후를 근절하여 실행가능한 치료제(viable therapeutic agent)를 구성하여야 할 필요는 없다. 관련분야에서 인식되는 바와 같이, 치료제들로서 사용되는 약물들은 주어진 질병 상태의 중증도를 감소시킬 수 있으며, 치료제로서 유용한 것으로 여겨지도록 하기 위하여 질병의 모든 징후를 제거하여야 할 필요는 없다. 유사하게, 예방의학적적으로 집행되는 치료는 실행가능한 치료제를 구성하기 위하여 상태의 개시를 예방함에 있어서 완전하게 유효하여야 할 필요는 없다. 질병의 영향을 단순히 감소시키거나(예를 들면, 질병의 증후군들의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것에 의하거나 또는 다른 치료의 유효성을 증가시키는 것에 의하거나 또는 다른 이로인한 효과를 산출하는 것에 의하여), 대상체 내에서 상기 질병이 발생하거나 또는 악화되는 것과 같은 감소시키는 것으로 충분하다. 본 발명의 하나의 구체예는 특정의 장애의 중증도를 반영하는 표시자(indicator)의 기준선(baseline) 너머로의 지속되는 개선(sustained improvement)을 유도하기에 충분한 양 및 시간 동안의 항원 결합 단백질을 환자에 투여하는 것을 포함하는 방법에 지향된다.

[0300] 약제학적 조성물들

[0301] 일부 구체예들에 있어서, 본 발명은 치료적 유효량의 하나 또는 그 이상의 본 발명의 상기 항원 결합 단백질들을 약제학적으로 수용가능한 희석제(diluent), 담체(carrier), 가용화제(solubilizer), 에멀전화제(emulsifier), 방부제(preservative) 및/또는 부형제(adjunct)들을 포함하는 약제학적 조성물들을 제공한다. 게다가, 본 발명은 이러한 약제학적 조성물을 투여하는 것에 의하여 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 용어 "환자"는 인간 및 동물 대상체들을 포함한다.

[0302] 하나 또는 그 이상의 항원 결합 단백질들을 포함하는 약제학적 조성물들이 TSLP 활성을 감소시키는 데 사용될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 항원 결합 단백질들을 포함하는 약제학적 조성물들이 TSLP 활성화와 연관되는 결과들, 증후군들 및/또는 병리학을 치료하는 데 사용될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 항원 결합 단백질들을 포함하는 약제학적 조성물들이 본 발명의 상기 항원 결합 단백질을 TSLP에 제공하는 것을 포함하는 TSLP의 TSLPR에의 결합 및/또는 시그널링을 저해하는 방법들에서 사용될 수 있다.

[0303] 특정의 구체예들에 있어서, 수용가능한 제형물질(formulation materials)들은 사용된 투여량(dosages)들 및 농도들에서 공급받는 자(recipients)들에게 비독성이다. 특정의 구체예들에 있어서, 상기 약제학적 조성물은, 예를 들면, 상기 조성물의 pH, 삼투압농도(osmolality), 점도, 투명도, 색상, 등장도(isotonicity), 냄새, 멸균도(sterility), 안정성, 분해 또는 방출속도, 흡수 또는 투과도를 변형, 유지 또는 보존하기 위한 제형물질들을 포함할 수 있다. 이러한 구체예들에 있어서, 적절한 제형물질들에는 아미노산(글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신 등과 같은); 향균제; 향산화제(아스코르빈산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨 등과 같은); 완충제(붕산염, 중탄산염, 트리스-염산, 시트르산염, 인산염 또는 다른 유기산들 등과 같은); 증량제(bulking agents ; 만니톨 또는 글리신 등과 같은); 킬레이트화제(에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)); 착화제(complexing agents ; 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-사이클로덱스트린 또는 히드록시프로필-베타-사이클로덱스트린); 충전제(fillers); 당당류; 이당류; 및 다른 탄수화물(글루코스, 슈크로스, 만노스 또는 텍스트린 등과 같은); 단백질(혈청알부민, 젤라틴 또는 면역글로블린 등과 같은); 착색제, 착향제 및 희석제; 에멀전화제; 친수성 중합체(폴리비닐피롤리돈 등과 같은); 저분자량 폴리펩티드; 염-형성 짝이온(salt-forming counterions ;

나트륨 등과 같은); 방부제(벤잘코늄클로라이드, 안식향산, 살리실산, 티메로살, 페네틸알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르빈산 또는 과산화수소 등과 같은); 용제(글리세린, 프로필렌글리콜 또는 폴리에틸렌글리콜 등과 같은); 당알코올(만니톨 또는 소르비톨 등과 같은); 현탁화제; 계면활성제 또는 적심제(wetting agents)(플루로닉, 폴리에틸렌글리콜, 소르비탄에스테르, 폴리소르베이트 20 등과 같은 폴리소르베이트, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 킬록사팜 등과 같은); 안정성증강제(슈크로스 또는 소르비톨 등과 같은); 장력증강제(tonicity enhancing agents ; 알칼리금속 할로젠화물, 바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨, 만니톨, 소르비톨 등과 같은); 전달비히클(delivery vehicles); 희석제; 첨가제(excipients) 및/또는 약제학적 부형제들이 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다. 레밍턴의 약제학(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18" Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company)을 참조하시오.

[0304] 특정의 구체예들에 있어서, 적절한 약제학적 조성물은 당해 기술분야에 숙련된 자에 의하여, 예를 들면, 목적하는 투여의 경로, 전달방식(delivery format) 및 원하는 투여량에 따라 결정될 수 있을 것이다. 예를 들면, 위의 레밍턴의 약제학을 참조하시오. 특정의 구체예들에 있어서, 이러한 조성물들은 물리적인 상태, 안정성, 본 발명의 상기 항원 결합 단백질들의 생체 내 방출 속도 및 생체 내 정화값(clearance)에 영향을 줄 수 있다. 특정의 구체예들에 있어서, 약제학적 조성물 내의 1차 비히클(primary vehicle) 또는 담체는 속성에 있어서 수성 또는 비-수성이 될 수 있다. 예를 들면, 적절한 비히클 또는 담체는 주사를 위한 물, 비경구투여(parenteral administration)를 위한 조성물들에서 공통적인 다른 물질들로 보충된 생리식염수 또는 인공뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid)들이 될 수 있다. 중성의 완충된 식염수 또는 혈청알부민과 혼합된 식염수들이 다른 예시적인 비히클들이다. 특정의 구체예들에 있어서, 약제학적 조성물들은 대략 pH 7.0 내지 8.5의 트리스 완충제 또는 대략 pH 4.0 내지 5.5의 아세트이트 완충제를 포함하며, 또한 소르비톨 또는 적절한 대체물(substitute)을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 특정의 구체예들에 있어서, TSLP 항원 결합 단백질 조성물들은 선택적인 제형화제(formulation agents)(위의 레밍턴의 약제학)와 함께 원하는 순도를 갖는 선택된 조성물을 동결건조된 케이크(lyophilized cake) 또는 수성용액의 형태로 혼합하는 것에 의하여 저장용으로 제조될 수 있다. 더욱이, 특정의 구체예들에 있어서, 상기 TSLP 항원 결합 단백질은 슈크로스 등과 같은 적절한 첨가제들을 사용하여 동결건조물(lyophilizate)로서 제형화될 수 있다.

[0305] 본 발명의 상기 약제학적 조성물들은 비경구적 전달용으로 선택될 수 있다. 달리, 상기 조성물들은 흡입용 또는 경구적으로 등과 같이 소화관(digestive tract)을 통한 전달용으로 선택될 수 있다. 상기 제형화 구성요소들은 바람직하게는 투여의 장소에 수용가능한 농도들로 존재한다. 특정의 구체예들에 있어서, 완충제들은 상기 조성물을 생리학적인 pH에서, 또는 약간 더 낮은 pH에서, 전형적으로는 약 5 내지 약 8의 범위의 pH 내로 사용된다. 약 5.1, 약 5.2, 약 5.3, 약 5.4, 약 5.5, 약 5.6, 약 5.7, 약 5.8, 약 5.9, 약 6.0, 약 6.1, 약 6.2, 약 6.3, 약 6.4, 약 6.5, 약 6.6, 약 6.7, 약 6.8, 약 6.9, 약 7.0, 약 7.1, 약 7.2, 약 7.3, 약 7.4, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.7, 약 7.8, 약 7.9 및 약 8.0들이 포함된다.

[0306] 비경구적 투여가 고려되는 경우, 본 발명에서 사용되기 위한 상기 치료적인 조성물(therapeutic compositions)들은 약제학적으로 수용가능한 비히클 내에 원하는 TSLP 항원 결합 단백질을 포함하는 무-발열인자(pyrogen-free)의, 비경구적으로 수용가능한 수성용액의 형태로 제공될 수 있다. 비경구적 주사를 위한 특히 적절한 비히클은 멸균 증류수이며 그 안에 상기 TSLP 항원 결합 단백질이 멸균, 등장의, 적절하게 방부처리된 용액으로서 제형화된다. 특정의 구체예들에 있어서, 조제용 물질(preparation)은 주사가 가능한 미소구(microspheres), 생분해성(bio-erodible)의 입자, 중합체성 화합물(폴리유산 또는 폴리글리콜산 등과 같은), 비드(beads) 또는 리포솜 등과 같은 약품들과 함께 원하는 분자의 제형을 포함할 수 있으며, 이들은 데포주사(depot injection)을 통하여 전달될 수 있는 제품의 제어되거나 또는 지속되는 방출을 제공할 수 있다. 특정의 구체예들에 있어서, 히알루론산이 또한 사용되어 순환에 있어서 지속되는 내구기간(sustained duration)의 효과를 갖도록 할 수 있다. 특정의 구체예들에 있어서, 이식가능한 약물 전달 기구들이 사용되어 원하는 항원 결합 단백질을 도입하도록 할 수 있다.

[0307] 본 발명의 약제학적 조성물들은 흡입용으로 제형화될 수 있다. 이들 구체예들에 있어서, TSLP 항원 결합 단백질들은 바람직하게는 건조된, 흡입가능한 분말로 제형화된다. 특정의 구체예들에 있어서, TSLP 항원 결합 단백질 흡입 용액들이 또한 에어로졸 전달(aerosol delivery)을 위한 추진제와 함께 제형될 수 있다. 특정의 구체예들에 있어서, 용액들은 또한 분무될 수 있다. 따라서, 폐 투여 및 제형화 방법은 국제특허출원 제 PCTUS94/001875호에 더욱 기술되며, 이는 여기에 참조로 인용되며, 또한 화학적으로 변형된 단백질들의 폐 전달을 기술하고 있다.

[0308] 상기 제형들이 경구적으로 투여될 수 있다는 것이 또한 고려된다. 이러한 방법으로 투여되는 TSLP 항원 결합

단백질들은 정제 또는 캡슐 등과 같은 고정 투여량 형태(solid dosage forms)의 컴파운딩(compounding)에서 상용적으로 사용되는 담체들과 함께 또는 담체들 없이 제형화될 수 있다. 특정의 구체예들에 있어서, 캡슐은 생물학적 이용가능성(bioavailability)이 극대화 되고 그리고 전전신적 분해(pre-systemic degradation)가 최소화 될 때 위장관의 지점에서 제형의 상기 활성부분을 방출하도록 설계될 수 있다. 상기 TSLP 항원 결합 단백질의 흡수를 용이하게 하기 위한 별도의 약제들이 포함될 수 있다. 희석제, 착향제, 저용점의 왁스, 식물성 오일, 윤활제, 현탁화제, 정제 봉해제 및 결합제들이 또한 사용될 수 있다.

[0309] 본 발명의 약제학적 조성물들은 정제들의 제조에 적절한 비독성의 부형제들과의 혼합물 내에 유효량의 하나 또는 복수의 TSLP 항원 결합 단백질들을 포함하도록 제공된다. 멸균수 또는 다른 적절한 비히클 내에 상기 정제들을 용해시키는 것에 의하여, 용액들이 단위-투여량 형태(unit-dose form)로 제조될 수 있다.

[0310] 적절한 부형제들에는 탄산칼슘, 탄산나트륨 또는 중탄산나트륨, 락토오스 또는 인산칼슘 등과 같은 비활성 희석제; 또는 전분, 젤라틴 또는 아카시아(acacia) 등과 같은 결합제; 또는 스테아린산마그네슘, 스테아린산 또는 활석(talc) 등과 같은 윤활제들이 포함되나, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0311] TSLP 항원 결합 단백질들을 포함하는, 지연-전달 또는 제어-전달 제형들로의 추가의 약제학적 조성물들은 당해 기술분야에서 숙련된 자들에게는 명백할 것이다. 리포솜 담체(liposome carriers), 생분해성 마이크로입자(bio-erodible microparticles) 또는 다공성 비드(porous beads) 및 데포 주사 등과 같은 다양한 다른 지연-전달 또는 제어-전달의 수단으로 제형화하는 기술들이 당해 기술분야에서 숙련된 자들에게는 또한 공지된 것이다. 예를 들면, 참조로 인용되며 또한 약제학적 조성물들의 전달을 위한 다공성의 중합체성 마이크로입자들의 제어된 방출을 기술하는 국제특허출원 제PCT/US93/00829호를 참조하시오.

[0312] 지연-방출 제제들은 형성화된 물품들, 예를 들면, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태의 반투과성의 중합체 매트릭스(semipermeable polymer matrices)를 포함할 수 있다. 지연 방출 매트릭스들에는 폴리에스터, 하이드로겔(hydrogels), 폴리락티드(각각 참조로 인용되는 미합중국 특허 제3,773,919호 및 유럽특허공개공보 제EP 058481호 등과 같은), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(시드만(Sidman)과 그의 동료들의 1983, Biopolymers 2:547-556), 폴리(2-하이드록시에틸렌에타크릴레이트)(랑거(Langer)와 그의 동료들의 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 및 랑거의 1982, Chem. Tech. 12:98-105), 에틸렌비닐아세테이트(랑거와 그의 동료들의 위의 1981 문헌) 또는 폴리-D(-)-3-하이드록시부틸산(유럽특허공개공보 제EP 133,988호)들이 포함될 수 있다.

[0313] 지연 방출 조성물들에는 또한 당해 기술분야에서 공지된 여러 기술들 중의 임의의 것에 의해 제조될 수 있는 리포솜들이 포함될 수 있다. 예를 들면, 참조로 인용되는 엡스타인(Eppstein)과 그의 동료들의 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; 유럽특허공개공보 제EP 036,676호; 동 제EP 088,046호 및 동 제EP 143,949호들을 참조하시오.

[0314] 생체 내 투여를 위하여 사용되는 약제학적 조성물들은 전형적으로는 멸균 제제들로서 제공된다. 멸균(sterilization)은 멸균여과막(sterile filtration membranes)을 통한 여과에 의해 수행될 수 있다. 상기 조성물이 동결건조되는 경우, 이러한 방법을 사용하는 멸균이 동결건조 및 재구성(reconstitution) 전 또는 후 둘 중 어느 하나에서 수행될 수 있다. 비경구투여를 위한 조성물들은 동결건조된 형태 또는 용액으로 저장될 수 있다. 비경구적 조성물들은 대체로 멸균 접근 구멍(sterile access port)을 구비한 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘로 찔러 넣을 수 있는 스톱퍼(stopper)를 구비한 정맥내 용액백(intravenous solution bag) 또는 바이알(vial) 내에 보관한다.

[0315] 본 발명의 관점들에는 자가-완충의 TSLP 항원 결합 단백질 제형(self-buffering TSLP antigen binding protein formulations)들이 포함되며, 이들은 본 명세서에서 그 전체로 참조로 인용되는 국제특허출원 공개공보 제WO 0613818 1A2 (PCT/US2006/022599)에서 기술된 바와 같은 약제학적 조성물들로서 사용될 수 있다. 하나의 구체예는 총 염 농도가 150mM 이하인 TSLP 항원 결합 단백질을 포함하는 자가-완충의 TSLP 항원 결합 단백질 제형들을 제공한다.

[0316] 사용될 TSLP 항원 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물의 치료적 유효량은, 예를 들면, 치료적인 정황(therapeutic context) 및 목표(objectives)들에 의존적일 수 있다. 당해 기술분야에서 숙련된 자들에게는 치료를 위한 적절한 투여량 수준들이 부분적으로는 전달되는 상기 분자, 상기 TSLP 항원 결합 단백질이 사용되는 징후, 투여의 경로 및 환자의 크기(체중, 체표면적 또는 장기 크기) 및/또는 환자의 상태(연령 및 일반적인 건강)에 의존적일 수 있다는 것은 이해될 수 있는 것이다.

- [0317] 특정의 구체예들에 있어서, 임상의는 적절한 치료 효과를 얻기 위하여 투여량을 적정하고 투여 경로를 변경할 수 있다. 전형적인 투여량은 앞서 언급한 상기 인자들에 따라 약 0.1 μ g/kg 내지 약 30mg/kg의 범위 또는 그 이상이 될 수 있다. 특정의 구체예들에 있어서, 상기 투여량(dosage)은 0.1 μ g/kg 내지 약 30mg/kg까지, 선택적으로 1 μ g/kg 내지 약 30mg/kg까지 또는 10 μ g/kg 내지 약 5mg/kg까지의 범위가 될 수 있다.
- [0318] 투여주기(dosing frequency)는 사용되는 제형 내의 특정한 TSLP 항원 결합 단백질의 약물동력학적 변수(pharmacokinetic parameters)들에 의존적일 수 있다. 전형적으로, 임상의는 원하는 효과를 달성하는 투여량에 달할 때까지 상기 조성물을 투여한다. 따라서, 상기 조성물은 단일 투여량으로서, 또는 2회 또는 그 이상의 투여량들(이는 상기 원하는 분자의 동일량을 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있음)을 시간경과에 따라 또는 이식기구(implantation device) 또는 카테터를 통하여 연속적인 투입으로 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 그 이상의 상세(refinement)는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에 의하여 일상적으로 수행된다.
- [0319] 적절한 투여량들은 적절한 투여-반응 데이터(dose-response data)의 사용을 통하여 알아낼 수 있다. 특정의 구체예들에 있어서, 본 발명의 상기 항원 결합 단백질들은 연장된 시간의 기간을 통하여 환자들에게 투여될 수 있다. 본 발명의 항원 결합 단백질의 만성적 투여는 통상적으로 완전한 인간이 아닌, 예를 들면, 비-인간의 동물 내에서 인간 항원, 예를 들면, 불완전한 인간 항체 또는 비-인간의 종들 내에서 생산되는 비-인간의 항체인 항원 결합 단백질들과 연관되는 면역부작용 또는 알러지반응들을 최소화한다.
- [0320] 상기 약제학적 조성물의 투여의 경로는 공지의 방법들, 예를 들면, 경구적으로, 정맥내, 복강내, 뇌내(유조직내(intra-parenchymal)), 뇌실내(intracerebroventricular), 근내(intramuscular), 안내(intra-ocular), 동맥내, 문맥내(intraportal) 또는 병소내 주사를 통하여; 자연 방출 시스템들에 의하거나 또는 이식기구들에 의하는 것들에 따른다. 특정의 구체예들에 있어서, 상기 조성물들은 일시주사 또는 투입에 의하여 연속적으로 또는 이식기구에 의하여 투여될 수 있다.
- [0321] 상기 조성물은 또한 그 위에 원하는 분자가 흡수되거나 또는 캡슐화된 막, 스펀지 또는 다른 적절한 물질의 이식을 통하여 국소적으로 투여될 수 있다. 특정의 구체예들에 있어서, 이식기구가 사용되는 경우, 상기 기구는 임의의 적절한 조직 또는 장기 내로 이식될 수 있으며, 원하는 분자의 전달은 확산, 시간 지연된 일시투여 또는 연속적인 투여를 통할 수 있다.
- [0322] 조합 요법들(combination therapies)
- [0323] 또 다른 구체예들에 있어서, 항원 결합 단백질은 환자가 고통받는 상태를 치료하는 데 유용한 다른 약물(agents)들과 함께 투여된다. 이러한 약물들의 예들에는 단백질성(proteinaceous) 또는 비-단백질성의 약물(drugs)들이 모두 포함된다. 다중의 치료법들이 공동투여(coadministered)되는 경우, 투여량들은 관련 분야에서 인식된 바와 같이 적절하게 조절될 수 있을 것이다. "공동투여" 및 조합 요법은 동시적인 투여로 제한되지 않을 뿐만 아니라, 환자에 적어도 하나의 다른 치료제(therapeutic agent)를 투여하는 것을 포함하는 치료의 과정 동안에 적어도 한번 항원 결합 단백질이 투여되는 치료식이요법(treatment regimens)들이 포함된다.
- [0324] 본 발명이 기술되는 하기의 실시예들은 제한을 위한 것이 아니고 설명을 위한 것으로 제공된다.
- [0325] 실시예 1 : 항원의 제조
- [0326] 여러 형태들의 재조합 TSLP가 면역원들로서 사용되었다. 인간 TSLP는 대장균 및 포유동물 세포들 둘 다의 내부에서 발현되었다. 대장균에서 생산된 TSLP는 태그되지 않은(untagged) 전장의 단백질이었다. TSLP 단백질은 아미노산 128 내지 132(RKRKV, SEQ ID NO: 371)에 대응하는 뉴클레오타이드 382 내지 396(AGAAAAAGGAAAGTC, SEQ ID NO: 370)을 결실시키는 것에 의해 생산된 결실된 퓨린 개열 사이트(furin cleavage site)를 갖는 COS PKB 세포들 내에서 생산되었다. 이 단백질은 C 말단 폴리HIS-플래그 태그(C terminal polyHIS-Flag tag)를 포함하였다(뉴클레오타이드 시퀀스 =

ATGTTCCCTTTTGCCTTACTATATGTTCTGTCAGTTTCTTTCAGGAAAATCTTCATCTTACA
ACTTGTAGGGCTGGTGTTAACTTACGACTTCACTAACTGTGACTTTGAGAAGATTAAAGC
AGCCTATCTCAGTACTATTTCTAAAGACCTGATTACATATATGAGTGGGACCAAAAGTAC
CGAGTTCAACAACACCGTCTCTTGTAGCAATCGGCCACATTGCCTTACTGAAATCCAGAG
CCTAACCTTCAATCCCACCGCCGGCTGCGCGTCGCTCGCCAAAGAAATGTTGCGCATGAA
AACTAAGGCTGCCTTAGCTATCTGGTGCCAGGCTATTCGGAAGCTCAGATAAATGCTAC
TCAGGCAATGAAGAAGAGGACAACCAATAAATGTCTGGAACAAGTGTACAAATTACAAG
GATTGTGGCGTCGCTTCAATCGACCTTTACTGAAACAACAGCATCACCATCACCATCAGC
ACTACAAAGACGATGACGACAAA (SEQ ID NO: 372);

[0327]

단백질 시퀀스 =

[0328]

MFPFALLYVLSVSFRKIFILQLVGLVLTDFNCDFEKIKAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNN
TVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKR
TTNKCLEQVSQQLGLWRRFNRPLLKQHHHHHHHDYKDDDDK (SEQ ID NO: 373).

[0329]

다른 캠페인(campaign)에 있어서, 전장의 TSLP C 말단 폴리HIS-플래그 태그된 단백질은 COS PKB 세포들 내에서
생산되었다(뉴클레오티드 시퀀스 =

[0330]

ATGTTCCCTTTTGCCTTACTATATGTTCTGTCAGTTTCTTTCAGGAAAATCTTCATCTTACA
ACTTGTAGGGCTGGTGTTAACTTACGACTTCACTAACTGTGACTTTGAGAAGATTAAAGC
AGCCTATCTCAGTACTATTTCTAAAGACCTGATTACATATATGAGTGGGACCAAAAGTAC
CGAGTTCAACAACACCGTCTCTTGTAGCAATCGGCCACATTGCCTTACTGAAATCCAGAG
CCTAACCTTCAATCCCACCGCCGGCTGCGCGTCGCTCGCCAAAGAAATGTTGCGCATGAA
AACTAAGGCTGCCTTAGCTATCTGGTGCCAGGCTATTCGGAAGCTCAGATAAATGCTAC
TCAGGCAATGAAGAAGAGGAGAAAAAGGAAAGTCACAACCAATAAATGTCTGGAACAA
GTGTACAATTACAAGGATTGTGGCGTCGCTTCAATCGACCTTTACTGAAACAACAGCAT
CACCATCACCATCAGACTACAAAGACGATGACGACAAA (SEQ ID NO: 374);

[0331]

단백질 시퀀스 =

[0332]

MFPFALLYVLSVSFRKIFILQLVGLVLTDFNCDFEKIKAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNN
TVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKR
RRKRVTTNKCLEQVSQQLGLWRRFNRPLLKQHHHHHHHDYKDDDDK (SEQ ID NO: 375).

[0333]

아미노산 시퀀스 1 내지 28(MFPFALLYVLSVSFRKIFILQLVGLVLT, SEQ ID NO: 376)이 이들 단백질을 둘 다의 성숙한
생성물로부터 개열된 단일 펩티드임을 주목하라.

[0334]

게다가, 사이노몰거스 TSLP가 퓨린 개열 사이트(아미노산 120 내지 124(RRKRV, SEQ ID NO: 371)에 대응하는 뉴
클레오티드 358 내지 372(AGAAAAGGAAAGTC, SEQ ID NO: 370) 결실된 것(DNA =

[0335]

=ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACCGG
TTACGACTTCACTAACTGTGACTTTTCAAGAGATTGAAGCAGACTATCTCCGTACTATTTCT
AAAGACCTGATTACATATATGAGTGGGACTAAAAGTACCGACTTCAACAACACCGTCTC
CTGTAGCAATCGGCCACACTGCCTTACTGAAATCCAGAGCCTAACCTTCAATCCCACCCC
CCGCTGCGCGTCGCTCGCCAAGGAAATGTTCCGCCAGGAAAATAAGGCTACCCTCGCTCT
CTGGTGCCAGGCTATTCGGAAGCTCAGATAAATGCTACTCAGGCAATGAAGAAGAGGA
CAACCAATAAATGTCTGGAACAAGTGTACAAATTACTAGGATTGTGGCGTCGCTTCATTC
GAACCTTACTGAAACAACAGCACCACCACCACCACCATGACTATAAAGACGATGACGAC
AAAT (SEQ ID NO: 377);

[0336]

단백질 =

[0337]

METDTLLLWVLLLWVPGSTGYDFNCDFFQKIEADYLRITISKDLITYMSGTKSTDFNNTVSCS
NRPHCLTEIQSLTFNPTPRCASLAKEMFARKTKATLALWCPGYSETQINATQAMKKRRTTNKC
LEQVSQQLGLWRRFIRTLTKQHHHHHHHDYKDDDDK (SEQ ID NO: 378)

[0338]

또는 COOS PKB 세포들 내의 동일한 C 말단 폴리HIS-플래그에 융합된 전장의/본래의 생성물(뉴클레오티드 시퀀스
=

[0339]

ATGGAGACAGACACACTCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGT
TACGACTTCACTAACTGTGACTTTTCAGAAAGATTGAAGCAGACTATCTCCGTACTATTCT
AAAGACCTGATTACATATATGAGTGGGACTAAAAGTACCGACTTCAACAACACCGTCTC
CTGTAGCAATCGGCCACACTGCCTTACTGAAATCCAGAGCCTAACCTTCAATCCCACCCC
CCGCTGCGCGTCGCTCGCCAAGGAAATGTTCCGCAAGGAAACTAAGGCTACCCTCGCTCT
CTGGTGCCAGGCTATTCGGAAGCTCAGATAAATGCTACTCAGGCAATGAAGAAGAGGA
GAAAAAGGAAAGTCACAACCAATAAATGTCTGGAACAAGTGTCACAATTACTAGGATTG
TGGCGTCGCTTCATTCGAACTTTACTGAAACAACAGCACCACCACCACCACCATGACTAT
AAAGACGATGACGACAAA (SEQ ID NO: 379);

[0340]

[0341]

단백질 =

METDTLLLWVLLLWVPGSTGYDFTNCDKFQKIEADYLRITISKDLITYMSGTKSTDFNNTVSCS
NRPHCLTEIQSLTFNPTPRCASLAKEMFARKTKATLALWCPGYSETQINATQAMKKRRKRKV
TTNKCLEQVSQLLGLWRRFIRTLKQKHHHHHHHDYKDDDDK (SEQ ID NO: 380)

[0342]

[0343]

중의 어느 하나와 유사하게 복제되고 그리고 서브클론되고/발현(subcloned/expressed)되었다. 아미노산 시퀀스 1 내지 20(METDTLLLWVLLLWVPGSTG, SEQ ID NO: 381)이 이들 사이노물거스 단백질들 둘 다의 성숙한 생성물로부터 개열된 단일 펩티드임을 주목하라.

[0344]

실시예 2 : 생쥐 항-인간 TSLP 항체들

[0345]

hTSLP-Fc가 Balb/c 생쥐(미합중국 메인주 바 하버 소재의 잭슨 라보레토리즈(Jackson Laboratories)의 면역화를 위하여 사용되었다. 수 회의 면역화 후, 비장으로부터 림프구들이 방출되었으며, 50% PEG/DMSO(시그마사)로의 화학적 융합에 의하여 생쥐 골수종 세포들 NS1(ATCC)으로 융합되었다. 상기 융합된 세포들을 10% PBS, 5% 오리젠 복제인자(Origen Cloning Factor ; 바이오베리스™(BioVeris™)), 1배량의 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 피루빈산나트륨(Penicillin-Streptomycin-Glutamine, Sodium Pyruvate ; 인비트로젠(Invitrogen))으로 보충된 200 μ l의 DMEM HAT(0.1mM 하이포크산틴(hypoxanthine), 0.16mM 티미딘(thymidine), 4mM 아미노프테린(aminopterin), 시그마사) 배지 내에서 2×10^4 세포들/웰의 농도로 96-웰 플레이트(96-well plates)들 내에 접종시켰다. 배지를 융합 후 7일에서 10% FBS, 5% 오리젠 복제인자(바이오베리스™), 1배량의 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 피루빈산나트륨(인비트로젠)으로 보충된 DMEM HT(0.1mM 하이포크산틴, 0.16mM 티미딘) 배지로 대체하였다. 조정된 배지를 배지 교환 2일 후에 수집하고 그리고 1차의 스크리닝(primary screening)을 수행하였다.

[0346]

실시예 3 : 완전한 인간 항체 생성

[0347]

예를 들어, 미합중국 특허출원 제2005/0118643호, 미합중국 특허 제6114598호, 동 제6162963호, 동 제7049426호, 동 제7064244호, 그리고 그의 동료들의 Nature Genetics 7:13-21 (1994), 메데즈(Medez)와 그의 동료들이 Nature Genetics 15:146-156 (1997), 그리고 자코보비티스(Green and Jakobovitis)의 J. Ex. Med. 188:483-495 (1998)들에서 기술되고(이들 모두는 본 명세서에서 참조로 인용됨) 그리고 이하에서 기술되는 바와 같은 제노마우스®(XenoMouse®) 기술을 사용하여 TSLP에 대해 특이적인 완전한 인간 모노클로날 항체들이 생성되었다.

[0348]

두 캠페인들이 수행되었다. 캠페인 1에 있어서는, 제노마우스®의 IgG2 및 IgG4 코호트(cohorts)들이 활용되었다. 대장균을 수용한 생쥐들의 50%는 인간 TSLP를 생산하였고 그리고 포유동물을 수용한 50%는 인간 TSLP(앞서 기술된)를 생산하였다. 효소면역측정(ELISA ; 이하에서 기술된)에 의하여 혈청적정(serum titers)들을 모니터링하였으며, 하기의 프로토콜(protocols)들을 사용하여 가장 우수한 적정들을 갖는 생쥐들을 융합시켰다.

[0349]

선택된 생쥐들을 희생시켰으며, 배출되는 림프절(lymph nodes)들을 수확하고 그리고 각 코호트로부터 저장시켰다. 림프성의 세포들을 B세포들 및 골수종 세포들로 융합된 B세포들로 풍부화시켜 하이브리도마들을 생성시켰다. 계속해서 상기 융합된 하이브리도마 세포주들을 하이브리도마 배지 내에 플레이트팅시켰으며, 37°C에서 10 내지 14일 동안 배양시켰다. 이하에서 기술되는 바와 같이 효소면역측정에 의하여 TSLP에 결합하는 IgG 항체들에 대하여 하이브리도마 상청액(supernatants)들을 스크리닝하였다.

[0350]

두 번째의 캠페인은 IgG2 제노마우스®의 두 코호트들을 포유동물 생성 인간 TSLP로 면역화시키는 것으로 개시되었으며, 하나의 코호트를 사이노물거스 TSLP로 부스팅(boosted) 시켰다. 수 회의 면역화 후, 림프절들로부터의 림프구들을 앞서 기술한 바와 같이 융합시키고 그리고 배양시켰다. 배양 후, 이하에서 기술되는 바와 같이

효소면역측정에 의하여 TSLP에의 결합에 대하여 하이브리도마 상청액들을 스크리닝하였다.

[0351] 이하에서 기술되는 분석법들을 기반으로 하는 계속되는 서브클로닝에 대하여 두 캠페인들로부터의 폴리클로날 상청액들이 선택되었다. TSLP 활성의 잠재적인 저해제들(potent inhibitors)인 항체들을 포함하는 하이브리도마들을 동정하고 그리고 사이노 TSLP(cyno TSLP)에 대한 교차-반응성을 더 결정하였다. 그 결과들을 하기 실시예 5에서 나타내었다. 이하에서 기술되는 원발성의 DC 분석에서의 그들의 성능을 기반으로 하여 기대되는 하이브리도마 상청액들이 선택되었다. 이들 하이브리도마들은 그 이상의 시험을 위하여 복제되고 그리고 확장된 단일세포(single cell)이었다. 계속해서 이하에서 기술된 바와 같이 상기 항체들을 정제하였다.

[0352] 마브 셀렉트(Mab Select ; 지이 헬스케어(GE Healthcare)) 수지를 사용하여 상기 하이브리도마들의 조정된 배지로부터 항체들을 정제하였다. PBS로 평형화된 마브 셀렉트 수지의 1 : 2 슬러리 100 μ l를 조정된 배지(conditioned media ; CM) 7 내지 10ml 사이에서 첨가하였다. 튜브들을 4 내지 8℃에서 밤새도록 회전기(totators)들 상에 위치시켰다. 상기 튜브들을 1,000*g에서 5분간 원심분리시켰으며, 비-결합된 분획(non-bound fraction)을 따라내었다. 상기 수지를 5ml의 PBS로 세척하고 그리고 앞서와 같이 원심분리시키고 그리고 따라내었다. 계속해서 상기 수지를 스펀-엑스(SPIN-X), 0.45 μ m, 2ml 튜브로 옮겼다. 상기 수지를 별도로 0.5 ml의 PBS로 2회 세척시키고, 그리고 원심분리시켰다. 실온에서 그리고 간헐적인 10분간의 혼합으로 배양시키는 것에 의하여 상기 마브들을 0.1M 아세트산 0.2ml로 용리시켰다. 상기 튜브들을 원심분리시켰으며, 1M 트리스 완충제(Tris buffer) pH 8.0 30 μ l을 상기 용리액(eluate)에 첨가시켰다. 정제된 마브들을 4 내지 8℃에서 저장하였다.

[0353] 실시예 4 : 항체 분석법들

[0354] A. 항-TSLP 항체의 존재를 검출하기 위한 효소면역측정

[0355] 96 웰 플레이트들을 1배량의 PBS/0.05% 아지드(azide) 내의 재조합적으로 생산된 wtHuTSLP 또는 pHisFlag 2 μ g/ml에서 결합시킨 코스타 3368(Costar 3368)로 코팅시키고, 그리고 4℃에서 배양시키는 것에 의하여 효소면역측정을 수행하였다. 상기 플레이트들을 1배량의 PBS/1% 우유(분석 희석제) 250 μ l로 세척하고 그리고 차단시켰으며, 실온에서 적어도 30분간 배양시켰다.

[0356] 대략 50 μ l/웰의 하이브리도마 상청액들, 양성 대조 생쥐 항체 M885 또는 음성 대조들을 첨가하고 그리고 실온에서 2시간 동안 배양시켰다. 상기 플레이트들을 세척하고 그리고 2차 항체(secondary antibody), 염소 항-인간 IgG Fc HRP(피어스(Pierce)) 또는 달리 염소 항-생쥐 IgG HRP(잭슨 랩스(Jackson Labs))들을 분석 희석액 내에 400ng/ml에서 적용시켰다. 상기 플레이트들을 실온에서 1시간 동안 배양시키고, 세척하고 그리고 450nm에서 광학적밀도(OD) 판독을 하였다.

[0357] B. 하기의 기능적인 분석법들을 사용하여 항-TSLP 하이브리도마들의 스크리닝을 수행하였다.

[0358] 1. 96웰 플레이트들을 수용체와 인간 Fc 사이에 8개의 아미노산 링커(8 aa acid linker ; SGGAPMLS, SEQ ID NO: 382)를 갖는 가용성의 huIL-7Ra-huTSLPR-Fc 단백질로 코팅시키고, 4℃에서 밤새도록 배양시켰다.

[0359] 2. 상기 플레이트들을 PBS ++ 1% BSA + 5% 슈크로스로 세척하고 그리고 1시간 동안 실온에서 차단시켰다.

[0360] 3. 상기 플레이트들을 비오틴일화된 huTSLPHFdel(biotinylated huTSLPHFdel ; HF는 폴리His 플래그를 의미하고, 여기에서 상기 TSLP는 결실된 류린 개열 사이트를 갖는다)(del))로 배양시켰다. 계속해서 상기 플레이트들을 양성 대조로서 (+/-) 하이브리도마 상청액들 또는 생쥐 항-인간 TSLP(M385)를 실온에서 2시간 동안 배양시켰다.

[0361] 4. SA-HRP(스트렙타비딘-고추냉이 과산화효소 ; streptavidin-horseradish peroxidase) 검출

[0362] SA는 비오틴일화된 huTSLPHFdel의 비오틴 부분에 강하게 결합하고 그리고 HRP는 과산화수소에 의한 크로모젠(chromogen), TMB(이는 청색으로 변화함)의 산화를 촉매한다.

[0363] B. 세포 기반 분석법들

[0364] 1) 하이브리도마 상청액들 또는 정제된 항체들에 의하여 상기 인간 TSLPR-IL7R 착체를 발현하는 안정한 BAF 세포주의 TSLP-유도 증식의 저해를 하기의 프로토콜에 따라 결정하였다.

[0365] 1. 성장 배지(growth media) 내의 BAF: Hu TSLPR 안정한 세포주들, RPMI 1640 + 10% FBS + 1% L-글루타민 + 0.1% Pen/Strep + 0.1% 2-ME를 10ng/ml의 huTSLPHFwt를 첨가한 것을 제외하고는 상기 성장 배지와 동일한 보존

배지(maintenance media) 내에서 사용된 TSLP를 제거하였다.

- [0366] 2. 웰들 내에서 실온에서 30분간 HuTSLPwtpHF (+/-) 또는 사이노몰거스 TSLPwtpHF (+/-)를 하이브리도마 상청액/정제된 항체/ 또는 생쥐 항-인간 TSLP(M385)로 배양시켰다.
- [0367] 3. 5×10^4 BAF 세포/웰을 첨가하고 그리고 3일간 배양시켰다.
- [0368] 4. 상기 세포들을 적정된 티미딘(1 uCi/웰)과 함께 밤새도록 진동시켰다(pulsed). 상기 BAF 세포들의 세포 증식, 또는 그의 저해를 상기 세포들에 의한 적정된 티미딘 내포(CPM)의 양으로 평가하였다.
- [0369] 2) 1차 세포 분석(Primary cell assay). 하이브리도마들 또는 정제된 항체들에 의한 1차 인간 수지상 세포(primary human dendritic cells ; DC)로부터의 TSLP 유도 오스테오프로테제린(osteoprotegerin ; OPG)(미합중국 특허 제6,284,728호에 기술됨)의 저해를 하기의 프로토콜에 따라 결정하였다.
- [0370] 1. 말초혈액 CD11c+ 골수의 DCs들을 CD1c(BDCA-1)DC 단리 키트(필테니이 바이오텍(Miltenyi Biotec))을 사용하는 정상의 내부 도우너(inhouse donor) 백혈구 성분 채집 팩(leukapheresis packs)들로 풍부화시켰다.
- [0371] 2. huTSLPwtpHF(+/-) 또는 사이노몰거스 TSLPwtpHF를 상청액들 또는 정제된 항체 또는 생쥐 항-인간 TSLP와 함께 실온에서 30분간 배양시켰다.
- [0372] 3. 1×10^5 세포/웰을 첨가하고 그리고 48시간 동안 배양시켰다. 상청액들을 수확하고 그리고 효소면역측정에 의한 OPG 생산에 대한 분석을 수행하였으며, 하이브리도마 상청액들 또는 정제된 항체들에 의한 OPG 생산의 저해를 결정하였다. 알앤디 시스템즈 듀오셋® 발달 키트(R&D systems DuoSet® development kit)를 사용하여 OPG 효소면역측정을 수행하였다. 항-TSLP들은 용량-의존적인 방법(dose-dependent manner)으로 세포들로부터의 OPG 생산을 저해하였다.
- [0373] 3) 사이노몰거스 말초혈액 모노클로날 세포 분석
- [0374] 하이브리도마 상청액들 또는 정제된 항체들에 의한 사이노TSLP 유도 CCL22/MDC의 저해를 하기의 프로토콜에 따라 결정하였다.
- [0375] 1. 이소림프(isolymph) 상의 1 : 1 혈액 : PBS 혼합물 상에 올려놓는 것에 의해 사이노몰거스 원숭이(SNBL)들로부터 수득된 말초혈액으로부터의 말초혈액 모노클로날 세포들(PBMC)들을 수득하였다.
- [0376] 2. 사이노몰거스 TSLPwtpHF(+/-) 상청액들/정제된 항체 또는 가용성 huIL-7Ra-huTSLPR-Fc를 실온에서 30분간 배양시켰다.
- [0377] 3. 4×10^5 세포/웰을 첨가하고 그리고 5일 동안 배양시켰다. 상청액들을 수확하고 그리고 효소면역측정에 의하여 사이노몰거스 CCL22/MDC 생산에 대하여 분석하였다.
- [0378] 실시예 5 : K_D 결정
- [0379] CM4 센서 칩이 장착된 바이어코어 3000(Biacore 3000Biacore 3000) 기기(스웨덴 옴살라 소재의 바이어코어 인터내셔널 아베(Biacore International AB) 제품)를 사용하여 25°C에서 본 출원에서 기술되는 표면 플라즈몬 공명 실험(surface plasmon resonance experiments)들을 수행하였다. 항-Fc γ 특이적인 포획 항체(Anti-Fc γ specific capture antibodies)들을 구동완충제(running buffer)로서 HBS-EP를 갖는 표준 아민-결합 화학을 사용하여 CM4 칩 상의 2개의 유세포(flow cells)들에 공유적으로 부동태화시켰다. 간단하게, 각 유세포를 0.1M NHS와 0.4M EDC의 1 : 1(v/v) 혼합물로 활성화시켰다. 10mM 아세트산나트륨 pH 5.0 내의 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 어핀퓨어 염소 항-인간 IgG(AffiniPure Goat Anti-Human IgG), Fc γ 단편 특이적 항체(미합중국 팬실베니아 웨스트 그로브 소재의 잭슨 임뮤노리서치 인코포레이티드(Jackson ImmunoResearch Inc.))를 2개의 유세포들 상에서 3,000RUs의 목표 수준으로 부동태화시켰다. 잔존의 반응성 표면을 1M 에탄올아민의 주입으로 비활성화시켰다. 계속해서 모든 잔존 단계들에 대하여 상기 구동완충제를 HBS-EP + 0.1mg/ml BSA로 교체하였다.
- [0380] 하기의 항체들을 테스트하였다. A5 IgG2는 정제된 클로날 항체이고, A2 IgG1 및 IgG2들은 재조합의 정제된 항체들이고, 그리고 A3 IgG4 및 A4 IgG4들은 클로날 상청액들이었다. 상기 항체들을 구동완충제로 적절하게 희석시켜 시험 유세포 상으로의 $10 \mu\text{l}$ /분에서의 2분간의 주사가 항체의 대략 110 내지 175 응답단위(response units)가 상기 시험 유세포 표면 상에 포획되는 결과를 가져오도록 하였다. 대조 유세포 표면 상에 포획된 항체는 없었다. 계속해서 블랭크 완충제(buffer blanks)들과 함께 여러 농도들에서의 인간, 사이노 또는 돌연변이

TSLP들을 상기 2개의 유세포들 상으로 흘려 보냈다. 인간 및 사이노 TSLP에 대한 농도범위들은 0.44 내지 100nM인데 반하여 쥐의 동물의 TSLP에 대한 농도범위는 8.2 내지 6000nM이었다. 50 μ l/분의 유속(flow rate)이 사용되었으며, 10 내지 30분의 해리단계(dissociation phase)에 후속하여 2분간의 결합단계(association phase)가 이어졌다. 매 회 이후, 표면들을 10mM 글리신 pH 1.5의 30초 간의 주사로 재생시켰다. 계속해서 신생의 항체(fresh antibody)를 시험 유세포 상에 포획시켜 다음 회를 위한 준비를 하였다.

[0381] 대조 표면 응답들을 제거하여 벌크 굴절률(bulk refractive index) 변화를 제거하고 그리고 계속해서 실험적인 유세포들로부터 평균된 블랭크 완충제 응답을 제거하여 시스템적인 인위물(systematic artifacts)들을 제거하는 것에 의하여 데이터를 이중대조(double referenced) 하였다. 상기 TSLP 데이터를 가공하고 그리고 비아 평가 소프트웨어 버전 4.1(BIA evaluation Software v 4.1 ; 스웨덴 옵살라 소재의 바이어코어 인터내셔널)에서 국지적 Rmax에 대하여 1 : 1 상호작용 모델(interaction model)로 국제적으로 맞추었다. 결합(k_a) 및 해리(k_d) 속도상수들을 결정하였으며, 해리평형상수(k_D)를 계산하는 데 사용하였다. 상기 해리속도상수들 및 해리평형상수들을 실시예 6에서 나타난 표 내에 요약하였다.

[0382] 실시예 6 : 항체들의 시험관 내 활성

[0383] 이하의 항체들을 앞서의 k_d 및 K_D 에 대하여 기술된 바이어코어 분석을 사용하여 특정하였다. IC50(pM)을 결정하는 데 일차 수지상 세포 분석을 사용하였다. A5에 대한 데이터는 정제된 클로날 항체에 대하여 생성되었으며, A2에 대하여는 재조합된 정제 항체에 대하여 생성되었으며, 또한 A3 및 A4에 대한 데이터는 클로날 상청액에 대하여 생성되었다. TSLP의 모든 버전들은 포유동물 세포들로부터 생성되었다.

항체	TSLP	kd (1/x) off-rate	KD (pM)	IC50 (pM)
A5 IgG2	Hu TSLP	7.36×10^{-5}	29.2	100-220
	사이노TSLP	8.64×10^{-5}	51.2	680-970
	Mu TSLP	8.81×10^{-4}	377,000	Nd
A2 IgG1	Hu TSLP	3.49×10^{-4}	203	600-1700
	사이노TSLP	1.04×10^{-4}	46.8	250-860
	Mu TSLP	--	--	--
A2 IgG2	Hu TSLP	2.85×10^{-4}	157	6-24
	사이노TSLP	9.42×10^{-5}	37.6	검출안됨
	Mu TSLP	무 결합	무 결합	없음
A3 IgG4	Hu TSLP	2.7×10^{-4}	170	6-24
	사이노TSLP	검출안됨	검출안됨	검출안됨
	Mu TSLP	검출안됨	검출안됨	검출안됨
A4 IgG4	Hu TSLP	3.30×10^{-4}	340	30-59
	사이노TSLP	검출안됨	검출안됨	검출안됨
	Mu TSLP	검출안됨	검출안됨	검출안됨

[0384]

[0385] 실시예 7 : 항체들의 재조합 발현 및 정제

[0386] 항체들을 발현하는 안정한 세포주의 개발

[0387] 감작 및 항-감작 가닥(anti-sense strnad) 둘 다에 대한 경쇄 또는 중쇄 가변도메인의 1차 시퀀스에 대응하는 오버래핑 올리고뉴클레오티드(overlapping oligonucleotides)들을 합성하였다. 이 올리고뉴클레오티드 풀(pool)을 표준 중합효소 연쇄반응에 사용하였다. 이 제1반응으로부터의 생성물을 제2 중합효소 연쇄반응 증폭에서 템플레이트(template)로 사용하였다. 증폭된 가변 중쇄 및 경쇄 단편들을 중간체 벡터(intermediate vector) 내로 서브클로닝하고 그리고 시퀀싱하여 무-결점의 생성물(error-free products)들을 동정하였다. 가변 중쇄 단편을 시그널 펩티드(signal peptide)와 인간 IgG2 불변영역을 포함하는 임시 발현 벡터(transient expression vector) 내로 복제시켰다. 가변 경쇄 단편을 시그널 펩티드와 인간 람다 불변영역을 포함하는 임시 발현 벡터 내로 복제시켰다. 완전한 중쇄 유전자를 벡터 pDC324 내로 옮겼다. 완전한 경쇄 유전자를 발현 벡터 pDC323 내로 옮겼다. 항-TSLP 발현 플라스미드들의 형질감염을 위하여 사용된 CS-9 숙주세포들은 무-혈청 배지(serum-free media)에의 적응(adaptation)을 통하여 DXB-11 세포들로부터 유도된 CHO 세포주들이었다(라스뮈센(Rasmussen)과 그의 동료들의 Cytotechnology 28:31-42, 1998). 표준 전기천공(electroporation) 또는 리포펙션 절차(lipofection procedure)를 사용하여 CS-9 숙주세포들을 상기 발현 플라스미드 pDC323-항-TSLP-람

다 및 pDC324-항-TSLP-IgG2들로 형질감염시키는 것에 의하여 항-TSLP 세포주들을 생성시켰다. 상기 숙주세포주의 상기 발현 플라스미드들로의 형질감염 후, 상기 세포들을 선택배지(selection medium) 내에서 2 내지 3주간 성장시켜 상기 플라스미드들의 선택 및 상기 세포들의 회복을 허용하도록 하였다. 일부 경우들에 있어서, 상기 배지는 3%의 투석된 우태혈청(dialyzed fetal bovine serum ; ds 또는 dFBS)로 보충되었다. 혈청이 사용된 경우, 이는 선택 기간(selection period) 후에 상기 배지로부터 제거되었다. 상기 세포들이 85% 초과 생존(> 85% viability)을 달성할 때까지 상기 선택배지 내에서 성장시켰다. 계속해서 이 형질감염된 세포들의 풀을 배양배지(culture medium) 내에서 배양시켰다.

[0388] 세포주 복제

[0389] 하기의 절차에 따라 선택된 복제들의 셀 बैं크(cell bank)가 만들어졌다. 복제단계는 상용적인 제조(commercial manufacturing)에서의 재생가능한 성능을 가능하게 하는 클로날 인구(clonal populations)들 및 셀 बैं크들이 생성되는 것을 보증한다. 항체-발현 세포들의 증폭된 풀을 희석의 제한 하에서 96-웰 플레이트들 내에 접종시켰으며, 소규모의 연구들에서 성장 및 생산성 성능에 대하여 후보 복제물들을 평가하였다.

[0390] 실시예 8 : 항체 교차-경쟁(Antibody cross-competition)

[0391] 경쟁 실험(competition experiments)들을 통하는 것이 에피토프들을 정의하는 통상적인 방법이다. 서로 경쟁하는 항체들은 표적에 대하여 동일한 사이트에 결합하는 것으로 고려될 수 있다. 이 실험은 TSLP에의 결합에 대한 경쟁을 결정하는 방법과 본 명세서에서 기술된 다수의 항체들에 적용되는 경우의 상기 방법의 결과들을 기술한다.

[0392] 여러 방법들로 분류실험(binning experiments)들이 수행될 수 있으며, 사용된 방법은 분석 결과들에 대한 영향을 가질 수 있다. 이들 방법들에서의 공통점은 TSLP가 전형적으로 하나의 대조 항체(reference antibody)에 의해 결합되고 그리고 다른 하나에 의해 탐침된다는 것이다. 만일 상기 대조 항체가 탐침 항체(probe antibody)의 결합을 저해하는 경우, 상기 항체들은 동일한 분류(bin) 내에 존재한다고 한다. 상기 항체들이 사용되는 순서가 중요하다. 만일 항체 A가 상기 대조 항체로 사용되고 그리고 항체 B의 결합을 차단하는 경우, 그 역이 항상 맞는 것은 아니며: 상기 대조 항체로서 사용된 항체 B는 필수적으로 항체 A를 차단하지는 않을 수 있다. 여기에서 작용하는 많은 인자들이 존재한다: 항체의 결합은 제2의 항체의 결합을 저해하는 표적에서의 형태적인 변화(conformational changes)들을 야기하거나 또는 오버랩(overlap)하기는 하나 완전히 서로를 가리지는 않는 에피토프들이 제2 항체가 여전히 결합을 허용하도록 상기 표적과의 충분히 높은 친화성의 상호작용을 갖는 것을 허용할 수 있다. 보다 더 높은 친화성을 갖는 항체들은 정상을 벗어난 차단하는 항체를 쫓아내는 보다 큰 능력을 가질 수 있다. 대체로, 경쟁이 순서대로 관측되는 경우, 상기 항체들은 서로 분류된다고 말하여지고, 그리고 두 항체들 모두가 서로 차단할 수 있는 경우, 이는 상기 에피토프들이 보다 완전하게 오버랩 된다고 할 수 있다.

[0393] 이러한 실시예에 대하여, 지아(Jia)와 그의 동료들(J. Immunological Methods, 288 (2004) 91-98)에 의해 기술된 멀티플렉스 자동 분류 방법(Multiplexed Binning method)의 변형(modification)이 사용되었다. TSLP 내의 퓨린 개열 사이트의 존재가 TSLP 단백질 제조에서의 이질성(heterogeneity)을 야기할 수 있기 때문에, 알려진 돌연변이된 상기 퓨린 개열 사이트 내에 아르기닌을 갖는 TSLP가 사용되었다. 미합중국 특허 제7,288,633호를 참조하십시오. 스트렙타비딘-코팅된 루미넥스 비드(Luminex beads)(루미넥스(Luminex), #L100-L1XX-01, XX는 비드 코드를 특정함)의 각 비드 코드(Bead Code)를 6pg/비드 비오티닐화 1가의 생쥐-항-인간 IgG 포획 항체(비디 파민젠(BD Pharmingen, #555785) 100 μ l 내에서 1시간 동안 실온에서 배양시켰으며, 계속해서 3배량의 PBSA, 인산염 완충 식염수(PBS ; phosphate buffered saline) 더하기 1% 소혈청알부민(BSA)으로 세척하였다. 각 비드 코드를 별도로 1 : 10 희석 항-TSLP 항체(코팅 항체) 100 μ l로 1시간 동안 배양시켰으며, 계속해서 세척하였다. 상기 비드들을 저장(pooled)하였으며, 계속해서 96-웰 필터 플레이트(밀리포어사 제품, #MSBVN1250)에 제공하였다. 2 μ g/ml의 부도 TSLP 100 μ l를상기 웰들의 절반까지 그리고 완충제를 다른 절반까지 첨가하고, 1시간 동안 배양시키고 그리고 계속해서 세척하였다. 1 : 10 희석 항-TSLP 항체(검출 Ab(Detection Ab)) 100 μ l을 하나의 웰에는 TSLP와 함께 그리고 다른 하나의 웰에는 TSLP 없이 첨가하고, 1시간 동안 배양시켰으며, 계속해서 세척하였다. 항체 무첨가와 마찬가지로 무관한 인간-IgG(잭슨사 제품, #009-000-003)을 음성 대조군들로서 구동시켰다. 20 μ l의 PE-콘주게이트된 1가의 생쥐-항-인간 IgG(비디 파민젠, #555787)을 각 웰에 첨가하고 그리고 1시간 동안 배양시킨 후, 계속해서 세척하였다. 비드들을 75 μ l PBSA 내에 재현탁시키고 그리고 바이오플렉스 기구(BioPlex instrument ; 바이오라드(BioRad)) 상에서 적어도 100회/비드 코드를 수집하였다.

[0394] TSLP가 없는 항체쌍의 중앙값 형광 세기(MFI ; Median Fluorescent Intensity)를 TSLP를 포함하는 대응하는 반

응의 시그널로부터 차감시켰다. 동시적으로 결합되고 그리고 그에 따라 서로 달리 분류되는 것으로 고려되어지는 상기 항체쌍에 대하여는, 상기 반응의 값이 2개의 기준 즉, 1) 상기 값들은 그 자체로 짝지워진 코팅 항체나 무관한 항체나 또는 무항체 보다 2배 더 커야 하고, 그리고 2) 상기 값들은 무관한 항체나 또는 무항체 코팅된 비드에 대해 존재하는 검출 항체의 시그널 보다 더 커야한다는 것을 충족하였다.

[0395] 상기 항체들 사이의 경쟁의 분석은 탐침들로서의 항체들의 성능에 대한 차단제(blockers)들로서의 그들의 성능 사이의 불일치가 존재한다는 사실에 의해 복잡하게 되었다. 그러나, 만일 모호하지 않은(즉, 각 항체는 대조로서 사용되는 경우에 다른 것들을 차단하지 않을 것이라는 것) 항체들의 이들 분류들 만을 고려한다면, 하기 표 4에 나타낸 바와 같이 최소 여덟개의 분류들이 발견되었다.

표 4

[0396]

분류 1	2	3	4	5	6	7	8
A5	A6	A27	A24	A10	A4	A2	A23
A17	A7	A11	A12	A26	A23	A21	A6
A6	A11	A24	A10	A4		A23	
			A26				

[0397] A23 및 A6 등과 같은 일부 항체들은 여러 분류들에서 qkfrusehldljT다는 것은 주목할 만 하다. 다른 분류 관계들을 결정하는 것이 가능하며, 또한 이들 분류들로부터의 항체들의 내포(inclusion) 또는 배척(exclusion)을 배척 쪽으로 편위시켰다(biased).

[0398] 상기 분석의 결과들로 다른 항체들 중의 어느 것이 상기 대조 항체와의 결합에 대하여 교차-경쟁하는 지를 결정하였다. "결합에 대한 교차-경쟁"에 대하여는, 이는 차단 항체로서 사용되는 경우에 상기 대조 항체는 탐침으로 사용되는 경우에서 다른 항체의 결합을 차단할 수 있으며 그 역이 가능하다는 것을 의미한다. 달리 말하면, 상기 대조 항체가 다른 항체를 차단하는 것이 가능하나 다른 항체는 상기 대조 항체를 차단하는 것이 가능하지 않은 경우, 상기 항체들은 교차-경쟁한다고 말할 수 없다. 교차-경쟁하는 항체들의 목록을 표 5에 제공하였다.

표 5

[0399]

대조 항체	예시적 교차-경쟁 항체들
A2	A21, A23
A4	A10, A23, A26
A5	A6, A8, A11, A17
A6	A5, A7, A8, A11, A17, A23
A7	A6, A8, A11, A17
A8	A5, A6, A7, A17, A23
A10	A4, A12, A24, A26
A11	A5, A6, A7, A17, A24, A27
A12	A10, A24, A26
A17	A5, A6, A7, A8, A11
A21	A2, A23, A27
A23	A2, A4, A6, A8, A21
A24	A10, A11, A12, A26, A27
A26	A4, A10, A12, A24
A27	A11, A21, A24

[0400] 실시예 9 : 에피토프 매핑(Epitope Mapping)

[0401] 비록 에피토프들이 종종 선형 시퀀스(linear sequences)들로 고려되기는 하나, 항체가 불연속적인 아미노산들로 이루어지는 표적의 면(face)을 인식하는 케이스들이 보다 빈번하다. 이들 아미노산들은 상기 선형 시퀀스 상에서는 보다 멀리 이격될 수 있으나, 표적의 절첩(folding)을 통하여 서로 근접하게 될 수 있으며, 이러한 에피토프를 인식하는 항체들은 형상-감응성(conformation-sensitive) 또는 단지 형상학적 항체(conformational antibodies)들로 알려져 있다. 이러한 종류의 결합은 변성된 웨스턴블롯(denatured Western blots)들의 사용을 통하여 정의될 수 있으며, 여기에서 겔 상에서의 구동에 앞서 표적을 계면활성제 및 환원제의 존재 중에서 가열시켜 이것이 펼쳐지도록 하였다. 계속해서 이러한 겔로부터의 블롯(blot)은 항체들에 의하여 탐침될 수 있으며, 이러한 처리 후에 상기 표적을 인식할 수 있는 항체는 아마도 선형의 에피토프를 인식할 것이다. 비록

선형 시퀀스들을 결합하는 항체들의 에피토프들이 펩티드들(예를 들면, PepSpot)에의 결합을 통하여 정의될 수 있기는 하나, 형상학적 항체들은 표준 펩티드들에 높은 친화성으로 결합할 것으로 기대되지는 않을 것이다.

[0402] 환원된, 열-변성된, 정제된 부모 TSLP 단백질을 MES SDS 구동 완충제(MES SDS Running Buffer) 내의 10% 비스-트리스 뉴페이지 겔(Bis-Tris Nupage gel) 상에 로딩시켰다. 단백질을 PVDF막으로 옮기고, PBS + 0.05% 트윈(PBST) 내의 5% 분말탈지유(Non-fat Dry Milk ; NFDM)로 차단하고 그리고 TSLP 항체들과 함께 1시간 동안 실온에서 배양시켰다. 블롯들을 3회 PBST로 세척하고 계속해서 염소 항-huIgG 2차 항체와 함께 1시간 동안 실온에서 배양시켰다. 상기 블롯들을 다시 세척하고 그리고 항-염소IgG:알렉사680(Alexa 680)과 함께 배양시켰다. PBST로의 3회 세척 후, 상기 블롯들을 라이코(LiCor) 상에서 주사하여 밴드(bands)들을 가시화시켰다.

[0403] 이러한 방법을 이용하여 항체들 A2, A4, A5, A6, A7, A10, A21, A23 및 A26들을 특정하였다. 상기 웨스턴 블롯 상에서 강한 밴드에 의해 입증되는 바와 같이 항체들 A2, A4 및 A5들이 선형 에피토프에 결합하였다. 상기 웨스턴 블롯 상에서의 밴드들이 없거나 또는 극히 약한 밴드들로 인한 것과 같이 모든 다른 항체들은 형태상 이었다.

[0404] 에피토프들은 구조적 또는 기능적으로 더욱 정의될 수 있다. 기능적 에피토프들은 대체로 구조적인 에피토프들의 서브세트(subset)이고, 그리고 상기 상호작용(예를 들면, 수소결합, 이온성 상호작용)의 친화성에 직접적으로 기여하는 그러한 잔기들로 이루어진다. 구조적 에피토프들은 상기 항체에 의해 피복되는 표적의 패치로서 고려될 수 있다.

[0405] 주사 돌연변이(scanning mutagenesis)를 사용하여 상기 항체들에 의해 결합된 상기 에피토프들을 더욱 정의하였다. 기능적인 에피토프들을 정의하는 데 알라닌 주사 돌연변이가 빈번하게 사용되었으며; 알라닌의 치환(메틸 측쇄)은 필수적으로 야생형 아미노산 측쇄의 절단(amputation)이고 그리고 상당히 미묘하다. 상기 아마이드 연결(amide linkages)들에 대한 수소결합 등과 같은 상기 단백질 골격과의 상호작용은 알라닌 주사로 노출되지는 않을 것이다. 대신 아르기닌 및 글루탐산 주사 돌연변이가 사용되었다. 그들의 큰 입체덩어리(steric bulk) 및 그들의 하전으로 인하여 이들 두 측쇄들이 선택되었으며, 이는 항체 결합에 대하여 보다 큰 영향을 갖도록 구조적인 에피토프 내에서 일어나는 돌연변이들을 허용한다. 야생형 잔기가 아르기닌 또는 리신인 경우를 제외하고는 아르기닌이 대체로 사용되었으며, 이들 케이스들에서 상기 잔기는 글루탐산으로 돌연변이되어 전하를 전환시켰다. 일부 경우들에 있어서, 상기 야생형 잔기는 아르기닌 및 글루탐산 둘 다에서 돌연변이 되었다.

[0406] TSLP에 걸쳐 분포된 95개의 아미노산들이 아르기닌 또는 글루탐산으로의 돌연변이를 위하여 선택되었다. 소수성 잔기들이 대체로 단백질의 접힌 코어(folded core) 내에서 발견되었기 때문에, 선택은 하전되거나 또는 극성인 아미노산들 쪽으로 편위되어 오접힌 단백질(misfolded protein)의 결과를 가져오는 돌연변이와 유사하게 환원되었다. 결정 구조가 없기 때문에, 이들 잔기들이 필수적으로 무작위로 선택되었으며 TSLP 전체를 통하여 분포되었다. 실시예 8에서 기술된 바와 같이, 돌연변이된 퓨린 개열 사이트를 포함하는 TSLP가 사용되었다.

[0407] 돌연변이 TSLP에의 항-TSLP 항체들의 결합을 측정하는 데 바이오플렉스™ 결합 분석이 사용되었다. 비오티닐화된 펜타-His Ab(biotinylated Penta-His Ab ; 키아젠(Qiagen), Lot#: 130163339)를 스트랩타비딘-코팅된 비드들의 100개의 비드 코드들(루미넥스, #L100-L1XX-01, XX는 비드 코드를 특정함) 상으로 결합시켰다. 이들을 사용하여 상기 his-태그된 단백질을 포획하였다. 상기 100개의 비드 코드들이 85개의 돌연변이들 전부, 3개의 부모 대조군들, 무관한 단백질 및 12개의 블랭크(blanks)들 모두의 멀티플렉싱을 허용하였다. 돌연변이 단백질에 결합하는 항체를 상기 부모에 결합하는 항체와 비교하였다.

[0408] 상청액 내의 상기 TSLP 돌연변이들과 부모들 및 1μg/ml 정제된 TSLP 야생형(WT)의 1 : 5 희석물 100μl, 1μg/ml 무관한 단백질 또는 무-단백질들을 상기 코팅된 비드들 상에 1시간 동안 실온에서 격렬하게 교반시켜 결합시켰다. 상기 비드들을 세척하고 그리고 96-웰 필터 플레이트(밀리포어사 제품) 내로 분획시켰다. 4배의 희석물들 내의 항체-TSLP 항체들 100μl를 3중의 웰(triplicate well)들 내로 첨가하였으며 0.5시간 동안 실온에서 배양시키고 그리고 세척하였다. PE-콘주게이트된 항-인간 IgG Fc(썬슨사 제품, #109-116-170)의 1 : 250 희석물 100μl를 각 웰에 첨가하고, 0.5시간 동안 배양시키고 그리고 세척하였다. 비드들을 75μl 내로 재현탁시켰으며, 적어도 3분간 교반시키고 그리고 바이오플렉스™ 상에서 판독하였다.

[0409] 잔기를 아르기닌 또는 글루탐산 방해된 항체 결합으로 돌연변이 시키는 경우, 잔기는 상기 구조적 에피토프(a "히트(hit)"의 일부로 여겨졌다. 이는 상기 EC50에서의 이동(shift) 또는 부모 TSLP에 결합하는 항체와 비교하여 최대 시그널의 감소로 나타났다.

[0410] 통계학적으로 명백한 EC50 이동들을 동정하기 위하여 부모 및 돌연변이들에 대한 항체 결합 곡선들의 통계학적

분석들이 사용되었다. 상기 분석은 분석법 및 곡선 맞춤(curve fitting)에서의 분산을 고려하였다.

- [0411] 상기 돌연변이 결합 곡선들 및 부모 결합 곡선들의 EC50을 비교하였다. 그 이상의 고려들에 대하여 히트들마다 통계학적으로 명백한 차이들이 동정되었다. "노피트(nofit)" 또는 "배드피트(badfit)" 플래그들에 대한 곡선들은 이 분석에서 제외시켰다.
- [0412] 곡선 피트로부터의 분산 및 비드-비드 분산의 분산들의 두 원천들을 EC50 예측들의 비교에서 고려하였다. 부모 및 돌연변이들을 서로 다른 비드들에 연결시키고 그에 따라 그들의 차이가 비드-비드 차이가 틀렸다는 것이 입증되었다. 로그(log) EC50 예측들의 표준 오차에 의해 곡선 피트 분산을 예측하였다. 부모 대조들이 상기 비드들 중의 각 하나에 연결되는 경우의 실험을 사용하여 비드-비드 분산을 실험적으로 결정하였다. 부모 결합 곡선의 EC50 예측들에서의 비드 분산을 사용하여 비드-비드 분산을 예측하였다.
- [0413] 스튜던트 티-테스트(Student's t-test)를 사용하여 두 EC50들의 비교들을 수행하였다. 델타(EC50 예측들 사이의 절대차(absolute differences)들) 및 델타의 표준편차 사이의 비율로 티-테스트 통계(t-statistics)를 계산하였다. 델타의 분산(variation)은 3개의 구성요소들, 비선형의 축퇴(nonlinear regression) 내의 돌연변이 및 별도의 실험으로부터의 부모 곡선들에 대한 EC50의 분산 예측값(variance estimate)의 2배들의 합에 의하여 델타의 분산을 예측하였다. 상기 비드-비드 분산에 대한 2배는 돌연변이 및 부모 비드들 둘 다 동일한 분산을 갖는 다는 가정으로 인한 것이다.
- [0414] 새터스와이트의 가정(Satterthwaite's (1946) approximation)을 사용하여 델타의 표준 편차의 자유도(degree of freedom)을 계산하였다. 각 비교에 대한 스튜던트 티-분산(Student's t distribution)에 기초하여 개별 p-값들 및 신뢰구간(confidence intervals ; 95% 및 99%)들을 유도하였다. 돌연변이에 가장 유사하였던 부모 대조를 선택(picking), 즉, 가장 큰 p-값들을 갖는 것들을 선택하는 것에 의하여 다중의 부모 대조들의 케이스에 있어서, 보수적 접근법(conservative approach)이 수행되었다.
- [0415] 다중성 조정(multiplicity adjustments)들이 대량의 시험들을 동시에 수행하는 한편으로 허위양성(false positives)들을 제어하는 데 중요하였다. 이 분석에서 두 가지 형태들의 다중성 조정 : 즉 1종의 오류(family wise error ; FWE) 조절 및 오류발견율(false discovery rate ; FDR) 조절이 수행되었다. 상기 1종의 오류 접근법은 하나 또는 그 이상의 히트들이 실체가 아닌 가능성을 조절하며; 오류발견을 접근법은 선택된 히트들 중에서 허위양성의 예측비(expected proportion)를 조절한다. 전자의 접근법은 후자에 비해 보다 보수적이고 그리고 보다 덜 강력하다. 두 접근법들에 대한 획득가능한 많은 방법들이 있으며, 이 분석에 대해서는, 1종의 오류 분석에 대하여는 호츠버그의 방법(Hochberg's (1988) method)이 그리고 오류발견을 분석에 대하여는 벤자미니-호츠버그의 오류발견을 방법(Benjamini-Hochberg's (1995) FDR method)이 선택되었다. 각 항체 또는 전체 분석들 중의 어느 하나에 대하여 두 접근법들에 대한 조정된 p-값들이 계산되었다.
- [0416] 그의 EC50이 부모와는 명백하게 다른 돌연변이들, 즉 각 항체에 대한 1종의 오류 조정된 p-값이 부모의 0.01 이하 또는 최대 시그널 50% 이하를 갖는 돌연변이들은 구조적 에피토프의 부분으로 고려되었다(표 6 ; 바이오플렉스 내에서의 항체 결합에 영향을 주고 그리고 구조적 에피토프의 부분인 돌연변이들의 요약). 모든 항체들에 대한 EC50 시프트 또는 최대 시그널 감소들 중의 어느 하나에 의하여 명백한 돌연변이들을 오절첩으로 고려하였다. 이들 돌연변이들은 Y15R, T55R, T74R 및 A77R들이었다.

표 6

항체	선형	증가된 결합 친화성	감소된 결합 친화성
A2	예	K67E, K97E, K98E, R100E, K101E, K103E	K21E, T25R, S28R, S64R, K73E
A4	예	K97E, K98E, R100E, K101E, K103E	K10E, A14R, K21E, D22R, K73E, K75E, A76R
A5	예		K12E, D22R, S40R, R122E, N124E, R125E, K129E
A6	아니오		S40R, S42R, H46R, R122E, K129E
A7	아니오	K101E	D2R, T4R, D7R, S42R, H46R, T49R, E50R, Q112R, R122E, R125E, K129E
A10	아니오	K97E, K98E, R100E, K101E, K103E	N5R, S17R, T18R, K21E, D22R, T25R, T33R, H46R, A63R, S64R, A66R, E68R, K73E, K75E, A76R, A92R, T93R, Q94R, A95R
A21	아니오	K97E, K98E, R100E, K101E, K103E	K21E, K21R, D22R, T25R, T33R, S64R, K73E, K75E, E111R, S114R
A23	아니오	K67E, K97E, K98E, R100E, K101E, K103E	E9R, K10E, K12E, A13R, S17R, S20R, K21E, K21R, K73E, K75E, N124E, R125E
A26	아니오	K97E, K98E, R100E, K101E, K103E	A14R, K21E, D22R, A63R, S64R, K67E, K73E, A76R, A92R, A95R

[0417]

[0418]

다종의 항체들의 결합을 방해하는 여러 돌연변이들, 특히 K73E, K21E 및 D22R들이 존재하였다. 상기 돌연변이는 자동분류에 의해 생성된 데이터를 입증하고 그리고 에피토프 공간(epitope space)에 대하여 더욱 한정하는 기능을 한다. TSLP에서의 돌연변이들은 함께 분류되는 항체들의 군집(clusters)들에 영향을 주는 것으로 나타난다.

[0419]

실시예 10 : 독성학

[0420]

인간 TSLP에 결합하rg 여전히 또한 다른 종들의 TSLP와 교차-반응하는 항체들을 그들 종들 내에서의 독성학 시험을 행하였다. 이 실시예에 있어서, 사이노몰거스 원숭이 TSLP에 교차-반응하는 항체를 사이노몰거스 원숭이들에 투여하였다. 계속해서 상기 원숭이들을 독성 효과들에 대하여 관찰하였다. 단일-투여량 안정성 약물학 연구(single-dose safety pharmacology study)는 상기 항체의 1회의 300mg/kg 정맥내 투여가 심혈관, 호흡기, 체온 또는 신경행동상(neurobehavioral)의 영향들을 갖지 않음을 나타내었다.

[0421]

사이노몰거스 원숭이들(5개체/성별/군)에 4주간 주 1회 30, 100 또는 300mg/kg을 피하투여하였다. 어떠한 투여량에서도 독성 부작용(adverse toxicology)가 관찰되지 않았다. 상기 항체는 임상적 고찰(clinical observations), 체중, 안과, 심전도(ECGs), 임상 병리학(clinical pathology) 또는 해부 병리학(anatomic pathology)들에 영향을 주지 않았다.

[0422]

별도의 연구에서, 원격계측되는(telemeterized) 4개체의 수컷 사이노몰거스 원숭이들에 비히클의 1회 정맥 투여(1일차) 및 300mg/kg 항체(3일차)가 투여되었다. 4일간의 관찰기간에 걸쳐 심혈관, 호흡기 또는 신경기능에 대한 영향들이 없음이 관찰되었다.

[0423]

미국식품의약국(FDA) 가이드라인 "Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use" (FDA Center for Biologics Evaluation and Research, 28 February 1997)에서 추천된 바에 따라 정상의 인간 및 사이노몰거스 원숭이 조직에 대하여 교차-반응성을 결정하기 위하여 상기 항체들을 더 시험하였다. 1 또는 50µg/ml에서 정상 조직의 염색이 관찰되지 않았다.

[0424]

상기 결과들은 상기 항체가 인간들에 있어서 독성 영향을 생성하지 않을 것이라는 것을 암시한다.

도면

도면1a

가변경쇄 CDRs

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A1 NA	CAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTA TGCAAGC (SEQ ID NO: 5)	GGTAAAACTACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 52)	AACTCCCGGGACAGAAGTGGTAACCATCTGGTGT TT (SEQ ID NO: 97)
AA	QGDSLRSYYAS (SEQ ID NO: 6)	GKNYRPS (SEQ ID NO: 53)	NSRDRSGNHLV (SEQ ID NO: 98)
A2 NA	CAAGGAGACAGCCTCAGAACCTATTA TGCAAGC (SEQ ID NO: 7)	GATAAAAAACAACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 54)	AACTCCCGGGACAGCAGTGATAACCATCTAGTG GTAT (SEQ ID NO: 99)
AA	QGDSLRTYYAS (SEQ ID NO: 8)	DKNNRPS (SEQ ID NO: 55)	NSRDSSDNHLVV (SEQ ID NO: 100)
A3 NA	ACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGC AGGTTTGTATGTACAC (SEQ ID NO: 9)	GATAACAACAATCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 56)	CAGTCCTATGACAGCAACCTGAGTGGTTCGATT GTGGTTT (SEQ ID NO: 101)
AA	TGSSSNIGAGFDVH (SEQ ID NO: 10)	DNNNRPS (SEQ ID NO: 57)	QSYDSNLGSIVV (SEQ ID NO: 102)
A4 NA	ACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGC AGGTTTGTATGTGCAC (SEQ ID NO: 119)	GATAACAACAATCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 58)	CAGTCCTATGACAGCAACCTGAGTGGTTCGATT GTGGTAT (SEQ ID NO: 103)
AA	TGSSSNIGAGFDVH (SEQ ID NO: 10)	DNNNRPS (SEQ ID NO: 57)	QSYDSNLGSIVV (SEQ ID NO: 102)
A5 NA	GGGGGAAACAACCTTGGAAGTAAAA GTGTGCAC (SEQ ID NO: 412)	GATGATAGCGACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 59)	CAGGTGTGGGATAGTAGTAGTATCATGTGGTA T (SEQ ID NO: 104)
AA	GGNNLGSKSVH (SEQ ID NO: 4213)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 60)	QVWDSDDHVV (SEQ ID NO: 105)

도면1b

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A6 NA	TCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATA TGCTTGC (SEQ ID NO: 4314)	CAAGATAAGAAGCGGCCCTC A (SEQ ID NO: 61)	CAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTAT (SEQ ID NO: 106)
AA	SGDKLGDKYAC (SEQ ID NO: 4415)	QDKKRPS (SEQ ID NO: 62)	QAWDSSTVV (SEQ ID NO: 107)
A7 NA	TCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATA TGCTTGC (SEQ ID NO: 4314)	CAAGATAACAAGCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 63)	CAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTAT (SEQ ID NO: 108)
AA	SGDKLGDKYAC (SEQ ID NO: 4415)	QKNKPRPS (SEQ ID NO: 64)	QAWDSTTAI (SEQ ID NO: 109)
A8 NA	TCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATA TGCTTGC (SEQ ID NO: 4314)	CAAGATAACAAGCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 63)	CAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTAT (SEQ ID NO: 106)
AA	SGDKLGDKYAC (SEQ ID NO: 4415)	QDNKRPS (SEQ ID NO: 65)	QAWDSSTVV (SEQ ID NO: 107)
A9 NA	CAAGGAGACAGCCTCAGAATCTTTTA TGCAAAC (SEQ ID NO: 4516)	GGTAAAAACAACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 66)	AACTCCCGGGACAGCAGTGGAACCATGTGGTA T (SEQ ID NO: 110)
AA	QGDSLRFYAN (SEQ ID NO: 4617)	GKNNRPS (SEQ ID NO: 67)	NSRDSSGNHVV (SEQ ID NO: 111)
A10 NA	CGGGCAAATCAGTACATTAGCACCTA TTTAAAT (SEQ ID NO: 4718)	GCTGCATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 68)	CAGCAGAGCTACACTACCCGATCACCT (SEQ ID NO: 112)
AA	RANQYISTYLN (SEQ ID NO: 4819)	AASSLQS (SEQ ID NO: 69)	QQSYTTPIT (SEQ ID NO: 113)
A11 NA	AAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAAACAG CTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT (SEQ ID NO: 4920)	TGGACATCCACCCGGAAGGC (SEQ ID NO: 70)	CAGCAGTATTTTACTACTCCGTGGACGT (SEQ ID NO: 114)
AA	KSSQSVLNSSNNKNYLA (SEQ ID NO: 2021)	WTSTREG (SEQ ID NO: 71)	QQYFTTPWT (SEQ ID NO: 115)

도면1c

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A12 NA	CGGGCGAGTCAGGGTATTAGTAGCTG GTTAGCC (SEQ ID NO: 2422)	ACTGCATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 72)	CAACAGGCTGACAGTTCCCGCTCACTT (SEQ ID NO: 116)
AA	RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 2223)	TASSLQS (SEQ ID NO: 73)	QQADSFPLT (SEQ ID NO: 117)
A13.1 NA	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTCTACAG TGATGGAGACACCTACTTGAAT (SEQ ID NO: 2324)	AAGGTTTCTAACTGGGACTCT (SEQ ID NO: 74)	ATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGGCCT (SEQ ID NO: 118)
AA	RSSQSLVYSDGDTYLN (SEQ ID NO: 2425)	KVSNWDS (SEQ ID NO: 75)	MQGTHWPPA (SEQ ID NO: 119)
A13.2 NA	CGGGCGAGTCAGGGTCTTAGCAGCTG GTTAGCC (SEQ ID NO: 2526)	AACACATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 76)	CAACAGGCTAACAGTTCCCTCTCACTT (SEQ ID NO: 120)
AA	RASQGLSSWLA (SEQ ID NO: 2627)	NTSSLQS (SEQ ID NO: 77)	QQANSFPLT (SEQ ID NO: 121)
A14.1 NA	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTCTACAG TGATGGAAACACCTACTTGAAT (SEQ ID NO: 2728)	AAGGTTTCTAACTGGGACTCT (SEQ ID NO: 74)	ATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGGCC (SEQ ID NO: 122)
AA	RSSQSLVYSDGNTYLN (SEQ ID NO: 2829)	KVSNWDS (SEQ ID NO: 75)	MQGTHWPPA (SEQ ID NO: 119)
A14.2 NA	CGGGCGAGTCAGGGTCTTAGCAGCTG GTTAGCC (SEQ ID NO: 2526)	AACACATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 76)	CAACAGGCTAACAGTTCCCTCTCACTT (SEQ ID NO: 120)
AA	RASQGLSSWLA (SEQ ID NO: 2627)	NTSSLQS (SEQ ID NO: 77)	QQANSFPLT (SEQ ID NO: 121)
A15.1 NA	AGGTCTAGTCAAAGCCTCATATACAG TGATGGAAACACCTACTTGAAT (SEQ ID NO: 2930)	AAGGTTTCTAACTGGGACTCT (SEQ ID NO: 74)	ATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGGCC (SEQ ID NO: 122)
AA	RSSQSLIYSDGNTYLN (SEQ ID NO: 3031)	KVSNWDS (SEQ ID NO: 75)	MQGTHWPPA (SEQ ID NO: 119)

도면1d

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A15.2 NA	CGGGCGAGTCAGGGTCTTAGCAGCTG GTTAGCC (SEQ ID NO: 2526)	ACTACATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 78)	CAACAGGCTGACAGTTCCCTCTCACTT (SEQ ID NO: 123)
AA	RASQGLSSWLA (SEQ ID NO: 2627)	TTSSLQS (SEQ ID NO: 79)	QQADSFPLT (SEQ ID NO: 117)
A16.1 NA	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAG TGATGGAAACACCTACTTGAAT (SEQ ID NO: 3132)	AAGGTTTCTTACTGGGACTCT (SEQ ID NO: 80)	ATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGGCCT (SEQ ID NO: 118)
AA	RSSQSLVYSDGNTYLN (SEQ ID NO: 3233)	KVSYWDS (SEQ ID NO: 81)	MQGTHWPPA (SEQ ID NO: 119)
A16.2 NA	CGGGCGAGTCAGAGTCTTAGCAGCTG GTTAGCC (SEQ ID NO: 3334)	AATGCATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 82)	CAACAGGCTAACAGTTCCCTCTCACTT (SEQ ID NO: 120)
AA	RASQSLSSWLA (SEQ ID NO: 3435)	NASSLQS (SEQ ID NO: 83)	QQANSFPLT (SEQ ID NO: 121)
A-17 NA	GGCTTGAACCTCTGGCTCAGTCTCTACT AGTTACTTCCCAGC (SEQ ID NO: 3536)	AGCACAAACAGTCGCTCTTCT (SEQ ID NO: 84)	GTGCTGTATATGGGTAGAGGCATTTGGGTGT (SEQ ID NO: 124)
AA	GLNSGSVSTSYFPS (SEQ ID NO: 3637)	STNSPSS (SEQ ID NO: 85)	VLYMGRGIWV (SEQ ID NO: 125)
A18.1 NA	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAG TGATGGAAACACCTACTTGAAT (SEQ ID NO: 3432)	AAGGTTTCTTACTGGGACTCT (SEQ ID NO: 80)	ATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGGCCT (SEQ ID NO: 118)
AA	RSSQSLVYSDGNTYLN (SEQ ID NO: 3233)	KVSYWDS (SEQ ID NO: 81)	MQGTHWPPA (SEQ ID NO: 119)
A18.2 NA	CGGGCGAGTCAGAGTCTTAGCAGCTG GTTAGCC (SEQ ID NO: 3334)	AATGCATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 82)	CAACAGGCTAACAGTTCCCTCTCACTT (SEQ ID NO: 120)
AA	RASQSLSSWLA (SEQ ID NO: 3435)	NASSLQS (SEQ ID NO: 83)	QQANSFPLT (SEQ ID NO: 121)

도면1e

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A19.1 NA	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTCTACAG TGATGGAGACACCTACTTGAAT (SEQ ID NO: 3738)	AAGGTTTCTAACTGGGACTCT (SEQ ID NO: 74)	ATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGGCCT (SEQ ID NO: 118)
AA	RSSQSLVYSDGDTYLN (SEQ ID NO: 3839)	KVSNWDS (SEQ ID NO: 75)	MQGTHWPPA (SEQ ID NO: 119)
A19.2 NA	CGGGCGAGTCAGGGTCTTAGCAGCTG GTTAGCC (SEQ ID NO: 2526)	AACACATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 76)	CAACAGGCTAACAGITTCCTCTCACTT (SEQ ID NO: 120)
AA	RASQGLSSWLA (SEQ ID NO: 2627)	NTSSLQS (SEQ ID NO: 77)	QQANSFPLT (SEQ ID NO: 121)
A20.1 NA	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTCTACAG TGATGGAGACACCTACTTGAAT (SEQ ID NO: 3738)	AAGGTTTCTAACTGGGACTCT (SEQ ID NO: 74)	ATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGGCCT (SEQ ID NO: 118)
AA	RSSQSLVYSDGDTYLN (SEQ ID NO: 3839)	KVSNWDS (SEQ ID NO: 75)	MQGTHWPPA (SEQ ID NO: 119)
A20.2 NA	CGGGCGAGTCAGGGTCTTAGCAGCTG GTTAGCC (SEQ ID NO: 2526)	AACACATCCAGTTTGCAAAGT (SEQ ID NO: 76)	CAACAGGCTAACAGITTCCTCTCACTT (SEQ ID NO: 120)
AA	RASQGLSSWLA (SEQ ID NO: 2627)	NTSSKQS (SEQ ID NO: 86)	QQANSFPLT (SEQ ID NO: 121)
A21 NA	ACTGGGAGCAGCTCCAACATTGGGGC GGGTTATGTTGTACAT (SEQ ID NO: 40)	GGTAACAGCAATCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 87)	AAAGCATGGGATAACAGCCTGAATGCTCAAGG GGTAT (SEQ ID NO: 126)
AA	TGSSSNIGAGYVH (SEQ ID NO: 41)	GNSNRPS (SEQ ID NO: 88)	KAWDNSLNAQGV (SEQ ID NO: 127)
A22 NA	AAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAA CTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT (SEQ ID NO: 42)	TGGGCTTCTACCCGGGAATCC (SEQ ID NO: 89)	CAGCAATTTTATGGTCCTCCTCTCACTT (SEQ ID NO: 128)
AA	KSSQSVLYSNSNNKLYLA (SEQ ID NO: 43)	WASTRES (SEQ ID NO: 90)	QQFYGPPLT (SEQ ID NO: 129)

도면1f

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A23 NA	TCTGGTGATAAATTGGGGGATAAATT TGCTTTC (SEQ ID NO: 44)	CAAGATAGCAAGCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 91)	CAGGCGTGGGACAGCAGCGCCGGGGGGTA (SEQ ID NO: 130)
AA	SGDKLGDKFAP (SEQ ID NO: 45)	QDSKRPS (SEQ ID NO: 92)	QAWDSSAGGV (SEQ ID NO: 131)
A24 NA	CAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATCA TGCAAGC (SEQ ID NO: 46)	GGTGAAAACAACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 93)	AATTATCGGGACAACAGTGGTAACCATCTGGTG T (SEQ ID NO: 132)
AA	QGDLSLSYHAS (SEQ ID NO: 47)	GENNRPS (SEQ ID NO: 94)	NYRDNSGNHLV (SEQ ID NO: 133)
A25 NA	AAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAA CTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT (SEQ ID NO: 42)	TGGGCTTCTACCCGGGAATCC (SEQ ID NO: 89)	CAGCAATTTTATGGTCCTCCTCTCACTT (SEQ ID NO: 128)
AA	KSSQSVLYSNSNNKLYLA (SEQ ID NO: 43)	WASTRES (SEQ ID NO: 90)	QQFYGPPLT (SEQ ID NO: 129)
A26 NA	TCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATA TATTTGC (SEQ ID NO: 48)	CAAGATAACAAGCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 93)	CAGGCGTGGGACAGCAGCACTGTGGTAT (SEQ ID NO: 106)
AA	SGDNLGDKYIC (SEQ ID NO: 49)	QDNKRPS (SEQ ID NO: 95)	QAWDSSTVV (SEQ ID NO: 107)
A27 NA	TCTGGAGATAAATTGGGGGAAAGCTA TGCTTGC (SEQ ID NO: 50)	CAAGATTACAAGCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 95)	CAGGCGTGGGACAGAAGTACTGTACTAT (SEQ ID NO: 134)
AA	SGDKLGESYAC (SEQ ID NO: 51)	QDYKRPS (SEQ ID NO: 96)	QAWDRSTVL (SEQ ID NO: 135)

도면2a

가변중쇄 CDRs

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A1 NA	AACTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 136)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 164)	CTAGTGGGAGCTACCAACTACTACGGTATGGACGTC (SEQ ID NO: 203)
AA	NYGMH (SEQ ID NO: 137)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 165)	LVGATNYYGMDV (SEQ ID NO: 204)
A2 NA	GATTTTACCATGCAC (SEQ ID NO: 138)	CTTATTAGTTGGGATGGTGGTAG CACATACTATGCAGACTCTGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 166)	CCTTACTACTACTTCTACGGTATGGACGTC (SEQ ID NO: 205)
AA	DFTMH (SEQ ID NO: 139)	LISWDGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 167)	PYYYYFYGMDV (SEQ ID NO: 206)
A3 NA	GACTACTATATGTAC (SEQ ID NO: 140)	TGGATCAACCCTAACAGTGGTGG CACAAACTATGTACAGAAGTTTC AGGGC (SEQ ID NO: 168)	GATGGGGGTAGCAGTGGCTGGCCCTCTTTCCTAC (SEQ ID NO: 207)
AA	DYYMY (SEQ ID NO: 141)	WINPNSGGTNYVQKFQ (SEQ ID NO: 169)	DGGSSGWPLFAY (SEQ ID NO: 208)
A4 NA	GGCGACTATATGCAC (SEQ ID NO: 142)	TGGATCAACCCTAACAGTGGTGG CACAAACCATGCACGGAAGTTTC AGGGC (SEQ ID NO: 170)	GATAGGGGTACCAAGTGGCTGGCCACTCTTGACTAT (SEQ ID NO: 209)
AA	GDYMH (SEQ ID NO: 143)	WINPNSGGTNHARKFQ (SEQ ID NO: 171)	DRGTSGWPLFDY (SEQ ID NO: 210)

도면2b

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A5 NA	ACCTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 144)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAACACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 172)	GCCCCTCAGTGGGAGCTAGTTCATGAAGCTTTTGATATC (SEQ ID NO: 211)
AA	TYGMH (SEQ ID NO: 145)	VIWYDGSNKHYADSVKG (SEQ ID NO: 173)	APQWELVHEAFDI (SEQ ID NO: 212)
A6 NA	AGCTATGGCATTAC (SEQ ID NO: 146)	GTTATATCATATGATGGAAGTTA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 174)	GGGGACTCCTGGAACGACAGATTAACTACTACTTCTACG ATATGGACGTC (SEQ ID NO: 213)
AA	SYGIH (SEQ ID NO: 147)	VISYDGSYKYYADSVKG (SEQ ID NO: 175)	GDSWNDRLNYYFYDMDV (SEQ ID NO: 214)
A7 NA	AGTGGTGGTTACTACTG GAGC (SEQ ID NO: 148)	TTCATCCATTACAGTGGGACCAC CTACTACAACCCGTCCTCAAGA GT (SEQ ID NO: 176)	GAAGTTGGCAGCTCGTCGGGTAAGTGGTTCGACCCC (SEQ ID NO: 215)
AA	SGGYYS (SEQ ID NO: 149)	FIHYSGTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 177)	EVGSSSGNWFD (SEQ ID NO: 216)
A8 NA	AGCTATGGCATTAC (SEQ ID NO: 146)	GTTATATCATATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 178)	GGGGACTCCTGGAACGACAGATTAACTACTACTTCTACG ATATGGACGTC (SEQ ID NO: 213)
AA	SYGIH (SEQ ID NO: 147)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 179)	GDSWNDRLNYYFYDMDV (SEQ ID NO: 214)
A9 NA	AGCTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 150)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TACATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 180)	GAGGTCCGGCGTATAGCAGTGGCTGGTACGCCGCTTGT ACTAC (SEQ ID NO: 217)
AA	SYGMH (SEQ ID NO: 151)	VIWYDGSNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 181)	EVRAYSSGWYAAFY (SEQ ID NO: 218)

도면2c

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A10 NA	AGTTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 152)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAG TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 182)	GTAAGAAGTGGGAGCTACTACGAACAGTATTACTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 219)
AA	SYGMH (SEQ ID NO: 151)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 183)	VRSGSYEYQYYYGMDV (SEQ ID NO: 220)
A11 NA	AGTTATAGCATGAAC (SEQ ID NO: 153)	TACATTAGTGGTCGTAAGTAG CGTATACTACGCAGACTCTGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 184)	AGTGGGATCTACTACGACTACTACGGTATGGACGTC (SEQ ID NO: 221)
AA	YSMN (SEQ ID NO: 154)	YISGRTSSVYYADSVKG (SEQ ID NO: 185)	SGIYYDYYGMDV (SEQ ID NO: 222)
A12 NA	AGCTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 150)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 164)	GGGGCAGCCTGCTATAGATTACTACTACTCCTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 223)
AA	SYGMH (SEQ ID NO: 151)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 165)	GAATAIDYYSYGMDV (SEQ ID NO: 224)
A13 NA	AGCTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 150)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 164)	GGGGGGGTATACCAGTAGCTGACTACTACTACTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 225)
AA	SYGMH (SEQ ID NO: 151)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 165)	GGGIPVADYYSYGMDV (SEQ ID NO: 226)
A14 NA	AGCTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 150)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 164)	GGGGGGGTATACCAGTAGCTGACTACTACTACTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 225)
AA	SYGMH (SEQ ID NO: 151)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 165)	GGGIPVADYYSYGMDV (SEQ ID NO: 226)

도면2d

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A15 NA	AACTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 136)	GTTATATGGTTTGATGGAAGTAA TAAATACTATGCGGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 186)	GGGGGGGTATAGCAGTGGCTGACTACTACTTCTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 227)
AA	NYGMH (SEQ ID NO: 137)	VIWFDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 187)	GGGIAVADYFYGMDV (SEQ ID NO: 228)
A16 NA	AACTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 136)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 164)	GGGGGGGTATAGCAGTGGCTGACTACTACTACTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 229)
AA	NYGMH (SEQ ID NO: 137)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 165)	GGGIAVADYYSYGMDV (SEQ ID NO: 230)
A17 NA	AGTTATGGCATGCTC (SEQ ID NO: 155)	GTTTTATGGTTTGATGGAAGTTA TAAAACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 188)	GATAGTACAACATATGGCCCACTTTGACTAC (SEQ ID NO: 231)
AA	SYGML (SEQ ID NO: 156)	VLWFDGSYKNYADSVKG (SEQ ID NO: 189)	DSTTMAHFDY (SEQ ID NO: 232)
A18 NA	AACTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 136)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 164)	GGGGGGGTATAGCAGTGGCTGACTACTACTACTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 229)
AA	NYGMH (SEQ ID NO: 137)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 165)	GGGIAVADYYSYGMDV (SEQ ID NO: 230)
A19 NA	AGCTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 150)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 164)	GGGGGGGTATACCAGTAGCTGACTACTACTACTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 225)
AA	SYGMH (SEQ ID NO: 151)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 165)	GGGIPVADYYSYGMDV (SEQ ID NO: 226)

도면2e

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A20 NA	AGCTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 150)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 164)	GGGGGGGTATACCACTAGCTGACTACTACTACTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 225)
AA	SYGMH (SEQ ID NO: 151)	VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 165)	GGGIPVADYYYYGMDV (SEQ ID NO: 226)
A21 NA	AGCTATGCCATGAGC (SEQ ID NO: 157)	GCAATTAGTGGTAGTGGTGGAA GTACACACTACGCAGACTCCGTG AAGGGC (SEQ ID NO: 190)	GATCTCAACTGGGAGCTTTTGATATC (SEQ ID NO: 233)
AA	SYAMS (SEQ ID NO: 158)	AISGSGGSTHYADSVKG (SEQ ID NO: 191)	DLNWGAFDI (SEQ ID NO: 234)
A22 NA	GGCTATGTCATGACT (SEQ ID NO: 159)	GGAATTAGTGGTAGTGGTGGTA GCACATACTACGCAGACTCCGTG AAGGGC (SEQ ID NO: 192)	GGAGACAGCTCGAACTACTACTCCGGTATGGACGTC (SEQ ID NO: 235)
AA	GYVMT (SEQ ID NO: 160)	GISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 193)	GDSSNYYSMDV (SEQ ID NO: 236)
A23 NA	GGCTACTATATGCAC (SEQ ID NO: 161)	TGGATCAACCCTAACAATGGTGG CACAACTATGGACAGAAAGTTTC AGGGC (SEQ ID NO: 194)	GGGAACTGGAACGACGATGCTTTTGATATC (SEQ ID NO: 237)
AA	GYMH (SEQ ID NO: 162)	WINPNNGGTNYGQKFQG (SEQ ID NO: 195)	GNWNDDAFDI (SEQ ID NO: 238)
A24 NA	AGCTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 150)	GTTATATGGTATGATGGAAGTAA TAAATACTATGAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 196)	ATGGGGTTTACTATGGTTCGGGAGCCCTCTACTACGGTA TGGACGTC (SEQ ID NO: 239)
AA	SYGMH (SEQ ID NO: 151)	VIWYDGSNKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 197)	MGFTMVRGALYYGMDV (SEQ ID NO: 240)

도면2f

Ab	CDR 1	CDR 2	CDR 3
A25 NA	AGCTATGCCATGAGC (SEQ ID NO: 157)	GCTATTAGTCGTAGTGGTAGTAC CACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 198)	CCGAGATATTTGACTGGTTATTAGGCGAC (SEQ ID NO: 241)
AA	SYAMS (SEQ ID NO: 158)	AISRSGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 199)	RPYFDWLLGD (SEQ ID NO: 242)
A26 NA	AGCTATGGCATGCAC (SEQ ID NO: 150)	GTTAAATGGTATGAAGGAAGTA ATAAATACTATGGAGACTCCGTG AAGGGC (SEQ ID NO: 200)	GGCGCCACGACTACGGTGACTTCTACTACGGTATGGACG TC (SEQ ID NO: 243)
AA	DFTMH (SEQ ID NO: 163)	LISWDGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 167)	PYYYFYGMDV (SEQ ID NO: 206)
A27 NA	AGCTATGCCATGAGC (SEQ ID NO: 157)	GCTATTAGTTATAGTGGCGGTAG CACATACTACGCAGGCTCCGTGA AGGGC (SEQ ID NO: 201)	GATCGGGAGGGAGCGACTTGGTACTACGGTATGGACGTC (SEQ ID NO: 244)
AA	SYAMS (SEQ ID NO: 158)	AISYSGGSTYYAGSVKG (SEQ ID NO: 202)	DREGATWYYGMDV (SEQ ID NO: 245)