

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0043720 (43) 공개일자 2014년04월10일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 37/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-7021269 (22) 출원일자(국제) 2012년03월01일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2013년08월12일 (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/053539 (87) 국제공개번호 WO 2012/117067 국제공개일자 2012년09월07일 (30) 우선권주장 11156416.7 2011년03월01일 유럽특허청(EPO)(EP) 61/448,827 2011년03월03일 미국(US)		(71) 출원인 노보 노르디스크 에이/에스 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 (72) 발명자 안데르센 메테 달 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포 레이트 패턴즈 노보 노르디스크 에이/에스 너르드비 페테르 리스비 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포 레이트 패턴즈 노보 노르디스크 에이/에스 (뒷면에 계속) (74) 대리인 송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **길항성 DR3 리간드**

(57) 요약

본 개시는 염증성 질환의 치료와 관련된다. 특히, 본 개시는 염증성 질환의 치료에 유용한 길항성 DR3 리간드와 관련된다.

(72) 발명자

키에르가르드 크리스티안

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

그렐 수산나 네데르가르드

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

그롤러 알브레흐트

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

부차르트 옌스

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

안데르센 헨릭 수네

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

파드키예르 쇠렌

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

카스트루프 제스퍼

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

하칸손 카타리나

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

호르눔 라르스

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

프리드리히센 비르기테

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

바운스가르드 도리트

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 코포
레이트 패턴츠 노보 노르디스크 에이/에스

특허청구의 범위

청구항 1

일가 길항성 DR3 항체로서, 상기 일가 항체는 DR3의 TL1A에 대한 결합을 차단하며, 이들의 이가 형태에서 상기 일가 항체는 DR3의 TL1A에 결합을 차단하는 작용성 항체인 일가 항체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 일가 항체는 W02011106707에 설명된 바와 같이 11H08 항체의 CDR 서열 (SEQ ID NOs 14+15)을 갖는 항체가 아닌 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 일가 항체는 친유성 모이어티에 콘쥬게이션되는 (conjugated) 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 4

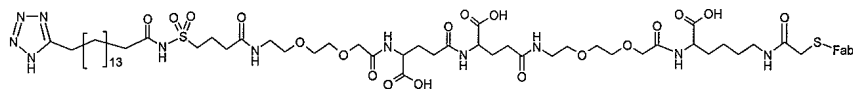
제 3항에 있어서, 상기 친유성 모이어티는 $-(CH_2)_n-CO-$ 지방 아실 기를 포함하며, n은 16-18인 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 5

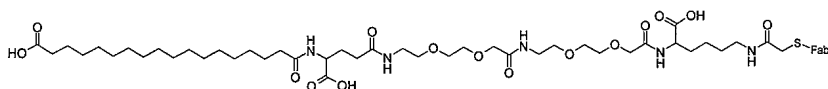
제 3항에 있어서, 상기 친유성 모이어티는 $-(CH_2)_n-CO-$ 지방 아실 기를 포함하며, n은 15인 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 6

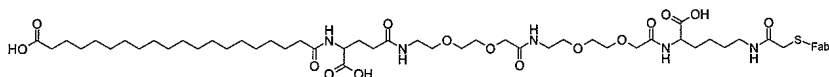
제 3항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 식 (I), (II), (III), (IV), (V), 및 (VI)로 구성된 그룹으로부터 선택된 친유성 모이어티에 콘쥬게이션되는 것을 특징으로 하는 일가 항체:



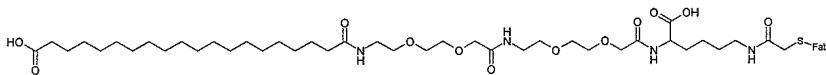
(I)



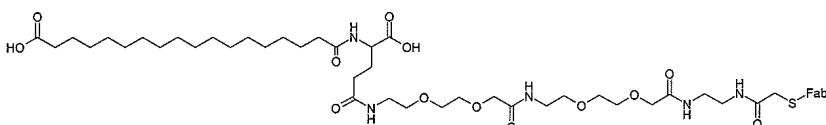
(II)



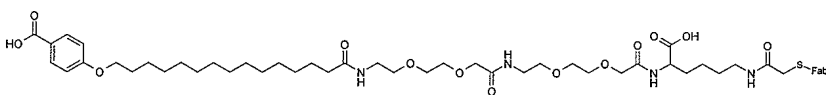
(III)



(IV)



(V)



(VI)

청구항 7

제 3항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 친유성 모이어티는 친수성 스페이서를 통해 항체의 중쇄에서 자연 발생한 C239 (카바트 번호 (Kabat numbering)) 시스템에 기재된 부속되는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 DR3상에서 에피토프에 결합하며, 상기 에피토프는 SEQ ID NO 1의 I43 및/또는 L45를 포함하는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 DR3상에서 에피토프에 결합하며, 상기 에피토프는 SEQ ID NO 1에 설명된 바와 같이 아미노산 G37 내지 L45 중 적어도 하나 및 아미노산 L57 내지 A59 중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 에피토프는 SEQ ID NO 1에 설명된 바와 같이 아미노산 G37 내지 L45 및 아미노산 L57 내지 A59를 포함하는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 Fab 단편인 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 일가 항체는 1 nM 미만의 해리 상수로 DR3에 결합하는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 사람 DR3의 CRD1 도메인에 결합하는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 14

SEQ ID NO 10에 설명된 3개의 CDR 서열 및 SEQ ID NO 11에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함하는 일가 항체.

청구항 15

일가 항체로서, 상기 항체는 사람 프레임워크, SEQ ID NO 16에 설명된 CDR3 서열 및 SEQ ID NO 17에 설명된 CDR3 서열뿐만 아니라 중쇄에서 "S49A" 역 돌연변이를 포함하는 일가 항체.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO 16에 설명된 3개의 CDR 서열, 및 SEQ ID NO 17에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 17

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 사람 DR3에 대한 결합에 대하여 "0228" 일가 항체와 경쟁하며, 0228 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 16에 설명되어있고 0228 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 17에 설명된 바와 같은 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 18

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 RA 환자의 활액 세포에서 IFN-감마 (IFN- γ) 방출을 감소시키며, 상기 활액 세포는 TL1A로 동시 자극되는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 19

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 CD 환자의 장내 생검의 점막고유층 단핵 세포 (LPMC)에서 하나 이상의 시토킨의 방출을 감소시키며, 상기 시토킨은 TNF- α , IL-6, GM-CSF, 및 IFN- γ 로 구성된 목록으로부터 선택되고, 상기 LPMC는 TL1A, IL-12, 및 IL-18로 동시 자극되는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 20

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 CD4+ T 세포에서 하나 이상의 시토킨의 방출을 감소시키며, 상기 시토킨은 TNF- α , IL-6, GM-CSF, 및 IFN- γ 로 구성된 목록으로부터 선택되고, 상기 T 세포는 TL1A에 의해 동시 자극되는 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 IgG4 타입 항체인 것을 특징으로 하는 일가 항체.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 23

염증성 질환을 치료하기 위한, 제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 따르는 일가 항체, 또는 제 22항의 약학적 조성물의 사용.

청구항 24

크론병 (CD)을 치료하기 위한, 제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 따르는 일가 항체, 또는 제 22항의 약학적 조성물의 사용.

청구항 25

류머티스성 관절염 (RA)을 치료하기 위한, 제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 따르는 일가 항체, 또는 제 22항의 약학적 조성물의 사용.

명세서

배경 기술

[0001] TL1A는 내피 세포, 수지상세포, 단핵 세포 및 다른 면역 세포에 의해 생산되는 TNF-슈퍼패밀리 멤버이다. TL1A은 활성화된 T-세포 및 다른 면역 세포에 의해 발현된 DR3-TNF 수용체-슈퍼패밀리 멤버를 통해 신호를 전달한다. TL1A에 의한 수용체 결합은 증가된 증식 및 T-조력 효과기 세포에 의한 시토킨 생산으로 이어진다. DR3 및 TL1A는 RA 및 CD에 수반되고 그러므로 DR3-유발 효과를 길항 작용하는 것은, 예를 들어, RA (류머티스성 관절염 (Rheumatoid Arthritis)) 및 CD (크론병 (Crohn's Disease))와 같은 염증성 질환의 치료에 바람직할 것이다.

[0002] WO2011106707은 DR3 특이적 항체 (11H08), 뿐만 아니라 다양한 항체 프레임워크에 삽입된 11H08 CDR 서열 (SEQ ID NO 14 + 15)을 포함하는, 이들의 변이체를 개시한다. 11H08 항체는 DR3에 상대적으로 낮은 친화도로 결합하고 그것은 CRD1 도메인에 결합하지 않는다. 따라서 업계에 염증성 질환의 치료에 유용한 DR3 길항제에 대한 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] DR3에 대하여 증가된 이가 항체는 작용성 효과를 갖는다. 이들 작용성 DR3 특이적 항체 중 일부는 DR3 및 TL1A 사이의 상호작용을 차단하는 능력을 갖는다. 작용성 항체는 증가된 증식 및 T-조력 효과기 세포에 의한 시토킨 생산으로 이어지고, 염증성 장애의 치료에 관하여 이가 DR3 항체를 사용하는 것은 바람직하지 않다.

[0004] 본 발명은 길항성 DR3 리간드를 제공하며, 상기 리간드는 DR3에 대하여 일가 특이성을 갖고, 상기 리간드는

TL1A의 DR3에 결합을 차단한다. 이러한 리간드는 바람직하게도 이가 작용성 항체로부터 유도되고 그것들은 선택적으로 반감기 연장 모이어티, 예를 들어, 친유성 모이어티와 콘주게이션된다 (conjugated). 이러한 리간드는 바람직하게도 높은 친화도를 갖고, 및/또는 바람직하게 DR3의 CRD1 도메인에 결합한다. 게다가 본 발명은 염증성 질환을 치료하는 이러한 리간드의 사용과 관련된다. 본 발명의 DR3 리간드는 여기에서 DR3를 통해 유발된 효과를 길항작용 하는 것이 가능한 것으로 나타난다.

도면의 간단한 설명

도 1: 여기에 나타난 서열.

도 2: FCM에 의해 분석된 CHOK1SV에서 DR3 발현. JD3은 상업적으로 이용 가능한 DR3 항체이다.

도 3: 100 μ M MSX로 배양된 CHOK1SV에서 안정한 DR3 발현. FCM에 의해 분석된 발현.

도 4: TNFR1 및 DR3 세포 외 도메인의 서열 정렬. 각각의 라인은 다시 A 및 B 서브도메인으로 나누어질 수 있는, 시스테인이 풍부한 도메인 (CRD)을 제공한다. TNFR1에 대하여 결정된 바와 같이, CRD에서 보존된 이황화 패턴이 강조된다.

도5: DR3를 과발현하는 CHO 세포에 결합된 사람 TL1A를 차단하는 능력을 위해 사전 스크리닝된 개개의 마우스-혈청. 오른쪽 막대 (검정)는 항-TL1A 대조군 (MAB7441 RnD Biosystems)이다.

도 6: 유동 세포분석법에 의해 수행된 TL1A:DR3 상호작용을 차단하는 항체의 예. 도 6a는 6개의 양성 DR3 항체의 DR3에 대한 특이적 결합을 나타낸다. 도 6b는 4개의 차단 항체 및 2개의 비-차단물질을 나타내는 억제 연구를 나타낸다. Y-축은 평균 강도 형광발광을 나타낸다.

도 7: 도 7a 차단 항체 및 대조군으로서 비-차단 DR3 특이적 항체 중 3개에 대한 적정 곡선-전체 항체 및 Fab's 로 나타남.

도 8: mAb에 대한 항-DR3 FAb가 있거나 없이 IL12/IL18 +TL1A로 자극된 CD4+ T 세포. T 세포 증식은 제5 일에 측정된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 발명자는 DR3 항원-가용성 버전 뿐만 아니라 이들의 세포 표면 발현된 버전-의 생산이 전통적인 접근법 중 아무것도 성공하지 않았을 정도로 어려운 것으로 입증되었다는 것을 인식하였다. 사람 세포주의 DR3의 세포 외 도메인의 재조합 발현은 보통 대량의 올리고머 및 고분자량 복합체를 함유하는 수용성 단백질의 분비로 이어졌다 (실시예 3 참조). 이들 올리고머화된 단백질 배치는 아마 면역화에 최적화되지 않았다. 수용성 단백질 발현 최적화와 병행하여 (실시예 3에 설명된 바와 같음), 마우스는 막-결합 DR3를 과발현하는 세포로 면역화되었다. 하지만, DR3를 과발현하는 안정한 세포주의 생산은 간단하지 않았다. 전체 길이 DR3의 죽음 도메인은 안정하게 트랜스펙션된, DR3를 과발현하는 세포주의 세포사로 이어지고 그러므로 전체 길이 DR3를 수정하는 것이 필요했다 (실시예 2 및 5 참조). 면역화는 항체-리포토리 다양성 및 중화 항-DR3 Ab의 생성 가능성을 증가시키기 위해 다른 마우스 품종 (BALB/C, RBF 및 NMRCF1)에서 수행되었다.

수백 가지의 DR3-결합 항체는 이들 중 소수 (-2%)만이 DR3:TL1A 결합을 차단/억제할 수 있다는 것이 확인되었다. 따라서 DR3:TL1A 결합을 차단하는 능력을 가진 DR3 항체는 DR3 유발 효과를 길항작용하는 능력을 갖는 것으로 생각된다. 하지만, 그것은 모든 DR3 항체가-그것들이 DR3:TL1A 결합을 차단하는 능력을 갖는지 여부에 관계없이-TL1A의 존재 및 부재 둘 다에서 작용성이다, 즉, 그것들은 분명히 TL1A 결합을 유발하는 DR3에 대한 효과를 어느 정도 모방했다는 것을 나타냈다.

이들 놀라운 관찰에 기초하여, 발명자는 모든 DR3 항체에 의해 가해진 작용성 효과에 대한 설명은 아마 어떤 이가 DR3 항체도 DR3의 클러스터링 (clustering)을 일으키고 DR3 클러스터링은 세포 내 DR3 신호 전달을 유도할 가능성을 가질 수도 있다는 것을 가정하였다. 게다가 이 가정은 TNFR 패밀리를 Fas (CD95) 및 TNFR2에 관하여 최근 공보에서 지원을 얻는다 (Wang et al. (2010) Nature Struc. Mol. Biol. 17, 1324-1328; Mukai et al. (2010) Sci. Signal. 3, ra83). Wang et al은 세포 내 신호 전달 복합체가 더 높은 차수이고 수용체의 적어도 5-7개의 카피를 함유한다는 것을 입증하는 구조 데이터 및 용액 데이터 둘 다를 제공한다. 유사하게는, Mukai et al.은 수용체의 세포 외 부분의 클러스터링은 리간드 결합에 의해 유발된다는 것을 입증한다. 따라서, 간행물 둘 다는 이들 TNFR 패밀리를 더 높은 차수의 클러스터링이 신호 전달을 위한 전제조건일 수도 있다는

것을 나타낸다.

- [0009] 이 가정을 테스트하기 위해, 과과인에 의한 mAb's의 분열에 의해 생성된 Fab 단편 (일가 DR3 항체)은 기능적 분석으로 테스트하였다. 이들 검정의 놀라운 결과는 일가 DR3 항체 (DR3:TL1A 결합을 차단/억제하는 능력을 갖는 DR3 항체의 기초하여 만들어짐)가 기능적 분석에서 길항성이다, 즉, 그것들은 DR3 유발 효과를 억제하는 능력을 가진다는 것이었다. 그러므로 일가 DR3 리간드/항체는 DR3-클러스터링을 가능하게 하지 않고 그러므로 그것들은 작용성 효과를 가지지 않는다.
- [0010] TL1A:DR3 상호작용을 방지하지 않는 항체는 음성 대조군으로서 사용되었다. 이 타입의 항체는 매우 높은 농도에 서 TL1A의 부제시 작용성이지만 mAb로서 만이다. 이들 항체의 해당 Fab는 TL1A-유발 효과를 방지할 수 없다.
- [0011] 정의:
- [0012] "염증"은 해로운 자극, 예를 들어, 병원체, 손상된 세포, 또는 자극물에 대한 혈관 조직의 복합적 생물학적 반응이다. 염증은 해로운 자극을 제거할 뿐만 아니라 조직에 대한 치유 과정을 개시하는, 유기체에 의한 보호적 시도이다. 염증은 감염에 대한 동의어는 아니다-감염이 외인성 병원체에 의해 유발되는 한편, 염증은 병원체에 대한 유기체의 면역계의 반응이다.
- [0013] 정상적으로, 면역계는 신체의 정상 세포 또는 "자기 (self)" 및 외래 병원체 또는 비정상 세포 또는 "비-자기 (nonsely)"를 구분할 수 있다. 면역계가 조직 또는 세포를 향한 정상적 및 이후의 반응으로서 "자기"를 인식하는 능력을 상실하는 과정은 내성, "자가 면역 (autoimmunity)"의 상태의 상실을 일으킨다. 자가 면역으로 인한 병리적 측면은 종종 심각한 임상결과를 가져오고 세계, 특히 선진국의 주요 건강 문제 중 하나이다.
- [0014] 생물학적 치료법은 현재 특정 자가 면역 질환 및/또는 암의 치료에 이용 가능하다. 예를 들어, 류머티스성 관절염에 걸린 환자는 리툭시맵 (항-CD20)으로 치료될 수도 있고, 크론병에 걸린 환자는 인플릭시맵 또는 나탈리주맵으로 치료될 수도 있다. 불행하게도, 이들 생물학적 약제 중 어떤 것으로 치료를 받은 환자는 또한 다양한 부작용을 경험하고 및/또는 비-반응자이고 및/또는 억제제를 개발한다. 특히 병원성 조직을 표적화하고 및/또는 건강한 조직에 영향을 미치지 않고 및/또는 덜 심각한 부작용을 일으키고 및/또는 더 적은 부작용을 일으키고 및/또는 장기간 사용될 수도 있고 및/또는 억제제의 형성을 일으키지 않는, 대안의 생물학적 의약품이 여전히 필요하다. 본 발명은 자가 면역 질환에 걸린 환자 및 만성 염증성 질환에 걸린 환자 사이에서 이들의 미충족 필요성과 관련된다.
- [0015] 따라서 본 발명의 리간드는 염증성 질환 및 상태, 예를 들어, 건선 (psoriasis), 타입 I 당뇨병 (type I diabetes), 그레이브 병 (Grave's disease), 염증성 장 질환 (Inflammatory bowel disease; IBD), 크론병, 궤양성 대장염 (ulcerative colitis), 과민성 대장 증후군 (irritable bowel syndrome), 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 류머티스성 관절염 (RA), 자가 면역 심근염 (autoimmune myocarditis), 가와사키병 (Kawasaki disease), 관상 동맥 질환 (coronary artery disease), 만성 폐쇄성 폐 질환 (chronic obstructive pulmonary disease), 간질성 폐 질환 (interstitial lung disease), 자가 면역성 갑상선염 (autoimmune thyroiditis), 전신 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus; SLE), 경피증 (scleroderma), 전신성 경화증 (systemic sclerosis), 건선성 관절염 (psoriatic arthritis), 골관절염 (osteoarthritis), 아토피성 피부염 (atopic dermatitis), 백납 (vitiligo), 이식편 대 숙주 병 (graft vs. host disease), 쇼그렌 증후군 (Sjogrens's syndrome), 자가 면역성 신염 (autoimmune nephritis), 굿패스츄어 증후군 (Goodpasture's syndrome), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경 장애 (chronic inflammatory demyelinating 폴리neuropathy), 알레르기 (allergy), 천식 (asthma) 및 다른 자가 면역 질환의 치료에 사용에 적합하다.
- [0016] **크론병** (CD/육아종 (granulomatous)/대장염)은 입에서 항문까지의 위장관 중 어떤 부분에도 영향을 미칠 수 있는, 장의 염증성 질환이며, 다양한 증상을 유발한다. 그것은 우선 주로 복통, 설사 (혈변일 수도 있음), 구토, 또는 체중 감소를 일으키지만, 또한 피부 발진 (skin rash), 관절염, 눈의 염증, 피로 (tiredness), 및 집중력 부족과 같은, 위장관 외부의 합병증을 유발할 수도 있다. 크론병에 대하여 알려진 약학적 또는 수술적 치료는 없다. 치료 옵션은 증상의 조절, 차도의 유지 및 재발의 방지로 제한된다.
- [0017] **류머티스성 관절염 (RA):** RA는 전체 신체에 영향을 미치는 전신성 질환이고 관절염의 가장 일반적인 형태 중 하나이다. 그것은 관절을 라이닝 (lining)하는 막의 염증을 특징으로 하며, 통증, 경직, 온기, 홍조 및 부기를 유발한다. 염증 세포는 뼈 및 연골을 분해할 수도 있는 효소를 방출한다. 류머티스성 관절염의 결과로서, 염증이 생긴 관절 라이닝, 활막은 뼈 및 연골에 침입하여 이를 손상시킬 수 있으며, 다른 생리학적 효과 중에 관절 약화 및 극심한 통증으로 이어진다. 관련 관절은 그것의 모양 및 배열을 상실하며, 통증 및 움직임의 상실을 일으

킨다.

- [0018] 업계에 알려진 류머티스성 관절염에 대한 여러 동물 모델이 있다. 예를 들어, 콜라겐-유발 관절염 (CIA) 모델에서, 마우스는 사람 류머티스성 관절염과 매우 유사한 만성 염증성 관절염에 걸린다. CIA는 RA와 유사한 면역학적 및 병리학적 특징을 공유하기 때문에, 이것은 그것을 잠재적 사람 항-염증성 화합물의 선별을 위한 이상적인 모델로 만든다.
- [0019] "DR3"는 가끔 죽음 수용체 3, TRAMP, TNFRSF12, TNFR25, TNFRS25, APO-3, DDR3, LARD, TR3, WSL-1, 또는 WSL-LR로 나타난다. 사람 DR3는 세포 외 도메인에 4개의 시스테인 풍부 모티브 및 세포질 도메인에 "죽음 도메인"을 포함하는 TNF 수용체 (TNFR) 슈퍼패밀리의 멤버이다. 사람 DR3은 SEQ ID 1에 정의된 바와 같이 아미노산 서열을 포함한다. DR3의 세포 외 도메인 (잔기 25-199)은 4개의 시스테인-풍부 도메인 (CRD1, CRD2, CRD3 및 CRD4)을 포함한다. 각각의 CRD는 전형적으로 3개의 이황화 결합을 형성하는 6개의 시스테인 잔기를 함유한다. 게다가 각각의 CRD는 TNFR 슈퍼패밀리의 통상적인 멤버에서 전형적으로 관찰되는 모듈 A1 및 B2로 세분될 수 있다.
- [0020] "DR3의 TL1A에 결합을 차단/억제/감소". 본 발명의 일가 리간드/항체는 DR3:TL1A 결합을 억제/차단/감소시키는 능력을 갖는다. 그것은 대용량 이미지 기반 검정에서 테스트될 수 있다. 이것은 DR3 트랜스펙션된 CHO 세포에 결합하는 능력에 대해 스크리닝함으로써 FRET 시스템에서 실행되었고 야생형 세포에 대하여 카운터-스크리닝되었다 (실시예 4에 더 상세히 설명됨). 본 발명의 일가 리간드/항체는, 이 검정에서 측정된 바와 같이, DR3:TL1A 결합이 적어도 10%, 바람직하게 적어도 20%, 바람직하게 적어도 25% 바람직하게 적어도 30%, 바람직하게 적어도 40%, 바람직하게 적어도 50%, 바람직하게 적어도 60%, 바람직하게 적어도 70%, 바람직하게 적어도 75%, 바람직하게 적어도 80%, 바람직하게 적어도 90%, 바람직하게 적어도 95% 및 가장 바람직하게 약 100% 감소되면, DR3:TL1A 결합을 차단 또는 억제 또는 감소시키는 능력을 갖는다.
- [0021] "지연성 기"/"반감기 연장 모이어티"는 여기에서-SH,-OH,-COOH,-CONH2,-NH2, 또는 하나 이상의 N-및/또는 O-글리칸 구조와 같이 하나 이상의 아미노산 부위 사슬 기능성에 부착된 및 이들 단백질/펩티드에 공유결합될 때, 많은 치료 단백질/펩티드의 생체 내 순환 반감기를 증가시킬 수 있는 하나 이상의 화학기로서 생각된다. 지연성 기/반감기 연장 모이어티의 예는 다음을 포함하지만 이에 제한된다: 생체 적합성 지방산 및 이들의 유도체, 히드록시 알킬 전분 (HAS) 예를 들어, 히드록시 에틸 전분 (HES), 폴리 에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리(Gly_x-Ser_y)_n (HAP), 히알루론산 (HA), 헤파로산 폴리머 (HEP), 포스포틸콜린-기반 폴리머 (PC 폴리머), 플렉시머, 텍스트란, 폴리-시알산 (PSA), Fc 도메인, 트랜스페린, 알부민, 엘라스틴 유사 펩티드, XTEN 폴리머, 알부민 결합, CTP 펩티드, 및 이들의 조합.
- [0022] 본 발명의 "PEG화된 DR3 리간드 변이체"는 DR3 리간드 폴리펩티드 중 어떤 아미노산 잔기 또는 탄수화물 모이어티를 포함하는, DR3 리간드 폴리펩티드 중 어떤 파트에도 부착되는 하나 이상의 PEG 분자를 갖는다. 화학적 및/또는 효소적 방법은 PEG 또는 다른 지연성 기를 본 발명의 일가 DR3 리간드의 글리칸에 공유결합에 이용될 수 있다. 효소적 공유결합 과정의 예는 예를 들어, W003031464에 설명된다. 글리칸은 자연 발생할 수도 있거나 그것은 업계에 잘 알려진 방법을 사용하여, 예를 들어, N-결합된 글리코실화 부위의 삽입을 통해 삽입될 수도 있다. 본 발명의 "시스테인-PEG화된 DR3 리간드 변이체"는 DR3 리간드에 존재하는 시스테인의 술폰드릴기에 공유결합된 하나 이상의 PEG 분자를 갖는다. 본 발명의 "시스테인-아실화된 DR3 리간드 변이체" 또는 "시스테인-알킬화된 DR3 리간드 변이체"는 DR3 리간드에 도입된 시스테인의 술폰드릴 기에 공유결합된 하나 이상의 소수성 반감기 연장 모이어티를 갖는다. 게다가 지연성 반감기 연장 모이어티를 다른 아미노산 잔기에 결합시키는 것이 가능하다.
- [0023] 포유동물 종의 순환 혈액 중의 가장 풍부한 단백질 성분은 혈청 알부민이며, 이것은 정상적으로는 전체 혈액 100 밀리리터 당 약 3 내지 4.5 그램의 농도로 존재한다. 혈청 알부민은 순환계에서 여러 중요한 기능을 가진 약 65,000 달톤의 혈액 단백질이다. 그것은 혈액에서 발견된 다양한 유기 분자의 수송자로서, 혈액을 통해 지방산 및 빌리루빈과 같은 다양한 대사산물의 주요 수송자로서, 및 그것의 풍부함 때문에, 순환 혈액의 삼투압 조절자로서 기능한다. 혈청 알부민은 일주일 이상의 반감기를 갖고, 단백질의 혈장 반감기를 증가시키는 한 접근법은 단백질을 혈청 알부민에 결합하는 모이어티와 공유결합시키는 것이었다. 알부민 결합 속성은 J. Med. Chem., 43, 1986, (2000)에 설명된 바와 같이 결정될 수도 있으며, 이것은 본원에 참고로 포함된다.
- [0024] 소수성/친유성 반감기 연장 모이어티: 본 발명의 리간드는 바람직하게 자연에서 주로 친유성/소수성인 반감기 연장 모이어티와 공유결합된다. 바람직한 구체예에서, 소수성 반감기 연장 모이어티는 알부민을 가진 비-공유 결합 복합체 ("알부민 바인더")를 형성할 수 있고, 이로 인해 혈류와 함께 유도체의 순환을 촉발하고, 또한 유도체의 작용의 시간을 연장하는 효과를 갖는다. 따라서, 바람직한 치환기, 또는 모이어티는, 전체로서, 알부민

결합 모이어티로 나타날 수도 있다.

- [0025] 반감기 연장 모이어티는 바람직하게 본 발명의 DR3 리간드에 부착된 그것의 지점과 비교하여 알부민 결합 모이어티에 또는 이것의 근처에, 반대쪽 끝에 있다. 알부민 결합 모이어티의 다른 부분, 즉, 반감기 연장 모이어티 및 펩티드에 부착된 지점 사이의 부분은 결합자 모이어티, 결합자, 스페이서, 등으로 나타날 수도 있다. 하지만, 결합자의 존재는 선택적이고, 이런 이유로 알부민 결합 모이어티는 반감기 연장 모이어티와 동일할 수도 있다.
- [0026] 특정 구체예에서, 알부민 결합 모이어티 및/또는 반감기 연장 모이어티는 친유성이고, 및/또는 생리학적 pH (7.4)에서 음전하를 띤다.
- [0027] 알부민 결합 모이어티 및/또는 반감기 연장 모이어티는 알킬화, 아실화, 또는 아미드 형성과 같은 콘쥬게이션 화학반응에 의해 펩티드의 아미노기에, 또는 예를 들어, 에스테르화, 알킬화에 의해 히드록실 기에, 또는 옥심화를 통해 다른 기에 공유 결합으로 부착될 수도 있다.
- [0028] 바람직한 구체예에서, 알부민 결합 모이어티 및/또는 반감기 연장 모이어티의 활성 황친화성 유도체는 항-DR3 Fab의 시스테인 잔기의 티올에 공유결합으로 결합된다. 이러한 황친화성 기는 말레이미드, 할로-말레이미드, 할리드 (특히 α -할로아세틸), 아크릴로일-유도체 (예를 들어, 아크릴레이트 및 아크릴아미드), 비닐술폰, 반응성 이황화 기 (예를 들어, 2-피리딜)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 본 발명의 항-DR3 Fab'는 바람직하게 티오에테르 또는 이황화 결합을 통해 알부민 결합 모이어티에 결합된다.
- [0029] 본 발명의 일가 항체, 예를 들어, Fab' 단편은 온전한 항체의 중쇄 황 브리지 중 하나의 일부를 형성하는 중쇄로부터 자연 발생한 시스테인 잔기를 함유하도록 설계될 수도 있다.
- [0030] 이 시스테인 잔기는 C239 (카바트 번호)로 불린다. 시스테인 잔기는 또한 유전적 조작에 의해 삽입될 수 있지만 콘쥬게이션의 목적으로 자연 발생한 시스테인 잔기의 이용과 관련된 안전성의 이점이 있을 수도 있다.
- [0031] 바람직한 구체예에서, 알부민 결합 모이어티 및/또는 소수성 반감기 연장 모이어티의 활성 에스테르는, 아미드 결합의 형성 하에, 시알산 잔기 또는 시알산 유도체의 아미노기에 공유결합으로 결합된다 (이 과정은 아실화로 나타남).
- [0032] 본 발명의 매우 바람직한 구체예에 따라, 알부민 결합 모이어티는 효소적 방법, 예를 들어, 시알릴일트랜스퍼라제의 사용을 수반하는 방법을 사용하여 글리칸을 통해 리간드에 부착된다.
- [0033] 본 목적을 위해, 용어 "알부민 결합 모이어티", "반감기 연장 모이어티", 및 "결합자"는 이들 분자의 비반응 뿐만 아니라 반응 형태도 포함한다. 하나의 또는 다른 형태를 의미하는지 여부는 용어가 사용된 맥락으로부터 분명하다.
- [0034] 용어 "지방산"은 4 내지 28개의 탄소 원자를 가진 지방족 모노카르복실산을 나타내며, 그것은 바람직하게 분기되지 않고 (unbranched), 및/또는 짝수이고, 그것은 포화되거나 불포화될 수도 있다.
- [0035] 용어 "지방 2산"은 상기 정의된 바와 같이 지방산을 나타내지만 오메가 위치에 추가적인 카르복실산 기를 갖는다. 따라서 지방 2산은 디카르복실산이다.
- [0036] 명명법은 업계에서와 같이 일반적이다, 예를 들어, $-COOH$, 뿐만 아니라 $HOOC-$ 는 카르복시를 나타내고; $-C_6H_4-$ 는 페닐렌을 나타내고; $-CO-$, 뿐만 아니라 $-OC-$ 는 카르보닐 ($O=C<$)을 나타내고; C_6H_5-O- 는 페녹시를 나타내고, 할리드는 할로겐 $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, 및 $-At$ 를 나타낸다.
- [0037] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 알부민 결합 모이어티는 결합자 및 시알산 잔기 또는 시알산 유도체를 통해 펩티드 또는 단백질에 결합된 지방 아실 기 ($-(CH_2)_n-CO-$, 여기에서 $n=1,2,3,\dots,40$) 또는 오메가-카르복시 지방 아실 기 ($HO_2C-(CH_2)_n-CO-$, 여기에서 $n=1,2, 3,\dots,40$)을 포함한다.
- [0038] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 알부민 결합 모이어티는 결합자 및 시스테인 잔기를 통해 펩티드 또는 단백질에 결합된 지방 아실 기 ($-(CH_2)_n-CO-$, 여기에서 $n=1,2, 3,\dots,40$) 또는 오메가-카르복시 지방 아실 기 ($HO_2C-(CH_2)_n-CO-$, 여기에서 $n=1,2, 3,\dots,40$)를 포함한다. 특히 바람직한 구체예에서, n 은 16 또는 18이다.
- [0039] 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 알부민 결합 모이어티는 결합자 및 시스테인 잔기를 통해 펩티드 또는 단백질에 결합된, 타입 $R-(CH_2)_n-CO-$ 의 지방 아실 기를 포함하며, 여기에서 $n=1,2,3,\dots,40$ 이다. R 은 산성 기, 예

를 들어, 테트라졸-5-일 또는 $-O-C_6H_4-COOH$ 를 포함하는 기이다. 특정 바람직한 구체예에서, n 은 14 또는 15이다.

- [0040] $-(CH_2)_{12}$ -모이어티를 가진 화합물은 본 발명의 맥락에서 가능한 알부민 바인더이다. 이러한 화합물이 단백질 또는 펩티드에 부착되고 상기 단백질 또는 펩티드의 증가된 혈장 반감기를 일으킨다면, 알부민 바인더는 혈장 반감기의 전체 증가에 기여할 수도 있다고 생각된다.
- [0041] 바람직한 구체예에서, 결합자 모이어티는, 존재하면, 2 내지 80개의 C-원자, 바람직하게 5 내지 70개의 C-원자를 갖는다. 추가적인 바람직한 구체예에서, 결합자 모이어티는, 존재하면 4 내지 20개의 헥테로 원자, 바람직하게 2 내지 40개의 헥테로 원자, 더 바람직하게 3 내지 30개의 헥테로 원자를 갖는다. 헥테로 원자의 특히 바람직한 예는 N-, 및 O-원자이다. H-원자는 헥테로 원자가 아니다.
- [0042] 또 다른 구체예에서, 결합자는 적어도 하나의 OEG 분자, 및/또는 적어도 하나의 글루탐산 잔기, 또는 대신 해당 라디칼 (radical) (OEG는 8-아미노-3,6-디옥사옥탄산, 즉, 이 라디칼: $-NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-CO-$ 를 지칭한다)을 포함한다.
- [0043] 한 바람직한 구체예에서, 결합자 모이어티는 디-카르복사미드 모이어티를 포함하고 결합자는 티오에테르 결합을 통해 시스테인 잔기에 결합된다. 바람직한 예에서, 디-카르복사미드 모이어티는 2-30개의 C-원자, 바람직하게 4-20개의 C-원자, 더 바람직하게 4-10개의 C-원자를 포함한다.
- [0044] 한 바람직한 구체예에서, 결합자 모이어티는 아마이드 결합에 의해 시알산 잔기에 결합된 디-카르복사미드 모이어티를 포함한다. 바람직한 예에서, 디-카르복실 잔기는 2-30개의 C-원자, 바람직하게 4-20개의 C-원자, 더 바람직하게 4-10개의 C-원자를 갖는다. 추가적인 바람직한 예에서, 디-카르복실 잔기는 0-10개의 헥테로-원자, 바람직하게 0-5개의 헥테로-원자를 갖는다.
- [0045] 또 다른 바람직한 구체예에서, 결합자 모이어티/스페이서는 그것의 말단의 카르복실 기를 통해 아마이드 결합에 의해 시알산 잔기에 결합된, 아미노 및 말단의 카르복실-기 둘 다를 함유하는 기를 포함한다. 한 바람직한 구체예에서, 이 기는 OEG 기이다. 용어 "친수성 스페이서"는 여기에 사용된 바와 같이 본 발명의 일가 DR3 항체/리간드 및 적어도 5개의 비-수소 원자를 포함하는 화학적 모이어티를 갖고, 이것들 중 30-50%는 N 또는 O인, 알부민 결합 잔기를 분리하는 스페이서를 의미한다. 바람직하게, 알부민 결합 잔기는, 친수성 스페이서를 통해, Cys 잔기에 결합된다.
- [0046] 아미노산 글루탐산 (Glu)은 2개의 카르복실산 기를 포함한다. 그것의 감마-카르복시 기는 바람직하게 시알산 잔기 또는 시알산 유도체의 아미노기, 또는 존재하면, OEG 분자의 아미노기, 또는 존재하면, 또 다른 Glu 잔기의 아미노기를 갖는 아마이드 결합의 형성에 사용된다. Glu의 아미노기는 차례로 반감기 연장 모이어티의 카르복시기, 또는 존재하면, OEG 분자의 카르복시 기, 또는 존재하면, 또 다른 Glu의 감마-카르복시 기를 갖는 아마이드 결합을 형성한다. 이 Glu의 포함 방법은 가끔 간단히 "감마-Glu"로 나타난다.
- [0047] "Fc 융합 유도체" 또는 "Fc 융합 단백질" 또는 돌연변이된 Fc 도메인을 갖는 DR3 항체는 여기에서 어떤 항체 이소타입으로부터 유도될 수 있는 Fc 도메인에 융합된, 본 발명의 DR3 리간드를 포함하지만, IgG Fc 도메인은 종종 IgG 항체의 상대적으로 긴 순환 반감기로 인해 바람직하다는 것을 의미한다. IgG1 및 IgG4 이소타입이 바람직하다. 게다가 Fc 도메인은 특정 효과기 기능, 예를 들어, 보체 결합 및/또는 특정 Fc 수용체에 결합을 조절하기 위해 변형될 수도 있다. 게다가 Fc 도메인은 신생의 Fc 수용체에 대한 친화도를 증가시키기 위해 조절될 수도 있다. FcRn 수용체에 결합하는 능력을 가진, 본 발명의 DR3 리간드의 Fc 도메인과 융합은 일반적으로 융합 단백질의 연장된 순환 반감기를 발생시킨다. IgG1 Fc 도메인에서 위치 234, 235 및 237의 돌연변이는 일반적으로 FcγRI 수용체 및 아마도 또한 FcγRIIa 및 FcγRIIIa 수용체에 대한 감소된 결합을 일으킨다. 이들 돌연변이는 FcRn 수용체에 결합을 변화시키지 않으며, 이것은 식작용 재활용 경로에 의해 긴 순환 반감기를 촉진한다. 바람직하게, 본 발명의 융합 단백질의 변형된 IgG1 Fc 도메인은 각각 특정 Fc 수용체 (L234A, L235E, 및 G237A)에 대한 감소된 친화도 및 C1q-매개 보체 고정 (A330S 및 P331S)을 일으키는 다음 돌연변이 중 하나 이상을 포함한다. 대안으로, Fc 도메인은 임의로 S241P/S228P 돌연변이를 포함하는 IgG4 Fc 도메인일 수도 있다.
- [0048] 용어 "항체", "단클론성 항체" 및 "mAb"는 여기에 사용된 바와 같이, 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 가진 면역글로불린 분자 및 이들의 단편을 나타내기 위한 것이다. 전체 길이 항체는 이항화 결합에 의해 상호연결된 4개의 폴리펩티드 사슬, 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (여기에서 HCVR 또는 VH로 축약됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3

으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (여기에서 LCVR 또는 VL로 축약됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 추가로 상보성 결정 영역 (complementarity determining region; CDR)으로 불리는 추가변성의 영역과 함께 프레임워크 영역 (framework region; FR)으로 불리는 더 보존된 영역으로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되고, 다음 순서로 아미노-말단에서 카르복시 말단으로 배치된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 항체는 다른 이소타입의 형태, 예를 들어, IgG (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA1, IgA2, IgD, 및 IgE 일 것이다. 전체 길이 항체는 정상적으로 이가 (bi-valent)/이가 (di-valent)이다, 즉, 그것은 2개의 "팔"을 가진 항원에 결합하는 능력을 갖는다. 반대로, 본 발명의 일가 항체는 항원/DR3에 특이적인 단 하나의 결합 부위를 포함한다.

[0049] "Fab 영역"/"Fab 도메인"/"Fab 단편"/"Fab"는 항체가 결합하는 특정 표적을 정의하는 가변성 섹션을 함유한다. Fab 단편은 본 발명의 단일특이적/일가 DR3 리간드/DR3 항체의 예이다.

[0050] 본 발명의 일가 DR3 리간드/항체의 예는 (i) Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH I 도메인으로 구성된 일가 단편; (ii) 예를 들어, 경첩 영역에서 이황화 결합에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편으로서, 이들 Fab 단편 중 단 하나만이 DR3에 특이적인 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 구성된, dAb 단편 (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); (vi) 분리된 상보성 결정 영역 (CDR); 및 (v) DR3에 대하여 일가인 이중 특이적 항체를 포함한다. 게다가, Fv 단편의 2개의 도메인, VL 및 VH는 별도의 유전자에 의해 암호화되지만, 그것들은, 재조합 방법을 사용하여, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어서 일가 분자 (단일 사슬 Fv (scFv)로 알려짐; 예컨대, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어질 수 있게 하는 합성 결합자에 의해 결합될 수 있다. 단일 사슬 항체의 다른 형태, 예를 들어, 이중체 (diabody)는 또한 용어 "일가 DR3 리간드/항체" 내에 포함된다.

[0051] "이중체"는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩티드 사슬 상에서 발현되는 이가, 이중 특이적 항체이지만, 같은 사슬 상에 2개의 도메인 사이에서 짝을 이루기 위해 매우 짧은 결합자를 사용하고, 이로 인해 도메인이 또 다른 사슬의 상보성 도메인과 짝을 이루도록 강요되고 2개의 항원 결합 부위를 생성한다 (예컨대, Hol-liger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

[0052] 용어 "사람 항체"는, 여기에 사용된 바와 같이, 사람 생식 계열 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역을 가진, 본 발명의 일가 DR3 항체를 의미한다. 본 발명의 사람 항체는 예를 들어, CDR에서 및 특히 CDR3에서 사람 생식 계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내 무작위의 또는 부위 특이적 돌연변이 유발 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수도 있다.

[0053] 하지만, 용어 "사람 항체"는 여기에 사용된 바와 같이 또 다른 포유동물 종, 예를 들어, 마우스의 생식 계열로부터 유도된 CDR 서열이 사람 프레임워크 서열에 이식된 항체, 예를 들어, 소위 "사람화 항체" 또는 사람/마우스 키메라 항체를 포함하지 않는다.

[0054] 용어 "키메라 일가 항체"는 전형적으로 다른 종에 속한 면역글로불린 가변 및 불변 영역 유전자의 유전적 조작에 의해 경쇄 및 중쇄 유전자가 구성되는, 본 발명의 일가 DR3 항체를 나타낸다. 예를 들어, 마우스 단클론성 항체의 유전자의 가변 세그먼트가 사람 불변 세그먼트에 결합될 수도 있다.

[0055] 용어 "에피토프"는 여기에 사용된 바와 같이 일가 항체가 결합하는 항원에 대한 어떤 항원성 결정요인도 의미한다. 에피토프성 결정요인은 보통 아미노산 또는 당 모이어티와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그루핑 (grouping)으로 구성되고 종종 특이적 3차원 구조적 특징, 뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 갖는다. 에피토프를 특성화하는 방법의 예는 HX-MS, NMR, X선, 펩티드 워킹 (walking), 검정, 등을 포함한다. 용어 "파라토프"는 항원을 인식하는 항체의 일부를 나타낸다.

[0056] 본 발명의 일가 DR3 항체는 그것들이 인식하거나 특이적으로 결합하는 에피토프(들) 또는 DR3의 일부(들)에 관하여 설명되거나 명시될 수도 있다. 에피토프(들) 또는 폴리펩티드 일부(들)은 예를 들어, N-말단 및 C-말단 위치에 의해, 또는 인접한 아미노산 잔기의 크기에 의해 명시될 수도 있다. 본 발명의 일가 DR3 항체는 또한 그것들의 교차-반응성에 관하여 설명되거나 명시될 수도 있다. 폴리펩티드의 어떤 다른 유사체, 오솔로그 (ortholog), 또는 상동체와도 결합하지 않는 항체가 포함된다.

[0057] "에피토프 비닝 (binning)"/"경쟁 결합 검정"은 DR3와 동시에 결합할 수 있거나 없고, 이로 인해 DR3 단백질 상

의 같은, 또는 중복되는 에피토프에 결합하지 않는 본 발명의 리간드/항체를 확인하거나 (실시에 10 참조), 부피 변화 장해 (steric hindrance)로 인해 동시에 결합할 수 없는 리간드/항체의 짝을 확인하기 위한 경쟁적 결합 검정의 사용을 나타낸다. 비닝 실험은 항원적으로 별개의 에피토프가 존재한다는 증거를 제공한다. 하지만, 스스로에 의해, 그것들은 특정 아미노산 서열 또는 DR3 단백질 상의 위치에서 에피토프를 확인하지 않거나, "매핑 (mapping)"하지 않는다. 결합을 위한 경쟁은 리간드/항체 또는 단편의 어떤 짝에 대해서도 평가될 수 있다. 흔히, 리간드/항체의 패밀리 (또는 빈 (bin))의 선호하는 성질은 항체 빈/경쟁적 그룹에 의해 한정된 특이적 에피토프에 결합과 연관될 수 있다.

[0058] 용어 "면역반응하다" 또는 "면역반응"은, 여기에 사용된 바와 같이, 리간드/항체의 10^{-4} M보다 낮은 해리 상수 Kd를 갖는, 그것의 에피토프에 어떤 결합도 의미한다. 용어 "면역반응하다" 또는 "면역반응"은 적절히 용어 "특이적 결합"과 교체 가능하게 사용된다.

[0059] 용어 "친화도"는 여기에 사용된 바와 같이, 본 발명의 리간드/항체의 에피토프에 결합의 강도를 의미한다. 항체/리간드의 친화도는 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ 로 정의된, 해리 상수 kd에 의해 측정되며, [Ab-Ag]는 항체-항원 복합체의 몰 농도이고, [Ab]는 결합되지 않은 항체의 몰 농도이고 [Ag]는 결합되지 않은 항원의 몰 농도이다. 친화도 상수 ka는 $1/Kd$ 에 의해 정의된다. 경쟁적 억제에 의해 항체 특이성 및 친화도를 결정하는 바람직한 방법은 Harlow, et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), 및 Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983)에서 발견될 수 있다.

[0060] 여기에 설명된 바와 같이 "RA 환자의 활액 (synovial fluid) 세포에서 IFN-감마 (IFN- γ) 방출의 감소"가 측정될 수 있다. 약 0.1, 0.5, 1, 또는 5 g 일가 항체/ml의 농도로, 여기에 설명된 검정 조건을 사용하여, RA 환자의 활액 T 세포에서 IFN- γ 방출은 적어도 15%, 더 바람직하게 적어도 20%, 더 바람직하게 적어도 25%, 더 바람직하게 적어도 30%, 더 바람직하게 적어도 35%, 더 바람직하게 적어도 40%, 더 바람직하게 적어도 45%, 더 바람직하게 적어도 50%, 및 가장 바람직하게 적어도 60%, 더 바람직하게 적어도 70%, 더 바람직하게 적어도 75%, 더 바람직하게 적어도 80%, 및 가장 바람직하게 적어도 95% 감소되는 것으로 생각된다. 환자의 물질 반응에서, 본 발명의 항체는 RA 뿐만 아니라 CD 환자의 물질에서 인터페론 방출 (예를 들어, IFN-감마)을 감소시킨다.

[0061] "CD 환자의 장내 생검의 점막고유층 (Lamina Propria) 단핵 세포 (LPMC)에서 하나 이상의 시토킨의 방출 감소"는 여기에 설명된 바와 같이 측정될 수 있다. 약 0.1, 0.5, 1, 또는 5 μ g 일가 항체/ml의 농도로, 여기에 설명된 검정 조건을 사용하여, CD 환자의 LPMC에서 시토킨 방출은 적어도 15%, 더 바람직하게 적어도 20%, 더 바람직하게 적어도 25%, 더 바람직하게 적어도 30%, 더 바람직하게 적어도 35%, 더 바람직하게 적어도 40%, 더 바람직하게 적어도 45%, 더 바람직하게 적어도 50%, 및 가장 바람직하게 적어도 60%, 더 바람직하게 적어도 70%, 더 바람직하게 적어도 75%, 더 바람직하게 적어도 80%, 및 가장 바람직하게 적어도 95% 감소되는 것으로 생각된다. 환자의 물질 반응에서, 본 발명의 항체는 RA 뿐만 아니라 CD 환자의 물질에서 인터페론 방출 (예를 들어, IFN-감마)을 감소시킨다.

[0062] "CD4+ T 세포에서 하나 이상의 시토킨의 방출 감소"는 여기에 설명된 바와 같이 측정될 수 있다. 약 0.1, 0.16, 0.5, 1, 또는 5 μ g 일가 항체/ml의 농도로, 여기에 설명된 검정 조건을 사용하여, CD4+ T 세포에서 시토킨 방출은 적어도 15%, 더 바람직하게 적어도 20%, 더 바람직하게 적어도 25%, 더 바람직하게 적어도 30%, 더 바람직하게 적어도 35%, 더 바람직하게 적어도 40%, 더 바람직하게 적어도 45%, 더 바람직하게 적어도 50%, 및 가장 바람직하게 적어도 60%, 더 바람직하게 적어도 70%, 더 바람직하게 적어도 75%, 더 바람직하게 적어도 80%, 및 가장 바람직하게 적어도 95% 감소되는 것으로 생각된다.

[0063] 본 발명의 DR3 리간드를 포함하는 "약학적 조성물"은 본 발명의 리간드를 포함하는 용기를 포함하는 키트로서 공급될 수도 있다. 치료적 폴리펩티드는 일회 또는 다회수 투여용 주사 가능한 용액의 형태로, 또는 주사 전에 재구성될 것인 멸균 분말로서 제공될 수 있다. 본 발명의 리간드를 포함하는 약학적 조성물은 피하 및/또는 IV 투여에 적합하다. 본 발명의 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수도 있다.

[0064] 용어 "치료"는, 여기에 사용된 바와 같이, 이것을 필요로 하는 어떤 사람 또는 다른 동물 대상체의 의학적 치료를 나타낸다. 상기 대상체는 상기 특정 치료의 사용이 상기 사람 또는 다른 동물 대상체의 건강에 이롭다는 것을 나타내는 잠정적 또는 확정적 진단을 제공하는 의사 또는 수의사에 의해 신체 검사를 겪은 것으로 예상된다. 상기 치료의 타이밍 및 목적은 대상체의 건강의 현재 상태에 따라, 한 개체에서 또 다른 개체까지 다를 수도 있

다. 따라서, 상기 치료는 예방, 완화, 진단 및/또는 치유적일 수도 있다.

[0065] 본 발명에 관하여, 예방, 완화, 진단 및/또는 치유적 치료는 본 발명의 별도의 양태를 제공할 수도 있다.

[0066] 본 발명의 리간드는 다른 약물 (예를 들어, 메토티렉세이트, 텍사메타손, 및 프레드니손) 및/또는 다른 생물학적 약물과 함께 투여될 수도 있다.

[0067] 일가 DR3 항체/리간드는 재조합 기술의 방법에 의해 생산될 수도 있다. 본 발명의 일가 DR3 항체/리간드를 암호화하는 DNA 서열은 보통 재조합 벡터에 삽입된다. 벡터는 바람직하게 DNA 서열이 DNA의 전사 뿐만 아니라 원하는 숙주 세포에서 클로닝된 유전자 또는 cDNA의 전사를 지시할 수 있는 프로모터의 전사에 필요한 추가적인 세그먼트에 작동 가능하게 결합되는 발현 벡터이다.

[0068] 세포가 DNA를 차지한 후, 그것들은 원하는 유전자의 발현을 시작하도록, 전형적으로 1-2일 동안, 적절한 성장 배지에서 성장된다. 일가 DR3 항체/리간드를 암호화하는 DNA 서열이 도입되는 숙주 세포는 어떤 세포도 될 수 있고, 효모, 균류, 박테리아 및 더 높은 진핵세포를 포함한다. 본 발명에 사용되는 포유동물 세포주의 예는 COS-1, 새끼 햄스터 신장 (BHK) 및 293이다. 바람직한 BHK 세포주는 BHK 570 세포로 나타날 수도 있는 tk-ts13 BHK 세포주이다. 게다가, 래트 Hep I, 래트 Hep II, TCMK, NCTC 1469, CHO, 및 DUKX 세포를 포함하는, 많은 다른 세포주들이 본 발명 내에 사용될 수도 있다.

[0069] 형질전환된 또는 트랜스펙션된, 상기 설명된 숙주 세포는 일가 DR3 항체/리간드의 발현을 허용한 후 결과의 펩티드 모두 또는 일부가 배양물로부터 회수될 수도 있는 조건 하에 적합한 영양 배지에서 배양된다. 세포에 의해 생산된 일가 DR3 항체/리간드는 문제의 폴리펩티드의 타입에 의존하여, 원심분리 또는 여과에 의해 숙주 세포를 배지로부터 분리하는 단계, 염, 예를 들어, 암모늄 술페이트에 의해 상층액 또는 여과물의 단백질성 구성 요소를 침전시키는 단계, 다양한 크로마토그래피 과정, 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피, 겔여과 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 등에 의해 정제하는 단계를 포함하는, 통상적인 과정에 의해 배양 배지로부터 회수될 수도 있다.

[0070] 형질전환 동물 기술은 본 발명의 일가 DR3 항체/리간드를 생산하기 위해 이용될 수도 있다. 숙주 암컷 포유동물, 바람직하게 양, 염소 또는 소의 젖샘 내에서 단백질을 생산하는 것이 바람직하다. 형질전환 식물의 생산이 또한 이용될 수도 있다. 발현은 특정 기관, 예를 들어, 덩이줄기 (tuber)에 관련될 수도 있다.

[0071] 일가 DR3 항체는 또한 상기 설명된 바와 같이 생산된 이가 항체에 기초하여 얻어질 수도 있고 이후에 결과의 Fab 단편의 펩티다제 분해 및 분리를 받게 된다.

[0072] 일가 DR3 항체/리간드는 이후에 연장된 생체 내 순환 반감기를 갖는 단백질을 얻기 위해 번역 후에 변형될 수도 있다.

[0073] **구체예의 목록:**

[0074] 다음은 본 발명의 구체예의 목록이다. 구체예의 이 목록은 제한하기 위한 것이 아니고 본 발명은 다음 구체예의 어떤 조합도 포함하는 것으로 생각된다.

[0075] **구체예 1:** 일가 길항성 DR3 항체로서, 상기 일가 항체는 DR3의 TL1A에 결합을 차단하고, 이가 형태의 상기 일가 항체는 DR3의 TL1A에 결합을 차단하는 작용성 항체인 일가 항체.

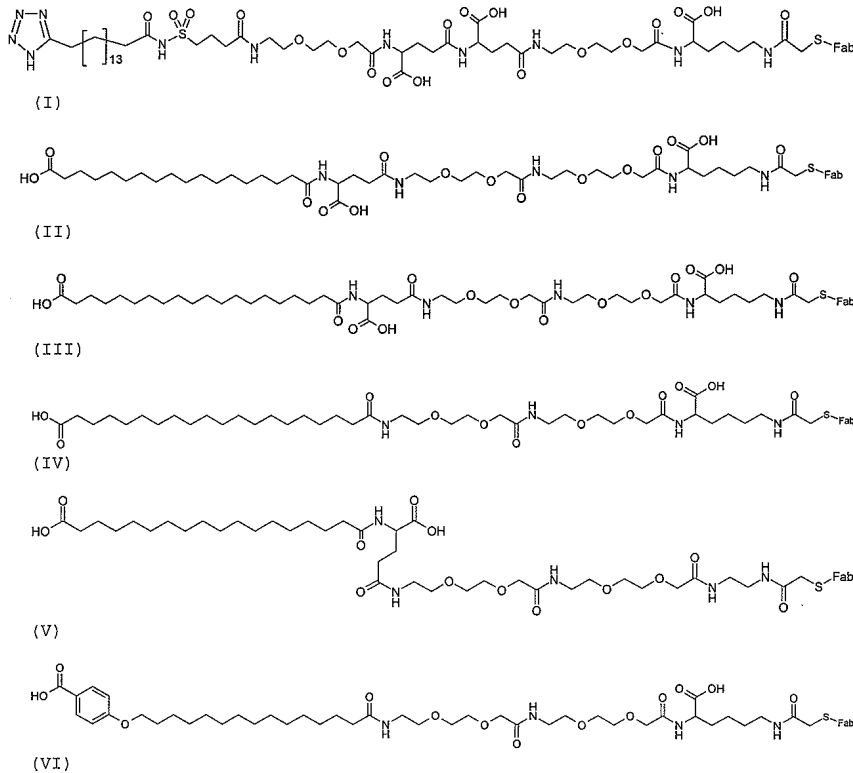
[0076] **구체예 2:** 구체예 1에 있어서, 일가 항체는 WO2011106707에 설명된 11H08 항체의 CDR 서열 (SEQ ID NOs 14-15)을 갖는 항체가 아닌 일가 항체.

[0077] **구체예 3:** 구체예 1 또는 구체예 2에 있어서, 상기 일가 항체는 친유성 모이어티에 콘쥬게이션되는 일가 항체.

[0078] **구체예 4:** 구체예 3에 있어서, 상기 친유성 모이어티는 $-(CH_2)_nCO-$ 지방 아실 기를 포함하며, n은 16-18인 일가 항체.

[0079] **구체예 5:** 구체예 3에 있어서, 상기 친유성 모이어티는 $-(CH_2)_nCO-$ 지방 아실 기를 포함하며, n은 15인 일가 항체.

[0080] **구체예 6:** 구체예 3 내지 구체예 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 식 (I), (II), (III), (IV), (V), 및 (VI)으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 친유성 모이어티에 콘쥬게이션되는 일가 항체:



[0081]

[0082]

구체예 7: 구체예 3 내지 구체예 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 친유성 모이어티는 친수성 스페이서를 통해 항체의 중쇄에서 자연 발생한 시스테인 잔기, 바람직하게 C239 (카바트 번호) 세스테인 잔기에 부착되는 일가 항체.

[0083]

구체예 8: 구체예 1 내지 구체예 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 DR3 상의 에피토프에 결합하며, 상기 에피토프는 SEQ ID NO 1의 I43 및/또는 L45를 포함하는 일가 항체.

[0084]

구체예 9: 구체예 1 내지 구체예 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 DR3 상의 에피토프에 결합하며, 상기 에피토프는 SEQ ID NO 1에 설명된 바와 같이 아미노산 G37 내지 L45 중 적어도 하나 및 아미노산 L57 내지 A59 중 적어도 하나를 포함하는 일가 항체.

[0085]

구체예 10: 구체예 9에 있어서, 상기 에피토프는 SEQ ID NO 1에 설명된 바와 같이 아미노산 G37 내지 L45 및 아미노산 L57 내지 A59를 포함하는 일가 항체.

[0086]

구체예 11: 구체예 1 내지 구체예 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 리간드는 Fab 단편인 일가 항체.

[0087]

구체예 12: 구체예 1 내지 구체예 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 일가 항체는 1 nM 미만의 해리 상수를 갖는 DR3에 결합하는 일가 항체.

[0088]

구체예 13: 구체예 12에 있어서, 상기 일가 항체는 500 pM 미만, 바람직하게 300 pM 미만, 바람직하게 100 pM 미만, 가장 바람직하게 30 pM 미만의 해리 상수를 갖는 DR3에 결합하는 일가 항체.

[0089]

구체예 14: 구체예 1 내지 구체예 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 사람 DR3의 CRD1 도메인에 결합하는 일가 항체.

[0090]

구체예 15: SEQ ID NO 16에 설명된 3개의 CDR 서열 및 SEQ ID NO 17에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함하는 일가 항체, 대안으로 이가 항체. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 일가 항체는 SEQ ID NO 10에 설명된 3개의 CDR 서열 및 SEQ ID NO 11에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함한다.

[0091]

구체예 16: 항체는 SEQ ID NO 16에 설명된 사람 프레임워크, CDR3 서열 및 SEQ ID NO 17에 설명된 CDR3 서열 뿐만 아니라 중쇄에서 "S49A" 역 돌연변이를 포함하는 일가 항체, 대안으로 이가 항체.

[0092]

구체예 17: 구체예 16에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO 16에 설명된 3개의 CDR 서열, 및 SEQ ID NO 17에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함하는 일가 항체. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 일가 항체는 각각 SEQ ID NO 16 및

SEQ ID NO 17에 설명된 중쇄 및 경쇄를 포함한다.

- [0093] **구체예 18:** 구체예 15 내지 구체예 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 IgG4 이소타입인 일가 항체.
- [0094] **구체예 19:** 구체예 1 내지 구체예 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 사람 DR3에 결합하는 일가 항체 "0228"과 경쟁하며, 0228 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 16에 설명되고 0228 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 17에 설명되는 일가 항체. 또 다른 구체예에서, 항체는 0228 항체와 같은 에피토프에 결합한다.
- [0095] **구체예 20:** 구체예 1 내지 구체예 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO 12에 설명된 3개의 CDR 서열 및 SEQ ID NO 13에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함하는 일가 항체.
- [0096] **구체예 21:** 항체는 일가 항체 0124와 사람 DR3에 결합에 대하여 경쟁하며, 0124 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 12에 설명되고 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 13에 설명되는 본 발명의 일가 항체. 또 다른 구체예에서, 항체는 0124 항체와 같은 에피토프에 결합한다.
- [0097] **구체예 22:** 항체는 SEQ ID NO 18에 설명된 3개의 CDR 서열 및 SEQ ID NO 19에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함하는 일가 항체, 대안으로, 이가 항체.
- [0098] **구체예 23:** 항체는 일가 항체 0130과 사람 DR3에 결합에 대하여 경쟁하며, 0130 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 18에 설명되고 0130 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 19에 설명되는 본 발명의 일가 항체. 또 다른 구체예에서, 항체는 0130 항체와 같은 에피토프에 결합한다.
- [0099] **구체예 24:** 항체는 SEQ ID NO 20에 설명된 3개의 CDR 서열 및 SEQ ID NO 21에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함하는 일가 항체, 대안으로, 이가 항체 (0143).
- [0100] **구체예 25:** 항체는 일가 항체 0143과 사람 DR3에 결합에 대하여 경쟁하며, 0143 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 20에 설명되고 0143 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 21에 설명되는 본 발명의 일가 항체. 또 다른 구체예에서, 상기 항체는 0143 항체와 같은 에피토프에 결합한다.
- [0101] **구체예 26:** 항체는 SEQ ID NO 22에 설명된 3개의 CDR 서열 및 SEQ ID NO 23에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함하는 일가 항체, 대안으로, 이가 항체 (0152).
- [0102] **구체예 27:** 항체는 일가 항체 0152와 사람 DR3에 결합에 대하여 경쟁하며, 0152 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 22에 설명되고 0152 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 23에 설명되는 본 발명의 일가 항체. 또 다른 구체예에서, 상기 항체는 0152 항체와 같은 에피토프에 결합한다.
- [0103] **구체예 28:** 항체는 RA 환자의 활액 세포에서 IFN-감마 (IFN- γ) 방출을 감소시키고, 상기 활액 세포는 TL1A로 동시 자극되는 본 발명의 일가 항체. 바람직하게, 세포는 IL-12/IL-18-활성화된다.
- [0104] **구체예 29:** 항체는 CD 환자의 장내 생검의 점막고유층 단핵 세포 (LPMC)에서 하나 이상의 시토킨의 방출을 감소시키고, 상기 시토킨은 IL-6, TNF- α , GM-CSF, 및 IFN-감마 (IFN- γ)로 구성된 목록으로부터 선택되고, 상기 LPMC는 TL1A, IL-12, 및 IL-18로 동시 자극되는 본 발명의 일가 항체. 바람직하게, 세포는 IL-12/IL-18-활성화된다.
- [0105] **구체예 30:** 항체는 CD4+ T 세포에서 하나 이상의 시토킨의 방출을 감소시키고, 상기 시토킨은 TNF- α , IL-6, GM-CSF, 및 IFN-감마 (IFN- γ)로 구성된 목록으로부터 선택되고, 상기 T 세포는 TL1A에 의해 동시 자극되는 본 발명의 일가 항체. 바람직하게, 세포는 IL-12/IL-18-활성화된다.
- [0106] **구체예 31:** 구체예 1 내지 구체예 30 중 어느 하나에 있어서, 항체는 IgG4 타입 항체인 일가 항체.
- [0107] **구체예 32:** 구체예 1 내지 구체예 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 지방산 및 이들의 유도체, 히드록시 에틸 전분 (HES), 폴리 에틸렌 글리콜 (PEG), 히알루로산 (HA), 헤파로산 폴리머, 포스포틸콜린-기반 폴리머, 플렉시머, 텍스트란, 폴리-시알산 (PSA), Fc 도메인, 트랜스페린, 알부민, 엘라스틴 유사 펩티드s, XTEN 폴리머, 알부민 결합 펩티드, 및 이들의 어떤 조합으로 구성된 목록 중 하나 이상으로부터 선택된 하나 이상의 반감기 연장 모이어티에 콘주게이션되는 일가 항체. 그 다음에 본 발명의 일가 항체는 둘 이상의 다른 타입의 반감기 연장 모이어티와 콘주게이션될 수 있다.
- [0108] **구체예 33:** 일가 항체는 감소된 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인 또는 증가된 안정성을 갖는 Fc 도메인을 포함하는 본 발명의 일가 항체. 바람직하게, Fc 도메인은 다음 돌연변이 중 하나, 둘, 셋, 넷, 또는 모두를 포함하는 IgG1 Fc 도메인이다: L234A, L235E, G237A, A330S, 및 P331S. 대안으로, Fc 도메인은 바람직하게 S241P/S228P

돌연변이를 포함하는 IgG4 Fc 도메인일 수도 있다.

- [0109] **구체예 34:** 일가 항체는 글리칸을 통해, 바람직하게 시알산을 통해 반감기 연장 모이어티에 콘쥬게이션되는 본 발명의 일가 항체.
- [0110] **구체예 35:** 항체는 사람 항체인 본 발명의 일가 항체.
- [0111] **구체예 36:** 항체는 사람화 항체인 본 발명의 일가 항체.
- [0112] **구체예 37:** 항체는 하나 이상의 리간드의 결합을 차단하는 본 발명의 일가 항체. DR3이 TL1A 외에 다른 리간드에 결합하는 것이 타당하다. 하지만, 이러한 리간드는 확인되지 않았다.
- [0113] **구체예 38:** 항체는 SEQ ID NO 8의 CDR 서열 중 적어도 하나 및 SEQ ID NO 9에 설명된 CDR 서열 중 적어도 하나를 포함하는 본 발명의 일가 항체 (바람직하게 27F16A1 항체와 본질적으로 같은 파라토프를 포함). 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 8에 설명된 CDR 서열 중 둘 및 SEQ ID NO 9에 설명된 CDR 서열 중 하나를 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 8에 설명된 CDR 서열 중 셋 및 SEQ ID NO 9에 설명된 CDR 서열 중 하나를 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 8에 설명된 CDR 서열 중 적어도 하나 및 SEQ ID NO 9에 설명된 CDR 서열 중 둘을 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 8에 설명된 CDR 서열 중 적어도 하나 및 SEQ ID NO 9에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 8에 설명된 CDR 서열 중 하나 및 SEQ ID NO 9에 설명된 CDR 서열 중 하나를 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 8에 설명된 CDR 서열 중 둘 및 SEQ ID NO 9에 설명된 CDR 서열 중 둘을 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체 SEQ ID NO 8에 설명된 CDR 서열 중 셋 및 SEQ ID NO 9에 설명된 CDR 서열 중 셋을 포함한다. 본 발명의 이러한 항체 중 어느 하나도 이러한 CDR 서열 중 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 또는 여섯을 포함하며, 이 또는 이들 CDR 서열의 하나 또는 2개의 아미노산이 삭제되거나, 추가되거나, 다른 아미노산 잔기로 돌연변이되었고-따라서 SEQ ID NO 8 및 SEQ ID NO 9에 설명된 CDR 서열과 비교하여 하나 이상의 위치가 다른 하나 이상의 CDR 서열을 발생시킨다.
- [0114] **구체예 39:** 항체는 일가 항체 27F16A1과 사람 DR3에 결합에 대하여 경쟁하며, 27F16A1 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 8에 설명되고 27F16A1 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 9에 설명되는 본 발명의 일가 항체. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 27F16A1 항체와 같은 에피토프에 결합하는 항체와 관련된다.
- [0115] **구체예 40:** 항체는 SEQ ID NO 10의 CDR 서열 중 적어도 하나 및 SEQ ID NO 11에 설명된 CDR 서열 중 적어도 하나를 포함하는 본 발명의 일가 항체 (바람직하게 27F44A2 항체와 본질적으로 같은 파라토프를 포함). 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 10에 설명된 CDR 서열 중 둘 및 SEQ ID NO 11에 설명된 CDR 서열 중 하나를 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 10에 설명된 CDR 서열 중 셋 및 SEQ ID NO 11에 설명된 CDR 서열 중 하나를 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 10에 설명된 CDR 서열 중 적어도 하나 및 SEQ ID NO 11에 설명된 CDR 서열 중 둘을 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 10에 설명된 CDR 서열 중 적어도 하나 및 SEQ ID NO 11에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 10에 설명된 CDR 서열 중 하나 및 SEQ ID NO 11에 설명된 CDR 서열 중 하나를 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 10에 설명된 CDR 서열 중 둘 및 SEQ ID NO 11에 설명된 CDR 서열 중 둘을 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 10에 설명된 CDR 서열 중 셋 및 SEQ ID NO 11에 설명된 서열 중 셋을 포함한다. 본 발명의 이러한 항체 중 어떤 하나도 이러한 CDR 서열 중 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 또는 여섯을 포함할 수도 있으며, 이 또는 이들 CDR 서열의 하나 또는 2개의 아미노산이 삭제되거나, 추가되거나, 다른 아미노산 잔기로 돌연변이되었고-따라서 SEQ ID NO 10 및 SEQ ID NO 11에 설명된 CDR 서열과 비교하여 하나 이상의 위치가 다른 하나 이상의 CDR 서열을 발생시킨다.
- [0116] **구체예 41:** 항체는 일가 항체 27F44A2와 사람 DR3에 결합에 대하여 경쟁하며, 27F44A2 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 10에 설명되고 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 11에 설명되는 본 발명의 일가 항체. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 27F44A2 항체와 같은 에피토프에 결합한다.
- [0117] **구체예 42:** 항체는 SEQ ID NO 12의 CDR 서열 중 적어도 하나 및 SEQ ID NO 13에 설명된 CDR 서열 중 적어도 하나를 포함하는 본 발명의 일가 항체 (바람직하게 28F26A3 항체와 본질적으로 같은 파라토프를 포함). 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 12에 설명된 CDR 서열 중 둘 및 SEQ ID NO 13에 설명된 CDR 서열 중 하나를 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 12에 설명된 CDR 서열 중 셋 및 SEQ ID NO 13에 설명된 CDR 서열 중 하나를 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 12에 설명된 CDR 서열 중 하나 및 SEQ ID NO 13에 설명된 CDR 서열 중 둘을 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 12에 설명된 CDR 서열 중 하나 및 SEQ ID NO 13에 설명된 3개의 CDR 서열을 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 12에 설명된 CDR

서열 중 하나 및 SEQ ID NO 13에 설명된 CDR 서열 중 하나를 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 12에 설명된 CDR 서열 중 둘 및 SEQ ID NO 13에 설명된 CDR 서열 중 둘을 포함한다. 더 바람직하게, 상기 항체는 SEQ ID NO 12에 설명된 CDR 서열 중 셋 및 SEQ ID NO 13에 설명된 CDR 서열 중 셋을 포함한다. 본 발명의 이러한 항체 중 어떤 하나도 이러한 CDR 서열 중 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 또는 여섯을 포함할 수도 있으며, 이 또는 이들 CDR 서열의 하나 또는 2개의 아미노산이 삭제되거나, 추가되거나, 다른 아미노산 잔기로 돌연변이되었고-따라서 SEQ ID NO 12 및 SEQ ID NO 13에 설명된 CDR 서열과 비교하여 하나 이상의 위치가 다른 하나 이상의 CDR 서열을 발생시킨다.

[0118] **구체예 43:** 항체는 일가 항체 28F26A3과 사람 DR3에 결합에 대하여 경쟁하며, 28F26A3 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 12에 설명되고 28F26A3 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 13에 설명되는 본 발명의 일가 항체. 또 다른 구체예에서, 항체는 28F26A3 항체와 같은 에피토프에 결합한다.

[0119] **구체예 44:** 본 발명의 일가 항체 또는 리간드를 암호화하는 DNA 분자.

[0120] **구체예 45:** 구체예 44의 DNA 분자를 포함하는 발현 벡터.

[0121] **구체예 46:** 구체예 45의 발현 벡터, 또는 구체예 44의 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포.

[0122] **구체예 47:** 구체예 46의 숙주 세포의 배양을 포함하는 본 발명의 리간드 또는 항체를 만드는 방법.

[0123] **구체예 48:** 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물. 조성물은 임의로 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체/첨가물을 포함한다.

[0124] **구체예 49:** 의약품으로서 본 발명의 리간드 또는 본 발명의 약학적 조성물의 사용.

[0125] **구체예 50:** 염증성 질환의 치료를 위해 본 발명의 리간드 또는 본 발명의 약학적 조성물의 사용.

[0126] **구체예 51:** RA의 치료를 위해 본 발명의 리간드 또는 본 발명의 약학적 조성물의 사용.

[0127] **구체예 52:** 크론병 (CD)의 치료를 위해 본 발명의 리간드 또는 본 발명의 약학적 조성물의 사용.

[0128] **구체예 53:** 궤양성 대장염 (UC)의 치료를 위해 본 발명의 리간드 또는 본 발명의 약학적 조성물의 사용.

[0129] **구체예 54:** 본 발명의 리간드, 또는 본 발명의 약학적 조성물을 이것이 필요한 사람에게 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환을 치료하는 방법. 염증성 질환은 바람직하게 RA, 크론병 또는 궤양성 대장염이다.

[0130] 본 발명의 특정 성질이 여기에 도시되거나 설명되는 한편, 많은 변형, 치환, 변화, 및 첨가물이 당업자에게 발생할 것이다. 그러므로, 첨부된 청구 범위는 본 발명의 진정한 사상의 범위에 들어가는 이러한 변형 및 변화 모두를 커버하는 것으로 생각된다.

[0131] 실시예

[0132] 실시예 1

[0133] 면역화 및 *히브리도마 (hybridoma)* 발생

[0134] 다음 실시예에 진술된 바와 같이, 이 단백질의 시스테인이 풍부한 성질로 인해 고품질의 전체 길이 DR3의 수용성 형태를 생산하는 것은 어렵다. DR3의 수용성 형태는 고도로 응집되는 성향이 있으며, 이것은 중요한 리간드-결합 영역의 차폐로 이어질 수 있고 면역화시 원하는 항체 반응을 증가시키는 것은 어렵다. 전범위의 면역화-요법을 강한 항-DR3 항체 (Ab) 혈청 역가를 얻기 위해 수용성 전체 길이 DR3 단백질, DR3의 ECD (예를 들어, CRD1 도메인만으로 면역화와 유사)의 일부분을 함유하는 D3 단백질 유도체 둘 다, 및 면역화를 위해 DR3를 발현하는 세포 (실시예 3에 설명됨)를 사용하여 수행하였다. 면역화를 항체-레퍼토리 다양성 및 중화 항-DR3 Ab의 생성 가능성을 증가시키기 위해 다른 마우스 품종 (BALB/C, RBF 및 NMRCF1)에서 수행하였다. 한 예에서, BALB/C 마우스를 불완전 프로인트 보조제 (incomplete Freund's adjuvant; IFA)와 함께 또는 없이 5×10^6 개의 DR3-발현 CHO 세포로 8번 복강 내 면역화한 후 IFA에서 정제된 hDR3-Fc (실시예 3 참조)로 6번 IP 면역화하였다. 실시예 4에 설명된 바와 같이 마우스 혈청을 FACS에 의해 FACS에 의해 DR3/hTL1A 차단 항체에 대하여 스크리닝하였다. DR3/hTL1A 차단 Ab 역가를 가진 마우스는 DR3-mFc를 사용하여 꼬리 정맥에 단일 정맥 내 주사 (i.v.)로 구성된 최종 부스트 (boost)를 받았다. 부스트 3일 후 마우스를 표준 전기 융합 과정에 의해 비장세포를 X63Ag8653 골수종 세포와 융합시켰다. 융합된 세포를 96-웰 플레이트에 분주하였고 DR3/hTL1A 차단 mAb에 대하여 스크리닝하기 전에 일주일 동안 DMEM (Invitrogen) 및 FCS (Hy클론)이 보충된 HAT 선택 배지에서 배양하였다.

- [0135] **실시예 2**
- [0136] *스크리닝 및 면역화용 세포*
- [0137] 막관통 (TM) DR3를 과발현하는 세포를 세포 기반 스크리닝 검정에 사용 및 마우스의 면역화를 위한 필수적인 도구로서 개발하였다.
- [0138] TM DR3을 과발현하는 안정한 세포주의 생산은 간단하지 않았다. 처음에 TM 및 죽음 도메인 (DD)을 포함하는 전체 길이 DR3 (전체 AA 서열에 대하여 SEQ ID NO 1 참조)를 pcDNA3.1 발현 벡터 (Invitrogen)에 클로닝하였고 벡터를 Ba/F3 세포의 트랜스펙션에 사용하였다. 하지만, 전체 길이 DR3에서 DD는 안정한 세포주의 세포사로 이어진다. 간단히 활성 DD를 가진 전체 길이 DR3를 발현하는 것은 불가능했다. DR3의 DD를 불활성화시키고 막관통 DR3 단백질을 발현할 수 있게 하기 위해 2개의 새로운 구조물을 설계하고 개발하였다. CD95에 대한 유사한 돌연변이된 버전을 설명했던 Itoh and Nagata, JBC (268) pp. 10932-10937, 1993에 따르는 SEQ ID NO 1의 돌연변이 (L356N)는 수용체의 불활성화로 이어진다. SEQ ID NO 1에서 DD의 삭제 (Δ M339-P417)는 Sreaton et al., PNAS (94) pp. 4615-4619, 1997에 따라 결정되었다. 절단된 버전 및 돌연변이된 버전 둘 다를 pcDNA3.1에 클로닝하였고 Ba/F3에서 발현시켰다. 이것은 2개의 표면 DR3을 과발현하는 안정한 세포주를 발생시켰다. 유동 세포분석법 (FCM)은 DR3에 대한 발현 수준이 DR3의 절단된 버전으로 개발된 세포주에서 가장 높은 것으로 발견되었다는 것을 분석한다. 하지만, 발현 수준은 스크리닝 검정에 사용되는 세포주에 대하여 너무 낮았다. 그러므로 Lonza (Basel, Switzerland)의 GS-CHO 시스템이 DR3의 절단된 버전의 발현에 사용될 수 있는지 조사하는 것으로 결정하였다. pcDNA3.1의 암호화 cDNA를 Lonza 발현 벡터, pEE14.4로 옮겼다.
- [0139] 안정한 CHOK1SV 세포의 확립을 Lonza 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. CHOK1SV 세포를 전기천공에 의해 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 전에 pEE14.4 플라스미드를 AcII 제한 효소로 분해함으로써 선형화하였다. AcII 분해된 pEE14.4의 10 μ g을 전기천공에 의해 1×10^7 CHOK1SV 세포의 트랜스펙션에 사용하였다. 세포를 T75 플라스크에 도말하였다. 트랜스펙션 하루 후 글루타맥스가 없는 CD-CHO 배지에 L-메티오닌 술폭시민 (MSX)을 50 μ M의 최종 농도로 추가함으로써 개시하였다. 트랜스펙션 3주 후, 세포를 림폴라이트 (lympholyte)-포유동물 (Cedarlane)을 사용함으로써 정제하고, 셰이커플라스크 (shakerflask)에 옮기고 37°C, 8% CO₂ 및 125 rpm의 배양기 셰이커에서 배양한다. 선택 압력은 이 시점부터 25 μ M MSX로 낮아졌고 발현 수준을 증가시키기 위해 형광-활성화 세포 분류 (fluorescence-activated cell sorting; FACS)에 의해 풀 (pool)을 분류하기로 결정하였다. FACS 4일 후 풀을 DR3 발현에 대하여 FCM에 의해 테스트하였고 처음에 DR3 발현은 좋았다 (도 2). 불행하게도, 2-3주 후 DR3 발현 수준은 감소하기 시작하고 세포는 더 이상 스크리닝에 사용될 수 없다.
- [0140] DR3 수준을 증가시키고 풀을 더 안정하게 만들기 위한 시도에서, MSX 선택 압력을 50 μ M 및 100 μ M으로 증가 시킴으로써 조사하였고 추가로 풀을 4 X 96W 플레이트의 1/2 세포/웰에 서브클로닝하였다. 서브클로닝은 2개의 FCM에 의해 분석된 높은 DR3 발현 수준을 가진 클론을 발생시켰다. 하지만 1-3주 후 클론들은 다시 발현을 상실하기 시작하고 불안정하게 보이고 따라서 스크리닝에 사용할 수 없었다. 풀에 대한 MSX 선택을 100 μ M로 증가시키는 것은 아주 좋고 높은 발현 수준을 발생시켰고 게다가 이것은 시간이 지남에 따라 높은 발현 수준을 유지할 수 있었다 (도 3). 그러므로 스크리닝 및 면역화에 사용된 결과의 세포주는 절단된 DR3로 트랜스펙션된 CHOK1SV였고 CD-CHO + 100 μ M MSX에서 배양하였다.
- [0141] **실시예 3**
- [0142] *수용성 DR3의 발현 및 정제*
- [0143] 사람 DR3는 세포 외 도메인 (ECD, 잔기 25-199)에 4개의 시스테인-풍부 도메인 (CRD1, CRD2, CRD3 및 CRD4) 및 세포질 도메인에 "죽음 도메인 (DD)"을 포함하는 시스테인이 매우 풍부한 단백질이다. Banner et al., Cell (73) pp. 431-445, (1993)에 따라, 각각의 CRD는 전형적으로 3개의 이황화 결합을 형성하는 6개의 시스테인 잔기를 함유한다. 게다가 각각의 CRD는 전형적으로 TNFR 슈퍼패밀리의 통상적인 멤버에서 관찰되는 모듈 A1 및 B2로 세분될 수 있다 (J.H.Naismith et al., Trends Biochem. Sci. (23) pp. 74-79, 1998). 예측된 CRD 및 모듈 A1 및 B2를 갖는 DR3에 대한 서열은 도 4에 나타난다.
- [0144] 수용성 DR3의 생산은 매우 어려웠으며, 이것은 단백질의 높은 시스테인 함량으로 인한 것일 수도 있다. 사람 세포주에서 DR3의 ECD의 재조합 발현은 보통 분자 간 이황화 결합의 형성으로 인해, 대량의 올리고머 및 고분자량 복합체를 함유하는 수용성 단백질의 분비로 이어졌다. 이들 단백질 배치는 TL1A에 결합하지 않았고 세포 검정에서 활성이 아니었다.

- [0145] 응집 문제를 해결하기 위해 다른 접근법을 취했다. 처음에, DR3의 전체 ECD (25-199)를 마우스 IgG1 또는 사람 IgG4의 Fc 도메인에 융합시켰다. HEK293 세포에서 일시적인 생산은 낮은 수득율 (<10 mg/L) 및 높은 정도의 응집을 발생시켰다. 겔 여과는 예측된 다이머의 풍부함을 허용했지만, 낮은 수득율 및 높은 정도의 올리고머화로 인해, 순수한 분획을 얻는 것이 처음부터 불가능했다. 비오틴화, FLAG-태그 또는 트리머화 펩티드, TenascinC (TNC)와 같은 다른 정제 태그를 또한 테스트하였지만, 결과를 개선하지 않았다.
- [0146] 게다가, 올리고머화의 원인이 되는 단백질의 일부를 결정하기 위해, DR3의 ECD의 일부만을 함유하는 DR3-Fc 융합 단백질을 조작하였다. 4개의 단백질을 다음과 같이 설계하였다:
- [0147] DR3 (CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2)
- [0148] DR3 (CRD1+A1)-Fc (SEQ ID NO 3)
- [0149] DR3 (CRD1+CRD2)-Fc (SEQ ID NO 4)
- [0150] DR3 (CRD1+CRD2+A1)-Fc (SEQ ID NO 5)
- [0151] 분자 간 이황화 결합의 형성 및 이로 인한 미스폴딩 (misfolding)은 DR3 ECD의 길이의 증가와 관련되고, 아마 증가된 수의 시스테인을 반영한다. 동시에, 단백질 발현의 수득율은 DR3 EC 도메인의 길이가 증가함에 따라 감소하였다. 겔 여과는 이들 구조물 모두에 대하여 주로 다이머 분획의 정제를 허용하였다. 하지만, 단백질은 생물학적으로 활성이 아니었다. 올리고머화의 원인이 되는 단일 시스테인 또는 작은 영역을 정확하게 지적하려는 시도로 그 구조물 이외에 많은 절단 및 cys-삭제 구조물이 또한 만들어졌다. 하지만, 단일 영역 또는 특이적 시스테인은 원인이 있는 것으로 보이지 않고 전체 DR3 서열은 수용성 형태로 발현되기 어려운 것으로 보인다.
- [0152] 게다가, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST) 및 DR3의 CRD1 사이에서 융합 단백질이 생산되며, 그것은 동형 유전자이다 (SEQ ID NO 6).
- [0153] 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서, DR3의 ECD를 포함하는 DR3-Fc, TEV 분열 부위를 함유하는 결합자 및 사람 IgG4의 Fc 부분의 안정한 발현은 발현 수준을 증가시켰고 주로 다이머 단백질 (SEQ ID NO 7)의 분리를 허용하였다. 이 분획은 TL1A 유발 DR3 신호 전달을 측정하는 리포터 유전자 검정에서 DR3에 결합하는 TL1A에 대하여 경쟁할 수 있었다.
- [0154] 많은 이들 단백질을 마우스의 면역화에 사용하였다. 배치의 일부를 소량의 비-올리고머화된 DR3을 분리하기 위해 추가로 정제하였다. 이들 배치를 표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance; SPR) 결합 검정에 사용하였다.
- [0155] HEK293 세포에서 일시적인 발현:
- [0156] 벡터:
- [0157] DR3 단백질의 변이체 모두는 CMV 프로모터-기반 발현 벡터 (pTT 벡터)를 사용함으로써 발현되었다. pTT 벡터는 Yves Durocher에 의해 개발된 HEK293-6E EBNA-기반 발현 시스템에서 일시적인 발현을 위해 생성된다 (Durocher et al. Nucleic Acid Research, 2002).
- [0158] 세포 유지:
- [0159] HEK293-6E 세포를 25 µg/ml 제네티신 (Gibco), 1 부피%의 계면활성제 Pluronic F-68 (Gibco) & 1 부피%의 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco)이 보충된 Freestyle™ 293 발현 배지 (Gibco) 중의 현탁액에서 성장시켰다. 세포를 37°C, 8% CO₂ 및 125 rpm의 셰이커 배양기의 Erlenmeyer 셰이커 플라스크에서 배양하였고 0.1-1.5 X 10⁶ 세포/ml 사이의 세포 밀도로 유지하였다.
- [0160] DNA 트랜스펙션:
- [0161] ● 트랜스펙션에 사용된 배양물의 세포 밀도는 0.9-1.1 X 10⁶ 세포/ml였다.
- [0162] ● 1 µg DNA를 ml 세포 배양물 당 사용하였다.
- [0163] ● DNA를 Opti-MEM 배지 (Gibco) 30 µl/µg DNA에 희석하였고, 혼합하였고 상온 (23-25 °C)에서 5분 동안 배양하였다.

- [0164] ● 293Fectin™ (Invitrogen)을 μg DNA 당 1 μl 의 농도의 트랜스펙션 시약으로 사용하였다.
- [0165] ● 293Fectin™을 Opti-MEM 배지 (Gibco)에 30X로 희석하였고, 혼합하였고 상온 (23-25 °C)에서 5분 동안 배양하였다.
- [0166] ● DNA 및 293Fectin 용액을 혼합하였고 상온 (23-25 °C)에서 25분 동안 배양하도록 두었다.
- [0167] ● DNA-293Fectin 혼합물을 세포 배양물에 직접 추가하였다.
- [0168] ● 트랜스펙션된 세포 배양물을 37°C, 8% CO₂ 및 125 rpm의 셰이커 배양기에 옮겼다.
- [0169] ● 트랜스펙션 5-6일 후, 세포 배양물 상층액을 원심분리에 의해 수확한 후 이어서, 0.22 μm PES 필터 (Corning)를 통해 여과하였다.
- [0170] ● 단백질 생산의 가능한 정량 분석을 ForteBio Octet 시스템 및 단백질 A 바이오센서를 사용하는 Biolayer Interferometry에 의해 수행하였다.
- [0171] *DR3-Fc 단백질의 정제*
- [0172] 세포 상층액을 버퍼로서 20mM Tris/HCl, pH 8.5와 함께 단백질 A 친화도 비드 (Mabelect Sure; GE Healthcare)가 들어있는 컬럼에 직접 로딩하였다. 결합된 단백질을 10 mM, 50 mM 및 100 mM 나트륨 포르미에이트 pH 3.5로 순차적으로 용출하였다. 용출된 분획을 농축하였고 한외여과에 의해 PBS 버퍼로 옮겼다. 겔 여과를 버퍼로서 PBS가 들어있는 Superdex200 컬럼 (GE Healthcare) 상에서 수행하였다. 분획 함유 다이머 단백질을 모았고 한외여과에 의해 농축하였다. 모든 크로마토그래피 단계를 Akta Explorer FPLC 장치 (GE Healthcare)로 수행하였다.
- [0173] **실시예 4**
- [0174] *TL1A:DR3 상호작용을 차단하는 항체에 대한 스크리닝*
- [0175] *마우스 혈청의 사전 스크리닝*
- [0176] 마우스가 혈청에서 차단 효과의 정도의 매우 큰 차이를 갖기 때문에, 융합을 수행하기 전 차단 효과에 대하여 마우스 혈청을 사전 스크리닝하는 것은 필수적인 것으로 나타났다.
- [0177] 마우스를 DR3을 과발현하는 세포주 및 DR3 단백질 둘 다로 면역화하였다. 전범위의 면역화-요법을 다른 항체-레퍼토리를 가진 다른 마우스를 얻기 위해 수행하였다. 전체 세포면역화는 단일 항원 면역화와 달리 다수의 항원의 주사를 포함한다. 다른 면역화-요법은 다른 항체 레퍼토리를 일으키기 때문에, 전체 세포면역화를 사용할 때, 더 많은 면역 최적화가 필요하다는 것으로 이전에 나타났다. 차단 효과를 위해 마우스 혈청의 스크리닝은 융합되는 마우스를 선택하기 위해 중요한 도구였다 (도 5).
- [0178] *히브리도마 상층액의 스크리닝*
- [0179] TL1A 결합을 차단하는 능력을 가진, DR3에 대한 항체를 선택하기 위해, 스크리닝 계획은 다음과 같다:
- [0180] DR3 특이적 항체에 대한 1차 테스트로서, 높은 처리율 이미지-기반 검정을 설정하였다. 이것을 DR3 트랜스펙션된 CHO 세포에 결합하는 능력에 대하여 스크리닝함으로써, FMAT 시스템에서 수행하였고 야생형 세포에 대하여 카운터-스크리닝하였다 (DR3 세포주의 생성에 대하여 실시예 2 참조).
- [0181] 검정을 50 μl 의 세포-조제물 (50 μl 중의 웰당 50000 세포)을 적정에서 희석된 단클론성 항체 또는 희석되지 않은 히브리도마 상층액의 25 μl 과 함께 96 웰 플레이트 (Greiner, 제품 번호 65021)에 표지함으로써 수행하였고 4 °C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 및 세척 (5% 태아 소 혈청이 들어있는 PBS 버퍼, 5분 동안 200 g로 원심분리) 후 웰 당 50 μl 의 2차 항체 (PBS 버퍼에서 1:400으로 희석됨)를 추가하였고 4 °C에서 또 다른 1시간 동안 배양하였다. APC 항 마우스를 RBF 마우스 또는 Balb/c 마우스 Jacksons # 115-136-071 1:400으로부터 스크리닝할 때 사용하였다.
- [0182] 최종적으로 세포를 세척하였고 검은 FMAT에 옮겼고 플레이트를 PerkinElmer Envision Turbo (FMAT) 상에서 판독하였다.
- [0183] 처음 스크리닝의 그 다음 부분은 DR3 리간드 (TL1A) 결합을 차단하는 능력에 대하여 테스트하는 것이다. 이것을 양성 히브리도마-상층액을 DR3 트랜스펙션된 세포에 결합하는 TL1A-flag 태그를 차단하는 능력에 대하여 스크리닝함으로써 선택된 DR3 특이적 히브리도마 상층액 상에서 수행하였다. 대조군으로서, 비-트랜스펙션된 세포 무

관한 항체 또는 상층액을 사용하였다.

- [0184] FCM 기반 억제 검정을 적정에서 희석된 단클론성 항체 또는 희석되지 않은 히브리도마 상층액의 50 μ l을 DR3 양성 세포 (웰 당 50000개의 세포)에 추가함으로써 수행하였고 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 및 세척 (5% 태아 소 혈청이 들어있는 PBS 버퍼, 5분 동안 200 g로 원심분리) 후 TL1A-flag 태그 (농축, 50 μ l의 총량으로)를 96 웰 플레이트 (Greiner, 제품 번호 65021)에 추가하였다. 다시 배양 및 세척 후 2차 항체 (5 μ g/ml의 최종 농도로 Perkin Elmer의 APC 항 flag 태그 ab) (PBS 버퍼에서 1:400으로 희석됨)를 추가하였고 4 $^{\circ}$ C에서 또 다른 1시간 동안 배양하였다.
- [0185] 동시에 리포터 유전자 검정을 항체의 작용성 또는 길항성 기능성에 대해 검출하기 위해 실시예 5에 설명된 바와 같이 수행하였다.
- [0186] 내부에서 생산된 TL1A는 TL1A의 성숙한 세포 외 도메인이다. TL1A는 N-말단 FLAG-HIS-TEV 태그를 함유한다. FLAG-태그는 FACS/FMAT에서 검출에 사용되고, HIS-태그는 정제에 사용되고 TEV 부위는 선택적 TEV 분열 및 태그의 제거를 허용한다. 이. 콜리 (E. Coli)에서 생산된 TL1A는 R&D Systems에서 상업적으로 이용 가능하다. 내부의 TL1A를 HEK 세포에서 생산하였고 잠재적 N-글리코실화 부위를 방해하기 위해 2개의 N->Q 위치 돌연변이를 함유하였다. 재조합 게막이 원숭이 TL1A를 유사하게 생산하였다.
- [0187] **실시예 5**
- [0188] *DR3 리포터 유전자 검정*
- [0189] DR3은 NF카파B를 통해 신호를 전달하고 DR3이 MCF7 세포에서 이소성으로 발현될 때 아포토시스 (apoptosis)를 유발한다는 것은 Chinaiyan et al. 1996 (Science yr: 1996 vol:274 iss:5289 pg:990-992)에 의해 보고되었다. 우리는 NF카파B 신호 전달을 리포터로서 이용하고 아포토시스성 세포를 방지하기 위해 감소된 DR3 발현을 사용하는 것을 원했다.
- [0190] HEK293 세포주를 사람 DR3 발현 플라스미드 및 NF카파B-루시페라제 리포터 플라스미드로 안정하게 트랜스펙션하였다. DR3 발현 플라스미드는 pcDNA3.1 (히그로)+에 기초하고 SV40 프로모터에 의해 조절되는 히그로마이신 내성 유전자를 함유하고, CMV 프로모터를 제거하고 2개의 열-충격-요소 (HSE), 최소의 c-fos 프로모터 및 사람 DR3 암호화 서열을 삽입하였다. 리포터는 pGL3-베이지에 기초하고 Luc+ 반응은 3개의 NF카파B 부위 및 최소의 인터페론 프로모터에 의해 조절된다. SV40 프로모터에 의해 조절되는 네오마이신 내성 유전자를 벡터에 삽입하였다.
- [0191] I5로 불리는 DR3/HEK293 리포터 유전자 세포는 40 ng/ml TL1A (R&D Systems) 자극에 대한 루시페라제 활성의 20-25배 반응을 제공한다. TL1A, 작용성 항체 및 길항성 항체/Fab의 효과를 검출하는 과정은 다음과 같다. I5 세포를 폴리D-리신 코팅된 블랙 뷰 96 웰 플레이트에 20,000 세포/웰로 분주하였다. 다음 날 TL1A 또는 배지를 웰이 추가하였고 배양의 4시간 후 Steady-GLO 키트 (Promega)를 사용하여 발광을 TopCount NXT (Perkin Elmer) 장치에 의해 관찰하였다. 중성화 효과를 결정하기 위해, 항체 또는 Fab를 TL1A의 추가 전에 15분 동안 사전 배양하였다.
- [0192] 히브리도마 상층액의 스크리닝을 위해, 모든 샘플을 적어도 2번 및 0 ng/ml, 10 ng/ml TL1A 및 50 ng/ml TL1A 둘 다를 사용하여 테스트하였다.
- [0193] **실시예 6**
- [0194] *TL1A:DR3 상호작용을 차단하는 항체 및 Fab*
- [0195] DR3에 대하여 특이성을 갖고 DR3로 TL1A 상호작용의 차단에 대하여 양성으로 테스트된 단클론성 항체 (mAb)를 확인하였다. 총 수백 개의 특이적 DR3 mAb 전체가 주로 DR3를 발현하는 세포로 면역화된 마우스로부터 적어도 50번 융합 후 선택되었다. TL1A 억제/차단에 대하여 DR3 특이적 클론의 추가의 테스트는 74개의 클론을 제공하였다. 도 6은 DR3 항체를 차단하는 양성 항체 중 일부를 나타낸다. 또한 이러한 차단 효과가 없는 2개의 양성 DR3 특이적 클론이 포함된다.
- [0196] mAb 모두를 mAb의 Fab 버전과 함께 추가의 연구를 위해 선택하였다. 표 1은 수행된 연구를 요약하고 mAb 및 Fab 번호 매기기 및 히브리도마 클론 번호 매기기 사이의 연관성을 제공한다.
- [0197] **표 1.** 추가의 연구에 관하여 선택된 mAb 및 Fab의 목록 및 mAb 및 Fab 번호 매기기 및 히브리도마 클론 번호 매기기 사이의 연관성

화합물	포맷	제조된 형태	클론 이름	서열 (실시예 9 참조)	리포터 유전자 검정 (실시예 7 참조)	TL1A를 DR3 결합에 대하여 차단 (실시예 6 참조)	TL1A-유발 CD4+ T-세포 증식 검정 (실시예 8 참조)
0070	mAb	히브리도마 상층액	27F16A1	+	작용성	예	n.d.
0071	mAb	히브리도마 상층액	27F38	n.d.	약한 작용성	아니오	n.d.
0072	mAb	히브리도마 상층액	27F44A2	+	작용성	예	실시예 8 참조
0073	mAb	히브리도마 상층액	28F26A3	+	작용성	예	실시예 8 참조
0074	mAb	히브리도마 상층액	28F69	n.d.	약한 작용성	아니오	n.d.
0075	mAb	히브리도마 상층액	29F6	n.d.	약한 작용성	아니오	n.d.
0076	mAb	히브리도마 상층액	29F8	n.d.	작용성	예	n.d.
0077	mAb	히브리도마 상층액	30F1	n.d.	약한 작용성	아니오	실시예 8 참조
0087	Fab	mAb 0072의 파파인 분할	n.a.	+	길항성	예	실시예 8 참조
0088	Fab	mAb 0073의 파파인 분할	n.a.	+	길항성	예	실시예 8 참조
0089	Fab	mAb 0076의 파파인 분할	n.a.	n.d.	길항성	예	n.d.
0091	Fab	mAb 0077의 파파인 분할	n.a.	n.d.	효과 없음	아니오	실시예 8 참조

n.a.: 미적용

n.d.: 미결정

[0198]

[0199]

항체 0072, 0073 및 0076은 농도-의존적 방식으로 TL1A:DR3 상호작용을 차단하는 것이 발견되었다. 해당 Fab 분자 (0087, 0088 및 0089)는 또한 농도-의존적 방식으로 이 능력을 유지하였다 (도 7). 상대적으로, TL1A:DR3 상호작용을 억제할 수 없는 DR3 결합 mAb로부터 유도된 Fab는 또한 이 능력을 갖지 않았다 (화합물 0077 및 0091, 도 7)

[0200]

표 2는 Fab 특징의 예를 나타낸다: 전체적으로 우리는 결합, TL1A-DR3 상호작용을 차단하는 능력, TL1A 유발된 T 세포 활성화, 결합 (다른 실시예에서 더 상세함)에 대하여 46개의 Fab를 특성화하였다. 대조군과 함께 많은 선택된 Fab가 표에 나타난다:

[0201] 표 2: Fab 특징

억제 검정			hDR3을 발현하는 CHO 세포에 TL1A 결합을 대체/차단에 하여 테스트된 Fab	
Fab ID	Fab의 포맷		IC50 값 (nM)으로 및 최대 퍼센트 억제로 나타난 TL1A 결합의 차단/대체	
		n:	IC50 nM	% 억제
00228	IgG4-Cys, hz	1	0.484	78
00123	IgG4-Ser, 키메라	8	0.443	80
00124	IgG4-Ser, 키메라	4	1.297	79
00130	쥐 Fab	2	1.340	73
00143	IgG4-Ser, 키메라	2	0.120	76
00152	IgG4-Ser, 키메라	1	0.512	53
00231	IgG4-Ser, hz	1	24.680	81
00158	IgG4-Ser, hz	11	No inhib	10
00148	IgG4-Ser, 키메라	2	9.221	33
00163	IgG4-Ser, 키메라	2	No inhib	12
00122	IgG4-Ser, 키메라	2	5.114	33

n: 결정의 수, no inhib: 억제 안함

[0202]

[0203]

실시예 7

[0204]

DR3 항체 및 유도된 Fab의 기능적 효과

[0205]

DR3에 대하여 발생하였고 TL1A의 DR3와 상호작용의 차단에 대하여 양성으로 테스트된 단클론성 항체 (mAb)는 DR3 신호 전달의 잠재적 중화제였다.

[0206]

사람 DR3 리포터 유전자 세포주를 항체와 함께 15분 동안 배양한 후 이어서 TL1A로 자극하거나 배지를 추가하였다. 매우 높은 농도에서만 작용하는 항체는 TL1A 작용의 보통의 중성화를 갖고, 대조적으로 그것들은 낮은 투여량에서 자체로 효율적인 활성화제이다.

[0207]

표 3은 0072 항체의 효과를 나타낸다. TL1A의 추가가 없는 0072의 활성화 프로파일은 종-모양이며, 이가 항체가 수용체와 교차-결합함으로써 DR3를 활성화시킨다는 것을 나타낸다. 활성화는 특정 농도까지 증가하고, 그래서 그것은 TL1A 매개된 활성화를 포함하는 DR3 활성화를 감소시킨다. 항체의 더 높은 농도에서, 모든 파라토프는 수용체에 의해 더 이상 이용되지 않지만 항체는 여전히 TL1A 결합 및 활성화를 차단하고 억제 효과도 나타낸다. DR3의 활성화는 TL1A 특이적이라는 것을 강조하기 위해 TL1A 특이적 항체 MAB7441 (R&D Systems)가 포함된다.

[0208]

표 3:

사람 DR3 리포터 세포주에서 테스트된 0227-0000-0072 항-DR3 항체										
	배지	2.5 microg/ml MAB7441	0.000256 microg/ml -0072	0.00128 microg/ml -0072	0.0064 microg/ml -0072	0.032 microg/ml -0072	0.08 microg/ml -0072	4 microg/ml -0072	20 microg/ml -0072	100 microg/ml -0072
배 반응	1	1.1	1.1	2.2	9.3	18.6	25.1	21.1	16.3	9.2
	40 ng/ml TL1A	TL1A+ 2.5 microg/ml MAB7441	TL1A+ 0.000256 microg/ml -0072	TL1A+ 0.00128 microg/ml -0072	TL1A+ 0.0064 microg/ml -0072	TL1A+ 0.032 microg/ml -0072	TL1A+ 0.08 microg/ml -0072	TL1A+ 4 microg/ml -0072	TL1A+ 20 microg/ml -0072	TL1A+ 100 microg/ml -0072
배 반응	32.8	3.7	33.8	37.2	40.3	41.0	38.4	34.0	27.8	18.4

[0209]

[0210] 이들 데이터에 기초하여 우리는 DR3에 대한 친화도를 갖는 일가 항체, 예를 들어, Fab (단편 ab)가 아마 수용체를 클러스터링 (cluster)하지 않지만 여전히 TL1A 결합을 억제할 수도 있다. 항체를 과과인으로 분열하였고 Fab 단편을 정제하였다. Fab 단편의 DR3의 TL1A 활성화를 억제하는 능력을 사람 DR3 리포터 검정으로 테스트하였다. 4개의 다른 DR3 항체의 Fab 단편을 테스트하였고 그것들 중 셋 (Fab 0087, 0088, 0089에 해당하는 0072, 0073 및 0076)은 TL1A 활성화를 차단할 수 있었다 (표 4).

[0211] 표 4:

사람 DR3 리포터 세포주에서 테스트된 항-DR3 항체로부터 유도된 Fabs						
	배지	2.5 microg/ml MAb7441	0.1 microg/ml 항-DR3 분자	1 microg/ml 항-DR3 분자	10 microg/ml 항-DR3 분자	100 microg/ml 항-DR3 분자
배 반응 -0087 Fab	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
배 반응 -0088 Fab	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0
배 반응 -0089 Fab	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1
배 반응 -0097 Fab	1.0	1.0	1.1	1.0	1.1	1.1
	40 ng/ml TL1A	TL1A + 2.5 microg/ml MAb7441	TL1A + 0.1 microg/ml 항-DR3 분자	TL1A + 1 microg/ml 항-DR3 분자	TL1A + 10 microg/ml 항-DR3 분자	TL1A + 100 microg/ml 항-DR3 분자
배 반응 -0087 Fab	24.0	2.3	5.8	2.7	2.1	2.1
배 반응 -0088 Fab	22.6	2.0	15.2	6.3	2.9	2.8
배 반응 -0089 Fab	22.5	1.8	17.1	11.2	7.6	7.5
배 반응 -0097 Fab	25.6	2.3	26.7	25.7	24.9	22.0

[0212]

[0213] 4번째 Fab 0097 (mAb 0077의 것)은 DR3에 결합하는 TL1A를 억제하지 않았고 이것은 mAb 0077에 따라 이를 차단하지 않았다 (도 6 및 7). 표 5는 TL1A의 부제시 4개의 mAb (-0072, -0073, -0076 및 -0077)의 DR3 유전자 리포터 검정을 활성화하는 능력을 나타내며, 또한 여기에서-0077은 매우 불량한 작용제인 것을 입증한다.

[0214] 표 5

항-DR3 항체에서 테스트된 항-DR3 항체						
	배지	2.5 microg/ml MAb7441	0.1 microg/ml 항-DR3 분자	1 microg/ml 항-DR3 분자	10 microg/ml 항-DR3 분자	100 microg/ml 항-DR3 분자
배 반응 -0072 항체	1.0	1.0	20.6	19.8	17.3	8.5
배 반응 -0073 항체	1.0	1.0	12.8	14.4	12.8	6.9
배 반응 -0076 항체	1.0	1.0	18.3	22.7	17.5	9.0
배 반응 -0077 항체	1.0	1.0	1.1	1.2	2.8	10.3
	40 ng/ml TL1A	TL1A + 2.5 microg/ml MAb7441	TL1A + 0.1 microg/ml 항-DR3 분자	TL1A + 1 microg/ml 항-DR3 분자	TL1A + 10 microg/ml 항-DR3 분자	TL1A + 100 microg/ml 항-DR3 분자
배 반응 -0072 항체	24.0	2.3	29.6	24.8	23.3	13.6
배 반응 -0073 항체	22.6	2.0	24.2	27.9	25.5	19.0
배 반응 -0076 항체	22.5	1.8	27.5	27.8	25.6	19.5
배 반응 -0077 항체	25.6	2.3	23.7	23.3	25.1	24.9

[0215]

[0216]

재조합 Fab를 "I5" 사람 DR3 리포터 세포주 검정에서 테스트하였고 40 microg/ml TL1A를 사용할 때 IC50을 결정하였고, 표 6 참조. 특히 WO2011/106707의, 11H08 항-DR3-Fab의 2개의 버전, H1L2 및 H1L4를 또한 포함한다. H1L2 (0227-0000-0230) 및 H1L4 (0227-0000-0231)는 각각 3.7 nM 및 2.8 nM의 IC50을 갖는 반면에, 0227-0000-0228은 10배 낮은 320 pM이다.

[0217]

표 6

사람 DR3 리포터 유전자 세포주 (I5)에서 테스트된 Fab		
Fab ID	항체로부터 유도됨	40 ng/ml TL1A [질량]에서 IC50
0227-0000-0123	27F44	188 pM
0227-0000-0228	27F44	320 pM
0227-0000-0230	H1L2 (11H08) (WO2011106707)	3.7 nM
0227-0000-0231	H1L4 (11H08) (WO2011106707)	2.8 nM
0227-0000-0124	28F26	2.4 nM
0227-0000-0130	45F36	1.4 nM
0227-0000-0143	44F434	290 pM
0227-0000-0152	50F191	2.1 nM
0227-0000-0158	Hz-aTNP	이소타입 대조군
0227-0000-0148	5F13	길항성 아님

[0218]

[0219]

사람 리포터 세포주와 유사한 게놈이 원숭이 DR3 리포터 세포주를 생성하였다. 안정한 게놈이 원숭이 DR3 리포터 세포주를 Lyda20으로 명명하였고 40 ng/ml 사람 (0227-0000-0011) 또는 게놈이 원숭이 (0227-0000-0141) 수용성 TL1A를 추가함으로써 10-14배 반응을 제공한다. 표 7에서, 게놈이 원숭이 DR3의 0123 및 0228 활성화에 대한 데이터가 나타난다.

표 7:

게먹이 원숭이 DR3 리포터 유전자 세포주 (Lyda20)에서 테스트된 Fab	
Fab ID	40 ng/ml TL1A에서 IC50
0227-0000-0123	236 nM
0227-0000-0228	628 nM

마모셋 DR3 리포터 세포 검정은 일시적인 검정이고, 2개의 열-충격-요소 및 최소의 cFos 프로모터에 의해 조절되는 NF카파B-리포터 플라스미드 및 마모셋 DR3 발현 벡터를 TL1A로 자극 2일 전에 FuGene 6 트랜스펙션 시약 (Roche)을 사용하여 HEK293 세포에 트랜스펙션하였다. 표 8에서, 3가지 종의 DR3의 활성화는 Fab의 선택에 대하여 나타난다.

표 8:

일시적 트랜스펙션된 1차 DR3 리포터 세포에서 테스트된 Fab			
Fab ID	40 ng/ml에서 TL1A의 IC50, 사람 DR3 발현 HEK293	40 ng/ml에서 TL1A의 IC50, 게먹이 원숭이 DR3 발현 HEK293	40 ng/ml에서 TL1A의 IC50, 마모셋 DR3 발현 HEK293
0227-0000-0123	330 pM	99 nM	323 pM
0227-0000-0228	355 pM	73 nM	549 pM
0227-0000-0230	4.2 nM	14 nM	219 nM
0227-0000-0231	4.3 nM	13 nM	377 nM

표 8에서 나타난 바와 같이, 일시적인 게먹이 원숭이 DR3 리포터 세포 99 및 73 nM로 테스트될 때, 27F44 항체로부터 유도된 Fab 분자는 매우 불량한 IC50을 갖는다. 하지만, 일시적인 마모셋 DR3 리포터 세포 검정은 일시적인 사람 DR3 검정과 유사한 IC50 값을 나타내었다.

11H08/H1L2 (0227-0000-0230) 및 11H08/H1L4 (0227-0000-0231) Fab는

일시적인 사람 DR3 리포터 검정에서 4.2 및 4.3 nM의 IC50, 일시적인 게먹이 원숭이 DR3 리포터 검정에서 3배 더 높은 IC50, 14 및 13 nM, 및 일시적인 마모셋 DR3 리포터 유전자 검정에서 최종적으로 50배 더 높은 IC50, 219 및 377 nM을 갖는다. 모든 숫자는 표 8에 나열된다.

실시예 8

유동 세포분석법에 의해 활성화된 사람 세포에 결합

버피 코트 (Buffy Coat)를 코펜하겐 대학 병원 (Copenhagen University Hospital)의 정상적인 건강한 지원자로부터 얻었다. CD4+ T 세포를 마그네틱 비드 분리를 통해 분리하였다. 세포를 2 ng/ml IL-12, 50 ng/ml IL-18 및 100 ng/ml TL1A (Novo Nordisk A/S에서 생산된 Flag-HIS-TEV-TL1A)로 활성화하였고 5일 동안 배양하였다. 제5 일에 세포를 항-DR3 mAb 클론 0072, 0073, 또는 0077의 10, 5, 1, 0.5, 0.1 또는 0.0001 µg/ml으로, 또는 Fab 단편 클론 0087, 0088 및 0091로 염색하였다. 2차 PE 콘주게이션된 염소-항-마우스 (H+L)을 검출에 사용하였다.

결과: 단클론성 IgG 클론 0077, 및 그것의 해당 Fab 클론 0091은 세포에 약한 결합만을 입증하였다. 단클론성 IgG 클론 0072 및 0073은 1 µg/ml 이하의 농도에서 관찰된 최대 결합으로 시토킨 활성화된 CD4+ T 세포에 강한 결합을 나타냈다. 해당 Fab 클론 (0087 및 0088)은 유사한 힘으로 시토신 활성화된 세포와 결합하였지만, 결합 포화도에서 약간 더 낮은 MFI 값이 기록되었다. 2차 (검출) 항체 (항-IgG 중쇄 및 경쇄)가 전체 길이 IgG 항체 클론의 Fab 및 Fc 부분 둘 다에, 하지만 Fab 클론의 Fab 부분에만 결합하기 때문에, Fab 처리된 세포와 비교하여 IgG 처리된 세포의 관찰된 더 큰 MFI 값이 예상되었다 (표 9).

항체 또는 Fab 단편	검정에 사용된 농도	MFI
0072	1 µg/ml	1300
0073	1 µg/ml	1300
0077	1 µg/ml	100
0087	1 µg/ml	500
0088	1 µg/ml	500
0091	1 µg/ml	100

[0232]

[0233]

표 9: 평균 형광 발광 강도 (Mean fluorescence intensity; MFI) 값은 제5 일에 IL-12/IL-18/TL1A 활성화된 세포에 대하여 나타난다. 세포는 단일항 (singlet), 살아있는 CD4+ T 세포에서 조절된다.

[0234]

기능성 검정:

[0235]

CD4+ T 세포를 CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 및 Histopaque (Sigma)를 사용하여 마그네틱 비드 분리를 통해 버피 코트로부터 분리하였다. T 세포 (96-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰)를 항-TL1A (1000 ng/ml; MAB7441; RnDSystems) 및 DR3 mAb 또는 DR3 Fab (5 또는 10 µg/ml)와 함께 및 없이 2 ng/ml IL-12, 50 ng/ml IL-18 및 100 ng/ml TL1A (Flag-HIS-TEV-TL1A; Novo Nordisk)로 5일 동안 활성화하였다. 사용된 DR3 mAb는 0072, 0073 및 0077이었다. 사용된 DR3 Fab는 0087, 0088 및 0091이었다. 세포를 활성화의 5일 후에 [^{3} H]티미딘을 적용하였고 16시간 후 수확하였다. 대안으로, 세포를 3일 동안 활성화시켰고 시토킨의 이후 생산을 측정하였다 (실시에 6, 15, 18 참조).

[0236]

표 10: T 세포 검정: IL-12/IL18+TL1A로 활성화된 건강한 기증자의 CD4+ T 세포

Fab ID	Fab의 포맷	IC50 값 (nM으로 나타남) 및 최대 평균 억제로서 나타나는 시토킨 생산 (TNF알파)의 억제:						
		모든 테스트된 기증자의 평균과 함께 나타난 2명의 대표적인 기증자						
		기증자 1		기증자 2			평균	평균
		IC50 nM	% 억제	IC50 nM	% 억제	n:	IC50 nM	% inhib
00228	IgG4-Cys, hz	0.300	92.20	0.170	82.30	3	0.189	89.27
00123	IgG4-Ser, 키메라	0.301	83.50	0.320	75.90	22	0.208	79.64
00124	IgG4-Ser, 키메라	1.112	52.30	1.205	41.30	4	1.329	69.29
00130	쥐 Fab	0.539	84.40	1.766	78.00	5	0.642	82.73
00143	IgG4-Ser, 키메라	0.148	76.70	0.074	66.00	5	0.125	70.03
00152	IgG4-Ser, 키메라	0.183	73.50			1	0.183	73.50
00230	IgG4-Ser, hz	27.74	46.00	7.282	68.00	3	15.34	55.66
00231	IgG4-Ser, hz	31.73	56.00	14.91	72.00	3	17.97	60.15
00158	IgG4-Ser, hz	억제 안함	1.24	억제 안함	0.75	8	억제 안함	-1.80
00148	IgG4-Ser, 키메라	억제 안함	9.50	억제 안함	-8.50	2	억제 안함	0.50
00122	IgG4-Ser, 키메라	억제 안함	3.90	억제 안함	10.00	4	억제 안함	6.95

[0237]

[0238]

T 세포 증식은 TL1A로 동시 자극에 의해 3배 증가하였다. 이 TL1A-의존적 증가는 항-TL1A 중성화 대조군 항체와 동시 배양에 의해 차단되었다. 모든 항-DR3 mAb 뿐만 아니라 Fab 0091은 10 µg/ml에서 증식을 약간 억제하는 한편, Fab 0087 및 0088은 검정에 사용된 가장 낮은 농도로도 증식을 완벽히 차단하였다. 결론적으로, Fab 0087 및 0088은 CD4-양성 T-세포 증식의 TL1A-의존적 동시 자극을 하향 조절하는데 매우 효율적이다.

[0239]

실시예 9

[0240]

마우스 27F16A1, 27F44A2 및 28F26A3 mAb의 클로닝 및 시퀀싱.

[0241]

항-DR3 항체에 대한 쥐 증쇄 및 경쇄 서열을 히브리도마 27F16A1, 27F44A2 및 28F26A3로부터 클로닝하였다. Qiagen의 RNeasy-Mini Kit를 사용하여 히브리도마 세포로부터 추출된 총 RNA를 cDNA 합성을 위한 주형으로서 사용하였다. cDNA를 Clontech의 SMARTer™ RACE cDNA 증폭 키트를 사용하는 5'-RACE 반응으로 합성하였다. 이후 HC 및 LC 서열의 표적 증폭을 Phusion High-Fidelity PCR Master 믹스 (Finnzymes) 및 정방향 프라이머로서 SMARTer™ RACE 키트에 포함된 일반적 프라이머 믹스 (UPM)를 사용하는 PCR에 의해 수행하였다.

[0242] PCR 생성물을 겔 전기영동법에 의해 분리하였고, GE Healthcare Life Sciences의 GFX PCR DNA 및 Gel Band Purification Kit를 사용하여 추출하였고 Invitrogen의 Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit 및 화학적 컴피턴트 (competent) TOP10 E.coli를 사용하여 시퀀싱을 위해 클로닝하였다. Applied Biosystems의 AmpliTaq Gold Master Mix 및 13uni/M13rev 프라이머를 사용하여 선택된 콜로니에서 콜로니 PCR을 수행하였다. 콜로니 PCR 클린업 (clean-up)을 ExoSAP-IT 효소 믹스 (USB)를 사용하여 수행하였다. 시퀀싱을 T3/T7 시퀀싱 프라이머를 사용하여 Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany에서 수행하였다.

[0243] 서열을 VectorNTI 프로그램을 사용하여 분석하였고 주석을 달았다. 모든 키트 및 시약을 제조사의 지시에 따라 사용하였다. 히브리도마, 27F16A1 및 27F44A2로부터, 단일 독특한 쥐 LC 타입 카파 및 단일 독특한 쥐 HC, 서브클래스 IgG1을 확인하였다 (SEQ ID NO 8-11). 28F26A3으로부터, 단일 독특한 쥐 LC 타입 카파 및 단일 독특한 쥐 HC, 서브클래스 IgG2a를 확인하였다 (SEQ ID NO 12-13). 선도 펩티드 서열은 포함되지 않는다.

[0244] *BLAST 검색*

[0245] 번역된 항-DR3 27F16A1, 27F44A2 및 28F26A3 VL 및 VH 아미노산 서열을 쿼리 (query) 서열로서 사용하였다. BLAST 검색을 BLASTp 프로그램을 사용하는 GeneSeqP 특허 데이터베이스 (외부 데이터베이스로부터 들어온 서열이 있지만 외부 입자에 대한 접근이 금지된 내부 데이터베이스)의 서열에 대하여 수행하였다. 100개의 가장 높은 식별 점수 중에서 VH에 대하여 가장 높은 식별 점수는 87.4 (28F26A3)였고 VL에 대하여 그것은 97.3 (27F44A2)이었다. 결론적으로, 항-DR3에 대한 VH 및 VL 서열은 새로운 서열을 제공한다.

[0246] **실시예 10**

[0247] *유동 세포분석법에 의한 항체 결합의 평가*

[0248] 사람 CD4-양성 T 세포를 CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 및 Histopaque (Sigma)를 사용하여 버피 코트로부터 정제하였다. T 세포를 10% fcs가 보충된 RPMI에서 2 CD4 T 세포/ml 미만으로 T75 플라스크에서 4일 동안 1:1 비율의 CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen)로 자극하였다. 비드를 마그넷을 사용하여 제거하였고, 세포를 적정하기 전에 500.000 세포/염색의 항체에서 2번 세척하였다. 염소-항-마우스 피코에리트린 (Jackson ImmunoResearch)으로 배양 후 결합 포화도를 측정하였고 이후에 세포를 BD LSRII 상에서 유동 세포분석법에 의해 분석하였다. 모든 항체는 3 µg/ml에서 포화에 도달하였다. 중간 형광 발광 강도는 표 11에 제공되는 한편, 염색 지수 (MFI Ab/MFI 이소타입)는 표 12에 나타난다. Ab 0070, 0072, 0073 및 0076은 0071 및 0077보다 더 강한 결합을 입증하였다.

[0249] **표 11: 중간 형광 발광 강도**

Ab	중간 형광 발광 강도
0070	2329
0071	406
0072	2650
0073	2844
0076	2645
0077	645
IgG1 이소타입	222

[0250]

[0251] 표 12: 염색 지수

Ab	염색 지수
0070	10.49
0071	1.83
0072	11.94
0073	12.81
0076	11.91
0077	2.91
IgG1 이소타입	1

[0252]

[0253] 모든 항체의 엘리퀴트를 피코에리트린 표지 키트 lightening link (Innova Biosciences)를 사용하여 콘쥬게이션 시켰다. CD4 T 세포를 상기 설명된 바와 같이 자극하였고 세포를 세척하기 전에, 비드를 마그넷을 사용하여 제거하였다. 표지되지 않은 항체를 0-50 µg/ml 최종 농도로 적정하였고 4 °C에서 30분 동안 배양하기 전 세포에 추가하였다. 세포를 세척하였고 직접 표지된 항체를 2 µg/ml로 추가하였다. 30분 배양 후에, 세포를 세척하였고 유동 세포분석기 상에서 실행하였다. 표지된 및 표지되지 않은 항체의 모든 조합을 테스트하였고, 중간 형광 발광 강도를 기록하였다. 표지된 항체의 결합에 대하여 경쟁하는 표지되지 않은 항체는 같은 빈 (bin)에 결합하는 것으로 분류된다.

[0254] Ab 0070, 0072, 0073, 0076만이 활성화된 T 세포를 그것들에 결합할 정도로 충분히 염색할 수 있다. 표 13에 예측된 바와 같이, 0070, 0072, 0073, 0076은 서로에 대하여 경쟁할 수 있고, 따라서 같은 빈으로 분류된다. 대부분의 경우 이들 mAb는 같은 에피토프, 중복 에피토프에 결합하지만, 부피 변화 장애로 인해 동시에 결합할 수 없다.

[0255] 표 13: "Bin 1" 항체

Bin 1
0070
0072
0073
0076

[0256]

[0257] 실시예 11

[0258] 항체 및 Fab 단편의 SPR 분석

[0259] DR3의 다른 도메인에 결합

[0260] DR3의 세포 외 모이어티는 DR3의 아미노 말단 부분에 위치하고 4개의 TNF 수용체 시스테인-풍부 도메인으로 구성된다. 사람 IgG4의 Fc 도메인에 융합된 증가된 길이의 DR3의 세포 외 도메인의 일부를 함유한 여러 융합 단백질이 발현되고 정제된다. SPR 분석에 사용된 DR3 단백질은 올리고머화된 물질을 제외하도록 정제되었다. 이들 단백질을 아민 결합 화학 반응을 사용하여 CM5 센서 칩에 고정하였다. 0070, 0072, 0073 및 0076으로 불리는 항-DR3 항체의 다른 DR3-Fc 융합 단백질에 결합을 Biacore T100 장치 (GE Healthcare) 상에서 플라스몬 표면 결합 측정의 방법에 의해 테스트하였다. 이들 항체 모두는 FACS 검정에서 TL1A의 DR3에 대한 결합을 억제한다. 이들 4개의 항체는 재조합 DR3 (CRD1)에 결합하였다-아미노 말단 CRD만을 함유하는 Fc 단백질 (SEQ ID NO 2)은 DR3의 아미노산 25-71로 구성된다. 또 다른 항체 0077은 DR3에 결합하는 TL1A를 억제하지 않으며, DR3 (CRD1)에 결합하지 않는다. 하지만 Fc (SEQ ID NO 2)는 DR3 (CRD1 + A1)에 결합하였다-Fc (SEQ ID NO 3)는 DR3의 아미노산 25-90을 함유하며, 그것의 에피토프 또는 그것의 에피토프의 적어도 일부는 아미노산 77 내지 90 사이에 위치한다.

[0261] 같은 분석을 또한 Fab 단편의 일부에 대하여 수행하였다. Fab 단편 0123, 0124, 0130, 0143, 0152, 0219 및 0228은 모두 DR3(CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2)에 결합하였다.

[0262] Fab 단편 230 및 231의 DR3-Fc에 결합을 또한 SPR에 의해 테스트하였다. Fab는 완벽한 DR3의 세포 외 도메인을 함유하는 DR3 (ECD)-Fc (SEQ ID NO 7)에 결합하였지만, DR3 (CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2) 또는 DR3 (CRD1 + A1)-Fc

(SEQ ID NO 3)는 아니며, 이들 2개의 선행 기술 Fab 단편은 DR3 CRD1 도메인에 결합하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0263] SPR에 의해 항-DR3 Fab 단편에 대한 결합 역학의 측정

[0264] 실험을 Biacore T200 장치 (GE Healthcare)에서 수행하였고 Biacore T200 Evaluation Software로 분석하였다. 항 사람 IgG 항체 (GE Healthcare의 사람 IgG 캡처 키트)를 제조사의 지시에 따라 CM5 센서 칩의 모든 유동 세포에 고정하였다. 0.1% 사람 혈청 알부민이 들어있는 HBS-EP (GE Healthcare)를 러닝 버퍼로서 사용하였다.

[0265] DR3(CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2)를 14 내지 45 RU의 낮은 표면 밀도의 칩에서 캡처하였다. Fab 단편을 90 내지 0.037 nM 사이의 농도로 희석하였고 이후에 360초 동안 주입하였다. 표준 해리 시간은 900였지만, 높은 친화도로 인해, 올바른 kd 값을 결정하기 위하여 가장 높은 농도에 대하여 최대 13,000초의 연장된 해리 시간이 적용되었다. 결합 곡선을 25 °C에서 30 내지 60 μ l/분의 유속으로 측정하였다.

[0266] 재생을 3 M CaCl₂로 2 x 20초 동안 수행하였다. 미가공 데이터를 캡처된 리간드 및 버퍼 블랭크 없이 참고 유동 세포로부터 신호를 뺄으로써 2번 참조하였다. 역학적 파라미터의 결정을 Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare)를 사용하여 1:1 결합 모델과 맞춤으로써 수행하였다. DR3(CRD1)-Fc (SEQ ID NO 2)의 3개의 다른 표면 밀도로부터 얻은 평균 값을 계산하였고 표 14에 진술한다.

[0267] 표 14: K_D 값

Fab	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _d [s ⁻¹]	K _D [M]
124	7.52E+05	2.01E-04	2.67E-10
130	1.74E+06	2.08E-04	1.20E-10
143	3.49E+06	5.10E-06	1.47E-12
219	3.20E+06	3.06E-05	9.55E-12
228	3.97E+06	3.19E-05	8.05E-12

[0268]

[0269] Fab 경쟁 검정

[0270] 실험을 Biacore T200 장치 (GE Healthcare)에서 수행하였다. 항 사람 IgG 항체 (GE Healthcare의 사람 IgG 캡처 키트)를 제조사의 지시에 따라 CM5 센서 칩의 모든 유동 세포에 고정하였다. 0.1% 사람 혈청 알부민이 들어있는 HBS-EP (GE Healthcare)를 러닝 버퍼로서 사용하였다. DR3 (ECD)-Fc (SEQ ID NO 7)를 700 내지 1200 RU의 표면 밀도에서 캡처하였다. Fab 단편을 20 μ g/mL의 농도로 사용하였다. 2개의 Fab 단편의 이중 주입을 각각 300 및 150초 동안 수행한 후 이어서, 3 M CaCl₂로 2 x 20초 동안 재생하였다. Fab 단편의 결합 반응을 Scrubber (BioLogic Software)로 분석하였다.

[0271] Fab 단편은, DR3 (ECD)-Fc에 동시에 결합할 수 없으며, 같은 에피토프 빈에 속하는 것으로 생각되었다. 표 15에 나타난 바와 같이, Fab 단편 124, 130, 143 및 228은 모두 CRD1 도메인에 대하여 지시되고, 같은 에피토프 빈으로 나누어진다. 유사하게 Fab 단편 230 및 231은 같은 CDR 도메인을 가지며, 또한 CRD1과 다른, 같은 에피토프 빈에 속한다. Fab 단편 148 및 163은 다른 Fab 중 어떤 것과도 경쟁하지 않고 그러므로 별도의 에피토프 빈으로 나누어진다. Fab 단편 148은 2로 주입될 때 124, 130, 143 및 228과 경쟁하지 않는다. 항체는, 그것이 다른 빈에 속해있다는 것을 나타낸다. 하지만, 148이 먼저 결합될 때, 130, 143 또는 228은 더이상 결합하지 않으며, 다른 Fab 단편의 결합을 불가능하게 하는, DR3-Fc의 부피 변화 장애 또는 구조적 변화가 있다고 제안한다.

[0272] 표 15: SPR에 의해 측정된 DR3-Fc에 결합에 대한 Fab 경쟁.

1. Fab \ 2. Fab	124	130	143	148	163	228	230	231
124	-	-	-	+	+	-	+	n.t.
130	-	-	-	+	+	-	+	n.t.
143	-	-	-	+	+	-	+	n.t.
148	n.t.	-	-	-	+	-	+	+
163	n.t.	n.t.	+	+	-	+	+	+
228	n.t.	n.t.	-	+	+	-	+	+
230	+	+	+	+	+	+	-	-
231	n.t.	n.t.	+	+	+	+	-	-

[0273] +: Fab와 동시 결합 ; -: 2. Fab의 비결합; n.t.: 테스트 안됨

[0274] 경쟁 검정

[0275] 표 16에 나타난 바와 같이, Fab 단편 228, 231, 230 및 148을 FACS에서 DR3를 발현하는 세포에 결합하는 0107 (0228의 Mab) 및 0121 (148의 Mab)의 결합을 차단하는 능력에 대하여 테스트하였다. Fab 단편 230 및 231은 Mab 중 어떤 것과도 경쟁할 수 없고 Mab 0107 및 Mab 0121과 동시에 결합할 수 있다.

[0276] 표 16: FACS에 의해 수행된 경쟁 검정

경쟁 검정		
최대 1:10000 초과 Fab를 사용하여 Mab의 결합의 차단에 대하여 테스트된 Fab		
MAB ID	0107	0121
Fab ID	(쥐 Mab 0228)	(0148의 쥐 Mab)
0228	분자비 Mab/Fab 1:10에서부터 억제	억제 안함
0230	억제 안함	억제 안함
0231	억제 안함	억제 안함
0148	분자비 Mab/Fab 1:100에서부터 억제	분자비 Mab/Fab 1:3에서부터 완벽히 억제

[0277]

[0278] 실시예 12

[0279] DR3의 돌연변이 유발에 의한 Fab-0228의 에피토프 매핑

[0280] 사람 DR3의 CRD1의 아미노산이-0123 Fab와 상호작용의 원인이 되는지 결정하기 위해, 소수의 DR3 돌연변이를 발생시켰다. 3개의 돌연변이 R29Q, I43N 및 L45V를 부위-관련 돌연변이 유발 (Quikchange, Stratagene)에 의해 만들었다. 돌연변이된 DR3 발현 플라스미드 및 NF카파B-Luc 리porter 플라스미드를 HEK293 세포에 일시적으로 트랜스펙션하였고 세포를 항-DR3 항-Fab-0228과 함께 간단히 사전 배양하였고 이후에 사람 TL1A로 4시간 동안 자극하였다. 루시퍼라제 활성을 Steady-GLO (Promega)를 사용하여 검정하였고 TopCount NXT (Perkin Elmer) 상에서 관찰하였다. R29Q는 사람 야생형보다 약간 더 잘 중성화되었지만, I43N, L45V 둘 다 및 결합된 돌연변이 I43N/L45V는 훨씬 덜 효율적으로 중성화되었으며, 표 17 참조.

[0281] 항-Fab-0123를 또한 테스트하였고 순위는 -0228와 유사하였다: R29Q>WT>L45V>I43N>I43N-L45V. 따라서, 잔기 I43 및 L45는 0228의 친화도의 DR3에 결합을 유지하기 위해 매우 중요하다. 그러므로 이들 잔기는 대부분의 경우 결합 에피토프의 일부이다. 반대로, R29는 친화도가 유지되고 이 잔기가 돌연변이될 때 약간 개선되기 때문에, 0228의 DR3에 결합에 필수적인 것으로 보이지 않는다. 하지만 이 위치가 0228 결합에 영향을 미치기 때문에 그것은 결합 에피토프에 대하여 구조적으로 중요하다.

[0282] 표 17:

일시적으로 트랜스펙션된 1차 DR3 리porter 세포에서 테스트된 Fab, TL1A에 의한 자극시 Fab의 IC50					
Fab ID	사람 DR3	R29Q	I43N	45V	I43N/L45V
0227-0000-0228	645 pM	372 pM	68 nM	nM	149 nM

[0283]

[0284] 실시예 13

[0285] 항-DR3 사람화

[0286] 0072의 서열을 히브리도마 27F44A2의 클로닝으로부터 얻었다. 이 실시예에 사용된 모든 번호 매기기는 카바트 번호를 나타낸다.

>0072VH (볼드체로 표시된 CDR) (SEQ ID NO 10)
 EVKLVESSGGGLVQPGGSLKLSCLSCASGFAFSNYDMSWVRQTPEKRLEWVAFAFSSDGYTFYP
 DSLKGRFTISRDNARNTLYLQMSLGSSEDTALYCCARHADYANYFVMDYWGQGTSTVTVSS
 >0072VL (볼드체로 표시된 CDR) (SEQ ID NO 11)
 DIVLAQSPASLLVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQKPGQPPKLLIYLASNLES
 GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTMLELKR

[0287]

[0288]

[0289]

[0290]

[0291]

[0292]

[0293]

[0294]

[0295]

[0296]

[0297]

0072의 서열 분석은 중쇄의 위치 91의 자유 시스테인을 나타내며, 그것은 사람화 중에 제거되어야 한다.

0072의 3D 모델을 MOE의 표준 기술을 사용하여 제작하였고 [www.chemcomp.com에서 이용 가능] 효과적인 CDR 영역 (VH: 31-35B, 50-58, 95-102; VL: 24-34, 50-56, 89-97)의 4.5 Å 내의 모든 잔기는 마스크 잔기로 정의된다. 마스크 잔기는 모두 잠재적으로 CDR에서 결합을 유지하는데 중요하다.

마스크 잔기는 중쇄에 대하여 위치 2, 4, 27-37, 47, 50-59, 69-71, 78, 91-103 및 경쇄에 대하여 위치 3-5, 7, 23-36, 46-60, 62, 65, 67, 69-71, 87-98을 포함한다.

생식 계열 검색 및 수동식 검토를 사용하여 VH3_13 및 JH4를 중쇄에 대한 적절한 사람 생식 계열 조합으로서 확인하였고 VKI_02 및 JK4를 경쇄에 대한 적절한 사람 생식 계열 조합으로서 확인하였다.

사람화는 현재 다음과 같은 규칙으로 수행될 수 있다:

- 마스크 외부의 잔기는 사람으로서 간주된다.
- 마스크 내부 및 카바트 CDR 내부의 잔기는 쥐로서 간주된다.
- 마우스/생식계열의 공통된, 마스크 내부 및 카바트 CDR 외부의 잔기는 공통 서열로서 간주된다.
- 마우스/생식계열이 다른, 마스크 내부 및 카바트 CDR 외부의 잔기는 잠재적 역 돌연변이를 받는다.

0072의 효과적인 CDR 영역을 생식 계열에 이식하는 것은 0072, hz0072의 기본적인 사람화 구조를 형성한다.

1. >hz0072VH (SEQ ID NO 28)
 2. EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWVRQATGKGLEW
 VSAFSSDGYTFYP
 3. GSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLGSSEDTALYCCARHADYANYFVMDYWGQGTSTVTVSS
 4.
 5. >hz0072VL (SEQ ID NO 29)
 6. DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQKPGKA
 PKLLIYLASNLES
 7. GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSRELPLTFGGGTK
 VEIK

[0298]

[0299]

[0300]

[0301]

[0302]

[0303]

[0304]

[0305]

[0306]

쥐 CDR과 비교하여 유일한 차이는 CDR_{H2}이다.

마스크 잔기에서 0072 및 hz0072 사이의 어떤 차이도 잠재적인 역 돌연변이를 생성할 것이고 목록은 다음을 포함한다

hz0072VH: T28A, S49A, Y91C

hz0072VL: Q3V, M4L, T5M, S60A

모든 잠재적으로 사람화된 mAb를 조사하기 위해 상기 돌연변이의 모든 조합을 생산해야 한다.

표 18에 나열된 Fab 단백질은 HEK293 6E 세포에서 발현되었고 각각의 변이체의 발현 수준을 SDS-PAGE 겔에 의해 평가된 바와 같이 비교하였다. 표 18의 결과는 중쇄 (화합물 0169, 1070 및 0171)의 부위-91에서 생식 계열 Tyr을 함유하는 변이체 모두가 이 부위에서 다른 대체, Cys (화합물 0172) 또는 Ser (화합물 0173 또는 0174)를 함유하는 것들과 비교하여 크게 개선된 발현 수준을 갖는다는 것을 나타낸다.

또한 표 18로부터, 경쇄의 부위-4에서 사람 버전의 Met 또는 쥐 버전의 Leu는 발현 수준에 대한 분명한 효과를 갖지 않았다. 이것은 중쇄의 Y91이 0072의 완전히 이식된 버전의 발현 수준의 향상에 중요하다는 것을 나타낸다.

표 18: 중쇄의 부위-91 또는 경쇄의 부위-4에서 돌연변이를 갖는 항-DR3 Fab의 변이체의 의한 Fab의 발현 수준의 비교. 변이체를 HC_T28A_S49A 및 LC_Q3A_T5A_S60A의 역 돌연변이로 사람화된 항-DR3 0072에서 발생시켰다. HC_Y91은 사람화된 버전이다; Y91C는 쥐 버전이다; Y91S는 Y91을 부적당한 아미노산 Ser으로 돌연변이가 되게 하는 것이다. LC_M4는 사람화된 버전이다; LC_M4L는 쥐 버전이다. 발현 수준을 SDS-PAGE 겔에 의해 평가하였다;

"++++"는 >50 mg/L의 높은 발현 수준을 나타내고, "+"는 불량한 발현 수준을 나타낸다.

화합물 이름	돌연변이 부위		발현 수준
	HC_91	LC_4	
0169	Y91	M4L	++++
0170	Y91	M4	++++
0171	Y91	M4	++++
0172	Y91C	M4L	+
0173	Y91S	M4L	+
0174	Y91S	M4	+

역 돌연변이의 선택

역 돌연변이의 삽입의 잠재적인 이점을 발현, 강도 및 친화도 스크리닝에 기초하여 뿐만 아니라 생물물리학적 특징에 의해 평가하였다.

발현 패턴: 다양한 역 돌연변이 (BM's)를 포함하는, 다양한 사람화된 버전의 0072의 발현 수준을 HEK293-6E에서 일시적으로 평가하였다 (HEK293-6E에서 일시적인 발현에 대하여 실시예 3 참조).

hz0072에 추가로, 다음 BM's를 발현에 관하여 개별적으로 평가하였다:

LC: T5A 및 S60A

HC: T28A 및 S49A

실험을 3번 수행하였다. 세포를 트랜스펙션 후 5일 동안 성장시켰다. 배지를 수확하였고 발현 수준을 단백질 G 센서를 사용하는 forteBIO's Octet에 의해 측정하였다.

결과는 HC에서 BM S49A가 hz0072 발현과 비교하여 ~2배 증가를 일으킨다는 것을 나타냈다. 다른 BM 중 아무 것도 발현 수준을 증가시키는 능력을 갖지 않았다 (표 19).

표 19: 역 돌연변이된 중쇄 (HC) 및 역 돌연변이된 경쇄 (LC)의 상대적 발현 수준 및 100% 발현 수준으로 설정된 야생형 (WT)과 비교.

	평균 (%)	표준편차
hz0072	100	0.06
hz0072 T28A(VH)	91.7	6.02
hz0072 S49A(VH)	251.2	4.58
hz0072 T5A(VL)	45.7	1.26
hz0072 S60A(VL)	63.6	2.17

생물물리학적 특징

사람화된 Fab의 내열성을 시차열 형광측정법 (differential scanning fluorimetry; DSF)을 사용하여 측정하였다. DSF를 MyiQ Real-시간 PCR 검출 시스템 (Biorad Laboratories, Inc)을 사용하여 수행하였다. 0.3 mg/ml의 최종 농도에서 pH 7.4인 PBS 중의 샘플 및 염료 Sypro Orange의 2000배 희석된 스톡 용액을 밀봉된 96 웰 PCR 플레이트에 배치하였으며, 이것을 단백질 언폴딩 (unfolding) 전이를 관찰하기 위해 사용하였다. 형광 발광 강도를 들뜸/배출 파장으로 측정하였다: 480/575 nm. 표 20은 사람화된 Fab의 내열성을 나타낸다. 결과는 역 돌연변이된 2개의 Fab (228 및 229)가 71 °C에서 같은 내열성 (T_m)을 가지는 반면, 역 돌연변이되지 않은 사람화된 Fab (227)는 66 °C에서 감소된 내열성을 갖는다.

Fab	m (°C)
hz0072 (227)	6
hz0072 S49A(VH) (228)	1
hz0072 S49A(VH) S60A(VL) (229)	1

[0320]

[0321] 표 20: T_m (변성 온도) 값은 사람화된 Fab에 대하여 나타난다.

[0322] 생물물리학적 평가를 사용하여 IgG4 백본의 선택

[0323] 사람화된 Fab의 IgG1 및 IgG4 이소타입을 단편화 패턴을 보기 위해 Bioanalyser를 사용하여 pH 7.4의 PBS 중의 3 mg/ml에서 측정하였다. Agilent 2100 Bioanalyzer를 단편화 패턴을 보기 위해 사용하였다. 키트는 Agilent 단백질 230였고, 사용된 마커는 7개의 피크를 가진 단백질 230 Ladder였다. 비-감소된 샘플을 2 μ l 샘플, 2 μ l Mill-Q 물, 2 μ l 샘플 버퍼 및 1 μ l 0.5 M N-에틸말레이미드로 제조하였다 (CH₃CN에 용해된 NEM). 모든 샘플을 100°C로 최대 5분 동안 가열하였다.

[0324] 표 21은 비-감소된 조건에서 Fab에 대하여 자유 LC의 통합된 양의 Bioanalyser 데이터를 나타낸다. 결과는 IgG4 Fab 모두가 IgG1 Fab와 비교하여 비-감소된 환경에서 덜 자유로운 LC를 갖는다는 것을 나타낸다.

Fab	gG1	gG4
hz0072	1.9	.0
hz0072S49A(VH)	.6	.6
hz0072S49A(VH) S60A (VL)	.2	.7

[0325]

[0326] 표 21: IgG1 및 IgG4 사람화된 Fab에 대하여 비-감소된 조건에서 자유 LC의 통합된 피크 값

[0327] 상기 설명된 바와 같이 대규모 효능 및 친화도 스크리닝, 발현 분석 및 안정성 연구 후, 최종 사람화된 후보물질을 다음 서열을 갖는 hz0072VH S49A, hz0072VL의 IgG4 버전으로서 선택하였다.

8. >hz0072VH_S49A (SEQ ID NO 16)
 9. EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWVRQATGKGLEW
 VAAFSSDGYTFYP
 10. GSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARHADYANYFPM
 DYWGQGLTVTVSS
 11. >hz0072VL (SEQ ID NO 17)
 12. DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPKGA
 PKLLIYLASNLES
 13. GVPFRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHSRELPLTFGGGTK
 VEIK

[0328]

[0329] 이 후보물질은 가변 도메인에서 자유 시스테인을 갖지 않는다.

[0330] 실시예 14

[0331] 제조합 Fab 단편의 정제:

[0332] 제조합 Fab 단편을 Akta Explorer FPLC 시스템 (GE Healthcare)을 사용하여 크로마토그래피 단계에 의해 정제하였다. 2 mS보다 낮게 전도도를 감소시키기 위해 제조합 마우스 Fab를 함유하는 세포 배양 상층액을 회석하였다. Fab 단편의 이론적인 pH에 의존적으로, MonoQ 또는 MonoS 컬럼 (GE Healthcare)을 사용하여 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. Fab 단편을 5 내지 8.5의 pH 값의 낮은 이온 강도의 버퍼에서 컬럼에 결합시켰고 최대 1 M NaCl의 염 구배로 용출하였다. 올리고머 Fab 복합체를 제거하기 위해 Superdex200 컬럼 (GE Healthcare) 및 버퍼로서 PBS를 가지고 겔 여과를 수행하였다.

[0333] 키메라 Fab 단편은 사람 카파 면역글로불린 경쇄의 불변 부분을 함유하며, 제조사의 지시에 따라 KappaSelect (GE Healthcare)를 사용하는 친화도 정제에 의해 정제한 후 이어서 고분자량 복합체를 제거하기 위해 겔 여과하

였다.

[0334] mAb의 파파인 분열에 의한 Fab의 발생

[0335] 제조사의 지시에 따라 Pierce Fab Preparation Kit (Thermo Scientific)를 사용하여 mAb의 분열에 의해 Fab 단편을 발생시켰다. 일부 경우에, 고분자량 형태를 제거하기 위해 Superdex200 컬럼 (GE Healthcare) 및 버퍼로서 PBS를 가지고 겔 여과를 수행하였다.

[0336] 실시예 15

[0337] 1차 사람 T 세포로부터 시토킨 방출 또는 이것의 증식.

[0338] CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 및 Histopaque (Sigma)를 사용하는 마그네틱 비드 분리를 통해 버피 코트로부터 분리된 CD4 + T 세포를 TCR 활성화 없이 100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A; Novo Nordisk)와 함께 또는 없이 시토킨 IL-12 (2 ng/ml), IL-18 (50 ng/ml)로 자극하였다. T 세포 증식 및 시토킨 방출을 측정하였다. 48시간 동안 자극된 CD4+ T 세포 (2×10^5 세포/웰)의 상층액을 수확하였고 Bioplex에 의해 시토킨 방출에 대해 분석하였다. T 세포 증식을 5일 후에 측정하였다.

[0339] IL-12 (2 ng/ml), IL-18 (50 ng/ml) 및 100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A; Novo Nordisk) 처리된 CD4+ T 세포는 IL-12/IL-18 처리된 T 세포와 비교하여 6배 증가된 T 세포 증식을 입증하였다. 0123 및 0124 Fab는 이미 0.16 µg/ml의 Fab의 농도에서 유발된 T 세포 증식을 완전히 차단하는 한편, 해당 mAb 0072 및 0108은 T 세포 증식에 영향을 미치지 않았다 (도 8).

[0340] 방출된 시토킨 IL-6, IFN γ , GM-CSF 및 TNF α 를 TL1A by IL-12/IL-18 처리된 CD4+ T 세포에 의해 48시간 후 모두 유발하였다. TNF α 는 DR3 결합 비-차단 Fab 0091와 비교하여, 항-DR3 Fab 0124에 의해 유의하게 (p=*) 차단되었다 (표 22).

[0341] 표 22:

시토킨	+TL1A (IL12/IL18 활성화된 T 세포와 비교하여 배 상향 조절)	+TL1A+항 DR3 Fab (IL12/IL18 활성화된 T 세포와 비교하여 배 하향 조절)
IL-6	16 (p=0.051)	13.3 (p=0.08)
IFN γ	1.2 (p=0.025)	1.1 (p=0.08)
GM-CSF	7.5 (p=0.04)	7.9 (p=0.08)
TNF α	4.4 (p=0.0007=)	5 (p=0.025)

[0342]

[0343] 실시예 16

[0344] 지질 모이어티를 Fab에 콘쥬게이션

[0345] NAP-25 컬럼, GE Healthcare의 cat# 17-0852-02

[0346] GE Healthcare의 Hitrap Q-세파로스 FF 컬럼 (코드: 17-5156-01)

[0347] TSPP: 트리페닐 포스핀-3,3',3"-트리술폰산 삼나트륨 염 수화물, Alfa Aesar의 cat# 39538,

[0348] TDSPP: 비스(p-술포나토페닐)페닐포스핀 이수화물 이칼륨 염, Strem Chemicals의 cat# 151888-20-9,

[0349] TEA: 트리에탄올아민, 제품 번호: Sigma의 90279

[0350] 에틸렌글리콜, MERCK의 cat# 1.00949.1000

[0351] NaCl: 코드: Acros Organics의 207790010

[0352] EDTA, 이나트륨 염, 이수화물 cat# ChemCruz의 SC-29092

[0353] PBS 타블렛, cat# GIBCO의 18912-014

[0354]	Vivaspin 20, 10000 MWCO, PES 막, cat# Sartorius의 VS2001
[0355]	PD10 G-25 컬럼, cat# Ge Healthcare의 17-0851-01
[0356]	약어
[0357]	CV: 컬럼 부피
[0358]	FLD: 형광 발광 검출
[0359]	MQ: MilliQ 물 (고도로 정제된 물)
[0360]	m/z: 전하에 대한 질량 비율
[0361]	MS: 질량 분석법
[0362]	M+H: 단독으로 양성자화된 종의 질량
[0363]	HPLC: 고압 액상 크로마토그래피
[0364]	RP: 역상
[0365]	LC-MS: 액상 크로마토그래피-질량 분석법
[0366]	NMR: 핵 자기 공명 분광법 (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
[0367]	rt 또는 RT: 상온
[0368]	Boc: 삼차 부틸옥시카르보닐
[0369]	O-f-Bu: 삼차 부틸 에스테르
[0370]	f-Bu: 삼차 부틸
[0371]	DCM: 디클로로메탄, CH ₂ Cl ₂ , 메틸렌클로리드
[0372]	DIC: 디이소프로필카르브디이미드
[0373]	DIPEA: N,N-디이소프로필에틸아민
[0374]	DMF: N,N-디메틸포름아미드
[0375]	DMSO: 디메틸설폭시드
[0376]	Fmoc: 9H-플루오렌-9-일메톡시카르보닐
[0377]	Lys(Mtt)-OH: (S)-6-[(디페닐-p-톨일-메틸)-아미노]-2-아미노-헥사노익산
[0378]	Thx: 트랜스-4-아미노메틸시클로헥산카르복실산
[0379]	NMP: N-메틸피롤리딘-2-원
[0380]	OEG: (2[2-(아미노)에톡시]에톡시)아세트산
[0381]	TFA: 트리플루오로아세트산
[0382]	THF: 테트라히드로푸란
[0383]	TIS: 트리이소프로필실란
[0384]	TNBS: 트리니트로벤젠 술폰산
[0385]	HC: 중쇄
[0386]	LC: 경쇄
[0387]	wt: 야생형
[0388]	아미노산 약어는 IUPAC 규약을 따른다.
[0389]	버퍼 약어는 Stoll, V. S. and Blanchard, J. S., Methods of Enzymology, 182, 1990, Academic Press, 24-38

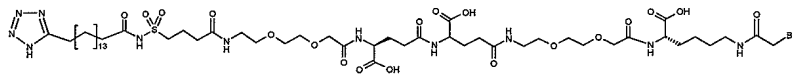
을 따른다.

[0390] 콘쥬게이션, 일반적인 사항

[0391] 소수성 돌출 기와 콘쥬게이션되는 Fab's를 중쇄 (HC)의 C-말단에서 또는 근처에서 언페어드 (unpaired) 시스테인으로 구성하였다. 이 시스테인은 예를 들어, 말레이미드 또는 할로-아세틸 기를 함유하는 황친화성 알킬화 시약과 콘쥬게이션되기 위한 것이다.

[0392] Fab's는 돌연변이된 Cys에 이황화 결합된 시스테인화된 분자로서 발현되었다. 알킬화 시약과 반응을 위해 돌연변이된 Cys를 자유롭게 하기 위해, 그것은 포스핀 시약을 사용하여 환원되었다. 환원 후, 단백질을 환원제로부터 분리하였고 알킬화제를 추가함으로써 알킬화를 받았다. 최종적으로, 콘쥬게이트 (conjugate)를 표준 저압 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0393] 4-(1H-테트라졸-16-일-헥사데카노일술폰파모일)부타노일-OEG-γ Glu-γ Glu-OEG-Af(C(0)CH₂Br)Lys-OH (알부민 바인더 I):



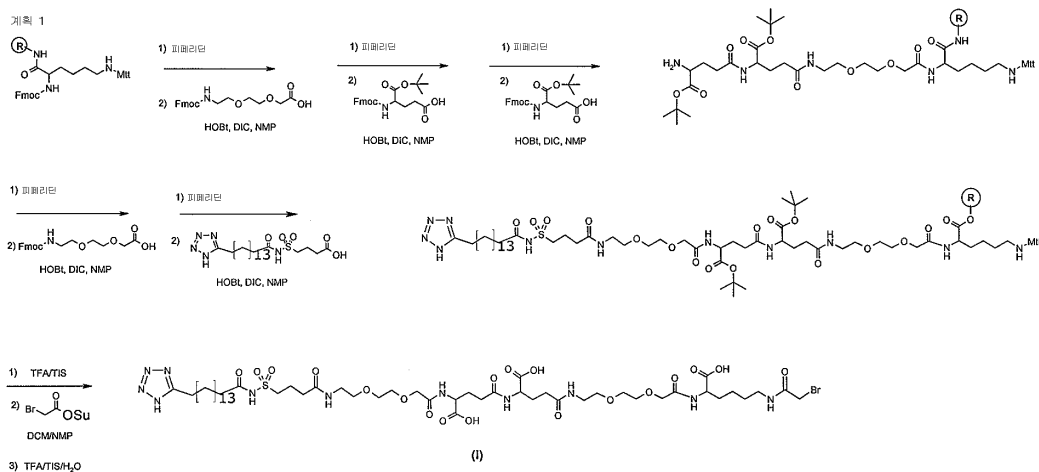
(화합물 I)

[0394]

[0395] 화합물 I을 계획 1에 따라 ABI433 합성기 (Applied Biosystems)에서 표준 Fmoc-펩티드 화학반응을 사용하여 1 mM 규모로 고체 지지대 상에서 합성하였다. 펩티드를 Fmoc-OEG-OH 및 Fmoc-Glu-OtBu 보호된 아미노산을 사용하여 Fmoc-Lys(MTT)-Wang 수지에 모았다. 4-(16-1H-테트라졸-5-일-헥사데카노일술폰파모일)부티르산을 DCM/NMP 중의 DIC/NHS를 사용하여 2 eq. 하룻밤 동안 수동으로 결합시켰고, TNBS 테스트는 반응이 완료되는 것으로 나타났다. 수지에 플로우스루 (flowthrough) 방식으로 50 mL DCM/TFA/TIS/물 (94:2:2:2)를 노란 색이 사라질 때까지, ~20 분 동안 처리한 후 이어서 세척하고 DIPEA/DMF로 중성화하였다. DCM/NMP (1:1) 중의 브로모 아세트산 (4 mM)을 NHS 및 DIC의 1 mM 혼합물로 활성화하였고, 여과하였고, DIPEA의 추가 1 mM의 추가와 함께 수지에 추가하였다. 1시간 후 반응이 완료되었다. 수지에 80 mL TFA/TIS/물 (95:2.5:2.5)을 1시간 동안 처리하였다. N₂의 스트림으로 증발시켰고, Et₂O의 추가에 의해 침전시켰고 Et₂O로 세척하였고 건조하였다. 조생성물을 예비 HPLC에서 수증의 0.1% TFA에 대하여 30-80% 0.1 TFA / MeCN의 구배로 정제하였다 (2번 실행). 분획을 수거하였고 ~50% MeCN 생성 화합물 I로 동결건조하였다.

[0396] TOF-MS: 질량 1272.52 (M+1)

[0397] 상기 실시예는 고체 단계 합성을 사용하여 높은 순도의 알부민 바인더 화합물 I를 제조하는 것이 가능하다는 것을 나타낸다.



[0398]

[0399] Fab 0120의 알부민 바인더 I에 콘쥬게이션

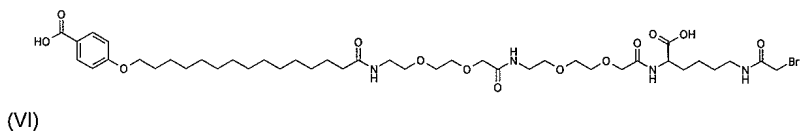
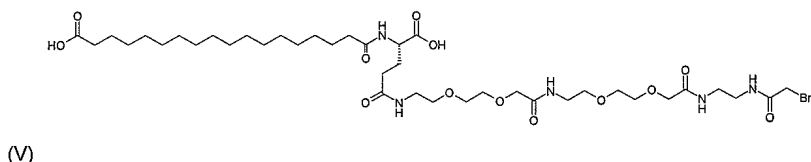
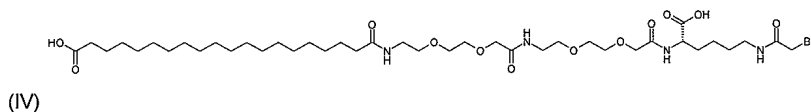
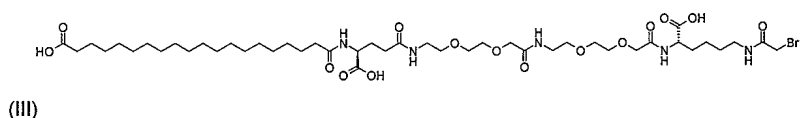
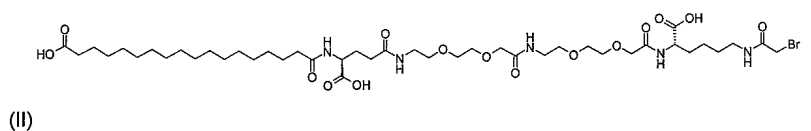
[0400] PBS 버퍼 중의 Fab 0120 (25 mg, 0.53 μmol, 4.2 mg/ml)를 20 mM 트리에탄올아민, 2 mM EDTA, pH 8.5 중의 트리페닐포스핀-3,3',3" 트리술폰산 삼나트륨 염 수화물 (TSPP, 40 mg/ml, 350 μl, 최종 농도 3.7 mM)의 용액과

혼합하였다. 반응 혼합물을 상온에서 150분의 기간 동안 배양하였다. 저분자량 물질을 평형화된 3개의 NAP-25 컬럼에서 버퍼 교환에 의해 제거하였고 20 mM 트리에탄올아민, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl, pH 8.5로 용출하였다. 교환된 버퍼가 감소된 Fab-용액을 20 mM 트리에탄올아민 2 mM EDTA, 400 mM NaCl, pH 8.5 중의 알부민 바인더 I (490 μ l, 16 mM, 최종 농도: 0.8 mM)의 용액과 혼합하였다. 반응 혼합물 (약 9.5 ml)을 상온에서 20시간의 기간 동안 배양하였고 버퍼 20 mM 트리에탄올아민, 10% 에틸렌글리콜, pH 8.0의 10 ml로 희석하였다. 이후에, 혼합물을 20 mM 트리에탄올아민, 10% 에틸렌글리콜, pH 8.0으로 평형화된 4개의 NAP25 컬럼에서 버퍼 교환하였다. 버퍼 교환 물질을 Akta Puifier 100 시스템 (GE Healthcare)을 사용하여 20 mM 트리에탄올아민, 10% 에틸렌글리콜, pH 8.0으로 평형화된 5 ml Hitrap Q-세파로스 FF 컬럼에 로딩하였다. 결합되지 않은 물질 (비공유제이션된 (inconjugated) Fab 포함)을 버퍼를 사용하여 세척하였고 생성물을 1.5시간의 기간 동안 20 mM 트리에탄올아민, 10% 에틸렌글리콜, 1 M NaCl, pH 8.0의 선형 구배를 사용하여 용출하였다. 생성물을 대칭 피크 프로파일로 약 380 mM NaCl에서 용출하였다. 적절한 분획을 모았고, Vivaspin 20 장치 (10000 MWCO, Sartorius)를 사용하여 3500 g로 한외여과에 의해 농축하였고 최종적으로 PBS 버퍼로 버퍼 교환하였다. 최종 분리된 생성물은 A280 측정에 의해 결정된 1.7 mg/ml의 농도로 11.9 mg (48%)였다. SDS-PAGE 및 MS 분석은 생성물의 정체성을 확인하였다 (발견 m/z 49919 (M+H), 계산 49917 (M+H)).

[0401] 상기 실시예는 Fab의 알부민 바인더 I와 성공적인, 부위-특이적 공유제이션을 나타낸다. 공유제이션은 좋은 수득률 및 높은 순도의 생성물을 발생시킨다.

[0402] *Fab's의 알부민 바인더 II-VI에 공유제이션*

[0403] 알부민 바인더 II-VI는 하기 나타난 바와 같은 구조를 갖는다



[0404]

[0405] 알부민 바인더 I-VI의 공유제이션은 상기 화합물 I에 대하여 설명된 바와 같은 과정에 따른다. 알부민 바인더 IV 및 VI의 경우에, 화합물은 Fab-용액에 추가하기 전에 완벽히 수용성이 아니었다. 일부 경우에서, 가용화를 촉진하기 위해 유기 용매를 추가하였다. 알부민 바인더 II-VI에서 더 낮은 수의 산성 기로 인해, 공유제이트는 pH가 8.6으로 증가되지 않으면 AIEC 컬럼에 결합하지 않았다. 알부민 바인더 II-VI의 경우에서, 순수한 단일치환된 생성물을 다양하게 변형된 Fab의 다른 양으로 오염시켰다. 이것들은 이온 교환 크로마토그래피에 의해 제거하기 힘들었다.

[0406] 모든 공유제이트의 정체성을 표 23에 나타난 SDS-PAGE 및 LC-MS 실시예로 확인하였다. 순도를 II, III 및 V의 공유제이트에 대하여 >90%인 것으로 결정하는 한편, IV 및 VI인 공유제이트는 비공유제이션된 Fab-기반 불순물

의 약 30%를 함유하였다.

표 23: 계산된 질량과 비교하여, 다양한 알부민 바인더에 콘쥬게이션된 2개의 다른 Fab's의 LC-MS 데이터

알부민 바인더와 접합	화합물 번호	Fab 번호	발견된 m/z (M+H)	계산된 m/z (M+H)
II	0190	0120	49629	49629
III	0192	0120	49657	49657
IV	0193	0120	49427	49528
V	0191	0120	49543	49543
VI	0194	0120	49550	49550
II	0243	0228	48764	48765
III	0240	0228	48792	48793
IV	0242	0228	48663	48664
V	0244	0228	48678	48679
I	0241	0228	49053	49053

상기 실시예는 다양한 다른 알부민 바인더가 IgG1 및 IgG4 기원 둘 다의 Fab's에 좋은 수득율 및 순도로 콘쥬게이션될 수 있다는 것을 나타낸다.

상기 실시예는 다양한 다른 알부민 바인더가 IgG1 및 IgG4 기원 둘 다의 Fab's에 좋은 수득율 및 순도로 콘쥬게이션될 수 있다는 것을 나타낸다.

다양한 Fab's의 알부민 바인더 I과 콘쥬게이션

다음 Fab's가 콘쥬게이션되었다: 0118, 0119, 0127, 및 0147 (표 25 참조). 이들 Fab's는 C-말단에서, 또는 0157의 경우에, C-말단에 근접한, 언페어드 시스테인 잔기를 함유하였다. Fab's를 IgG1 또는 IgG4로부터 유도하였고 DR3 수용체에 결합하는 다른 클론 모두에 해당한다. 상기 설명된 방법에 따라 반응될 때, 콘쥬게이트는 LC-MS 데이터에 따라 좋은 수득율로 형성되었다.

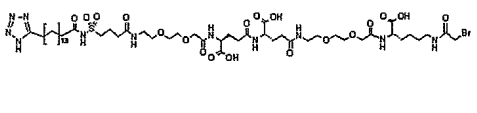
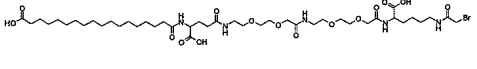
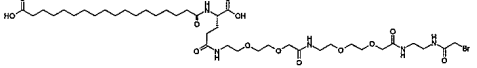
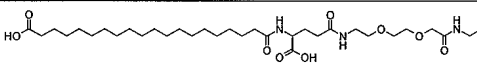
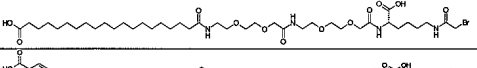
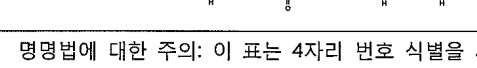
다음 MS 데이터를 얻었다 (표 24).

표 24: 계산된 질량과 비교하여, 알부민 바인더 I와 콘쥬게이션된 다양한 Fab's의 LC-MS 데이터

Fab와 접합	발견된 m/z (M+H)	계산된 m/z (M+H)
118	49947	49947
119	49408	49408
127	49712	49712
134	49975	49975
147	49409	49409
157	50169	50169

상기 실시예는 다양한 Fab's가 다른 알부민 바인더 분자에 좋은 수득율 및 순도로 콘쥬게이션될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0417] 표 25: PK 연구에 대하여 항-DR3 Fab 알부민 바인더 컨쥬게이트의 목록.

알부민 바인더 구조	내부 번호	지방산 길이	Fab에 접합됨	접합된 화합물 번호
	I	미적용	0120 0228 0118 0119 0127 0147	0153 0241 0189 0166
	II	C18	0120 0228	0190 0243
	V	C18	0120 0228	0191 0244
	III	C20	0120 0228	0192 0240
	IV	C20	0120 0228	0193 0242
	VI	미적용	0120	0194

명명법에 대한 주의: 이 표는 4자리 번호 식별을 사용한다 (예를 들어, 0228). 하지만, 같은 화합물에 대하여 다른 명명법이 관찰될 수 있다. 예를 들어, 화합물 0228은 또한 0227-0000-0228, 0227-0228, 00228, 또는 228로 명명된다. 이들 명명법 모두는 같은 화합물을 나타낸다. 이 규칙은 모든 화합물에 적용된다.

[0418]

[0419] 실시예 17

[0420] 주요 목적은 DBA/1 마우스에 iv 및 sc 투여 후 약물동력학적 파라미터를 특성화하는 것이고, 주요 초점은 Fab 단편을 변화시킨 후 연장도의 정도를 평가하기 위해 말단 반감기에 있다.

[0421] 연구 설계 및 방법

[0422] 두 연구의 결과는 본 요약에 포함된다 (DKPF111105 및 DKPF110703). 두 연구를 DBA/1 마우스에서 수행하였고, 마우스는 꼬리 정맥에서 정맥 내 (i.v.) 또는 사타구니에서 피하에 (s.c.) 투여되었다. 투여량은 Fab에 대하여 5 mg/kg 및 변형된 Fab에 대하여 1 mg/kg이었다. 스파스 (sparse) 샘플링 설계를 사용하였고, 3개의 혈액 샘플을 각 샘플링 시점에서 수거하였고, 샘플을 화합물에 의존적으로, 투여 후 7일까지 사전 투여량으로부터 수거하였다 (예를 들어, Fab를 테스트할 때 샘플은 투여 후 최대 7시간 동안 수거되는 반면, 콘쥬게이션된 Fab 샘플을 테스트할 때 투여 후 샘플은 최대 7일 동안 수거되었다)

[0423] 수거된 혈장 샘플을 모두 ELISA 검정을 사용하여 분석하였고, 간단히 플레이트를 hDR3-Fc 융합 단백질 (SEQ ID NO 7)로 코팅하였고, 희석된 혈액 샘플을 추가하였고 분석물 (Fab 또는 콘쥬게이션된 Fab)은 hDR3에 결합할 것이고, 결합된 분석물을 퍼옥시다제 표지된 항-Fab 항체에 의해 검출하였고, 표준 방법을 사용하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 혈장 농도 값에 기초하여, 약물동력학 파라미터를 상업적으로 이용 가능한 소프트웨어 Phoenix WinNonlin (Pharsight Corp.)를 사용하는, 표준 비-구획적 방법을 사용하여 평가하였다.

[0424] 결과

[0425] Fab의 말단 반감기를 연장하기 위해 여러 다른 결합자를 평가하였고, 알부민 결합 기술에 기초하여 여러 분자에 대하여 20시간 이상 Fab의 말단 반감기를 증가시키는 것이 가능했다 (표 26). Fab의 반감기를 1시간 미만인 것으로 추정하였으며, 이것은 모두 훨씬 더 긴 반감기를 나타내는 콘쥬게이션된 Fab와 비교하여 Fab의 차이를 설명한다 (표 26).

[0426] 표 26: 마우스에 iv 또는 sc 투여 후 약물동력학적 파라미터

연구	경로	항체	NNC	투여량 (mg/kg)	T _{1/2} (h)	MRT (h)	Cl (mL/h/kg)	F (%)
DKPF111105	iv	IgG1 (G1m17) 키메라 Fab wt Cys	0227-0000-0120-1A	5	0.8	0.2	158	-
DKPF111105	iv	알부민 바인더 결합자 0195-0000-3007 (FGF-21 결합자) C18+GLU를 갖는 0120	0227-0000-0190-1A	1	14	17	1.7	-
DKPF111105	iv	알부민 바인더 결합자 0186-0000-3007 (FGF-21 결합자) C20+GLU를 갖는 0120	0227-0000-0192-1A	1	21	25	1.9	-
DKPF111105	iv	알부민 바인더 결합자 0195-0000-3007 (FGF-21 결합자) C20+GLU를 갖는 0120	0227-0000-0193-1A	1	24	24	3.0	-
DKPF111105	iv	알부민 바인더 결합자 0194-0000-3032 (FGF-21 결합자) C18+GLU를 갖는 0120	0227-0000-0191-1A	1	16	18	1.8	-
DKPF111105	iv	알부민 바인더를 갖는 0120	0227-0000-0194-1A	1	7.2	9	4.3	-
DKPF111105	sc	IgG1 (G1m17) 키메라 Fab wt Cys	0227-0000-0120-1A	5	1.1	2.5	-	13
DKPF111105	sc	알부민 바인더 결합자 0186-0000-3007 (FGF-21 결합자) C20+GLU를 갖는 0120	0227-0000-0192-1A	1	27	37	-	31
DKPF111105	sc	알부민 바인더 결합자 0195-0000-3007 (FGF-21 결합자) C20+GLU를 갖는 0120	0227-0000-0193-1A	1	23	32	-	34
DKPF111105	sc	알부민 바인더 결합자 0194-0000-3032 (FGF-21 결합자) C18+GLU를 갖는 0120	0227-0000-0191-1A	1	19	27	-	52
DKPF111105	sc	알부민 바인더를 갖는 0120	0227-0000-0194-1A	1	32	-	-	34
DKPF110703	iv	알부민 바인더를 갖는 0120	0227-0000-0153-1A	1	25	30	1.1	-
DKPF110703	iv	Cys 내지 Ser을 갖는 0120	0227-0000-0124-2A	1	0.2	0.16	183	-
DKPF110703	iv	IgG1 (G1m17) 키메라 Fab wt Cys	0227-0000-0120-1A	1	0.4	0.31	181	-
DKPF110703	sc	알부민 바인더를 갖는 0120	0227-0000-0153-1A	1	24	40	-	55
DKPF110703	sc	Cys 내지 Ser을 갖는 0120	0227-0000-0124-2A	1	.	-	-	16
DKPF110703	sc	IgG1 (G1m17) 키메라 Fab wt Cys	0227-0000-0120-1A	1	.	-	-	22

[0427] T_{1/2}: 말단 반감기, MRT: 평균 잔류 시간, Cl: 제거; F: 생물학적 이용 가능성

[0428] 실시예 18:

[0429] 항-DR3 활성을 결정하는 방법으로서 인터페론-감마 방출의 관독

[0430] 신선한 사람 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 Ficoll (GE Healthcare, Cat# 17-5442-02)에서 2000 rpm으로 20분 동안 원심분리에 의해 혈액 버피 코트 (307 Hospital Blood Center of PLA; Beijing, PRC)로부터 분리하였다. DPBS로 세척 후, 세포 펠렛을 흡입하였고 플라스크에서 하룻밤 동안 배양을 위해 1×10^6 /ml로 사전 데워진 검정 배지 (RPMI 1640, 10% 열 불활성화된 FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신)에 재현탁하였다. 비점착성 림프구를 제거하였고 T 세포 동시 자극 검정에 사용하였다.

[0431] 동시 자극 검정을 위해, 재조합 사람 TL1A (12 μ g/mL)를 동시 자극물로서 50 μ l/웰로 에지를 제외한 모든 웰에 1차 자극제, 항-CD3 mAb (BD Pharmingen cat# 555336)로 0.3 μ g/mL에서 37°C 배양기에서 3시간 동안 사전 코팅된 건조 96 웰 U-바닥 검정 플레이트 (Corning costar 3799)에 추가하였다. 0.012 내지 12 μ g/mL의 범위의 4X 농축을 위해 96 웰 딥-웰 플레이트 (Nunc 278743)에서 1.5 mL/웰로 1:3 연속 적정에 이어서, 테스트하는 항-DR3 FAb (0170, 0171, 0173, 0169 & 0118)를 50 μ l/웰로 검정 플레이트에 둘로 옮겼다. 검정 플레이트에 2×10^5 세포/웰로 풍부한 림프구의 0.1 mL을 추가하였고, 0.2 mL/웰로 최종 부피를 가져왔다. 5% CO₂의 37°C 배양기에서 세포 배양의 40시간 후, IFN- γ ELISA 키트 (eBioscience Cat# 88-7316-88)로 시토킨 분비를 측정하기 위해 120mL 상층액을 배양 플레이트의 각각의 웰로부터 수확하였다. 제조사의 지시에 따라, 테스트하는 T 세포 검정에서 분비되는 시토킨의 전체 범위를 측정하기 위해 상층액을 1:20 희석하였다.

[0432] (173, 170 & 169) 역 돌연변이가 있거나 (171) 역 돌연변이가 없는 많은 사람화된 항-DR3 Fab를 건강한 기증자의 말초 혈액으로부터 1차 T 세포의 TL1A-동시 자극된 시토킨 분비를 억제하는 능력에 대하여 평가하였다.

[0433] 표 27에 나타난 바와 같이, 항-CD3 프라이밍은 중간 수준 (~50 ng/mL)의 IFN- γ 분비를 유발하였으며, 이것은 재조합 TL1A 동시 자극에 의해 3배 이상 (159 ng/mL)으로 향상되었다; 반면에 TL1A 단독 처리는 시토킨 방출의 최소량을 (1.2 ng/mL)발생시켰다. TL1A 동시 자극 조건 하에, 테스트하는 사람화된 항-DR3 FAb 모두는 항-CD3 프라이밍에 대한 최소의 효과로, 투여량-의존적 및 완벽한 방식으로 IFN- γ 분비를 억제하였다 (IC₅₀ ~0.01-0.03 μ g/mL). 다수의 기증자와 많은 실험으로부터 확인된 음성 대조군으로서, 비 리간드-차단 키메라 항-DR3 Fab 0118은 T 림프구의 TL1A 동시 자극에서 예상된 바와 같이 큰 효과를 나타내지 않았다. 다른 혈액 기증자와 또 다른 실험의 0171 및 0170 Fab의 두 번째 배치에서 유사한 결과를 얻었다.

[0434] 표 27: 건강한 혈액 기증자의 TL1A-동시 자극된 T 림프구의 IFN- γ 분비에 대한 사람화된 항-DR3 Fab의 효과

[μ g/mL]	IFN- γ (ng/mL)				
	cFab-0118	hFab-0169	hFab-0170	hFab-0171	hFab-0173
0	159 $\pm$ 38	159 $\pm$ 38	159 $\pm$ 38	159 $\pm$ 38	159 $\pm$ 38
0.003	132 $\pm$ 0.2	121 $\pm$ 0.2	131 $\pm$ 31	140 $\pm$ 8.2	160 $\pm$ 3.7
0.01	134 $\pm$ 0.3	138 $\pm$ 34	101 $\pm$ 64	105 $\pm$ 58	163 $\pm$ 0.5
0.03	158 $\pm$ 42	81 $\pm$ 26	108 $\pm$ 24	69 $\pm$ 10	95 $\pm$ 2.8
0.1	151 $\pm$ 0.1	58 $\pm$ 25	46 $\pm$ 27	52 $\pm$ 12	69 $\pm$ 18
0.3	124 $\pm$ 68	31 $\pm$ 0.1	51 $\pm$ 7.1	62 $\pm$ 0.3	62 $\pm$ 11
1.0	132 $\pm$ 55	55 $\pm$ 24	63 $\pm$ 4.7	40 $\pm$ 0.4	48 $\pm$ 3.1

$\pm$ 이후의 숫자는 측정의 표준 편차를 나타낸다.

[0435]

[0436] 실시예 19

[0437] 류머티스성 관절염 환자의 혈액에서 항-DR3 항체 Fab는 효과기 T 세포의 TL1A 동시 자극을 차단한다

[0438] 사람화된 항-DR3 Fab는 전술된 실시예에서 건강한 개인의 말초 혈액으로부터 분리된 1차 T 세포의 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 추가적으로, 일부 Fab's는 또한 그것들의 류머티스성 관절염 (RA) 환자로부터 유도된 혈액 T 세포의 효과기 기능을 차단하는 능력에 대하여 평가되었다. T 세포의 효과기 기능은 본 실시예에서 분석된 IFN- γ 분비를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 분비된 IFN- γ 의 수준을 실시예 18에 설명된 바와 같은 ELISA 키트에 의해 측정하였다.

[0439] 신선한 사람 혈액 (SF) 세포를 DMARD (Beijing University People's Hospital, PRC)의 관절 내 주사의 부산물 (폐기물)인 RA 환자의 무릎 관절 유동체로부터, 2000 rpm으로 10분 동안 원심분리에 의해, 분리하였다. 세포 펠렛을 흡입하였고 사전 데워진 검정 배지 (RPMI 1640, 10% heat inactivated FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신)에서 1×10^6 /mL로 재현탁하였다. 혈액 세포의 작은 샘플 ($\sim 10^5$ /0.1 mL)을 FACS 분석에 의해 T 림프구의 존재 (%)에 대하여 검사하였다. >5-10% 림프구 밀도의 RA/SF 세포 샘플을 T 세포 동시 자극 실험에 사용하였다.

[0440] 동시 자극 검정을 위해, 재조합 사람 TL1A (12 μ g/mL)를 동시 자극물로서 50 μ l/웰로 에지를 제외한 모든 웰에 1차 자극제, 항-CD3 mAb (BD cat# 555336)로 0.3 μ g/mL에서 37°C 배양기에서 3시간 동안 사전 코팅된 건조 96 웰 U-바닥 검정 플레이트 (Corning costar 3799)에 추가하였다. 0.012 내지 12 μ g/mL의 범위의 4X 농축을 위해 96 웰 딥-웰 플레이트 (Nunc 278743)에서 1.5 mL/웰로 1:3 연속 적정에 이어서, 테스트하는 항-DR3 Fab (0170, 0171, 0173 & 0118)를 50 μ l/웰로 검정 플레이트에 둘로 옮겼다. 검정 플레이트에 2×10^5 세포/웰로 RA/SF 세포의 0.1 mL을 추가하였고, 0.2 mL/웰로 최종 부피를 가져왔다. 5% CO₂의 37°C 배양기에서 세포 배양의 40시간 후, IFN- γ ELISA 키트 (eBioscience Cat# 88-7316-88)로 시토킨 분비를 측정하기 위해 120mL 상층액을 배양 플레이트의 각각의 웰로부터 수확하였다. 제조사의 지시에 따라, T 세포 검정에서 분비된 시토킨의 전체 범위를 측정하기 위해 적절한 희석 인자를 테스트하는 상층액에서 결정하였다.

[0441] 사람화된 항-DR3 Fab (171) 및 그것의 백본-돌연변이된 변이체 (173 & 170)를 그것들의 RA 환자의 무릎 관절로부터 혈액 T 세포의 TL1A-동시 자극된 시토킨 분비를 차단하는 능력에 대하여 평가하였다.

[0442] 표 28에 나타난 바와 같이, 항-CD3 프라이밍은 IFN- γ 분비의 중간 수준 (~ 1228 pg/mL)을 유발하였으며, 이것은 재조합 TL1A 동시 자극에 의해 약 2배 향상되었다 (~ 2188 pg/ml); 반면에 TL1A 단독 처리는 검출 가능한 시토킨 방출을 나타내지 않는다. TL1A 동시 자극 조건 하에, 3개의 테스트하는 사람화된 항-DR3 Fab는 항-CD3 프라이밍에 대한 최소의 효과로, 투여량-의존적 및 완벽한 방식으로 IFN- γ 분비를 억제하였다 (IC100 ~ 0.1 μ g/mL). 음성 대조군으로서, 비 리간드-차단 키메라 항-DR3 Fab 0118은 T 림프구의 TL1A 동시 자극에서 예상된 바와 같이 큰 효과를 나타내지 않았다. 다른 RASF 샘플로 5번의 실험의 0171 (3 배치) 및 0170 (2 배치) Fab 다른 배치에서 유사한 결과를 얻었다.

[0443] 표 28: 사람화된 항-DR3 FAb는 RA 환자의 SF 세포의 TL1A-동시 자극된 IFN- γ 분비를 억제한다

	IFN- γ (pg/mL)			
[μ g/mL]	cFab-0118	hFab-0170	hFab-0171	hFab-0173
0	2188 $\pm$ 255	2188 $\pm$ 255	2188 $\pm$ 255	2188 $\pm$ 255
0.003	2308 $\pm$ 639	1794 $\pm$ 366	1870 $\pm$ 80	1552 $\pm$ 195
0.01	2280 $\pm$ 0.4	1635 $\pm$ 370	1375 $\pm$ 248	1230 $\pm$ 248
0.03	2079 $\pm$ 368	1357 $\pm$ 331	1220 $\pm$ 0.4	1127 $\pm$ 122
0.1	2103 $\pm$ 0.0	1166 $\pm$ 0.2	1143 $\pm$ 65	1131 $\pm$ 82
0.3	2121 $\pm$ 75	1301 $\pm$ 0.1	1157 $\pm$ 180	992 $\pm$ 56
1	2232 $\pm$ 567	1249 $\pm$ 184	1232 $\pm$ 0.1	1062 $\pm$ 36

[0444]

[0445] 실시예 20

[0446] 항-DR3 FAb의 HX-MS에 의한 에피토프 매핑

[0447] HX-MS 기술은 단백질의 수소 교환 (HX)이 질량 분석법 (MS)로 쉽게 이어진다는 것을 이용한다. 수소를 함유하는 수성 용매를 중수소를 함유하는 수성 용매로 대체함으로써, 단백질의 특정 부위에 중수소 원자의 통합은 1 Da의 질량의 증가를 발생시킬 것이다. 이 질량 증가는 교환 반응의 킨치된 (킨치ed) 샘플에서 질량 분석법에 의해 시간의 함수로서 관찰될 수 있다. 중수소 표지 정보는 킨치 조건 하에 펩신 분해에 의해 단백질의 영역에 하위 국한될 수 있고 결과의 펩티드의 질량 증가에 따른다.

[0448] HX-MS의 한 사용은 단백질-단백질 복합체 형성시 환원된 수소 교환의 영역을 확인함으로써 분자의 상호작용에 수반되는 부위를 찾는 것이다. 보통, 결합 계면은 용매의 부피 변화 제외로 인해 수소 교환의 현저한 감소에 의해 나타날 것이다. 단백질-단백질 복합체 형성은 간단히 시간의 함수로서 각각의 결합 파트너의 존재 및 부재시 단백질 멤버에 통합되는 중수소의 총량을 측정함으로써 HX-MS에 의해 검출될 수도 있다. HX-MS 기술은 네이티브 성분, 즉, 단백질 및 항체 또는 Fab 단편을 사용하고, 용액에서 수행된다. 따라서 HX-MS는 생체 내 조건을 모방할 가능성을 제공한다 (HX-MS 기술에 대한 최근 재검토를 위해, Wales and Engen, Mass Spectrom. Rev. 25, 158 (2006) 참조).

[0449] 사용된 단백질 배치는:

[0450] hDR3: Fc (SEQ ID NO 7)에 융합된 hDR3의 전체 세포 외 도메인. 이 분자는 Fc의 다이머화로 인해 hDR3에 대한 다이머이다. 발현 배치는 또한 단백질의 올리고머화된 버전을 함유하지만, 정제된 다이머 분획만을 HX-MS 실험에 사용하였다.

[0451] Fab 분자: 0120, 0130, 0143, 0148, 0163, 0228, 0230 및 0231 (표 29 참조). 모든 단백질을 실험 전에 PBS pH 7.4로 버퍼 교환하였다.

[0452] 기기 장치 및 데이터 기록

[0453] HX 실험을 Synapt G2 질량 분석기 (Waters Inc.)에 결합된 HDX Technology (Waters Inc.)로 nanoACQUITY UPLC System에서 수행하였다. Waters HDX 시스템은 LeapShell 소프트웨어 (Leap Technologies Inc/Waters Inc.)에 의해 작동되는 Leap 로봇 (H/D-x PAL; Waters Inc.)을 함유하였으며, 이것은 중수소 교환 반응, 반응 시간 조절, 킨치 반응, UPLC 시스템에 주입 및 분해 시간 조절의 개시를 수행하였다. Leap 로봇은 버퍼 저장 및 HX 반응을 위해 20 °C로 유지되고 각각 단백질 및 킨치 용액의 저장을 위해 2 °C로 유지되는 2개의 온도 조절 스택 (stack)을 장착하였다. 게다가 Waters HDX 시스템은 전치 컬럼 (pre-column) 및 분석 컬럼, LC 튜빙 및 스위칭 밸브를 1 °C에서 유지하는 온도 조절 챔버를 함유하였다. 별도의 온도 조절 챔버는 펩신 컬럼을 25 °C로 유지한다. 인라인 펩신 분해를 위해 10개의 200 pmol hDR3을 함유하는 킨치된 샘플을 로딩하였고 100 μ L/분의 등용매 유속을 사용하여 25 °C에 배치된 Poroszyme® Immobilized Pepsin Cartridge (2.1 x 30 mm (Applied Biosystems))를 통과하였다 (0.1% 포름산:CH3CN 95:5). 결과의 펩티드를 트래핑하였고 VanGuard 전치 컬럼 BEH C18 1.7 μ m (2.1 x 5 mm (Waters Inc.))에서 탈염하였다. 이후에, 밸브를 스위치하여 전치 컬럼을 분석 컬럼, UPLC-BEH C18 1.7 μ m (1 x 100 mm (Waters Inc.))과 함께 인라인으로 배치하였고, 10-40% B의 9분 구배를 사용하여 분리된 펩티드는 nanoAQUITY UPLC 시스템 (Waters Inc.)으로부터 200 μ L/분으로 전달되었다. 이동상은 A: 0.1% 포름산 및 B: CH3CN 중의 0.1% 포름산으로 구성되었다. ESI MS 데이터, 및 별도의 향상된 에너지 (MSE) 실험을 Synapt G2 질량 분석기 (Waters Inc.)를 사용하는 양이온 모드에서 획득하였다. 연속체

(continuum) 모드에서 루신-엔케팔린을 잠금 집단 (lock mass) (m/z 556.2771에서 $[M+H]^+$ 이온)으로서 사용하였고 데이터를 수집하였다 (추가 설명을 위해, Andersen and Faber, Int. J. Mass Spec, 302, 139-148(2011) 참조).

[0454] 데이터 분석

[0455] Synapt G2 (Waters Inc.)의 이온 이동 성질을 이용하여 펩티드 및 단편이 추가로 정렬되는 경우 펩신의 펩티드를 표준 MSE 방법을 사용하는 별도의 실험으로 확인하였다. MSE 데이터를 ProteinLynx Global Server 버전 2.5 (Waters Inc.)를 사용하여 가공하였다. HX-MS 미가공 데이터를 DynamX 소프트웨어 (Waters Inc.)에서 가공하였다. DynamX는 자동적으로 잠금 집단-교정 및 중수소 통합 결정, 즉, 중수소화된 펩티드의 센트로이드 (centroid) 결정을 수행한다. 게다가, 모든 펩티드를 수동으로 점검하여 소프트웨어에 의한 올바른 피크 및 중수소화 배치를 확인하였다.

[0456] 에피토프 매핑 실험

[0457] 아미드 수소/중수소 교환 (HX)을 FAb 0120, 0130, 0143, 0148, 0163, 0228, 0230 또는 0231의 존재 또는 부재시 hDR3의 해당 중수소화된 버퍼 (즉, D2O에서 제조된 PBS, 96% D2O 최종, pH 7.4 (비교정 값))로 7배 희석에 의해 개시하였다. HX 반응 모두를 20°C에서 수행하였고 10 μ M Fab의 부재 또는 존재시 2 μ M hDR3을 함유하였고, 따라서 Fab의 5배 몰 초과를 제공한다. 10초 내지 3000초 범위의 적절한 시간 간격으로, HX 반응의 50 μ l 앨리퀀트를 50 μ l 아이스-콜드 (ice-cold) 킨치 버퍼 (1.35M TCEP)에 의해 킨치하며, 2.5 (비교정 값)의 최종 pH를 발생시켰다.

[0458] 결과 및 논의

[0459] 20개의 펩신의 펩티드의 HX 시간-경과는 hDR3 세포 외 도메인의 1차 구조의 75%를 커버하며, 0120, 0130, 0143, 0148, 0163, 0228, 0230 또는 0231 Fab의 부재 또는 존재시 10 내지 3000초 동안 관찰되었다. hDR3은 위치 N67 및 N106에서 2개의 N-글리코실화 부위를 함유하고 따라서 펩티드 매핑은 이 영역에서 갭 (gap)을 갖는다.

[0460] 초기 시점 (<300초)에서 관찰된 교환 패턴은 FAb 0120, 0130, 0143, 0148, 0163, 0228, 0230 또는 0231의 존재 또는 부재시 2개의 다른 그룹으로 나누어질 수 있다: 펩티드의 한 그룹은 Fab의 결합에 의해 영향을 받지 않는 교환 패턴을 나타낸다. 대조적으로, hDR3의 펩티드의 또 다른 그룹은 Fab 결합시 교환으로부터 보호를 나타낸다 (표 29). 펩티드에서 관찰된 교환 보호는 Fab 결합에 수반되는 이 영역을 나타낸다. 따라서 에피토프는 특이적 펩티드에 의해 한정된 영역 내에 부분적으로 위치하거나 전체가 위치할 수도 있다. 하지만, HX-MS의 해상도가 펩신의 펩티드에 기초하기 때문에, 특정 영역 내의 교환 보호는 영역 내에 있는 모든 잔기가 반드시 Fab 결합에 수반된다는 것을 의미하지 않는다.

[0461] 0148 및 0163의 에피토프 매핑

[0462] FAb 0148 및 0163은 hDR3에 결합하지만 TL1A 결합을 차단하지 않는 Fab 분자를 나타낸다. 이들 Fab 분자는 대조군에 대한 연구에 포함되었다. 에피토프 신호 전달을 Fab 0148에 대하여 CRD3의 영역 P140-L153에서 관찰하였다 (표 29). 현재 실험을 Fab의 5x 잉여으로 수행하였지만, 0148의 hDR3에 대한 등물비를 사용하는 HX-MS 실험은 이 Fab가 표준 등물 조건 하에서 매핑될 수 있다는 것을 확인한다.

[0463] Fab 0613에 대한 약한 에피토프 신호 전달을 CRD4 영역의 영역 G163-F169에서 부분적으로 및 영역 Y170-L184에서 부분적으로 관찰하였다.

[0464] 0120, 0130, 0143 및 0228의 에피토프 매핑

[0465] Fab 0228을 Fab 분자의 3-5x 잉여를 사용하는 여러 실험에서 매핑하였다. 에피토프 신호 전달을 CRD1의 영역 R32-G54, G37-L45 및 F46-A59에서 관찰하였다. 하지만, 펩신의 펩티드에서 교환 보호의 상대적인 수준 및 영역 F46-Y56에서 약한 또는 없는 교환 보호에 기초하여, 0228에 대한 에피토프가 영역 G37-L45 및 L57-A59에서 가장 강한 것으로 결론 내렸다. 영역 G37-L45는 또한 0228/0123의 hDR3에 결합에 중요한 돌연변이 유발에 의해 발견된 잔기를 커버하고 따라서 이들 실험의 데이터는 전체가 따른다 (실시예 12, 표 16). 놀랍게도, 그것은 hDR3에 비해 0228 Fab의 많은 잉여를 사용하는 것은 필수적이었다. 정상적으로, 그것은 HX-MS에 의해 에피토프 매핑을 수행할 때 mAb 또는 Fab의 등물비를 사용하기 위해 충분하다. 0228의 hDR3에 대한 등물비를 사용하는 경우, 0228이 매우 높은 친화도를 갖지만 에피토프 신호 전달은 관찰되지 않았다 (데이터 미도시) (실시예 11, 표 14). 이들 관찰은 0228 에피토프가 실험 조건 하에 완전히 접근 가능한 용매가 아닌 영역에 있다는 것을 나타낸다.

다. 따라서 0228의 높은 친화도에도 불구하고 낮은 교환 보호는 hDR3 자가-상호작용의 상단에 나타나는-또는 이와 경쟁하는-fab 분자의 결과일 수 있다. hDR3 자가-상호작용은 불특정 응집의 결과 또는, 예를 들어, TNFR 슈퍼-패밀리의 다른 멤버에 대하여 설명된 바와 같이 세포 외 도메인의 클러스터링의 결과일 수도 있다 (Mukai et al. (2010) Sci. Signal.3, ra83). 게다가, 약한 효과가 C-말단 영역에서 관찰될 수 있다. 0228 및 0120이 CRD1만을 함유하는 단백질에 결합할 때 완전한 친화도를 갖기 때문에 (실시예 11, 표 14), C-말단 효과는 대부분의 경우 Fab 결합시 구조적 재배열의 결과이고 DR3을 Fc에 융합하는 경첩 영역의 이동의 결과일 수도 있다.

[0466] SPR 실험으로부터 0120, 0130 및 0143 모두가 hDR3에 결합에 대하여 0228과 및 서로 경쟁한다는 것을 확립하였다 (실시예 11, 표 15). 따라서, 이들 Fab는 에피토프를 부분적으로 또는 완전히 공유한다.

[0467] , 이들 Fab에서 HX-MS는 또한 같은 영역 G37-L45에서 에피토프 신호 전달을 나타낸다. 하지만 교환 보호 정도는 더 약하다. 상기 관찰에 기초하여 클러스터링 계면에서 교환 보호를 나타내는 HX-MS를 갖기 위해 결합 분자의 높은 잉여를 갖는 것이 필요하고 그것은 높은 친화도 상호작용이어야 한다는 것을 추측할 수 있다.

[0468] 0230 및 0231의 에피토프 매핑

[0469] Fab 0230 및 0231에 대한 에피토프 매핑 (W02011 106707의 11H08)은 어떤 에피토프도 나타내지 않았다. hDR3에 대한 에피토프 매핑이 성공적이기 위해 좋은 친화도가 필요하다는 상기 설명된 관찰이 제공되는 경우 HX-MS에 의해 이들 Fab (W0201 1106707)의 상대적으로 불량한 친화도가 성공적인 에피토프 매핑을 막는다는 것으로 추측할 수 있다.

[0470] 표 29: Fab 분자에 대하여 DR3을 수득하는 에피토프 정보의 HXMS 분석. 중수소 교환 반응후, DR3는 분석된 다음 펩신의 펩티드 영역을 수득하는 펩신으로 분해된다. 위치 N67 및 N106은 글리코실화되고 따라서 펩티드 매핑은 이들 영역에서 겹을 갖는다. DR3 잔기의 번호 매기는 SEQ ID NO 1에 따른다.

서열	영역	0120	0130	0143	0148	0163	0228
		차단	차단	차단	비 차단	비 차단	차단
R32-G54	CRD1	EX	NA	NA	N	NA	EX
G37-L45	CRD1	W	W	W	N	N	EX
F46-Y56	CRD1	W/N	N	N	N	N	W/N
F46-A59	CRD1	EX/W	N	NA	N	N	EX
L71-F78	CRD2	N	N	N	N	N	N
L71-L79	CRD2	N	N	N	N	N	N
L79-E88	CRD2	N	N	N	N	N	N
L79-C89	CRD2	N	N	N	N	N	N
A80-C89	CRD2	N	N	N	N	N	N
V110-W121	CRD2/CRD3	N	N	N	N	N	N
V110-F122	CRD2/CRD3	N	N	N	N	N	N
V123-C130	CRD3	NA	N	N	N	N	N
V131-L142	CRD3	N	NA	N	N	N	N
P140-L153	CRD3	N	N	N	EX	N	N
D143-L153	CRD3	N	N	N	EX	N	N
L154-L166	CRD3/CRD4	N	N	N	N	N	N
L154-F169	CRD3/CRD4	N	N	N	N	W	N
G163-F169	CRD4	N	N	N	N	W	N
Y170-L184	CRD4	N/W	N	N	N	W	N/W
Y170-A193	CRD4	N/W	N	N	N	W	N/W

EX: 에피토프 영역을 나타내는 Fab 결합시 교환 보호 (> 0.4 Da).

W: Fab 결합시 약한 교환 보호 (0.2-0.4 Da).

N: Fab 결합시 교환 보호 안함 (< 0.2 Da).

NA: 각각의 실험에서 분석 불가능함.

[0471]

[0472] 하나 이상의 과제는 교환 보호의 정도에 관하여 둘 이상의 실험이 약간 다른 결과를 제공한다는 것을 나타낸다.

[0473] 실시예 21

[0474] 여기에 언급된 항체의 개요

[0475] 표 30 은 여기에 언급된 항체의 개요 및 사용된 다른 mAb/Fab 포맷에 의존적인 그것들의 네이밍 (naming)을 제공한다. 명명법에 대한 주의: 표 30은 4개의 숫자 식별법을 사용한다 (예를 들어, 0228). 하지만, 다른 명명법이 같은 화합물에 대하여 관찰될 수 있다. 예를 들어, 화합물 0228은 또한 0227-0000-0228, 0227-0228, 00228 또는 228로 명명된다. 이들 명명법 모두는 같은 화합물을 나타낸다. 이 규칙은 모든 화합물에 적용된다.

[0476] 표 30: 연구를 위해 선택된 항-DR3 및 Fab 화합물의 목록. 이 표는 mAb, Fab 및히브리도마 클론 번호 매기기 사이의 상호관계를 제공한다. 같은 줄의 화합물은 같은 CDR 영역을 갖고 같은 쥐 mAb로부터 유래하지만, 다른 포맷으로 제조되었다. 같은 컬럼의 화합물은 같은 분자적 포맷, 예를 들어, 화합물의 중 또는 이소타입을 공유하지만, 다른 쥐 mAb로부터 제조되었다.

히브리도마 번호	히브리도마 정제된 쥐 mAb	재조합 쥐 mAb	파파인 분할된 쥐 mAb의 Fab	재조합 쥐 Fab	키메라 Fab. 쥐 가변 도메인, 사람 IgG1 불변 도메인.	키메라 Fab. 쥐 가변 도메인, 사람 IgG4 불변 도메인.	키메라 Fab. 쥐 가변 도메인, 사람 IgG4 불변 도메인. 한지 Cys -> Ser	사람화된 Fab, IgG4	사람화된 Fab, IgG1	TL1A 결합 차단	SEQ ID NO
5F13	0025	0121		0140	0147	0149	0148			아니오	24, 25
27F16 또는 27F16A1	0070 또는 0083	0106		0110	0118	0125	0122			부분적으로	8, 9
27F38	0071									아니오	
27F44 또는 27F44A2	0072 또는 0084	0107	0087	0111	0119	0126	0123	0227, 0228 (S49A HC), 0229 (S49A HC, S60A LC)	0169, 0170, 0171, 0172, 0173, 0174, 0222, 0219 (S49A HC), 0226 (S49A HC, S60A LC)	예	10, 11, 16, 17
28F26 또는 28F26A3	0073 또는 0085	0108	0088	0112	0120	0127	0124			예	12, 13
28F69	0074									아니오	
29F6	0075									아니오	
29F8	0076 또는 0086	0116	0089							예	
30F1	0077		0091							아니오	
44F434				0128			0143			예	20, 21
44F478				0129			0144			부분적으로	
45F36				0130						예	18, 19

[0477]

45F187							0150 또는 0163			아니오	26, 27
45F243							0184 또는 0185			예	
45F284				0131			0145			부분적으로	
45F304				0132			0146			아니오	
46F108					0136					예	
46F147 또는 46F42					0135		0151			예	
46F164					0137					부분적으로	
46F172					0138					부분적으로	
46F186					0139					예	
48F312							0179			아니오	
49F23							0180			부분적으로	
50F1							0159			예	
50F3							0177			예	
50F62							0186			예	
50F134							0160			예	
50F141							0161			부분적으로	
50F142							0162			예	
50F189							0178			예	
50F191							0152			예	22, 23
50F213							0187			예	
11H08 (WO2011106 707)								0230 (H1L2) 0231 (H1L4)		예	14, 15
aTNP							0158*			이소타입 대조군, DR3에 결합 안 함	

* 이소타입 대조군 -DR3에 결합 안 함

[0478]

[0479] 실시예 22

[0480] 결합 실험

[0481] 재료 및 방법: 버피 코트를 Copenhagen Hospital의 정상 건강한 지원자로부터 얻었다. CD4+ T 세포를 마그네틱

비드 분리를 통해 분리하였다. 세포를 2 ng/ml IL-12, 50 ng/ml IL-18 및 100 ng/ml TL1A로 활성화하였고 (Novo Nordisk A/S에서 생산된 Flag-HIS-TEV-TL1A) 5일 동안 배양하였다. 제5 일에 세포를 항-DR3 mAb 클론 0072, 0073, 또는 0077의 10, 5, 1, 0.5, 0.1 또는 0.0001 µg/ml으로, 또는 Fab 단편 클론 0087, 0088 또는 0091으로 염색하였다. 2차 PE 콘주게이션된 염소-항-마우스 (H+L)를 검출에 사용하였다. 샘플은 2 배수였다. 염색 강도를 FACS에 의해 평가하였다.

[0482] 결과: 세포에 결합은 단클론성 IgG 클론 0077, 및 그것의 해당 Fab 클론 0091에 대하여 검출되지 않을 수 있다. 단클론성 IgG 클론 0072 및 0073은 1 µg/ml 이하의 농도에서 관찰된 최대 결합인 시토킨 활성화된 CD4+ T 세포에 강한 결합을 나타냈다. 해당 Fab 클론 (0087 및 0088)은 시토킨 활성화된 세포에 유사한 힘으로 결합하였지만, 약간 낮은 MFI 값을 결합 포화에서 기록하였다. Fab 처리된 세포와 비교하여 처리된 전체 길이 항체의 관찰된 더 큰 MFI 값은 2차 (검출) 항체 (항-IgG 중쇄 및 경쇄)가 전체 길이 IgG 항체 클론의 Fab 및 Fc 부분 둘 다에 결합하지만, Fab 클론의 Fab 부분에만 결합하기 때문인 것으로 예상되었다.

항체 또는 Fab 단편	검정에 사용된 농도	MFI
0072	1 µg/ml	1300b
0073	1 µg/ml	1300
0077	1 µg/ml	100
0087	1 µg/ml	500
0088	1 µg/ml	500
0091	1 µg/ml	100

[0483]

[0484] 표 31: 평균 형광 발광 강도 (MFI) 값은 제5 일에 IL-12/I L-18/TL1A 활성화된 세포에 대하여 나타났다. 세포는 단일항, 살아있는 CD4+ T 세포에서 조절된다.

[0485] 실시예 23

[0486] T 세포증식:

[0487] CD4+ T 세포를 CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 및 Histopaque (Sigma)를 사용하는 마그네틱 비드 분리를 통해 버피 코트로부터 분리하였다. T 세포 (96-웰 플레이트에서 2×10^5 세포/웰)를 항-TL1A (1000 ng/ml; MAB7441; RnDSYSTEMS) 또는 DR3 mAb 또는 DR3 FAb (5 또는 10 Mg/ml)와 함께 또는 없이 2 ng/ml IL-12, 50 ng/ml IL-18 및 100 ng/ml TL1A (Flag-HIS-TEV-TL1A; Novo Nordisk)로 5일 동안 활성화시켰다. 사용된 DR3 mAb는 0072, 0073 및 0077이었다. 사용된 DR3 FAb는 0087, 0088 및 0091이었다. 모든 샘플은 3 배수로 수행되었다. 세포증식을 티미딘 통합에 의해 측정하였다. 세포를 활성화의 5일 후에 [³H]티미딘을 적용하였고 16 시간 후 수확하였다. 통합된 티미딘을 Top Counter에 의해 분 당 계수 (cpm)로서 검출하였다.

[0488] 결과: T 세포증식은 TL1A로 동시 자극에 의해 3배 증가되었다. 이 TL1A-의존적 증가를 항-TL1A 중성화 대조군 항체로 동시-배양에 의해 차단하였다. 모든 항-DR3 mAb뿐만 아니라 Fab 0091은 증식을 10 µg/ml로 약간 억제하는 한편, Fab 0087 및 0088은 검정에 사용된 가장 낮은 농도로도 증식을 완벽히 차단하였다. 결론적으로, Fab 0087 및 0088은 CD4-양성 T-세포 증식의 TL1A-의존적 동시 자극을 하향 조절하는데 매우 효율적이다.

[0489] 유사한 실험에서, IL-12 (2 ng/ml), IL-18 (50 ng/ml) 및 100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A; Novo Nordisk) 처리된 CD4+ T 세포는 IL-12/IL-18 처리된 T 세포와 비교하여 6배 증가된 T 세포증식을 입증하였다. 0123 및 0124 FAb는 Fab의 0.16 µg/ml의 농도에서 유발된 T 세포증식을 완전히 차단하는 한편 해당 mAb 0072 및 0108은 T 세포증식에 영향을 미치지 않았다. 표 2에서 mAb 0072 및 해당 Fab 0123의 짝에 대한 데이터가 나타난다. 티미딘 통합에 의해 검출된 증식은 분 당 계수 (cpm)으로서 제공된다.

표 32:

처리	mAb 0072	Fab 0123
IL-12/IL-18	1629±109 cpm	1629±109 cpm
IL-12/IL-18+TL1A	10439±689 cpm	10439±689 cpm
IL-12/IL-18+TL1A+0.00128 µg/ml mAb 또는 Fab	10434±1132 cpm	5492±1330 cpm
IL-12/IL-18+TL1A+0.16 µg/ml mAb 또는 Fab	11886±984 cpm	2329±336 cpm
IL-12/IL-18+TL1A+10 µg/ml mAb 또는 Fab	10139±689 cpm	1619±109 cpm

표준 편차는 ± 이후의 숫자로 나타낸다.

항-DR3 Fab에 의해 영향을 받는 시토킨 방출

CD4 Rosettesep (Stem cell technologies) 및 Histopaque(Sigma)를 사용하는 마그네틱 비드 분리를 통해 버피 코트로부터 분리된 CD4 + T 세포를 TCR 활성화시, 100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A; Novo Nordisk)와 함께 또는 없이 시토킨 IL-12 (2 ng/ml), IL-18 (50 ng/ml)로 자극하였다. 활성화된 CD4+ T 세포 (2 x 10⁵ 세포/웰)의 상층액을 48시간 후 수확하였고 Bioplex에 의해 시토킨 방출에 대하여 분석하였다.

방출된 시토킨 IL-6, IFN γ , GM-CSF 및 TNF α 를 모두 48시간 후 IL-12/IL-18 처리된 CD4+ T 세포에 의해 유발하였다. IL-6, IFN γ , GM-CSF, TNF α 는 TL1A에 의해 16배 (p=0.05), 1.2 (p=0.02), 7.5배 (p=0.04), 4.4 (p=0.0007) 유발되었다. IL-6 (p=0.04), GM-CSF (p=0.04) 및 TNF α (p=0.0008)는 DR3 결합 비-차단 Fab 0091과 비교할 때, 모두 항-DR3 Fab 0124에 의해 크게 차단되었다 (표 33).

표 33:

시토킨 (평균±SEM)	IL-12/IL-18- 활성화된 CD4+ T 세포 (평균±SEM)	IL-12/IL-18- 활성화된 CD4+ T 세포 + TL1A (평균±SEM)	IL-12/IL-18- 활성화된 CD4+ T 세포 + TL1A+0124 (평균±SEM)	IL-12/IL-18- 활성화된 CD4+ T 세포 + TL1A+0091 (평균±SEM)
IL-6	361±145	5981±1918	698±282	9268±3564
IFN γ	4207±270	4893±400	4388±195	4945±516
GM-CSF	45±11	336±101	55±17	437±167
TNF α	23±2.3	102±3	24±2.5	121±21

표준 편차는 ± 이후의 숫자로 나타낸다.

실시예 24

크론병 환자의 장내 생검으로부터 분리된 점막고유층 단핵 세포를 사용하는 기능적 연구

크론병 환자의 장내 생검으로부터 분리된 점막고유층 단핵 세포 (LPMC) 대 비-IBD 대조군을 항-DR3 Fab 0124 및 비-차단 대조군 0091과 함께 및 없이 IL-12 (2 ng/ml), IL-18 (50 ng/ml) 및 100 ng/ml TL1A (Flag-His-TEV-TL1A; Novo Nordisk)로 활성화시켰다.

염증성 크론병 환자의 LPMC는 IFN γ 를 유발함으로써 IL-12/IL-18 + TL1A에 반응할 수 있고 IFN γ 의 TL1A-유발된 수준은 0124에 의해 크게 차단되었다 (p=0.0001, n=4), 표 34. 게다가 DR3 Fab 0124 및 0228은 IL-12/IL-18 자극된 TL1A 처리된 크론병 환자의 LPMC에 의해 GM-CSF, TNF- α , 및 IFN γ 분비를 억제한다.

[0501] 표 34:

시토킨 (평균±SEM)	IL-12/IL-18- 활성화된 LPMCs (평균 ±SEM, n=4))	IL-12/IL-18 활성화된 LPMCs + TL1A (평균 ±SEM, n=4)	IL-12/IL-18- 활성화된 LPMCs + TL1A+0124 (평균 ±SEM, n=4)
IFN γ	195±51	577±158	199±53

[0502]

도면

도면1a

SEQ ID NO 1: HDR3 (회색으로 나타난 신호 펩티드 1-14 및 막관통 도메인,

죽음 도메인 (DD)은 밑줄 그어져 있다)

1-417

MEQRPRGCAVAAAHLLVLLGARAQGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEP
CGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNSECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGCKPGWFVECQ
VSQCVSSSPFYQCPCLDGALHRHTRLLCSRRTDCGTCLPGFYEHDGCVSCPTSTLGSCPER
CAAVCGWRQMEWQVLLAGLWPLEGATLTYYRHCWPHKPLVTADAGMEALTPPPATHLSP
LDSAHTLLAPPDSSEKICTVQLVGNWTPGYPETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAAPTLSP
SPAGSPAMMLQGPQLYDVMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRW
RQQQPAGLGAVYAALERMGLDGCVEDLRSLRQGP

SEQ ID NO 2:

DR3 (CRD1) – Fc (밑줄 그어진 DR3 영역)

QGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLESKYGPPCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCVLKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVM
HEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO 3:

DR3 (CRD1+ A1) – Fc (밑줄 그어진 DR3 영역)

QGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNS
ECAESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO 4:

DR3 (CRD1+CRD2) – Fc (밑줄 그어진 DR3 영역)

QGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNS
ECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI

도면1b

SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
K

SEQ ID NO 5:

DR3 (CRD1+CRD2+A1) – Fc (밑줄 그어진 DR3 영역)

QGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNS
ECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGCKPGWFEQCVSQCVSSSPFYCQESKYGPCCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO 6:

GST-hDR3 (CRD1): (밑줄 그어진 DR3 영역)

SPILGWYKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQ
SMAIIRYIADKHNMLGGSPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRVIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMF
DRLSHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVSFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAW
PLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGSPEFQGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKA
PCTEPCGNSTCLEFPGRLERPHRD

SEQ ID NO 7:

hDR3-TEV-Fc (밑줄 그어진 DR3 영역)

QGGTRSPRCDACAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPCGNSTCLVCPQDTFLAWENHHNS
ECARCQACDEQASQVALENCASAVADTRCGCKPGWFEQCVSQCVSSSPFYCQPCLDGALHR
HTRLLCSRRDTCGTCLPGFYEHDGCVSCPTSTLGSCPERCAAVCGWRQENLYFQGESKYGP
PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

도면1c

SEQ ID NO 8:

27F16A1: 중쇄 - mlgG1 (볼드체로 표시된 CDR)
 EVQLVESGGDFVKPGGSLKLSAASGFTFN**NYGMSW**VRQTPDKRLEWAA**AISSGV**TYTYPD
 TVKGRFTISRDNAKNTLYLHMSSLKSEDTAMYYCGR**HDDYGNHFDY**WGQGTTLVSS

SEQ ID NO 9:

27F16A1: 경쇄-카파 (볼드체로 표시된 CDR)
 DIVMTQSPSSLAMSLGQRVTMNC**KSSQSL**LNSHNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLVYFASSRE**
 SGVPDRFIGSGSGTDFTLTIS**SVQAED**LADYFC**QQHYSTPFT**FGSGTKLEIKR

SEQ ID NO 10:

27F44A2/0072: 중쇄 - mlgG1 (볼드체로 표시된 CDR)
 EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSASGFAFS**NYDMSW**VRQTPEKRLEWAA**AFSSDGYTFYPDS**
 LKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLGSEDTALYCCAR**HADYANYPVMDY**WGQGTSTVSS

SEQ ID NO 11:

27F44A2/0072: 경쇄-카파 (볼드체로 표시된 CDR)
 DIVLAQSPASLLVSLGQRATIS**CRASKSVSTSGYS**MH**WYQQKPGQPPKLLIYLASNLE**SGVP
 ARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC**QHSRELPLT**FGAGTMLELKR

SEQ ID NO 12:

28F26A3/0073/0124: 중쇄 - mlgG2a (볼드체로 표시된 CDR)
 EVKVVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFV**SSYDMSW**VRQIPEKRLEWAA**AISSGDYYTYPDS**
 VKGRFTISRDDARNTLYLQMSSLRSEDTALYYCAR**HRGGNYPQYAMDY**WGQGTSTVSS

SEQ ID NO 13:

28F26A3/0073/0124: 경쇄-카파 (볼드체로 표시된 CDR)
 DILLTQSPASFAVSLGQRATIS**CRASKSVSTSGY**NY**HWYQQKPGQPPKLLIYLT**SNLESGVPA
 RFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC**QHSREL**PFTFGSGTKLEIKR

SEQ ID NO 14:

11H08 중쇄 (0230) - 밑줄로 표시된 CDR

도면1d

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTNYAMS~~SWWRQAPGQRLEWV~~STITSGGSYIYYLDSV
~~KGRFTISRDN~~AKSTLYLQMNSLRAEDTAVYNCARRKDGNYYYAMDYWGQGT~~TVTVSSASTKGPS~~
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~TV
 SSSLG~~TKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKR~~VESKYGPPS~~

SEQ ID NO 15:

11H08 경쇄 (0230) – 밑줄로 표시된 CDR

DIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSY~~GNSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNL~~ESGIPARFS
 GSGSRDFTLT~~ISSLPEDFATYYCQSYEDPWTF~~GGG~~TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT~~
 ASVVCLLN~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~DSTYLSSTLTLSKADYE~~KKHVVYA~~
 CEVTHQGLSSPVT~~KSFNRGEC~~

SEQ ID NO 16:

"0228 중쇄" (27F44A2/"0072"의 인간화 버전) : "S49A" 역 돌연변이를 포함 밑줄로 표시된 CDR):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS~~NYDMSWWRQATGKGLEWVA~~AFSSDGYTFY~~PGSV~~
~~KGRFTISR~~ENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCARHADYANYPVMDYWGQGT~~LVTVSSASTKGPS~~
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT~~SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV~~TV
 SSSLG~~TKTYTCNV~~DHKPSNTKVDKR~~VESKYGPPC~~

SEQ ID NO 17:

"0228 경쇄" (27F44A2/"0072"의 인간화 버전) – 밑줄로 표시된 CDR):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSGYSY~~MHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLES~~GVPSR
 FSGSGSGTDFLT~~ISSLPEDFATYYCQHSRELPLTF~~GGG~~TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG~~
 TASVVCLLN~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK~~DSTYLSSTLTLSKADYE~~KKHVVYA~~
 CEVTHQGLSSPVT~~KSFNRGEC~~

SEQ ID NO 18:

"0130 중쇄" (45F36) –밑줄로 표시된 CDR

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMS~~SWWRQSPDKRLEWVA~~EISSGDTYTYYPDTV
~~TGRFTISR~~DN~~AKKTLYLEMSGLR~~SEDTAMYYCARDREAYY~~GQQYVMDYWGQGT~~SVTVSS

SEQ ID NO 19:

"0130 경쇄" (45F36) – 밑줄로 표시된 CDR

도면1e

DIVLTQSPASLAVSLGLSVTISCRASESIEYSGTSFLQWYQQKPGQPPRLIYGSSTVESGVPARFS
GSGSGTDFSLNIHPVEEDDSAMYFCQQSRRLPWTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO 20:

"0143" 중쇄 (44F434) - 밑줄로 표시된 CDR

EVQLVESGGDLVMPGGSLKLSAASGFIFSSYGLSWIRQTPDKRLEWVAISGGDSYTYYPDSVK
GRFTISSDNAKNTLYLQMTSLKSEDTAMYYCATQREIYYGTYALDHWGQGTSTVTSS

SEQ ID NO 21:

"0143" 경쇄 (44F434) - 밑줄로 표시된 CDR

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNLYLNWYQQKPDGTVKLLIYTSRLQSGVPSRFSGSG
SGTDYSLTISSEQDDIATYFCQQGSPLPWTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO 22:

"0152" 중쇄 (50F191) - 밑줄로 표시된 CDR

EVQLVESGGGLVEPGGSLKLSAASGFTFSTYAMSWWRQSPKRELEWVAEISSGDSYTYYPDIVT
GRFTISRDDAKNTLFLEMSSLRSEDTAIYCVRDQDYRYDGYAMDHWGQGTSTVTSS

SEQ ID NO 23:

"0152" 경쇄 (50F191) - 밑줄로 표시된 CDR

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEHYGTSMLQWYQQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPAR
FSGRGSGPDFSLNIHPVEEDDIAMYYFCQQSRRLPWTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO 24:

"0148" 중쇄 (5F13 - 밑줄로 표시된 CDR)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKFSCAVSGFTFSSYVMSWWRQTPEKRLEWVAEISSDSTYTYLDSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARQTRSDAMDYWGQGTSTVTSS

SEQ ID NO 25:

"0148" 경쇄 (5F13 - 밑줄로 표시된 CDR)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARF
SGSGSRTDFTLTINPVEADDVAIYYCQQSNEDPLTFGAGTKLEIKR

SEQ ID NO 26:

"0163" 중쇄 (45F187 - 밑줄로 표시된 CDR)

도면1f

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTNYMAWVRKPPGKLEWLGFMRNIVNGYTTDYS
SVEGRFTISRDNQSILYLQMNALRPEDSATYYCARDIGYRYDGGGYGLDYWGQGTSTVTSS

SEQ ID NO 27:

"0163" 경쇄 (45F187 - 밑줄로 표시된 CDR)

DIQMTQSPASLSASVGETVTLTCRASGNIHNYLTWYQQKQGKSPQLLVNVKTLADGVSSRFSGS
GSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQHFWITPYTFGGGKLEIRR

SEQ ID NO 28:

0072, hz0072 (VH)의 본 사람화 구조로 - 볼드체 표시된 CDR

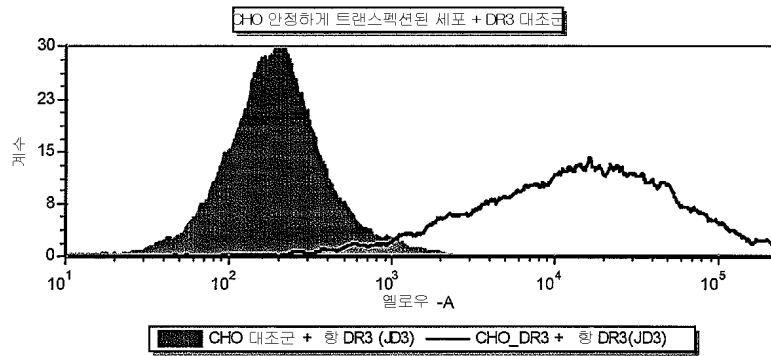
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWVRQATGKGLEWWSAFSSDGYTFYPGSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAGDTAVYYCARHADYANYPVMDYWGQGTSTVTSS

SEQ ID NO 29:

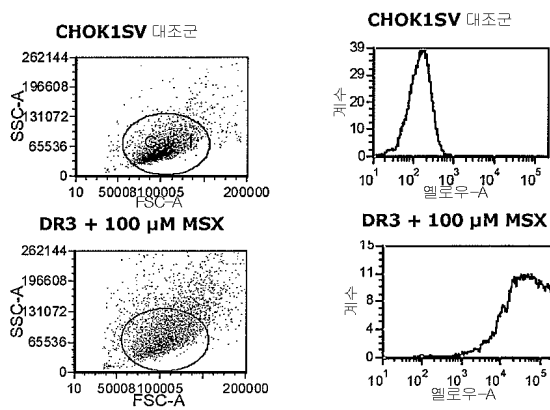
0072, hz0072 (VL)의 본 사람화 구조로 - 볼드체 표시된 CDR

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTSGYSYMHYQQKPGKAPKLLIYLASNLES
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHSRELPLTFGGGKVEIK

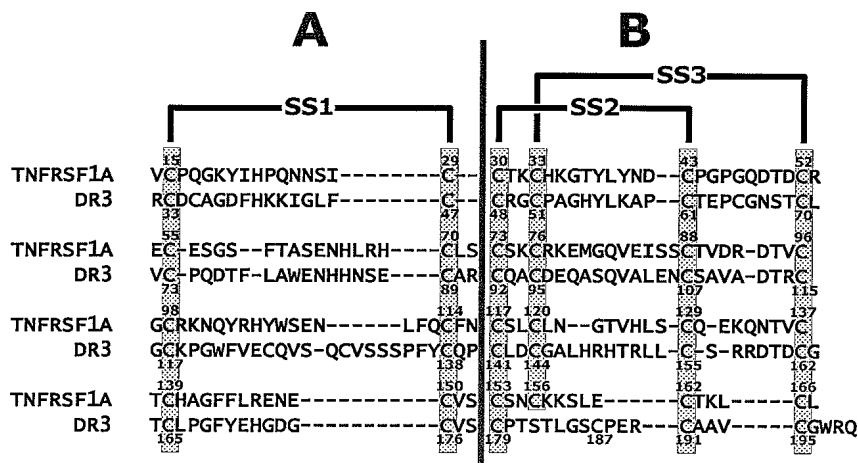
도면2



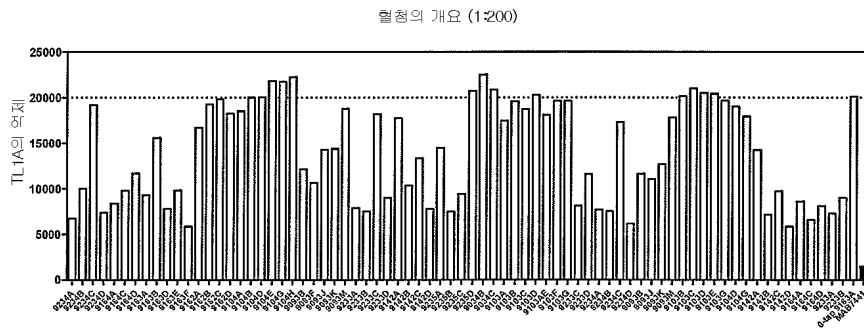
도면3



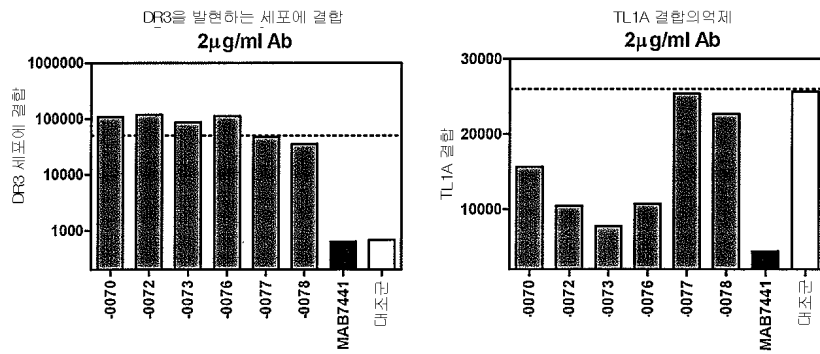
도면4



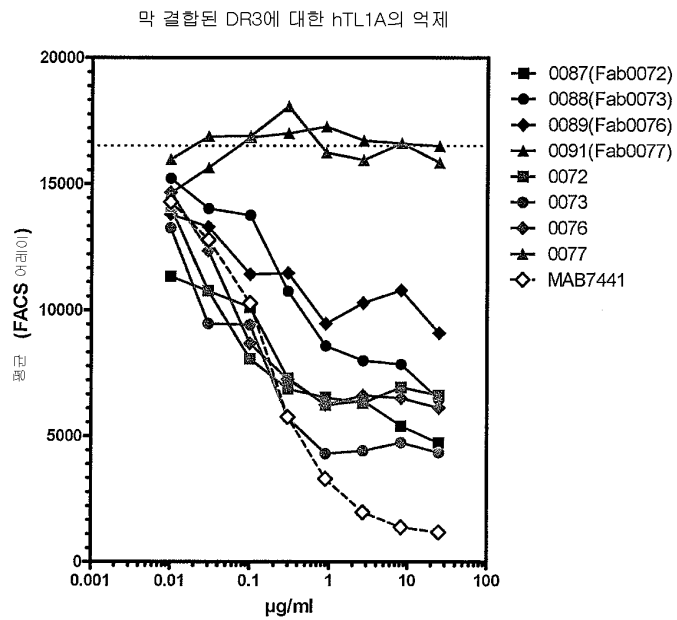
도면5



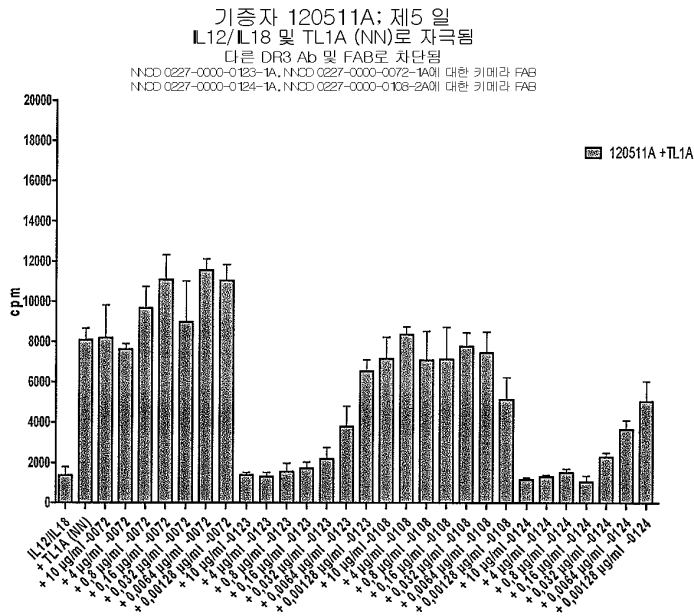
도면6



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Antagonistic DR3 ligands

<130> 8309

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 417

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys

35 40 45

Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro

50 55 60
 Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala
 65 70 75 80
 Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp
 85 90 95
 Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp

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

 165 170 175
 Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala
 180 185 190
 Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala
 195 200 205
 Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr
 210 215 220
 Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly

 225 230 235 240
 Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp
 245 250 255
 Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys
 260 265 270
 Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr
 275 280 285
 Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro

 290 295 300

Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser
 305 310 315 320
 Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr
 325 330 335
 Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg
 340 345 350
 Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile
 355 360 365
 Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln
 370 375 380
 Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met
 385 390 395 400
 Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly
 405 410 415
 Pro

<210> 2

<211> 276

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hDR3 (CRD1):Fc fusion

<400> 2

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

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
85 90 95
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
100 105 110
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
115 120 125
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
130 135 140
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
145 150 155 160
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
165 170 175
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
180 185 190
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
195 200 205
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
210 215 220
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
245 250 255
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
260 265 270
Ser Leu Gly Lys
275
<210> 3
<211> 295
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> DR3 (CRD1+ A1):Fc fusion
<400> 3

Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His
1 5 10 15
Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr
20 25 30
Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val
35 40 45
Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu
50 55 60
Cys Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
65 70 75 80
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
85 90 95
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
100 105 110
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
115 120 125
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
130 135 140
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
145 150 155 160
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
165 170 175
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
180 185 190
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
195 200 205
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
210 215 220
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
225 230 235 240
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

245 250 255
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
260 265 270
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

275 280 285
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

290 295
<210> 4
<211> 321
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> DR3 (CRD1+CRD2):Fc fusion

<400> 4
Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His
1 5 10 15
Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr
20 25 30
Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val

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

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

145 150 155 160
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val

 165 170 175
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

 180 185 190
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys

 195 200 205
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

 210 215 220
Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

225 230 235 240
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

 245 250 255
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

 260 265 270
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys

 275 280 285
Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

 290 295 300
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

305 310 315 320
Lys

<210> 5

<211> 344

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> DR3 (CRD1+CRD2+A1):Fc fusion

<400> 5

Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His

1 5 10 15

Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr

20 25 30

Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val

35 40 45

Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu

50 55 60

Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu

65 70 75 80

Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly

85 90 95

Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe

100 105 110

Tyr Cys Gln Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala

115 120 125

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

165 170 175

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

180 185 190

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

195 200 205

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

210 215 220

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

225 230 235 240

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

245 250 255

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

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

275 280 285
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

290 295 300

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe

305 310 315 320

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys

325 330 335

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

340

<210> 6

<211> 287

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> GST-hDR3 (CRD1)

<400> 6

Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr

1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr

20 25 30

Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly

35 40 45

Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu

50 55 60

Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met

65 70 75 80

Leu Gly Gly Ser Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly

85 90 95

Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys

100 105 110

Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met

115 120 125
 Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Ser His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly
 130 135 140
 Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val
 145 150 155 160
 Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val
 165 170 175
 Ser Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu

180 185 190
 Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr
 195 200 205
 Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg Gly
 210 215 220
 Ser Pro Glu Phe Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala
 225 230 235 240
 Gly Asp Phe His Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro

245 250 255
 Ala Gly His Tyr Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser
 260 265 270
 Thr Cys Leu Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp
 275 280 285

<210> 7

<211> 411

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hDR3-TEV:Fc fusion

<400> 7

Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His
 1 5 10 15

Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr

20	25	30
Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val		
35	40	45
Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu		
50	55	60
Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu		
65	70	75
		80
Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly		
85	90	95
Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe		
100	105	110
Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg		
115	120	125
Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly		
130	135	140
Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu		
145	150	155
Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Glu		
165	170	175
Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro		
180	185	190
Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
195	200	205
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
210	215	220
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn		
225	230	235
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
245	250	255
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
260	265	270

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 275 280 285
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 290 295 300
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 305 310 315 320
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 325 330 335

 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 340 345 350
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 355 360 365
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 370 375 380
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 385 390 395 400

 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 405 410

 <210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> 27F16A1: HC - mIgG1
 <400> 8

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

 35 40 45
 Ala Ala Ile Ser Ser Gly Val Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu His Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Gly Arg His Asp Asp Tyr Gly Asn His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 114

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 27F16A1: LC - kappa

<400> 9

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

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

100 105 110
Lys Arg

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 27F44A2/"0072": HC-mIgG1

<400> 10

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ala Phe Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 27F44A2/"0072": LC-kappa

<400> 11

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Glu Leu Lys Arg

100 105 110

<210> 12

<211> 122

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 28F26A3/"0073"/"0124":HC-mIgG2a

<400> 12

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

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 28F26A3/"0073"/"0124": LC-kappa

<400> 13

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Asn Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 14

<211> 227

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> 11H08 H1 (0230)

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Leu Asp Ser Val

50 55 60

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

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

 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Ser
 225
 <210> 15
 <211> 218

 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> 11H08 L2 (0230)
 <400> 15
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Gly Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 16

<211> 226

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> "0228 heavy chain" (humanized version of 27F44A2/"0072"): incl.

the "S49A" back mutation

<400> 16

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

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

65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
Arg His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

 130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

 195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
Pro Cys

225

<210> 17

<211> 218

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> "0228 light chain" (humanized version of 27F44A2/"0072")

<400> 17

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

<210> 18

<211> 123

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> "0130 heavy chain" (45F36)

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Asp Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

50

55

60

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

65 70 75 80

Leu Glu Met Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Glu Ala Tyr Tyr Gly Gln Gln Tyr Val Met Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> "0130 light chain" (45F36)

<400> 19

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

1 5 10 15

Leu Ser Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Glu Tyr Ser

20 25 30
 Gly Thr Ser Phe Leu Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ser Ser Thr Val Glu Ser Gly Val Pro Ala

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

<210> 20
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> artificial

<220><223> "0143" heavy chain (44F434)

<400> 20
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Met Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

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

115

120

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> "0143" light chain (44F434)

<400> 21

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50

55

60

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

65 70 75 80

Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Pro Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 22

<211> 123

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> "0152" heavy chain (50F191)

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
Ala Glu Ile Ser Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ile Val
50 55 60

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

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> "0152" light chain (50F191)

<400> 23

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

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

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> "0148" heavy chain

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Asp Ser Thr Tyr Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Thr Arg Ser Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220>

><223> "0148" light chain

<400> 25

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

<210> 26

<211> 126

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> "0163" heavy chain

<400> 26

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

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

65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Asp Ile Gly Tyr Arg Tyr Asp Gly Gly Gly Tyr Gly
100 105 110
Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> "0163" light chain

<400> 27

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr

20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Asn Val Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg Arg

100 105

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> The basic humanization construct of 0072, hz0072 (VH)

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu

65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
 Arg His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 29
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> The basic humanization construct of 0072, hz0072 (VL)

<400> 29
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30
 Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95
 Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110