(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월20일
(11) 등록번호 10-1830181
(24) 등록일자 2018년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7027973
(22) 출원일자(국제) 2011년03월30일
심사청구일자 2016년03월23일
(85) 번역문제출일자 2012년10월25일
(65) 공개번호 10-2013-0009999
(43) 공개일자 2013년01월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/030469
(87) 국제공개번호 WO 2011/123507
국제공개일자 2011년10월06일
(30) 우선권주장
61/319,260 2010년03월31일 미국(US)
61/341,458 2010년03월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100021569 A*
Journal of Allergy and Clinical Immunology. Vol. 120, No. 6, pp. 1324-1331 (2007)
WO2009136976 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국, 펜실베니아주 19044, 호샴, 릿지뷰 드라이브 800
(72) 발명자
알마그로 주앙 카를로스
미국 매사추세츠주 02446 #5 하버드 애비뉴 44
브래니건 패트릭
미국 펜실베니아주 19087 래드너 킹 오브 프러시아 로드 145
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 26 항 심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 **인간화 IL-25 항체**

(57) 요 약

본 발명은 인간 IL-25의 특정 에피토프에 결합하는 표적 결합 구성원(예를 들어, 항체)에 관한 것이다. 또한 본 발명은 하나 이상의 인간화 항체 VL 도메인 서열을 포함하고 IL-25에 결합하는 표적 결합 구성원(예를 들어, 항체)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 IL-25에 결합하는 표적 결합 구성원(예를 들어, 항체)을 포함하는 조성물, 그러한 표적 결합 구성원의 제조 방법, 및 질환 및 병태(예를 들어, 천식, 염증성 장질환)의 치료 또는 예방에 있어서의 그러한 표적 결합 구성원의 용도에 관한 것이다.

(72) 발명자

케인 콜린

미국 펜실베니아주 19087 래드너 킹 오브 프러시아 로드 145

스트롤 윌리엄

미국 펜실베니아주 19087 래드너 킹 오브 프러시아 로드 145

타우드테 수잔

미국 펜실베니아주 19087 래드너 킹 오브 프러시아 로드 145

토어네타 마크

미국 펜실베니아주 19087 래드너 킹 오브 프러시아 로드 145

휠러 존

미국 펜실베니아주 19087 래드너 킹 오브 프러시아 로드 145

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 아미노산 서열 SASQGISNYLN (서열 번호 6)을 갖는 CDR1, 아미노산 서열 YTSSLHS (서열 번호 7)를 갖는 CDR2 및 아미노산 서열 QQYLAFPYTF (서열 번호 8)를 갖는 CDR3을 포함하는 항체 VL 도메인; 및

b) 아미노산 서열 GYTMN (서열 번호 10)을 갖는 CDR1, 아미노산 서열 LINPYNGGTSYNQNFKG (서열 번호 11)를 갖는 CDR2 및 아미노산 서열 EDYDGYLYFAMDY (서열 번호 12)를 갖는 CDR3을 포함하는 항체 VH 도메인을 포함하는, IL-25에 결합하는 표적 결합 구성원.

청구항 2

제1항에 있어서,

서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 서열 번호 17의 아미노산 잔기 66-84 및 서열 번호 17의 아미노산 잔기 129-135로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열에 결합하는 표적 결합 구성원.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열 번호 17의 아미노산 잔기 56-63 및 서열 번호 17의 아미노산 잔기 66-74에 결합하는 표적 결합 구성원.

청구항 4

제1항에 있어서, VL 도메인은 서열 번호 5의 서열을 포함하는 표적 결합 구성원.

청구항 5

제1항에 있어서, VH 도메인은 서열 번호 9의 서열을 포함하는 표적 결합 구성원.

청구항 6

제1항에 있어서, 항체 불변 영역을 포함하는 표적 결합 구성원.

청구항 7

제6항에 있어서, 항체 불변 영역은 IgG1 불변 영역 또는 IgG4 불변 영역인 표적 결합 구성원.

청구항 8

제1항에 있어서, 전 항체를 포함하는 표적 결합 구성원.

청구항 9

제1항에 있어서, Fab 항체 단편, $F(ab')_2$ 항체 단편 및 scFv 항체 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 단편을 포함하는 표적 결합 구성원.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 표적 결합 구성원을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 11

프로모터에 작동가능하게 연결된 제10항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 12

제11항의 발현 벡터를 갖는 숙주 세포.

청구항 13

표적 결합 구성원의 제조를 위한 조건 하에 제12항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 표적 결합 구성원을 제조하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 표적 결합 구성원을 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 표적 결합 구성원을 적어도 하나의 추가의 성분을 포함하는 조성물로 조제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 표적 결합 구성원 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 천식, 염증성 장질환, 궤양성 대장염 또는 크론병(Crohn's disease)의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 동결건조된 분말을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 18

유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 표적 결합 구성원을 포함하는, 천식의 치료 또는 예방용 약제.

청구항 19

유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 표적 결합 구성원을 포함하는, 염증성 장질환의 치료 또는 예방용 약제.

청구항 20

유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 표적 결합 구성원을 포함하는, 궤양성 대장염의 치료 또는 예방용 약제.

청구항 21

유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 표적 결합 구성원을 포함하는, 크론병의 치료 또는 예방용 약제.

청구항 22

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 천식의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 표적 결합 구성원.

청구항 23

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 염증성 장질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 표적 결합 구성원.

청구항 24

제23항에 있어서, 염증성 장질환은 궤양성 대장염 또는 크론병인 표적 결합 구성원.

청구항 25

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-25에 대한 결합 친화도가 50 pM 이하인 표적 결합 구성원.

청구항 26

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항체를 포함하는 표적 결합 구성원.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

발명의 설명

배 경 기 술

[0001] IL-17E로도 공지된 인터류킨-25(IL-25)는 IL-17 사이토카인 패밀리에 속하는 사이토카인이며, 제2형 헬퍼(helper) T 세포(Th2) 및 비만 세포에 의해 분비된다. IL-25는 다수의 조직에서 IL-4, IL-5 및 IL-13을 포함하는 다른 사이토카인의 생성을 유도하며, 호산구의 확장을 자극한다.

[0002] IL-25는 위장관과 결부된 만성 염증에 연루되어 있으며, IL-25 유전자는 염증성 장질환(inflammatory bowel disease; IBD)과 같은 장의 자가면역 질환과 결부된 염색체 영역에서 확인되었다. IBD의 치료를 위한 통상적인 요법은 항생제 또는 스테로이드 유도된 약물을 포함하지만; 상기 요법은 환자에 있어서 임상 관해를 유도하거나 또는 유지하는 데 있어서 현재 성공적이지 못하다.

[0003] 또한 IL-25는 전세계적으로 3억명의 사람들에게 영향을 주는 것으로 추정되는 병태인 천식에 걸린 환자 유래의 샘플에서 상향조절되는 것으로 밝혀졌으며, 이는 이 사이토카인의 과발현이 천식 및 관련 병태의 병상에 기여함을 시사한다.

[0004] 따라서, 천식 및 염증성 장질환을 비롯하여 IL-25 과발현을 특징으로 하는 질환 및 병태의 치료에 유용한 IL-25

의 효과적인 길항제에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 인터류킨 25(IL-25)에 대하여 유도된, 항체 및 그 결합 단편을 포함하는 표적 결합 구성원에 관한 것이다.

[0006] 또한 본 발명은 본 명세서에서 용어 "huDDG91" 및 "M9"를 사용하여 또한 지칭되는, 쥐과 2C3 항체의 인간화(CDR-그래프팅) 버전인 RH2.5_R71V의 변이체에 관한 것이다. 하나의 그러한 변이체는 본 명세서에서 "M6 항체" 또는 "M6"으로 지칭된다. M6은 시험관 내에서 그리고 생체 내에서 다수의 유익한 특성을 나타내며, 이는 예를 들어 모(parent) huDDG91 항체에 비하여, IL-25에 대한 향상된 결합 친화성, 모 huDDG91 항체에 비하여 수용체 및 세포 기반 분석법에서 IL-25 수용체를 저해하는 개선된 능력 및 다른 특징, 예를 들어 높은 발현 수준, 높은 용해성, 정제시에 상당한 단백질 응집의 결여, 및 원하지 않는 번역 후 변경, 단백질-단백질 상호작용 및 정제시의 산화의 부재를 포함한다.

[0007] 일 실시 형태에서, 본 발명은 IL-25에 결합하는 표적 결합 구성원에 관한 것이며, 여기서 표적 결합 구성원은 서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 서열 번호 17의 아미노산 잔기 66-84 및 서열 번호 17의 아미노산 잔기 129-135로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열에 결합한다. 특정 실시 형태에서, 본 발명의 표적 결합 구성원은 서열 번호 17의 아미노산 잔기 56-63 및 서열 번호 17의 아미노산 잔기 66-74에 결합한다. 다른 실시 형태에서, 표적 결합 구성원은 아미노산 서열 QQYLAFPYTF(서열 번호 8)를 갖는 CDR3을 포함하는 항체 VL 도메인을 포함한다.

[0008] 다른 실시 형태에서, 본 발명은

[0009] a) 아미노산 서열 SASQGISNYLN (서열 번호 6)을 갖는 CDR1, 아미노산 서열 YTSSLHS (서열 번호 7)를 갖는 CDR2 및 아미노산 서열 QQYLAFPYTF (서열 번호 8)를 갖는 CDR3을 포함하는 항체 VL 도메인; 및

[0010] b) 아미노산 서열 GYTMN (서열 번호 10)을 갖는 CDR1, 아미노산 서열 LINPYNGGTSYNQNFKG (서열 번호 11)를 갖는 CDR2 및 아미노산 서열 EDYDGYLYFAMDY (서열 번호 12)를 갖는 CDR3을 포함하는 항체 VH 도메인을 포함하는, IL-25에 결합하는 표적 결합 구성원에 관한 것이다.

[0011] 특정 실시 형태에서, 표적 결합 구성원은 서열 번호 5의 서열을 포함하는 VL 도메인 및 서열 번호 9의 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 추가의 실시 형태에서, 표적 결합 구성원은 전 항체를 포함한다.

[0012] 다양한 실시 형태에서, 본 발명은 또한 본 발명의 표적 결합 구성원을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산, 그러한 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 그러한 발현 벡터를 갖는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0013] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 표적 결합 구성원의 제조 방법에 관한 것이며, 본 방법은 본 발명의 숙주 세포를 표적 결합 구성원의 제조를 위한 조건 하에 배양하는 단계를 포함한다.

[0014] 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 표적 결합 구성원 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0015] 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상에서 질환 또는 병태를 치료하거나 또는 예방하는 방법을 포함하며, 이는 천식 및 염증성 장질환을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0016] 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 천식(알러지성 천식을 포함함) 및 염증성 장질환(예를 들어, 크론병(Crohn's disease) 및 궤양성 대장염)과 같은 염증성 병태를 포함하는 질환 또는 병태의 치료에 있어서의, 예를 들어 약학 조성물 형태의 본 발명의 표적 결합 구성원의 용도를 제공한다.

[0017] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 IL-25에의 결합에 대하여 서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 서열 번호 17의 아미노산 잔기 66-84 및 서열 번호 17의 아미노산 잔기 129-135로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열에 결합하는 표적 결합 구성원과 경쟁하는 표적 결합 구성원에 관한 것이다. 특정 실시 형태에서, 표적 결합 구성원은 인간 IL-25에 대한 결합 친화도가 약 50 pM 이하이다.

[0018] 본 발명은 또한 다른 실시 형태에서 하기를 포함하는 본 발명의 표적 결합 구성원에 관한 것이다:

[0019] a) 서열 번호 5의 아미노산 서열에 비하여 1 내지 약 20개 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 항체 VL 도메인;

[0020] b) 서열 번호 9의 아미노산 서열에 비하여 1 내지 약 20개 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 항체 VH 도메인; 또는

[0021] c) 그 조합.

[0022] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 표적 결합 구성원을 제조하는 방법을 제공하며, 이는

[0023] (a) VL 도메인을 코딩하는 핵산 (여기서, 상기 핵산은 대체되는 CDR3 코딩 영역을 포함하거나 또는 CDR3 코딩 영역이 결여됨)의 출발 레퍼토리(starting repertoire)를 제공하는 단계;

[0024] (b) 출발 레퍼토리를 아미노산 서열 QQYLAFPYTF (서열 번호 8)를 갖는 VL CDR3을 코딩하는 도너(donor) 핵산 (여기서, 상기 도너 핵산은 상기 레퍼토리 내의 하나 이상의 핵산 내로 삽입되어 아미노산 서열 QQYLAFPYTF (서열 번호 8)를 갖는 VL CDR3을 포함하는 VL 도메인을 코딩하는 핵산의 생성물 레퍼토리(product repertoire)를 제공함)과 조합하는 단계;

[0025] (c) 생성물 레퍼토리의 핵산을 발현시켜 표적 결합 구성원을 제공하는 단계;

[0026] (d) 서열 번호 17의 아미노산 잔기 56-63, 서열 번호 17의 아미노산 잔기 66-74 및 서열 번호 17의 아미노산 잔기 129-135로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 서열에 특이적으로 결합하는 표적 결합 구성원을 선발하는 단계; 및

[0027] (e) 표적 결합 구성원 또는 상기 표적 결합 구성원을 코딩하는 핵산을 회수하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 본 특허 또는 출원 파일은 컬러로 제작된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 컬러 도면(들)을 포함하는 이 특허 또는 특허 출원 공개의 복사본은 요청시에 그리고 필요한 납부금의 지불시에 미국 특허청에 의해 제공될 것이다.

<도 1>

도 1은 huDDG91/ RH2.5_R71V 항체의 카파 경쇄 뉴클레오티드(서열 번호 1) 및 아미노산(서열 번호 2) 서열을 나타낸다. 아미노산 서열에서의 밑줄은 CDR을 나타낸다. 리더(Leader) 서열은 포함되지 않는다.

<도 2>

도 2는 huDDG91/ RH2.5_R71V 항체의 중쇄 뉴클레오티드(서열 번호 3) 및 아미노산(서열 번호 4) 서열을 나타낸다. 아미노산 서열에서의 밑줄은 CDR을 나타낸다. 리더 서열은 포함되지 않는다.

<도 3>

도 3은 huDDG91/ RH2.5_R71V 항체를 기반으로 하는 25-구성원 조합 라이브러리의 스크리닝에 의해 확인된, M6을 포함하는 9가지의 후보 단클론 항체의 특성을 예시하는 표이다. 이탤릭체는 상이한 데이터 세트로부터 얻어진 수를 나타낸다. R71V G1은 huDDG91 항체를 말한다. R71V G1의 두 열은 두 상이한 데이터 세트로부터의 측정치를 나타낸다. 소수성이 증가된 잔기는 황색으로 강조되어 있다.

<도 4a>

도 4a는 M6 항체의 경쇄(서열 번호 5) 및 그의 CDR(서열 번호 6-8)의 아미노산 서열을 나타낸다. 아미노산 서열에서의 밑줄은 CDR의 위치를 나타낸다. 리더 서열은 포함되지 않는다. 볼드 레드 폰트(bold red font)의 아미노산 잔기는 모(parental) huDDG91/ RH2.5_R71V 서열에 대한 아미노산 치환을 나타낸다.

<도 4b>

도 4b는 M6 항체의 중쇄(서열 번호 9) 및 그의 CDR(서열 번호 10-12)의 아미노산 서열을 나타낸다. 아미노산 서열에서의 밑줄은 CDR의 위치를 나타낸다. 리더 서열은 포함되지 않는다.

<도 5>

도 5는 rhIL-4 및 rhIL-25의 존재 하에 자가유래 수지상 세포로 4일 동안 자극한 나이브(naïve) 인간 CD4+ T 세포에 의한 IL-4/IL25-유도된 IL-5 생성을 huDDG91(M9) 항체보다 더 큰 정도로 M6이 억제함을 나타내는 그래프이다. 아이소타입(isotype) IgG1 항체(아이소)는 대조군으로서의 역할을 하였다. n=4 공여체.

<도 6a 및 도 6b>

도 6a 및 도 6b는 재조합 인간 IL-25로 24시간 동안 자극한 LS174T 세포에서 huDDG91(M9) 항체에 비하여 M6 항체에 의한 IL-25 유도된 GROa 생성의 향상된 억제를 나타내는 그래프이다. 도 6a 및 도 6b에서의 그래프는 별도의 두 실험으로부터의 데이터를 나타낸다.

<도 7a>

도 7a는 2 M 우레아, 1 M TCEP (pH 3.0) 켄칭을 이용한 펩신 분해에 의한 인간 IL-25의 아미노산 잔기 1-78(서열 번호 13)의 서열 커버리지(coverage) 지도를 나타낸다. 흑색 선은 관찰되는 펩티드이다.

<도 7b>

도 7b는 2 M 우레아, 1 M TCEP (pH 3.0 켄칭을 이용한 펩신 분해에 의한 인간 IL-25의 아미노산 잔기 79-146(서열 번호 14)의 서열 커버리지 지도를 나타낸다. 흑색 선은 관찰되는 펩티드이다.

<도 8a 및 도 8b>

도 8a 및 도 8b는 인간 IL-25 단백질의 상이한 절편들(서열 번호 15 및 서열 번호 16)에 있어서 H/D-교환 실험에서 M6 항체 결합시에 중수소화 수준의 차이를 나타낸다. 각각의 블록은 인간 IL-25 펩티드를 나타내며, 6개의 시점, pH 6에서의 150 s 및 500 s와, pH 7에서의 150 s, 500 s, 1,500 s 및 5,000 s에 있어서의 데이터를 함유한다. 짙은 청색은 M6 항체 결합시에 보호가 없음을 나타낸다. 다른 색은 우측 인서트에 나타낸 바와 같이 온-컬럼(on-column)/오프-컬럼(off-column) 교환 후보다 온-용액(on-solution)/오프-컬럼 교환 후 더 많은 중수소를 나타낸다. 각각의 이온의 첫 번째 두 아미노산 잔기 중 어느 하나에 부착된 중수소는 분석(수성 환경에서의 분해/분리/질량 분석) 동안 손실되며, 이는 H/D-Ex 패턴에서의 작은 갭의 이유가 된다.

<도 9a 내지 도 9f>

도 9a 내지 도 9f는 3℃에서 pH 6 및 pH 7에서 M6 항체 컬럼을 이용한 온/오프 교환 후 인간 IL-25의 상이한 절편들에서의 중수소 함량을 나타내는 그래프이다. 청색은 온-용액/오프-컬럼이며, 자주색은 온-컬럼/오프-컬럼이다. 모든 교환 시간은 동등한 pH 7, 23℃로 전환된다(예를 들어, 3℃에서의 pH 6에서의 150 s는 23℃에서의 pH 7에서의 1.85 s와 동일함). 각각의 절편에 나타낸 인간 IL-25 잔기는 각각의 플롯(plot)의 상부에 나타낸다.

<도 10>

도 10은 인간 IL-25의 아미노산 서열(서열 번호 17)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 부분적으로 본 발명은 본 명세서에서 "M6"으로 지칭되는 고친화성 인간 IL-25 항체의 확인(실시예 1 참조), 및 수소/중수소(H/D) 교환 질량 분광법(실시예 3 참조)으로 결정할 때 M6 항체가 결합하는 인간 IL-25 내의 아미노산 잔기의 확인을 기반으로 한다. 따라서, 일 실시 형태에서, 본 발명은 인간 IL-25(서열 번호 17)의 아미노산 잔기 46-63, 66-84 및 129-135로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열에 결합하는, IL-25에 결합하는 표적 결합 구성원에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 표적 결합 구성원은 서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 서열 번호 17의 아미노산 잔기 66-84, 또는 서열 번호 17의 아미노산 잔기 129-135, 또는 임의의 그 조합에 결합할 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 표적 결합 구성원은 서열 번호 17의 아미노산 56-63 및 서열 번호 17의 아미노산 66-74에 결합한다.

[0030] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "표적 결합 구성원"은 중쇄 또는 경쇄의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)을 함유하는 면역글로불린 분자의 적어도 일부분, 또는 그의 리간드 결합 부분을 포함하는 분자를 포함하는 임의의 단백질 또는 펩티드 함유 분자를 말하며, 이는 포유류(예를 들어, 인간) IL-25 단백질, 또는 그 일부분에 특이적으로 결합한다. 그러한 표적 결합 구성원은 항체 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 적어도 일부분, 항체 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 적어도 일부분, 항체 프레임워크(framework) 영역의 적어도 일부분, 또는 임의의 그 조합을 추가로 포함할 수 있다. 그러한 표적 결합 구성원은 시험관 내에서, 원위치에서 및/또는 생체 내에서 적어도 하나의 IL-25 활성 또는 결합, 또는 IL-25 수용체 활성 또는 결합을 조정하고/하거나, 감소시키고/시키거나, 길항하고/하거나, 경감시키고/시키거나, 완화시키고/시키거나, 차단하고/하거나, 저해하고/하거나, 저지하고/하거나 간섭한다. 비제한적 예로서, 본 발명의 적합한

표적 결합 구성원은 본 발명에 개시된 M6 항체에 의해 인식되는 인간 IL-25의 저해 및/또는 중화 에피토프에 고친화도로 결합할 수 있다.

[0031] 본 발명의 표적 결합 구성원은 단지 서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 아미노산 잔기 66-84, 및/또는 아미노산 잔기 129-135에 결합하는 것들에 한정되지 않는다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 표적 결합 구성원은 서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 아미노산 잔기 66-84, 및/또는 아미노산 잔기 129-135를 포함하지 않는 인간 IL-25의 하나 이상의 다른 부분에 추가로 결합할 수 있다. 다른 예에서, 본 발명의 표적 결합 구성원은 서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 아미노산 잔기 66-84, 및/또는 아미노산 잔기 129-135의 측면에 위치하는 인간 IL-25 내의 하나 이상의 아미노산 잔기에 추가로 결합할 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한 서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 아미노산 잔기 66-84, 및/또는 아미노산 잔기 129-135 내에 포함되는 인간 IL-25의 하나 이상의 부분, 예를 들어 서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 아미노산 잔기 66-84, 및/또는 아미노산 잔기 129-135의 적어도 5개 아미노산으로 이루어진 IL-25의 부분들에 결합하는 표적 결합 구성원을 고려한다. 표적 결합 구성원이 결합할 수 있는 IL-25의 예시적인 부분은 서열 번호 17의 아미노산 56-63 및/또는 아미노산 66-74를 포함한다.

[0033] 본 발명의 표적 결합 구성원이 결합하는 IL-25의 영역, 또는 에피토프는 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려져 있는 몇몇 표준 에피토프 지도화 기술 중 임의의 것을 사용하여 결정될 수 있다. 그러한 기술은 예를 들어 결합 분석법과 커플링된 지정 부위 돌연변이 유발법, 펩티드 핀(pin)을 이용한 에피토프 지도화(예를 들어, 문헌[Geysen et al., Peptides: Chemistry and Biological, Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium, p. 519-523, Ed, G.R. Marshall, Escom, Leiden, 1988]), X-선 결정법, 및 수소/중수소(H/D) 교환 기술(예를 들어, H/D-교환 질량 분광법)을 포함한다.

[0034] 본 명세서에 기재된 바와 같이, M6 항체가 인식하고 결합하는 인간 IL-25에서의 에피토프(들)의 결정을 위하여 H/D-교환 질량 분광법이 이용되었다 (실시예 3 및 도 8a, 도 8b 및 도 9a 내지 도 9f 참조). 물로부터 중수소 기재의 용매 시스템(중수)으로의 이전시에, 단백질은 단백질의 수소 원자가 점진적으로 중수소(수소의 더욱 무거운 동위 원소)로 대체되게 됨에 따라 질량의 증가를 경험할 것이다. 수소/중수소 교환 사건(event)의 가능성은 단백질 구조 및 용매 접근성에 의해 주로 결정된다. H/D-교환 질량 분광법은 교환의 측정, 그 결과로서 단백질 구조 및 용매 접근성의 측정에 사용된다. 작은 분자 또는 단백질 결합 파트너가 단백질 표적에 결합할 때, 그 표적은 그의 교환 속도의 실험적으로 관찰가능한 변화를 경험한다. 복합체 형성시에 용매를 배제하는 표면 영역은 더욱 더 느리게 교환된다. 용매 배제 영역은 결합 부위의 위치의 추론에 유용하다. 예를 들어, 항원-항체 상호작용의 경우, 이들 변화는 에피토프의 위치를 강조한다.

[0035] 전형적으로, 본 발명의 표적 결합 구성원은 IL-25 결합 도메인을 제공하기 위하여 항체 중쇄 가변 영역(VH) 도메인과 쌍을 형성하는 항체 경쇄 가변 영역(VL) 도메인을 포함할 것이다. 본 명세서에 개시된 본 발명의 제조에 있어서, huDDG91 항체의 결합 친화도는 huDDG91 항체 VL 도메인(서열 번호 1)의 상보성 결정 영역(CDR), 구체적으로 CDR3 영역을 QQYLAFPYTF(서열 번호 8)로 변경함으로써 향상됨이 밝혀졌다. 따라서, 본 명세서에 개시된 본 발명은 서열 번호 8의 서열을 포함하는 VL 도메인 및 그러한 VL 도메인을 포함하는 표적 결합 구성원을 고려한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 표적 결합 구성원 내의 VL 도메인은 M6 및 huDDG91 항체 유래의 CDR1(SASQGISNYLN(서열 번호 6)) 및 CDR2(YTSSLHS(서열 번호 7))를 또한 포함한다. 본 발명의 표적 결합 구성원 내의 포함에 적합한 다른 VL CDR 영역은 도 3에 예시된 VL CDR1 영역들 중 임의의 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 표적 결합 구성원은 M6 항체의 VL 도메인, 서열 번호 5의 서열을 포함한다.

[0036] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 표적 결합 구성원은 M6 및 huDDG91 항체의 CDR 영역에 상응하는 서열 번호 10-12의 서열을 포함하는 VH 도메인을 또한 포함한다. 본 발명의 표적 결합 구성원 내의 포함에 적합한 다른 CDR 영역은 도 3에 예시된 VH CDR3 영역들 중 임의의 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 표적 결합 구성원은 M6 및 huDDG91 항체의 VH 도메인, 서열 번호 9의 서열을 포함한다. VH 도메인은 M6 항체(서열 번호 5)의 VL 도메인 이외의 다수의 VL 도메인과 쌍을 형성할 수 있다. 바람직하게는, VH 도메인은 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR 3 영역을 포함하는 VL 도메인과 쌍을 형성한다.

[0037] 본 명세서에 기재된 M6 항체의 CDR의 서열은 삽입, 치환 및 결실에 의해 변경될 수 있으며, 변경된 CDR(들)을 갖는 표적 결합 구성원(예를 들어, 항체)이 인간 IL-25에 결합하여 그를 저해하는 능력을 유지하는 한, 본 발명의 표적 결합 구성원 내에 포함될 수 있다. 당업자라면 본 명세서에 기재된 기능 분석을 실시함으로써 이 활성의 유지를 확인할 수 있다. 본 발명의 표적 결합 구성원 내의 CDR은 서열 번호 6, 7, 8, 10, 11 또는 12로 나

타낸 상응하는 M6 CDR에 대하여 예를 들어 약 50% 내지 약 100%의 상동성, 바람직하게는 약 80% 내지 약 100%의 상동성, 더 바람직하게는 약 90% 내지 약 100%의 상동성을 가질 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 발명의 표적 결합 구성원 내의 CDR은 서열 번호 6, 7, 8, 10, 11 또는 12로 나타낸 상응하는 M6 CDR에 대한 상동성이 약 100%일 수 있다.

[0038] 본 발명에 다른 표적 결합 구성원은 본 명세서에 기재된 M6 항체의 것과 사실상 유사하거나 또는 그보다 더 큰 친화도로 IL-25에 결합할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 표적 결합 구성원은 IL-25(예를 들어, 인간 IL-25)에 대한 결합 친화도가 약 50 pM(예를 들어, 약 53 pM) 이하, 예를 들어 약 45 pM, 약 40 pM, 약 35 pM, 약 30 pM, 약 25 pM 또는 약 20 pM일 수 있다. 표적 결합 구성원은 일반적으로 IL-25에 특이적일 것이다. 따라서, 표적 결합 구성원은 그의 특정 결합 파트너(들) 이외의 분자에 대하여 어떠한 유의한 결합성도 나타내지 않을 것이다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 M6 항체는 IL-17A, IL-17C, IL-17D 또는 IL-17F와 교차 반응하지 않음이 밝혀졌다. 천식 및 유사 과정에 연루된 다른 사이토카인에 대한 그러한 교차 반응성의 회피는 본 발명의 일부 실시 형태에서 표적 결합 구성원의 바람직한 특징이다.

[0039] 항원에 대한 표적 결합 구성원의 친화도 또는 친화력은 임의의 적합한 방법을 이용하여 실험적으로 결정될 수 있다. (예를 들어, 문헌[Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions," in Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984)]; 문헌[Kuby, Janis, Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992)]; 및 본 명세서에 기재된 방법 참조). 상이한 조건 (예를 들어, 염 농도, pH) 하에서 측정할 경우, 특정 항체-항원 상호작용의 측정되는 친화도는 다양할 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원-결합 파라미터 (예를 들어, KD, Kd, Ka)의 측정은 바람직하게는 항체 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 완충제로 이루어진다.

[0040] 예를 들어, 특이성은 특히 항원의 패널을 이용하는 ELISA, 바이아코어(Biacore) 분석법 및/또는 옥테트(Octet) 분석법과 같은 결합 분석법에 의해 측정될 수 있다. 본 발명에 다른 표적 결합 구성원은 IL-25를 인식할 수 있으며, IL-17 패밀리의 다른 구성원, 특히 IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D 및 IL-17F 중 임의의 하나; 일 실시 형태에서, 모든 5가지의 이들 분자는 인식할 수 없다. 본 발명에 따른 표적 결합 구성원과 IL-25의 결합은 재조합 IL-25와의 경쟁에 의해 무효화될 수 있다.

[0041] 상이한 표적 결합 구성원들의 결합 친화성 및 중화 능력은 적절한 조건 하에 비교될 수 있다.

[0042] 본 발명은 또한 IL-25에의 결합에 대하여 서열 번호 17의 아미노산 잔기 46-63, 서열 번호 17의 아미노산 잔기 66-84 및 서열 번호 17의 아미노산 잔기 129-135로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열에 결합하는 본 발명의 표적 결합 구성원과 경쟁하는 표적 결합 구성원에 관한 것이다. 특정 실시 형태에서, 표적 결합 구성원은 인간 IL-25에 대한 결합 친화도가 약 50 pM 이하이다.

[0043] 경쟁적 분석을 본 발명의 표적 결합 구성원(예를 들어, 항체)을 이용하여 실시하여 어떤 단백질, 항체 및 기타 길항제가 IL-25에의 결합에 대하여 본 발명의 표적 결합 구성원과 경쟁하는지 및/또는 에피토프 영역을 공유하는지를 결정할 수 있다. 당업자에게 쾌히 공지되어 있는 이들 분석은 단백질, 예를 들어 IL-25 상의 제한된 개수의 결합 부위들에 대한 길항제들 또는 리간드들 사이의 경쟁을 평가한다. 단백질 및/또는 항체는 경쟁 전 또는 후에 고정되거나 불용화되며, IL-25 단백질에 결합된 샘플은 예를 들어 (단백질/표적 결합 구성원이 사전 불용화되었을 경우) 가만히 따름으로써 또는 (단백질/항체가 경쟁 반응 후에 침전되었을 경우) 원심분리에 의해 미결합 샘플로부터 분리된다. 또한, 경쟁적 결합은 단백질에의 표적 결합 구성원의 결합에 의해 또는 상기 결합의 결여에 의해 기능이 변경되는지에 의해, 예를 들어 표적 결합 구성원 분자가 예를 들어 표지체의 효소적 활성을 저해하는지 또는 강화하는지에 의해 결정될 수 있다. 당업계에 잘 알려져 있는 바와 같이 ELISA 및 기타 기능적 분석이 사용될 수 있다.

[0044] 항체

[0045] 바람직하게는, 본 발명의 표적 결합 구성원은 항체 분자이다. 용어 "항체"는 항체 모방체(mimetic) 또는 단쇄 항체 및 그 단편을 포함하는, 항체 또는 그의 특정 단편 또는 부분의 구조 및/또는 기능을 모방하는 항체의 부분을 포함하는, 전 항체, 그의 분해 단편, 특정 부분 및 변이체를 포함하고자 의도되는데; 각각은 적어도 하나의 CDR을 함유한다. 기능성 단편은 포유류 IL-25에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다. 예를 들어, Fab(예를 들어, 파파인 분해에 의해), Fab'(예를 들어, 펩신 분해 및 부분 환원에 의해) 및 $F(ab')_2$(예를 들어, 펩신 분해에 의해), facb(예를 들어, 플라스민 분해에 의해), pFc'(예를 들어, 펩신 또는 플라스민 분해에 의해), Fd(예를 들어, 펩신 분해, 부분 환원 및 재응집에 의해), Fv 또는 scFv(예를 들어, 분자생물학 기술에 의해) 단

편을 포함하지만 이에 한정되지 않는, IL-25에 결합할 수 있는 항체 단편 또는 그 부분이 본 발명에 포함된다(예를 들어, 문헌[Colligan, et al., eds, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994 2001)]; 문헌[Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997 2001)"] 참조).

[0046] 상기 단편은 당업계에 공지되어 있는 및/또는 본 명세서에 기재되어 있는 바와 같은 효소에 의한 절단, 합성 또는 재조합 기술에 의해 생산될 수 있다. 항체는 또한 하나 이상의 정지 코돈이 천연 정지 부위의 상류에 도입된 항체 유전자를 사용하여 다양한 말단절단 (truncated) 형태로 생산될 수 있다. 예를 들어, 중쇄의 CH_1 도메인 및/또는 힌지 영역을 코딩하는 DNA 서열을 포함하도록, $F(ab')_2$ 중쇄 부분을 코딩하는 조합 유전자를 설계할 수 있다. 항체의 다양한 부분은 통상의 기술에 의해 화학적으로 함께 연결될 수 있거나 또는 유전 공학 기술을 사용하여 연접 단백질로서 제조될 수 있다.

[0047] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 또한 본 명세서에 기재된 M6 CDR과 비-쥐과로부터 유래된 하나 이상의 단백질 또는 펩티드, 바람직하게는 인간 항체의 임의의 조합을 포함하는 "인간화" 또는 "CDR-그래프팅된" 항체, 및 "키메라" 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명에 따르면, CDR이 M6 항체로부터 유래된 키메라 또는 인간화 항체가 제공된다. 따라서, 일 실시 형태에서, 항체의 인간 부분은 인간에 있어서 사실상 비면역원성인 영역을 포함할 수 있다. 인간 항체로부터 유래된 항체의 영역은 인간 항체와의 동일성이 100%일 필요는 없다. 바람직한 실시 형태에서, 면역원성이 무시가능하게 되는 것을 위하여 가능한 한 많은 인간 아미노산 잔기가 유지되지만, 인간 잔기는 CDR에 의해 형성되는 항원 결합 부위를 지지하는 동시에 항체의 인간화를 최대화하기 위하여 필요할 경우 변경될 수 있다. 상기 변화 또는 변이는 선택적으로 그리고 바람직하게는, 변경되지 않은 항체에 비해 인간 또는 다른 종에서 면역원성을 유지시키거나 감소시킨다. 인간화 항체는 기능적으로 재배열된 인간 면역글로불린(예를 들어 중쇄 및/또는 경쇄) 유전자를 발현할 수 있는 비-인간(non-human) 동물 또는 원핵 또는 진핵 세포에 의해 생성될 수 있다. 추가로, 항체가 단쇄 항체일 때, 항체는 천연 인간 항체에서는 발견되지 않는 링커 펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, Fv는 중쇄의 가변 영역 및 경쇄의 가변 영역을 연결시키는 링커 펩티드, 예를 들어 2 내지 약 8개의 글라이신 또는 다른 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 상기 링커 펩티드는 인간 기원인 것으로 생각된다.

[0048] 대안적으로, 도 4a 및 도 4b에서 M6 항체의 전체 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역(서열 번호 5 및 9)은 인간 불변 영역 및 프레임워크 영역과 조합되어 본 발명의 표적 결합 구성원을 형성할 수 있다.

[0049] 본 발명의 표적 결합 구성원의 불변(C) 영역을 코딩하는 인간 유전자는 공지된 방법에 의해 인간 태아 간 라이브러리(library)로부터 유래될 수 있다. 인간 C 영역 유전자는 인간 면역글로불린을 발현하고 생성하는 것을 비롯한 임의의 인간 세포로부터 유래될 수 있다. 인간 CH 영역은 감마, 뮤., 알파., 델타., 엡실론, 및 그 하위 타입, 예를 들어 G1, G2, G3 및 G4를 비롯하여 인간 H 사슬의 공지된 클래스 또는 아이소타입 중 임의의 것으로부터 유래될 수 있다. H 사슬 아이소타입은 항체의 다양한 이펙터(effector) 기능에 책임이 있기 때문에, CH 영역의 선택은 원하는 이펙터 기능, 예를 들어 보체 고정, 또는 항체 의존성 세포 독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)에서의 활성에 의해 인도될 것이다. 일 실시 형태에서, CH 영역은 감마 1(IgG 1)로부터 유래된다.

[0050] 인간 CL 영역은 인간 L 사슬 아이소타입, 카파 또는 람다, 바람직하게는 카파로부터 유래될 수 있다.

[0051] 인간 면역글로불린 C 영역을 코딩하는 유전자는 표준 클로닝 기술(예를 들어, 문헌[Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)] 및 문헌[Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology (1987, 1993)])에 의해 인간 세포로부터 얻어질 수 있다. 인간 C 영역 유전자는 L 사슬의 2가지 클래스, H 사슬의 5가지 클래스 및 그 하위 클래스를 대표하는 유전자를 함유하는 공지된 클론으로부터 쉽게 입수가능하다. 키메라 항체 단편, 예를 들어 $F(ab_1)_2$ 및 Fab는 적절하게 절단된 키메라 H 사슬 유전자를 설계함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, $F(ab_1)_2$ 단편의 H 사슬 부분을 코딩하는 키메라 유전자는 H 사슬의 CH1 도메인 및 힌지(hinge) 영역을 코딩하는 DNA 서열, 이어서 절단형 분자를 생성하기 위한 번역 종결 코돈을 포함할 것이다.

[0052] 일반적으로, 일 실시예에서, 본 발명의 키메라 항체, 단편 및 영역은 M6 항체의 H 및 L 사슬 항원 결합 영역을 코딩하는 DNA 단편을 클로닝하고, 이들 DNA 절편을 각각 CH 및 CL 영역을 코딩하는 DNA 절편에 연결시켜 키메라 면역글로불린 코딩 유전자를 생성함으로써 제조된다.

[0053] 따라서, 일 실시 형태에서, 연결(J) 절편을 포함하는 기능적으로 재배열된 V 영역과 같은 비-인간 기원의 적어

도 하나의 항원 결합 영역을 코딩하는 제1 DNA 절편이 인간 C 영역의 적어도 일부분을 코딩하는 제2 DNA 절편에 연결된 것을 포함하는 융합된 키메라 유전자가 생성된다.

[0054] M6 항체의 가변 영역의 서열은 표적 결합 구성원이 인간 IL-25에 결합하여 그를 저해하는 능력을 유지하는 한 삽입, 치환 및 결실에 의해 변경될 수 있다.

[0055] 편의상, 카밧(Kabat) 등의 넘버링 방법이 본 발명에서 채용되었다. 잔기는 본 발명의 서열이 표준 카밧 넘버링 서열에 부합되도록 필요할 경우 소문자 수 또는 하이픈에 의해 표기된다.

[0056] 본 발명에 따르면, M6 항체의 CDR 영역이 인간 영역과 조합된 CDR-그래프팅 또는 인간화 항체의 경우, 모 항체, 예를 들어 M6에 특유한 잔기들이 FR 영역에서 유지될 수 있다. 다른 항체의 인간화에 중요한 것으로 입증된 잔기들이 또한 유지될 수 있다. CDR에 의해 형성되는 항원 결합 부위를 지지하는 동시에 항체의 인간화를 최대화하는 데 필요한 정도로 이들 지침을 따를 수 있다.

[0057] 또한, 비-인간 또는 인간 항체를 조작 또는 인간화하는 방법이 사용될 수 있고, 이는 당업계에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 인간화되거나 조작된 항체는 비-인간인 공급원, 예를 들어 생쥐, 쥐, 토끼, 비-인간 영장류 또는 다른 포유류인 그러나 이에 한정되지 않는 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 상기 인간 아미노산 잔기는 주로 "임포트(import)" 잔기로 언급되고, 전형적으로 공지된 인간 서열의 "임포트" 가변, 불변 또는 기타 도메인으로부터 취해진다. 공지된 인간 Ig 서열이 예를 들어 다수의 공공 데이터베이스, 예를 들어 미국 국립 보건 연구소(National Institute of Health)의 NCBI 데이터베이스 또는 간행물, 예를 들어 문헌[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)]에 개시되어 있다.

[0058] 상기 도입된 서열은 면역원성을 감소시키거나, 결합, 친화도, 온-레이트 (on-rate), 오프-레이트 (off-rate), 친화력 (avidity), 특이성, 반감기, 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 적합한 특성을 감소, 향상, 또는 변형시키기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 비-인간 또는 인간 CDR 서열의 일부 또는 전부가 유지될 수 있는 반면, 가변 및 불변 영역의 비-인간 서열은 인간 또는 다른 아미노산으로 대체된다. 항체는 또한 선택적으로 항원에 대한 고 친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 유지하면서 인간화될 수 있다. 상기 목적을 달성하기 위하여 인간화 항체는 선택적으로 모(parental) 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 모 서열 및 다양한 개념적(conceptual) 인간화 산물의 분석 과정에 의해 제조될 수 있다. 3차원 면역글로불린 모델이 통상 이용가능하고 당업자에게 잘 알려져 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체 배좌 구조를 묘사하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 상기 디스플레이의 조사는, 후보 면역글로불린 서열이 기능함에 있어서의 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉, 그의 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능케 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 요구되는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가가 달성되도록 콘센서스(consensus) 및 임포트 서열로부터 선택되어 조합될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 주는 것에 직접적으로 그리고 가장 실질적으로 연루되어 있다. 본 발명의 항체의 인간화 또는 조작은 문헌[Jones et al., Nature 321:522 (1986)]; 문헌[Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)]; 문헌[Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)], 문헌[Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993)]; 문헌[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)], 문헌[Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992)]; 문헌[Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)], 미국 특허 제5,723,323호, 제5,976,862호, 제5,824,514호, 제5,817,483호, 제5,814,476호, 제5,763,192호, 제5,723,323호, 제5,766,886호, 제5,714,352호, 제6,204,023호, 제6,180,370호, 제5,693,762호, 제5,530,101호, 제5,585,089호, 제5,225,539호; 제4,816,567호, 국제 특허 출원 제PCT/US98/16280호, 제US96/18978호, 제US91/09630호, 제US91/05939호, 제US94/01234호, 제GB89/01334호, 제GB91/01134호, 제GB92/01755호; 국제특허 공개 WO90/14443호, WO90/14424호, WO90/14430호, 유럽 특허 제229246호와 같은 그러나 이에 한정되지 않는 임의의 공지된 방법을 이용하여 실시될 수 있는데, 이들 각각은 그 안에 인용된 참고문헌을 비롯하여 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다.

[0059] 본 발명의 표적 결합 구성원의 인간 불변 영역은 임의의 클래스(IgG, IgA, IgM, IgE, IgD 등) 또는 아이소타입의 것일 수 있으며, 카파 또는 람다 경쇄를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 인간 불변 영역은 IgG 중쇄 또는 규정된 단편, 예를 들어 아이소타입, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중 적어도 하나를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 표적 결합 구성원은 IgG1 중쇄 및 IgG1 K 경쇄를 포함한다. 본 발명의 단리된 표적 결합 구성원은 임의의 적합한 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 본 명세서에 개시된 항체 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 표적 결합 구성원은 인간 IL-25에 결합하며 이로써 상기 단백질의 적어도 하나의 생물 활성을 부

분적으로 또는 사실상 중화시킨다. 표적 결합 구성원, 또는 그의 특정 부분 또는 변이체는 적어도 하나의 IL-25 단백질 또는 단편의 적어도 하나의 생물 활성을 부분적으로 또는 바람직하게는 사실상 중화시키며 이로써 IL-25가 IL-25 수용체에 결합하는 것을 통하여 또는 다른 IL-25-의존성 또는 매개 기작을 통하여 매개되는 활성을 저해한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "중화 항체"는 IL-25-의존성 활성을 분석에 따라 약 20-100%, 바람직하게는 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100%만큼 또는 이보다 더 크게 저해할 수 있는 항체를 말한다. 바람직하게는 표적 결합 구성원이 IL-25-의존성 활성을 저해하는 능력은 본 명세서에 기재된 바와 같이 및/또는 당업계에 공지된 바와 같이 적어도 하나의 적합한 IL-25 단백질 또는 수용체 분석에 의해 평가된다.

[0060] 본 발명의 적어도 하나의 항체는 M6 항체가 결합하는 본 명세서에 특정된 적어도 하나의 에피토프에 결합한다. 상기 적어도 하나의 에피토프는 단백질의 적어도 하나의 일부를 포함하는 적어도 하나의 항체 결합 영역을 포함하고, 에피토프는 바람직하게는 상기 단백질의 적어도 하나의 세포외, 가용성, 친수성, 외부 또는 세포질 부분으로 이루어진다. 일반적으로, 본 발명의 표적 결합 구성원은 서열 번호 10, 11 및 12의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR 1, CDR2 및 CDR3) 또는 적어도 하나의 중쇄 가변 영역의 변이체 및 적어도 하나의 인간 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)(서열 번호 6, 7 및 8) 또는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역의 변이체를 포함하는 항원 결합 영역을 포함할 것이다.

[0061] 인간 IL-25에 결합하는 그리고 규정된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 또는 CDR 영역을 포함하는 표적 결합 구성원은 당업계에 공지된 바와 같이 및/또는 본 명세서에 기재된 바와 같이 트랜스제닉(transgenic) 동물을 이용하는 방법 또는 파지 디스플레이(phage display) (문헌[Katsube, Y., et al., Int J. Mol. Med, 1(5):863 868 (1998)])와 같은 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체, 특정 부분 또는 변이체는 적합한 숙주 세포에서 코딩 핵산 또는 그의 일부를 사용하여 발현시킬 수 있다.

[0062] 기술된 바와 같이, 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 M6 아미노산 서열과 사실상 동일한 서열의 아미노산을 포함하는 항체, 항원-결합 단편, 면역글로불린 사슬 및 CDR에 관한 것이다. 그러한 항-IL-25 항체는 본 명세서에 특정된 바와 같이 자연 돌연변이 또는 인간 조작에 의해 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 그러한 항체 또는 항원-결합 단편 및 그러한 사슬 또는 CDR을 포함하는 항체는 고친화도 (예를 들어 약 10-9 M 이하의 KD)로 인간 IL-25에 결합할 수 있다. 본 명세서에 기재된 서열과 사실상 동일한 아미노산 서열은 보존적 아미노산 치환, 및 아미노산 결실 및/또는 삽입을 포함하는 서열을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은 제1 아미노산의 것과 유사한 화학적 및/또는 물리적 특성 (예를 들어, 전하, 구조, 극성, 소수성/친수성)을 갖는 제2 아미노산에 의한 제1 아미노산의 대체를 말한다. 보존적 치환은 하기 군들 내에서의 하나의 아미노산의 다른 것에 의한 대체를 포함한다: 라이신(K), 아르기닌(R) 및 히스티딘(H); 아스파르테이트(D) 및 글루타메이트(E); 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 세린(S), 트레오닌(T), 타이로신(Y), K, R, H, D 및 E; 알라닌(A), 발린(V), 류신(L), 아이소류신(I), 프롤린(P), 페닐알라닌(F), 트립토판(W), 메티오닌(M), 시스테인(C) 및 글라이신(G); F, W 및 Y; C, S 및 T.

[0063] 숙련자에 의해 생성되는 아미노산 치환의 수는 상기 기재된 것을 포함하는 다수의 인자에 따라 달라진다. 일반적으로 말하면, 임의의 주어진 항-IL-25 항체, 단편 또는 변이체에 대한 아미노산 치환, 삽입 또는 결실의 수는 본 명세서에 특정된 바와 같이 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 이하, 예를 들어 1-30 또는 상기 범위 내의 임의의 범위 또는 값일 것이다.

[0064] 기능에 필수적인 본 발명의 표적 결합 구성원의 아미노산은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어, 지정 부위 돌연변이 유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이 유발에 의해 확인할 수 있다 (예를 들어, 문헌[Ausubel, 상기 문헌, Chapters 8, 15]; 문헌[Cunningham and Wells, Science 244:1081 1085 (1989)]). 후자의 절차는 분자 내의 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 이어서, 생성된 돌연변이 분자를 적어도 하나의 IL-25 중화 활성과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 생물 활성에 대하여 시험한다. 또한, 항체 결합에 중요한 부위는 구조 분석, 예를 들어 결정화, 핵자기공명 또는 광친화 표지(photoaffinity labeling)에 의해 확인될 수 있다 (문헌[Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899 904 (1992)] 및 문헌[de Vos, et al., Science 255:306 312 (1992)]).

[0065] 본 발명의 표적 결합 구성원은 서열 번호 5-12 중 적어도 하나의 5개 내지 전부의 연접 아미노산으로부터 선택되는 적어도 하나의 일부, 서열 또는 조합을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0066] 표적 결합 구성원은 서열 번호 5 또는 9 중 적어도 하나의 70-100%의 연접 아미노산 중 적어도 하나의 폴리펩티드를 추가로 선택적으로 포함할 수 있다.

[0067] 일 실시 형태에서, 면역글로불린 사슬, 또는 그의 일부 (예를 들어 가변 영역, CDR)의 아미노산 서열은 서열 번호 5 또는 9 중 적어도 하나의 상응하는 사슬의 아미노산 서열에 대하여 약 70-100%의 동일성 (예를 들어, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 범위 내의 임의의 범위 또는 값)을 갖는다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호 5의 서열과 비교될 수 있거나, 또는 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 번호 9의 서열과 비교될 수 있다. 바람직하게는, 70-100%의 아미노산 동일성(즉, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값)을 당업계에 공지된 바와 같이 적합한 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정한다.

[0068] 예시적인 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이 서열 번호 5 및 9에 제공된다. 본 발명의 표적 결합 구성원, 또는 그의 특정된 변이체는 본 발명의 항체로부터의 임의의 수의 연접 아미노산 잔기를 포함할 수 있으며, 여기서 그 수는 표적 결합 구성원 내의 연접 잔기수의 10-100%로 이루어진 정수들의 군으로부터 선택된다. 선택적으로, 연접 아미노산의 상기 하위서열(subsequence)의 길이는 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250개 이상의 아미노산 또는 그 범위 내의 임의의 범위 또는 값이다. 추가로 상기 하위서열의 수는 1 내지 20, 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 또는 5로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 정수일 수 있다.

[0069] 당업자가 이해하는 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 생물학적으로 활성인 항체를 포함한다. 생물학적으로 활성인 항체는 천연(비-합성), 내인성의 또는 관련된 그리고 공지된 항체의 비활성의 적어도 20%, 30%, 또는 40%, 그리고 바람직하게는 적어도 50%, 60%, 또는 70%, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 80%, 90%, 또는 95% 1000%의 비활성을 갖는다. 효소 활성 및 기질 특이성을 분석하는 방법 및 정량화하는 수단이 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0070] 다른 태양에서, 본 발명은 유기 모이어티의 공유 결합적 부착에 의해 변형된, 본 명세서에 기재된 표적 결합 구성원에 관한 것이다. 그러한 변형은 약동학적 특성 (예를 들어, 생체 내 혈청중 반감기 증가)이 개선된 항체 또는 항원-결합 단편을 생성할 수 있다. 유기 모이어티는 선형 또는 분지형 친수성 중합체기, 지방산기, 또는 지방산 에스테르기일 수 있다. 특정 실시 형태에서, 친수성 중합체기는 약 800 내지 약 120,000 달톤의 분자량을 가질 수 있고, 폴리알칸 글리콜 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜 (PPG)), 탄수화물 중합체, 아미노산 중합체 또는 폴리비닐 피롤리돈일 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르기는 약 8 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0071] 본 발명의 변형된 표적 결합 구성원은 항체에 직접 또는 간접적으로 공유 결합된 하나 이상의 유기 모이어티를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편에 결합되는 각각의 유기 모이어티는 독립적으로 친수성 중합체기, 지방산기 또는 지방산 에스테르기일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지방산"은 모노-카르복실산 및 다이-카르복실산을 포함한다. "친수성 중합체기"는 이 용어가 본 명세서에 사용될 때 옥탄중에서보다 물 중에서 보다 가용성인 유기 중합체를 말한다. 예를 들어, 폴리라이신은 옥탄 중에서보다 물 중에서 더 가용성이다. 따라서, 폴리라이신의 공유 결합적 부착에 의해 변형된 항체가 본 발명에 포함된다. 본 발명의 항체의 변형에 적합한 친수성 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 예를 들어 폴리알칸 글리콜 (예를 들어, PEG, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜(mPEG), PPG 등), 탄수화물 (예를 들어, 덱스트란, 셀룰로오스, 올리고당, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체 (예를 들어, 폴리라이신, 폴리아르기닌, 폴리아스파테이트 등), 폴리알칸 옥사이드 (예를 들어, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리프로필렌 옥사이드 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 항체를 변형시키는 친수성 중합체는 별개의 분자 엔티티(entity)로서 약 800 내지 약 150,000 달톤의 분자량을 갖는다. 예를 들어, PEG_{5000} 및 PEG_{20000} (여기서, 아래첨자는 중합체의 평균 분자량 (달톤)임)이 사용될 수 있다. 친수성 중합체기는 1 내지 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르기로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르기로 치환된 친수성 중합체를 적합한 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 아민기를 포함하는 중합체는 지방산 또는 지방산 에스테르의 카르복실레이트에 커플링될 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카르복실레이트(예를 들어, N,N-카르보닐 다이이미다졸로 활성화됨)는 중합체 상의 하이드록실기와 커플링될 수 있다.

[0072] 본 발명의 항체 변형에 적합한 지방산과 지방산 에스테르는 포화될 수 있거나 하나 이상의 불포화 단위를 함유할 수 있다. 본 발명의 항체 변형에 적합한 지방산은 예를 들어 n-도데카노에이트(C12, 라우레이트), n-테트라데카노에이트(C14, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트(C18, 스테아레이트), n-에이코사노에이트(C20, 아라키데이트), n-도코사노에이트(C22, 베헤네이트), n-트라이아콘타노에이트(C30), n-테트라콘타노에이트(C40), 시스-

델타9-옥타데카노에이트(C18, 올레에이트), 모두 시스(all cis)-델타5,8,11,14-에이코사테트라에노에이트(C20, 아라키도네이트), 옥탄다이오익산, 테트라데칸다이오익산, 옥타데칸다이오익산, 도코산다이오익산 등을 포함한다. 적합한 지방산 에스테르는 선형 또는 분지형 저급 알킬기 포함하는 다이카르복실산의 모노-에스테르를 포함한다. 저급 알킬기는 1 내지 약 12개, 바람직하게는 1 내지 약 6개의 탄소원자를 포함할 수 있다.

[0073] 변형된 표적 결합 구성원은 적합한 방법을 사용하여, 예를 들어 하나 이상의 변형제와의 반응에 의해 제조될 수 있다. "변형제"는 이 용어가 본 명세서에 사용될 때, 활성화기를 포함하는 적합한 유기기 (예를 들어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)를 말한다. "활성화기"는 적절한 조건 하에 제2 화학기와 반응하여 변형제와 제2 화학기 사이의 공유 결합을 형성할 수 있는 화학적 모이어티 또는 작용기이다. 예를 들어, 아민-반응성 활성화기는 토실레이트, 메실레이트, 할로 (클로로, 브로모, 플루오로, 요오도), N-하이드록시석신이미딜 에스테르 (NHS) 등과 같은 친전자성 기를 포함한다. 티올과 반응할 수 있는 활성화기는 예를 들어 말레이미드, 요오도아세틸, 아크릴롤일, 피리딜 다이설파이드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올 (TNB-티올) 등을 포함한다. 알데히드 작용기는 아민- 또는 히드라지드-함유 분자에 커플링될 수 있고, 아지드기는 3가 인기와 반응하여 포스포르아미데이트 또는 포스포르이미드 연결을 형성할 수 있다. 활성화 기를 분자 내로 도입하기에 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌[Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)] 참조). 활성화 기는 유기기 (예를 들어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에 직접, 또는 링커 모이어티, 예를 들어 2가 C_1 C_{12} 기 (여기서, 하나 이상의 탄소 원자는 산소, 질소 또는 황과 같은 헤테로원자에 의해 대체될 수 있음)를 통해 결합될 수 있다. 적합한 링커 모이어티는 예를 들어 테트라에틸렌 글리콜, --$(CH_2)_3$--, --NH--$(CH_2)_6$--NH--, --$(CH_2)_2$--NH-- 및 --CH_2--O--CH_2--CH_2--O--CH_2--CH_2--O--CH--NH--를 포함한다. 링커 모이어티를 포함하는 변형제는 예를 들어 모노-Boc-알킬다이아민 (예를 들어, 모노-Boc-에틸렌다이아민, 모노-Boc-다이아미노헥산)을 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필) 카르보다이이미드(EDC)의 존재하에 지방산과 반응시켜 유리 아민과 지방산 카르복실레이트 사이에 아미드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. Boc 보호기는 트라이플루오로아세트산(TFA) 처리에 의해 생성물로부터 제거하여 설명된 바와 같이 다른 카르복실레이트에 커플링될 수 있거나 말레산 무수물과 반응시키고 생성된 생성물을 환화하여 지방산의 활성화 말레이미도 유도체를 제조할 수 있는 1차 아민을 노출시킬 수 있다 (예를 들어, 그 전체 교시 내용이 본 명세서에 참고로 포함되는 톰슨(Thompson) 등의 국제특허 공개 WO 92/16221호 참조).

[0074] 본 발명의 변형된 표적 결합 구성원은 인간 항체 또는 항원-결합 단편을 변형제와 반응시켜 제조될 수 있다. 예를 들어, 유기 모이어티는 아민-반응성 변형제, 예를 들어 PEG의 NHS 에스테르를 사용함으로써 부위 비-특이적 방식으로 항체에 결합될 수 있다. 변형된 인간 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 항원-결합 단편의 다이설파이드 결합 (예를 들어, 사슬내 다이설파이드 결합)을 환원시킴으로써 제조될 수 있다. 이어서, 환원된 항체 또는 항원-결합 단편을 티올-반응성 변형제와 반응시켜 본 발명의 변형된 항체를 제조할 수 있다. 본 발명의 항체의 특이적인 부위에 결합되는 유기 모이어티를 포함하는 변형된 인간 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법, 예를 들어 역 단백질 분해(reverse proteolysis) (문헌[Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3:147 153 (1992)]; 문헌[Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411 417 (1994)]; 문헌[Kumaran et al., Protein Sci. 6(10):2233 2241 (1997)]; 문헌[Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1): 59 68 (1996)]; 문헌[Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456 463 (1997)]), 및 문헌[Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)]에 기재된 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0075] 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 표적 결합 구성원은 IL-25에의 고친화도의 결합을 특징으로 하며, 선택적으로 독성이 낮다. 특히, 본 발명의 표적 결합 구성원은 개별적인 구성요소, 예를 들어 가변 영역, 불변 영역 및 프레임워크가 개별적으로 및/또는 공동으로, 선택적으로 및 바람직하게는 낮은 면역원성을 가질 경우 본 발명에서 유용하다. 본 발명에서 사용될 수 있는 표적 결합 구성원은 선택적으로 측정가능하게 증상을 완화시키면서 그리고 낮은 및/또는 허용가능한 독성으로 장기간 동안 환자를 치료하는 그의 능력을 특징으로 한다. 낮은 또는 허용가능한 면역원성 및/또는 높은 친화도와, 다른 적합한 특성이 성취되는 치료 결과에 기여할 수 있다. 본 명세서에서 "낮은 면역원성"은 약 75% 미만, 또는 바람직하게는 약 50% 미만의 치료 환자에서 유의한 HAHA, HACA 또는 HAMA 반응을 야기하고/하거나 치료 환자에서 낮은 역가(이중 항원 효소 면역분석에 의해 측정될 때, 약 300 미만, 바람직하게는 약 100 미만)를 야기하는 것으로서 정의된다 (전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Elliott et al., Lancet 344: 1125 1127 (1994)]).

[0076] 적어도 2가지의 상이한 항원에 대하여 결합 특이성을 갖는 단클론, 인간화 항체인 2특이성(bispecific), 이종특이성(heterospecific), 이종컨쥬게이트(heteroconjugate) 또는 유사 항체도 사용될 수 있다. 본 발명의 경우에, 결합 특이성들 중 하나는 적어도 하나의 IL-25 단백질에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대

한 것이다. 2특이성 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 통상적으로, 2특이성 항체의 재조합적 생성은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시 발현을 기반으로 하며, 상기 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌[Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)]). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류 때문에, 이들 하이브리도마 (콰드로마 (quadroma))는 하나만 정확한 2특이성 구조를 갖는 10가지의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생성한다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 성가시고, 생성물 수율도 낮다. 유사한 절차가 예를 들어 국제특허 공개 WO 93/08829호, 미국 특허 제6,210,668호, 제6,193,967호, 제6,132,992호, 제6,106,833호, 제6,060,285호, 제6,037,453호, 제6,010,902호, 제5,989,530호, 제5,959,084호, 제5,959,083호, 제5,932,448호, 제5,833,985호, 제5,821,333호, 제5,807,706호, 제5,643,759호, 제5,601,819호, 제5,582,996호, 제5,496,549호, 제4,676,980호, 국제특허 공개 WO 91/00360호, WO 92/00373호, 유럽 특허 제03089호, 문헌[Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)]에 개시되어 있으며, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다.

[0077] IL-25

[0078] 당업계에서 IL-17E로도 공지된 Il-25는 상업적 공급처(예를 들어, 미국 미네소타주 소재의 알앤디 시스템즈(R&D Systems))로부터 입수가능하거나 또는 당업계에서 이용가능한 IL-25의 서열을 참고로 하여 클로닝되거나 또는 합성될 수 있다. 인간 IL-25의 서열(서열 번호 17)이 도 3에 예시되어 있다. 항체의 생성 또는 면역분석에서의 사용에 있어서, IL-25 단백질(예를 들어, 재조합 IL-25 단백질)의 임의의 단편 또는 단편들의 조합이 사용될 수 있으며, 특히 N-말단에서 절단된 것들이 사용될 수 있다. 예를 들어, 구매가능한 재조합 인간 IL-25(IL-17E)는 등록 번호 Q9H293의 Tyr 33 - Gly 177의 성숙 단백질 서열을 포함하며, 구매가능한 쥐과 IL-25는 생쥐 IL-17E(등록 번호 NP_542767)의 잔기 Val 17 - Ala 169를 포함한다.

[0079] 핵산 분자

[0080] 본 명세서에 제공된 정보를 이용하여, 본 발명의 적어도 하나의 표적 결합 구성원을 코딩하는 본 발명의 핵산 분자를 본 명세서에 설명된 방법을 이용하여 또는 당업계에 공지된 바와 같이 얻을 수 있다.

[0081] 본 발명의 핵산 분자는 RNA, 예를 들어 mRNA, hnRNA, tRNA의 형태 또는 임의의 다른 형태 또는 클로닝에 의해 얻어지거나 합성에 의해 생성된 게놈 DNA 및 cDNA 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는 DNA의 형태일 수 있다. DNA는 삼중가닥, 이중가닥 또는 단일가닥, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. DNA 또는 RNA의 적어도 한 가닥의 임의의 부분은 센스 가닥으로도 공지된 코딩 가닥일 수 있거나, 또는 이것은 안티센스 가닥으로도 언급되는 비코딩 가닥일 수 있다.

[0082] 본 발명의 단리된 핵산 분자는 하나 이상의 인트론을 선택적으로 포함하는 개방 판독 프레임(open reading frame; ORF)을 포함하는 핵산 분자, 예를 들어 그러나 이에 한정되지 않는 적어도 하나의 중쇄 (예를 들어, 서열 번호 10-12) 또는 경쇄 (예를 들어, 서열 번호 6-8)의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3로서의 적어도 하나의 CDR의 적어도 하나의 특정 부분; 항-IL-25 가변 영역 (예를 들어, 서열 번호 5 또는 9)의 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자; 및 상기에 기재된 것과 사실상 상이한 뉴클레오티드 서열을 포함하지만 유전자 코드의 축퇴성으로 인하여 본 명세서에 기재된 및/또는 당업계에 공지된 적어도 하나의 항-IL-25 항체를 여전히 코딩하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 물론, 유전자 코드는 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 당업자가 본 발명의 특정 항-IL-25 항체를 코딩하는 상기 축퇴성 핵산 변이체를 생성시키는 것은 통상적인 것이다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, et al., 상기 문헌]을 참조하며, 그러한 핵산 변이체는 본 발명에 포함된다.

[0083] 본 명세서에 나타낸 바와 같이, 항-IL-25 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 본 발명의 핵산 분자는 항체 단편, 그것 자체의 아미노산 서열을 코딩하는 것들; 전 항체 또는 그 일부분의 코딩 서열; 항체, 단편 또는 일부와, 추가의 서열의 코딩 서열, 예를 들어 전술한 추가의 코딩 서열, 예를 들어 적어도 하나의 인트론을 비코딩 5' 및 3' 서열, 예를 들어 스플라이싱 및 폴리아데닐화 시그널(예를 들어, mRNA의 리보좀 결합 및 안정성)을 포함하는 mRNA 프로세싱, 전사에서 그 역할을 하는 전사된, 비번역된 서열을 포함하지만 이에 한정되지 않는 추가의 비코딩 서열과 함께 포함하거나 또는 포함하지 않는 적어도 하나의 시그널 리더 또는 융합 단백질의 코딩 서열; 추가의 기능성을 제공하는 것과 같은 추가의 아미노산을 코딩하는 추가의 코딩 서열을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 항체를 코딩하는 서열은 항체 단편 또는 일부를 포함하는 융합된 항체의 정제를 용이하게 하는 펩티드를 코딩하는 서열과 같은 마커 서열에 융합될 수 있다.

[0084] 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드

[0085] 본 발명은 선택적인 혼성화 조건 하에서 본 발명에서 개시되는 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 단리된 핵산을 제공한다. 따라서, 상기 실시 형태의 폴리뉴클레오티드는 그러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 단리, 검출, 및/또는 정량하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 기탁된 라이브러리에서 부분적인 또는 전장 클론을 확인, 단리, 또는 증폭하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 폴리뉴클레오티드는 인간 또는 포유류 핵산 라이브러리로부터 단리된 게놈 또는 cDNA 서열이거나, 또는 그렇지 않으면 인간 또는 포유류 핵산 라이브러리로부터의 cDNA에 상보성이다.

[0086] 바람직하게는, cDNA 라이브러리는 적어도 80% 전장 서열, 바람직하게는 적어도 85% 또는 90% 전장 서열, 보다 바람직하게는 적어도 95% 전장 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 희귀 서열의 제시를 증가시키도록 정규화될 수 있다. 낮거나 중등 엄격성 혼성화 조건은 전형적으로, 그러나 비배타적으로, 상보성 서열에 비해 감소된 서열 동일성을 갖는 서열과 함께 사용된다. 중등 및 높은 엄격성 조건은 동일성이 더 큰 서열에 대해 선택적으로 사용될 수 있다. 낮은 엄격성 조건은 약 70% 서열 동일성을 갖는 서열의 선택적인 혼성화를 허용하고 이종상동성(orthologous) 또는 이원성(paralogous) 서열을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0087] 선택적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 명세서에 기술된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 항체의 적어도 일부를 코딩할 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 혼성화하기 위해 사용될 수 있는 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 각각이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 오스벨(Ausubel)의 상기 문헌; 콜리건(Colligan)의 상기 문헌을 참조하라.

[0088] 핵산의 제조

[0089] 본 발명의 단리된 핵산은 당업계에 공지된 바와 같이 (a) 재조합 방법, (b) 합성 기술, (c) 정제 기술, 또는 이들의 조합을 사용하여 제조될 수 있다.

[0090] 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 부가적으로 서열을 편리하게 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하는 다중-클로닝 부위는 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 핵산 내로 삽입될 수 있다. 또한, 번역가능한 서열은 본 발명의 번역된 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 삽입될 수 있다. 예를 들어, 헥사-히스티딘 마커 서열은 본 발명의 단백질을 정제하는 편리한 수단을 제공한다. 본 발명의 핵산 - 코딩 서열을 제외함 - 은 선택적으로 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 어댑터 또는 링커이다.

[0091] 추가의 서열은 클로닝 및/또는 발현에서 그 기능을 최적화하거나, 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕거나 또는 폴리뉴클레오티드의 세포 내로의 도입을 개선하기 위해 상기 클로닝 및/또는 발현 서열에 부가될 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터 및 링커의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. (예를 들어, 오스벨의 상기 문헌; 또는 샘브룩(Sambrook)의 상기 문헌 참조)

[0092] 핵산 제조를 위한 재조합 방법

[0093] RNA, cDNA, 게놈 DNA, 또는 이들의 임의의 조합과 같은 본 발명의 단리된 핵산 조성물은 업계의 당업자에게 공지된 임의의 수의 클로닝 방법을 사용하여 생물학적 공급원으로부터 얻을 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 엄격한 조건 하에서 선택적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프로브는 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리에서 원하는 서열을 확인하기 위해 사용된다. RNA의 단리 및 cDNA 및 게놈 라이브러리의 제작은 당업자에게 잘 알려져 있다. (예를 들어, 오스벨의 상기 문헌; 또는 샘브룩의 상기 문헌 참조)

[0094] 핵산 스크리닝 및 단리 방법

[0095] cDNA 또는 게놈 라이브러리는 본 명세서에 설명된 것과 같이, 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 서열에 기초한 프로브를 사용하여 스크리닝될 수 있다. 프로브는 게놈 DNA 또는 cDNA 서열과 혼성화하여 동일하거나 상이한 유기체 내의 상동 유전자를 단리하기 위해 사용될 수 있다. 당업자라면 다양한 혼성화 엄격성 정도가 당해 분석법에서 이용될 수 있으며; 혼성화 매질 또는 세척 매질 중 어느 하나가 엄격한 것일 수 있음을 인식할 것이다. 혼성화 조건이 보다 더 엄격해지면, 이중체 형성의 발생을 위해 프로브와 표적 사이의 상보성 정도가 보다 커야 한다. 엄격성 정도는 온도, 이온강도, pH 및 포름아미드와 같은 부분 변성 용매의 존재 중 하나 이상에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 혼성화 엄격성은 예를 들어 포름아미드의 농도를 0% 내지 50%의 범위 내에서 조작함을 통하여 반응물 용액의 극성을 변화시킴으로써 편리하게 변화시킨다. 검출가능한 결합에 필요한 상보성(서열 동일성) 정도는 혼성화 매질 및/또는 세척 매질의 엄격성에 따라 달라질 것이다. 상보성 정도는 최적으로는 100%, 또는 70 내지 100%, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값일 것이다. 그러나, 프로브 및 프라이머에서의 작

은 서열 변이는 혼성화 배지 및/또는 세척 배지의 엄격성을 감소시켜 보상될 수 있음을 이해해야 한다.

[0096] RNA 또는 DNA의 증폭 방법은 당업계에 공지되어 있고 과도한 실험을 실시하지 않으면서, 본 명세서의 교시 사항 및 지침을 기초로 하여 본 발명에 따라 사용될 수 있다. DNA 또는 RNA의 공지된 증폭 방법은 폴리머라제 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR) 및 관련 증폭 공정 (예를 들어, 물리스(Mullis) 등의 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호, 제4,800,159호, 제4,965,188호; 테이버(Tabor) 등의 미국 특허 제4,795,699호 및 제4,921,794호; 이니스(Innis)의 미국 특허 제5,142,033호; 윌슨(Wilson) 등의 미국 특허 제5,122,464호; 이니스의 미국 특허 제5,091,310호; 가일렌스텐(Gyllensten) 등의 미국 특허 제5,066,584호; 겔판드(Gelfand) 등의 미국 특허 제4,889,818호; 실버(Silver) 등의 미국 특허 제4,994,370호; 비스와스(Biswas)의 미국 특허 제4,766,067호; 링골드(Ringold)의 미국 특허 제4,656,134호 참조) 및 이중 가닥 DNA 합성을 위한 주형으로서 표적 서열에 대한 안티센스 RNA를 사용하는 RNA 매개 증폭법 (말렉(Malek) 등의 미국 특허 제5,130,238호, 상표명: NASBA)을 포함하지만, 이에 한정되지 않으며, 상기 참고문헌의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. (예를 들어, 오스벨의 상기 문헌; 또는 샘브룩의 상기 문헌 참조)

[0097] 예를 들어, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 기술은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열 및 관련 유전자를 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 직접 증폭하기 위해 사용될 수 있다. 또한, PCR 및 기타 시험관내 증폭 방법은 예를 들어 발현되는 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 클로닝하고, 샘플 내의 원하는 mRNA의 존재를 검출하기 위한 프로브로서 사용하는 핵산을 제조하거나, 핵산 서열 결정 또는 기타 목적에 유용할 수 있다. 시험관 내 증폭 방법을 통하여 숙련자를 인도하기에 충분한 기술의 예가 베르거(Berger)의 상기 문헌, 샘브룩의 상기 문헌 및 오스벨의 상기 문헌과, 물리스 등의 미국 특허 제4,683,202호 (1987); 및 문헌[Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, Calif. (1990)]에서 찾아진다. 게놈 PCR 증폭을 위해 구매가능한 키트가 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 어드밴티지-지씨 게노믹 PCR 키트(Advantage-GC Genomic PCR Kit) (클론테크(Clontech))를 참조한다. 추가로, 예를 들어, T4 유전자 32 단백질 (뵈링거 만하임(Boehringer Mannheim))은 긴 PCR 생성물의 수율을 개선하기 위해 사용될 수 있다.

[0098] 핵산 제조를 위한 합성 방법

[0099] 본 발명의 단리된 핵산은 또한 공지 방법에 의해 직접적인 화학적 합성으로 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Ausubel, et al., 상기 문헌] 참조). 화학적 합성은 일반적으로 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 생성하는데, 이는 상보성 서열과의 혼성화, 또는 단일 가닥을 주형으로서 사용하여 DNA 폴리머라제에 의한 중합에 의해 이중 가닥 DNA로 전환될 수 있다. 당업자라면 DNA의 화학적 합성이 약 100개 또는 이보다 많은 염기의 서열로 제한될 수 있는 반면, 보다 긴 서열은 더 짧은 서열의 라이게이션에 의해 얻어질 수 있음을 인식할 것이다.

[0100] 재조합 발현 카세트

[0101] 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 재조합 발현 카세트를 추가로 제공한다. 본 발명의 핵산 서열, 예를 들어 본 발명의 항체를 코딩하는 cDNA 또는 게놈 서열은 적어도 하나의 원하는 숙주 세포 내로 도입될 수 있는 재조합 발현 카세트 제조에 사용될 수 있다. 재조합 발현 카세트는 의도하는 숙주 세포 내에서 폴리뉴클레오티드의 전사를 지시하는 전사 개시 조절 서열에 작동가능하게 연결된 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 일반적으로 포함한다. 이종성 및 비-이종성 (즉, 내인성) 프로모터 모두가 본 발명의 핵산의 발현을 지시하기 위해 사용될 수 있다.

[0102] 일부 실시 형태에서, 프로모터, 인핸서, 또는 기타 요소로서 기능하는 단리된 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현을 상향조절 또는 하향조절하기 위해 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 비-이종성 형태의 적절한 위치 (상류, 하류 또는 인트론 내)에서 도입될 수 있다. 예를 들어, 내인성 프로모터는 돌연변이, 결실 및/또는 치환에 의해 생체 내에서 또는 시험관 내에서 변경될 수 있다.

[0103] 벡터 및 숙주 세포

[0104] 또한, 본 발명은 당업계에 공지된 바와 같이, 본 발명의 단리된 핵산 분자, 재조합 벡터에 의해 유전공학적으로 엔지니어링된 숙주 세포, 및 재조합 기술에 의한 적어도 하나의 항-IL-25 항체의 생성에 관한 것이다. 예를 들어, 각각이 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된 샘브룩 등의 상기 문헌; 오스벨 등의 상기 문헌을 참조하라.

[0105] 폴리뉴클레오티드는 숙주 내에서 증식을 위한 선택가능한 마커를 함유하는 벡터에 선택적으로 연결될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 침전물, 예를 들어 인산칼슘 침전물 내에, 또는 하전된 지질과의 복합체 내에 도입된다. 벡터가 바이러스일 경우, 적합한 패키징(packaging) 세포주를 이용하여 시험관내에서 패키징된 후,

숙주 세포 내로 형질도입된다.

[0106] DNA 삽입물은 적합한 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 발현 제작물은 전사 개시, 종결을 위한 부위, 및 전사된 영역에서 번역을 위한 리보좀 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 당해 제작물에 의해 발현된 성숙 전사체의 코딩 부분은 바람직하게는 번역되는 mRNA의 말단에 적절하게 위치한 종결 코돈(예를 들어, UAA, UGA 또는 UAG) 및 시작부의 번역 개시 코돈을 포함할 것이며, 이때 포유류 또는 진핵 세포 발현에는 UAA 및 UAG가 바람직하다.

[0107] 발현 벡터는 바람직하게는 적어도 하나의 선택가능한 마커를 선택적으로 포함할 것이다. 그러한 마커는 예를 들어 진핵 세포 배양을 위한 메토트렉세이트(MTX), 다이하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR, 미국 특허 제4,399,216호; 제4,634,665호; 제4,656,134호; 제4,956,288호; 제5,149,636호; 제5,179,017호, 암피실린, 네오마이신(G418), 마이코페놀산, 또는 글루타민 신테타제(지에스(GS), 미국 특허 제5,122,464호; 제5,770,359호; 제5,827,739호) 내성, 및 이. 콜라이(E. coli) 및 다른 박테리아 또는 원핵생물에 있어서의 배양을 위한 테트라사이클린 또는 암피실린 내성 유전자를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다(상기 특허들은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다). 상기 숙주 세포에 대한 적절한 배양 배지 및 조건은 당업계에 공지되어 있다. 적절한 벡터는 당업자에게 자명하다. 숙주 세포 내로의 벡터 제작물의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질 매개 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 방법은 당업계, 예를 들어 문헌[Sambrook, 상기 문헌, Chapters 1 4 and 16 18]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌, Chapters 1, 9, 13, 15, 16]에 기재되어 있다.

[0108] 본 발명의 적어도 하나의 항체는 융합 단백질과 같은 변형된 형태로 발현될 수 있고, 분비 시그널뿐만 아니라 추가의 이종성 기능성 영역도 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역은 정제 동안, 또는 후속 취급 및 보관 동안에 숙주 세포 내에서의 안정성 및 지속성을 개선시키기 위해 항체의 N-말단에 부가될 수 있다. 또한, 펩티드 모이어티가 정제를 용이하게 하기 위해 본 발명의 항체에 부가될 수 있다. 상기 영역은 항체 또는 그의 적어도 하나의 단편의 최종 제조 전에 제거될 수 있다. 그러한 방법은 많은 표준 실험 매뉴얼, 예를 들어 문헌[Sambrook, 상기 문헌, Chapters 17.29 17.42 and 18.1 18.74]; 문헌[Ausubel, 상기 문헌, Chapters 16, 17 and 18]에 기재되어 있다.

[0109] 당업자는 본 발명의 단백질을 코딩하는 핵산의 발현에 이용가능한 많은 발현 시스템을 잘 알 수 있다.

[0110] 대안적으로, 본 발명의 핵산은 본 발명의 항체를 코딩하는 내인성 DNA를 함유하는 숙주 세포 내에서 (조작에 의한) 턴온(turn on) 에 의해 숙주 세포 내에서 발현될 수 있다. 그러한 방법은 예를 들어 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제5,580,734호, 제5,641,670호, 제5,733,746호, 및 제5,733,761호에 기재되어 있는 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.

[0111] 항체, 그의 특정 부분 또는 변이체의 생성에 유용한 세포 배양물의 예는 포유류 세포이다. 포유류 세포 시스템은 종종 세포의 단일층 형태일 것이지만, 포유류 세포 현탁액 또는 생물반응기도 사용될 수 있다. 온전한 글리코실화 단백질을 발현할 수 있는 많은 적합한 숙주 세포주가 당업계에서 개발되어 있고, 이는 COS-1 (예를 들어, ATCC CRL 1650), COS-7 (예를 들어, ATCC CRL1651), HEK293, BHK21 (예를 들어, ATCC CRL-10), CHO (예를 들어, ATCC CRL 1610) 및 BSC-1 (예를 들어, ATCC CRL-26) 세포주, Cos-7 세포, CHO 세포, hep G2 세포, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293 세포, HeLa 세포 등을 포함하며, 이들은 예를 들어 미국 버지니아주 머내서스 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection) 으로부터 쉽게 입수가능하다 (www.atcc.org). 바람직한 숙주 세포는 림프구양 기원의 세포, 예를 들어 골수종 및 림프종 세포를 포함한다. 특히 바람직한 숙주 세포는 P3X63Ag8.653 세포 (ATCC 기탁 번호 CRL-1580) 및 SP2/0-Ag14 세포 (ATCC 기탁 번호 CRL-1851)이다. 특히 바람직한 실시 형태에서, 재조합 세포는 P3X63Ab8.653 또는 SP2/0-Ag14 세포이다.

[0112] 이들 세포를 위한 발현 벡터는 다음과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 하기 발현 조절 서열들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 복제 기점; 프로모터 (예를 들어, 후기 또는 초기 SV40 프로모터, CMV 프로모터 (미국 특허 제5,168,062호; 제5,385,839호), HSV tk 프로모터, pgk (포스포글리세레이트 키나제) 프로모터, EF-1 알파 프로모터(미국 특허 제5,266,491호), 적어도 하나의 인간 면역글로불린 프로모터; 인핸서, 및/또는 프로세싱 정보 부위, 예를 들어 리보좀 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 (예를 들어, SV40 라지 T Ag 폴리 A 부가 부위) 및 전사 종결 서열. 예를 들어, 오스벨 등의 상기 문헌; 샘브룩 등의 상기 문헌을 참조하라. 본 발명의 핵산 또는 단백질 생산에 유용한 다른 세포는 공지되어 있고/있거나, 예를 들어 세포주 및 하이브리도마의 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션 카탈로그(American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas) (www.atcc.org) 또는 다른 공지의 또는 상업적 공급원으로부터 이용가능하다.

[0113] 진핵 숙주 세포가 사용될 경우, 폴리아데닐화 또는 전사 종결자 서열은 일반적으로 벡터 내에 혼입된다. 종결자 서열의 예로는 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 서열이 있다. 전사체의 정확한 스플라이싱을 위한 서열도 포함될 수 있다. 스플라이싱 서열의 예는 SV40 유래의 VP1 인트론이 있다 (문헌[Sprague, et al., J. Virol. 45:773 781 (1983)]). 추가로, 숙주 세포 내의 복제를 조절하는 유전자 서열은 당업계에 공지된 바와 같이 벡터 내로 혼입될 수 있다.

[0114] 조성물

[0115] 본 발명은 또한 본 발명에 기재되고/되거나 당업계에 공지된 적어도 하나, 적어도 2가지, 적어도 3가지, 적어도 4가지, 적어도 5가지, 적어도 6가지의 또는 그보다 더 많은 표적 결합 구성원을 포함하는 적어도 하나의 표적 결합 구성원 조성물을 제공하며, 이는 자연 비발생 조성물, 혼합물 또는 형태로 제공된다. 이러한 조성 비율은 당업계에 공지되거나 본 발명에 기재된 바와 같이, 액체 또는 무수 용액, 혼합물, 현탁액, 에멀전, 또는 콜로이드로서 중량, 부피, 농도, 몰 농도, 몰랄 농도를 기준으로 한 것이다.

[0116] 본 발명의 조성물은 그러한 조절, 처치 또는 치료법이 필요한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에 대한 적어도 하나의 항-IL-25 표적 결합 구성원을 포함하는 적어도 하나의 임의의 적합하고 유효한 양의 조성물 또는 약학 조성물을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 선택적으로 적어도 하나의 TNF 길항제 (예를 들어, TNF 항체 또는 단편, 가용성 TNF 수용체 또는 단편, 그의 융합 단백질, 또는 소분자형 TNF 길항제, 그러나 이에 한정되지 않음), 항류머티즘제 (예를 들어, 메토트렉세이트, 아우라노핀, 아우로티오글루코스, 아자티오프린, 에타네르셉트, 금나트륨 티오말레이트, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 레플루노마이드, 설파살진), 근육 이완제, 마약, 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 진통제, 마취제, 진정제, 국소 마취제, 신경근 차단제, 항미생물제 (예를 들어, 아미노글리코시드, 항진균제, 구충제, 항바이러스제, 카르바페넴, 세팔로스포린, 플루오르퀴놀론, 마크롤리드, 페니실린, 설폰아미드, 테트라사이클린, 다른 항미생물제), 건선치료제, 코르티코스테로이드, 단백동화 스테로이드, 당뇨병 관련 약제, 미네랄, 영양제, 갑상선제, 비타민, 칼슘 관련 호르몬, 지사제, 진해약, 구토방지제, 항궤양제, 완하제, 항응고제, 에리트로포이에틴 (예를 들어, 에포에틴 알파), 필그라스팀 (예를 들어, G-CSF, 뉴포겐(Neupogen)), 사르그라모스팀 (GM-CSF, 류카인(Leukine)), 면역제, 면역글로불린, 면역억제제 (예를 들어, 바실릭시맙, 사이클로스포린, 다클리주맙), 성장 호르몬, 호르몬 대체 약물, 에스트로겐 수용체 조절제, 산동제, 조절마비제, 알킬화제, 항대사물질, 유사분열 억제제, 방사성 의약품, 항우울제, 항조병제, 항정신병약, 불안 완화제, 수면제, 교감신경흥분제, 흥분제, 도네페질, 타크린, 천식 약물, 베타 작용제, 흡입 스테로이드, 류코트라이엔 억제제, 메틸잔틴, 크로몰린, 에피네프린 또는 유사체, 도르나제 알파 (풀모자임(Pulmozyme)), 사이토카인 또는 사이토카인 길항제로부터 선택된 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다. 그러한 사이토카인의 비제한적인 예는 IL-1 내지 IL-23 중 임의의 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적절한 투여량은 당업계에 공지되어 있다 예를 들어, 문헌[Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000)]; 문헌[PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000)]을 참조하며, 상기 참고문헌 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다.

[0117] 상기 항암제 또는 항감염제는 적어도 하나의 본 발명의 항체와 회합, 결합, 공동-제형화 또는 공동 투여되는 독소 분자를 또한 포함할 수 있다. 독소는 선택적으로 병적 세포 또는 조직을 선택적으로 죽이는 작용을 할 수 있다. 병적 세포는 암 또는 다른 세포일 수 있다. 상기 독소는 독소의 적어도 하나의 기능적 세포독성 도메인, 예를 들어 리신, 디프테리아 독소, 뱀독소, 또는 세균 독소로부터 선택된 것을 포함하는 정제된 또는 재조합 독소 또는 독소 단편일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 용어 "독소"는 인간 및 기타 포유류에서 죽음에 이를 수도 있는 독소 쇼크를 포함하는 임의의 병적 상태를 일으킬 수 있는 임의의 자연 발생, 돌연변이 또는 재조합 세균 또는 바이러스에 의해 생성될 수 있는 내독소 또는 외독소를 모두 포함한다. 상기 독소는 장독성 이. 콜라이 열-불안정성 장독소(LT), 열-안정성 장독소(ST)), 시겔라(Shigella) 세포독소, 아에로모나스(Aeromonas) 장독소, 독성 쇼크 증후군 독소-1(toxic shock syndrome toxin-1; TSST-1), 스타필로코커스 장독소 A(Staphylococcal enterotoxin A; SEA), B (SEB), 또는 C (SEC), 스타필로코커스 장독소류 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 그러한 박테리아는 장독성 이. 콜라이(ETEC) 종, 장출혈 이. 콜라이 종 (예를 들어, 혈청형 0157:H7의 균주), 스타필로코커스(Staphylococcus) 종 (예를 들어, 스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 스타필로코커스 피오게네스(Staphylococcus pyogenes)), 시겔라 종 (예를 들어, 시겔라 디센테리아에(Shigella dysenteriae), 시겔라 플렉스네리(Shigella flexneri), 시겔라 보이디이(Shigella boydii), 및 시겔라 손네이(Shigella sonnei)), 살모넬라(Salmonella) 종 (예를 들어, 살모넬라 티피이(Salmonella thphyi), 살모넬라 콜레라-수이스(Salmonella cholera-suis), 살모넬라 엔테리티디스

(Salmonella enteritidis)), 클로스트리디움(Clostridium) 종 (예를 들어, 클로스트리디움 페르프린겐스(Clostridium perfringens), 클로스트리디움 디피실레(Clostridium dificile), 클로스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum)), 캄플로박터(Camphlobacter) 종 (예를 들어, 캄플로박터 제주니(Camphlobacter jejuni), 캄플로박터 페투스(Camphlobacter fetus)), 헬리오박터 종(헬리오박터 파일론(Heliobacter pylon)) , 아에로모나스(Aeromonas) 종 (예를 들어, 아에로모나스 소브리아(Aeromonas sobria), 아에로모나스 하이드로필라(Aeromonas hydrophila), 아에로모나스 카비아에(Aeromonas caviae)), 플레이소모나스 시겔로이데스(Pleisomonas shigelloides), 예르시나 엔테로콜리티카 (Yersina enterocolitica), 비브리오스(Vibrios) 종 (예를 들어, 비브리오스 콜레라에(Vibrios cholerae), 비브리오스 파라헤몰리티쿠스(Vibrios parahemolyticus)), 클렙시엘라(Klebsiella) 종, 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa), 및 스트렙토코커스(Streptococci) 균주를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1 13, Little, Brown and Co., Boston, (1990)]; 문헌[Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239 254, Plenum Medical Book Co., New York (1991)]; 문헌[Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, N.Y. (1990)]; 문헌[Berkow et al, eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992]; 문헌[Wood et al, FEMS Microbiology Immunology, 76:121 134 (1991)]; 문헌[Marrack et al, Science, 248:705 711 (1990)]을 참조하는데, 상기 참고문헌의 내용은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다.

[0118] 본 발명의 조성물은 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친유성 용매, 보존제, 아쥬번트 등과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 적어도 하나의 임의의 적합한 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 보조제가 바람직하다. 그러한 살균 용액의 제조 방법의 비제한적 예는 문헌[Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990]과 같은 그러나 이에 한정되지 않는 본 기술 분야에 공지되어 있다. 당업계에 공지되거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 항-IL-25 표적 결합 구성원, 단편 또는 변이체 조성물의 투여 양식, 용해도 및/또는 안정성에 적합한 약학적으로 허용가능한 담체가 통상적으로 선택될 수 있다.

[0119] 본 발명의 조성물에 유용한 약학적 부형제 및 첨가제는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질 및 탄수화물(예를 들어, 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류 및 올리고당류; 유도체화된 당류, 예를 들어 알디톨, 알돈산, 에스테르화 당류 등; 및 다당류 또는 당 중합체를 포함하는 당류)을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 이는 단독으로 또는 조합되어 존재할 수 있고, 이는 단독의 또는 조합된 1 99.99 중량% 또는 부피%로 포함된다. 예시적인 단백질 부형제는 인간 혈청 알부민 (HSA), 재조합 인간 알부민 (rHA), 젤라틴, 카제인 등과 같은 혈청 알부민을 포함한다. 완충 용량에서 또한 기능할 수 있는 대표적인 아미노산/항체 성분은 알라닌, 글라이신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 류신, 아이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함한다. 바람직한 아미노산은 글라이신이다.

[0120] 본 발명에서 사용하기에 적합한 탄수화물 부형제는 예를 들어 단당류, 예컨대 프룩토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등; 이당류, 예를 들어 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로바이오스 등; 다당류, 예를 들어 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 덱스트란, 전분 등; 및 알디톨, 예를 들어 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨(글루시톨), 미오이노시톨 등을 포함한다. 본 발명에 사용하기 바람직한 탄수화물 부형제는 만니톨, 트레할로스, 및 라피노스이다.

[0121] 본 조성물은 완충제 또는 pH 조정제를 또한 포함할 수 있으며; 전형적으로, 완충제는 유기 산 또는 염기로부터 제조되는 염이다. 대표적인 완충제는 시트르산, 아스코르브산, 글루콘산, 탄산, 타르타르산, 석신산, 아세트산, 또는 프탈산의 염과 같은 유기산염; 트리스, 트로메타민 염산, 또는 인산염 완충제를 포함한다. 본 발명에서 사용하기 바람직한 완충제는 시트레이트와 같은 유기산 염이다.

[0122] 추가로, 본 발명의 조성물은 폴리비닐피롤리돈, 피콜 (중합체성 당), 덱스트레이트 (예를 들어, 2-하이드록시프로필-.베타.-사이클로덱스트린과 같은 사이클로덱스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 착향제, 항미생물제, 감미제, 산화방지제, 정전기 방지제, 계면활성제 (예를 들어, "트윈(TWEEN) 20" 및 "트윈 80"과 같은 폴리소르베이트), 지질 (예를 들어, 인지질, 지방산), 스테로이드 (예를 들어, 콜레스테롤), 및 킬레이팅제 (예를 들어, EDTA)와 같은 중합체성 부형제/첨가제를 포함할 수 있다.

[0123] 본 발명에 따른 조성물에서 사용하기에 적합한 이들 및 추가의 공지된 약학적 부형제 및/또는 첨가제는 예를 들어 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995)] 및 문

헌["Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998)]에 열거된 바와 같이 당업계에 공지되어 있으며, 상기 문헌의 개시 내용은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 바람직한 담체 또는 부형제 물질은 탄수화물 (예를 들어, 당류 및 알디톨) 및 완충제 (예를 들어, 시트레이트) 또는 중합체 물질이다.

[0124] 치료적 응용

[0125] 일 태양에서, 본 발명은 처치를 필요로 하는 대상(예를 들어, 인간)에서 기도 과민반응성을 예방하거나 또는 감소시키는 방법을 제공하며, 이는 대상에게 IL-25에 결합하는 표적 결합 구성원, 특히 항체 분자를 투여하는 단계를 포함한다. 다른 태양에서, 본 발명은 처치를 필요로 하는 대상에서 천식을 예방하거나, 감소시키거나 또는 치료하는 방법을 제공하며, 이는 대상에게 IL-25에 결합하는 표적 결합 구성원, 특히 항체 분자를 투여하는 단계를 포함한다. 천식은 알러지성 천식을 포함한다.

[0126] 상기 방법들은 IL-25가 그 역할을 하는 다양한 질환 및 질병에서 치료적 잠재성을 갖는, IL-25에 결합하며 바람직하게는 그의 작용을 길항하는 데 유용한 본 발명에 따른 표적 결합 구성원(그 조성물을 포함함)을 이용하여 실행될 수 있다. 천식에 더하여, 그러한 질환은 염증과 결부된 다른 병태, 예를 들어 염증성 장질환(IBD), 예를 들어, 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한다. 본 방법은 또한 첨부된 실시예에서 하기에 기재된 바와 같이 얻어질 수 있는, IL-25에 결합하는 다른 표적 결합 구성원(그 조성물을 포함함)을 이용하여 실행될 수 있다.

[0127] 본 발명에 따른 표적 결합 구성원 (그 조성물을 포함함)은 인간 또는 동물 대상에서 치료(예방적 치료를 포함함) 또는 진단 방법에서 사용될 수 있다. 그러한 치료 또는 진단(이는 예방적 치료를 포함할 수 있음) 방법은 상기 대상에게 유효량의 본 발명의 표적 결합 구성원을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 예시적인 질환 및 질병이 하기에 추가로 논의된다.

[0128] 인간 또는 동물 대상에게 투여하기 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 표적 결합 구성원(그 조성물을 포함함)의 용도가 또한 제공된다.

[0129] 항-IL-25 표적 결합 구성원이 치료 효과를 제공하기 위하여 사용될 수 있는 임상 징후는 IL-25가 병리학적 결과를 갖는 임의의 병태를 포함한다. 따라서, 일반적으로 본 발명의 표적 결합 구성원은 원하지 않는 Th2 반응 또는 제2형 반응과 결부된 임의의 병태의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 표적 결합 구성원은 알러지 및 천식, 특히 천식의 치료에 사용될 수 있다.

[0130] 항-IL-25 치료는 주사에 의해(예를 들어, 정맥내) 또는 국소 전달법에 의해 주어질 수 있다. 항-IL-25는 유전자 매개 기술에 의해 전달될 수 있다. 대안적인 제형 전략은 경구 또는 좌약적 경로에 적합한 제제를 제공할 수 있다. 투여 경로는 효능을 최적화하기 위하여 또는 부작용을 최소화하기 위하여 질환에 대한 특수 고려 사항에 의해 당해 처치의 물리화학적 특징에 의해 결정될 수 있다.

[0131] 본 발명에 따르면, 제공된 조성물은 개체에게 투여될 수 있다. 투여는 바람직하게는 "치료적 유효량"인 것이며, 이는 환자에게 효과를 나타내기에 충분하다. 그러한 효과는 적어도 하나의 증상을 적어도 완화시키는 것일 수 있다. 실제 투여량, 및 투여 속도 및 시간 코스는 치료되는 것의 성질 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 치료제의 처방전, 예를 들어 투여량에 대한 결정 등은 일반의 및 다른 의사의 책임 이내이다. 항체의 적절한 용량은 당업계에 잘 알려져 있으며; 문헌[Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664]; 문헌[Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922]을 참조하라.

[0132] 정확한 용량은 항체가 진단용인지 치료용인지, 치료될 영역의 크기 및 위치, 항체(전 항체, 단편 또는 다이아바디(diabody))의 정확한 성질, 및 항체에 부착된 임의의 검출가능한 표지체 또는 다른 분자의 성질을 포함하는 다수의 요인에 따라 달라질 것이다. 전형적인 항체 용량은 0.5 ㎎ - 1.0 g의 범위 내일 것이며, 이는 정맥내로 볼루스로서 또는 적절한 경우 수시간에 걸친 주입물로서 투여되어 필요한 용량을 성취할 수 있다. 다른 투여 양식은 유사한 전체 누적 용량을 성취하기 위한, 수시간에 걸친 정맥내 주입을 포함한다. 이는 성인 환자의 단회 처치 용량이며, 이는 아동 및 유아에 대하여 비례적으로 조정될 수 있으며, 또한 분자량에 비례하여 다른 항체 포맷에 대하여 조정될 수 있다. 처치는 의사의 재량에 따라 매일, 주 2회, 매주 또는 매달 간격으로 반복될 수 있다.

[0133] 추가의 투여 양식은 내재 기구의 사전 코팅 또는 달리 상기 기구 내로의 혼입을 이용하며, 그를 위해서는 항체의 최적의 양이 적절한 실험에 의해 결정될 것이다.

[0134] 본 발명의 일부 바람직한 실시 형태에서 항체 분자는 단량체성 단편, 예를 들어 F(ab) 또는 scFv이다. 그러한 항체 단편은 상대적으로 짧은 반감기 및 덜한 혈소판 활성화 (수용체 클러스터링(clustering)에 의해 야기될 수 있음) 위험의 이점을 가질 수 있다. 혈소판 활성화를 일으키는 클러스터링은 예를 들어 IL-25 분자의 것이거나 IL-25와 FcγRII 분자와의 것일 수 있다.

[0135] 전 항체가 사용될 경우, 이것은 바람직하게는 혈소판을 활성화할 수 없고/없거나 파괴할 수 없는 형태로 존재한다. IgG4 아이소타입 또는 대안적으로는 "디자이너(designer)" 아이소타입(IgG1 골격으로부터 유래됨) (신규한 Fc 유전자 제작물, 국제특허 공개 WO99/58572호, 클라크(Clark), 아머(Armour), 윌리엄슨(Williamson))이 바람직한 선택이다. 더 작은 항체 단편, 예를 들어 F(ab')2가 사용될 수 있다. 게다가, 이중 에피토프 특이성(예를 들어, scFv 2C3에 의해 인식되는 에피토프에 대한 것)을 갖는 전 항체 또는 단편(예를 들어, F(ab')2 또는 다이아바디)이 사용될 수 있다. 그러한 실시 형태는 수용체 클러스터링을 촉진할 수 있지만, 개개의 수용체에 대한 높은 회합 속도는 이 문제를 배제시킬 수 있다.

[0136] 본 발명의 표적 결합 구성원은 일반적으로 약학 조성물의 형태로 투여될 것이며, 상기 조성물은 표적 결합 구성원에 더하여 적어도 하나의 성분을 포함할 수 있다.

[0137] 본 발명의 표적 결합 구성원은 치료할 병태에 따라 동시에 또는 순차적으로, 단독으로 또는 다른 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 다른 처치는 적합한 용량의 통증 완화약, 예를 들어 비스테로이드성 항염증약(예를 들어, 아스피린, 파라세타몰, 이부프로펜 또는 케토프로펜) 또는 오피에이트, 예를 들어 모르핀의 투여; 항구토제의 투여; 또는 천식에 대하여 활성을 갖는 적어도 하나의 다른 화합물, 일반적으로 기도 이완을 생성하거나 또는 점액 제거(mucus clearance)를 향상시키는 기관지 확장제, 예를 들어 베타-작용제(예를 들어, 살부타몰, 살메테롤), 다이소듐 크로모글리케이트, 스테로이드, 또는 PDEIV의 억제제의 투여를 포함할 수 있다.

[0138] 분석 방법

[0139] 본 발명은 본 발명에서 제공된 표적 결합 구성원의 IL-25에의 결합을 야기하거나 또는 허용하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 나타낸 바와 같이, 그러한 결합은 예를 들어 표적 결합 구성원, 또는 표적 결합 구성원을 코딩하는 핵산의 투여 후 생체 내에서 일어날 수 있거나, 또는 이것은 시험관 내에서, 예를 들어 ELISA, 바이아코어(Biacore) 분석, 옥테트(Octet) 분석, 웨스턴(Western) 블로팅, 면역 세포 화학, 면역침전 또는 친화성 크로마토그래피에서 일어날 수 있다.

[0140] IL-25에의 표적 결합 구성원의 결합의 양이 결정될 수 있다. 정량화는 진단적으로 관심이 있을 수 있는 시험 샘플 중 항원의 양에 관련될 수 있다.

[0141] 샘플에서의 항체의 반응성은 임의의 적절한 수단에 의해 결정될 수 있다. 방사 면역 측정법(Radioimmunoassay; RIA)이 하나의 가능성이다. 방사성 표지 항원은 비표지 항원(시험 샘플)과 혼합되며 항체에의 결합이 허용된다. 결합된 항원은 미결합 항원으로부터 물리적으로 분리되며, 항체에 결합된 방사성 항원의 양이 결정된다. 시험 샘플 중에 항원이 더 많을수록 더 적은 방사성 항원이 항체에 결합할 것이다. 경쟁적 결합 분석법은 리포터 분자에 연결된 항원 또는 유사체를 사용하여 비방사성 항원과 함께 사용될 수 있다. 리포터 분자는 스펙트럼상 단리된 흡광 또는 발광 특징(spectrally isolated absorption or emission characteristics)을 갖는 형광색소, 인광체 또는 레이저 염료일 수 있다. 적합한 형광색소는 플루오레세인, 로다민, 피코에리트린 및 텍사스 레드(Texas Red)를 포함한다. 적합한 발색성 염료는 다이아미노벤지딘을 포함한다.

[0142] 다른 리포터는 거대분자형 콜로이드성 입자 또는 미립자 물질, 예를 들어 착색된 라텍스 비드, 시각적으로 관찰되거나, 전자적으로 탐지되거나 또는 달리 기록되는 검출가능한 시그널을 직접적으로 또는 간접적으로 야기할 수 있는 자성 또는 상자성, 및 생물학적 또는 화학적 활성제를 포함한다. 이들 분자는 예를 들어 색을 발색시키거나 또는 변화시키는 또는 전기적 특성의 변화를 야기하는 반응을 촉매하는 효소일 수 있다. 상기 분자는 에너지 상태들 사이의 전자 전이가 특징적인 스펙트럼 흡광 또는 발광으로 이어지도록 분자적으로 여기가능할 수 있다. 상기 분자는 바이오센서와 함께 사용되는 화학적 엔티티를 포함할 수 있다. 바이오틴/아비딘 또는 바이오틴/스트렙타비딘 및 알칼리 포스파타제 검출 시스템이 이용될 수 있다.

[0143] 개개의 항체-리포터 컨쥬게이트에 의해 생성된 시그널을 이용하여 샘플(정상 및 시험) 중 관련 항체 결합의 정량가능한 절대적 또는 상대적 데이터를 유도할 수 있다.

[0144] 본 발명은 또한 경쟁적 분석법에서 항원 수준을 측정하는 데 있어서 상기와 같은 표적 결합 구성원의 사용을 제공하며, 즉, 말하자면 경쟁적 분석법에서 본 발명에 의해 제공되는 표적 결합 구성원을 이용함으로써 샘플 중

항원의 수준을 측정하는 방법을 제공한다. 이는 미결합 항원으로부터의 결합된 것의 물리적 분리가 필요하지 않은 경우일 수 있다. 물리적 또는 광학적 변화가 결합시에 일어나도록 표적 결합 구성원에 리포터 분자를 연결하는 것이 하나의 가능성이다. 리포터 분자는 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한, 그리고 바람직하게는 측정가능한 시그널을 생성할 수 있다. 리포터 분자의 연결은 직접적인 또는 간접적인, 공유 결합에 의한, 예를 들어 펩티드 결합을 통한 또는 비-공유 결합에 의한 것일 수 있다. 펩티드 결합을 통한 연결은 항체 및 리포터 분자를 코딩하는 유전자 융합물의 재조합적 발현의 결과로서의 것일 수 있다.

[0145] 본 발명은 또한 예를 들어 바이오센서 시스템에서 본 발명에 따른 표적 결합 구성원을 이용함으로써 직접적으로 항원의 수준을 측정하는 것을 제공한다.

[0146] 당업자라면 그가 선호하는 것 및 일반 지식에 따라 적합한 양식 또는 결합을 선택할 수 있다.

[0147] 실시예

[0148] 본 발명의 예시적인 실시 형태에 대한 설명이 뒤따른다.

[0149] 실시예 1: 고친화도 인간화 IL-25 항체, M6의 생성

[0150] 쥐과 2C3 단클론 항-IL25 항체의 인간화(CDR-그래프팅) 버전인 huDDG91을 IL-25에 대하여 결합 친화도가 개선된 변이체의 생성을 위한 모 분자로 선택하였다. 리더 서열을 제외한 huDDG91의 카파 경쇄 서열이 도 1에 예시되어 있으며 (서열 번호 2), 여기서 카밧에 의해 정의된 CDR 루프의 아미노산 서열은 밑줄이 그어져 있다. huDDG91 중쇄의 서열(서열 번호 4)이 도 2에 예시되어 있으며, 여기서 카밧에 의해 정의된 CDR의 아미노산 서열은 밑줄이 그어져 있다. huDDG91은 RH2.5_R71V로도 공지되어 있다. 쥐과 2C3 단클론 항-IL25 항체의 생성 및 특성화는 2008년 10월 30일자로 국제특허 공개 WO2008/129263으로 공개된 국제 특허 출원 제PCT/GB2008/001365호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다.

[0151] huDDG91의 변이체를 생성하기 위하여, huDDG91 서열을 기반으로 한 파지 디스플레이 라이브러리를 표준 방법을 이용하여 제작하였다. Fab 라이브러리를 바이오티닐화 IL-25에 대하여 패닝하였다(panned). ELISA에 의해 huDDG91(IgG4)에 비견되거나 또는 그보다 더 우수한 결합을 나타내는 Fab를 선발하였다.

[0152] Fab를 하기와 같이 mAb로 전환시켰다. 5가지의 상이한 경쇄 및 5가지의 상이한 중쇄(huDDG91 경쇄 및 중쇄를 포함함)의 조합 라이브러리를 설계하였다. 라이브러리에서 사용한 경쇄 및 중쇄는 경쇄 CDR1 및 CDR3 아미노산 서열과 중쇄 CDR 3 서열에 있어서 서로와 상이하였다. 이들 경쇄 및 중쇄를 이용하여, 총 25가지의 mAb(IgG1)를 제작하고, 소규모로 HEK293 세포에서 발현시키고, 정제하였다. mAb 각각을 IL-25 결합 친화성, 세포 저해, 및 수용체 저해에 대하여 하기와 같이 시험하였다:

[0153] · IL-25 결합 친화성을 표준 IL-25 ELISA 및 바이아코어 결합 분석법을 이용하여 결정하였다. 인간 IL-25에 있어서 K_D가 50 pM 미만이고 인간 IL-17A, C, D 및 F에 있어서 K_D가 100 nM 초과인 후보를 선발하였다;

[0154] · 세포 저해를 표준 TK-10 인간 신장 암종 세포-기반 분석법(IL-25 반응성; IL-25 및 IL-8 정보 판독; 가용성 IL-25R과 모 mAb 사이의 차이를 식별할 수 있음) 및 CD4+ T 세포-기반 분석법을 사용하여 평가하였다. TK-10 분석법에 있어서, 모 huDDG91 항체보다 더 낮은 IC50 및 >90%의 10 nM mAb 농도에서의 IL-25 방출의 저해율을 디스플레이하는 mAb를 선발하였다. CD4+ T 세포 분석법에 있어서, 모 huDDG91이 나타낸 것 이상인 IL-5 생성의 저해를 야기하는 mAb를 선발하였다;

[0155] · 변형된 비드-기반 전기 화학 발광 면역분석법(electrochemiluminescence immunoassay; ECLIA)을 사용하여 수용체 저해를 평가하였다. 10 nM mAb 농도에서의 모 huDDG91 항체에 비하여 수용체에의 IL-25 결합의 IC50의 3배 초과의 감소를 야기하는 후보를 선발하였다.

[0156] 이들 기준을 기반으로 하여, 9가지의 후보 mAb를 선발하였다 (도 3). 모든 후보는 HEK293에서 발현시키고 표준 프로토콜을 이용하여 정제할 때 바람직한 SE-HPLC 및 SDS-PAGE 프로필을 디스플레이하였고 허용가능한 발현 수준을 나타냈다. 이어서 이들 9가지의 후보를 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary; CHO) 세포에서 10 L 규모로 일시적으로 발현시키고, Mab 셀렉트(Select) SuRe (지이 헬스케어 라이프 사이언시즈(GE Healthcare Life Sciences))를 사용하여 정제하고, 완충제를 인산염 완충 염수(PBS)로 교환하고, 농축시켰다. 9가지의 후보 mAb 각각에 대한 IL-25 결합 친화도는 huDDG91과 비교하여 유의하게 개선되었다. mAb 각각을 일상적인 기술 및 분석법을 이용하여 발현 수준, 아이덴티티(identity) (SDS-PAGE), 용해도, 응집 (SE-HPLC), 번역 후 변형, 단백질-단백질 상호작용 및 산화에 대하여 또한 시험하였다. 몇몇의 후보 mAb는 CHO에서 발현시키고,

정제하고, 표준 조건 하에 프로세싱할 때 농축 동안의 침전, 낮은 수율 및/또는 바람직하지 못한 SDS-PAGE 및 SE-HPLC 프로필을 디스플레이하였다.

[0157] M6으로 표기한 하나의 mAb를 탁월한 발현 수준, 높은 용해도, 정제시의 상당한 단백질 응집의 결여, 및 원하지 않는 번역 후 변형, 단백질-단백질 상호작용 및 정제시의 산화의 부재를 기반으로 하여 추가의 연구용으로 선발하였다.

[0158] 실시예 2: M6 항체의 특성화

[0159] 재료 및 방법

[0160] LS 174T 인간 결장 상피 세포 분석

[0161] 인간 결장 상피 세포주 LS 174T (CL-188)를 ATCC (미국 버지니아주 매너서스 소재)로부터 획득하고, 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신이 보충된 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM) (미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로겐(Invitrogen)에서 37℃에서 5% CO_2 하에 유지하였다. 세포를 총 100 ㎕의 부피로 1×105개의 세포/㎖의 밀도로 96웰 조직 배양 플레이트에 접종하고 하룻밤 부착시켰다. IL-25 항체(M6 및 M9)는 일정한 양의 IL-25 단백질 (10 ng/㎖의 최종 농도)을 3배 희석 시리즈로 또는 로그의 절반의 희석 시리즈로 적정한 다양한 양의 항-IL-25 항체와 혼합하여 재조합 인간 IL-25 단백질 (센토코르(Centocor)) 과 사전 복합체를 형성시키고, 37℃에서 1 hr 동안 인큐베이션하였다. 세포 배양 배지를 부드럽게 흡인하고, IL-25 단백질 / IL-25 항체 복합체로 대체하고, 이어서 세포를 18-22 hr 동안 하룻밤 인큐베이션하였다. 이어서 배양 플레이트를 1200 rpm에서 2분 동안 원심분리하여 세포 잔해의 이월을 없애고, 이어서 상청액을 수집하고, ELISA 포맷 (미국 미네소타주 미니애폴리스 소재의 알앤디 시스템즈(R&D Systems))을 이용하여 GROa에 대하여 분석하였다.

[0162] 결과

[0163] M6의 서열 분석에 의하면 huDDG91 서열에 비하여 총 3개의 아미노산 치환이 나타났으며, 이들 전부는 경쇄의 CDR3에 존재하였다 (도 3 참조). M6의 경쇄 (서열 번호 5) 및 중쇄 (서열 번호 9) 및 그 CDR의 아미노산 서열이 도 4에 예시되어 있다.

[0164] M6은 바이아코어에 의하면 인간 IL-25에 대한 결합 친화도가 인간 IL25에 대한 huDDG91의 친화도보다 3-5배 더 높은 것으로 결정되었다 (도 3). 게다가, M6은 IL-25에 대하여 선택적이었으며, 그 이유는 이것이 인간 IL-17A, C, D 또는 F에 결합하지 않기 때문이었다. M6의 종간 교차 반응성을 게먹이 원숭이(cynomolgus monkey) I2-25 사이노(cyno)IL-25 및 설치류(생쥐) IL-25에서 평가하였다. 사이노IL-25와의 종간 교차 반응성을 5배의 인간 IL-25 내에서의 친화도, 수용체 리간드에서의 저해 및 TK-10 세포 기반 분석법에 의해 나타냈다. 이들 기준을 이용하여, 사이노- 및 생쥐 IL-25 둘 모두에 M6이 결합함을 결정하였다.

[0165] 실시예 1에서 설명한 세포 기반 분석법을 이용하면, M6은 huDDG91에 비하여 증가된 수용체 저해를 나타내어서 huDDG91과 비교하여 3배 초과의 IC50 감소를 디스플레이하는 것으로 밝혀졌다 (도 3). 게다가, 실시예 1에서 설명한 세포 기반 분석법을 이용하면, M6은 huDDG91과 비교하여 인간 IL25의 증가된 세포 저해를 디스플레이하였다 (도 3 및 도 5). 이러한 결과는 상기에 설명한 바와 같이 실시한 LS 174T 인간 결장 상피 세포 분석에 의해 확인하였다 (도 6a 및 도 6b).

[0166] 실시예 3: M6에 의해 인식되는 인간 IL-25에서의 에피토프의 H/D-교환 지도화

[0167] 개요

[0168] M6 항체에 의해 인식되는 인간 IL-25에서의 추정 에피토프를 엑스사르 코포레이션(ExSar Corporation; 미국 뉴저지주 몬머스 정션)에 의해 실시되는 엑스사르™ 수소/중수소 교환 질량 분광법을 이용하여 지도화하였다.

[0169] 재료 및 방법

[0170] I. IL-25의 분해/분리의 최적화

[0171] (1) 얼음 상에서 IL-25를 해동시킴

[0172] (2) 18 × 100 ㎕ 분취물로의 분할 및 하나를 제외한 이들의 냉동

[0173] (3) 10 ㎕의 0.28 mg/㎖ (16.6 μM)의 IL-25와 30 ㎕의 pH 7.0의 물 중 PBS를 혼합시킴 → [IL-25] = 0.07 mg/

㎖ (4.2 μM)

[0174] (4) 40 ㎕의 (3)과 다양한 켄칭 용액을 혼합시킴

[0175] (5) 55 ㎕를 엑스사르 시스템 내로 주입함

[0176] (6) 샘플을 완충제 A (H2O 중 0.05% TFA) 중 200 ㎕/min으로 고정화 펩신 컬럼 위에 통과시킴

[0177] (7) 펩신 처리 단편을 역상 트랩 컬럼 상에 로딩하고 완충제 A를 이용하여 200 ㎕/min으로 3 min 동안 탈염시킴

[0178] (8) 펩신 처리 펩티드를 23 min 내의 13% → 40%의 완충제 B (95% 아세토니트릴, 5% H2O, 0.0025% TFA)의 선형 구배를 이용하여 C18 컬럼에 의해 분리함

[0179] (9) 펩티드를 질량 분광법에 의해 검출함

[0180] II. M6의 고정화

[0181] 4.1. M6의 고정화를 위한 실험 절차

[0182] <수지 상에서의 항체의 컨쥬게이션>

[0183] (1) 얼음 상에서 1.5 ㎖의 0.96 ㎎/㎖ M6을 해동시킴

[0184] (2) 400 ㎕를 사용함 (사용하지 않은 재료는 재냉동함)

[0185] (3) 4 ㎎ $NaCNBH_3$ (87.5 μmol)을 1.5 ㎖ 스크류 톱 바이알(screw top vial)에 첨가함 → 1 g의 포로스 알 (POROS AL) 당 40 ㎎의 $NaCNBH_3$

[0186] (4) 400 ㎕의 항체 용액을 바이알에 첨가함

[0187] (5) 포로스 알 수지의 첨가 전에 $NaCNBH_3$ 용해를 확실하게 함

[0188] (6) 100 ㎎의 포로스 알을 바이알 내에 넣음

[0189] (7) 3 h 동안 진탕하면서 실온에서 커플링 반응물을 인큐베이션함

[0190] (8) 400 ㎕의 총 부피의 2.8 M Na_2SO_4를 5 × 80 ㎕의 부분씩, 시간 당 한 부분을 첨가함 → [항체] = 0.48 ㎎/㎖, [$NaCNBH_3$] = 5.0 ㎎/㎖ [Na_2SO_4] = 1.4 M.

[0191] (9) 상기 혼합물을 실온에서 하룻밤 진탕함

[0192] (10) 상기 혼합물을 필터 깔때기를 사용하여 다량의 pH 7.0의 PBS 완충제를 이용하여 세척함

[0193] <캡핑(capping)>

[0194] (11) 250 ㎕의 에탄올아민 (FW = 61.08, 밀도 = 1.012 g/㎖, 8.3 mmol, 대략 1 M)을 3.5 ㎖의 pH 7.0의 PBS에 혼합시키고 이 용액의 pH를 빙초산 (대략 200 ㎕)으로 pH 7.2로 조정함으로써 캡핑 용액을 제조함. 상기 용액의 최종 부피는 4 ㎖에 가까움.

[0195] (12) 4 ㎎의 NaCNBH3을 500 ㎕의 캡핑 용액에 용해시킴 → [$NaCNBH_3$] = 8 ㎎/㎖, [에탄올아민] = 대략 1 M.

[0196] (13) $NaCNBH_3$ 용액 중에 세척 건조 수지를 재현탁시킴

[0197] (14) 실온에서 2 h 동안 진탕함

[0198] (15) 혼합물을 필터 깔때기를 사용하여 다량의 pH 7.0의 PBS를 이용하여 여과 및 세척함.

[0199] (16) 수지 케이크를 pH 7.0의 0.75 ㎖ PBS 완충제 중에 재현탁시킴.

[0200] (17) 컨쥬게이션된 물질을 4℃에서 냉장고에 보관함.

[0201] III. M6 컬럼의 결합 능력 시험의 실험 절차

[0202] <완충제의 제조>

[0203] (1) 물 중 pH 6.0의 50 mM 시트레이트를 제조함

[0204] (2) 물 중 pH 6.0의 50 mM 시트레이트, 2 mM 포스콜린(Foscholine)-12를 제조함

[0205] (3) 물 중 pH 7.0의 PBS를 제조함

[0206] (4) (1), (2) 또는 (3) 중 어느 하나를 "완충제 H"로서 사용함

[0207] <결합 능력 시험>

[0208] (5) 500 ㎕/min의 유량의 완충제 A (H_2O 중 0.05% TFA) 및 2.1 ㎜ × 30 ㎜ 스테인리스강 컬럼 홀더를 이용하여 mAb 컬럼 (104 ㎕)을 포로스 수지에 커플링시킨 600 ㎕의 M6으로 채움

[0209] (6) 컬럼 안팎으로의 시약의 전달 및 포착용으로 세팅한 라인을 갖춘, 3℃로 설정한 칠러 유닛(chiller unit)의 저장조 내에 항체 컬럼을 넣음. 2 마이크로미터의 프릿을 시약 및 샘플의 여과를 위하여 입력 라인을 따라 둠.

[0210] (7) 항체 컬럼을 2 × 250 ㎕의 "완충제 H"로 평형화함. 상기 라인의 단부에서 pH지를 사용하여 용액의 pH를 시험하여 pH가 중성임을 확실하게 함.

[0211] (8) 10 ㎕의 0.28 ㎎/㎖ (16.6 μM)의 IL-25를 30 ㎕의 "완충제 H"와 혼합함 → [IL-25] = 4.1 μM (166 pmol과 등가임)

[0212] (9) 상기 혼합물을 평형화 항체 컬럼 상에 주입함.

[0213] (10) 시린지 펌프를 사용하여 200 ㎕의 "완충제 H" (500 uL의 해밀턴(Hamilton) 시린지 내에 넣음)를 3℃에서 컬럼에 전달하고, 5 × 40 ㎕의 분획물을 수집함.

[0214] (11) 200 ㎕의 0.8% 포름산을 3℃에서 시린지 펌프를 사용하여 컬럼으로 전달하고, 5 × 40 ㎕의 분획물을 수집함.

[0215] (12) 10 ㎕의 0.28 ㎎/㎖ (16.6 μM)의 IL-25를 30 ㎕의 "완충제 H"와 혼합함으로써 대조 주입물을 글래스 인서트(glass insert)에서 제조

[0216] (13) 분획물 또는 대조 샘플을 함유하는 모든 인서트를 원심분리하여 모든 액체를 인서트의 벽 상에 스핀 다운(spin down)시킴. 인서트가 내부에 있는 바이알의 뚜껑을 덮고 그를 표지함.

[0217] (14) 대조 샘플, 중성 세척물 1, 2, 3, 4, 5 및 산성 세척물 1, 2, 3, 4, 5의 순서에 따라 홀수 위치의 3으로부터 23까지의 냉각 스택 트레이에 대조 샘플 뿐만 아니라 중성 및 산성 분획물도 유지함.

[0218] (15) 뚜껑을 덮은 11개의 빈 바이알을 짝수 위치의 4로부터 24까지의 냉각 스택 트레이 4에 위치시킴.

[0219] (16) 각각의 분획물을 20 ㎕의 pH 3.0의 2 M 우레아, 1 M TCEP와 혼합함.

[0220] (17) 55 ㎕의 켄칭 용액을 폐신 컬럼 없이 엑스사르 시스템 내로 주입함.

[0221] (18) 샘플을 완충제 A (0.05% TFA) 중 200 ㎕/min으로 트랩 컬럼 상에 로딩하고, 3 min 동안 탈염시키고, 23 min에 걸쳐 13% 내지 40%의 완충제 B (95% 아세토니트릴, 5% H2O, 0.0025% TFA)의 선형 구배를 이용하여 용출시킴.

[0222] (19) 용출액을 MS1:센트로이드 모드(Centroid mode)로 질량 분광법에 의해 분석함.

[0223] IV. 온-용액/오프-컬럼 교환(On-Solution/Off-Column Exchange)의 실험 절차

[0224] <완충제의 제조>

[0225] (1) H_2O 중 pH 6.0의 50 mM 시트레이트, 2 mM 포스콜린-12를 제조함

[0226] (2) H_2O 중 pH 7.0의 PBS, 2 mM 포스콜린-12를 제조함

[0227] (3) H_2O 중 pH 7.0의 PBS를 제조함

[0228] (4) "익스체인지(exchange) H"로서 (1) - (3)을 사용함

[0229] (5) H_2O 중 1부의 pH 7.0의 PBS를 3부의 "익스체인지 H"와 혼합함으로써 "익스체인지 HH"를 제조함

[0230] (6) D_2O 중 pH 6.0의 50 mM 시트레이트, 2 mM 포스콜린-12를 제조함

[0231] (7) D_2O 중 pH 7.0의 PBS, 2 mM 포스콜린-12를 제조함

[0232] (8) D_2O 중 pH 7.0의 PBS를 제조함

[0233] (9) "익스체인지 D"로서 (6) - (8)을 사용함

[0234] (10) H_2O 중 1부의 pH 7.0의 PBS를 3부의 "익스체인지 D"와 혼합함으로써 "익스체인지 HD"를 제조함

[0235] <온-용액>

[0236] (1) mAb 컬럼 (104 ㎕의 베드(bed) 부피)을 3℃의 냉각 박스 내부에 위치시키고 평형화함

[0237] (2) mAb 컬럼을 2 × 250 ㎕의 0.8% 포름산으로 세정함

[0238] (3) mAb 컬럼을 2 × 250 ㎕의 "익스체인지 HD"로 세척하여 컬럼을 평형화함

[0239] (4) 10 ㎕의 0.28 mg/㎖ (16.6 μM)의 IL-25를 3℃에서 30 ㎕의 "익스체인지 D"와 혼합함 → [IL-25] = 0.07 mg/㎖ (4.2 μM), [D2O] = 75% (온-교환의 시작 타이머)

[0240] (5) 상기 혼합물을 3℃에서 150, 500, 1,500 또는 5,000 s 동안 인큐베이션함

[0241] (6) 상기 혼합물 (40 ㎕)을 mAb 컬럼 상에 주입함

[0242] (7) mAb 컬럼을 3℃에서 100 ㎕의 "익스체인지 HD"로 세척함

[0243] <오프-컬럼>

[0244] (8) mAb 컬럼을 200 ㎕의 냉각 "익스체인지 HH"로 세척함 (H_2O가 컬럼에 닿자마자 곧 온-교환 시간을 중지시키고 오프-교환 시간을 시작함)

[0245] (9) 23℃에서 75 250, 750 또는 2,500 s 동안 인큐베이션함

[0246] <용출>

[0247] (10) 120 ㎕의 냉각 0.8% 포름산을 mAb 컬럼 상에 주입함(산이 컬럼 내로 도입되자마자 곧 오프-교환 시간을 중지시킴)

[0248] (11) 추가의 40 ㎕의 냉각 0.8% 포름산을 주입하여 항원을 mAb 컬럼으로부터 용출시킴

[0249] (12) 글래스 인서트를 사용하여 이 40 ㎕ 분획물을 수집함

[0250] <분석>

[0251] (13) 20 ㎕의 pH 3.0의 냉각 2 M 우레아, 1 M TCEP를 40 ㎕ 분획물에 첨가함

[0252] (14) 55 ㎕의 켄칭 교환 샘플을 펩신 컬럼 및 C18 컬럼을 갖춘 엑스사르 시스템 내로 주입함 (펩신 컬럼: 104 ㎕의 베드 부피; 펩신 컬럼 위에서의 유량: 200 ㎕/min; C18 구배: 23 min에 걸쳐 13% - 40%의 완충제 B). 분해 시간을 3 min으로 설정함.

[0253] (15) 용출물을 MS1:프로필로 질량 분광계에 의해 분석함

[0254] <u>V. 온-컬럼/오프-컬럼 교환의 실험 절차</u>

[0255] <온-컬럼>

[0256] (1) mAb 컬럼 (104 ㎕의 베드 부피)을 23℃의 냉각 박스 내부에 위치시키고 평형화함

[0257] (2) mAb 컬럼을 2 × 250 ㎕의 0.8% 포름산으로 세정함

[0258] (3) mAb 컬럼을 "익스체인지 HH"로 세척하여 컬럼을 평형화함

[0259] (4) 10 ㎕의 0.28 mg/㎖ (16.6 μM)의 IL-25를 3℃에서 30 ㎕의 "익스체인지 H"와 혼합함 → [IL-25] = 0.07 mg/㎖ (4.2 μM), [D_2O] = 0%

[0260] (5) 상기 혼합물을 mAb 컬럼 상에 주입함

[0261] (6) 100 ㎕의 "익스체인지 HH"로 세척함

[0262] (7) 온-교환 반응은 200 ㎕의 "익스체인지 HD"를 mAb 컬럼 위에 통과시킴으로써 개시함 (온-교환 시간을 시작함)

[0263] (8) 3℃에서 mAb 컬럼을 150, 500, 1,500 또는 5,000 s 동안 인큐베이션함

[0264] <오프-컬럼> 5.2와 동일함

[0265] <용출> 상기 절차 IV, 단계 10-14와 동일함.

[0266] <분석> 상기 절차 IV, 단계 15와 동일함.

[0267] VI. 완전 중수소화 실험의 실험 절차

[0268] <완전 중수소화 샘플의 제조>

[0269] (1) 10 ㎕의 0.28 mg/mℓ (16.6 μM)의 IL-25를 30 ㎕의 "익스체인지 D"와 혼합함

[0270] (2) 상기 혼합물을 60℃에서 3 h 동안 가열함

[0271] (3) 이것을 실온으로 냉각시킴

[0272] (4) 40 ㎕의 혼합물을 mAb 컬럼에 로딩함

[0273] (5) 100 ㎕의 "익스체인지 HD"를 mAb 컬럼 내로 주입함

[0274] <용출> 상기 절차 IV, 단계 10-14와 동일함.

[0275] <분석> 상기 절차 IV, 단계 15와 동일함.

[0276] 각각의 이온의 첫 번째 두 아미노산 잔기 상에 부착된 임의의 중수소는 분석 (수성 환경에서의 분해/분리/질량 분석) 동안 손실되었다. 이는 도 8a 및 도 8b에서 H/D-Ex 패턴에서의 작은 갭의 이유가 된다. 비-중수소화 실험, 온-교환 실험, 및 완전 중수소화 실험을 각각의 단백질에 대하여 진행하였다. 비-중수소화 실험은 중수소를 이용하지 않고서 각각의 이온의 정확한 m/z뿐만 아니라 이온들도 확인하기 위한 것이었다. 완전 중수소화 실험에 의해 분석 (수성 환경에서의 분해/분리/질량 분석) 동안 각각의 이온에 있어서 중수소 손실을 확인하였다. 이들 유형의 실험에서, LCMS 분석 전의 그리고 온 또는 온-오프 교환 반응 후의 중수소의 수를 역계산할 수 있다. 온-오프 교환 실험에 있어서, 오프-교환 시간은 온-교환 시간의 절반이었다. 이는 동일한 pH 판독치에 있어서 고유 H→D 교환 속도가 고유 D→H 교환 속도의 절반이라는 사실로 인한 것이다.

[0277] 결과

[0278] IL-25 분해

[0279] IL-25를 다양한 조건을 이용하여 펩신으로 분해하였다. 펩신에 의한 IL-25의 최상의 분해는 2부의 희석 IL-25 용액을 1부의 pH 3.0의 2 M 우레아, 1 M TCEP로 켄칭하고, 200 ㎕/min으로 펩신 컬럼에 의해 분해시킬 때 얻어졌다. 최상의 분리 조건은 23 min 동안 완충제 A 중 13% 내지 40%의 완충제 B (95% 아세토니트릴, 5% H2O, 및 0.0025% TFA)의 선형 구배를 갖는 C18 컬럼이었다. 펩신에 의한 분해 후 IL-25의 서열 커버리지(coverage)는 100%였다 (= 146 / 146; 도 7a 및 도 7b).

[0280] M6의 고정화 및 M6 컬럼의 결합 능력 시험

[0281] 펩신 분해를 하지 않은 IL-25 샘플은 8.5 min에서 하나의 크로마토그래피 피크를 나타냈다. 샘플은 투명하게 보였다. M6을 쉬프 염기(Schiff's base) 화학에 의해 포로스 알 수지 상에 성공적으로 컨쥬게이션시켰다. 엑스사르에 의해 표 1에 나타낸 바와 같이 3가지의 상이한 조건에서 M6 컬럼의 결합 능력을 시험하였다. m/z =1875 (+18) 및 1985 (+17)인 온전한 피크가 뒤따랐다. 시험한 모든 결합 조건에서, IL-25는 중성 세척에서 용출되어 나오지 않았으며, 이는 로딩된 모든 IL-25 (166 pmol)가 중성 조건에서 M6 컬럼에 결합함을 나타내는 것이었다. IL-25는 M6 컬럼에 비특이적으로 고착될 수 있다. 로딩한 IL-25 중 단지 17-18%가 세제의 부재 하에 산 세척에서 회수되었다. 또한 IL-25가 반복적으로 로딩됨에 따라 M6 컬럼의 배압이 점진적으로 증가한다. 회수는 포스콜린-12의 첨가에 의해 향상되었다.

표 1

M6 항체 컬럼의 결합 능력의 시험에 이용한 조건

	"환충제 B"	온도	펩신	중성	산
[illegible]	50 mM 시트레이트, pH 6	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	50 mM 시트레이트, 2 mM 포스콜린-12, pH 6	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	PBS, pH 7	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

"온도"와 "중성" 사이의 컬럼의 표제를 "펩신"으로 한다.

[0282]

[0283] 에피토프 확인

[0284] <용액 중 IL-25의 온-교환 실험>

[0285] 용액 중 IL-25의 온-교환 실험을 23℃에서 pH 7에서 수행하였다.

[0286] IL-25는 상대적으로 동적인 단백질인 것으로 밝혀졌다.

[0287] <M6 컬럼을 이용하거나 이용하지 않는 IL-25의 온/오프-교환 실험>

[0288] 아미노산 잔기 56-63 및 66-74를 포함하는 절편에서 가장 강한 보호가 관찰되었다 (도 8a 및 9c; 표 2). 아미노산 잔기 46-63 및 66-84를 포함하는 유사한 절편은 일관적인 약한 보호를 나타냈다 (도 8a, 9c 및 9d; 표 2). 아미노산 잔기 129-135를 포함하는 절편에 있어서 경계선 보호가 관찰되었다 (도 8b, 9e 및 9f; 표 2).

표 2

23℃에서 pH 7 및 pH 8에서 온/오프 교환 실험 후 인간 IL-25의 다양한 절편에서의 중수소화 수준의 차이

시작	마지막	전하	pH 6 150	pH 6 500	pH 7 150	pH 7 500	pH 7 1,500	pH 7 5,000	평균
3	9	1	-3%	2%	-1%	-1%	-1%	5%	0%
3	15	2	-3%	-5%	1%	0%	-3%	-1%	-2%
3	20	2	1%	0%	2%	1%	-3%	-1%	0%
12	20	1	0%	4%	-1%	0%	0%	1%	1%
23	42	2	3%	1%	1%	0%	-1%	3%	1%
23	43	2	3%	1%	0%	0%	-1%	0%	0%
23	45	3	2%	1%	2%	1%	1%	-2%	1%
23	53	3	2%	1%	0%	1%	1%	-1%	1%
46	53	1	2%	-1%	2%	1%	0%	0%	1%
46	63	3	8%	5%	11%	7%	1%	0%	5%
56	63	1	7%	7%	9%	8%	6%	2%	6%
66	74	2	6%	10%	11%	13%	7%	0%	8%
66	84	2	9%	2%	5%	7%	6%	-2%	4%
77	84	2	-	-	-	-	-2%	-2%	-2%
87	101	2	3%	2%	1%	3%	-2%	1%	1%
90	101	2	2%	0%	3%	3%	0%	1%	1%
104	109	1	2%	0%	0%	1%	0%	-2%	0%
105	109	1	0%	0%	0%	1%	4%	0%	1%
112	126	2	3%	2%	3%	2%	1%	0%	2%
112	127	2	7%	-4%	1%	4%	-3%	1%	1%
129	135	2	3%	6%	8%	4%	8%	0%	5%
133	135	1	-2%	3%	7%	5%	5%	2%	3%
138	146	1	1%	1%	-1%	-2%	0%	1%	0%
140	146	1	-1%	7%	3%	-2%	-2%	2%	1%

[0289]

[0290] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 공개된 특허 출원 및 참고문헌의 교시 내용은 전체적으로 참고로 포함된다.

[0291] 본 발명을 그의 예시적인 실시 형태들을 참고로 하여 구체적으로 예시하고 기재하였지만, 당업자라면 형태 및 상술에 있어서의 다양한 변화가 첨부된 특허청구범위에 포함된 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않고서 본 발명 내에서 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

도면1

GATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG
GAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGTGCATCCCAGGGC
ATTAGCAATTATCTGAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGG
AAAGTTCCTAAACTCCTGATCTATTACACATCAAGTTTAC
ACTCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAGCGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGTATAGCAA
GCTGCCGTACACGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG
ATCAAA (서열 번호 1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKP
GKVPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DVATYYCQQYSKLPYTFGQGTKLEIK (서열 번호 2)

도면2

GAGGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGCCGAGGT
GAAGAAGCCAGGCGCCAGCGTCAAGGTGTCCTG
CAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCTCCGGCTACAC
CATGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCCAGAG
GCTGGAATGGATGGGCCTGATCAACCCCTACAAC
GGCGGCACCAGCTACAACCAGAACTTCAAGGGC
AGGGTGACACTGACCGTGGATACCAGCGCCAGC
ACCGCCTACCTGGAACTGAACAGCCTGAGAAGC
GAGGACACCGGCGTGTACTACTGCGCCAGAGAG
GACTACGACGGCTACCTGTACTTCGCCATGGACT
ACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGC
(서열 번호 3)

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYTM
NWVRQAPGQRLEWMGLINPYNGGTSYNQNFKGR
VTLTVDTSASTAYLELNSLRSEDTGVYYCAREDYDG
YLYFAMDYWGQGTLVTVS (서열 번호 4)

도면3

	L1	L2	L3	LCDR1										LCDR3										HCDR3										7200 초 헤리에 대한 바이아코어에서의 KD (pM)	수용체 저해 IC50, pM	세포 억제
huDG91	S	A	S	Q	G	I	S	N	Y	L	N	Q	Q	Y	S	K	L	P	Y	T	F	E	D	Y	D	G	Y	L	Y	F	A	M	D	Y		패널 A/B	배수 변화
I25M6												-	-	-	L	A	F	-	-	-	-														**53**	12	4
I25M10												-	-	-	L	A	F	-	-	-	-			F	-	S	W	T	F	-	-	-	-		**36**	**14**	**5**
I25M11	-	-	-	-	-	A	S	F	-	-		-	-	-	S	F	-	-	-	-	-			F	-	S	W	T	F	-	-	-	-		57	**14**	**5**
I25M20												-	-	-	L	A	F	-	-	-	-			Y	-	S	W	T	F	-	-	-	-		*45*	**13**	**20**
I25M32	-	-	-	-	-	N	E	-	-	-		-	-	-	I	N	F	-	-	-	-			Y	-	S	W	T	F	-	-	-	-		87	**11**	**4**
I25M28												-	-	-	L	A	F	-	-	-	-			F	-	S	W	T	Y	-	-	-	-		**19**	**14**	**16**
I25M30	-	-	-	-	-	H	W	N	-	-		-	-	F	N	S	F	-	-	-	-			F	-	S	W	T	Y	-	-	-	-		44	20	**3**
I25M31																								F	-	S	W	T	Y	-	-	-	-		**40**	**18**	**12**
I25M34	-	-	-	-	-	N	E	-	-	-		-	-	-	I	N	F	-	-	-	-			F	-	S	W	T	Y	-	-	-	-		64	**13**	**7**
IL-17BR																																				17	63	1
R71V G1																																				194	45 2-64 3	
R71V G1																																				*136*		

도면4a

M6 경쇄 (LC) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKP
GKVPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DVATYYCQQYLAFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC (서열 번호 5)

LC CDR 1: SASQGISNYLN (서열 번호 6)

LC CDR 2: YTSSLHS (서열 번호 7)

LC CDR 3: QQYLAFPYT (서열 번호 8)

도면4b

M6 중쇄 (HC) 아미노산 서열

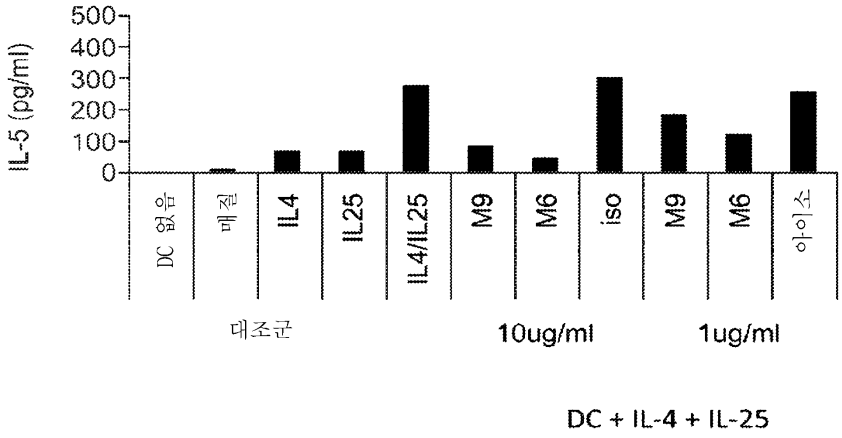
EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYTMNWVRQ
APGQRLEWMGLINPYNGGTSYNQNFKGRVTLTVDTSASTA
YLELNSLRSEDTGVYYCAREDYDGYLYFAMDYWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (서열 번호 9)

HC CDR 1: GYTMN (서열 번호 10)

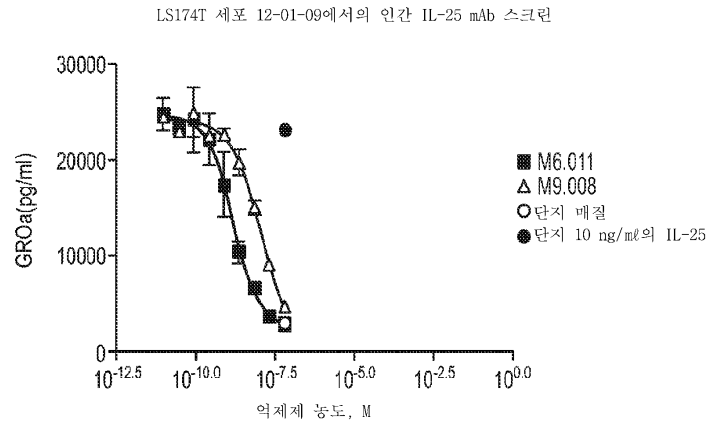
HC CDR 2: LINPYNGGTSYNQNFKG (서열 번호 11)

HC CDR 3: EDYDGYLYFAMDY (서열 번호 12)

도면5

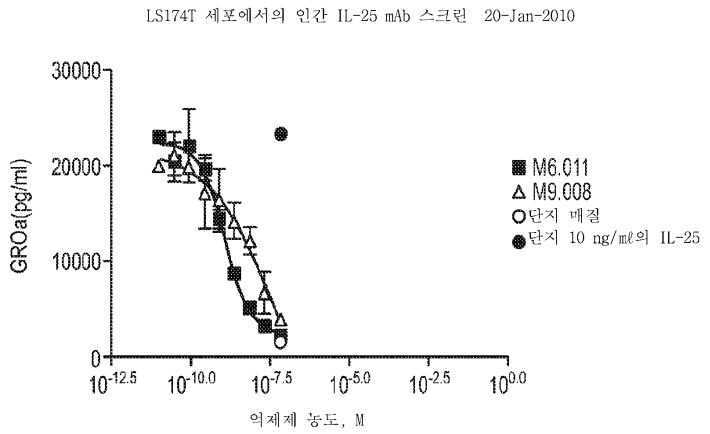


도면6a



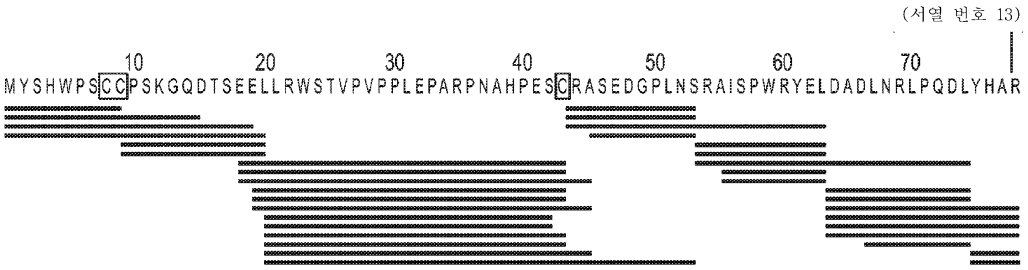
	M6.011	M9.008
EC50	1.55e-009	1.17e-008

도면6b



	M6.011	M9.008
EC50	1.26e-009	4.57e-008

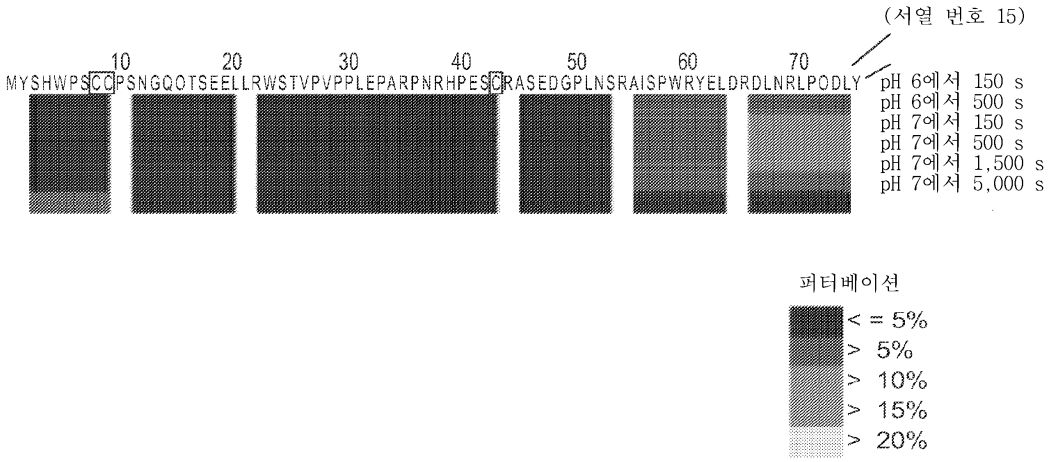
도면7a



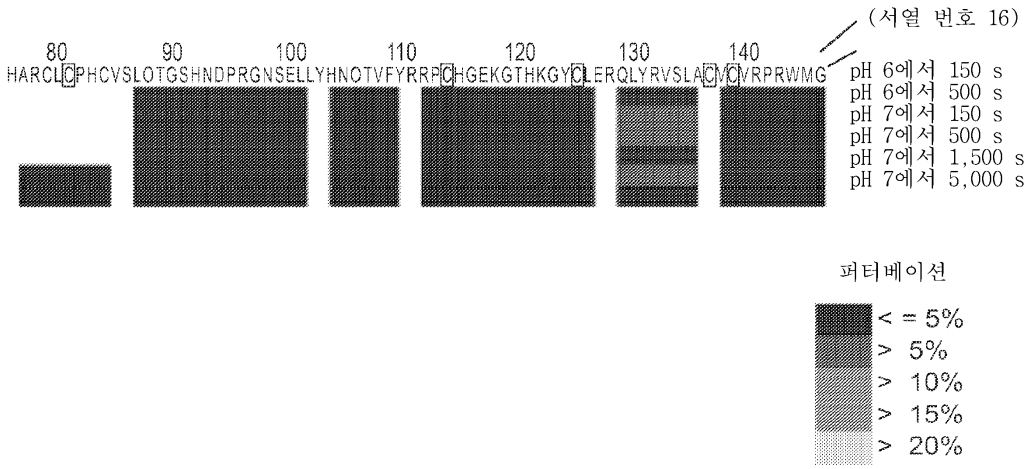
도면7b



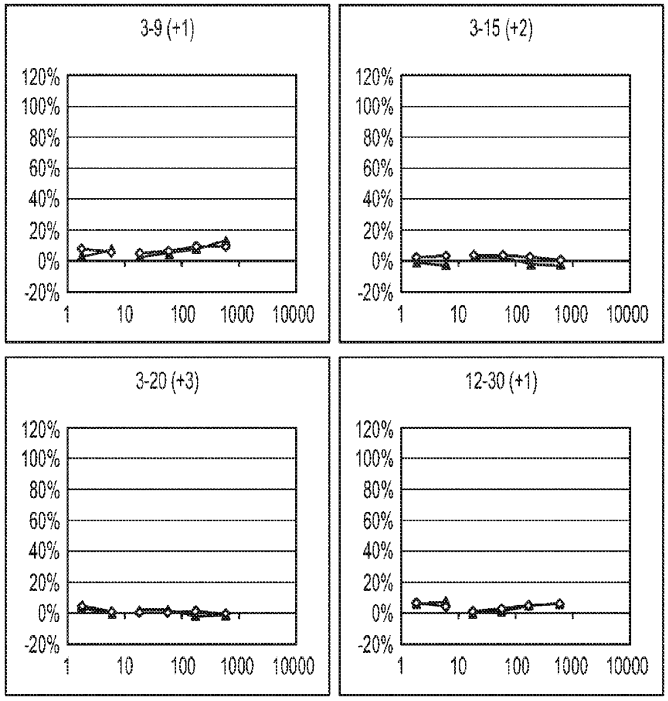
도면8a


(서열 번호 15)
10
20
30
40
50
60
70
MYSHWPSCCPSNGQQTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNRHPESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLY
pH 6에서 150 s
pH 6에서 500 s
pH 7에서 150 s
pH 7에서 500 s
pH 7에서 1,500 s
pH 7에서 5,000 s
퍼터베이션
< = 5%
> 5%
> 10%
> 15%
> 20%

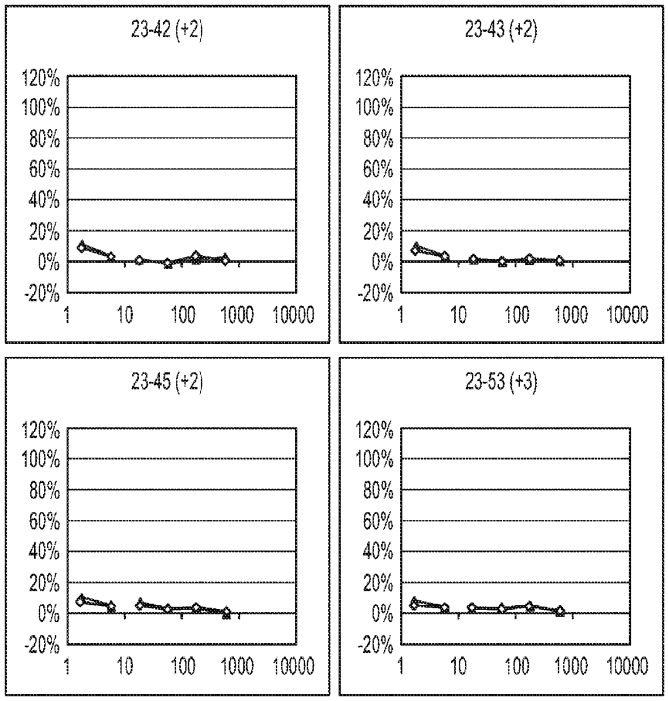
도면8b


(서열 번호 16)
80
90
100
110
120
130
140
HARCLCPHCVSLQTGSHNDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGTHKGYCLERQLYRVSLACVCVRPRWMG
pH 6에서 150 s
pH 6에서 500 s
pH 7에서 150 s
pH 7에서 500 s
pH 7에서 1,500 s
pH 7에서 5,000 s
퍼터베이션
< = 5%
> 5%
> 10%
> 15%
> 20%

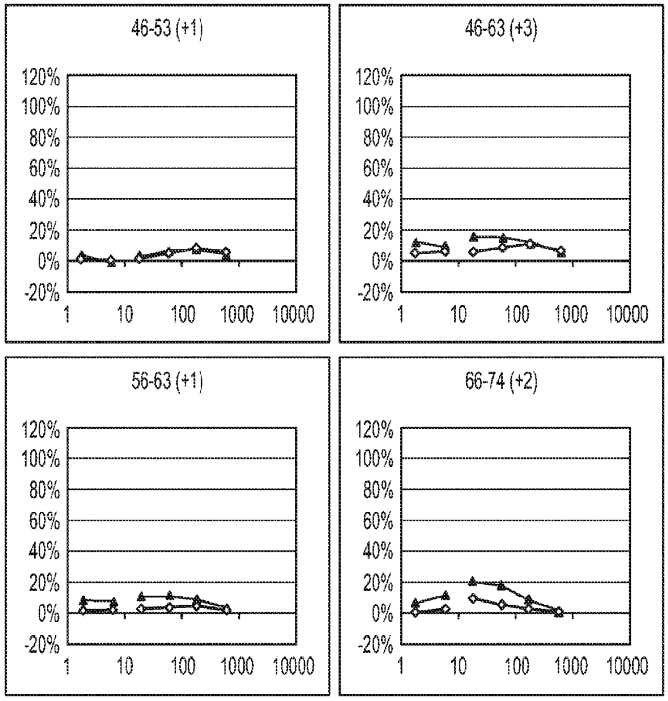
도면9a


3-9 (+1)
3-15 (+2)
3-20 (+3)
12-30 (+1)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

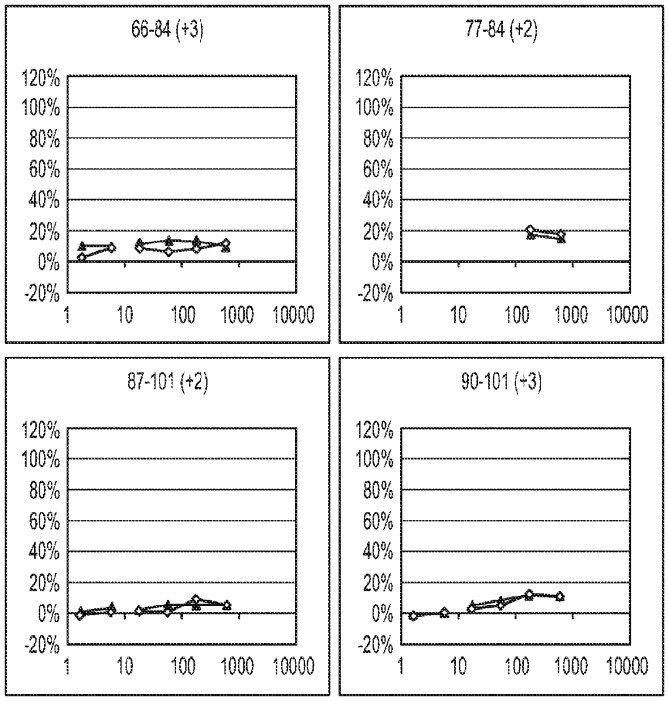
도면9b


23-42 (+2)
23-43 (+2)
23-45 (+2)
23-53 (+3)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

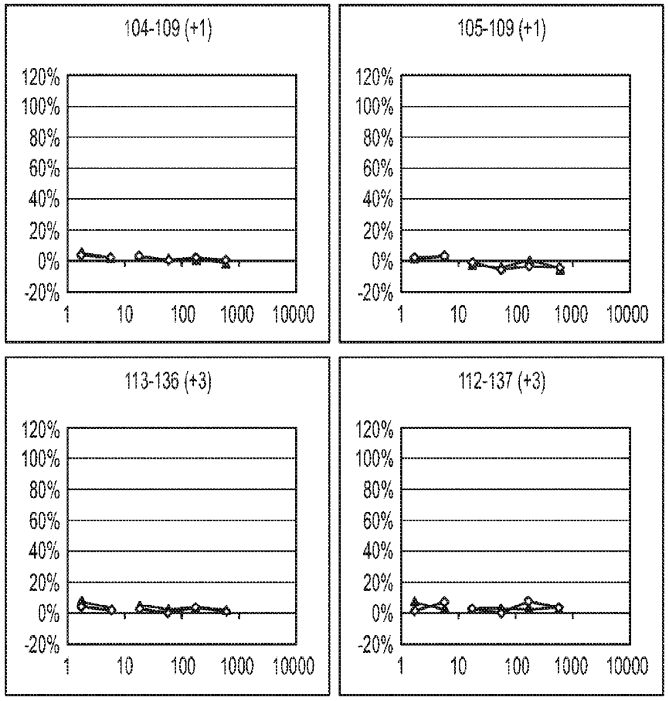
도면9c


46-53 (+1)
46-63 (+3)
56-63 (+1)
66-74 (+2)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

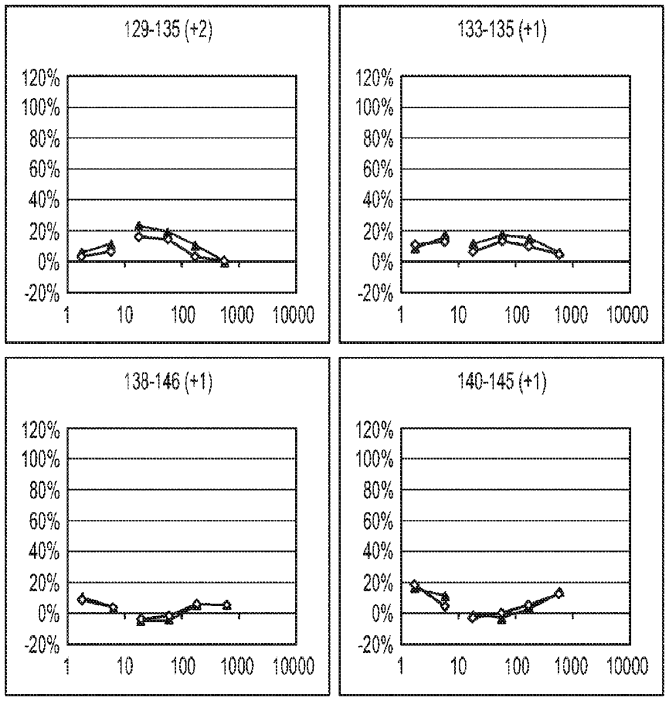
도면9d


66-84 (+3)
77-84 (+2)
87-101 (+2)
90-101 (+3)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

도면9e


104-109 (+1)
105-109 (+1)
113-136 (+3)
112-137 (+3)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

도면9f


129-135 (+2)
133-135 (+1)
138-146 (+1)
140-145 (+1)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
1
10
100
1000
10000

도면10

MYSHWPSCCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPP
LEPARPNRHPESCRASEDGPLNSRAISPWR
YELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQTG
SHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGT
HKGYCLERRLYRVSLACVCVRPRVMG (서열 번호 17)

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.

<120> HUMANIZED IL-25 ANTIBODIES

<130> SPC5341PCT

<140> To Be Assigned

<141> 2011-03-28

<150> 61/341458

<151> 2010-03-30

<150> 61/319260

<151> 2010-03-31

<160> 17

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 313

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gatgacccag tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg 60

cagtgcatcc cagggcatta gcaattatct gaattggtat cagcagaaac cagggaaagt 120

tcctaaactc ctgatctatt acacatcaag tttacactca ggggtcccat ctcggttcag 180

cggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc agcctgcagc ctgaagatgt 240

tgcaacttat tactgtcagc agtatagcaa gctgccgtac acgtttggcc aggggaccaa 300

gctggagatc aaa 313

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 3

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaggtgcagc tggtcgagag cggagccgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta cagcttctcc ggctacacca tgaactgggt gcggcaggcc 120

ccaggccaga ggctggaatg gatgggcctg atcaaccccct acaacggcgg caccagctac 180

aaccagaact tcaagggcag ggtgacactg accgtggata ccagcgccag caccgcctac 240

ctggaactga acagcctgag aagcgaggac accggcgtgt actactgcgc cagagaggac 300

tacgacggct acctgtactt cgccatggac tactggggcc agggcaccct ggtgaccgtg 360

agc 363

<210> 4

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ala Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

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

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

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7
Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Gln Tyr Leu Ala Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

```
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                165                 170                 175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
            180                 185                 190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
        195                 200                 205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser

    210                 215                 220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225                 230                 235                 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
                245                 250                 255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

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

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

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

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

435 440 445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 13

<211> 78

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr
1 5 10 15

Ser Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu
20 25 30

Pro Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp
35 40 45

Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp
50 55 60

Arg Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg
65 70 75

<210> 14

<211> 68

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp
1 5 10 15

Pro Arg Gly Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr
20 25 30

Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu
35 40 45

Glu Ala Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro

50 55 60

Arg Val Met Gly
65

<210> 15

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr

1 5 10 15

Ser Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu

20 25 30

Pro Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp

35 40 45

Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp

50 55 60

Arg Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr

65 70 75

<210> 16

<211> 71

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

1 5 10 15

His His Asp Pro Arg Gly Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr

20 25 30

Val Phe Tyr Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly

35 40 45

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

50 55 60

Val Arg Pro Arg Val Met Gly

65 70

<210> 17

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr

1 5 10 15

Ser Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu

20 25 30

Pro Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp

35 40 45

Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp

50 55 60

Arg Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu

65 70 75 80

Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val

130 135 140

Met Gly

145