



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0117317
(43) 공개일자 2022년08월23일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/24 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7025148</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년12월18일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년07월19일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/AU2020/051403</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/119761
국제공개일자 2021년06월24일</p> <p>(30) 우선권주장
201904859 2019년12월20일 오스트레일리아(AU)</p> | <p>(71) 출원인
허드슨 인스티튜트 오브 메디컬 리서치
오스트레일리아, 3168 빅토리아, 클레이튼, 라이
트 스트리트 27-31</p> <p>(72) 발명자
스티븐스, 앤드루 엔
오스트레일리아 3180 빅토리아 녹스필드 오토리아
로드 14
라인추크, 아담
오스트레일리아 3160 빅토리아 벨그레이브 레슬리
스트리트 11
강, 성-웅
오스트레일리아 3145 빅토리아 멜버른 이스트 칼
라일 웨이 37</p> <p>(74) 대리인
특허법인필앤온지</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 CXCL10 결합 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 C-X-C 모티프 케모카인 리간드 10 (CXCL10) 결합 단백질 그리고, 대상체에서 CXCL10의 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 대상체에서 병태의 검출 및/또는 진단 방법에서 이의 용도에 관한 것이다. 총 CXCL10 (전장, N-말단에 절두되고 시트룰린화됨)에 결합하는 특이적 항체 그리고 활성 CXCL10 (전장)을 결합시키는 항체는 난소암 환자들의 샘플에서 총 및 활성 CXCL10의 수준을 측정하는데 사용되었다. 활성 대 총 CXCL10의 계산된 비율은 양성 종양을 가진 환자들 또는 건강한 개체들과 비교할 때 악성 병태를 가진 환자들에서 더 낮았고 악성 병태 진단, 종양 부담 및 질병 진행 모니터링 방법의 기초이다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/57449 (2013.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2333/52 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

명세서

청구범위

청구항 1

결합 단백질이 전장 인간 CXCL10, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10에 결합하는, C-X-C 모티프 케모카인 리간드 10 (CXCL10) 결합 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 전장 인간 CXCL10, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10의 에피토프 NH2-LSRTVRCTCISISNQPVNPRSLE-COOH (서열번호: 26)를 결합시키는, CXCL10 결합 단백질.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 결합 단백질이:

- (i) 전장 인간 CXCL10에 50 nM 이하의 K_D 로 결합하고/거나;
 - (ii) N-말단에 절두된 인간 CXCL10에 5 nM 이하의 K_D 로 결합하는,
- CXCL10 결합 단백질.

청구항 4

결합 단백질이 전장 인간 CXCL10에 50 nM 이하의 K_D 로 결합하지만, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10을 결합시키지 않는, C-X-C 모티프 케모카인 리간드 10 (CXCL10) 결합 단백질.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 전장 인간 CXCL10에 결합하기 위해 에피토프 NH2-VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLE-COOH (서열번호: 25)의 N-말단 발린 및/또는 프롤린이 필요한, CXCL10 결합 단백질.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 가변 영역 또는 항원 결합 도메인을 포함하는, CXCL10 결합 단백질.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이:

- (i) Fv;
- (ii) 단일 체 Fv 단편 (scFv);
- (iii) 이량체성 scFv (di-scFv);
- (iv) 단일-도메인 항체;
- (v) 미니바디;
- (vi) 디아바디;
- (vii) 트리아바디;
- (viii) 테트라바디;
- (ix) Fab;
- (x) F(ab')₂;

- (xi) 항체;
- (xii) 항체 모방체;
- (xiii) 중쇄 단독 면역글로불린;
- (xiv) T-세포 수용체;
- (xv) 애드넥틴;
- (xvi) 안티칼린;
- (xvii) 아피바디;
- (xviii) 아비머;
- (xix) 설계된 안키린-반복 단백질 (DARPin); 또는
- (xx) 항체의 불변 영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인 (C_H) 2 및/또는 C_H3 에 연결된 (i) 내지 (xix) 중 하나로 이루어지는 군으로부터 선택되는, CXCL10 결합 단백질.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이:

- (i) 서열번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 서열번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (V_L); 및/또는
- (ii) 서열번호: 11에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L

을 포함하는 CXCL10에 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 경쟁적으로 억제시키는, CXCL10 결합 단백질.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이:

- (i) 서열번호: 3에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_L ; 또는
- (ii) 서열번호: 11에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_L

을 포함하는, CXCL10 결합 단백질.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이:

- (i) 서열번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L ; 또는
- (ii) 서열번호: 11에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L

을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, CXCL10 결합 단백질.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이:

(i) a) 서열번호: 3의 아미노산 25-34에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
 b) 서열번호: 3의 아미노산 49-65에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
 c) 서열번호: 3의 아미노산 98-108에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
 을 포함하는 V_H ; 및

a) 서열번호: 4의 아미노산 23-33에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
 b) 서열번호: 4의 아미노산 49-55에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
 c) 서열번호: 4의 아미노산 88-96에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
 을 포함하는 V_L ; 또는

(ii) a) 서열번호: 11의 아미노산 25-34에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
 b) 서열번호: 11의 아미노산 49-65에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
 c) 서열번호: 11의 아미노산 98-108에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
 을 포함하는 V_H ; 및

a) 서열번호: 12의 아미노산 23-33에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
 b) 서열번호: 12의 아미노산 49-55에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
 c) 서열번호: 12의 아미노산 88-96에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
 을 포함하는 V_L

을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, CXCL10 결합 단백질.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이:

(i) a) 서열번호: 5에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
 b) 서열번호: 6에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
 c) 서열번호: 7에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
 을 포함하는 V_H ; 및

a) 서열번호: 8에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
 b) 서열번호: 9에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
 c) 서열번호: 10에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
 을 포함하는 V_L ; 또는

(ii) a) 서열번호: 13에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
 b) 서열번호: 14에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
 c) 서열번호: 15에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
 을 포함하는 V_H ; 및

a) 서열번호: 16에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
 b) 서열번호: 17에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
 c) 서열번호: 18에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3

을 포함하는 V_L

을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, CXCL10 결합 단백질.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 단백질이 검출가능한 표지에 컨쥬게이션되는, CXCL10 결합 단백질.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 결합 단백질 및 담체를 포함하는, 조성물.

청구항 15

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 따른 CXCL10 결합 단백질을 인코딩하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 16

제 15 항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 발현 벡터.

청구항 17

시험관내 제 16 항의 발현 벡터를 포함하는, 세포.

청구항 18

CXCL10 결합 단백질을 제조하기 위한, 제 17 항의 세포의 용도.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 제 17 항의 세포를 배양시키는 단계 및 그로부터 CXCL10 결합 단백질을 생산하는 단계; 및 임의로 상기 생산된 결합 단백질을 분리 및 정제시키는 단계를 포함하는, 용도.

청구항 20

대상체에서 악성 병태의 검출 및/또는 진단 방법으로서, 상기 방법은

- (i) 상기 대상체에서 활성 CXCL10의 수준 및 상기 대상체에서 총 CXCL10의 수준을 결정하는 단계; 및
 - (ii) 상기 대상체에서 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계
- 를 포함하는, 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 활성 CXCL10 및 총 CXCL10의 수준을 결정하는 단계가 상기 대상체에서 활성 CXCL10 단백질의 양 및 총 CXCL10 단백질의 양을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 22

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체에서 CXCL10 비율을 적어도 하나의 참조에서 CXCL10 비율과 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 상기 방법은

- a) 상기 대상체에서 상기 CXCL10 비율이 상기 참조에서 상기 CXCL10 비율보다 더 높은 지, 또는
 - b) 상기 대상체에서 상기 CXCL10 비율이 상기 참조에서 상기 CXCL10 비율보다 더 낮은 지
- 를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

- (i) 상기 참조에서 상기 CXCL10 비율과 비교하여 상기 대상체에서 더 낮은 CXCL10 비율이 악성 병태를 나타내거나; 또는
- (ii) 상기 참조에서 상기 CXCL10 비율과 비교하여 상기 대상체에서 더 높은 CXCL10 비율이 양성 병태를 나타내는, 방법.

청구항 25

제 20 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은:

- (i) 상기 대상체에서 총 CXCL10의 수준을 결정하기 위해 전장 인간 CXCL10 및 N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10을 특이적으로 결합시키는 CXCL10 결합 단백질; 및
- (ii) 상기 대상체에서 활성 CXCL10의 수준을 결정하기 위해 전장 인간 CXCL10을 특이적으로 결합시키지만, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10을 결합시키지 않는 CXCL10 결합 단백질을 사용하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 방법은 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 CXCL10 결합 단백질을 사용하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

제 20 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 상기 대상체에서 총 CXCL10의 수준이 서열번호: 11에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 결정되고/거나;
- (ii) 상기 대상체에서 활성 CXCL10의 수준이 서열번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 결정되는, 방법.

청구항 28

제 25 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CXCL10 결합 단백질들 중 하나 이상이 검출가능한 표지에 컨쥬게이션되는, 방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 상기 검출가능한 표지가 방사성표지, 효소, 형광성 표지, 발광성 표지, 생물발광성 표지, 자성 표지, 보철 그룹 및 조영 제제로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 30

제 20 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 유세포 분석, 효소-연결된 면역흡착 검정 또는 웨스턴 블랏을 수행하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

제 20 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 상기 대상체로부터 수득된 적어도 하나의 생물학적 샘플에서 수행되는, 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 상기 생물학적 샘플이 생검시료, 유체 샘플, 혈장 샘플 또는 세포성 면봉인, 방법.

청구항 33

제 20 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 악성 병태가 생식 암인, 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 생식 암이 난소암인, 방법.

청구항 35

제 20 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 상기 대상체에서 디펩티딜 펩티다제-4 (DPP4) 및 /또는 암 항원 125 (CA-125)의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 36

제 20 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 인터류킨 6 (IL-6), 종양 괴사 인자 수용체 II (TNF-RII), 인간 부고환 단백질 4 (HE4) 및 인터류킨 8 (IL-8) 중 하나 이상 또는 모두의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 37

악성 병태를 앓고 있는 대상체에서 종양 부담의 모니터링 방법으로서, 하나 이상의 시점에 상기 대상체에서 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

대상체에서 악성 병태의 진행의 모니터링 방법으로서, 하나 이상의 시점에 상기 대상체에서 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 39

악성 병태를 앓고 있는 대상체에서 종양 퇴행의 결정 방법으로서, 하나 이상의 시점에 상기 대상체에서 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 40

대상체에서 악성 병태의 치료 방법으로서, 제 20 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 따른 상기 대상체에서 상기 악성 병태를 검출 및/또는 진단하는 단계, 및 상기 대상체에 치료를 실시하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 41

대상체에서 병태의 검출 및/또는 진단 방법으로서, 제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 CXCL10 결합 단백질을 사용하여 상기 대상체에서 CXCL10의 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 출원 데이터

[0002] 본원은 2019년 12월 20일 출원된 "CXCL10 결합 단백질 및 이의 용도"라는 표제의 호주 특허 출원 번호 2019904859로부터 우선권을 주장하고, 이의 전체 내용은 이로써 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본원은 전자적 형태의 서열 목록으로 제출된다. 서열 목록의 전체 내용은 이로써 참조로 포함된다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 개시내용은 CXCL10 결합 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

발명의 배경

케모카인 인터페론- γ 유도가능한 단백질(C-X-C 모티프 케모카인 리간드 10; CXCL10; 인터페론-유도된 단백질-10 또는 IP-10으로서 또한 알려진)은 CXC 케모카인 패밀리의 구성원이고 상응하는 케모카인 수용체를 발현시키는 세포에서 화학주성 활성도를 생산함으로써 백혈구 수송에서 중요한 역할을 한다.

CXCL10은 양쪽 효능적 및 길항적 활성을 갖고 화학주성, 세포자멸사의 유도, 및 세포 성장의 조절 및 항혈관신생적 효과의 매개에 관여된다. CXCL10은 수용체, CXCR3를 특이적으로 활성화시킴으로써 이의 생물학적 효과를 발휘하고, 이는 활성화된 T 림프구 (Th1), 자연 살해 (NK) 세포, 염증성 수지상 세포, 대식세포 및 B 세포에서 주로 발현된 7개 경막-스패닝 G 단백질-커플링된 수용체이다. CXCL10의 증식적 또는 항-증식적 작용은 이의 수용체 CXCR3의 하위유형에 의존적이고/거나 세포-유형-의존적인 것으로 보인다. 더욱이, 번역후 변형 예컨대 펩티다아르기닌 테이미나제 (PAD)에 의한 CXCL10의 탈아미노화 또는 시트룰린화 또는 프로테아제 예컨대 디펩티딜 펩티다제 IV (DPP4)에 의한 NH₂-말단 절두화는 CXCR3를 결합시킬 수 있지만 신호전달을 유도하지 않는 우세한 음성 형태를 생성함으로써 이의 생물학적 효과에 기여한다.

CXCL10은 감염성 질환, 중추신경계 장애, 만성 염증, 면역 기능장애 및 암을 포함하는 다양한 인간 질환과 연관되었다.

수많은 인간 장애와 이의 광범위한 연관을 감안하여, CXCL10은 매력적인 바이오마커 및 표적화된 요법의 후보이었다. 하지만, 상업적으로 이용가능한 진단법의 적용은 상이한 생물학적으로 관련된 형태의 단백질을 차별할 수 없는 그들의 능력 때문에 제한되었다.

잠재적 바이오마커로서 모든 형태의 CXCL10을 정확하게 표적할 수 있는 화합물 (예를 들면, 항체 및 항체-유래된 단백질)에 대하여 당업계에서의 필요성이 있음은 전술에 기초하여 숙련된 기술자에 명백할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

발명의 개요

본 발명을 제조회에 있어서, 본 발명자들은 생물학적으로 관련된 형태의 CXCL10에 결합하는 시약을 생산하고자 하였다. 본 발명자들은 전장 (즉, 생물학적으로 활성) CXCL10에 결합하는 항체 뿐만 아니라 N-말단에 절두된 및 시트룰린화된 (즉, 비활성도) 형태에 대하여 전장 CXCL10을 결합시키는 항체를 생산하였다. 놀랍게도, 본 발명자들은 상이한 형태의 CXCL10, 및 특히 상이한 형태의 CXCL10의 비율을 검출하는 것이 양성 및 음성 병태를 구별할 수 있다는 것을 알아내었다. 본 발명자들은 또한 상이한 형태의 CXCL10의 비율이 (양성 또는 음성 둘 중 하나) 질환의 존재를 질환의 부재 (즉, 건강한 개체)와 구별할 수 있다는 것을 알아내었다. 본 발명자들은 또한 놀랍게도 다른 생물학적 마커 (예를 들면, DPP4, CA-125, GM-CSF, IL-6, TNF-RII, HE4 및/또는 IL-8)와 조합으로 상이한 형태의 CXCL10의 비율을 검출하는 것이 I 기 (즉, 초기 단계) 암 또는 전암성 병변 및 양성 병태를 차별할 수 있다는 것을 알아내었다.

하나의 예에서, 본 개시내용은 CXCL10 결합 단백질을 제공하고, 여기서 결합 단백질은 전장 인간 CXCL10, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10에 결합한다.

상기 예의 한 구현예에서, CXCL10 결합 단백질은 전장 인간 CXCL10, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10의 에피토프 NH₂-LSRTVRCTCISISNPVNPRLSLE-COOH (서열번호: 26)를 결합시킨다.

하나의 예에서, CXCL10 결합 단백질은 (i) 전장 인간 CXCL10에 50 nM 이하의 K_D로 결합하고/거나; (ii) N-말단에 절두된 인간 CXCL10에 5 nM 이하의 K_D로 결합한다.

하나의 예에서, CXCL10 결합 단백질은 전장 인간 CXCL10에 50 nM 이하의 K_D로 결합하거나 특이적으로 결합한다.

예를 들어, CXCL10 결합 단백질은 전장 인간 CXCL10에 약 50 nM, 또는 약 40 nM, 또는 약 30 nM, 또는 약 20 nM, 또는 약 10 nM의 K_D 로 결합하거나 특이적으로 결합한다. 하나의 예에서, CXCL10 결합 단백질은 전장 인간 CXCL10에 약 49 nM의 K_D 로 결합하거나 특이적으로 결합한다.

- [0019] 상기 예의 한 구현예에서, CXCL10 결합 단백질은 전장 인간 CXCL10에 결합하기 위해 에피토프 NH₂-VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLE-COOH (서열번호: 25)의 N-말단 발린 및/또는 프롤린이 필요하다.
- [0020] 하나의 예에서, CXCL10 결합 단백질은 N-말단에 절두된 인간 CXCL10에 5 nM 이하의 K_D 로 결합하거나 특이적으로 결합한다. 예를 들어, CXCL10 결합 단백질은 N-말단에 절두된 인간 CXCL10에 약 5 nM, 또는 약 4 nM, 또는 약 3 nM, 또는 약 2 nM, 또는 약 1 nM의 K_D 로 결합하거나 특이적으로 결합한다. 하나의 예에서, CXCL10 결합 단백질은 N-말단에 절두된 CXCL10에 약 3 nM의 K_D 로 결합하거나 특이적으로 결합한다.
- [0021] 본 개시내용은 또한 CXCL10 결합 단백질을 제공하고, 여기서 결합 단백질은 50 nM 이하의 K_D 로 전장 인간 CXCL10에 결합하지만, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10에 결합하지 않는다.
- [0022] 하나의 예에서, CXCL10 결합 단백질은 N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10을 검출가능하게 결합하지 않거나 유의미하게 결합하지 않는다.
- [0023] 폴리펩타이드에 CXCL10 결합 단백질의 결합을 결정하는 방법은 숙련된 기술자에 명백할 것이다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 고체 또는 반-고체 표면에서 부동화되고 CXCL10 결합 단백질은 부동화된 폴리펩타이드에 접촉된다. 결합하기는 그 다음, 예를 들면, 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 영상에 의해 결정된다.
- [0024] 하나의 예에서, (예를 들면, K_D 에 의해 결정된 경우에) 결합하기의 수준은 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 영상에 의해 측정된다.
- [0025] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 가변 영역 또는 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0026] 하나의 예에서, 결합 단백질은:
- [0027] (i) Fv;
- [0028] (ii) 단일쇄 Fv 단편 (scFv);
- [0029] (iii) 이량체성 scFv (디-scFv);
- [0030] (iv) 단일-도메인 항체;
- [0031] (v) 미니바디;
- [0032] (vi) 디아바디;
- [0033] (vii) 트리아바디;
- [0034] (viii) 테트라바디;
- [0035] (ix) Fab;
- [0036] (x) F(ab')₂;
- [0037] (xi) 항체;
- [0038] (xii) 항체 모방체;
- [0039] (xiii) 중쇄 단독 면역글로불린;
- [0040] (xiv) T-세포 수용체;
- [0041] (xv) 애드넥틴;
- [0042] (xvi) 안티칼린;
- [0043] (xvii) 아피바디;
- [0044] (xviii) 아비머;

- [0045] (xix) 설계된 안키린-반복 단백질 (DARPin); 및
- [0046] (xx) 항체의 불변 영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인 (CH) 2 및/또는 CH3에 연결된 (i) 내지 (xix) 중 하나로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0047] 하나의 예에서, 결합 단백질은 항체의 항원 결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 결합 단백질은 적어도 V_H 및 V_L 을 포함하고, 여기서 V_H 및 V_L 은 결합하여 항원 결합 도메인을 포함하는 Fv를 형성한다.
- [0049] 하나의 예에서, 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편 (예를 들면, 항체의 가변 영역을 포함하는 scFv)이다. 예시적 항체는 전장 및/또는 숨김없는 (예를 들면, 컨주게이션되지 않은) 항체이다. 하나의 예에서, 본 개시내용의 항체는 전장 항체이다.
- [0050] 하나의 예에서, 항체는 IgG 또는 IgE 또는 IgM 또는 IgD 또는 IgA 또는 IgY 항체이다. 예를 들어, 항체는 IgG 항체이다.
- [0051] 하나의 예에서, IgG 항체는 IgG₁ 또는 IgG₂ 또는 IgG₃ 또는 IgG₄이다. 예를 들어, 항체는 IgG₁ 항체이다. 또 다른 예에서, 항체는 IgG₄ 항체이다. 하나의 예에서, 항체는 안정화된 IgG₄ 항체이다.
- [0052] 하나의 예에서, 결합 단백질은 재조합, 키메라, CDR 이식된, 인간화된, 유사인간화된, 영장류화된, 탈면역화된 또는 인간이다.
- [0053] 하나의 예에서, 본 개시내용의 항원 결합 단편은 절반 항체이다. 예를 들어, CXCL10 결합 단백질은 단일 중쇄 및 단일 경쇄를 포함하는 절반 항체이다.
- [0054] 하나의 예에서, 본 개시내용의 항원 결합 단편은 IgG₄ 불변 영역 또는 안정화된 IgG₄ 불변 영역을 포함한다.
- [0055] 하나의 예에서, 결합 단백질은 항체 모방체이다. 예를 들어, 결합 단백질은 면역글로불린, 예를 들면, IgNAR, 카멜리드 항체 또는 T 세포 수용체의 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0056] 하나의 예에서, 결합 단백질은 (예를 들면, 중쇄 가변 영역만 또는 오직 경쇄 가변 영역만을 포함하는) 도메인 항체 또는 중쇄 단독 항체 (예를 들면, 카멜리드 항체 또는 IgNAR) 또는 이의 가변 영역이다.
- [0057] 하나의 예에서, 결합 단백질은
- [0058] (i) 서열번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (V_H) 및 서열번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (V_L); 및/또는
- [0059] (ii) 서열번호: 11에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L
- [0060] 을 포함하는 CXCL10에 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합하기를 경쟁적으로 억제시킨다.
- [0061] 하나의 예에서, 결합 단백질은 서열번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 CXCL10에 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합하기를 경쟁적으로 억제시킨다.
- [0062] 또 다른 예에서, 결합 단백질은 서열번호: 11에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 CXCL10에 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합하기를 경쟁적으로 억제시킨다.
- [0063] 하나의 예에서, 결합 단백질은:
- [0064] (i) 서열번호: 3에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_L ; 또는
- [0065] (ii) 서열번호: 11에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 서열

에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_L

[0066] 을 포함한다.

[0067] 하나의 예에서, 결합 단백질은 서열번호: 3에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_L 을 포함한다. 예를 들어, 결합 단백질은 본원에 개시된 서열에 적어도 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 V_H 및/또는 V_L 을 포함한다.

[0068] 하나의 예에서, 결합 단백질은 서열번호: 11에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 V_L 을 포함한다. 예를 들어, 결합 단백질은 본원에 개시된 서열에 적어도 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 V_H 및/또는 V_L 을 포함한다.

[0069] 하나의 예에서, 본 개시내용의 결합 단백질은 본원에 개시된 임의의 서열의 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 임의로 포함한다. 본 개시내용에서 사용에 적합한 아미노산 치환은 숙련된 사람에게 명백할 것이고 자연-발생 치환 및 조작된 치환을 포함한다.

[0070] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은

[0071] (i) 서열번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L ; 또는

[0072] (ii) 서열번호: 11에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L

[0073] 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0074] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 서열번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0075] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 서열번호: 11에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0076] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은

[0077] (i) a) 서열번호: 3의 아미노산 25-34에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및

[0078] b) 서열번호: 3의 아미노산 49-65에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0079] c) 서열번호: 3의 아미노산 98-108에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3

[0080] 을 포함하는 V_H ; 및

[0081] a) 서열번호: 4의 아미노산 23-33에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및

[0082] b) 서열번호: 4의 아미노산 49-55에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0083] c) 서열번호: 4의 아미노산 88-96에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3

[0084] 을 포함하는 V_L ; 또는

[0085] (ii) a) 서열번호: 11의 아미노산 25-34에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및

[0086] b) 서열번호: 11의 아미노산 49-65에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및

[0087] c) 서열번호: 11의 아미노산 98-108에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3

[0088] 을 포함하는 V_H ; 및

[0089] a) 서열번호: 12의 아미노산 23-33에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및

- [0090] b) 서열번호: 12의 아미노산 49-55에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0091] c) 서열번호: 12의 아미노산 88-96에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0092] 을 포함하는 V_L
- [0093] 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0094] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은
- [0095] (i) a) 서열번호: 3의 아미노산 25-34에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0096] b) 서열번호: 3의 아미노산 49-65에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0097] c) 서열번호: 3의 아미노산 98-108에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0098] 을 포함하는 V_H ; 및
- [0099] (ii) a) 서열번호: 4의 아미노산 23-33에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0100] b) 서열번호: 4의 아미노산 49-55에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0101] c) 서열번호: 4의 아미노산 88-96에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0102] 을 포함하는 V_L
- [0103] 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0104] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은
- [0105] (i) a) 서열번호: 11의 아미노산 25-34에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0106] b) 서열번호: 11의 아미노산 49-65에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0107] c) 서열번호: 11의 아미노산 98-108에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0108] 을 포함하는 V_H ; 및
- [0109] (ii) a) 서열번호: 12의 아미노산 23-33에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0110] b) 서열번호: 12의 아미노산 49-55에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0111] c) 서열번호: 12의 아미노산 88-96에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0112] 을 포함하는 V_L
- [0113] 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0114] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은
- [0115] (i) a) 서열번호: 5에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0116] b) 서열번호: 6에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0117] c) 서열번호: 7에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0118] 을 포함하는 V_H ; 및
- [0119] a) 서열번호: 8에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0120] b) 서열번호: 9에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0121] c) 서열번호: 10에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0122] 을 포함하는 V_L ; 또는
- [0123] (ii) a) 서열번호: 13에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및

- [0124] b) 서열번호: 14에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0125] c) 서열번호: 15에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0126] 을 포함하는 V_H ; 및
- [0127] a) 서열번호: 16에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0128] b) 서열번호: 17에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0129] c) 서열번호: 18에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0130] 을 포함하는 V_L
- [0131] 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0132] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은
- [0133] (i) a) 서열번호: 5에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0134] b) 서열번호: 6에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0135] c) 서열번호: 7에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0136] 을 포함하는 V_H ; 및
- [0137] (ii) a) 서열번호: 8에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0138] b) 서열번호: 9에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0139] c) 서열번호: 10에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0140] 을 포함하는 V_L
- [0141] 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0142] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은
- [0143] (i) a) 서열번호: 13에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0144] b) 서열번호: 14에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0145] c) 서열번호: 15에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0146] 을 포함하는 V_H ; 및
- [0147] (ii) a) 서열번호: 16에서 제시된 서열을 포함하는 CDR1; 및
- [0148] b) 서열번호: 17에서 제시된 서열을 포함하는 CDR2; 및
- [0149] c) 서열번호: 18에서 제시된 서열을 포함하는 CDR3
- [0150] 을 포함하는 V_L
- [0151] 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.
- [0152] 하나의 예에서, 단백질, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 외래 단백질, 항체 또는 기능적 단편 중 임의의 것을 인코딩하는 핵산에 의해 인코딩된 단백질, 항체 또는 이의 기능적 단편의 임의의 형태이다.
- [0153] 하나의 예에서, CXCL10 결합 단백질은 검출가능한 표지에 컨쥬게이션된다. 본 개시내용에서 사용에 적합한 검출 가능한 표지는 숙련된 사람에 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다. 예를 들어, 검출가능한 표지는 방사성표지, 효소, 형광성 표지, 발광성 표지, 생물발광성 표지, 자성 표지, 보철 그룹 및 조영 제제로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0154] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 방사성표지이다. 예를 들어, 방사성표지는, 비제한적으로, 방사성요오드 (125I, 131I); 테크네튬; 이트륨; 35S 또는 3H일 수 있다.

- [0155] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 효소이다. 예를 들어, 효소는, 비제한적으로, 겨자무 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제일 수 있다.
- [0156] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 형광성 표지이다. 예를 들어, 형광성 표지는, 비제한적으로, 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린일 수 있다.
- [0157] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 발광성 표지이다. 예를 들어, 발광성 표지는, 비제한적으로, 루미놀일 수 있다.
- [0158] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 생물발광성 표지이다. 예를 들어, 생물발광성 표지는, 비제한적으로, 루시페라제, 루시페린 또는 에쿼린일 수 있다.
- [0159] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 자성 표지이다. 예를 들어, 자성 표지는, 비제한적으로, 가돌리늄 또는 산화철 킬레이트일 수 있다.
- [0160] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 보철 그룹이다. 예를 들어, 보철 그룹은, 비제한적으로, 스트렙타비딘/비오틴 또는 아비딘/비오틴일 수 있다.
- [0161] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 조영 제제이다.
- [0162] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 결합 단백질 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 개시내용에서 사용에 적합한 담체는 숙련된 사람에게 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다.
- [0163] 본 개시내용은 또한 본 개시내용에 따라 CXCL10 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0164] 본 개시내용은 추가로 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 개시내용에서 사용에 적합한 예시적 벡터는 숙련된 사람에게 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다.
- [0165] 본 개시내용은 추가로 *시험관내* 본 개시내용의 발현 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 본 개시내용에서 사용에 적합한 예시적 세포는 숙련된 사람에게 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다. 하나의 예에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질을 제조하기 위한 세포의 용도를 제공한다. 예를 들어, 용도는 본 개시내용의 세포를 배양시키고 이로부터 CXCL10 결합 단백질을 생산하는 단계; 및 생산된 결합 단백질을 분리 및 정제시키는 단계를 포함한다. 생산된 결합 단백질의 분리 및 정제 방법은 숙련된 사람에게 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다.
- [0166] 본 개시내용은 대상체에서 악성 병태의 검출 및/또는 진단 방법을 제공하고, 상기 방법은
- [0167] a) 대상체에서 활성 CXCL10의 수준 및 대상체에서 총 CXCL10의 수준을 결정하는 단계; 및
- [0168] b) 대상체에서 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계
- [0169] 를 포함한다.
- [0170] 하나의 예에서, 활성 CXCL10 및 총 CXCL10의 수준을 결정하는 단계는 대상체에서 활성 CXCL10 단백질의 양 및 총 CXCL10 단백질의 양을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0171] 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 대상체에서 CXCL10 비율을 적어도 하나의 참조에서 CXCL10 비율과 비교하는 단계를 포함한다. 참조의 결정 방법은 숙련된 사람에게 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다.
- [0172] 하나의 예에서, 본 방법은 (a) 대상체에서 CXCL10 비율이 참조에서 CXCL10 비율보다 더 높은지, 또는 (b) 대상체에서 CXCL10 비율이 참조에서 CXCL10 비율보다 더 낮은지를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0173] 하나의 예에서, (i) 참조에서 CXCL10 비율과 비교하여 대상체에서 더 낮은 CXCL10 비율은 악성 병태를 나타내거나; (ii) 참조에서 CXCL10 비율과 비교하여 대상체에서 더 높은 CXCL10 비율은 양성 병태를 나타낸다.
- [0174] 하나의 예에서, 본 방법은
- [0175] (i) 대상체에서 총 CXCL10의 수준을 결정하기 위해 전장 인간 CXCL10 및 N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10을 특이적으로 결합시키는 CXCL10 결합 단백질; 및
- [0176] (ii) 대상체에서 활성 CXCL10의 수준을 결정하기 위해 전장 인간 CXCL10을 특이적으로 결합시키지만, N-말단에

절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10을 결합시키지 않는 CXCL10 결합 단백질

- [0177] 을 사용하는 단계를 포함한다.
- [0178] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 본 개시내용에 따라 적어도 하나의 CXCL10 결합 단백질을 사용하는 단계를 포함한다.
- [0179] 하나의 예에서,
- [0180] (i) 대상체에서 총 CXCL10의 수준은 서열번호: 11에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 결정되고/거나;
- [0181] (ii) 대상체에서 활성 CXCL10의 수준은 서열번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 결정된다.
- [0182] 하나의 예에서, 대상체에서 총 CXCL10의 수준은 서열번호: 11에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 12에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 결정된다.
- [0183] 또 다른 예에서, 대상체에서 활성 CXCL10의 수준은 서열번호: 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호: 4에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용하여 결정된다.
- [0184] 하나의 예에서, CXCL10 결합 단백질들 중 하나 이상은 검출가능한 표지에 컨쥬게이션된다. 본 개시내용에서 사용에 적합한 검출가능한 표지는 숙련된 사람에 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다. 예를 들어, 검출가능한 표지는 방사성표지, 효소, 형광성 표지, 발광성 표지, 생물발광성 표지, 자성 표지, 보철 그룹 및 조영 제제로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0185] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 방사성표지이다. 예를 들어, 방사성표지는, 비제한적으로, 방사성요오드 (125I, 131I); 테크네튬; 이트륨; 35S 또는 3H일 수 있다.
- [0186] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 효소이다. 예를 들어, 효소는, 비제한적으로, 겨자무 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제일 수 있다.
- [0187] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 형광성 표지이다. 예를 들어, 형광성 표지는, 비제한적으로, 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린일 수 있다.
- [0188] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 발광성 표지이다. 예를 들어, 발광성 표지는, 비제한적으로, 루미놀일 수 있다.
- [0189] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 생물발광성 표지이다. 예를 들어, 생물발광성 표지는, 비제한적으로, 루시페라제, 루시페린 또는 에쿼린일 수 있다.
- [0190] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 자성 표지이다. 예를 들어, 자성 표지는, 비제한적으로, 가돌리늄 또는 산화철 킬레이트일 수 있다.
- [0191] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 보철 그룹이다. 예를 들어, 보철 그룹은, 비제한적으로, 스트렙타비딘/비오틴 또는 아비딘/비오틴일 수 있다.
- [0192] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 조영 제제이다.
- [0193] CXCL10의 수준의 검출 방법은 숙련된 사람에 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다. 예를 들어, 본 방법은 유세포 분석, 효소-연결된 면역흡착 검정 또는 웨스턴 블랏을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0194] 하나의 예에서, 본 방법은 유세포 분석을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0195] 하나의 예에서, 본 방법은 효소-연결된 면역흡착 검정을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0196] 하나의 예에서, 본 방법은 웨스턴 블랏을 수행하는 단계를 포함한다.

- [0197] 하나의 예에서, 본 방법은 시험관내 또는 생체외 대상체에서 수행된다. 예를 들어, 본 방법은 시험관내 대상체에서 수행된다. 또 다른 예에서, 본 방법은 생체외 대상체에서 수행된다.
- [0198] 하나의 예에서, 본 방법은 대상체로부터 수득된 적어도 하나의 생물학적 샘플에서 수행된다. 본 개시내용에서 사용에 적합한 생물학적 샘플은 숙련된 사람에 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 생검시료, 유체 샘플, 혈장 샘플 또는 세포성 면봉으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0199] 하나의 예에서, 생물학적 샘플은 생검시료이다.
- [0200] 하나의 예에서, 생물학적 샘플은 유체 샘플이다. 예를 들어, 유체 샘플은 자궁경부액, 질액 또는 복수이다. 하나의 예에서, 생물학적 샘플은 복수액이다.
- [0201] 하나의 예에서, 생물학적 샘플은 혈장 샘플이다.
- [0202] 하나의 예에서, 생물학적 샘플은 세포성 면봉이다. 예를 들어, 세포성 면봉은 자궁경부 면봉이다. 하나의 예에서, 세포성 면봉은 경질 면봉 (CVS)이다.
- [0203] 하나의 예에서, 본 방법은 혈장 샘플 및 경질 면봉 (CVS)에서 수행된다.
- [0204] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 발명은 대상체에서 악성 병태의 검출 및/또는 진단 방법을 제공한다. 예를 들어, 악성 병태는 생식 암이다. 하나의 예에서, 생식 암은 난소암이다. 하나의 예에서, 난소암은 I 기 암이다. 또 다른 예에서, 난소암은 전암성 병변, 예를 들어 p53 유전자 돌연변이가 있는 병변이다.
- [0205] 하나의 예에서, 본 방법은 양성 병태로부터 악성 병태를 검출하고/거나 진단하는 단계를 포함한다.
- [0206] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 대상체에서 디펩티딜 펩티다제-4 (DPP4) 및/또는 암 항원 125 (CA-125)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 대상체에서 디펩티딜 펩티다제-4 (DPP4) 및 암 항원 125 (CA-125)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 또 다른 예에서, 본 방법은 추가로 대상체에서 디펩티딜 펩티다제-4 (DPP4)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 추가 예에서, 본 방법은 추가로 대상체에서 암 항원 125 (CA-125)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0207] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 인터류킨 6 (IL-6), 종양 괴사 인자 수용체 II (TNF-RII), 인간 부고환 단백질 4 (HE4) 및 인터류킨 8 (IL-8)의 하나 이상 또는 모두의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본 방법은 추가로 GM-CSF, IL-6, TNF-RII, HE4 및 IL-8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0208] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 DPP4, GM-CSF, IL-6, TNF-RII, HE4 및 IL-8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0209] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 CA-125, GM-CSF, IL-6, TNF-RII, HE4 및 IL-8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0210] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 DPP4, CA-125, GM-CSF, IL-6, TNF-RII, HE4 및 IL-8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0211] 대상체에서 병태의 검출 및/또는 진단 방법으로, 본 발명의 적어도 하나의 CXCL10 결합 단백질을 사용하여 대상체에서 CXCL10의 수준을 결정하는 단계를 포함하는 방법이 또한 제공된다.
- [0212] 이러한 예에서 병태는 전장 (즉, 생물학적으로 활성) CXCL10, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10의 하나 이상의 수준, 및/또는 상대 비율을 특징으로 한다. 하나의 예에서, 병태는 염증성 병태이다. 예를 들어, 염증성 병태는 관절염, 예컨대 류마티스 관절염 및/또는 건선 관절염이다. 하나의 예에서, 병태는 류마티스 관절염이다. 또 다른 예에서, 병태는 건선 관절염이다. 하나의 예에서, 병태는 C형 간염이다. 또 다른 예에서, 병태는 심부전이다.
- [0213] 본 개시내용은 또한 악성 병태를 앓는 대상체에서 종양 부담의 모니터링 방법으로, 하나 이상의 시점에 대상체에서 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0214] 본 개시내용은 추가로 대상체에서 악성 병태의 진행의 모니터링 방법으로, 하나 이상의 시점에 대상체에서 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0215] 본 개시내용은 또한 악성 병태를 앓는 대상체에서 종양 퇴행의 결정 방법으로, 하나 이상의 시점에 대상체에서

활성 CXLC10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

- [0216] 본 개시내용은 또한 악성 병태를 앓는 대상체에서 종양 재발의 결정 방법으로, 하나 이상의 시점에 대상체에서 활성 CXLC10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0217] 본 개시내용은 또한 악성 병태를 앓는 대상체에서 악성 병태에 대하여 치료의 효능의 결정 방법으로, 하나 이상의 시점에 대상체에서 활성 CXLC10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0218] 하나의 예에서, 대상체는 악성 병태를 갖는 것으로 진단되었다. 예를 들어, 대상체는 악성 병태를 앓고 있다. 예를 들어, 악성 병태는 생식 암, 예컨대 난소암이다.
- [0219] 하나의 예에서, 대상체는 무증상적이다.
- [0220] 하나의 예에서, 대상체는 악성 병태에 대하여 치료를 받지 않았다. 예를 들어, 대상체는 치료 경험이 없다. 하나의 예에서, 대상체는 악성 병태에 대하여 치료를 받고 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 악성 병태에 대하여 치료를 받았다. 악성 병태의 치료에 적합한 요법은 숙련된 사람에 명백할 것이고/거나 본원에 기재될 것이다. 예를 들어, 치료는 수술, 화학요법, 방사선 요법, 표적화된 약물 요법, 면역요법 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0221] 하나의 예에서, 치료는 수술을 포함한다.
- [0222] 하나의 예에서, 치료는 화학요법을 포함한다.
- [0223] 하나의 예에서, 치료는 방사선 요법을 포함한다.
- [0224] 하나의 예에서, 치료는 표적화된 약물 요법을 포함한다.
- [0225] 하나의 예에서, 치료는 면역요법을 포함한다.
- [0226] 하나의 예에서, 본 방법은
- [0227] (a) 후속 시점에 대상체에서 CXCL10 비율이 첫 번째 시점에 대상체에서 CXCL10 비율보다 더 낮은지; 또는
- [0228] (b) 후속 시점에 대상체에서 CXCL10 비율이 첫 번째 시점에 대상체에서 CXCL10 비율보다 더 높은지
- [0229] 를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0230] 하나의 예에서, 첫 번째 시점에 비교하여 후속 시점에 대상체에서 더 낮은 CXCL10 비율은 대상체에서 증가된 종양 부담 및/또는 종양 진행 및/또는 종양 재발을 나타낸다. 예를 들어, 치료 전 (즉, 첫 번째 시점)에 비교하여 치료 후 (즉, 후속 시점에) 대상체에서 CXCL10 비율은 대상체에서 증가된 종양 부담 및/또는 종양 진행 및/또는 종양 재발을 나타낸다.
- [0231] 하나의 예에서, 첫 번째 시점에 비교하여 후속 시점에 대상체에서 더 높은 CXCL10 비율은 대상체에서 감소된 종양 부담 및/또는 종양 퇴행 및/또는 종양 재발을 나타낸다. 예를 들어, 치료 전 (즉, 첫 번째 시점)에 비교하여 치료 후 (즉, 후속 시점에) 대상체에서 더 높은 CXCL10 비율은 대상체에서 감소된 종양 부담 및/또는 종양 퇴행 및/또는 종양 재발을 나타낸다.
- [0232] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 대상체에서 종양 부담 및/또는 종양 진행을 감소시키기 위해 치료를 실시하는 단계를 포함한다.
- [0233] 본 개시내용은 추가로 대상체에서 악성 병태의 치료 방법으로, 본 개시내용에 따라 대상체에서 악성 병태를 검출하고/거나 진단하는 단계, 및 대상체에 치료를 실시하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0234] 악성 병태의 치료에 적합한 요법은 숙련된 사람에 명백할 것이고/거나 본원에 기재될 것이다. 예를 들어, 치료는 수술, 화학요법, 방사선 요법, 표적화된 약물 요법, 면역요법 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0235] 본 개시내용은 또한 대상체에서 악성 병태를 검출하고/거나 진단하기 위한 패널 또는 키트로, 본 개시내용의 하나 이상의 CXCL10 결합 단백질질을 포함하는 패널 또는 키트를 제공한다.
- [0236] 본 개시내용은 추가로 대상체에서 종양 부담 모니터링, 진행 모니터링, 종양 퇴행 결정, 종양 재발 결정 및/또는 악성 병태의 치료의 효능 결정을 위한 패널 또는 키트로, 본 개시내용의 하나 이상의 CXCL10 결합 단백질질을 포함하는 패널 또는 키트를 제공한다.
- [0237] 본원에 임의의 구현예는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 준용하여 임의의 다른 구현예에 적용되어야 한다. 가령, 숙련된 사람이 이해할 바와 같이, 본 발명의 일 예에 대하여 상기 약술된 예는 본 발명 다른 예에 똑같이

적용한다.

[0238] 본 발명은, 단지 예시의 목적으로 의도되는, 본원에 기재된 특정 구현예에 의해 범위에서 제한되지 않는다. 기능적으로-동등한 생산물, 조성물 및 방법은, 본원에 기재된 대로, 분명히 본 발명의 범위 내에 있다.

[0239] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 구체적으로 언급되지 않거나 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성, 단계들의 그룹 또는 물질의 조성들의 그룹 지칭은 단계들, 물질의 조성, 단계들의 그룹 또는 물질의 조성들의 그룹 중 하나 및 복수 (즉, 하나 이상)를 포괄하는 것으로 간주되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0240] 도면의 간단한 설명

도 1 - 활성 및 총 CXCL10 감별을 도시하는 그래픽 표현. $R^2 > 0.99$ 를 각각 가진, CXCL10의 검출을 위하여 RA2 및 RG2를 사용하는 대표적 표준 곡선.

도 2 - (a) ART와 상업적 ELISA 사이 난소암 환자들 (n=212)로부터 악성 복수액내 정량화된 총 CXCL10의 비교. 매칭된 복수액에서 정량화된 총 CXCL10내 유의미한 차이는 ART와 상업적 ELISA 사이 관찰되지 않았다. ART 및 상업적 ELISA에 의한 총 CXCL10의 전반적 평균은 1126.1 ± 2158.6 pg/mL 및 1192.4 ± 1059.5 pg/mL, 각각이었다. (b) ART와 상업적 ELISA 사이 정량화된 총 CXCL10의 상관관계; 0.3084 및 0.2594, 각각의 r 값들을 가진 양쪽 양성 및 악성 복수액에 대하여 2개 테스트 사이 중간정도의 양성 상관관계. $P \leq 0.05$.

도 3 - (a) mAb-RA2 및 mAb-RG2에 의한 재조합 전장 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10의 검출을 입증하는 웨스턴 블랏. CXCL10은 60 분 동안 시트룰린화를 유도하기 위해 PAD2와 (+) 또는 없이 (-) 처리되었고 그 다음 웨스턴 블랏팅에 의해 분리되었다. 임의의 치료 없이 (n/t) 재조합, 전장 CXCL10은 양성 대조군으로서 사용되었다. 상업적 항-CXCL10 항체 (ab9807)는 15 분후 PAD2 인큐베이션 기간에 시트룰린화된 CXCL10을 검출하지 못했다. mAb-RA2에 의한 검출에서 시트룰린화된 CXCL10으로의 실질적 감소가 15 분후 관찰되었고, mAb-RG2에 의한 CXCL10 검출에서 시트룰린화의 효과가 관찰되지 않았음을 유의한다. (b) mAb-RA2 및 mAb-RG2의 ART에 의한 시트룰린화된 CXCL10의 검출. mAb-RA2에 의한 시트룰린화된 CXCL10의 결합에서 실질적 감소가 관찰된 반면, mAb-RG는 시트룰린화된 CXCL10에 결합의 정도를 유지하였다.

도 4 - 활성 및 총 CXCL10의 정량화; 및 활성 CXCL10 비율을 통해서 난소암 환자들로부터 양성 및 악성 복수액의 감별. (a) 양성 (n=51) 및 악성 복수 (n=208)에서 활성 CXCL10 농도: 240.4 ± 410.5 pg/mL 및 818.6 ± 1098.0 pg/mL, 각각; 및 (b) 양성 (n=51) 및 악성 복수 (n=212)에서 총 CXCL10 농도: 160.8 ± 362.0 pg/mL 및 1126.1 ± 2158.6 pg/mL, 각각. (c) 양성 (n=51)과 악성 복수 (n=226) 사이 활성 비율에서 유의미한 차이: 2.59 ± 1.18 및 1.43 ± 1.04 , 각각. (d) 양성 및 악성에서 난소암의 병기에 기초한 활성 비율. 양성: 2.59 ± 1.18 ; 1 기: 1.07 ± 0.44 ; 및 3 기: 1.55 ± 1.23 . **** $P \leq 0.0001$.

도 5 - 양성 및 악성 감별하기에서 DPP4 및 혈장 CA125. (a) 항-DPP4 ELISA에 의한 양성 (n = 48) 및 악성 복수 (n = 148)에서 DPP4 농도의 측정; 184.8 ± 177.6 ng/mL 및 203.5 ± 154.3 ng/mL, 각각. $P=0.1031$. (b) 양성 (n = 49) 및 악성 (n = 50) 복수에서 DPP4 비활성도 (U/ng)의 측정; 2.49 ± 3.83 및 1.65 ± 2.13 , 각각. $P=0.4229$. (c) 매칭하는 환자들에서 혈장 CA125의 측정: 양성 (n = 30) 및 악성 (n = 188) 환자 샘플, 각각에 대하여 200.8 ± 368.7 U/mL 및 1697.0 ± 3409.0 U/mL. **** $P \leq 0.0001$.

도 6 - 양성 및 악성 복수액에서 활성 비율과: 혈장 CA125; DPP4 농도; 및 DPP4 비활성도 사이 상관관계. (a) 어느 한쪽 양성 또는 악성 샘플에서 활성 비율과 혈장 CA125 사이 유의미한 상관관계 없음. (b) 양성 샘플에서 유의미한 상관관계가 없는 한편 악성 복수 샘플에서 활성 비율과 DPP4 (ng/mL) 사이 중간, 음성 상관관계 ($P = 0.0002$). (c) 악성 샘플에서 상관관계가 없는 한편 양성 샘플에서 활성 비율과 DPP4 비활성도 (U/ng) 사이 중간, 음성 상관관계 ($P = 0.0895$).

도 7 - 환자 복수 샘플에서 ART 대 다른 마커에 대하여 우수한 AUC를 입증하는 수신기 오퍼레이터 곡선 (ROC) 분석. (a) 총 CXCL10 및 활성 CXCL10의 정량화의 AUC (AUC 0.8122 및 0.7872, 각각)보다 더 높은 AUC (0.8617)를 달성하는 활성 비율; (b) DPP4 및 혈장 CA125의 AUC (AUC 0.5598 및 AUC 0.8262, 각각)보다 더 높은 AUC를 달성하는 활성 비율. 활성 비율, DPP4 (ng/mL), 및 혈장 CA125 (U/mL)를 조합시킴으로써 최고 AUC의 입증.

도 8 - 바이오마커-기반 테스트로서 ART에 이상적인 경질 면봉 (CVS) 및 혈장의 입증. (a) 양성 (n=50) 및 악성 (n=50) 샘플 사이 CVS에서 활성 비율의 유의미한 차이: 양성 및 악성 CVS에서 활성 비율; 4.39 ± 4.52 및

1.14 ± 0.62, 각각. (b) 양성 (n=30)과 악성 (n=30) 혈장 샘플 사이 혈장에서 활성 비율의 유의미한 차이: 양성 및 악성 혈장에서 활성 비율; 3.18 ± 1.79 및 2.02 ± 1.05 각각. ****P < 0.0001, **P < 0.01.

도 9 - ART는 무암 환자들을 양성 병태 또는 악성 난소암을 가진 환자들과 차별한다. (a) 혈장 샘플에서 측정된 활성 및 총 CXCL10 농도. (b) 3개 환자 그룹에 걸쳐서 활성 및 총 CXCL10 농도. (c) 혈장 또는 (d) CVS에서 검출된 무암 (건강한) 샘플과 양성 및 악성 샘플 사이 계산된 활성 비율. * p ≤ 0.05; ****p ≤ 0.0001.

도 10 - (a) DPP4 풍부도 및 (b) 예방적으로 수집된 코호트에서 DPP4 비활성도 및 (c)-(d) 활성 비율과 그들의 상관관계.

도 11 - 무암과 양성 및 악성 질환 사이 차별된 CVS 먼분을 사용하여 수행된 ART. (a) 활성 CXCL10의 전반적 농도는 총 CXCL10보다 상당히 더 높았다. (b) 무암 (건강한) 샘플과 양성 및 악성 샘플 사이 계산된 활성 비율. * p ≤ 0.05; ****p ≤ 0.0001.

도 12 - (a) CVS에서 DPP4 풍부도 및 (b) CVS의 계산된 활성 비율과 상관관계.

도 13 - (a) 어느 한쪽 양성 또는 악성 난소 종양을 가진 환자들에 대해 예방적으로 수집된 코호트에서 혈장 CA125. (b) CA125와 활성 비율 사이 상관관계.

도 14 - 건강한 여성들과 악성 난소 종양을 가진 환자들 사이 각각 차별된, (a) 혈장 및 CVS의 활성 비율 (b) DPP4 및 CA125와 혈장의 활성 비율 및 (c) DPP4 및 CA125와 CVS의 활성 비율의 조합.

도 15 - (a) CA125에 비교에서 개별 마커들 및 (b) (양성 + 건강한 대 악성에 기반하여 작제된) 마커들의 조합의 차별력을 평가하기 위한 ROC.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열 목록에 대한 핵심

서열번호: 1 사전-서열을 포함하는 인간 CXCL10의 아미노산 서열

서열번호: 2 성숙한 인간 CXCL10의 아미노산 서열

서열번호: 3 항-CXCL10 항체 RA2의 중쇄 V_H 아미노산 서열

서열번호: 4 항-CXCL10 항체 RA2의 경쇄 V_L 아미노산 서열

서열번호: 5 항-CXCL10 항체 RA2의 중쇄 V_H CDR1 아미노산 서열

서열번호: 6 항-CXCL10 항체 RA2의 중쇄 V_H CDR2 아미노산 서열

서열번호: 7 항-CXCL10 항체 RA2의 중쇄 V_H CDR3 아미노산 서열

서열번호: 8 항-CXCL10 항체 RA2의 경쇄 V_L CDR1 아미노산 서열

서열번호: 9 항-CXCL10 항체 RA2의 경쇄 V_L CDR2 아미노산 서열

서열번호: 10 항-CXCL10 항체 RA2의 경쇄 V_L CDR3 아미노산 서열

서열번호: 11 항-CXCL10 항체 RG2의 중쇄 V_H 아미노산 서열

서열번호: 12 항-CXCL10 항체 RG2의 경쇄 V_L 아미노산 서열

서열번호: 13 항-CXCL10 항체 RG2의 중쇄 V_H CDR1 아미노산 서열

서열번호: 14 항-CXCL10 항체 RG2의 중쇄 V_H CDR2 아미노산 서열

서열번호: 15 항-CXCL10 항체 RG2의 중쇄 V_H CDR3 아미노산 서열

서열번호: 16 항-CXCL10 항체 RG2의 경쇄 V_L CDR1 아미노산 서열

- [0258] 서열번호: 17 항-CXCL10 항체 RG2의 경쇄 V_L CDR2 아미노산 서열
- [0259] 서열번호: 18 항-CXCL10 항체 RG2의 경쇄 V_L CDR3 아미노산 서열
- [0260] 서열번호: 19 항-CXCL10 항체 RA2의 중쇄 V_H 뉴클레오타이드 서열
- [0261] 서열번호: 20 항-CXCL10 항체 RA2의 경쇄 V_L 뉴클레오타이드 산 서열
- [0262] 서열번호: 21 항-CXCL10 항체 RG2의 중쇄 V_H 뉴클레오타이드 서열
- [0263] 서열번호: 22 항-CXCL10 항체 RG2의 경쇄 V_L 뉴클레오타이드 산 서열
- [0264] 서열번호: 23 인간 CXCL10의 온전한 N-말단을 포함하는 펩타이드 서열
- [0265] 서열번호: 24 인간 CXCL10의 절두된 N-말단을 포함하는 펩타이드 서열
- [0266] 서열번호: 25 인간 CXCL10의 온전한 N-말단 에피토프
- [0267] 서열번호: 26 인간 CXCL10의 절두된 N-말단 에피토프
- [0268] **발명의 상세한 설명**
- [0269] **일반**
- [0270] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 구체적으로 언급되지 않거나 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성, 단계들의 그룹 또는 물질의 조성들의 그룹 지칭은 단계들, 물질의 조성, 단계들의 그룹 또는 물질의 조성들의 그룹 중 하나 및 복수 (즉, 하나 이상)를 포괄하는 것으로 간주되어야 한다.
- [0271] 본 개시내용은, 단지 예시의 목적으로 의도되는, 본원에 기재된 특정 예에 의해 범위에서 제한되지 않는다. 기능적으로-동등한 생산물, 조성물 및 방법은 분명히 본 개시내용의 범위 내에 있다.
- [0272] 수많은 변동 및/또는 수정이 광범위하게 기재된 대로 본 발명의 사상 또는 범위에서 벗어남 없이 특정 구현예에서 나타난 대로 본 발명에 실시될 수 있음이 당업자에 의해 인식될 것이다. 본 구현예는, 그러므로, 모든 면에서 예시적인 것으로 간주되어야 하며 제한적인 것은 아니다.
- [0273] 본원에 논의되고/거나 참조된 모든 간행물은 본원에 그들의 전체가 편입된다.
- [0274] 본 명세서에 포함된 문서, 행위, 자료, 장치, 물품 또는 기타 등등의 임의의 논의는 오로지 본 발명에 대하여 맥락 제공의 목적을 위한 것이다. 이들 주제 중 일부 또는 전부가 선행 기술 기반의 일부를 형성하거나 본원의 각 청구항의 우선일 이전에 존재했던 대로 본 발명에 관련한 분야에서 공통 일반 지식이었다는 것을 인정하는 것으로 간주되지 않아야 한다.
- [0275] 본원에 본 개시내용의 임의의 예는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 본 개시내용의 임의의 다른 예에 준용하여 적용하는 것으로 간주되어야 한다. 달리 말하면, 본 개시내용의 임의의 특정 예는 본 개시내용의 임의의 다른 특정 예와 조합될 수 있다 (상호 배타적인 경우 제외).
- [0276] 특정 속성 또는 속성들의 그룹 또는 방법 또는 방법 단계들을 개시하는 본 개시내용의 임의의 예는 특정 속성 또는 속성들의 그룹 또는 방법 또는 방법 단계들을 부인하기 위한 명시적 지원을 제공하는 것으로 간주될 것이다.
- [0277] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에서 (예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 분자 생물학, 면역조직화학, 단백질 화학, 및 생화학에서) 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는 것으로 간주되어야 한다.
- [0278] 달리 명시되지 않는 한, 본 개시내용에서 활용된 재조합 단백질, 세포 배양, 및 면역학적 기법은 당업자에게 잘 알려진 표준 절차이다. 그러한 기법은 출처 예컨대, Perbal, 1984; Sambrook 등, 1989; Brown, 1991; Glover 등, 1995 및 1996; Ausubel 등, 1988; Harlow 등, 1988; Coligan 등, 1991에서의 문헌 전반에 걸쳐 기재되고 설명된다.
- [0279] 본원에서 가변 영역 및 이의 부분, 면역글로불린, 항체 및 이의 단편의 설명 및 정의는 Kabat 등, 1987 및 1991; Bork 등, 1994; Chothia and Lesk, 1987; Chothia 등, 1989 및/또는 Al-Lazikani 등, 1997에서 논의에

의해 추가로 명확해질 수 있다.

- [0280] 본원에서, 예를 들면, 잔기의 범위 지칭은 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, "아미노산 56 내지 65를 포함하는 영역" 지칭은 포괄적 방식으로 이해될 것이다, 즉, 영역은 특정된 순서로 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 및 65로 넘버링된 대로 아미노산의 서열을 포함한다.
- [0281] 용어 "및/또는", 예를 들면, "X 및/또는 Y"는 어느 한쪽 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되어야 하고 양쪽 의미에 대하여 또는 어느 한쪽 의미에 대하여 명시적 지원을 제공하는 것으로 간주되어야 한다.
- [0282] 본 명세서 전반에 걸쳐 단어 "포함하다", 또는 이형 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은, 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹의 포함을 의미하는 것으로 이해될 것이지만, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹을 배제하지 않는다.
- [0283] 본원에 사용된 경우에, 용어 "대상체"는 인간, 예를 들어 포유동물을 포함하는 임의의 동물을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 예시적 대상체는 비제한적으로 인간 및 비-인간 영장류를 포함한다. 예를 들어, 대상체는 인간이다.
- [0284] **선택된 정의**
- [0285] 인간 CXCL10은, 성숙한 "전장" 인간 CXCL10 (서열번호: 2)을 생산하기 위해 절단된 N-말단 22개 아미노산과, 사전-서열 (서열번호: 1)로서 발현된다. 따라서, 본원에 사용된 경우에, 용어 "전장 CXCL10"은 "성숙한" 전장 CXCL10을 생산하기 위해 22개 N-말단 아미노산을 제거하도록 번역후 절단 이외 번역후에 변형되지 않은 CXCL10을 지칭한다.
- [0286] 본원에 사용된 경우에, 용어 "N-말단에 절두된 CXCL10"은 디펩티딜펩티다제 IV (DPP4)에 의해 절두되었고 예를 들면, 서열번호: 2의 아미노산 3 내지 77로 이루어지는 "성숙한" 전장 CXCL10을 지칭한다.
- [0287] 본원에 사용된 경우에, 용어 "시트룰린화된 CXCL10"은 펩티딜아르기닌 테이미나제 (PAD)에 의해 예를 들면, 서열번호: 2의 아미노산 위치 5에 아르기닌 잔기에서 탈아미노화 또는 시트룰린화에 의해 번역후에 변형된 CXCL10을 지칭한다.
- [0288] 다른 종으로부터 CXCL10의 서열은 본원에서 및/또는 공공으로 이용가능한 데이터베이스에서 제공된 서열을 사용하여 결정될 수 있고/거나 (예를 들면, Ausubel 등, 1988 (현재까지 모든 업데이트 포함) 또는 Sambrook 등, 1989에서 기재된 대로) 표준 기법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0289] 용어 "재조합"은 인공 유전적 재조합의 생산을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 가변 영역 또는 항원 결합 도메인 (예를 들면, 항체 항원 결합 도메인)을 포함하는 재조합 단백질의 맥락에서, 본 용어는 B 세포 성숙화 도중 발생하는 자연 재조합의 산물인 대상체의 신체 내에서 자연-발생 단백질을 포괄하지 않는다. 하지만, 그와 같은 단백질이 단리된다면, 가변 영역 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 단리된 단백질로 고려되어야 한다. 유사하게, 단백질을 인코딩하는 핵산이 단리되고 재조합 수단을 사용하여 발현된다면, 생성된 단백질은 가변 영역 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 재조합 단백질이다. 재조합 단백질은 또한, 예를 들면, 발현되는 세포, 조직 또는 대상체 내에 있는 경우 인공 재조합 수단에 의해 발현된 단백질을 포괄한다.
- [0290] 용어 "단백질"은 단일 폴리펩타이드 쇄, 즉 펩타이드 결합에 의해 연결된 일련의 연속 아미노산 또는 서로 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결된 일련의 폴리펩타이드 쇄 (즉, 폴리펩타이드 복합체)를 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 일련의 폴리펩타이드 쇄는 적합한 화학적 또는 디설피드 결합을 사용하여 공유적으로 연결될 수 있다. 비공유 결합의 예는 수소 결합, 이온성 결합, 반 데르 발스 힘, 및 소수성 상호작용을 포함한다.
- [0291] 용어 "폴리펩타이드" 또는 "폴리펩타이드 쇄"는 펩타이드 결합에 의해 연결된 일련의 연속 아미노산을 의미하는 것으로 상기 단락으로부터 이해될 것이다.
- [0292] 본원에 사용된 경우에, 용어 "결합 단백질"은 항원 (예를 들면, 세포 구성요소 또는 분자, 예컨대 단백질)과 상호작용 또는 이와 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 또는 이의 부분 또는 단백질의 다른 영역을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0293] 본원에 사용된 경우에, 용어 "항원 결합 도메인"은 항원, 즉, V_H 또는 V_L 또는 양쪽 V_H 및 V_L 을 포함하는 Fv에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 영역을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 항원 결합 도메인은 전체 항체의 맥락에 있을 필요는 없고, 예를 들면, 단리 (예를 들어, 도메인 항체)로 또는 또 다른 형태로, 예를 들면, 본원

에 기재된 대로, 예컨대 scFv로 존재할 수 있다.

[0294]

본 개시내용에 대한 목적을 위하여, 용어 "항체"는 Fv 내에 함유된 항원 결합 도메인에 의해 하나 또는 몇 개의 밀접하게 관련된 항원 (예를 들면, CXCL10)에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 포함한다. 본 용어는 4개쇄 항체 (예를 들면, 2개 경쇄 및 2개 중쇄), 재조합 또는 변형된 항체 (예를 들면, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, CDR-이식된 항체, 영장류화된 항체, 탈-면역화된 항체, 유사인간화된 항체, 절반-항체, 이중특이성 항체)를 포함한다. 항체는 일반적으로 불변 영역 또는 불변 단편 또는 결정화가능한 단편 (Fc)으로 배열될 수 있는 불변 도메인을 포함한다. 항체의 예시적 형태는 그들의 기본 단위로서 4-쇄 구조를 포함한다. 전장 항체는 공유적으로 연결된 2개 중쇄 (~50 내지 70 kDa) 및 2개 경쇄 (~23 kDa 각각)를 포함한다. 경쇄는 일반적으로 가변 영역 (존재한다면) 및 불변 도메인을 포함하고 포유동물에서 어느 한쪽 κ 경쇄 또는 λ 경쇄이다. 중쇄는 일반적으로 추가의 불변 도메인(들)에 힌지 영역에 의해 연결된 1개 또는 2개 불변 도메인(들) 그리고 가변 영역을 포함한다. 포유동물의 중쇄는 하기 유형들: α , δ , ϵ , γ , 또는 μ 중 하나의 것이다. 각 경쇄는 중쇄들 중 하나에 또한 공유적으로 연결된다. 예를 들어, 2개 중쇄 그리고 중쇄 및 경쇄는 쇠간 디설피드 결합에 의해 그리고 비-공유 상호작용에 의해 단결된다. 쇠간 디설피드 결합의 수는 항체의 상이한 유형들 중에 다양할 수 있다. 각 쇠는 N-말단 가변 영역 (각각이 길이로 ~110개 아미노산인 V_H 또는 V_L) 및 하나 이상의 불변 도메인을 C-말단에 갖는다. 경쇄의 불변 도메인 (길이로 ~110개 아미노산인 C_L)은 중쇄의 제1 불변 도메인 (길이로 330 내지 440개 아미노산인 C_H1)과 정렬되고 이에 디설피드-결합된다. 경쇄 가변 영역은 중쇄의 가변 영역과 정렬된다. 항체 중쇄는 2 이상 추가의 C_H 도메인 (예컨대, C_H2 , C_H3 및 기타 등등)을 포함할 수 있고 C_H1 및 C_H2 불변 도메인 사이 힌지 영역을 포함할 수 있다. 항체는 임의의 유형 (예를 들면, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 클래스 (예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 서브클래스의 것일 수 있다. 하나의 예에서, 항체는 쥐과 (마우스 또는 랫트) 항체 또는 영장류 (예컨대, 인간) 항체이다. 하나의 예에서 항체 중쇄는 C-말단 리신 잔기 누락이다. 하나의 예에서, 항체는 인간화된, 유사인간화된, 키메라, CDR-이식된 또는 탈면역화된다.

[0295]

용어들 "전장 항체", "온전한 항체" 또는 "전체 항체"는, 항체의 항원 결합 단편과 반대로, 이의 실질적으로 온전한 형태로 항체를 지칭하기 위해 교환가능하게 사용된다. 구체적으로, 전체 항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 가진 것들을 포함한다. 불변 도메인은 야생형 서열 불변 도메인 (예를 들면, 인간 야생형 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0296]

본원에 사용된 경우에, "가변 영역"은 항원에 특이적으로 결합할 수 있고 상보성-결정 영역 (CDR); 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 프레임워크 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 본원에 정의된 경우에 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 부분들을 지칭한다. 예를 들어, 가변 영역은 3개 CDR과 함께 3개 또는 4개 FR (예를 들면, FR1, FR2, FR3 및 임의로 FR4)를 포함한다. V_H 는 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. V_L 는 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0297]

본원에 사용된 경우에, 용어 "상보성 결정 영역" (동의어 CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3)은 특정 항원 결합의 주요 기여자인 것의 존재로 항체 가변 영역의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각 가변 영역 도메인 (V_H 또는 V_L)은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 식별된 3개 CDR을 갖는다. 하나의 예에서, CDR 및 FR로 할당된 아미노산 위치는 Kabat 등, 1987 및 1991에 따라 정의된다 (또한 본원에 "Kabat 넘버링 시스템"으로서 지칭됨). 또 다른 예에서, CDR 및 FR로 할당된 아미노산 위치는 Enhanced Chothia Numbering Scheme (<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>)에 따라 정의된다. Kabat의 넘버링 시스템에 따라, V_H FR 및 CDR은 다음과 같이 배치된다: 잔기 1 내지 30 (FR1), 31 내지 35 (CDR1), 36 내지 49 (FR2), 50 내지 65 (CDR2), 66 내지 94 (FR3), 95 내지 102 (CDR3) 및 103 내지 113 (FR4). Kabat의 넘버링 시스템에 따라, V_L FR 및 CDR은 다음과 같이 배치된다: 잔기 1 내지 23 (FR1), 24 내지 34 (CDR1), 35 내지 49 (FR2), 50 내지 56 (CDR2), 57 내지 88 (FR3), 89 내지 97 (CDR3) 및 98 내지 107 (FR4). 본 개시내용은 Kabat 넘버링 시스템에 의해 정의된 경우에 FR 및 CDR에 제한되지 않지만, 규범적 넘버링 시스템 또는 Chothia and Lesk, 1987; Chothia 등, 1989; 및/또는 Al-Lazikani 등, 1997; Honnegger and Plukthun, 2001의 넘버링 시스템; 또는 Giudicelli 등, 1997에서 논의된 IMGT 시스템을 포함하는, 모든 넘버링 시스템을 포함한다. 하나의 예에서, CDR은 Kabat 넘버링 시스템에 따라 정의된다. 임의로, Kabat 넘버링 시스템에 따른 중쇄 CDR2는 본원에 열거된 5개 C-말단 아미노산을 포함하지 않거나 그들 아미노산 중 어느 하나 이상은 또 다른 자연-발생 아미노산으로 치환된다. 이와 관련하여, Padlan 등, 1995는 중쇄 CDR2의 5개 C-말단 아미노산이 항원 결합에 일반적으로 관여되지 않음을 확

립하였다.

[0298] "프레임워크 영역" (FR)은 CDR 잔기 이외 그들 가변 영역 잔기이다.

[0299] 본원에 사용된 경우에, 용어 "Fv" (또는 가변 단편)는, 다중 폴리펩타이드 또는 단일 폴리펩타이드로 구성되든, 임의의 단백질을 의미하는 것으로 간주되어야 하고, 여기에서 V_L 및 V_H 는 회합하고 항원 결합 도메인을 갖는, 즉, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 복합체를 형성한다. 항원 결합 도메인을 형성하는 V_H 및 V_L 은 단일 폴리펩타이드 쇠 또는 상이한 폴리펩타이드 쇠일 수 있다. 더욱이, 본 개시내용의 Fv (뿐만 아니라 본 개시내용의 임의의 단백질)는 동일한 항원을 결합시킬 수 있거나 아닐 수 있는 다중 항원 결합 도메인을 가질 수 있다. 본 용어는 항체 뿐만 아니라 재조합 수단을 사용하여 생산된 그와 같은 단편에 상응하는 단백질로부터 직접적으로 유래된 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 예에서, V_H 는 중쇄 불변 도메인 (C_H) 1에 연결되지 않고/거나 V_L 은 경쇄 불변 도메인 (C_L)에 연결되지 않는다. 예시적 Fv 함유 폴리펩타이드 또는 단백질은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 또는 고차 복합체, 또는 불변 영역 또는 이의 도메인, 예를 들어 C_H2 또는 C_H3 도메인, 예를 들면, 미니바디에 연결된 전술한 것 중 임의의 것을 포함한다. "항원 결합 단편" 또는 "Fab 단편"은 면역글로불린의 1가 항원-결합 단편으로 이루어지고, 온전한 경쇄 및 중쇄의 한 부분으로 이루어지는 단편을 산출하기 위해, 효소 파파인으로 전체 항체의 소화에 의해 생산될 수 있거나 재조합 수단을 사용하여 생산될 수 있다. 항체의 "Fab' 단편"은, V_H 및 단일 불변 도메인을 포함하는 중쇄의 한 부분 및 온전한 경쇄로 이루어지는 분자를 산출하기 위해, 펩신으로 전체 항체를 처리하고, 이어서 환원시킴으로써 획득될 수 있다. 2개 Fab' 단편은 이런 식으로 처리된 항체마다 획득된다. Fab' 단편은 재조합 수단에 의해 또한 생산될 수 있다. 항체의 "F(ab')₂ 단편"은 2개 디설피드 결합에 의해 단결된 2개 Fab' 단편의 이량체로 이루어지고, 후속 환원 없이, 전체 항체 분자를 효소 펩신으로 처리함으로써 획득된다. "Fab₂" 단편은, 예를 들어 류신 지퍼 또는 C_H3 도메인을 사용하여 연결된 2개 Fab 단편을 포함하는 재조합 단편이다. "단일 쇠 Fv" 또는 "scFv"는 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역이 적합한, 가요성 폴리펩타이드 링커에 의해 공유적으로 연결되는 항체의 가변 영역 단편 (Fv)을 함유하는 재조합 분자이다.

[0300] 본원에 사용된 경우에, CXCL10 결합 단백질 또는 이의 항원 결합 도메인의 항원과의 상호작용과 관련하여 용어 "결합한다"는 상호작용이 항원에서 특정한 구조 (예를 들면, 항원성 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존함을 의미한다. 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질보다 오히려 특정 단백질 구조를 인식하고 이에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 결합한다면, 표지화된 "A" 및 단백질을 함유하는 반응에서, 에피토프 "A" (또는 유리, 표지되지 않은 "A")를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지화된 "A"의 양을 감소시킬 것이다.

[0301] 본원에 사용된 경우에, 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "결합한다 특이적으로"는 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질이 대체 항원 또는 세포로 하는 것보다 동종을 발현시키는 특정한 항원 또는 세포로 더욱 빈번하게, 더욱 신속하게, 더 긴 지속시간으로 및/또는 더 큰 친화성으로 반응하거나 회합함을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, CXCL10 결합 단백질은 다중반응성 자연 항체에 의해 (즉, 인간에서 자연적으로 발견된 다양한 항원에 결합하는 것으로 알려진 자연 발생 항체에 의해) 공통으로 인식된 항원에 또는 다른 케모카인 수용체에 하는 것보다 물질적으로 더 큰 친화성 (예를 들면, 1.5 배 또는 2 배 또는 5 배 또는 10 배 또는 20 배 또는 40 배 또는 60 배 또는 80 배 내지 100 배 또는 150 배 또는 200 배)으로 CXCL10에 결합한다. "결합" 지칭은 용어 "특이적 결합"에 대하여 명시적 지원을 제공하고 그 반대의 경우도 마찬가지이다.

[0302] 본원에 사용된 경우에, 용어 "결합하지 않는다"는 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질이 동종을 발현시키는 특정한 항원 또는 세포에 결합하지 않음을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0303] 본원에 사용된 경우에, 용어 "검출가능하게 결합하지 않는다"는 CXCL10 결합 단백질, 예를 들면, 항체가 배경보다 10%, 또는 8% 또는 6% 또는 5% 미만 수준에서 후보 항원에 결합함을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 배경은 단백질의 부재 하에서 및/또는 음성 대조군 단백질 (예를 들면, 아이소타입 대조군 항체)의 존재 하에서 검출된 결합 신호의 수준 및/또는 음성 대조군 항원의 존재 하에서 검출된 결합의 수준일 수 있다. 하나의 예에서, 결합의 수준은 항원 (예를 들면, 폴리펩타이드)이 부동화되고 CXCL10 결합 단백질과 접촉되는 바이오센서 분석 (예를 들면 Biacore)을 사용하여 검출된다.

[0304] 본원에 사용된 경우에, 용어 "유의미하게 결합하지 않는다"는 폴리펩타이드에 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질의 결합의 수준이 배경, 예를 들면, CXCL10 결합 단백질의 부재 하에서 및/또는 음성 대조군 단백질 (예를 들면, 아이소타입 대조군 항체)의 존재 하에서 검출된 결합 신호의 수준 및/또는 음성 대조군 폴리펩타이드의 존

재 하에서 검출된 결합의 수준보다 통계적으로 유의미하게 더 높지 않음을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 하나의 예에서, 결합의 수준은 항원 (예를 들면, 폴리펩타이드)이 부동화되고 CXCL10 결합 단백질과 접촉되는 바이오센서 분석 (예를 들면 Biacore)을 사용하여 검출된다.

[0305] 설명의 목적을 위하여 그리고 본원에 예시된 주제에 기초하여 숙련된 기술자에게 명백할 바와 같이, 본 명세서에서 "친화성" 지칭은 단백질 또는 항체의 K_D 지칭이다.

[0306] 설명의 목적을 위하여 그리고 본원에서 기재에 기초하여 숙련된 기술자에게 명백할 바와 같이, "적어도 약의 친화성" 지칭은 친화성 (또는 K_D)이 인용된 값과 같거나 더 높음 (즉, 친화성으로서 인용된 값이 더 낮음), 즉, 2nM의 친화성이 3nM의 친화성보다 더 큼을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 달리 말하면, 본 용어는 "X 이하의 친화성"일 수 있고, 여기서 X는 본원에 인용된 값이다.

[0307] 본원에 사용된 경우에, 용어 "에피토프" (동의어 "항원성 결정기")는 CXCL10 결합 단백질이 결합하는 영역을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본 용어는 CXCL10 결합 단백질이 접촉하는 특정 잔기 또는 구조로 반드시 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 용어는 CXCL10 결합 단백질에 의해 접촉된 아미노산 및 이 영역의 외부에서 5-10개 (또는 그 이상) 또는 2-5개 또는 1-3개 아미노산에 미치는 영역을 포함한다. 일부 예에서, 에피토프는 CXCL10 폴리펩타이드가 폴딩되는 때 서로 가까이 위치되고, 예를 들어, 또 다른 CXCL10 폴리펩타이드, 즉 "형태적 에피토프"와 회합되는 일련의 불연속 아미노산을 포함한다.

[0308] 용어 "경쟁적으로 억제한다"는 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질 (또는 이의 항원 결합 도메인)이 CXCL10에 인용된 항체 또는 CXCL10 결합 단백질의 결합을 감소시키거나 방지함을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 이것은 동일한 또는 중첩 에피토프에 결합하는 항체 및 CXCL10 결합 단백질 (또는 항원 결합 도메인) 때문일 수 있다. CXCL10 결합 단백질이 항체의 결합을 완전히 억제시킬 필요가 없고, 오히려 결합을 통계적으로 유의미한 양만큼, 예를 들어, 적어도 약 10% 또는 20% 또는 30% 또는 40% 또는 50% 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 95%만큼 단지 감소시킬 필요가 있다는 것이 상기로부터 명백할 것이다. 예를 들어, CXCL10 결합 단백질은 항체의 결합을 적어도 약 30%만큼, 예를 들어 적어도 약 50%만큼, 예컨대, 적어도 약 70%만큼, 예를 들어 적어도 약 75%만큼, 더더욱 바람직하게는, 적어도 약 80% 또는 85%만큼 예를 들면, 적어도 약 90%만큼 감소시킨다. 결합의 경쟁적 억제를 결정하는 방법은 당업계에서 알려지고/거나 본원에 기재된다. 예를 들어, 항체는 CXCL10 결합 단백질의 어느 한쪽 존재 또는 부재 하에서 CXCL10에 노출된다. 더 적은 항체가 CXCL10 결합 단백질의 부재 하에서 보다 CXCL10 결합 단백질의 존재 하에서 결합한다면, 단백질은 항체의 결합을 경쟁적으로 억제시키는 것으로 간주된다. 하나의 예에서, 경쟁적 억제는 입체 장애 때문이 아니다.

[0309] CXCL10 결합 단백질

[0310] 본원에 논의된 경우에, 본 개시내용의 결합 단백질은 다양한 형태를 취할 수 있고 전장 인간 CXCL10, N-말단에 절두된 CXCL10 및/또는 시트룰린화된 CXCL10에 결합할 수 있다.

[0311] 하나의 예에서, 본 개시내용은 CXCL10 결합 단백질을 제공하고, 여기서 결합 단백질은 전장 인간 CXCL10, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10에 결합한다.

[0312] 또 다른 예에서, 본 개시내용은 CXCL10 결합 단백질을 제공하고, 여기서 결합 단백질은 전장 인간 CXCL10에 결합하지만, N-말단에 절두된 CXCL10 및 시트룰린화된 CXCL10을 결합시키지 않는다.

[0313] 항체

[0314] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0315] 면역화-기반 방법

[0316] 항체를 생성하는 방법은 당업계에서 알려지고/거나 Harlow 등, 1988에서 기재된다. 일반적으로, 상기 방법들에서, 임의의 적합한 또는 원하는 담체, 보조제, 또는 약학적으로 허용가능한 부형제와 임의로 제형화된, 단백질 또는 이의 면역원성 단편 또는 에피토프 또는 동종을 발현시키고 디스플레이하는 세포 (즉, 면역원)는 비-인간 동물, 예를 들어, 마우스, 닭, 랫트, 토끼, 기니 피그, 개, 말, 소, 염소 또는 돼지에 투여된다. 면역원은 비강 내로, 근육내로, 피하내로, 정맥내로, 피내로, 복강내로, 또는 다른 알려진 루트로 투여될 수 있다.

[0317] 다클론성 항체의 생산은 면역화 이후 다양한 지점에 면역화된 동물의 혈액을 샘플링함으로써 모니터링될 수 있다. 하나 이상의 추가 면역화는, 원하는 항체 역가를 달성하는데 필요하다면, 주어질 수 있다. 적합한 역가가 달성되는 때까지 부스팅 및 역가화의 과정은 반복된다. 면역원성의 원하는 수준이 수득되는 경우, 면역화된 동

물은 채혈되고 혈청 분리되고 저장되고/거나, 동물은 단클론성 항체 (mAb)를 생성하는데 사용된다.

- [0318] 단클론성 항체는 본 개시내용에 의해 고려된 항체의 하나의 예시적 형태이다. 용어 "단클론성 항체" 또는 "mAb"는 동일한 항원(들)에, 예를 들어, 항원 내에서 동일한 에피토프에 결합시킬 수 있는 균질 항체 개체군을 지칭한다. 본 용어는 항체의 출처 또는 항체가 만들어지는 방식과 관련하여 제한되는 것으로 의도되지 않는다.
- [0319] mAb의 생산을 위하여 다수의 알려진 기법들 중 어느 하나, 예컨대, 예를 들어, US4196265 또는 Harlow 등, 1988에서 예시된 절차가 사용될 수 있다.
- [0320] 예를 들어, 적합한 동물은 항체 생산 세포를 자극시키는데 충분한 조건 하에서 면역원으로 면역화된다. 토끼 및 설치류 예컨대 마우스 및 랫트는 예시적 동물이다. 인간 면역글로불린 단백질을 발현시키도록 그리고, 예를 들어, 쥐와 면역글로불린 단백질을 발현시키지 않도록 유전적으로-조작된 마우스는 (예를 들면, W02002066630에서 기재된 대로) 본 개시내용의 항체를 생성하는데 또한 사용될 수 있다.
- [0321] 면역화 이후, 항체를 생산하는 잠재성이 있는 체세포, 예를 들면, B 림프구 (B 세포)는 mAb 생성 프로토콜에서 사용을 위하여 선택된다. 이들 세포는 비장, 편도선 또는 림프절의 생검으로부터, 또는 말초 혈액 샘플로부터 수득될 수 있다. 면역화된 동물로부터 B 세포는 그 다음, 면역원으로 면역화된 동물과 동일한 종에서 일반적으로 유래된, 불멸성 골수종 세포의 세포들과 융합된다.
- [0322] 하이브리드는 조직 배양 배지에서 뉴클레오타이드의 드 노보 합성을 차단하는 제제를 포함하는 선택적 배지에서 배양에 의해 증폭된다. 예시적 제제는 아미노프테린, 메토타렉세이트 및 아자세핀이다.
- [0323] 증폭된 하이브리도마는, 예컨대, 예를 들어, 유세포 분석 및/또는 면역조직화학 및/또는 면역검정 (예를 들면 방사성면역검정, 효소 면역검정, 세포독성 검정, 플라크 검정, 도트 면역검정, 및 기타 등등)에 의해 항체 특이성 및/또는 역가에 대하여 기능적 선택에 적용된다.
- [0324] 대안적으로, ABL-MYC 기술 (NeoClone, 매디슨 WI 53713, 미국)은 (예를 들면, Largaespada 등, 1996에서 기재된 대로) mAb를 분비시키는 세포주를 생산하는데 사용된다.
- [0325] 라이브러리-기반 방법
- [0326] 본 개시내용은 또한 (예를 들면, 이의 가변 영역을 포함하는) 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 라이브러리의 스크리닝을 포괄한다.
- [0327] 본 개시내용에 의해 고려된 라이브러리의 예는 (도전받지 않은 대상체로부터) 나이트 라이브러리, (항원으로 면역화된 대상체로부터) 면역화된 라이브러리 또는 합성 라이브러리를 포함한다. 항체 또는 이의 영역 (예를 들면, 가변 영역)을 인코딩하는 핵산은 (예를 들면, Sambrook 등, 2001에서 개시된 대로) 종래 기법에 의해 클로닝되고 당업계에서 알려진 방법을 사용하여 단백질을 인코딩 및 디스플레이하는데 사용된다. 단백질의 라이브러리를 생산하는 다른 기법은, 예를 들어 US6300064 (예를 들면, Morphosys AG의 HuCAL 라이브러리); US5885793; US6204023; US6291158; 또는 US6248516에서 기재된다.
- [0328] 본 개시내용에 따른 항원 결합 단편은 가용성 분비된 단백질일 수 있거나 세포, 또는 입자 (예를 들면, 파지 또는 다른 바이러스, 리보솜 또는 포자)의 표면에서 융합 단백질로서 제시될 수 있다. 다양한 디스플레이 라이브러리 형식은 당업계에서 알려진다. 예를 들어, 라이브러리는 시험관내 디스플레이 라이브러리 (예를 들면, US7270969에서 기재된, 예를 들면, 리보솜 디스플레이 라이브러리, 공유 디스플레이 라이브러리 또는 mRNA 디스플레이 라이브러리)이다. 더욱 또 다른 예에서, 디스플레이 라이브러리는 항체의 항원 결합 단편을 포함하는 단백질, 예를 들면, US6300064; US5885793; US6204023; US6291158; 또는 US6248516에서 기재된 대로, 파지에서 발현되는 파지 디스플레이 라이브러리이다. 다른 파지 디스플레이 방법은 당업계에서 알려지고 본 개시내용에 의해 고려된다. 유사하게, 세포 디스플레이의 방법은 본 개시내용, 예를 들면, US5516637에서 기재된 대로, 예를 들면, 박테리아성 디스플레이 라이브러리; 예를 들면, US6423538에서 기재된 대로 효모 디스플레이 라이브러리, 또는 포유류 디스플레이 라이브러리에 의해 고려된다.
- [0329] 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하는 방법은 당업계에서 알려진다. 하나의 예에서, 본 개시내용의 디스플레이 라이브러리는, 예를 들면, Scopes, 1994에서 기재된 대로 친화성 정제를 사용하여 스크리닝된다. 친화성 정제의 방법은 전형적으로 라이브러리에 의해 디스플레이된 항원 결합 단편을 포함하는 단백질의 표적 항원과의 접촉 및, 이어서 세정, 항원에 결합된 채 남아있는 그들 도메인 용출을 포함한다.
- [0330] 스크리닝에 의해 식별된 임의의 가변 영역 또는 scFv는, 원한다면, 완전 항체로 용이하게 변형된다. 가변 영역

또는 scFv를 완전 항체로 변형 또는 재형식화하는 예시적 방법은, 예를 들어, Jones 등, 2010; 또는 Jostock 등, 2004; 또는 W02012040793에서 기재된다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 표준 클로닝 방법은, 예를 들면, Ausubel 등, 1987, 및/또는 Sambrook 등, 2001에서 기재된 대로 사용된다.

[0331] 탈면역화된, 키메라, 인간화된, 유사인간화된, 영장류화된 및 인간 항체 또는 항원 결합 단편

[0332] 본 개시내용의 항체 또는 항원 결합 단편은 인간화될 수 있다.

[0333] 용어 "인간화된 항체"는 인간-유사 가변 영역을 포함하는 단백질을 지칭하는 것으로 이해되어야 하고, 이는 인간 항체 (이러한 유형의 항체는 "CDR-이식된 항체"로서 또한 지칭됨)로부터 FR에 이식되거나 삽입된 비-인간 종 (예를 들면, 마우스 또는 랫트 또는 비-인간 영장류)에서 항체로부터 CDR을 포함한다. 인간화된 항체는 또한 인간 단백질의 하나 이상의 잔기가 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형되고/거나 인간 항체의 하나 이상의 FR 잔기가 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체되는 항체를 포함한다. 인간화된 항체는 인간 항체에서도 또는 비-인간 항체에서도 발견되지 않는 잔기를 또한 포함할 수 있다. 항체의 임의의 추가의 영역 (예를 들면, Fc 영역)은 일반적으로 인간이다. 인간화는 당업계에서 알려진 방법, 예를 들면, US5225539, US6054297, US7566771 또는 US5585089를 사용하여 수행될 수 있다. 용어 "인간화된 항체"는 또한, 예를 들면, US7732578에서 기재된 대로 초-인간화된 항체를 포괄한다. 유사한 의미는 용어 "인간화된 항원 결합 단편"에 적용하는 것으로 간주될 것이다.

[0334] 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 용어 "인간 항체"는 본원에 사용된 경우에 인간에서, 예를 들면 인간 생식계열 또는 체세포에서 또는 상기 영역을 사용하여 생산된 라이브러리로부터 발견된 가변 및, 임의로, 불변 항체 영역을 갖는 항체를 지칭한다. "인간" 항체는 인간 서열에 의해 인코딩되지 않은 아미노산 잔기, 예를 들면 시험관내 랜덤 또는 부위 지향된 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이 (특히 단백질의 잔기들의 소수에서, 예를 들면 단백질의 잔기들의 1, 2, 3, 4 또는 5개에서 보존적 치환 또는 돌연변이를 포함하는 돌연변이)를 포함할 수 있다. 이들 "인간 항체"는 인간의 면역 반응의 결과로서 반드시 생성될 필요는 없고, 오히려, 이들은 재조합 수단을 사용하여 (예를 들면, 과지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하여) 및/또는 인간 항체 불변 및/또는 가변 영역을 인코딩하는 핵산을 포함하는 유전자이식 동물 (예를 들면, 마우스)에 의해 및/또는 (예를 들면, 또는 US5565332에서 기재된 대로) 안내된 선택을 사용하여 생성될 수 있다. 본 용어는 또한 상기 항체의 친화성 성숙화된 형태를 포괄한다. 본 개시내용의 목적을 위하여, 인간 항체는 인간 항체로부터 FR 또는 인간 FR의 공통 서열로부터 서열을 포함하는 FR을 포함하는 단백질을 포함하는 것으로 또한 간주될 것이고 여기에서 CDR들 중 하나 이상은, 예를 들면, US6300064 및/또는 US6248516에서 기재된 대로 랜덤 또는 절반-랜덤이다. 유사한 의미는 용어 "인간 항원 결합 단편"에 적용하는 것으로 간주될 것이다.

[0335] 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 유사인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 용어 "유사인간화된 항체"는 W02007019620에서 기재된 방법에 의해 제조된 항체를 지칭한다. 유사인간화된 항체는 항체의 가변 영역을 포함하고, 여기서 가변 영역은 신세계 영장류 항체 가변 영역으로부터 FR 그리고 비-신세계 영장류 항체 가변 영역으로부터 CDR을 포함한다.

[0336] 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 영장류화될 수 있다. "영장류화된 항체"는 비-인간 영장류 (예를 들면, 사이노몰구스 마카크)의 면역화 이후 생성된 항체로부터 가변 영역(들)을 포함한다. 임의로, 비-인간 영장류 항체의 가변 영역은 인간 불변 영역에 연결되어 영장류화된 항체를 생산한다. 영장류화된 항체를 생산하는 예시적 방법은 US6113898에서 기재된다.

[0337] 하나의 예에서 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 키메라 항체 또는 단편이다. 용어 "키메라 항체" 또는 "키메라 항원 결합 단편"은 가변 도메인들 중 하나 이상이 특정한 종 (예를 들면, 쥐과, 예컨대 마우스 또는 랫트) 출신이거나 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하고 있는 항체 또는 단편을 지칭하고, 한편 항체 또는 단편의 나머지는 또 다른 종 (예컨대, 예를 들어, 인간 또는 비-인간 영장류) 출신이거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하고 있다. 하나의 예에서, 비-인간 항체 (예를 들면, 쥐과 항체)로부터 V_H 및/또는 V_L 및 항체의 나머지 영역을 포함하는 키메라 항체는 인간 항체 출신이다. 상기 키메라 항체 및 이의 항원 결합 단편의 생산은 당업계에서 알려지고, (예를 들면, US6331415; US5807715; US4816567 및 US4816397에서 기재된 대로) 표준 수단에 의해 달성될 수 있다.

[0338] 본 개시내용은 또한, 예를 들면, W02000034317 및 W02004108158에서 기재된 대로 탈면역화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 고려한다. 탈-면역화된 항체 및 단편은 제거된 (즉, 돌연변이된) 하나 이상의 에피토프, 예를

들면, B 세포 에피토프 또는 T 세포 에피토프를 가져 이로써 대상체가 항체 또는 단백질에 대해 면역 반응을 일으킬 가능성을 감소시킨다. 예를 들어, 본 개시내용의 항체는 분석되어 하나 이상의 B 또는 T 세포 에피토프를 식별하고 에피토프 내에서 하나 이상의 아미노산 잔기는 돌연변이되어 이로써 항체의 면역원성을 감소시킨다.

[0339] 항체 결합 도메인 함유 단백질

[0340] 단일-도메인 항체

[0341] 일부 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 (용어 "도메인 항체" 또는 "dAb"와 교환가능하게 사용되는) 단일-도메인 항체이거나 이를 포함한다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 한 부분을 포함하는 단일 폴리펩타이드 체이다.

[0342] 디아바디, 트리아바디, 테트라바디

[0343] 일부 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 또는 고차 단백질 복합체 예컨대 W098/044001 및/또는 W094/007921에서 기재된 것들이거나 이를 포함한다.

[0344] 예를 들어, 디아바디는 2개 연관된 폴리펩타이드 체를 포함하는 단백질이고, 각 폴리펩타이드 체는 구조 V_L -X- V_H 또는 V_H -X- V_L 을 포함하고, 여기서 X는 단일 폴리펩타이드 체에서 V_H 및 V_L 을 회합 (또는 Fv를 형성)시키는데 불충분한 잔기를 포함하는 링커이거나 부재이고, 여기서 하나의 폴리펩타이드 체의 V_H 는 다른 폴리펩타이드 체의 V_L 에 결합하여 항원 결합 부위를 형성한다, 즉, 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 Fv 분자를 형성한다. V_L 및 V_H 는 각 폴리펩타이드 체에서 동일할 수 있거나 V_L 및 V_H 는 이중특이적 디아바디를 형성하기 위해 (즉, 상이한 특이성을 갖는 2개 Fv를 포함하는) 각 폴리펩타이드 체에서 상이할 수 있다.

[0345] 단일 체 Fv (scFv) 단편

[0346] 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 scFv일 수 있다. 숙련된 기술자는 scFv가 단일 폴리펩타이드 체에서 V_H 및 V_L 영역 그리고 scFv가 항원 결합을 위하여 (즉, 단일 폴리펩타이드 체의 V_H 및 V_L 이 서로 회합하여 Fv를 형성하기 위하여) 원하는 구조를 형성할 수 있는 V_H 와 V_L 사이의 폴리펩타이드 링커를 포함한다는 것을 인지할 것이다. 예를 들어, 링커는 scFv에 대하여 더욱 선호된 링커들 중 하나인 $(Gly_4Ser)_3$ 과 과량의 12개 아미노산 잔기를 포함한다.

[0347] 본 개시내용은 또한 디설피드 안정화된 Fv (또는 diFv 또는 dsFv)를 고려하고, 여기에서 단일 시스테인 잔기는 V_H 의 FR 및 V_L 의 FR 그리고 디설피드 결합에 의해 연결된 시스테인 잔기에 도입되어 안정한 Fv를 산출한다.

[0348] 대안적으로, 또는 이밖에, 본 개시내용은 이량체성 scFv, 즉, 비-공유 또는 공유 연결기에 의해, 예를 들면, (예를 들면, Fos 또는 Jun에서 유래된) 류신 지퍼 도메인에 의해 연결된 2개 scFv 분자를 포함하는 단백질을 포괄한다. 대안적으로, 2개 scFv는 양쪽 scFv가, 예를 들면, US20060263367에서 기재된 대로 항원을 형성하고 이에 결합시키는데 충분한 길이의 펩타이드 링커에 의해 연결된다.

[0349] 절반-항체

[0350] 일부 예에서, 본 개시내용의 항원 결합 단편은 절반-항체 또는 절반-분자이다. 숙련된 기술자는 절반-항체가 단일 중쇄 및 단일 경쇄를 포함하는 단백질을 지칭한다는 것을 인지할 것이다. 용어 "절반-항체"는 또한 항체 경쇄 및 항체 중쇄를 포함하는 단백질을 포괄하고, 여기서 항체 중쇄는 돌연변이되어 또 다른 항체 중쇄와 회합을 방지한다. 하나의 예에서, 절반-항체는 항체가 해리하여 단일 중쇄 및 단일 경쇄를 각각 함유하는 2개 분자를 형성하는 때 형성한다.

[0351] 절반-항체를 생성하는 방법은 당업계에서 알려지고 예시적 방법은 본원에 기재된다.

[0352] 하나의 예에서, 절반-항체는 발현을 위하여 관심의 IgG를 구성하는 단일 중쇄 및 단일 경쇄의 세포 유전자에 도입함으로써 분비될 수 있다. 하나의 예에서, 불변 영역 (예를 들면, IgG₄ 불변 영역)은 헤테로이량체 형성을 방지하기 위해 "키 또는 홀" (또는 "늑 또는 홀") 돌연변이를 포함한다. 하나의 예에서, 불변 영역 (예를 들면, IgG₄ 불변 영역)은 T366W 돌연변이 (또는 늑)를 포함한다. 또 다른 예에서, 불변 영역 (예를 들면, IgG₄ 불변 영역)은 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이 (또는 홀)를 포함한다. 또 다른 예에서, 불변 영역은 T350V, T366L, K392L 및 T394W 돌연변이 (늑)를 포함한다. 또 다른 예에서, 불변 영역은 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V 돌연

변이 (홀)를 포함한다. 예시적 불변 영역 아미노산 치환은 EU 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다.

[0353] 다른 항체 및 이의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질

[0354] 본 개시내용은 또한 다른 항체 및 이의 항원-결합 도메인을 포함하는 단백질, 예컨대:

[0355] (i) 예를 들면, US5837821에서 기재된 대로 미니바다;

[0356] (ii) 예를 들면, US4676980에서 기재된 대로 헤테로컨쥬게이트 단백질;

[0357] (iii) 예를 들면, US4676980에서 기재된 대로 화학적 가교-링커를 사용하여 생산된 헤테로컨쥬게이트 단백질; 및

[0358] (iv) (예를 들면, EP19930302894에서 기재된 대로) Fab₃

[0359] 을 고려한다.

[0360] 면역글로불린 및 면역글로불린 단편

[0361] 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질의 예는 면역글로불린, 예컨대 T 세포 수용체 또는 중쇄 면역글로불린 (예를 들면, IgNAR, 카멜리드 항체)의 가변 영역을 포함하는 단백질이다.

[0362] 중쇄 면역글로불린

[0363] 중쇄 면역글로불린은, 이들이 중쇄를 포함하지만, 경쇄를 포함하지 않는 한, 많은 다른 형태의 면역글로불린 (예를 들면, 항체)과 구조적으로 상이하다. 따라서, 이들 면역글로불린은 "중쇄 단독 항체"로서 또한 지칭된다. 중쇄 면역글로불린은, 예를 들어, 카멜리드 및 연골 어류 (또한 IgNAR로 칭함)에서 발견된다.

[0364] 자연 발생 중쇄 면역글로불린에서 존재하는 가변 영역은, ("V_H 도메인"으로서 지칭되는) 종래 4-쇄 항체에서 존재하는 중쇄 가변 영역 및 ("V_L 도메인"으로서 지칭되는) 종래 4-쇄 항체에서 존재하는 경쇄 가변 영역과 이들을 구별하기 위해, 카멜리드 Ig내 "V_H 도메인" 및 IgNAR내 V-NAR로서 일반적으로 지칭된다.

[0365] 중쇄 면역글로불린은 관련한 항원에 고 친화성 및 고 특이성으로 결합하기 위해 경쇄의 존재가 필요 없다. 이것은 단일 도메인 결합 단편이 중쇄 면역글로불린에서 유래될 수 있음을 의미하고, 이는 발현하기 쉽고 일반적으로 안정하고 가용성이다.

[0366] 카멜리드 및 이의 가변 영역으로부터 중쇄 면역글로불린 및 이들의 생산 및/또는 단리 및/또는 사용 방법에 대한 일반적인 설명은 특히 하기 참고문헌 W094/04678, W097/49805 및 W0 97/49805에서 확인된다.

[0367] 연골 어류로부터 중쇄 면역글로불린 및 이의 가변 영역 그리고 그들의 생산 및/또는 단리 및/또는 사용 방법의 일반 설명은 특히 W02005118629에서 확인된다.

[0368] V-유사 단백질

[0369] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 T-세포 수용체를 포함한다. T 세포 수용체는 항체의 Fv 모듈과 유사한 구조로 조합하는 2개 V-도메인을 갖는다. Novotny 등, 1991은 (알파 및 베타로 명명된) T-세포 수용체의 2개 V-도메인이 단일 쇠 폴리펩타이드로서 융합 및 발현될 수 방법 그리고, 추가로, 항체 scFv에 직접적으로 유사한 소수성을 감소시키기 위해 표면 잔기를 변경시키는 방법을 설명한다. 2개 V-알파 및 V-베타 도메인을 포함하는 단일-쇄 T-세포 수용체 또는 다량체성 T 세포 수용체의 생산을 설명하는 다른 간행물은 W01999045110 또는 W02011107595가 포함된다.

[0370] 항원 결합 도메인을 포함하는 다른 비-항체 단백질은 V-유사 도메인을 가진 단백질을 포함하고, 이는 일반적으로 다량체성이다. 상기 V-유사 도메인을 포함하는 단백질의 예는 CTLA-4, CD28 및 ICOS를 포함한다. 상기 V-유사 도메인을 포함하는 단백질의 추가 개시내용은 W01999045110에 포함된다.

[0371] 에드넥틴

[0372] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 에드넥틴을 포함한다. 에드넥틴은 루프 영역이 변경되어 항원 결합을 부여하는 인간 피브로넥틴의 10번째 피브로넥틴 유형 III (¹⁰F_n3) 도메인에 기반된다. 예를 들어, ¹⁰F_n3 도메인의 β-샌드위치의 한쪽 끝에 3개 루프는 에드넥틴이 항원을 특이적으로 인식할 수 있도록 조작될 수

있다. 추가의 상세 내용은 US20080139791 또는 WO2005056764를 참조한다.

[0373] **안티칼린**

[0374] 추가 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 안티칼린을 포함한다. 안티칼린은 리포칼린에서 유래되고, 이는 작은 소수성 분자 예컨대 스테로이드, 빌린, 레티노이드 및 지질을 수송하는 세포외 단백질의 패밀리아. 리포칼린은 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 원뿔형 구조의 개방 말단에 다수의 루프를 가진 강직한 β -시트 이차 구조를 갖는다. 이렇게 조작된 리포칼린은 안티칼린으로서 알려져 있다. 안티칼린에 대한 추가 설명은 US7250297 또는 US20070224633을 참조한다.

[0375] **아피바디**

[0376] 추가 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 아피바디를 포함한다. 아피바디는 항원에 결합하도록 조작될 수 있는 황색포도상구균의 단백질 A의 Z 도메인 (항원 결합 도메인)에서 유래된 스캐폴드이다. Z 도메인은 대략 58개 아미노산의 3개-나선형 다발로 이루어진다. 라이브러리는 표면 잔기의 랜덤화에 의해 생성되었다. 추가의 상세 내용은 EP1641818을 참조한다.

[0377] **아비머**

[0378] 추가 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 아비머를 포함한다. 아비머는 A-도메인 스캐폴드 패밀리에 유래된 멀티도메인 단백질이다. 대략 35개 아미노산의 천연 도메인은 정의된 디설피드 결합된 구조를 채택한다. 다양성은 A-도메인의 패밀리에 의해 나타난 자연 변이의 서플링에 의해 생성된다. 추가의 상세 내용은 WO2002088171을 참조한다.

[0379] **DARPin**

[0380] 추가 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 설계된 안키린 반복 단백질 (DARPin)을 포함한다. DARPin은 세포골격에 통합적 막 단백질의 부착을 매개하는 단백질의 한 패밀리에 유래된다. 단일 안키린 반복 부는 2개 α -나선 및 β -턴으로 이루어지는 33개 잔기 모티프이다. 이들은 각 반복부의 첫 번째 α -나선 및 β -턴에서 잔기를 랜덤화함으로써 상이한 표적 항원을 결합시키도록 조작될 수 있다. 그들의 결합 인터페이스는 모듈의 수를 증가시킴으로써 증가될 수 있다 (친화성 성숙화의 방법). 추가의 상세 내용은 US20040132028을 참조한다.

[0381] **결합 단백질에 대한 돌연변이**

[0382] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 동종을 인코딩하는 핵산 또는 CXCL10 결합 단백질을 제공한다. 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질 또는 핵산은 본원에 개시된 서열에 적어도 약 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하고, 여기서 단백질은 임의의 예에 따라 본원에 기재된 경우에 CXCL10에 특이적으로 결합한다.

[0383] 대안적으로, 또는 추가적으로, CXCL10 결합 단백질은 임의의 예에 따라 본원에 기재된 경우에 V_H 또는 V_L 의 CDR (들)에 적어도 약 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 동일한 CDR (예를 들면, 3개 CDR)을 포함하고, 여기서 단백질은 임의의 예에 따라 본원에 기재된 경우에 CXCL10에 특이적으로 결합할 수 있다. CXCL10에 단백질의 결합을 결정하는 방법은 본원에 기재된다.

[0384] 중쇄 CDR2의 5개 C-말단 잔기가 보존적 또는 비-보존적 아미노산 치환 (잔기의 31%)으로 돌연변이될 수 있음이 당업계에 공지되어 있다 (Padlan 등, 1995). 따라서, 단백질은 본원에 개시된 중쇄 CDR2 서열에 적어도 약 35% 동일성을 갖는 CDR2를 포함할 수 있다.

[0385] 본 개시내용은 또한 본원에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질의 돌연변이체 형태를 고려한다. 일부 예에서, CXCL10 결합 단백질은 10개 이하, 예를 들면, 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2 또는 1개 보존적 아미노산 치환을 포함한다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄 및/또는 소수친수성 및/또는 친수성을 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 예시적 보존적 아미노산 치환은 표 1에서 제공된다.

표 1: 예시적 아미노산 치환.

본래 잔기	예시적 치환
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro; ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

[0386]

[0387]

염기성 측쇄 (예를 들면, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들면, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄 (예를 들면, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들면, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), β -분지된 측쇄 (예를 들면, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들면, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티로신)를 포함하는 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에서 정의되었다. 소수친수성 지수는, 예를 들어 Kyte and Doolittle, 1982에서 기재되고 친수성 지수는, 예를 들면, US4554101에서 기재된다.

[0388]

본 개시내용은 또한 비-보존적 아미노산 변화를 고려한다. 예를 들어, 하전된 아미노산의 또 다른 하전된 아미노산으로 그리고 중성 또는 양으로 하전된 아미노산으로의 치환이 특히 관심이다. 일부 예에서, CXCL10 결합 단백질은 10개 이하, 예를 들면, 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2 또는 1개 비-보존적 아미노산 치환을 포함한다.

[0389]

하나의 예에서, 돌연변이(들)는 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질의 항원 결합 도메인의 FR 내에서 발생한다. 또 다른 예에서, 돌연변이(들)는 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질의 CDR 내에서 발생한다.

[0390]

CXCL10 결합 단백질의 돌연변이체 형태를 생산하는 예시적 방법은 하기를 포함한다:

[0391]

- DNA (Thie 등, 2009) 또는 RNA (Kopsidas 등, 2006; Kopsidas 등, 2007; 및 W01999/058661)의 돌연변이유발;

[0392]

- 돌연변이유발유전자 세포, 예를 들면, XL-1Red, XL-mutS 및 XL-mutS-Kanr 박테리아성 세포 (Stratagene)에 폴리캡타이드를 인코딩하는 핵산 도입하기;

[0393]

- 예를 들면, Stemmer, 1994에서 개시된 대로 DNA 서플링; 및

[0394]

- 예를 들면, Dieffenbach 등, 1995)에서 기재된 대로 부위 지향된 돌연변이유발.

[0395]

본 개시내용의 돌연변이체 CXCL10 결합 단백질의 생물학적 활성을 결정하는 예시적 방법은 숙련된 기술자에 명백할 것이고, 예를 들어 항원 결합, 결합의 경쟁적 억제, 친화성, 회합 및 해리를 포함한다.

[0396]

또 다른 예에서, 본 개시내용의 핵산은 본원에 제시된 서열에 적어도 약 90% 또는 95% 또는 97% 또는 98% 또는

99% 동일한 그리고 임의의 예에 따라 본원에 기재된 경우에 기능을 갖는 CXCL10 결합 단백질을 인코딩하는 서열을 포함한다. 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질을 인코딩하는 핵산을 포괄하고, 이는 유전적 코드의 축퇴의 결과로서 본원에 예시된 서열과 상이하다.

[0397] 핵산 또는 폴리펩타이드의 % 동일성은 갭 창작 패널티=5, 및 갭 확장 패널티=0.3이 있는 GAP (Needleman and Wunsch, 1970) 분석 (GCG 프로그램)에 의해 결정된다. 쿼리 서열은 길이로 적어도 50개 잔기이고, GAP 분석은 적어도 50개 잔기의 영역에 걸쳐서 2개 서열을 정렬시킨다. 예를 들어, 쿼리 서열은 길이로 적어도 100개 잔기이고 GAP 분석은 적어도 100개 잔기의 영역에 걸쳐서 2개 서열을 정렬시킨다. 예를 들어, 2개 서열은 그들의 전체 길이에 걸쳐서 정렬된다.

[0398] 불변 영역

[0399] 본 개시내용은 항체의 불변 영역을 포함하는 본원에 기재된 CXCL10 결합 단백질 및/또는 항체를 포괄한다. 이는 Fc에 융합된 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0400] 본 개시내용의 단백질을 생산하는데 유용한 불변 영역의 서열은 다수의 상이한 공급원으로부터 취득될 수 있다. 일부 예에서, 단백질의 불변 영역 또는 이의 부분은 인간 항체에서 유래된다. 불변 영역 또는 이의 부분은 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하는 임의의 항체 클래스, 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 임의의 항체 아이소타입에서 유래될 수 있다. 하나의 예에서, 불변 영역은 인간 아이소타입 IgG4 또는 안정화된 IgG4 불변 영역이다. 한 구현예에서, 불변 영역은 IgG 카파 불변 영역이다.

[0401] 하나의 예에서, 불변 영역의 Fc 영역은, 예를 들면, 천연 또는 야생형 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 영역에 비교하여, 효과기 기능을 유도하는 능력이 감소된다. 본 개시내용의 맥락에서, "효과기 기능"은 세포의 사멸을 초래하는 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 결합하는 세포 또는 단백질에 의해 매개된 그들 생물학적 활성을 지칭한다. 항체에 의해 유도된 효과기 기능의 예는 보체 의존적 세포 독성 (CDC); 항체-의존적-세포-매개된 세포독성 (ADCC); 항체-의존적-세포-식균작용 (ADCP); 및 B-세포 활성화를 포함한다. 하나의 예에서, 효과기 기능은 ADCC 및/또는 ADCP 및/또는 CDC이다. Fc 영역 함유 단백질의 효과기 기능의 수준을 사정하는 방법은 당업계에서 알려지고/거나 본원에 기재된다.

[0402] 하나의 예에서, Fc 영역은 (즉, IgG4 불변 영역으로부터) IgG4 Fc 영역, 예를 들면, 인간 IgG4 Fc 영역이다. 적합한 IgG4 Fc 영역의 서열은 숙련된 사람에게 명백할 것이고/거나 공공으로 이용가능한 데이터베이스에서 이용가능 (예를 들면, 국립 생명 공학 정보 센터로부터 이용가능)할 것이다.

[0403] 하나의 예에서, 불변 영역은 안정화된 IgG4 불변 영역이다. 용어 "안정화된 IgG4 불변 영역"은 Fab 아암 교환 또는 Fab 아암 교환을 거치는 경향 또는 절반-항체의 형성 또는 절반 항체를 형성하는 경향을 감소시키도록 변형된 IgG4 불변 영역을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "Fab 아암 교환"은 인간 IgG4에 대하여 단백질 변형의 한 유형을 지칭하고, 여기에서 IgG4 중쇄 및 부착된 경쇄 (절반-분자)는 또 다른 IgG4 분자로부터 중-경쇄 쌍으로 맞바뀐다. 따라서, IgG4 분자는 (이종특이적 분자를 초래하는) 2개 별개 항원을 인식하는 2개 별개 Fab 아암을 획득할 수 있다. Fab 아암 교환은 생체내 자연적으로 발생하고 정제된 혈구 또는 환원 제제 예컨대 환원된 글루타티온에 의해 시험관내 유도될 수 있다. "절반 항체"는 IgG4 항체가 해리하여 단일 중쇄 및 단일 경쇄를 각각 함유하는 2개 분자를 형성하는 때 형성한다.

[0404] 하나의 예에서, 안정화된 IgG4 불변 영역은 Kabat의 시스템에 따라 힌지 영역의 위치 241에 프롤린을 포함한다 (Kabat 등, 1987 및/또는 1991). 이 위치는 EU 넘버링 시스템에 따라 힌지 영역의 위치 228에 상응한다 (Kabat 등, 2001 및 Edelman 등, 1969). 인간 IgG4에서, 이 잔기는 일반적으로 세린이다. 세린으로 프롤린의 치환 이후, IgG4 힌지 영역은 서열 CPPC를 포함한다. 이와 관련하여, 숙련된 사람은 "힌지 영역"이 항체의 2개 Fab 아암에서 기동성을 부여하는 Fc 및 Fab 영역을 연결하는 항체 중쇄 불변 영역의 프롤린-풍부 부문을 인지할 것이다. 힌지 영역은 중쇄간 디설피드 결합에 관여되는 시스테인 잔기를 포함한다. Kabat의 넘버링 시스템에 따라 인간 IgG1의 Glu226부터 Pro243까지 스트레칭으로서 일반적으로 정의된다. 다른 IgG 아이소타입의 힌지 영역은 동일한 위치에서 중쇄간 디설피드 (S-S) 결합을 형성하는 최초 및 최종 시스테인 잔기를 배치시킴으로써 IgG1 서열과 정렬될 수 있다 (예를 들어 W02010/080538 참조).

[0405] 안정화된 IgG4 항체의 추가의 예는 (EU 넘버링 시스템에 따라) 인간 IgG4의 중쇄 불변 영역에서 위치 409에 아르기닌이 (예를 들면, W02006/033386에서 기재된 대로) 리신, 트레오닌, 메티오닌, 또는 류신으로 치환되는 항체이다. 불변 영역의 Fc 영역은 (EU 넘버링 시스템에 따라) 405에 상응하는 위치에 알라닌, 발린, 글리신, 이소류신 및 류신으로 이루어지는 군으로부터 선택된 잔기를 추가적으로 또는 대안적으로 포함할 수 있다. 임의로,

한지 영역은 (상기 기재된 대로) 위치 241에 프롤린 (즉, CPPC 서열)을 포함한다.

[0406] 또 다른 예에서, Fc 영역은 감소된 효과기 기능을 갖도록 변형된 영역, 즉, "비-면역자극 Fc 영역"이다. 예를 들어, Fc 영역은 268, 309, 330 및 331로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 치환을 포함하는 IgG1 Fc 영역이다. 또 다른 예에서, Fc 영역은 하기 변화들 E233P, L234V, L235A 및 G236의 결실 중 하나 이상 및/또는 하기 변화들 A327G, A330S 및 P331S 중 하나 이상을 포함하는 IgG1 Fc 영역이다 (Armour 등, 1999; Shields 등, 2001). 비-면역자극 Fc 영역의 추가의 예는, 예를 들어, Dall'Acqua 등, 2006; 및/또는 Hezareh, 2001)에서 기재된다.

[0407] 또 다른 예에서, Fc 영역은, 예를 들면, IgG4 항체로부터 적어도 하나의 C_H2 도메인 및 IgG1 항체로부터 적어도 하나의 C_H3 도메인을 포함하는 키메라 Fc 영역이고, 여기서 Fc 영역은 (예를 들면, WO2010/085682에서 기재된 대로) 240, 262, 264, 266, 297, 299, 307, 309, 323, 399, 409 및 427 (EU 넘버링)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 예시적 치환은 240F, 262L, 264T, 266F, 297Q, 299A, 299K, 307P, 309K, 309M, 309P, 323F, 399S, 및 427F를 포함한다.

[0408] 단백질 생산

[0409] 하나의 예에서, 임의의 예에 따라 본원에 기재된 CXCL10 결합 단백질은, 예를 들면, 본원에 기재된 경우에 및/또는 당업계에서 알려진 대로 단백질을 생산하는데 충분한 조건 하에서 본 발명의 세포를 배양시킴으로써 생산된다.

[0410] 제조합 발현

[0411] 또 다른 예에서, 임의의 예에 따라 본원에 기재된 CXCL10 결합 단백질은 제조합이다.

[0412] 제조합 단백질의 경우에서, 동종을 인코딩하는 핵산은 발현 작제물 또는 벡터로 클로닝될 수 있고, 이는 그 다음 숙주 세포, 예컨대 *E. 콜리* 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 포유류 세포, 예컨대 시미안 COS 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 인간 배아 신장 (HEK) 세포, 또는 달리 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포로 형질감염된다. 단백질을 발현시키는데 사용된 예시적 세포는 CHO 세포, 골수종 세포 또는 HEK 세포이다. 이들 목적을 달성하기 위한 분자성 클로닝 기법은 당업계에서 알려지고, 예를 들어 Ausubel 등, 1988 (현재까지 모든 업데이트 포함) 또는 Sambrook 등, 1989에서 기재된다. 매우 다양한 클로닝 및 시험관내 증폭 방법은 제조합 핵산의 작제에 적합하다. 제조합 항체의 생산 방법은 당업계에서 또한 알려지고, 예를 들면, US4816567 또는 US5530101을 참고한다.

[0413] 달리 이후, 핵산은 추가 클로닝 (DNA의 증폭)을 위하여 또는 무세포 시스템에서 또는 세포에서 발현을 위하여 발현 작제물 또는 발현 벡터에서 프로모터에 작동가능하게 연결되어 삽입된다.

[0414] 본원에 사용된 경우에, 용어 "프로모터"는 이의 가장 넓은 맥락으로 간주되어 하고, 예를 들면, 발달적 및/또는 외부 자극에 반응하여, 또는 조직 특이적 방식으로 핵산의 발현을 변경시키는 추가의 조절 요소 (예를 들면, 업스트림 활성화 서열, 전사 인자 결합 부위, 인핸서 및 사이렌서) 있거나 없이, 정확한 전사 개시에 필요한, TATA 박스 또는 개시체 요소를 포함하는, 게놈성 유전자의 전사적 조절 서열을 포함한다. 본 맥락에서, 용어 "프로모터"는 작동가능하게 연결되는 핵산의 발현을 부여, 활성화 또는 향상시키는 제조합, 합성 또는 융합 핵산, 또는 유도체를 설명하는데 또한 사용된다. 예시적 프로모터는 하나 이상의 특이적 조절 요소의 추가의 카피를 함유하여 상기 핵산의 발현을 추가로 향상 및/또는 공간적 발현 및/또는 일시적 발현을 변경시킬 수 있다.

[0415] 본원에 사용된 경우에, 용어 "에 작동가능하게 연결된"은 핵산의 발현이 프로모터에 의해 제어되도록 핵산에 대한 프로모터의 위치화를 의미한다.

[0416] 세포에서 발현을 위한 많은 벡터는 이용가능하다. 벡터 구성요소는 일반적으로, 비제한적으로, 하기: 신호 서열, (예를 들면, 본원에 제공된 정보에서 유래된) 단백질을 인코딩하는 서열, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함한다. 숙련된 기술자는 단백질의 발현에 적합한 서열을 인지할 것이다. 예시적 신호 서열은 원핵 분비 신호 (예를 들면, pelB, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II), 효모 분비 신호 (예를 들면, 인버타제 리더, α 인자 리더, 또는 산 포스파타제 리더) 또는 포유류 분비 신호 (예를 들면, 단순 포진 gD 신호)를 포함한다.

[0417] 포유류 세포에서 활성인 예시적 프로모터는 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 (CMV-IE), 인간 신장 인자 1-α 프로모터 (EF1), 소형 핵 RNA 프로모터 (U1a 및 U1b), α-미오신 중쇄 프로모터, 시미안 바이러스 40 프로

모터 (SV40), 라우스 육종 바이러스 프로모터 (RSV), 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, β -액틴 프로모터; CMV 인핸서/ β -액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터 또는 이의 활성 단편을 포함하는 하이브리드 조절 요소를 포함한다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 주 (현탁 배양물에서 성장을 위하여 서브클로닝된 293 또는 293 세포; 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 또는 중국 햄스터 난소 세포 (CHO)이다.

[0418] 효모 세포 예컨대 예를 들어 *피치아 파스토리스*(*Pichia pastoris*), *사카로마이세스 세레비시애*(*Saccharomyces cerevisiae*), 및 *슈조사카로마이세스 폼베*(*Schizosaccharomyces pombe*)를 포함하는 균으로부터 선택되는 효모 세포에서 발현에 적합한 전형적 프로모터는, 비제한적으로, *ADHI* 프로모터, *GAL1* 프로모터, *GAL4* 프로모터, *CUP1* 프로모터, *PHO5* 프로모터, *nmt* 프로모터, *RPR1* 프로모터 또는 *TEF1* 프로모터를 포함한다.

[0419] 발현을 위하여 세포에 동종을 포함하는 단리된 핵산 또는 발현 작제물을 도입하는 수단은 당업자에 알려진다. 주어진 세포에 사용된 기법은 알려진 성공적 기법에 의존한다. 재조합 DNA를 세포에 도입하는 수단은 미세주입, DEAE-텍스트란에 의해 매개된 형질감염, 리포솜에 의해 예컨대 리포펙타민 (Gibco, MD, USA) 및/또는 선택타민 (Gibco, MD, USA)을 사용함으로써 매개된 형질감염, PEG-매개된 DNA 흡수, 전기천공 및 예컨대 DNA-코팅된 텅스텐 또는 금 입자 (Agracetus Inc., WI, USA)를 사용함으로써 미세입자 충격을 특히 포함한다.

[0420] 단백질을 생산하는데 사용된 숙주 세포는, 사용된 세포 유형에 의존하여, 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지 예컨대 햄(Ham's) F10 (Sigma), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium) ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 및 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM), Sigma)가 포유류 세포를 배양시키는데 적합하다. 본원에 논의된 다른 세포 유형들을 배양시키기 위한 배지는 당업계에서 알려진다.

[0421] 단백질의 단리

[0422] 단백질을 단리시키는 방법은 당업계에서 알려지고/거나 본원에 기재된다.

[0423] CXCL10 결합 단백질이 배양 배지에 분비되는 경우, 상기 발현 시스템으로부터 상청액은 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 한외여과 유닛을 사용하여 먼저 농축될 수 있다. 프로테아제 억제제 예컨대 PMSF는 단백질분해를 억제시키기 위해 전술한 단계들 중 임의의 것에 포함될 수 있고 항생제는 외래 오염물의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 상청액은, 예를 들면, 연속 원심분리를 사용하여 단백질을 발현시키는 세포로부터 여과 및/또는 분리될 수 있다.

[0424] 세포로부터 제조된 CXCL10 결합 단백질은, 예를 들어, 이온 교환, 수산화인회석 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화성 크로마토그래피 (예를 들면, 단백질 A 친화성 크로마토그래피 또는 단백질 G 크로마토그래피), 또는 상술의 임의의 조합을 사용하여 정제될 수 있다. 이들 방법은 당업계에서 알려지고, 예를 들어 W099/57134 또는 Harlow 등, 1988에서 기재된다.

[0425] 숙련된 기술자는 단백질이 정제 또는 검출을 용이하게 하는 태그, 예를 들면, 폴리-히스티딘 태그, 예를 들면, 헥사-히스티딘 태그, 또는 인플루엔자 바이러스 혈구응집소 (HA) 태그, 또는 시미안 바이러스 5 (V5) 태그, 또는 FLAG 태그, 또는 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST) 태그를 포함하도록 변형될 수 있음을 또한 인지할 것이다. 생성된 단백질은 그 다음 당업계에서 알려진 방법, 예컨대, 친화성 정제를 사용하여 정제된다. 예를 들어, 헥사-히스 태그를 포함하는 단백질은 단백질을 포함하는 샘플을 고체 또는 절반-고체 지지체에서 부동화된 헥사-히스 태그를 특이적으로 결합시키는 니켈-니트릴로트리아세트산 (Ni-NTA)과 접촉시키고, 샘플을 세정하여 결합되지 않은 단백질을 제거하고, 이어서 결합된 단백질을 용출시킴으로써 정제된다. 대안적으로, 또는 이밖에 도 태그에 결합하는 리간드 또는 항체는 친화성 정제 방법에서 사용된다.

[0426] **컨쥬게이트**

[0427] 하나의 예에서, 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 검출가능한 표지에 컨쥬게이션된다.

[0428] 본원에 사용된 경우에, 용어 "컨쥬게이트" 또는 "컨쥬게이션된"은 양쪽 간접 및 직접 결합을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 직접 컨쥬게이션은 화학적 컨쥬게이션을 포함하고, 이는 ("융합"으로서 또한 지칭된) 비-공유 또는 공유 또는 유전적 컨쥬게이션일 수 있다. 하나의 예에서, 컨쥬게이션은 공유, 예를 들면, 디설피드 결합이다.

[0429] 본원에 사용된 경우에, "검출가능한 표지"는 시각적으로 또는 적합한 검출기를 사용함으로써 검출될 수 있는 광학 또는 다른 신호 또는 산물을 생성하거나 생성하도록 유도될 수 있는 분자성 또는 원자성 태그 또는

마커이다. 검출가능한 표지는 당업계에서 잘 알려지고, 예를 들어, 방사성표지, 효소, 형광성 표지, 발광성 표지, 생물발광성 표지, 자성 표지, 보철 그룹, 조영 제제 및 초음파 제제를 포함한다.

[0430]

흔히 사용된 형광성 표지는 알렉사, 시아닌 예컨대 Cy5 및 Cy5.5, 및 인도시아닌, 그리고 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)를 포함하지만, 이들은 그렇게 제한되지 않는다. 본 개시내용의 실시에서 유용한 형광성 표지는, 또한 제한 없이, 1,5 IAEDANS; 1,8-ANS; 4-메틸움벨리페론; 5-카르복시-2,7-디클로로플루오레세인; 5-카르복시플루오레세인 (5-FAM); 5-카르복시나프토플루오레세인 (pH 10); 5-카르복시테트라메틸로다민 (5-TAMRA); 5-FAM (5-카르복시플루오레세인); 5-HAT (하이드록시 트립타민); 5-하이드록시 트립타민 (HAT); 5-ROX (카르복시-X-로다민); 5-TAMRA (5-카르복시테트라메틸로다민); 6-카르복시로다민 6C; 6-CR 6G; 6-JOE; 7-아미노-4-메틸쿠마린; 7-아미노악티노마이신 D (7-AAD); 7-하이드록시-4-메틸쿠마린; 9-아미노-6-클로로-2-메톡시아크리딘; ABQ; 산 폭신; ACMA (9-아미노-6-클로로-2-메톡시아크리딘); 아크리딘 오렌지+DNA; 아크리딘 오렌지+RNA; 아크리딘 오렌지, 양쪽 DNA 및 RNA; 아크리딘 레드; 아크리딘 옐로우; 아크리플라빈; 아크리플라빈 포일겐 SITSA; 애쿼린 (광단백질); 알렉사 플루오르 350; 알렉사 플루오르 430; 알렉사 플루오르 488; 알렉사 플루오르 532; 알렉사 플루오르 546; 알렉사 플루오르 568; 알렉사 플루오르 594; 알렉사 플루오르 633; 알렉사 플루오르 647; 알렉사 플루오르 660; 알렉사 플루오르 680; 알리자린 컴플렉손; 알리자린 레드; 알로피코시아닌 (APC); AMC, AMCA-S; AMCA (아미노메틸쿠마린); AMCA-X; 아미노악티노마이신 D; 아미노쿠마린; 아미노메틸쿠마린 (AMCA); 아닐린 블루; 안트로실스 테아레이트; APC (알로피코시아닌); APC-Cy7; APTRA-BTC=비율 염료, Zn^{2+} ; APTS; 아스트라존 브릴리언트 레드 4G; 아스트라존 오렌지 R; 아스트라존 레드 6B; 아스트라존 옐로우 7 GLL; 아타브린; ATTO-TAG CBQCA; ATTO-TAG FQ; 아우라민; 오로포스핀 G; 오로포스핀; BAO 9 (비삼니노페닐옥사디아졸); BCECF (높은 pH); BCECF (낮은 pH); 베르베린 술페이트; 베타 락타마제; BFP 청색 이동된 GFP (Y66H); 청색 형광성 단백질; BFP/GFP FRET 비마네; 비스벤잠니드; 비스벤즈이미드 (Hoechst); 비스-BTC = 비율 염료, Zn^{2+} ; 블랑코포르 FFG; 블랑코포르 SV; BOBO-1; BOBO-3; 바디피 492/515; 바디피 493/503; 바디피 500/510; 바디피 505/515; 바디피 530/550; 바디피 542/563; 바디피 558/568; 바디피 564/570; 바디피 576/589; 바디피 581/591; 바디피 630/650-X; 바디피 650/665-X; 바디피 665/676; 바디피 F1; 바디피 FL ATP; 바디피 F1-세라미드; 바디피 R6G SE; 바디피 TMR; 바디피 TMR-X 컨쥬게이트; 바디피 TMR-X, SE; 바디피 TR; 바디피 TR ATP; 바디피 TR-X SE; BO-PRO-1; BO-PRO-3; 브릴리언트 술폴플라빈 FF; BTC-비율 염료 Ca^{2+} ; BTC-5N-아티오 염료, Zn^{2+} ; 칼세인; 칼세인 블루; 칼슘 크립손; 칼슘 그린; 칼슘 그린-1 Ca^{2+} 염료; 칼슘 그린-2 Ca^{2+} ; 칼슘 그린-5N Ca^{2+} ; 칼슘 그린-C18 Ca^{2+} ; 칼슘 오렌지; 칼코플루오르 화이트; 카르복시-X-로다민 (5-ROX); 캐스케이드 블루; 캐스케이드 옐로우 399; 카테콜아민; CCF2 (진블레이저); CFDA; CFP--시아 형광성 단백질; CFP/YFP; FRET; 엽록소; 크로모마이신 A; 크로모마이신 A; CL-NERF (비율 염료, pH); CMFDA; 코엘렌테라진; 코엘렌테라진 cp (Ca^{2+} 염료); 코엘렌테라진 f; 코엘렌테라진 fcp; 코엘렌테라진 h; 코엘렌테라진 hcp; 코엘렌테라진 ip; 코엘렌테라진 n; 코엘렌테라진 O; 쿠마린 팔로이딘; C-피코시아닌; CPM 메틸쿠마린; CTC; CTC 포르마잔; Cy2; Cy3.1 8; Cy3.5; Cy3; Cy5.1 8; Cy5.5; Cy5; Cy7; 시안 GFP; 환식 AMP 형광센서 (FicRhR); CyQuant 세포 증식 검정; 다브실; 단실; 단실 아민; 단실 카다베린; 단실 클로라이드; 단실 DHPE; 단실 플루오라이드; DAPI; 다폭실; 다폭실 2; 다폭실 3; DCFDA; DCFH (디클로로디하이드로플루오레세인 디아세테이트); DDAO; DHR (디하이드로로다민 123); 디-4-ANEPPS; 디-8-ANEPPS (비비); DiA (4-디-16-ASP); 디클로로디하이드로플루오레세인 디아세테이트 (DCFH); DiD-친유성 추적자; DiD (DiIC18(5)); DIDS; 디하이드로로다민 123 (DHR); DiI (DiIC18(3)); 디니트로페놀; DiO (DiOC18(3)); DiR; DiR (DiIC18(7)); DM-NERF (높은 pH); DNP; 도파민; DsRed; 적색 형광성 단백질; DTAF; DY-630-NHS; DY-635-NHS; EBFP; ECFP; EGFP; ELF 97; 에오신; 에리트로신; 에리트로신 ITC; 에티뎀 브로마이드; 에티뎀 동종이량체-1 (EthD-1); 유크리신; 유코라이트; 유로폼 (III) 클로라이드; EYFP; 패스트 블루; FDA; 포일겐 (파라로사닐린); FIF (포름알데하이드 유도된 형광); FITC; FITC 항체; 플라조 오렌지; 플루오-3; 플루오-4; 플루오레세인 (FITC); 플루오레세인 디아세테이트; 플루오로-에메랄드; 플루오로-골드 (하이드록시스티라미딘); 플루오르-루비; 플루오르X; FM 1-43; FM 4-46; 푸라 레드 (높은 pH); 푸라 레드/플루오-3; 푸라-2, 고 칼슘; 푸라-2, 저 칼슘; 푸라-2/BCECF; 제나크릴 브릴리언트 레드 B; 제나크릴 브릴리언트 옐로우 10GF; 제나크릴 핑크 3G; 제나크릴 옐로우 5GF; 진블레이저 (CCF2); GFP (S65T); GFP 적색 이동된 (rsGFP), GFP 야생형, 비-UV 여기 (wtGFP); GFP 야생형, UV 여기 (wtGFP); GFPuv; 글록살산; 그레놀라 블루; 헤마토포르피린; 핵스트 33258; 핵스트 33342; 핵스트 34580; HPTS; 하이드록시쿠마린; 하이드록시스티라미딘 (FluoroGold); 하이드록시트립타민; 인도-1, 고 칼슘; 인도-1, 저 칼슘; 인도디카르보시아닌 (DiD); 인도트리카르보시아닌 (DiR); 인트라화이트 Cf; JC-1; JO-JO-1; JO-PRO-1; 레이저프로; 라우로단; LDS 751 (DNA); LDS

751 (RNA); 류코퍼르 PAF; 류코퍼르 SF; 류코퍼르 WS; 리사민 로다민; 리사민 로다민 B; LIVE/DEAD 키트 동물 세포, 칼세인/에티뎀 동종이량체; LOLO-1; LO-PRO-1; 루시퍼 엘로우; 리소 트래커 블루; 리소 트래커 블루-화이트; 리소 트래커 그린; 리소 트래커 레드; 리소 트래커 엘로우; 리소센서 블루, 리소센서 그린; 리소센서 엘로우/블루; 막 그린; 막달라 레드 (플록신 B); 막-푸라 레드; 막-푸라-2; 막-푸라-5; 막-인도-1; 마그네슘 그린; 마그네슘 오렌지; 말라카이트 그린; 마리나 블루; 막실론 브릴리언트 플라빈 10 GFF; 막실론 브릴리언트 플라빈 8 GFF; 메로시아닌; 메톡시쿠마린; 미토타래커 그린 FM; 미토타래커 오렌지; 미토타래커 레드; 미트라마이신; 모노브로모비만; 모노브로모비만 (mBBBr-GSH); 모노클로로비만; MPS (메틸 그린 파이로닌 스틸벤); NBD; NBD 아민; 나일 레드; 니트로벤조사디올; 노르아드레날린; 핵 패스트 레드; 핵 엘로우; 닐로산 브릴리언트 이아빈 E8G; 오레곤 그린; 오레곤 그린 488-X; 오레곤 그린; 오레곤 그린 488; 오레곤 그린 500; 오레곤 그리네 514; 퍼시픽 블루; 파라로사닐린 (포일젠); PBF1; PE-Cy5; PE-Cy7; PerCP; PerCP-Cy5.5; PE-텍사스레드 [레드 613]; 플록신 B (막달라 레드); 포와이트 AR; 포와이트 BKL; 포와이트 레드; 포와이트 RPA; 포스핀 3R; 포토레지스트; 피코에리트린 B [PE]; 피코에리트린 R [PE]; PKH26 (Sigma); PKH67; PMIA; 폰토크롬 블루 블랙; POPO-1; POPO-3; PO-PRO-1; PO-PRO-3; 프리물린; 프로시온 엘로우; 프로피뎀 요오다이드 (PI); PyMPO; 피렌; 피로닌; 피로닌 B; 피로잘 브릴리언트 플라빈 7GF; QSY 7; 퀴나크린 머스타드; 레드 613 [PE-텍사스레드]; 레소루핀; RH 414; 로드-2; 로다민; 로다민 110; 로다민 123; 로다민 5 GLD; 로다민 6G; 로다민 B; 로다민 B 200; 로다민 B 엑스트라; 로다민 BB; 로다민 BG; 로다민 그린; 로다민 팔리시딘; 로다민 팔로이딘; 로다민 레드; 로다민 WT; 로즈 벤갈; R-피코시아닌; R-피코에리트린 (PE); rsGFP; S65A; S65C; S65L; S65T; 사파이어 GFP; SBF1; 세로토닌; 세브론 브릴리언트 레드 2B; 세브론 브릴리언트 레드 4G; 세브론 브릴리언트 레드 B; 세브론 오렌지; 세브론 엘로우 L; sgBFP; sgBFP (슈퍼 글로우 BFP); sgGFP; sgGFP (슈퍼 글로우 GFP); SITS; SITS (프리물린); SITS (스틸벤 이소티오술폰산); SNAFL 칼세인; SNAFL-1; SNAFL-2; SNARF 칼세인; SNARF1; 소듐 그린; 스펙트럼아쿠아; 스펙트럼그린; 스펙트럼오렌지; 스펙트럼 레드; SPQ (6-메톡시-N-(3-술포프로필)퀴놀리늄); 스틸벤; 술포로다민 B 캔 C; 술포로다민 G 엑스트라; SYTO 11; SYTO 12; SYTO 13; SYTO 14; SYTO 15; SYT; SYTO 17; SYTO 18; SYTO 20; SYTO 21; SYTO 22; SYTO 23; SYTO 24; SYTO 25; SYTO 40; SYTO 41; SYTO 42; SYTO 43; SYTO 44; SYTO 45; SYTO 59; SYTO 60; SYTO 61; SYTO 62; SYTO 63; SYTO 64; SYTO 80; SYTO 81; SYTO 82; SYTO 83; SYTO 84; SYTO 85; SYTOX 블루; SYTOX 그린; SYTOX 오렌지; 테트라사이클린; 테트라메틸로다민 (TRITC); 텍사스 레드; 텍사스 레드-X 컨쥬게이트; 티아디카르보시아닌 (DiSC3); 티아진 레드 R; 티아졸 오렌지; 티오플라빈 5; 티오플라빈 S; 티오플라빈 TCN; 티올라이트; 티오졸 오렌지; 티노폴 CBS (칼코플루오르 화이트); TMR; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; 트리컬러 (PE-Cy5); TRITC (테트라메틸로다민-이소티오시아네이트); 트루 블루; 트루레드; 울트라라이트; 우라닌 B; 유비텍스 SFC; wt GFP; WW 781; X-로다민; XRITC; 크실렌 오렌지; Y66F; Y66H; Y66W; 엘로우 GFP; YFP; YO-PRO-1; YO-PRO-3; YOYO-1; 및 YOYO-3을 포함할 수 있다.

[0431] 하나의 예에서, 검출가능한 표지는 효소이다. 효소는 적절한 기질에서 작용하여 검출가능한 염료의 생산을 초래할 수 있다. 본 개시내용에서 유용한 효소의 예는, 제한 없이, 알칼리성 포스포타제 및 겨자무 퍼옥시다제를 포함한다. 대안적으로 또는 이밖에, 효소는, 예를 들어, 루시페라제일 수 있다. 효소는 종래 화학적 방법에 의해 항체에 연결될 수 있거나, 융합 단백질로서 항체와 함께 발현될 수 있다.

[0432] 본 개시내용에서 검출가능한 표지로서 유용한 방사성동위원소는 당업계에서 잘 알려지고 ^3H , ^{11}C , ^{18}F , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{99}mTc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , 및 ^{131}I 를 포함할 수 있다. 칼시토닌 수용체를 결합시키는 화합물의 카르복실, 아미노, 또는 술포하이드릴기와 반응할 수 있는 임의의 감마 방출 방사성 물질, 예를 들면, ^{99}mTc 및 ^{111}In 의 부착은 감마 선풍조영술을 사용하는 검출 방법에서 사용에 적합하다. 화합물의 카르복실, 아미노, 또는 술포하이드릴기와 반응할 수 있는 방사성 ^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{124}I , 및 ^{131}I 화합물의 부착은 PET/SPECT 영상을 사용하는 검출 방법에서 사용에 적합하다.

[0433] **CXCL10 결합 단백질 검정하기**

[0434] **CXCL10 및 이의 변형된 형태에 결합하기**

[0435] 본 개시내용의 일부 CXCL10 결합 단백질이 전장 CXCL10에 및/또는 CXCL10의 특이적 번역후에 변형된 형태 (예를 들면, N-말단에 절두된 CXCL10 및/또는 시트룰린화된 CXCL10)에 결합하는 것이 본원에 본 개시내용으로부터 숙련된 기술자에 명백할 것이다. 단백질에의 결합을 사정하는 방법은, 예를 들면, Scopes, 1994에서 기재된 대로 당업계에서 알려진다. 그와 같은 방법은 일반적으로 CXCL10 결합 단백질을 부동화하는 단계 그리고 이것을 표지화된 항원과 접촉시키는 단계를 포함한다. 비-특이적 결합된 단백질을 제거하기 위한 세정 이후, 표지의 양 그

리고, 결과적으로, 결합된 항원은 검출된다. 물론, CXCL10 결합 단백질은 표지화될 수 있고 항원은 부동화될 수 있다. 패닝-유형 검정은 또한 사용될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 표면 플라즈몬 공명 검정은 사용될 수 있다.

[0436] 친화성 결정하기

[0437] 임의로, 결합 단백질의 해리 상수 (K_d) 또는 결합 상수 (K_a) 또는 평형 상수 (K_D)가 결정된다. 결합 영역 (예를 들면, 항체 또는 항원 결합 단편)에 대하여 이들 상수는, 하나의 예에서, 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 바이오센서 분석에 의해 측정된다. 예시적 SPR 방법은 US7229619에서 기재된다.

[0438] 친화성 측정은 항체 반응에 대하여 표준 방법론, 예를 들어, 면역검정, 표면 플라즈몬 공명 (SPR) (Rich and Myszyka, 2000; Englebiene, 1998), 등은 적정 열량계 (ITC) 또는 당업계에 알려진 다른 동역학적 상호작용 검정에 의해 결정될 수 있다.

[0439] 경쟁적 결합 결정하기

[0440] 본원에 기재된 CXCL10 결합 단백질의 결합을 경쟁적으로 억제시키는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 결정하기 위한 검정은 숙련된 기술자에 명백할 것이고/거나 본원에 기재될 것이다.

[0441] 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 검출가능한 표지, 예를 들면, 형광성 표지 또는 방사성 표지에 컨쥬게이션된다. 표지화된 항체 및 테스트 CXCL10 결합 단백질은 그 다음 혼합되고 CXCL10 또는 이의 한 영역 또는 동종을 발현시키는 세포와 접촉된다. 표지화된 항체의 수준은 그 다음 결정되고 표지화된 항체가 CXCL10 결합 단백질의 부재 하에서 CXCL10, 영역 또는 세포와 접촉되는 때 결정된 수준에 비교된다. 표지화된 항체의 수준이 CXCL10 결합 단백질의 부재에 비교하여 테스트 CXCL10 결합 단백질의 존재 하에서 감소된다면, CXCL10 결합 단백질은 CXCL10에 항체의 결합을 경쟁적으로 억제시키는 것으로 간주된다.

[0442] 임의로, 테스트 CXCL10 결합 단백질은 항체에 대한 상이한 표지에 컨쥬게이션된다. 이러한 대안적 표지화는 CXCL10 또는 이의 영역 또는 세포에 테스트 CXCL10 결합 단백질의 결합의 수준의 검출을 허용한다.

[0443] 또 다른 예에서, CXCL10 결합 단백질은 항체와 CXCL10, 영역 또는 세포 접촉하기에 앞서 동종을 발현시키는 CXCL10 또는 이의 영역 또는 세포에 결합하도록 허용된다. CXCL10 결합 단백질의 부재 하에 비교하여 CXCL10 결합 단백질의 존재 하에서 결합된 항체의 양에서 감소는 단백질이 CXCL10에 항체의 결합을 경쟁적으로 억제시키는 것을 나타낸다. 상호 검정은 표지화된 CXCL10 결합 단백질을 사용하고 먼저 항체를 CXCL10에 결합시켜 또한 수행될 수 있다. 이 경우에, 항체의 부재 하에 비교하여 항체의 존재 하에서 CXCL10에 결합된 표지화된 CXCL10 결합 단백질의 감소된 양은 CXCL10 결합 단백질이 CXCL10에 항체의 결합을 경쟁적으로 억제시키는 것을 나타낸다.

[0444] CXCL10의 수준 결정하기

[0445] 상기 논의된 대로, CXCL10은 감염성 질환, 중추 신경계 장애, 만성 염증, 면역 기능장애 및 암을 포함하는 다양한 인간 질환과 연관되었다.

[0446] 본 발명자들은 상이한 형태의 단백질, 즉, 전장 또는 성숙한 CXCL10, N-말단에 절두된 CXCL10 및/또는 시트룰린화된 CXCL10을 검출하기 위해 CXCL10 결합 단백질을 개발하였다.

[0447] 본 발명자들은 상이한 형태의 단백질이 양성 및 악성 병태에서 상이한 수준에 존재하는 것을 알아내었다.

[0448] 따라서, 본원에 기재된 임의의 개시내용의 방법은 대상체에서 CXCL10의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

[0449] 본원에 사용된 경우에, CXCL10과 관련하여 용어 "수준"은 단백질의 기능성의 수준 (즉, 기능적 수준)을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 수준 (또는 "발현의 수준")은 인코딩된 단백질의 측정치를 지칭한다.

[0450] 특히, 본 발명자들은 대상체에서 활성 CXCL10 단백질 및 총 CXCL10 단백질의 수준을 결정하는 단계가 양성 및 악성 병태를 구별할 수 있음을 알아내었다. 이 절차는 본원에 활성 비율 테스트 (ART)로서 지칭된다.

[0451] 본원에 사용된 경우에, CXCL10의 수준의 맥락에서 용어 "활성"은 CXCL10의 생물학적으로 활성 형태를 지칭한다. 예를 들어, 활성 CXCL10을 결합시키는 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 전장 또는 성숙한 (즉, N-말단에 온전한) CXCL10에 결합하지만 N-말단에 절두된 또는 시트룰린화된 CXCL10에 결합하지 않는 결합 단백질을 지칭한다.

[0452] 본원에 사용된 경우에, CXCL10의 수준의 맥락에서 용어 "총"은 CXCL10의 모든 형태를 지칭한다. 예를 들어, 총

CXCL10을 결합시키는 본 개시내용의 CXCL10 결합 단백질은 전장 또는 성숙한 (즉, N-말단에 온전한) CXCL10에 뿐만 아니라 N-말단에 절두된 및 시트룰린화된 CXCL10에 결합하는 결합 단백질을 지칭한다.

- [0453] 하나의 예에서, 활성 CXCL10 및 총 CXCL10의 수준을 결정하는 단계는 대상체에서 활성 CXCL10 단백질의 양 및 총 CXCL10 단백질의 양을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0454] 본원에 사용된 경우에, CXCL10의 수준에 관련하여 용어 "양"은 단백질의 정량 (즉, 어느 한쪽 활성 또는 총 CXCL10)을 지칭하는 것으로 이해될 것이다. 단백질의 정량의 다양한 사정 방법은 숙련된 사람에 이용가능하고 숙련된 사람은 특정 값 또는 양이 사용된 사정 방법에 의존하여 다양할 것임을 인식할 것이다. 본 용어가 양쪽 절대값 및 상대값을 포괄하는 것이 또한 명백할 것이다. 예를 들어, 양은 참조 또는 대조군 샘플에 상대적일 수 있다. 또 다른 예에서, 양은 샘플에서 존재하는 단백질의 양의 절대값일 수 있다.
- [0455] 본 발명자들은 대상체에서 CXCL10 비율을 결정하는 단계가 양성 및 악성 병태를 구별할 수 있다는 것을 놀랍게도 알아내었다.
- [0456] 본원에 사용된 경우에, 용어 "CXCL10 비율"은 대상체에서 활성 CXCL10의 수준 대 총 CXCL10의 수준의 비율을 지칭한다.
- [0457] 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 대상체에서 CXCL10 비율을 적어도 하나의 참조에서 CXCL10 비율과 비교하는 단계를 포함한다.
- [0458] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 (a) 대상체에서 CXCL10 비율이 참조에서 CXCL10 비율보다 더 높은지, 또는 (b) 대상체에서 CXCL10 비율이 참조에서 CXCL10 비율보다 더 낮은지를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0459] CXCL10 비율에 관련하여 용어 "더 높은"은 대상체에서 비율이 대조군 또는 참조 수준에 비교하여, 더 크거나 증가되는 것을 의미한다. CXCL10 비율이 통계적으로 유의미한 양만큼, 예를 들어, 적어도 약 10%, 또는 약 20%, 또는 약 30%, 또는 약 40%, 또는 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 90%, 또는 약 95% 만큼 단지 증가될 필요가 있음이 상기로부터 명백해질 것이다.
- [0460] CXCL10 비율에 관련하여 용어 "더 낮은"은 대상체에서 비율이 대조군 또는 참조 수준에 비교하여, 감소되거나 줄어드는 것을 의미한다. CXCL10 비율이 통계적으로 유의미한 양만큼, 예를 들어, 적어도 약 10%, 또는 약 20%, 또는 약 30%, 또는 약 40%, 또는 약 50%, 또는 약 60%, 또는 약 70%, 또는 약 80%, 또는 약 90%, 또는 약 95% 만큼 단지 감소될 필요가 있음이 상기로부터 명백해질 것이다.
- [0461] **CXCL10의 수준의 결정 방법**
- [0462] CXCL10 단백질의 수준의 결정 방법은 숙련된 사람에 명백할 것이고/거나 본원에 기재된다. 예를 들어, 방법은 면역조직화학, 면역형광, 면역블랏, 웨스턴 블랏, 도트 블랏, 효소결합 면역흡착 검정 (ELISA), 방사선 면역검정 (RIA), 효소 면역검정, 형광 공명 에너지 전달 (FRET), 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 비행 시간 (MALDI-TOF), 전자분무 이온화 (ESI), 질량 분광법 (탠덤 질량 분광법, 예를 들면 LC MS/MS 포함), 바이오센서 기술, 소멸성 섬유-광학 기술 또는 단백질 칩 기술을 포함한다. 예를 들어, 적합한 검정은 절반-정량적 검정 및/또는 정량적 검정이다.
- [0463] 하나의 예에서, 샘플에서 CXCL10의 수준을 결정하는 방법은 결합 단백질과 폴리펩타이드 또는 단백질 사이 복합체가 형성하는데 충분한 조건 하에서 그리고 시간 동안 CXCL10 폴리펩타이드 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 (본원에 기재된 경우에) CXCL10 결합 단백질과 대상체로부터 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계 및 그 다음 복합체를 검출하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 방법에서 활성 CXCL10의 수준은 측정되고 총 CXCL10의 수준은 측정되고 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 비율은 결정된다.
- [0464] **효소결합 면역흡착 검정 (ELISA) 및 형광결합 면역흡착 검정 (FLISA)**
- [0465] 표준 고체상 ELISA 또는 FLISA 형식은 다양한 샘플로부터 단백질의 농도를 결정하는데 특히 유용하다. 하나의 형태에서 그와 같은 검정은 생물학적 샘플을 고체 매트릭스, 예컨대, 예를 들어 폴리스티렌 또는 폴리카르보네이트 마이크로웰 또는 계량봉, 막, 또는 유리 지지체 (예를 들면 유리 슬라이드)에 부동화시키는 단계를 포함한다.
- [0466] CXCL10 폴리펩타이드 내에서 마커에 특이적으로 결합시키는 항체는 부동화된 생물학적 샘플과 직접 접촉되고, 상기 샘플에서 존재하는 이의 표적 단백질의 임의의 것과 직접 결합을 형성한다. 이 항체는 검출가능한 리포터

분자, 예컨대 예를 들어, FLISA의 경우에 형광성 표지 (예를 들면 FITC 또는 텍사스 레드) 또는 (US 6,306,610에서 기재된 대로) 형광성 반도체 나노결정 또는 ELISA의 경우에 효소 (예를 들면 겨자무 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제 (AP) 또는 β -갈락토시다제)로 일반적으로 표지화되거나, 또는 대안적으로 제1 항체에 결합하는 제2 표지화된 항체는 사용될 수 있다. 임의의 결합되지 않은 항체를 제거하기 위한 세정 이후 표지는 어느 한쪽 형광성 표지의 경우에 직접적으로, 또는 효소적 표지의 경우에 기질, 예컨대 예를 들어 과산화수소, TMB, 또는 톨루이딘, 또는 5-브로모-4-클로로-3-인돌-베타-D-갈라오토피라노시드 (x-gal)의 추가를 통해서 검출된다.

[0467] 그러한 ELISA 또는 FLISA 기반된 시스템은 항체가 결합하는 단백질 표준, 예컨대 예를 들어, 단리된 및/또는 재조합 CXCL10 폴리펩타이드 또는 이의 면역원성 단편 또는 이의 에피토프의 알려진 양에 대해 검출 시스템을 보정함으로써, 샘플에서 단백질의 양의 정량화에 적합하다.

[0468] 또 다른 예에서, ELISA는 고체 매트릭스, 예컨대, 예를 들어, 막, 폴리스티렌 또는 폴리카르보네이트 마이크로웰, 폴리스티렌 또는 폴리카르보네이트 마이크로웰 계량봉 또는 유리 지지체상의 CXCL10 폴리펩타이드 내에서 질환 또는 장애의 마커를 특이적으로 결합시키는 항체 또는 리간드 부동화로 이루어진다. 샘플은 그 다음 상기 항체와 물리적 관련되고, 샘플 내에서 상기 마커는 결합되거나 '포착된다'. 결합된 단백질은 그 다음 표지화된 항체를 사용하여 검출된다. 대안적으로, 제2 (검출) 항체를 결합시키는 제3 표지화된 항체는 사용될 수 있다.

[0469] 하나의 예에서, 부동화된 항체는 다클론성 항체이다.

[0470] 본원에 기재된 검정 형식이 고 처리량 형식, 예컨대, 예를 들어 Mendoza 등, 1999에서 기재된 대로 스크리닝 공정 또는 마이크로어레이 형식의 자동화에 따른다는 것이 숙련된 사람에게 명백할 것이다. 더욱이, 상기-기재된 검정의 변동, 예컨대, 예를 들어, 경쟁적 ELISA는 당업자에 명백할 것이다.

[0471] 하나의 예에서, 검정 형식은 미세유체공학 장치, 예를 들어, 미세유체공학 칩 또는 액적-기반 미세유체공학 장치이다. 미세유체공학 칩 (예를 들면, 미세전자기계 시스템 (MEMS) 장치)은, 전형적으로 크기로 몇 제곱 밀리미터 내지 몇 제곱 센티미터 범위이다. 이들 미세유체공학 칩은 생물학적 또는 의료적 처리 또는 테스트를 수행하기 위해 작은 유체 부피를 취급 또는 조종하도록 설계된다. 유체는 단일 미세유체공학 칩에서 기동, 혼합, 또는 처리될 수 있다.

[0472] 또 다른 예에서, 검정 형식은 계량봉, 예를 들어, 폴리카르보네이트 계량봉이다.

[0473] SIMOA 검정

[0474] 본 발명에서 사용될 수 있는 또 다른 검정은 단일-분자 어레이 (Simoa) 검정이고, 이는 Kuhle 등 (2016) 및 Gisslen 등 (2016)에서 상세히 기재된다.

[0475] 웨스턴 블랏팅

[0476] 또 다른 예에서, 웨스턴 블랏팅은 샘플에서 CXCL10 폴리펩타이드 내에 마커의 수준을 결정하는데 사용된다. 그와 같은 검정에서 샘플로부터 단백질은 당업계에서 알려지고, 예를 들어, Scopes, 1994에서 기재된 기법을 사용하는 나트륨 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)을 사용하여 분리된다. 분리된 단백질은 그 다음 당업계에서 알려진 방법, 예를 들어, 전기이동을 사용하여 고체 지지체, 예컨대, 예를 들어, 막 (예를 들면, PVDF 막)으로 이동된다. 이 막은 그 다음 차단되고 CXCL10 폴리펩타이드 내에서 마커에 특이적으로 결합하는 표지화된 항체 또는 리간드로 탐침조사된다. 대안적으로, 표지화된 이차, 또는 심지어 삼차, 항체 또는 리간드는 특이적 일차 항체의 결합을 검출하는데 사용된다. 표지의 수준은 그 다음 사용된 표지에 적절한 검정을 사용하여 결정된다.

[0477] 적절한 검정은 숙련된 기술자에 명백할 것이고, 예를 들어, 밀도계측을 포함한다. 하나의 예에서, 단백질 밴드 또는 스팟의 강도는 당업계에서 알려진 방법을 사용하여 SDS-PAGE 겔에 로딩된 단백질의 총 양에 대해 정규화된다. 대안적으로, 검출된 마커의 수준은 대조군/참조 단백질의 수준에 대해 정규화된다. 상기 대조군 단백질은 당업계에서 알려지고, 예를 들어, 액틴, 글리세르알데하이드 3-포스페이트 데하이드로게나제 (GAPDH), β 2 마이크로글로불린, 하이드록시-메틸빌란 신타제, 하이포크산틴 포스포리보실-트랜스퍼라제 1 (HPRT), 리보솜 단백질 L13c, 숙시네이트 데하이드로게나제 복합체 서브유닛 A 및 TATA 박스 결합 단백질 (TBP)을 포함한다.

[0478] 방사성면역검정

[0479] 대안적으로, CXCL10의 수준은 방사성면역검정 (RIA)을 사용하여 검출된다. 검정의 기본 원리는 항체-항원 상호작용을 검출하기 위한 방사성표지화된 항체 또는 항원의 사용이다. CXCL10 폴리펩타이드 내에서 마커에 특이적

으로 결합하는 항체 또는 리간드는 고체 지지체에 결합되고 샘플은 상기 항체와 직접 접촉된다. 결합된 항원의 수준을 검출하기 위해, 항원의 단리된 및/또는 재조합 형태는 방사성표지화되고 동일한 항체와 접촉된다. 세정 이후, 결합된 방사능의 수준은 검출된다. 생물학적 샘플의 임의의 항원이 방사성표지화된 항원의 결합을 억제시킴에 따라 검출된 방사능의 수준은 샘플에서 항원의 수준에 반비례한다. 그와 같은 검정은 증가하는 알려진 농도의 단리된 항원을 사용하는 표준 곡선을 사용함으로써 정량화될 수 있다.

[0480] 숙련된 사람에게 명백할 바와 같이, 그와 같은 검정은 방사성 표지 대신에 임의의 리포터 분자, 예컨대, 예를 들어, 효소 또는 형광성 분자를 사용하도록 변형될 수 있다.

[0481] 바이오센서 또는 광학 면역센서 시스템

[0482] 대안적으로, 샘플에서 CXCL10의 수준은 바이오센서 또는 광학 면역센서 시스템을 사용하여 결정된다. 일반적으로, 광학 바이오센서는 표적 폴리펩타이드에 리간드 또는 항체의 결합을 전기 신호로 정량적으로 변환시키기 위해 광학 원리를 사용하는 장치이다. 이들 시스템은 4가지 주요 범주: 반사 기법; 표면 플라즈몬 공명; 섬유 광학 기법 및 통합된 광학 장치로 그룹화될 수 있다. 반사 기법은 타원 측정법, 다중 통합 반사 분광법, 및 형광성 모세관 충전 장치를 포함한다. 섬유-광학 기법은 소멸장 형광, 광섬유 모세관, 및 섬유 광학 형광 센서를 포함한다. 통합된 광학 장치는 평면형 소멸장 형광, 입력 등급화 커플러 면역센서, 마호-젠더 간섭계, 하트만 간섭계 및 차등 간섭계 센서를 포함한다. 광학 면역센서의 이들 예는 Robins, 1991에 의해 일반적으로 기재된다. 이들 장치의 더욱 구체적인 설명은 예를 들어 미국 특허 번호 4,810,658; 4,978,503; 5,186,897; 및 Brady 등, 1987에서 찾아진다.

[0483] 생물학적 샘플

[0484] 숙련된 사람에게 명백할 바와 같이, 생물학적 샘플의 유형 및 크기는 사용된 검출 수단에 의존할 것이다. 예를 들어, 단백질-기반 검정은 항원 기반된 검정에 대하여 충분한 단백질을 제공하기 위해 충분한 세포가 필요하다.

[0485] 본원에 사용된 경우에, 용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 대상체로부터 수득된 임의의 유형의 적합한 물질을 지칭한다. 본 용어는 임상적 샘플 (예를 들면, 자궁경부, 또는 경질, 먼봉), 생물학적 유체 (예를 들면, 자궁경부액, 질액, 혈장, 복수), 조직 샘플, 살아있는 세포를 포괄하고 또한 배양물내 세포, 세포 상청액, 이로부터 유래된 세포 용해물을 포함한다. 샘플은 공급원으로부터 직접적으로 수득된 채로 또는 적어도 1-단계의 (부분적) 정제 이후 사용될 수 있다. 샘플이 본 개시내용의 방법을 방해하지 않는 임의의 매질에서 제조될 수 있다는 것이 숙련된 사람에게 명백할 것이다. 전형적으로, 샘플은 세포 또는 조직을 포함하고/거나 세포 또는 조직을 포함하는 수용액 또는 생물학적 유체이다. 숙련된 사람은 선택 및 전처리 방법을 인지할 것이다. 전처리는, 예를 들어, 점성 유체를 희석하는 단계를 포함할 수 있다. 샘플의 처리는 여과, 증류, 분리, 농축을 포함할 수 있다.

[0486] 하나의 예에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 이전에 유래되었다. 따라서, 하나의 예에서, 임의의 구현예에 따라 본원에 기재된 경우에 방법은 추가적으로 생물학적 샘플을 제공하는 단계를 포함한다.

[0487] 하나의 예에서, 생물학적 샘플은 예를 들면 악성 병태의 진행을 모니터링, 재발에 대하여 모니터링, 및/또는 치료 프로토콜의 효능을 사정하기 위해 1개 초과 시점에 대상체로부터 수집될 수 있다. 하나의 예에서, 생물학적 샘플은 악성 병태에 대하여 대상체의 치료 이전, 도중 및/또는 이후 대상체로부터 수집될 수 있다. 샘플은 악성 병태의 진행을 모니터링 또는 치료 레지멘의 효능을 사정하기 위해 매주, 격주, 매월, 2 개월마다, 3 개월마다, 4 개월마다, 5 개월마다 또는 6 개월마다 수집될 수 있다.

[0488] 하나의 예에서, 임의의 구현예에 따라 본원에 기재된 경우에 방법은 샘플, 예컨대, 예를 들어, 단백질로부터 추출물을 사용하여 수행된다.

[0489] 참조 샘플

[0490] 상기 설명에서 명백할 바와 같이, 본 개시내용의 일부 검정은 정량화를 위하여 적합한 참조 샘플 또는 대조군을 활용할 수 있다.

[0491] 본 개시내용의 방법에서 사용을 위한 적합한 참조 샘플은 숙련된 사람에게 명백할 것이고/거나 본원에 기재될 것이다. 예를 들어, 참조는 (예를 들면, 연령, 샘플 유형 및/또는 주기의 병기에 의해 매칭된) 확립된 데이터 세트 또는 정상 개체로부터, 내부 참조 (즉, 동일한 대상체 출신)일 수 있다.

[0492] 하나의 예에서, 참조는 내부 참조 또는 샘플이다. 예를 들어, 참조는 자가 참조이다. 하나의 예에서, 내부 참조

는 분석 중 샘플로서 동시에 대상체로부터 수득된다. 또 다른 예에서, 내부 참조는 분석 중 샘플로서 더 이른 시점에 대상체로부터 수득된다.

- [0493] 본원에 사용된 경우에, 용어 "정상 개체"는 대상체가 이들이 악성 및/또는 양성 병태를 갖지 않거나, 이들이 그러한 병태를 갖는 것으로 의심되지 않는다는 근거로 선택됨을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 정상 개체는 건강한 개체이다.
- [0494] 하나의 예에서, 참조는 확립된 데이터 세트이다. 본 개시내용에서 사용에 적합한 확립된 데이터 세트는 숙련된 사람에게 명백할 것이고, 예를 들어
- [0495] · 연령 및 샘플 유형에 의해 매칭된 정상 대상체 또는 정상 대상체의 개체군으로부터 데이터 세트;
- [0496] · 연령, 샘플 유형 및/또는 질환/병태에 의해 매칭된 또 다른 대상체 또는 대상체의 개체군으로부터 데이터 세트;
- [0497] · 세포가 CXCL10 발현을 유도하기 위해 처리된, 시험관내 세포를 포함하는 데이터 세트; 및
- [0498] · 세포가 CXCL10 발현을 억제하기 위해 처리된, 시험관내 자궁내막 상피 세포를 포함하는 데이터 세트를 포함한다.
- [0500] 하나의 예에서, 참조는 검정에서 포함되지 않는다. 대신에, 적합한 참조는 이전에 생성된 확립된 데이터 세트에서 유래된다. 테스트 샘플 처리, 분석 및/또는 검정에서 유래된 데이터는 그 다음 샘플에 대하여 수득된 데이터에 비교된다.
- [0501] **악성 병태 검출하기 및/또는 진단하기**
- [0502] 본원에 개시된 경우에, 본 개시내용의 발명자들은 악성 병태 검출하기 및/또는 진단하기에서 CXCL10의 역할을 입증하였다. 본원에 개시된 방법이 대상체에서 악성 병태를 양성 병태와 구별하기에서 유용할 것임이 숙련된 사람에게 명백할 것이다. 예를 들어, 본 개시내용의 방법은 대상체에서 악성 병태의 진단을 위한 스크리닝 테스트로서 유용하다.
- [0503] 따라서, 본 개시내용은, 예를 들어, 대상체에서 악성 병태의 검출 및/또는 진단 방법으로,
- [0504] (i) 대상체에서 활성 CXCL10의 수준 및 대상체에서 총 CXCL10의 수준을 결정하는 단계; 및
- [0505] (ii) 대상체에서 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0506] 를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0507] 본원에 사용된 경우에, 용어 "검출하다", "검출하기", "진단" 또는 "진단하기"는 대상체에서 악성 병태의 식별을 지칭한다.
- [0508] 본원에 사용된 경우에, 용어 "악성 병태"는 제어되지 않는 방식으로 성장하고, 정상 조직을 침범하고, 기원 조직에서 원격 부위에 종종 전이하고 성장하는 병태 또는 질환을 지칭한다. 하나의 예에서, 악성 질환 또는 병태는 암이거나 암에 관련된다. 숙련된 사람은 암이 신체에서 거의 모든 조직에서 발생할 수 있고 본원에 사용된 경우에 본 용어가 예를 들면, 암종, 육종, 림프종, 및 백혈병 (즉, 암의 고체 및 비-고체 형태)를 포함하는, 질환의 모든 형태를 포괄한다는 것을 이해할 것이다.
- [0509] 하나의 예에서, 본 개시내용은 악성 병태의 양성 병태와의 구별 방법을 제공한다.
- [0510] 본원에 사용된 경우에, 용어 "양성 병태"는 이웃한 조직을 침범하는 능력이 부족한 세포들의 덩어리를 지칭한다.
- [0511] 하나의 예에서, 본 개시내용은 전암성 병변의 양성 병태와의 구별 방법을 제공한다.
- [0512] 본원에 사용된 경우에, 용어 "전암성 병변"은 비정상적으로 성장하여, 그들의 크기, 형상 또는 외관이 정상 세포와 상이하게 보이게 하지만, 이들이 아직 암성이거나 악성이 아닌 세포들의 덩어리를 지칭한다. 하나의 예에서, 전암성 병변은 p53 전암성 병변이다. 본원에 사용된 경우에, 용어 p53 전암성 병변은 p53 유전자 돌연변이를 갖는 세포를 지칭한다.
- [0513] 하나의 예에서, 대상체는 악성 병태 (즉, 암)를 앓는다. 예를 들어, 암은 고형 종양, 예컨대 육종 또는 암종이다. 예를 들어, 암종은 전립선, 난소, 유방, 폐, 간, 신장, 결장, 췌장 또는 위의 암종이다. 예를 들어, 대상체

는 난소암을 앓는다. 하나의 예에서, 암은 비-고형 종양, 예를 들어 백혈병 또는 림프종이다. 하나의 예에서, 대상체는 0 기 암을 앓는다. 예를 들어, 암종은 *제자리*이다. 또 다른 예에서, 대상체는 I, II 또는 III 기 암을 앓는다. 예를 들어, 암종은 기원 기관을 넘어서 인근 림프절 및/또는 원발성 종양의 위치에 인접한 조직 또는 기관으로 퍼졌다. 하나의 예에서, 대상체는 IV 기 암을 앓는다. 예를 들어, 암은 원격 조직 및/또는 장기로 퍼졌다.

[0514] 하나의 예에서, 대상체는 악성 병태에 대하여 치료를 받지 않았다. 예를 들어, 대상체는 치료 경험이 없다.

[0515] 하나의 예에서, 대상체는 악성 병태에 대하여 치료를 받고 있다. 하나의 예에서, 대상체는 악성 병태에 대하여 치료를 받았다. 악성 병태의 치료에 적합한 요법은 숙련된 사람에 명백할 것이고/거나 본원에 기재될 것이다. 예를 들어, 치료는 수술, 화학요법, 방사선 요법, 표적화된 약물 요법, 면역요법 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0516] 난소암

[0517] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 대상체에서 난소암을 검출 및/또는 진단하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 대상체는 난소암을 앓는다.

[0518] 본원에 사용된 경우에, 용어 "난소암"은 난소에서 시작하는 임의의 암성 성장을 지칭한다.

[0519] 하나의 예에서, 본 방법은 대상체에서 난소암의 양성 병태와의 감별 방법을 포함한다.

[0520] 본원에 기재된 방법이, 예를 들어, 상피, 자궁내막양 종양, 생식-세포 종양, 투명 세포 및 점액성 선암종을 포함하는 난소암의 모든 하위유형 검출하기 및/또는 진단하기에 적용가능하다는 것은 숙련된 사람에 명백할 것이다.

[0521] 하나의 예에서, 본 개시내용은 대상체에서 상피 난소암을 검출 및/또는 진단하는 방법을 제공한다.

[0522] 숙련된 사람은 난소암이, 표 2에서 하기 기재된 대로, 국제 부인과 및 산부인과 연맹 (FIGO) 병기화 시스템을 사용하여 병기화되는 것을 이해할 것이다.

[0523] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 개시내용은 암의 병기와 상관없이 대상체에서 난소암을 검출 및/또는 진단하는 방법을 제공한다.

[0524] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 개시내용은 대상체에서 I 기 난소암을 검출 및/또는 진단하는 방법을 제공한다.

[0525] 숙련된 사람은 난소암이 암의 등급에 기초하여 분류되는 것을 또한 이해할 것이다. 예를 들어, 1 등급 종양은 잘 분화된 세포를 갖고; 2 등급 종양은 중간정도로 잘-분화되고; 3 등급 종양은 부실하게 분화된다.

[0526] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 개시내용은 암의 등급과 상관없이 대상체에서 난소암을 검출 및/또는 진단하는 방법을 제공한다.

[0527] 또 다른 예에서, 난소암은 장액성, 점액성, 자궁내막양, 투명 세포, GCT 또는 이들의 혼합물, 난소암이다. 예를 들어, 난소암은 장액성이다.

[0528] 하나의 예에서, 대상체는 난소암의 위험에 있다.

[0529] 본원에 사용된 경우에, 난소암의 "위험에 있는" 대상체는 검출가능한 난소암 또는 난소암의 증상들을 가질 수 있거나 아닐 수 있다. "위험에 있는"은 대상체가, 당업계에서 알려진 및/또는 본원에 기재된 대로, 질환 또는 병태의 발달과 상관관계가 있는 측정가능한 파라미터인, 하나 이상의 위험 인자를 갖는 것을 나타낸다. 예를 들어, 대상체는 p53 유전자 돌연변이를 갖는다.

표 2: 난소암의 FIGO 병기

병기			설명
I			암이 난소에 완전히 제한된다
	IA		한쪽 난소를 포함하고, 캡슐은 온전하고, 난소 표면에 종양이 없고, 음성 세척
	IB		양쪽 난소를 포함하고, 캡슐은 온전하고, 난소 표면에 종양이 없고, 음성 세척
	IC		종양이 한쪽 또는 양쪽 난소를 포함한다
	IC1		외과적 유출
	IC2		캡슐이 파열되거나 난소 표면에 종양이 있다
	IC3		양성 복수 또는 세척
II			(골반에 국한되어야 하는) 종양의 골반 확장 또는 원발성 복막 종양이 한쪽 또는 양쪽 난소를 포함한다
	IIA		자궁 또는 나팔관에서 발견된 종양
	IIB		골반에 다른 곳에서 종양
III			골반 외부에서 또는 후복막 림프절에서 발견된 암이 한쪽 또는 양쪽 난소를 포함한다
	IIIA		후복막 림프절에서 전이 또는 미시적 골반외 전이
		IIIA1	후복막 림프절에서 전이
		IIIA1(i)	전이의 직경으로 10 mm 미만이다
		IIIA1(ii)	전이의 직경으로 10 mm 초과이다
		IIIA2	후복막 림프절 상태와 무관하게, 복막에서 미시적 전이
	IIIB		후복막 림프절 상태와 무관하게, 직경으로 2 cm 이하 복막에서 전이; 또는 간 또는 비장 캡슐로 전이
	IIIC		후복막 림프절 상태와 무관하게, 직경으로 2 cm 초과 복막에서 전이; 또는 간 또는 비장 캡슐로 전이
IV			원격 전이 (즉 복막의 외부)
	IVA		암 세포를 함유하는 종막 삼출액
	IVB		(비장 또는 간의 실질물 포함하는) 원격 장기로 전이, 또는 서혜 및 복부외 림프절로 전이

[0530]

[0531]

위험 인자는, 예를 들어

[0532]

· 난소암 및/또는 유방암의 가족력;

[0533]

· 생식력, 즉, 35세 이후에 자녀가 있거나 자녀가 없는 경우는 더 높은 위험과 연관됨;

[0534]

· 유방암의 병력;

[0535]

· 호르몬 요법, 예를 들면, 폐경 후 호르몬 대체 요법 (HRT)은 증가된 위험과 연관됨; 및

[0536]

· 비만, 예를 들면, 30 초과 체질량 지수

[0537]

를 포함한다.

[0538]

대상체는 대조 개체군보다 더 높은 난소암 발병의 위험을 갖는다면 위험에 있다. 대조 개체군은 난소암을 앓지 않거나 이의 가족력을 갖는 (예를 들면, 연령, 성별, 인종 및/또는 민족에 의해 매칭된) 일반 개체군으로부터 랜덤으로 선택된 하나 이상의 대상체를 포함할 수 있다. 대상체는 난소암과 연관된 "위험 인자"가 그 대상체와 연관된 것으로 밝혀지면 위험에 있는 것으로 고려될 수 있다. 위험 인자는, 예를 들어, 대상체의 개체군에서 통계적 또는 역학적 연구를 통해서 주어진 장애와 연관된 임의의 활동성, 특질, 이벤트 또는 특성을 포함할 수 있다. 따라서 대상체는 기저하는 위험 인자를 식별하는 연구가 대상체를 구체적으로 포함하지 않았던 경우조차 위험에 있는 것으로 분류될 수 있다.

[0539]

하나의 예에서, 본 개시내용의 방법은 난소암의 증상들의 발병 이전 또는 이후 수행된다. 난소암의 증상들은 속

련된 사람에 명백할 것이고, 예를 들어

- [0540] · 복부 팽대 또는 붓기;
- [0541] · 복부 팽만 및 통증;
- [0542] · 하복부의 통증;
- [0543] · 극소량 식사후 포만감;
- [0544] · 피로감;
- [0545] · 장 또는 방광 습관의 변화;
- [0546] · 옷이 잘 맞지 않음;
- [0547] · 다리의 붓기;
- [0548] · 숨가쁨;
- [0549] · 질 출혈;
- [0550] · 비정상 생리적 주기;
- [0551] · 체중 감소 또는 증가; 및
- [0552] · 설명되지 않은 요통
- [0553] 을 포함한다.
- [0554] 본 발명자는 본 개시내용의 방법이 다른 생물학적 마커의 검출과 조합될 수 있음을 또한 알아내었다.
- [0555] 하나의 예에서, 본 개시내용의 방법은 추가로 대상체에서 디펩티딜 펩티다제-4 (DPP4) 및/또는 암 항원 125 (CA-125)의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 DPP4의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 또 다른 예에서, 본 방법은 추가로 CA-125의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 추가 예에서, 본 방법은 추가로 DPP4 및 CA-125의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0556] DPP4 및/또는 CA-125의 측정 방법은 당업계에서 공지되고/거나 (예를 들어, US 5,356,817, Saho 등, 2019; Scholler 등, 2007 및 Vuento 등, 1997, 참고) 본원에 기재된다.
- [0557] 하나의 예에서, 본 개시내용의 방법은 추가로 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 인터류킨 6 (IL-6), 종양 괴사 인자 수용체 II (TNF-RII), 인간 부고환 단백질 4 (HE4) 및 인터류킨 8 (IL-8)의 하나 이상 또는 모두의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0558] 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 GM-CSF의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0559] 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 IL-6의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0560] 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 TNF-RII의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0561] 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 HE4의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0562] 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 IL-8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0563] 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 GM-CSF, IL-6, TNF-RII, HE4 및 IL-8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0564] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 DPP4, GM-CSF, IL-6, TNF-RII, HE4 및 IL-8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0565] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 CA-125, GM-CSF, IL-6, TNF-RII, HE4 및 IL-8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0566] 본원에 기재된 임의의 방법의 하나의 예에서, 본 방법은 추가로 DPP4, CA-125, GM-CSF, IL-6, TNF-RII, HE4 및 IL-8의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- [0567] **악성 병태의 치료 방법**
- [0568] 하나의 예에서, 본 발명은 대상체에서 악성 병태의 치료 방법으로, 본원에 기재된 경우에 본 방법을 수행하는

단계 및 악성 병태에 대하여 대상체를 치료하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

- [0569] 본원에 사용된 경우에, 용어 "치료하기", "치료하다" 또는 "치료"는 암의 전부 또는 일부를 외과적으로 제거하는 것 또는 악성 병태의 적어도 하나의 증상을 감소 또는 제거하는데 충분한 화합물/분자/방사선의 치료적으로 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 치료적 용도를 위한 "유효량"은 과도한 유해 부작용 없이 질환 증상들에서 임상적으로 유의미한 감소를 제공하는데 필요한 화합물의 양이다. 임의의 개별 경우에서 적절한 "유효량"은 기법, 예컨대 용량 단계적상승 연구를 사용하여 결정될 수 있다. 화합물의 "유효량"은 과도한 유해 부작용 없이 원하는 약리학적 효과 또는 치료적 개선을 달성하는데 효과적인 양이다. "유효량" 또는 "치료적으로 유효량"이 연령, 체중, 대상체의 일반 병태, 치료 중인 병태, 치료 중인 병태의 중증도, 및 처방 의사의 판단 중 임의의 것의 화합물의 대사 변화로 인해, 대상체마다 다양할 수 있음이 이해된다.
- [0570] 하나의 예에서, 치료는 수술, 화학요법, 방사선 요법, 표적화된 약물 요법 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0571] 하나의 예에서, 치료는 수술을 포함한다. 예를 들어, 수술은 감량 수술이다.
- [0572] 또 다른 예에서, 치료는 화학요법을 포함한다. 예시적 화학요법 제제는, 예를 들어, 카보플라틴, 시타라빈, 클로람부실, 시스플라틴, 시클로포스파미드, 다노루비신, 도세탁살, 독소루비신, 에를로티닙, 에토포시드, 플루로우리실, 플루다라빈, 이다루비신, 이리노테칸, 리포솜 독소루비신, 메토크세이트, 미톡산트론, 파클리탁셀, 토포테칸, 빈크리스틴 및 빈블라스틴을 포함한다.
- [0573] 하나의 예에서, 치료는 방사선 요법을 포함한다. 예를 들어, 방사선 요법은 외부 빔 방사선 요법 (EBRT), 3차원 등각 방사선 요법 (3D-CRT), 강도 변조 방사선 요법 (IMRT), 체적 변조 아크 요법 (VMAT), 등각 양성자 빔 방사선 요법, 정위 방사선수술 (SRS)/정위 방사선요법 (SRT), 영상-안내된 방사선 요법 (IGRT), 근접요법 (내부 방사선 요법) 그리고 전거 및 척수 방사선 요법 (두개척수 방사선)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0574] 하나의 예에서, 치료는 표적화된 약물 요법을 포함한다. 예를 들어, 표적화된 약물 요법은 치료적 항체이다. 예시적 치료적 항체는 숙련된 사람에게 알려지고, 비제한적으로, 아바고보맙; 압식시맙; 아비투주맙; 아브틸루맙; 약독수맙; 아달리루맙; 아데카투무맙; 아두카누맙; 아펠리모맙; 아푸투주맙; 알라시주맙 페골; 알렘투주맙; 알리로쿠맙; 알투모맙 펜테테이트; 아마톡시맙; 아나투모맙 마페나톡스; 아네투맙 라브탄신; 아니프롤루맙; 안루킨주맙; 아폴리주맙; 아르시투모맙; 아스크린바쿠맙; 아셀리주맙; 아테졸리주맙; 아티누맙; 아틀리주맙 (토실리주맙); 아톨롤리루맙; 바피뉴주맙; 바실릭시맙; 바비톡시맙; 벡투모맙; 베겔로맙; 벨리루맙; 벤랄리주맙; 베르틸리루맙; 베실레소맙; 베바시주맙; 베즐로톡수맙; 비시로맙; 비마그루맙; 비메키주맙; 비바투주맙 베르탄신; 블리나투모맙; 블로소주맙; 보코시주맙; 브넬톡심 압베도틴; 브리아키누맙; 브로달루맙; 브롤루시주맙; 브론틱투주맙; 카나키누맙; 칸투주맙 베르탄신; 칸투주맙 라브탄신; 카플라시주맙; 카프로맙 펜테티드; 칼루맙; 카투막소맙; cBR96-독소루비신 면역접합체; 세렐리주맙; 세르톨리주맙 페골; 세톡시맙; 시타투주맙 보가톡스; 식수투무맙; 클라자키주맙; 클레놀릭시맙; 클리바투주맙 테트라세탄; 코드리투주맙; 콜톡시맙 라브탄신; 코나투무맙; 콘시주맙; 크레네주맙; 다세투주맙; 다클리주맙; 달로투주맙; 다피롤리주맙 페골; 다라투무맙; 텍트레쿠맙; 템시주맙; 데닌투주맙 마포도틴; 데노수맙; 데를로톡시맙 비오틴; 데투모맙; 디누톡시맙; 디리다부맙; 돌리모맙 아리톡스; 드로지투맙; 돌리고투맙; 두필루맙; 더발루맙; 두시기투맙; 에크로멕시맙; 에쿨리주맙; 에도바코맙; 에드레콜로맙; 에팔리주맙; 에폰구맙; 엘렐루맙; 엘렘투맙; 엘로투주맙; 엘실리모맙; 에막투주맙; 에미베투주맙; 에나바투주맙; 엔포르투맙 베도틴; 엔리모맙 페골; 에노블리투주맙; 에노키주맙; 에노티쿠맙; 엔시톡시맙; 에피투모맙 시톡세탄; 에프라투주맙; 에를리주맙; 에르투막소맙; 에타너셉트; 에타라시주맙; 에트롤리주맙; 에비나쿠맙; 에볼로쿠맙; 엑스비비루맙; 파놀레소맙; 파랄리모맙; 팔레투주맙; 파시누맙; 펠비주맙; 페자키누맙; 피클라투주맙; 피기투무맙; 피리부맙; 플란보투맙; 플레티쿠맙; 폰톨리주맙; 포랄루맙; 포라비루맙; 프레솔리루맙; 풀라누맙; 푸톡시맙; 갈릭시맙; 가니투맙; 간테네루맙; 가빌리모맙; 쥬투주맙 오조가미신; 게보키주맙; 지렌톡시맙; 글렘바투무맙 베도틴; 골리루맙; 고밀릭시맙; 구셀쿠맙; 이발리주맙; 이브리투모맙 티옥세탄; 이크루쿠맙; 이다루시주맙; 이고보맙; 이말루맙; 임시로맙; 임가투주맙; 인클라쿠맙; 인다톡시맙 라브탄신; 인두사투맙 베도틴; 인플릭시맙; 이놀리모맙; 이노투주맙 오조가미신; 인테투무맙; 이필리루맙; 이라투무맙; 이사톡시맙; 이톨리주맙; 익세키주맙; 켈릭시맙; 라베투주맙; 람블리주맙; 람팔리주맙; 레브리키주맙; 레말레소맙; 렌질루맙; 레르델리루맙; 렉사투무맙; 리비비루맙; 리파투주맙 베도틴; 리켈리주맙; 릴로토맙 사테트라세탄; 린투주맙; 리릴루맙; 로델시주맙; 로키베트맙; 로르보투주맙 베르탄신; 루카투무맙; 물리주맙 페골; 루밀릭시맙; 룰레투주맙; 마파투무맙; 마르게톡시맙; 마슬리모맙; 마투주맙; 마브릴리루맙; 메폴리주맙; 메텔리루맙; 밀라투주맙; 민레투모맙; 미르베크시맙 소라브탄신; 미투모맙; 모가물리주맙; 모물리루맙; 모타비주맙; 목세투모맙 파수도톡스; 무로모맙-CD3; 나콜로맙 타페나톡스; 나밀루맙; 나프투모맙 에스타페나톡스; 나

르나투맵; 나탈리주맵; 네바쿠맵; 네시투무맵; 네몰리주맵; 네렐리모맵; 네스바쿠맵; 니모투주맵; 니볼루맵; 노페투모맵 메르펜탄; 오빌톡삭시맵; 오비누투주맵; 오카라투주맵; 오크렐리주맵; 오둘리모맵; 오파투무맵; 올라라투맵; 올로키주맵; 오말리주맵; 오나르투주맵; 온톡시주맵; 오피시누맵; 오포르투주맵 모나톡스; 오레고보맵; 오르티쿠맵; 오텔릭시주맵; 오텔레르투주맵; 옥셀루맵; 오자네주맵; 오조랄리주맵; 파기박시맵; 팔리비주맵; 파니투무맵; 판코맵; 파노바쿠맵; 파르사투주맵; 파스콜리주맵; 파소톡시주맵; 파테클리주맵; 파트리투맵; 켈브롤리주맵; 켈투모맵; 페라키주맵; 페르투주맵; 펙셀리주맵; 피딜리주맵; 피나투주맵 베도틴; 핀투모맵; 플라쿨루맵; 플라투주맵 베도틴; 포네주맵; 프릴릭시맵; 프리톡삭시맵; 프리투무맵; 켈리주맵; 라코투모맵; 라드레투맵; 라피비루맵; 칼판시주맵; 라무시루맵; 라니비주맵; 락시바쿠맵; 레파네주맵; 레가비루맵; 레슬리주맵; 릴로투무맵; 리누쿠맵; 리톡시맵; 로바투무맵; 롤레두맵; 로모소주맵; 론탈리주맵; 로벨리주맵; 루폴리주맵; 사시투주맵 고비테칸; 사말리주맵; 사릴루맵; 사투모맵 펜데티드; 세쿠키누맵; 세리반투맵; 세톡삭시맵; 세비루맵; 시브로투주맵; 시팔리무맵; 실톡시맵; 심투주맵; 시플리주맵; 시루쿠맵; 소피투주맵 베도틴; 솔라네주맵; 솔리토맵; 소네프시주맵; 손투주맵; 스타몰루맵; 술레소맵; 수비주맵; 타발루맵; 타카투주맵 테트라세탄; 타도시주맵; 탈리주맵; 타네주맵; 타폴리투모맵 팜톡스; 타렉스투맵; 테피바주맵; 텔리모맵 아리톡스; 테나투모맵; 테넬릭시맵; 테폴리주맵; 테프로투무맵; 테시돌루맵; 테톨로맵; 티실리무맵; 티가투주맵; 티드라키주맵; 토실리주맵; 토랄리주맵; 토사톡수맵; 토시투모맵; 토베투맵; 트랄로키누맵; 트라스투주맵; 트레갈리주맵; 트레멜리무맵; 트레보그루맵; 투코투주맵 셀물류진; 투비루맵; 유블리톡시맵; 울로쿠플루맵; 우렐루맵; 우르톡사주맵; 우스테키누맵; 반도르투주맵 베도틴; 반딕투맵; 바누시주맵; 바팔릭시맵; 바릴루맵; 바텔리주맵; 베둘리주맵; 벨투주맵; 베팔리모맵; 베센쿠맵; 비실리주맵; 볼로식시맵; 보르세투주맵 마포도틴; 보투무맵; 잘루투무맵; 자눌리무맵; 자톡시맵; 지랄리무맵; 줄리모맵 아리톡스를 포함한다.

[0575] 하나의 예에서, 치료는 면역요법을 포함한다. 예를 들어, 면역요법은 관문 억제제, 종양용해성 바이러스 요법, T 세포 요법 및 암 백신으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0576] 하나의 예에서, 면역요법은 관문 억제제이다. 적합한 관문 억제제는, 예를 들어, 이필리무맵 (Yervoy®), 니볼루맵 (Opdivo®), 켈브롤리주맵 (Keytruda®), 아테졸리주맵 (Tecentriq®), 아벨루맵 (Bavencio®), 더발루맵 (Imfinzi®)을 포함한다.

[0577] 하나의 예에서, 면역요법은 종양용해성 바이러스 요법이다. 예를 들어, 종양용해성 바이러스 요법은 탈리모진 라헤르파렙백 (Imlygic®), 또는 T-VEC이다.

[0578] 하나의 예에서, 면역요법은 T-세포 요법이다. 예를 들어, T-세포 요법은 CAR T-세포 요법이다.

[0579] 하나의 예에서, 면역요법은 암 백신이다.

[0580] **종양 부담, 진행, 재발 및 퇴행 모니터링하기**

[0581] 본 개시내용이 악성 병태를 앓는 대상체에서 종양 부담의 모니터링, 진행의 모니터링, 재발의 모니터링 및/또는 종양 퇴행의 결정 방법으로, (i) 대상체에서 활성 CXCL10의 수준 및 대상체에서 총 CXCL10의 수준을 결정하는 단계; 및 (ii) 대상체에서 활성 CXCL10 대 총 CXCL10의 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함하는 방법을 또한 제공하는 것이 숙련된 사람에 명백할 것이다.

[0582] 본원에 사용된 경우에, 용어 "모니터링하기"는, 예후의 결정, 약물 요법에 대한 반응, 진행 중인 약물 요법의 사정, 성과의 예측, 요법에 대한 반응 결정하기 (합병증의 진단 포함), 종양 부피의 이후 진행, 또는 요법으로부터 가장 유익할 것 같은 환자들 선택하기를 포함할 수 있다.

[0583] 본원에 사용된 경우에, 용어 "종양 부담"은 종양 세포의 부피를 지칭하고 다른 변화 예컨대 염증, 괴사 또는 부종을 포함하지 않는다.

[0584] 본원에 사용된 경우에, 용어 "진행"은 종양의 계속된 성장 및 침입성을 지칭한다.

[0585] 본원에 사용된 경우에, 용어 "퇴행"은 종양의 크기 또는 부피에서 감소를 지칭한다.

[0586] 본원에 사용된 경우에, 용어 "재발"은 악성 병태가 검출될 수 없는 시기후 복귀하거나 돌아오는 악성 병태를 지칭한다.

[0587] 하나의 예에서, 악성 병태를 앓는 대상체에서 종양 부담의 모니터링, 진행의 모니터링, 재발의 모니터링 및/또는 종양 퇴행의 결정 방법은 하나 이상의 시점에 대상체에서 CXCL10 비율을 결정하는 단계를 포함한다. 예를 들어, miRNA의 발현의 수준은 1, 또는 2, 또는 3, 또는 4, 또는 5, 또는 6, 또는 7, 또는 8, 또는 9, 또는 10개

시점에 결정된다.

[0588] 하나의 예에서, CXCL10 비율은 치료에 앞서, 치료 도중 및/또는 치료 후에 대상체로부터 수득된 적어도 하나의 생물학적 샘플에서 결정된다. 예를 들어, CXCL10 비율은 치료에 앞서 하나 이상의 시점에 결정된다. 또 다른 예에서, CXCL10 비율은 치료 도중 하나 이상의 시점에 결정된다. 추가 예에서, CXCL10 비율은 치료 후에 하나 이상의 시점에 결정된다. 또 다른 예에서, CXCL10 비율은 치료에 앞서 및 도중 결정된다. 추가 예에서, CXCL10 비율은 치료에 앞서 및 후에 결정된다. 또 다른 예에서, CXCL10 비율은 치료 도중 및 후에 결정된다. 추가 예에서, CXCL10 비율은 치료에 앞서, 도중 및 후에 결정된다.

[0589] 하나의 예에서, 본 방법은 첫 번째 시점에 대상체에서 CXCL10 비율을 후속 시점에 대상체에서 CXCL10 비율에 비교하는 단계를 포함한다.

[0590] 첫 번째 및 후속 시점 지칭이 정의된 또는 특이적 시점 지칭이 아니고 단지 비교의 목적을 위한 것임이 본 개시내용으로부터 숙련된 사람에게 명백할 것이다. 첫 번째, 두 번째 (및 임의의 후속) 시점은 대상체의 악성 병태를 모니터링하기 바라는 동안 임의의 시기만큼 분리될 수 있다. 본 개시내용의 모니터링 방법은 추가 시점에 추가 샘플 (예를 들어, 첫 번째 및 두 번째 샘플 이외에, 세 번째 시점에 세 번째 샘플)을 사용할 수 있다.

[0591] 숙련된 자에게 명백할 바와 같이, 질환의 경과 동안 본 개시내용의 CXCL10 비율을 모니터링하는 능력은 종양 부담 및 질환 진행을 모니터링하는 데 도움이 될 것이다.

[0592] 대상체에서 종양 부담 및 질환 진행의 모니터링 방법이 대상체에서 종양 퇴행 및/또는 재발 결정하기에 유용할 것임이 숙련된 사람에게 명백할 것이다.

[0593] 패널 및 키트

[0594] 본 개시내용은 대상체에서 악성 병태를 검출 및/또는 진단하기 위한 패널 또는 키트를 제공한다. 본 개시내용은 또한 종양 부담, 종양 진행 및/또는 종양 퇴행을 모니터링하기 위한 패널 또는 키트를 제공한다. 본 발명의 패널 또는 키트는 바람직하게는 본원에 기재된 하나 이상의 또는 양쪽 CXCL10 결합 단백질을 포함할 것이다. 임의로, 패널 또는 키트는 본원에 기재된 방법에서 사용을 위한 지침을 포함한다.

[0595] 하나의 예에서, 패널 또는 키트는 참조 샘플을 포함한다.

[0596] 하나의 예에서, 본원에 기재된 경우에 패널 또는 키트는 생체외 분석을 위한 것이다. 하나의 예에서, 키트는 전혈, 혈장, 경질 (CVS) 면봉 및/또는 혈청 샘플과 사용에 적합하다.

[0597] 하나의 예에서, 본원에 기재된 경우에 패널 또는 키트는 고-처리량 스크리닝에 적합하다. 용어 "고-처리량 스크리닝"은 한 번에 1개 초과 샘플을 테스트하거나 사정하는데 사용될 수 있는 그리고 여러 샘플을 테스트하는 시간을 줄일 수 있는 스크리닝 방법을 지칭한다. 하나의 예에서, 본 방법은 적어도 5개의 샘플, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 50, 적어도 70, 적어도 90, 적어도 150, 적어도 200, 적어도 300개의 샘플을 한 번에 테스트하거나 사정하는데 적합하다. 상기 고-처리량 스크리닝 방법은 1개 초과 샘플을 신속하게 예를 들면 적어도 30 분 안에, 적어도 1 시간 안에, 적어도 2 시간 안에, 적어도 3 시간 안에, 적어도 4 시간 안에, 적어도 5 시간 안에, 적어도 6 시간 안에, 적어도 7 시간 안에, 적어도 8 시간 안에, 적어도 9 시간 안에 또는 적어도 10 시간 안에 분석할 수 있다. 고-처리량 스크리닝은 액체 취급 장치의 사용을 또한 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 고-처리량 분석은 자동화될 수 있다.

[0598] 본 개시내용은 하기 비-제한 예를 포함한다.

[0599] 실시예

[0600] 실시예 1: 물질 및 방법

[0601] 시약

[0602] Nunc-Immuno Microwell 96 웰 고체 플레이트는 SigmaAldrich (USA)로부터 구매되었다. TMB 색원체 용액은 ThermoFisher (USA) 출신이었다. (번역화 및 검정 표준에 사용된) 제조업 인간 CXCL10 단백질은 Genscript (홍콩) (서열번호:2) 출신이었다. CXCL10의 활성 또는 절두된 N-말단 어느 한쪽을 포함하는 짧은 펩타이드는 Mimotopes (호주)에 의해 합성되었다. 비오틴 (유형 A) 신속 쿼주제이션 키트, 항-IP-10 항체, 스트렙타비딘 퍼옥시다제, 항-인간 IP-10 ELISA 키트, 인간 디펩티딜 펩티다제 IV ELISA 키트, 및 활성 펩티딜 아르기닌 테이미나제 (PAD) 카테일은 Abcam (영국) 출신이었다. 모든 다른 시약은 분석 등급이었다.

[0603] 임상적 샘플

[0604] 임상적 샘플은, 2007-2014년 기간 동안 의심된 부인과 악성종양으로 수술을 받은 여성들로부터 전향적으로 수집된, 난소암 연구 재단 조직 은행에 저장된 보관 샘플에서 접근되었다. 모든 샘플은 이전에 외과적 치료를 받지 않은 마취된, 화학 요법 경험이 없는 환자들로부터 수득되었다.

[0605] 종양 유형, 병기 및 등급의 조직학적 평가, 수술전 CA125 측정, 연령, 폐경기 상태, 기존 병태 및 악성종양의 임의의 이전 병력은 탈-식별된 환자 의료 기록으로부터 수득되었다. 샘플에서 혈청 CA125의 측정은 호주 멜버른 모나쉬 의료 센터에 진단 병리 실험실에서 수행되었다. 윤리적 승인은, 사전 정보제공된 서면 동의를 제공하는 모든 환자들로, 남부 보건 인류 연구 윤리 위원회 (HREC 인증서; #06032C, #02031B)로부터 수득되었다.

[0606] 환자 샘플은 병리; 양성 및 악성에 따라 2개 그룹으로 분할된다.

[0607] 각 그룹을 위한 변동성 측정에 대하여 사분위수 범위 (IQR)가 있는 중위 CA125 측정.

[0608] 양쪽 양성 및 악성 그룹은 모두 폐경전 및 폐경후 (즉 혼합된) 여성들을 포함하였다.

[0609] 이 연구에서 테스트된 샘플 유형들은 복수, 혈장, 경질 먼봉 (CVS)이고 표 3에서 상세히 설명된다.

표 3. 양성 및 악성 샘플 사이 활성 CXCL10 비율의 비교에 사용된 환자 샘플 (복수, 혈장, CVS)의 개요.

그룹	병리	등급	병기	중위 CA125 (IQR)	폐경기 상태
양성 (n=51)	선성유종 (n=1)	n/a	n/a	52 (23-154)	혼합됨
	낭선종 (n=18)				
	낭선성유종 (n=3)				
	낭종 (n=2)				
	시스타데노마타 (n=1)				
	낭포-유피 (n=1)				
	근종 (n=1)				
	섬유종 (n=10)				
	섬유낭포막종 (n=1)				
	난관수종 (n=1)				
	유지질 세포 종양 (n=1)				
	성숙한 기형종 (n=2)				
	비틀림 (n=1)				
	황색육아종 (n=1)				
	미지 (n=7)				
악성 (n=226)	선암종 (n=32)	1, 2, 3	1, 3, 4	641 (149-1591)	혼합됨
	낭선암종 (n=5)				
	자궁내막 (n=2)				
	기형종 (n=1)				
	MMMT 암육종 (n=2)				
	유두 선암종 (n=64)				
	복막 (n=1)				
	관 (n=1)				
	췌담도 (n=1)				
	미지 (n=117)				

[0610]

[0611] 인간 CXCL10에 대한 단클론성 항체의 생성

[0612] 단클론성 항체는 전장, 재조합 CXCL10 단백질 (서열번호:2)에 대해 Monash Antibody Technologies Facility에서 생성되었다. 인간 CXCL10의 온전한 (NH₂-VPLSRTVRCISISNQPVNPRSL-²-COOH) (서열번호: 25) 또는 절두된 (NH₂-LSRTVRCISISNQPVNPRSL-²-COOH) (서열번호: 26) N-말단을 포함하는 짧은 펩타이드는 스크리닝에 사용되었다.

[0613] 마우스는, 2주에 3회 용량으로, 메틸화된 CpG로 공-주사된, 16ug의 보조된 (Sigma adjuvant system®; S6322)

전장 CXCL10으로 복강내로 접종되었다. 혈청 역가는 ELISA에 의해 테스트되었고 면역화에 앞서 수집된 나이브 혈청에 대해 비교되었다. 최고 역가를 디스플레이하는 마우스는 하이브리도마 생성을 위하여 선택되었다. 비장 세포는 추출되었고 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 SP2/0-Ag14 골수종 세포에 융합되었다. 생성된 하이브리도마 세포는 13 일 동안 96 웰 조직 배양 플레이트내 아자세린-하이포잔틴 함유 배지에서 성장되었다. 각 개별 하이브리도마에 대한 상청액은, ELISA에 의해 제-스크리닝된 양성 클론으로, 양쪽 전장 단백질 및 각 펩타이드 항원에 대한 반응성으로 마이크로어레이에 의해 스크리닝되었다.

[0614] 적절한 항원 특이성을 입증하는 최고 반응하는 클론은, 단클론성 하이브리도마 주의 유도체화를 보장하기 위해, 확장되었고 서브클론화되었다. 단클론성 항체는 단백질 G 세파로스를 사용하여 상청액으로부터 정제되었고, Ig 아이소타입은 상업적으로 이용가능한 검정 키트를 사용하여 결정되었다. 관심의 최종 단클론성 하이브리도마 주는 80% 합류로 성장되었고, 동결보호제로서 10% DMSO로 급속 냉동되었고 액체 N₂에서 저장되었다.

[0615] 표면 플라즈몬 공명 영상

[0616] 2개 단클론성 항체; 즉 전장, N-말단에 온전한 CXCL10에 특이적인 mAb-RA2, 및 양쪽 전장 및 절두된 CXCL10에 특이적인 mAb-RG2는 CXCL10의 양쪽 형태에 대해 결합 친화성에 대하여 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 분석되었다. 실험은, GLC 칩이 있는, ProteOn XPR36 SPRi 바이오센서 (BioRad)를 사용하여 수행되었다. 칩은 0.5% SDS, 50mM NaOH 및 100mM HCl으로 조건화되었고, 그 다음 레인은 동일한 부분 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보다이미드 (EDAC) 및 N-하이드록시숙신이미드 (NHS)를 사용하여 활성화되었다. 항체는 아세트산나트륨 완충액 (pH4.5)내 50 µg/mL의 농도로 별도 레인에서 부동화되었고, 그 다음 각 레인은 에탄올아민을 사용하여 비활성화되었다. 항원은 각 레인에 적용되었고, 결합은 RU로서 기록되었다. 모든 채널은 항원의 적용들 사이 0.85% H3PO3를 사용하여 재생되었다. 인터스팟 및 대조군 RU는 차감되어 특이적 결합을 제공하였다.

[0617] RA2 및 RG2 단클론성 항체의 비오틴화

[0618] mAb-RA2 및 mAb-RG2 항체는 비오틴화 키트 (Abcam; ab201795)를 사용하여 비오틴화되어 본 발명의 활성 비율 테스트 (ART)에서 검출 항체로서 이들을 사용하였고, 여기에서 스트렙타비딘-퍼옥시다제는 검출 시약으로 사용되었다. 2개 단클론성 항체의 비오틴화는 제조업체의 지침에 따라 수행되었고; 10 µL의 비오틴 변형체 시약은 100 µL의 각 정제된 단클론성 항체 (2 mg mL⁻¹; PBS, pH 7.4)에 첨가되었고, 이어서 부드럽게 혼합되었다. 혼합물은 직접적으로 동결건조된 비오틴에 첨가되었고 부드럽게 혼합되었다. 이들은 15 분 동안 실온에 인큐베이션되었다. 인큐베이션 후, 10 µL의 비오틴 퀀처 시약은 2개 항체의 완전 비오틴화에 첨가되었다.

[0619] 활성 및 총 CXCL10의 정량화

[0620] 복수액 및 혈장 샘플은 원심분리 (18,400 x g, 4°C에 20 분)에 의해 사전-청소되었고 청소된 상청액은 신선한 튜브로 옮겨졌다. 샘플은 검정 완충액 (0.1% BSA/ 0.05% Tween 20 / PBS, pH 7.4)으로 희석되었고 (1: 5) 검정에 앞서 얼음에서 유지되었다. CVS 샘플은 30 초 동안 와동되었고, 빙조에서 15 분 동안 초음파처리되었고 그 다음 추가로 30 초 동안 와동되었다. 상청액은 상기 대로 원심분리되었고, 검정 때까지 얼음에서 유지되었다.

[0621] ART에 의한 사정의 경우에, 코팅 완충액 (15mM NaCO₃ 및 35mM NaHCO₃, pH 9.6)에서 제조된 항-인간 IP-10 다클론성 항체 (Abcam; #ab9807)는 실온에 2 시간 동안 0.5 µg mL⁻¹의 코팅 농도로 96 웰 마이크로플레이트 (100 µL / 웰)에서 부동화되었다. 플레이트는 280 µL의 세정 용액 (0.05 % Tween 20/ Milli-Q H2O)으로 1회 세정되었고, 그 다음 실온에 2 시간 동안 300 µL 차단 용액 (5% BSA/ 0.05% Tween 20/ PBS, pH 7.4)으로 인큐베이션되었다. 플레이트는 세정 용액에서 4회 세정되었고, 그 다음 표준 (제조합 CXCL10 (서열번호:2), 48.8 pg mL⁻¹ 내지 200,000 pg mL⁻¹) 또는 샘플은 각각의 웰들 (100 µL / 웰)에 4중으로 첨가되었다. 2 시간 인큐베이션 이후, 각 웰은 세정 용액에서 4회 세정되었다. 비오틴화된 검출 항체 mAb-RA2 및 mAb-RG2 (검정 완충액내 1 µg mL⁻¹)는 적절한 경우 (100 µL / 웰) 첨가되었고 실온에 1 시간 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후 플레이트는 세정 완충액으로 5회 세정되었고, 그 다음 실온에 45 분 동안 희석된 (1: 1000) 스트렙타비딘 퍼옥시다제 (1 µg/mL/웰)로 인큐베이션되었다. 플레이트는 세정 용액에서 추가 4회 세정되었고, 그 다음 100 µL의 TMB 색원체 용액은 각 웰에 첨가되었고 실온에 어둠 속에서 20 분 동안 인큐베이션되었다. 반응은 정지 용액 (1M 염산, 50 µL / 웰)의 첨가에 의해 정지되었다. 흡광도는, Gen5 v3.08 분석 소프트웨어가 장착된 Cytation 3 멀티 모드 플레이트 판독기 (Biotek, La Jolla CA)를 사용하여, 450 nm의 파장에서 측정되었다. ART와 (총 CXCL10 만을 검출하는) 표준 ELISA 사이 비교는 제조업체의 지침에 따라 비색계 항-인간 IP-10 ELISA 키트 (Abcam #ab100579)를 사용하여 수행되었다.

[0622] DPP4의 정량화 및 DPP4 비활성도의 분석

[0623] DPP4 풍부도는, 제조업체의 지침에 따라, 상업적 항-인간 DPP4 ELISA (Abcam #ab222872)를 사용하여 (1: 4 희석된) 매칭된 복수 샘플에서 사정되었다. 검출 및 농도 분석은 (상기 대로) Cytation 멀티모드 플레이트 판독기를 사용하여 수행되었다. 로그로 DPP4 농도에 대한 비대칭 S자형의 비선형 회귀 곡선은 샘플에서 가용성 DPP4를 정량화하기 위해 작제되었다.

[0624] DPP4 비활성도 ($\mu\text{mol}/\text{분}/\text{ng}$ DPP4)은 이전에 기재된 대로 DPP4 기질로서 Gly-Pro-7-아미도-4-메틸쿠마린 하이드로브로마이드 (H-Gly-Pro-AMC)를 사용하여 측정되었다 (Sinnathurai 등, 2018). 전장 CXCL10의 시트룰린화는 최대 1 시간 동안 37 °C에 인간 단백질-아르기닌 테이미나제 2 (PAD2)로 인큐베이션시킴으로써 수행되었다. 분취량은 시간 경과 측정을 위한 인큐베이션 도중 15 분마다 채집되었다. 시간 경과 샘플은 그 다음 SDS PAGE에 의해 분리되었고 이전에 기재된 대로 mAb-RA2, mAb-RG2, 상업적 항-CXCL10 항체, 및 항-시트룰린 항체로 웨스턴 블랏팅에 의해 탐침조사되었다 (Loos 등, 2008).

[0625] 통계적 분석

[0626] 통계적 분석은, 대략적 정규성으로 로그-변환된 모든 검정 데이터로, GraphPad PRISM (GraphPad Software, La Jolla CA)을 사용하여 실시되었다. 최적선은 mAb-RA2 및 mAb-RG2 검정에 대하여 로그로 총 CXCL10 농도에 대한 비대칭 S자형 (5PL)에서 비선형 회귀 곡선에 의해 결정되어 활성 및 활성 또는 절두된 CXCL10, 각각을 정량화하였다. 검정으로부터 수득된 CXCL10의 농도는 pg mL^{-1} 이다. 유의미성은, 스튜던트 t-테스트를 사용하여 수행된 쌍별 비교로, 일원 ANOVA 및 Bonferroni 사후 테스트를 사용하여 결정되었다. 상당히 상이한 분산이 있는 그룹 그룹의 경우, 웰치의 수정은 적용되었다. 스페어만 순위 테스트는 상관관계 분석에 사용되었다. $P < 0.05$ 의 결과는 유의미한 것으로 간주되었다.

[0627] 실시예 2: 활성을 총 CXCL10과 감별하는 기능적 검정의 생성

[0628] 본 발명자들은 CXCL10의 N-말단에 온전한, 화학주성적으로 활성 형태와 모든 다른 변이체를 감별할 수 있는 단클론성 항체를 개발하였다. 전장 CXCL10 단백질을 항원으로서 사용하여, 하이브리도마 클론은 단리되었고 (i) 전장 CXCL10 단백질; 및 (ii) CXCL10의 어느 한쪽 온전한 또는 절두된 N-말단을 나타내는 짧은 합성 펩타이드에 대한 반응성에 대하여 스크리닝되었다. 클론 mAb-RA2에 의해 분비된 항체는 양쪽 전장 및 N-말단에 온전한 CXCL10을 인식하였지만, N-말단에 절두된 형태는 인식하지 못했다 (표 4). 클론 mAb-RG2에 의해 분비된 항체는 테스트된 CXCL10의 모든 프로테오폴과 반응하였다. SPR 분석은 각 경우에 nM 내지 pM 범위에서 결합 친화성을 입증하였다. 양쪽 항체의 가변 영역을 인코딩하는 개방 판독 프레임은 시퀀싱되었다.

[0629] 비오틴화된 mAb-RA2 및 mAb-RG2를 검출 항체로서 사용하여, 샌드위치 ELISA는 온전한 또는 총 CXCL10을 독립적으로 측정하기 위해 작제되었다. 검출 한계 (LOD), 정량화 한계 (LOQ), 선형성, 검정간 및 검정내 정밀도 및 동적 범위를 포함하는 구체적 파라미터는 사정되었다 (표 4). mAb-RA2 및 mAb-RG2의 각각은, 0.996의 R-제곱 및 5 자릿수 (OOM) 동적 범위로, 전장 CXCL10에 대하여 양호한 친화성을 입증하였다 (도 1). mAb-RA2 및 mAb-RG2에 대하여 검출 한계는 95.9 pg mL^{-1} 및 116.3 pg mL^{-1} , 각각이었다 (표 4). 검정간 정밀도는 단일 용량으로 10개의 독립적으로 제조된 복제물을 사용하여 사정되었고; 검정내 변동은 다른 날에 수행된 10개의 별도 검정 실행들 사이 결정되었다. 검정간 및 검정내 양쪽에 대하여 변동 계수 (CV)는 각 경우에 10% 미만으로, 양호한 재현성 및 검정 정밀도를 입증하였다 (표 4).

표 4. SPR 에 의한 mAb-RA2 및 mAb-RG2 에 대한 결합 친화성.

	CXCL10 단백질체에 대한 결합 친화성 (KD)			검정 파라미터			
	전장	온전한 N-말단	VP-절두된 N-말단	검출 한계 (LOD)	정량화 한계 (LOQ)	검정내 정밀도 (%)	검정간 정밀도 (%)
mAb-RA2	4.90×10^{-10}	7.36×10^{-10}	결합 없음	95.9 pg mL^{-1}	162.2 pg mL^{-1}	2.8	9.9
mAb-RG2	3.89×10^{-12}	3.54×10^{-9}	3.00×10^{-9}	116.3 pg mL^{-1}	272.7 pg mL^{-1}	4.0	8.5

[0630]

[0631] 본 발명자들은 다음으로, 상업적으로 이용가능한 ELISA 키트에 비교하여, ART를 사용하여 CXCL10의 정량적 검출

을 검증하고자 하였다. CXCL10은 난소암 환자들로부터 복수액에서 풍부하고, 여기에서 암 세포 및 특이적 T-세포 서브세트의 CXCR3-매개된 이주에 관여된다 (Rainczuk 등, 2012; Windmuller 등, 2017). 본 발명자들은 그러므로 대표적, 복합 생물학적 매트릭스로서 난소암 환자들 (n=212)로부터 복수액에서 CXCL10 검출을 사정하였다. 샘플 그룹 내에 농도 범위 (88.4% - 225.1% 범위의 CV)에서 상당한 편차가 있었어도, ART 대 상업적 ELISA 사이 총 CXCL10의 정량화에서 유의미한 차이는 없었다 (도 2a). 정량화된 총 CXCL10내 양성 상관관계는 양쪽 양성 및 악성 복수액에 대하여 ART와 상업적 ELISA 사이 관찰되어, 0.3084 및 0.2594, 각각의 r 값들을 초래하였다 (도 2b).

[0632] **실시예 3: mAb-RA2 및 mAb-RG2는 기능적과 비-기능적 CXCL10을 감별한다**

[0633] CXCL10의 단백질분해성 N-말단 절두에 더하여, 다른 번역후 변형은 CXCL10 활성도에 영향을 미칠 수 있다 (Mortier 등, 2011). 특히, CXCL10의 N-말단 영역에서 아르기닌의 시트룰린 (R5Cit)으로의 탈아미노화는 생체내 발생하는 확립된 기능적 변형이고, 이에 따라 CXCL10 기능을 사정하기 위한 임의의 검정에서 설명되어야 한다 (Mortier 등, 2011). 본 발명자들은 그러므로 R5Cit 변형이 어느 한쪽 mAb-RA2 또는 mAb-RG2에 의해 전장 CXCL10의 검출에 영향을 미칠 수 있는지를 조사하였다.

[0634] 제조합, 전장 CXCL10 (서열번호:2)은 단백질-아르기닌 테이미나제 2 (PAD2)로 인큐베이션되어 탈아미노화를 R5에서 유도하였고, 단백질은 SDS PAGE에 의해 분리되었고 웨스턴 블랏팅에 의해 분석되었다. 시험관내 시트룰린화는 (총 CXCL10을 검출하는) mAb-RG2를 사용하여 CXCL10 검출에서 효과가 없어, mAb-RG2가 번역후 변형과 무관하게 CXCL10에 결합하였음을 시사하였다 (도 3a). 반대로, mAb-RA2는 N-말단에 R5Cit 변형 이후 에피토프의 변형과 일치하는 R5Cit-CXCL10의 실질적으로 감소된 검출 (도 3a)을 보여주었다.

[0635] 유사한 결과는 R5Cit-CXCL10이 ELISA에 의해 평가된 때 수득되었다. 시트룰린화는 mAb-RA2의 결합을 실질적으로 감소시켰던 반면, mAb-RG2는 R5Cit-CXCL10을 여전히 검출할 수 있었다 (도 3b). 종합하면, 데이터는 mAb-RA2 및 mAb-RG2가 활성을 총 CXCL10과 감별하는데 효과적으로 사용될 수 있음을 입증한다.

[0636] **실시예 4: 활성 비율 테스트는 양성을 악성 난소암 샘플과 감별한다**

[0637] 양성 대 악성 질환 사이 차별하도록 ART의 용도를 확립시키기 위해, 본 발명자들은 어느 한쪽 양성 또는 악성 난소 종양을 가진 환자들로부터 수확된 복수액에서 활성 대 총 CXCL10 농도를 측정하였다 (표 3). 총 CXCL10은 양성 (160.8 ± 362.0 pg mL⁻¹) 복수액에 비교하여 악성 (853.1 ± 1574.0 pg mL⁻¹)에서 상승되었다 (도 4b). 유사하게, 활성 CXCL10 측정에서 넓은 범위는 또한 관찰되었다 (240.4 ± 410.5 pg mL⁻¹ 및 818.6 ± 1098.0 pg mL⁻¹, 각각) (도 4a). 개체군 내에서 이러한 넓은 편차 (134.1 내지 225.1% 범위의 CV%)는 양성 대 악성 샘플 사이 감별에 대하여 낮은 감도를 초래하고 (표 5), 진단적 또는 예후적 목적을 위한 직접 CXCL10 측정과 연관된 어려움을 강조한다.

[0638] 활성 CXCL10의 비례적으로 더 큰 수준이 양성 대 악성 샘플에서 관찰되었으므로, 각 샘플내 기능적: 총 CXCL10의 비율은, 환자들 사이 CXCL10 기능을 정규화하는 기전으로서, 시험되었다 (도 4c). 이 "활성 비율" 측정은 그룹들 사이 분리를 상당히 개선시켜, 90% 및 95% 특이성, 각각에 < 1.43 및 < 1.25의 컷-오프 값들로 양성 대 악성 샘플 사이 감별을 초래하였다 (표 5). 이 관계는 또한 악성 샘플이 질환 병기 (FIGO I 기 대 III 기; 도 4d)에 따라 분리된 때 유효하게 유지되었다. 혈장 CA125가 악성 대 양성 질환을 가진 환자에서 상당히 상승되었어도 (도 5c), 복수액에서 측정된 활성 비율과 혈장 CA125 수준 사이 명백한 상관관계는 없었다 (도 6a). 따라서, 활성 비율은 혈장 CA125 농도와 독립적으로 악성종양의 마커를 제공한다.

[0639] **실시예 5: DPP4 풍부도 및 활성도는 기능적 CXCL10과 상관하지 않는다**

[0640] DPP4는 CXCL10의 N-말단에서 Val-Pro 또는 Ala-Pro 디펩타이드 형태의 제거를 촉매화하여, 이것을 T-세포 모집의 길항제로 전환시킨다. 이전의 작업은 그러므로 질환의 지표로서 생물학적 유체에서 DPP4-절단된 CXCL10의 수준을 정량화하도록 구하였다 (Casrouge 등, 2011 및 2012). 하지만, CXCL10에 대한 다중 변형 - 단백질분해성 및 비-단백질분해성 양쪽 - 은 단순한 DPP4-촉매화된 N-말단 처리를 넘어서 CXCL10 변이체의 확장된 레퍼토리를 초래할 수 있다 (Loos 등, 2008; Mortier 등, 2011). 이에 따라 이들 다중 변이체를 설명하는데 있어 실패는 임상적 샘플에서 CXCL10의 측정된 대 총 양들 사이의 불일치로 이어지고 CXCL10의 기능적 상태를 적절히 포착하지 못한다 (Casrouge 등, 2012).

표 5. 양성 및 악성 질환 사이 구별하기 위해 난소암 환자들로부터 복수액에서 활성 비율 및 다른 바이오마커의 예측적 성능. 각 바이오마커의 컷오프 포인트는 (특이성 90 및 95%에) ROC 분석에 기초하여 획득되어 따라서 감도, 양성 예측가능한 값 (PPV) 및 음성 예측가능한 값 (NPV)을 결정한다.

바이오마커 (컷오프 포인트)	특이성 % (95% CI)	감도 % (95% CI)	AUC	PPV	NPV
활성 비율					
< 1.43	90.0 (78.6-95.7)	63.5 (56.6-69.9)	0.8617	80.4	79.2
< 1.25	96.0 (86.5-99.3)	52.0 (45.1-58.8)		89.4	75.5
총 CXCL10 (pg mL⁻¹)					
> 241	90.2 (79.0-95.7)	51.0 (44.2-57.6)	0.8122	77.1	74.0
> 1204	94.1 (84.1-98.4)	19.5 (14.7-25.4)		68.2	64.4
활성 CXCL10 (pg mL⁻¹)					
> 598	90.1 (80.4-96.1)	35.6 (29.4-42.3)	0.7872	70.0	68.4
> 1400	94.6 (85.2-98.5)	17.3 (12.8-23.0)		67.5	63.9
DPP4 (ng mL⁻¹)					
> 316	89.6 (77.8-95.5)	12.2 (7.8-18.4)	0.5598	43.2	61.2
> 389	95.8 (86.0-99.3)	7.4 (4.2-12.8)		53.3	61.5
혈장 CA125 (U mL⁻¹)					
> 548	90.0 (73.5-97.9)	52.1 (44.7-59.5)	0.8262	77.1	74.4
> 757	93.3 (77.9-99.2)	44.7 (37.4-52.1)		89.8	73.0
조합된 바이오마커					
활성 비율 & DPP4	91.7 (73.0-99.0)	77.3 (68.3-84.7)	0.9114	85.8	86.2
(< 1.43 및 > 316 ng mL ⁻¹)					
활성 비율 & DPP4	95.8 (78.9-99.9)	67.3 (57.7-75.9)		91.2	81.9
(< 1.25 및 > 389 ng mL ⁻¹)					
활성 비율 & 혈장 CA125	91.7 (70.3-86.3)	79.1 (70.3-86.3)	0.9337	86.1	87.1
(< 1.43 및 > 548 U mL ⁻¹)					
활성 비율 & 혈장 CA125	95.8 (78.9-99.9)	51.8 (42.1-61.5)		88.9	75.4
(< 1.25 및 > 757 U mL ⁻¹)					
활성 비율 & DPP4 & 혈장 CA125	91.7 (73.0-99.0)	90.0 (82.8-94.9)	0.9511	87.5	93.4
(< 1.43 및 > 316 ng mL ⁻¹ 및 > 548 U mL ⁻¹)					
활성 비율 & DPP4 & 혈장 CA125	95.8 (78.9-99.9)	81.8 (73.3-88.5)		93.4	94.7
(< 1.25 및 > 389 ng mL ⁻¹ 및 > 757 U mL ⁻¹)					

주석: 환자 코호트에서 EOC 의 유병률은 90% 및 95% 특이성에서 양성 예측가능한 값 (PPV) 및 음성 예측가능한 값 (NPV)을 결정하기 위해 간주되었다.

[0641]

[0642]

임상적 샘플에서 DPP4 활성도와 CXCL10 기능 사이 관계를 명백히 하기 위해, 우리는 양성 및 악성 복수의 동일한 세트에서 DPP4 풍부도 및 비활성도를 측정하였다.

[0643]

각 마커 (활성 비율, DPP4, CA125)의 수신기 작동 특징 (ROC) 곡선은 환자들의 샘플의 결과에 기초하여 먼저 작도되어 곡선하 면적 (AUC)을 획득하였다. 조합된 ROC를 획득하기 위해, 이진 로지스틱 회귀가 수행되었고; 양쪽 양성 및 악성 그룹에 대하여 종속 변수로서 각 마커의 측정은 조합된 ROC를 작도하는데 후속적으로 사용되는 테스트 변수로서 확률을 획득하는데 사용되었다.

[0644]

어느 한쪽 경우에 관찰된 풍부도 또는 활성도에서 유의미한 차이는 없었다 (도 5a 및 도 5b). DPP4 풍부도가 악성 샘플에서 계산된 활성 비율과 상관관계가 있어도 (p=0.002), 이의 비활성도는 하지 않았고; 흥미롭게, 양성 샘플은 비활성도와 활성 비율 측정 사이 상관관계를 시사하는 역 (비-유의미한) 추세를 디스플레이하였다 (도 6b 및 도 6c). 이들 데이터는 DPP4 활성도가 비-악성 질환에서 CXCL10 기능과 관련될 수 있어도, 다중 CXCL10 변이체가 악성종양에서 CXCL10의 전반적 기능적 상태 결정하기에 중요할 가능성이 있음을 시사한다.

[0645]

실시예 6: 활성 비율은 양성 및 악성 질환 사이 예측적 차별을 제공한다

[0646]

활성 비율이 유용한 임상적 정보를 제공할 수 있는 지를 평가하기 위해, 우리는 수신기 작동 특징 (ROC) 곡선을 사용하여 복수액에서 이의 성능을 사정하였다 (도 7). 활성 비율은 어느 한쪽 활성 또는 총 CXCL10 단독의 측정에 비교하여 더 높은 AUC 그리고 감도 / 특이성에서 실질적 개선을 달성하여 (도 7a; 표 3), 이들 단일 측정정보

다 이의 향상된 유용성을 강조하였다. 감도, 특이성 및 활성 비율의 예측적 값들은 또한 혈장 CA125보다 더 높았다 (도 7b; 표 3). 활성 비율은 또한 어느 한쪽 DPP4, CA125 또는 CXCL10 (활성 또는 총) 측정 단독보다 더 큰 효과 크기 (코헨 d)를 달성하였다 (표 4). 따라서, 활성 비율, DPP4 및 혈장 CA125 측정의 조합은 양성 및 음성 질환 사이 차별을 위하여 양호한 PPV (87-94%) 및 NPV (93-95%)와 AUC >0.95를 산출하였다. 따라서, ART의 DPP4 및 혈장 CA125와의 조합은 복수액으로 제시하는 환자들에서 양성 및 음성 질환 사이 차별에서 유용하게 제공하였다.

표 6. 샘플 유형들에 기초한 바이오마커의 효과 크기, AUC, 코헨 d, 및 CV%의 값들은, 컷오프 포인트와 독립적으로, 수득되었다. P 값들은 ROC 분석에 기초한다.

바이오마커	샘플 유형	AUC	코헨 d	CV % (악성)	P 값
총 CXCL10 (pg/mL)	복수	0.8122	0.6976	191.7	<0.0001
활성 CXCL10 (pg/mL)	복수	0.7872	0.6062	134.1	<0.0001
활성 비율	복수	0.8617	0.8629	72.7	<0.0001
활성 비율	CVS	0.8036	1.0074	54.4	<0.0001
활성 비율	혈장	0.7828	0.7905	52.0	0.0002
DPP4 (ng/mL)	복수	0.5598	0.1124	75.8	0.2139
CA125	혈장	0.8262	0.6171	200.9	<0.0001

실시예 7: 임상적 진단으로서 ART

본 발명자들은 활성 비율 측정이 생식관을 대표하는 경질 면봉 (CVS)을 사용하여 수행될 수 있는 지를 탐구하였다.

복수액에서 우리의 발견과 병행하여, CVS 추출물 (n=50/그룹)에서 수행된 활성 비율 측정은 0.8의 AUC (p<0.0001)로 양성 및 음성 질환 샘플 사이 양호한 차별을 디스플레이하였다 (도 8a; 표 6). 매칭된 혈장 샘플 (n=30)에서, ART는 또한 그룹들 사이 차별할 수 있었다 (AUC 0.8, p<0.001).

ROC 분석을 넘어서 진단 유용성을 탐구하기 위해, 본 발명자들은 또한 각 바이오마커 및 샘플 유형에 대하여 효과 크기 (코헨 d)를 시험하였다 (표 6). 혈장 CA125의 측정은 0.83의 AUC를 반환하고, 복수액에서 ART 측정 (AUC 0.86) 다음이었지만; 효과 크기는 "중위" (코헨 d = 0.62)이었다. 반대로, ART 측정은 복수액 및 CVS (각각, 코헨 d = 0.86 및 1.0)에서 "큰" 효과 크기를 달성하여 동일한 개체군 내에서 크게 감소된 편차를 시사하였다. 유사하게, 혈장에서 수행된 ART 측정은 코헨 d = 0.79를 반환하였다 (표 6).

이 결과는 ART가 통계적으로 강력한 측정을 달성하기 위해 바람직한 바이오마커라는 것, 그리고 CVS를 사용하는 이의 분석이 양성 및 음성 질환 사이 차별하기 위해 강력하고 임상적으로 유용한 측정을 제공할 수 있다는 것을 나타낸다.

실시예 8: ART는 무암 환자들을 양성 또는 악성 난소 종양을 가진 환자들과 차별한다

활성 비율을 통해서 양성 및 악성 난소 종양을 가진 환자들 사이를 차별하기 위해 ART의 적용을 확립시킨 후, ART는 새로운 환자 코호트 (즉 예방적으로 수집된 코호트) - 어느 한쪽 BRCA1/2 돌연변이 담체 확인되거나, 유방암 및/또는 난소암의 강력한 가족력을 갖는 예방적, 위험-감소 난관난소절제술을 경험한 환자들을 테스트하기 위해 적용되었다. 이에 따라 이들 환자들은 초기 난소암의 존재를 검출하도록 설계된 ART의 검증을 위한 이상적 무질환 대조군 코호트를 나타낸다.

활성 CXCL10의 농도는 건강한 여성들에서 총 CXCL10보다 상당히 더 높다 (도 9a), 암이 없는 환자들에서 활성, 기능적 CXCL10의 더 높은 수준을 가질 수 있음을 시사하였다. 예방적으로 수집된 코호트에서 건강한 여성들내 전반적 활성 및 총 CXCL10 농도가 양성 및 악성의 각각의 CXCL10 농도에 비교된 경우, 이들은 양쪽 양성 및 악성보다 상당히 더 낮았다 (도 9b). 활성 비율에 관하여, 건강한 여성들에서 활성 비율은 양쪽 혈장 및 CVS에서 양성 및 악성 그룹보다 상당히 더 높았다 (도 9c 및 d).

건강한 여성들의 활성 CXCL10의 수준 및 활성 비율이 양성 및 악성 환자들, 각각의 총 CXCL10 및 활성 비율보다 상당히 더 높은 점을 감안하여, 데이터는 양성 병태 또는 악성 난소 종양이 없는 환자들에서 기능적 CXCL10의 DPP4-개시된 절단의 더 적은 정도가 있을 수 있음을 시사한다.

[0657] **실시예 9: DPP4 풍부도 및 활성도는 활성 비율과 상관하지 않는다**

[0658] 예방적으로 수집된 코호트에서 DPP4와 CXCL10 사이 관계를 확립하기 위해, 혈장 샘플에서 DPP4 풍부도 및 이의 비활성도는 측정되었고 양성 또는 악성 난소암을 가진 환자들의 결과에 비교되었다.

[0659] 건강한 환자들의 혈장 샘플에서 DPP4의 수준은 양쪽 양성 및 악성 환자 그룹보다 상당히 더 높았다. 하지만, DPP4 풍부도는 그들 건강한 여성들의 샘플에서 계산된 활성 비율과 상관하지 않았다 (도 10a). 건강한 여성들에서 DPP4의 수준이 양성 및 악성 환자 그룹보다 상당히 더 높았음에도 불구하고, 건강한 여성들의 혈장에서 이의 비활성도는 양쪽 양성 및 악성보다 상당히 더 낮았다 (도 10b). 비활성도는 계산된 활성 비율 어느 한쪽과 상관하지 않았다. 이들 데이터는 건강한 여성들에서 DPP4의 기능이 미지의 인자에 의해 억압될 수 있다는 것을 시사한다.

[0660] **실시예 10: CVS는 건강한 여성들을 양성 또는 악성 난소 종양을 가진 환자들과 차별한다**

[0661] CVS가 바이오마커-기반 테스트를 위한 선택적 샘플임에 따라, 예방적으로 수집된 코호트의 CVS에서 활성 및 총 CXCL10 농도의 수준은 측정되어 활성 비율을 수득하였다. 더욱이, 활성 비율의 비교는 예방적으로 수집된 코호트에서 건강한 환자들과 양성 또는 악성 난소 종양을 가진 환자들 사이 실시되었다.

[0662] 건강한 여성들에 관하여, 활성, 기능적 CXCL10의 전반적 수준은 총 CXCL10보다 상당히 더 높았다 (도 11a). 양성 또는 악성 난소 종양을 가진 환자들과 반대로, 건강한 환자들의 CVS의 계산된 활성 비율은 혈장 수준과 일치하였고; 건강한 여성들로부터 샘플의 전반적 활성 비율은 양쪽 양성 및 악성 환자 그룹보다 상당히 더 높았다 (도 11b).

[0663] **실시예 11: CVS의 DPP4 풍부도 및 CVS의 활성 비율과 이의 상관관계**

[0664] CVS에서 DPP4 풍부도는 CVS로부터 추출물의 제한된 정량으로 인해 난소암 바이오뱅크를 포함하는 이전의 연구에서 측정되지 않았다. 동일한 샘플 공급원으로부터 양쪽 활성 비율 및 DPP4 풍부도를 측정하고 동일한 샘플 유형 내에서 그들의 상관관계를 확립하는 것이 바람직함에 따라, CVS의 제조는 양쪽 활성 비율 및 CVS의 DPP4를 측정하고 이에 따라 이들을 상관시키도록 최적화되었다. 도 12에서 도시된 대로, CVS의 DPP4는 정량화될 수 있었고 계산된 활성 비율은 DPP4 ($p = 0.0094$)와 역으로 상관되었다. 이 데이터는 CVS의 DPP4와 활성 비율을 상관시키는 가능성을 시사한다.

[0665] **실시예 12: 활성 비율 및 혈장 CA125**

[0666] 건강한 여성들의 CA125 측정은 양쪽 양성 및 악성 그룹보다 상당히 더 낮았다. 데이터는 CA125의 수준이 악성 질환을 가진 환자들에서 상승된다는 사실과 일치한다 (도 13). 계산된 활성 비율은 CA125 ($p = 0.0015$)와 양으로 상관되었다.

[0667] **실시예 13: 활성 비율 및 혈장 CA125**

[0668] 활성 비율이 유용한 임상적 정보를 제공할 수 있는 지를 평가하기 위해, 혈장 및 CVS에서 이의 성능은 수신기 작동 특징 (ROC) 곡선을 사용하여 사정되었다. ROC 곡선은 예방적으로 수집된 코호트에서 건강한 여성들 대 악성 난소 종양을 가진 환자들 사이 비교에 기초하여 작도되었다.

[0669] 활성 비율이 이전의 복수 연구에서 어느 한쪽 활성 또는 총 CXCL10 단독의 정량화에 비교하여 감도 / 특이성에서 실질적 개선을 달성하였음에 따라, 혈장 및 CVS의 활성 비율들을 조합하는 것은 또한 더 높은 AUC를 달성하였다 (도 14a). 이것은 ART의 예후적 효능을 증가시키기 위해 양쪽 샘플 유형들의 용도를 검증한다. 혈장, DPP4, 및 혈장 CA125 측정의 활성 비율의 조합은 $AUC > 0.98$ 을 산출하였던 (도 14b) 반면 CVS, DPP4, 및 혈장 CA125의 활성 비율의 조합은 건강한 여성들과 악성 질환 사이 차별에 대하여 $AUC > 0.99$ 를 산출하였다. 이들 데이터는 2개 샘플 유형들을 조합하는 것과 함께 DPP4 및 혈장 CA125를 이용한 활성 비율의 조합이 건강한 여성들과 악성 질환 사이 차별에서 유용한 것으로 증명함을 시사한다.

[0670] **실시예 14: ART는 복합 배경에 대해 악성종양을 가진 환자들을 감별한다**

[0671] 다양한 배경에 대해 악성종양을 식별하도록 ART의 예후적 잠재성을 조사하기 위해, 건강한 및 양성 코호트에서 여성들은 조합되었고 ROC 분석들은 악성 그룹에 대해 수행되었다. ART 단독은 혈장 샘플에 적용된 때 0.79의 AUC 그리고 CVS 샘플에 적용된 때 0.72의 AUC를 반환하였다. 비교해 보면, CA125는 0.93의 AUC를 달성하였다 (도 15a). 하지만, CA125는 코호트 내에서 높은 변동 (CV 189.5%) 및 작은 효과 크기 (코헨 d 0.097)를 나타내어, 악성 샘플의 조합된 건강한 더하기 양성 코호트와의 감별에 대하여 강력한 측정이 아니었음을 시사하였다

(표 7).

반대로, 활성 비율 측정은 양쪽 CVFS ($d=0.64$) 및 혈장 ($d = 1.01$)에서 큰 효과 크기를 가져, 동일한 개체군 내에서 크게 감소된 편차를 시사하였다 (표 7). 이 결과는 ART가 통계적으로 강력한 측정을 달성할 수 있고, 건강한 여성들 또는 양성 질환을 가진 환자들의 복합 배경에 대해 악성 난소암의 감별을 위한 현행 CA125 금 표준을 능가할 수 있음을 시사한다.

표 7. 복합 배경 코호트에 대해 악성 질환의 감별을 위한 개별 바이오마커의 효과 크기.

바이오마커	AUC	코헨 d	CV %	P 값
활성 비율 (혈장)	0.7988	1.0168	97.3	<0.0001
활성 비율 (CVS)	0.7241	0.6383	73.9	<0.0001
DPP4 (ng mL-1)	0.6301	0.3078	91.2	<0.0001
CA125	0.9351	0.0996	189.5	<0.0001

ART (CVS 및/또는 혈장), DPP4, 및 CA125의 조합은 그룹들 사이 감별을 개선하기 위한 기전으로서 또한 시험되었다. CA125 (AUC 0.94)에 비교하여, 혈장에서 측정된 모든 다른 마커와 CVS를 사용하여 측정된 ART의 조합은 0.98의 AUC를 반환하였다 (표 8).

모든 바이오마커 (ART, DPP4 및 CA125)의 조합은 이 코호트 내에서 악성종양의 검출을 위하여 93.1%의 감도와 0.98의 AUC를 달성하였다 (표 8). 반대로, CA125 단독은 0.94의 AUC 그러나 겨우 78.6%의 감도를 나타냈다 (표 8).

표 8. 건강한 여성들 및 양성 부인과 질환을 가진 여성들로 구성된 환자 코호트와 악성 질환을 구별하기 위한 개별 마커 및 조합된 마커의 예후적 성능.

개별 바이오마커 (컷오프 포인트)	AUC	감도%	특이성 %
활성 비율 (혈장) (<1.25)	0.7988	56.3	90.8
활성 비율 (CVS) (<0.89)	0.7241	41.4	91.6
DPP4 (ng mL-1) (<119.4)	0.6301	20.1	90.0
CA125 (>138.5)	0.9351	78.6	90.6
조합된 바이오마커			
활성 비율 (혈장) + DPP4 + CA125 (<1.25 및 <119.4 및 >138.5)	0.9418	83.4	90.6
활성 비율 (CVS) + DPP4 + CA125 (<0.89 및 <119.4 및 >138.5)	0.9701	89.7	90.6
활성 비율 (혈장 + CVS) + DPP4 + CA125 (<1.25 및 <0.89 및 <119.4 및 >138.5)	0.9800	93.1	90.6

따라서, ART, DPP4 및 CA125의 조합은 건강한 여성들 및 양성 질환을 가진 여성들로 구성된 복합 배경에 대해 악성종양을 감별시켰고; 현행 임상적 금 표준인, CA125 단독을 상당히 능가하였다.

실시예 15: ART는 초기 (I 기) 암 환자들의 식별을 개선한다.

진단에서 암 병기는 난소암 환자들에 대하여 임상적 성과와 강하게 연관된다. 특히, FIGO I 기 질환 ("초기")으로 진단된 환자들은 III-IV 기에 진단된 이들 (<40%)에 비교하여 5-년 및 전반적 생존율 (~95%)을 실질적으로 개선하였다. 따라서, ART가 (단독으로 또는 조합으로) 초기 암 환자들을 어느 한쪽 건강한 여성들 또는 양성 질환을 가진 여성들과 성공적으로 감별할 수 있는 지가 사정되었다.

CA125는 초기 암 환자들과 양성 질환을 가진 이들 또는 건강한 여성들 사이 최대 단일-마커 감별을 제공하였다 (표 9). 하지만, ART (혈장)의 DPP4 및 CA125와의 조합은 양성 대 초기 악성종양 (AUC 0.75 대 0.63; 표 9) 사이 감별을 실질적으로 개선하였다. 놀랍게도, 초기 악성종양을 가진 환자들은 CA125 단독 (AUC 0.88; 감도

81.8%)에 비교하여 3-마커 조합 (AUC = 0.99; 감도 95.4%)을 사용하는 높은 정확도로 건강한 여성들과 감별될 수 있었다.

[0681] 따라서 ART는 현행 CA125 금 표준에 비교하여, 환자들의 진단적 또는 예후적 평가를 개선하는데, 그리고 특히 초기 암과 연관된 검출 질환-특이적 변화에 사용될 수 있다.

표 9.1 기 암을 식별하기 위한 개별 마커 및 조합된 마커의 예후적 성능

양성 대 I 기	AUC	감도%	특이성 %
활성 비율 (혈장) (<0.55)	0.5356	31.2	88.4
DPP4 (ng mL-1) (>335.3)	0.5770	25.0	89.8
CA125 (>532.5)	0.6250	22.3	88.9
활성 비율 (혈장) + DPP4 + CA125 (<0.55 및 >335.3 및 >532.5)	0.7463	50.0	90.7
건강함 대 I 기			
활성 비율 (혈장) (<1.65)	0.7661	50.0	90.0
DPP4 (ng mL-1) (>69.1)	0.8794	75.0	90.0
CA125 (>31.5)	0.8830	81.8	90.1
활성 비율 (혈장) + DPP4 + CA125 (<1.65 및 >69.1 및 >31.5)	0.9888	95.4	90.1

[0682]

[0683] 실시예 16: ART 패널 및 멀티플렉스 5-마커 패널의 조합은 장기적으로 수집된 코호트에서 전암성 병변을 가진 환자들을 식별한다

[0684] 난소암의 병인은 아직 불분명하지만, 많은 난소 종양의 형성이 나팔관에서 전암성 "p53 시그니처"의 존재와 시작한다는 것은 이제 분명하다. 다른 암 유형들과 유사하게, 극초 - 또는 전암성 - 기에 병변의 검출은 실질적으로 개선된 성과를 가능하게 할 것이다.

[0685] 본 발명자들은 높은 등급 상피 난소암의 진단적 프로파일링 (PMID: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59009-z>)에 관련한 몇몇 추가의 바이오마커 (GM-CSF, IL-6, TNF-R1I, HE4, IL8)를 이전에 식별하였다. 따라서, ART, DPP4 및 CA125의 기존 패널과 이들의 조합은 그들의 잠재적으로 개선된 진단적 성능에 대하여 사정되었다.

[0686] 이들 연구의 경우에, 마커 조합은 난소암 발병의 알려진 유전하는 위험에 대하여 예방적 위험-감소 수술 (전형적으로 양측-난관-난소절제술)을 경험한 여성들의 장기적으로 수집된 코호트에서 사정되었다. 조직학적 평가는 모든 환자들을 어느 한쪽 "건강한" (즉 질환의 확인된 부재) 또는 "암" (p53 병변 또는 초기 잠복 종양의 존재)으로 분류하는데 사용되었다.

[0687] 결과는 표 10에 제시되었다 (최상 성능 조합만 나타남). 5-마커 패널은 초기 / 전암성 병변의 검출에 대하여 0.87의 조합된 AUC를 반환하였던 반면; 확립된 ART 패널은 0.97의 AUC를 달성하였다 (표 10). 이들은 0.77의 AUC를 반환한 CA125보다 실질적으로 더욱 양호하였다.

[0688] 하지만 놀랍게도, 양쪽 패널이 조합된 때 마커의 이 특정 조합이 난소의 초기 및 전암성 병변의 진단에 높은 잠재력을 가짐을 입증하는 1.0의 완벽한 AUC가 달성되었다.

표 10. 1 기 암 또는 p53 전암성 병변을 가진 환자들을 식별하기 위한 개별 마커 및 조합된 마커의 예후적 성능.

멀티플렉스 5 마커 패널	AUC	감도%	특이성 %
GM-CSF	0.5564	22.2	92.6
IL-6	0.7816	44.4	90.1
TNF-RII	0.5317	11.1	90.1
HE4	0.8377	44.4	90.1
IL-8	0.6495	33.3	90.1
5개의 조합*	0.8645	77.8	90.1
ART 패널			
활성 비율 (혈장)	0.6846	36.4	90.0
활성 비율 (CVS)	0.5802	20.0	90.0
DPP4	0.5906	25.0	90.1
CA125	0.7677	54.6	90.1
4개의 조합*	0.9676	87.5	90.1
추가된 멀티플렉스:			
활성 비율 (혈장 + CVS)	0.9238	77.8	90.1
활성 비율 (혈장 + CVS) + DPP4	0.9329	75.0	90.0
활성 비율 (혈장 + CVS) + CA125	0.9833	88.9	90.0
활성 비율 (혈장 + CVS) + DPP4 + CA125	1.0000		

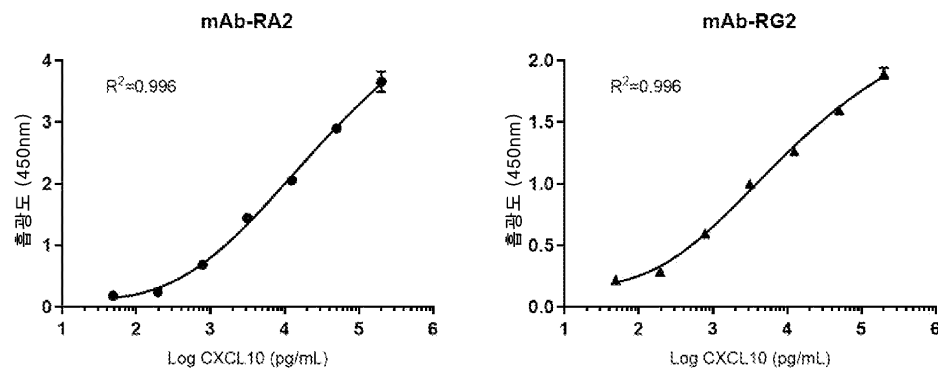
참고문헌

- Al-Lazikani et al. (1997) J Mol Biol, 273:927-948.
- Armour et al. (1999) Eur J Immunol, 29:2613-2624.
- Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, 1987, Wiley Interscience, ISBN 047 150338.
- Ausubel et al. (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, 1988, John Wiley and Sons, Inc.
- Bork et al. (1994) J Mol Biol, 242:309-320.
- Brady et al. (1987) Philosophical Transactions of the Royal Society, B316:143-160.
- Brown (ed.), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 1991, IRL Press, Volumes 1 and 2.
- Casrouge et al. (2011) The Journal of Clinical Investigation, 121:308-317.
- Casrouge et al. (2012) Clin Exp Immunol, 167:137-48.
- Chothia and Lesk (1987) J Mol Biol, 196:901-917.
- Chothia et al. (1989) Nature, 342:877-883.
- Coligan et al. (ed.), Current Protocols in Immunology, 1991, John Wiley & Sons.
- Cuello, ASIN 0471900524, 1984, John Wiley and Sons.
- Dall'Acqua et al. (2006) J Immunol, 177:1129-1138.
- Dieffenbach et al. (ed.), PCR Primer: A Laboratory Manual, 1995, Cold Spring Harbor Laboratories.
- Edelman et al. (1969) Proc Natl Acad Sci, 63:78-85.
- Englebienne (1998) Analyst, 123:1599-1603.
- Gisslen et al. (2016) EBioMedicine 3:135-140.
- Giudicelli et al. (1997) Nucleic Acids Res, 25:206-211.
- Glover et al. (ed.), DNA Cloning: A Practical Approach, 1995 and 1996, IRL Press, Volumes 1 to 4.

- [0711] Harlow et al. (ed.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbour Laboratory.
- [0712] Hezareh (2001) *J Virol*, 75:12161-12168.
- [0713] Honnegger and Plukthun, (2001) *J Mol Biol*, 309:657-670.
- [0714] Jones et al. (2010) *J Immunol Methods*, 354:85-90.
- [0715] Jostock et al. (2004) *J Immunol Methods*, 289:65-80.
- [0716] Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest* Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987, 1991, 2001
- [0717] Kopsidas et al. (2006) *Immunol Lett*, 107:163-168.
- [0718] Kopsidas et al. (2007) *BMC Biotechnol*, 7:18-29.
- [0719] Kuhle et al. (2016) *Clin. Chem. Lab Med.* 54:1655-166.
- [0720] Kyte and Doolittle (1982) *J Mol Biol*, 157:105-132.
- [0721] Largaespada et al. (1996) *J Immunol Methods*, 197:85-95.
- [0722] Loos et al. (2008) *Blood*, 112:2648-56.
- [0723] Mendoza et al. (1999) *Biotechniques*, 27:778-788.
- [0724] Mortier et al. (2011) *Exp Cell Res*, 317:642-54.
- [0725] Needleman and Wunsch (1970) *J Mol Biol*, 48:443-453.
- [0726] Novotny et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci*, 88:8646-8650.
- [0727] Padlan et al. (1995) *FASEB J*, 9:133-139.
- [0728] Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, 1984, John Wiley and Sons.
- [0729] Rainczuk et al. (2012) *Reproduction*, 144:303-17.
- [0730] Rich and Myszka (2000) *Curr Opin Biotechnol*, 11:54-61.
- [0731] Robins (1991) *Adv Biosensors*, 1:229-256.
- [0732] Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [0733] Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2001 (Third Edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [0734] Scholler et al. (2007) *Biomarkers in Medicine* 1:513-523.
- [0735] Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 1994, Springer Verlag.
- [0736] Shao et al. (2019) *Future Oncology* 15:1863-1871.
- [0737] Shields et al. (2001) *J Biol Chem*, 276:6591-6604.
- [0738] Sinnathurai et al. (2018) *International Journal of Rheumatic Diseases*, 21:1915-1923.
- [0739] Stemmer (1994) *Nature*, 370: 389-91.
- [0740] Thie et al. (2009) *Method Mol Biol*, 525:309-322.
- [0741] Vuento et al. (1997) *Gynecologic Oncology* 64:141-146.
- [0742] Windmuller et al. (2017) *Oncogenesis*, 6:e331.

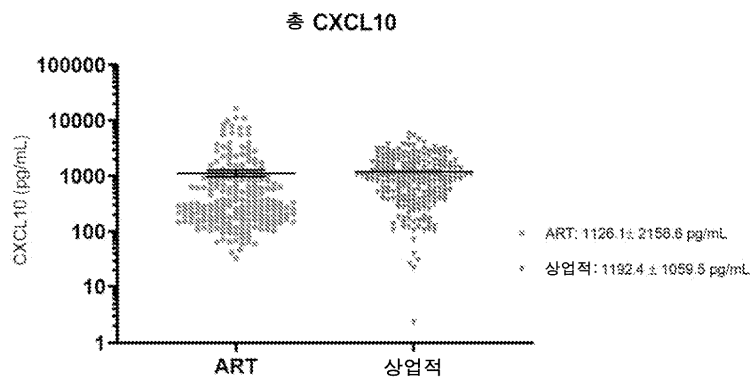
도면

도면1

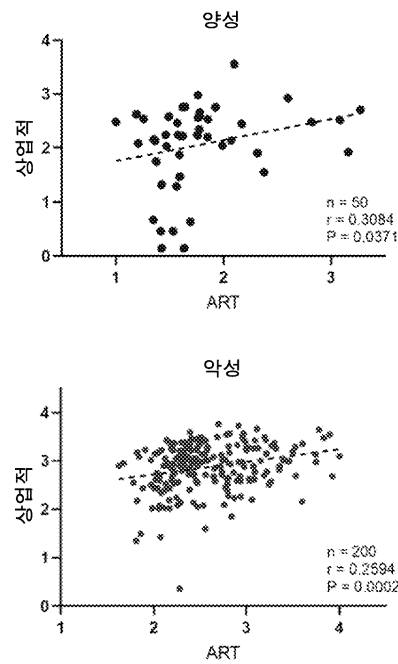


도면2

A.

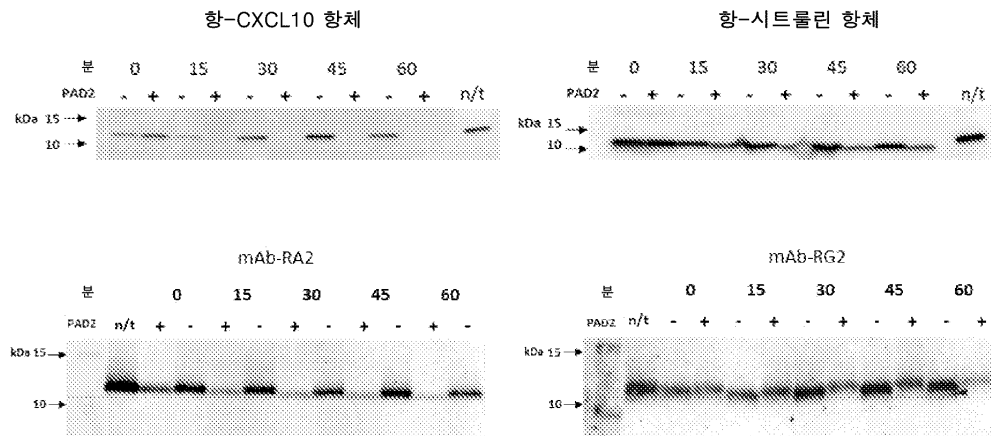


B.

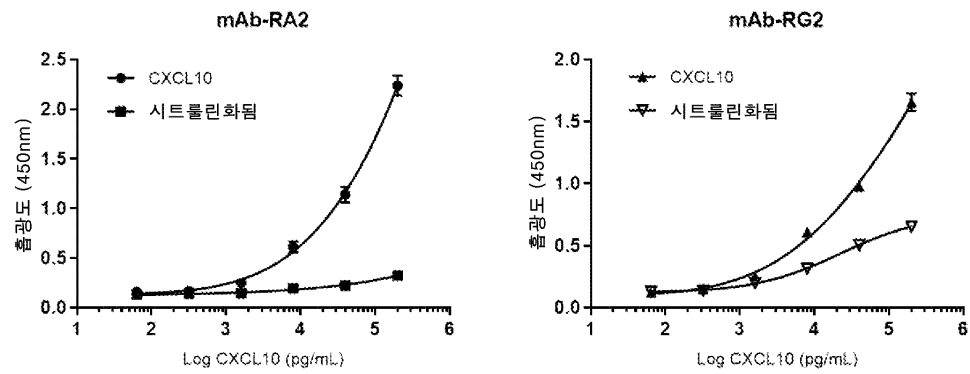


도면3

A.

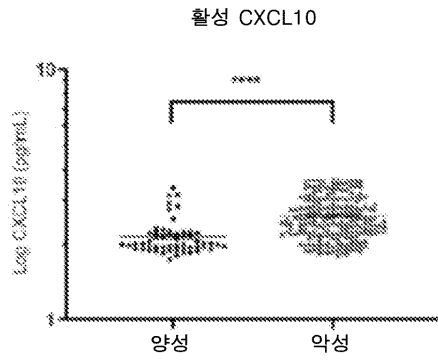


B.

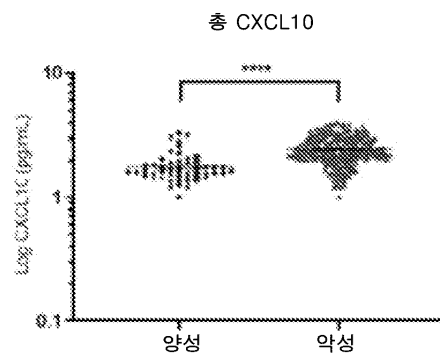


도면4

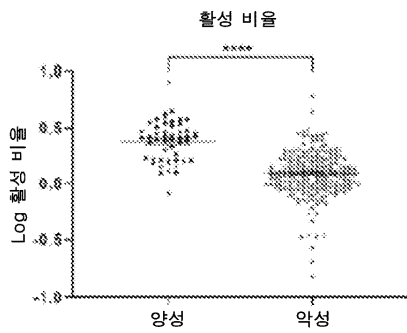
A.



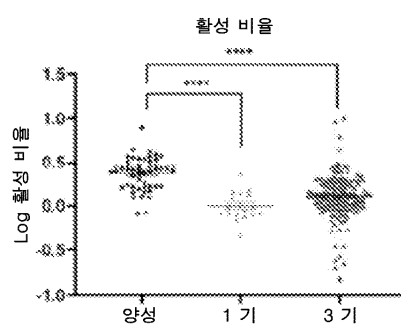
B.



C.

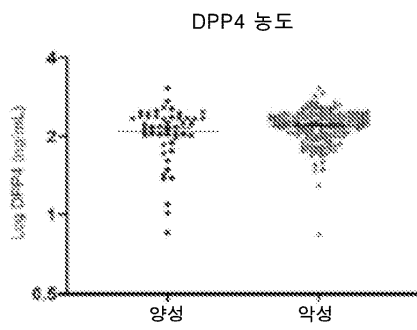


D.

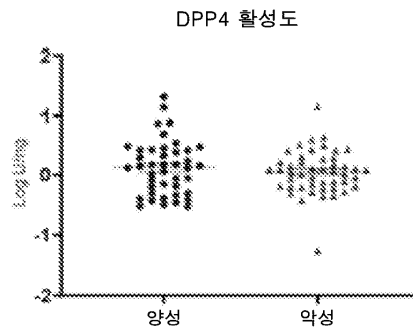


도면5

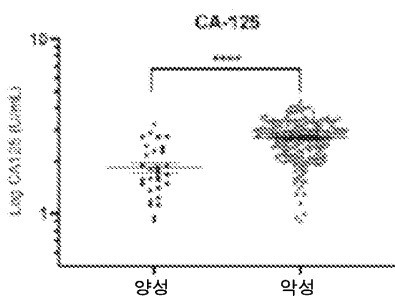
A.



B.

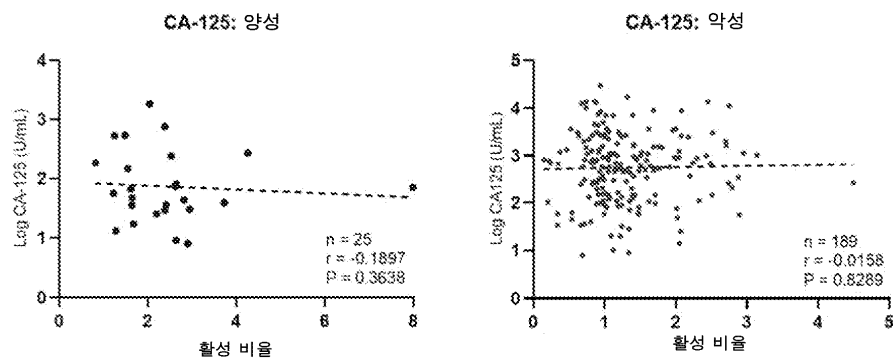


C.

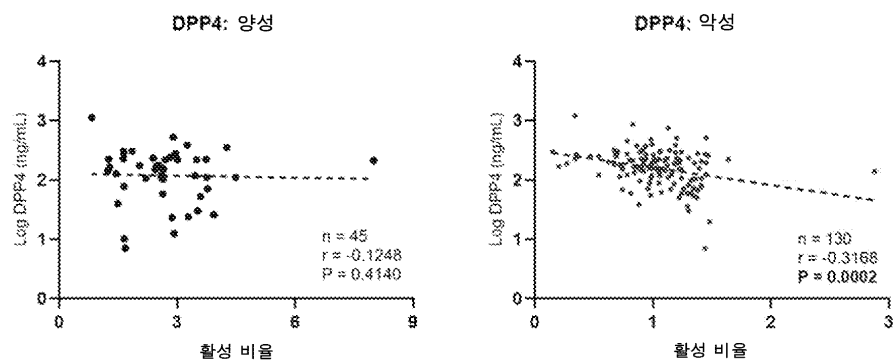


도면6

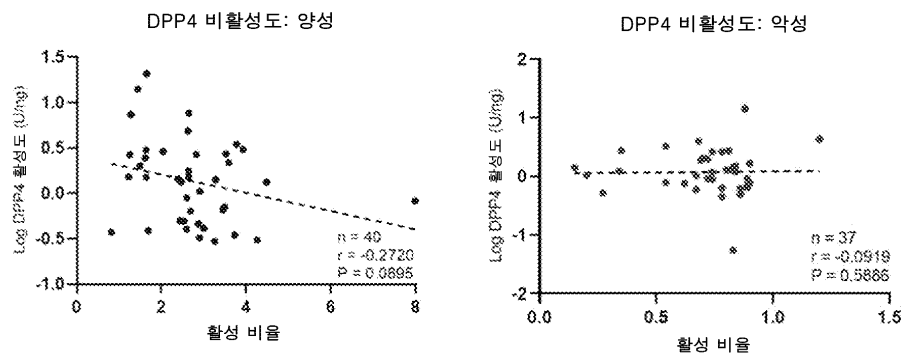
A.



B.

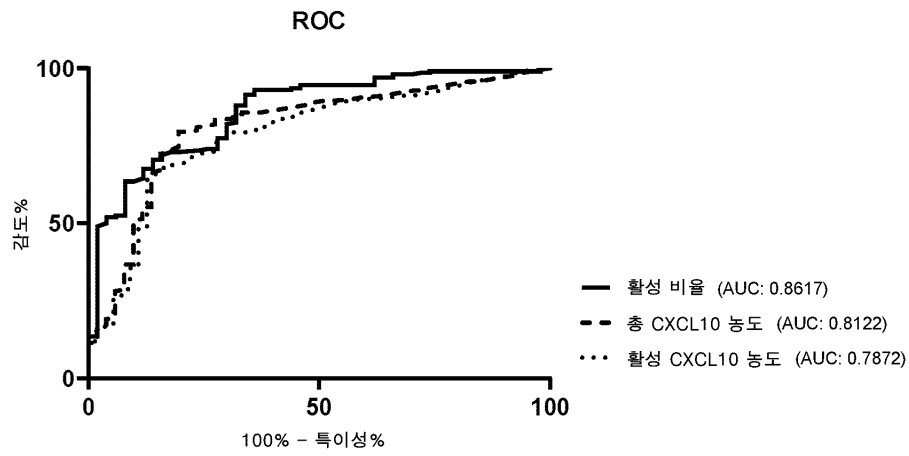


C.

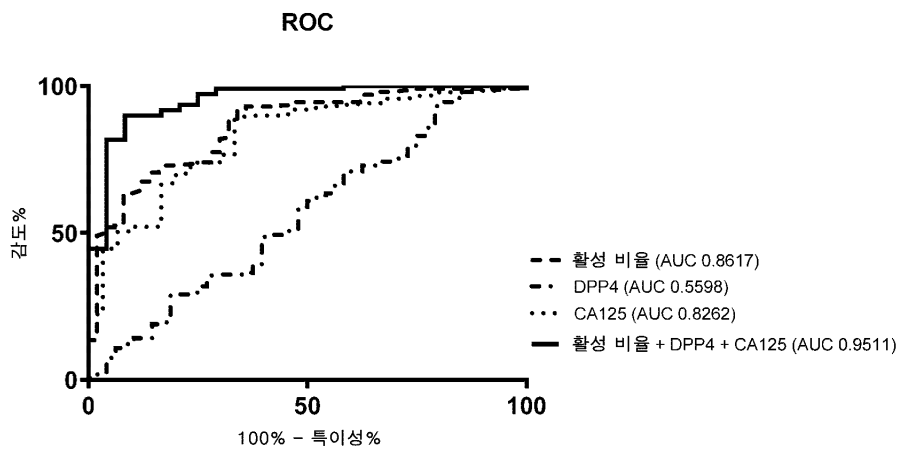


도면7

A.

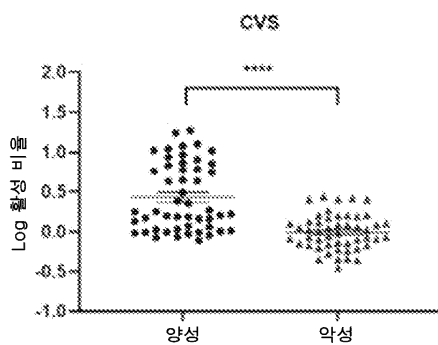


B.

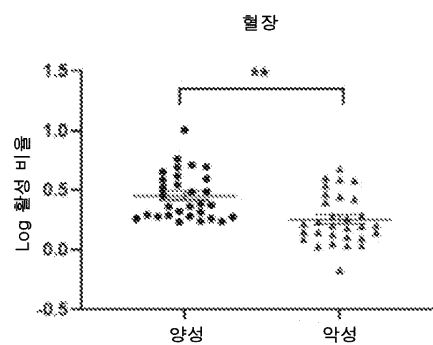


도면8

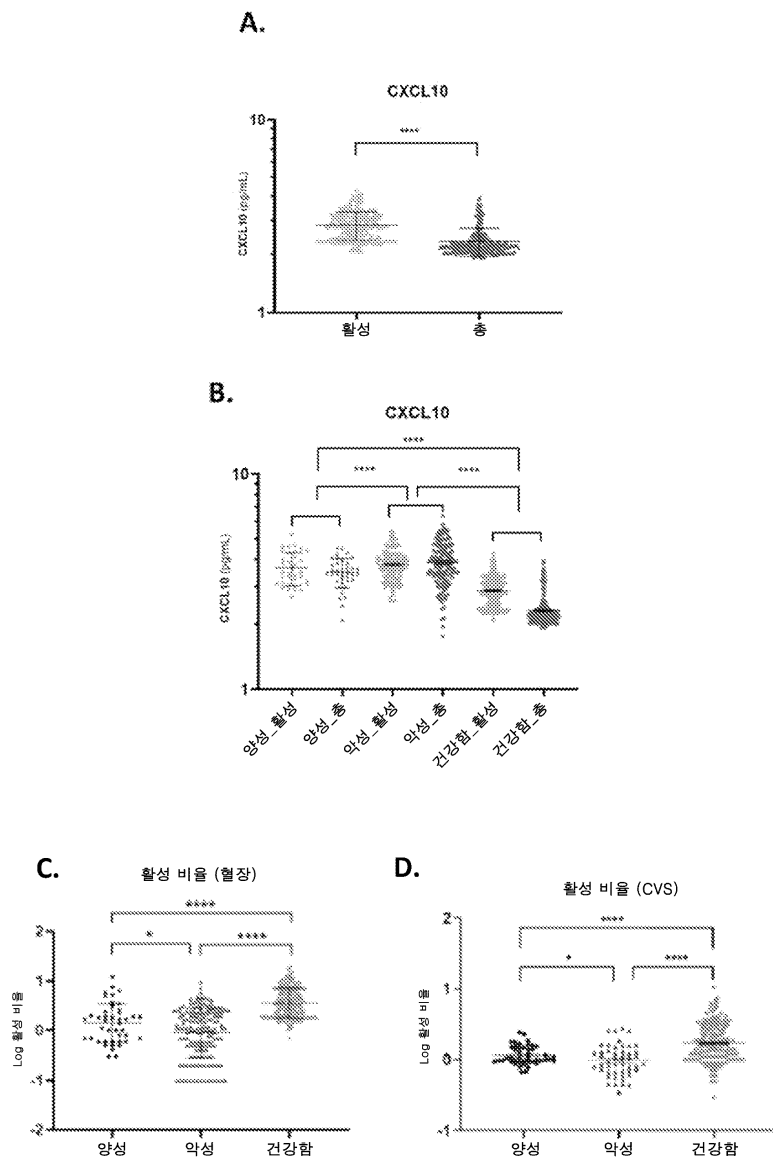
A.



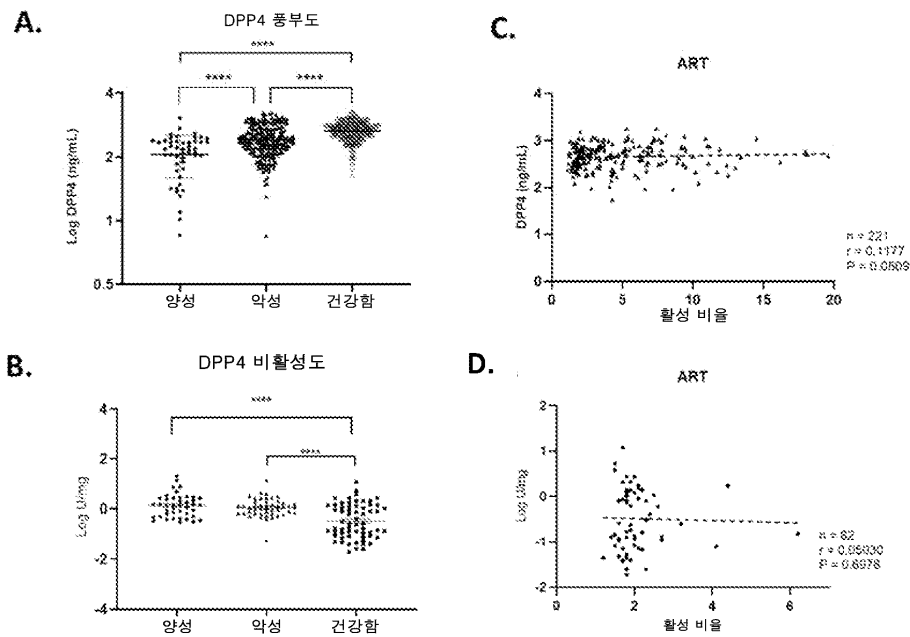
B.



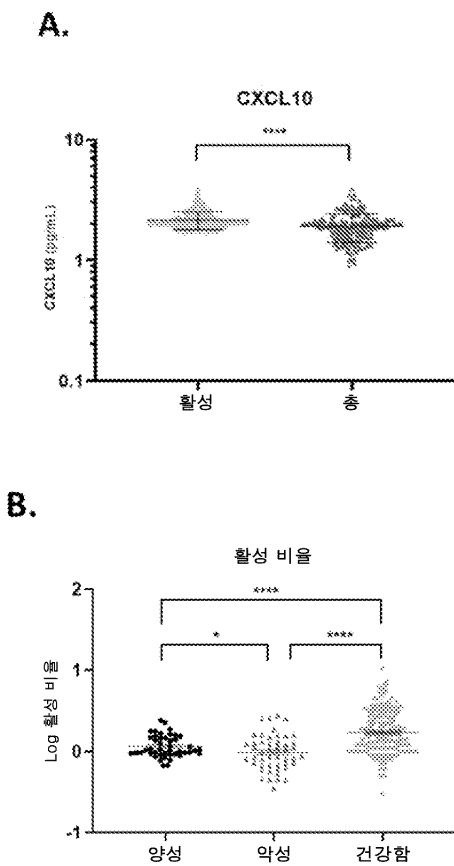
도면9



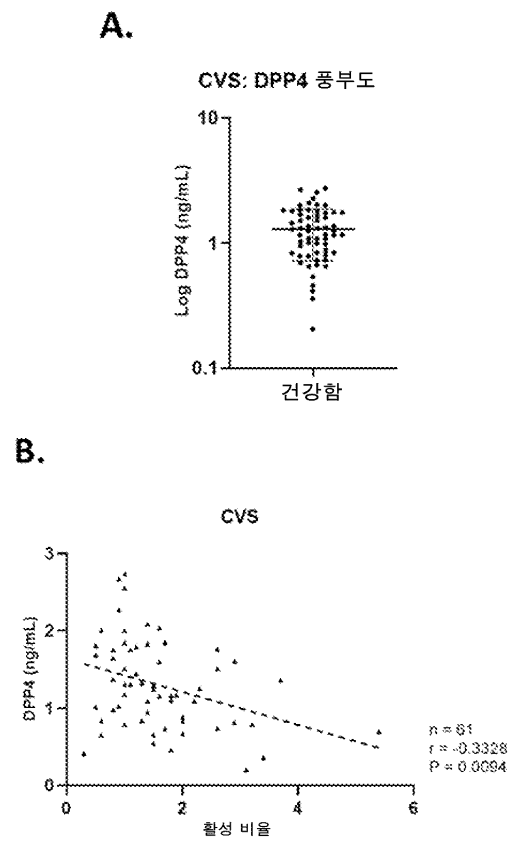
도면10



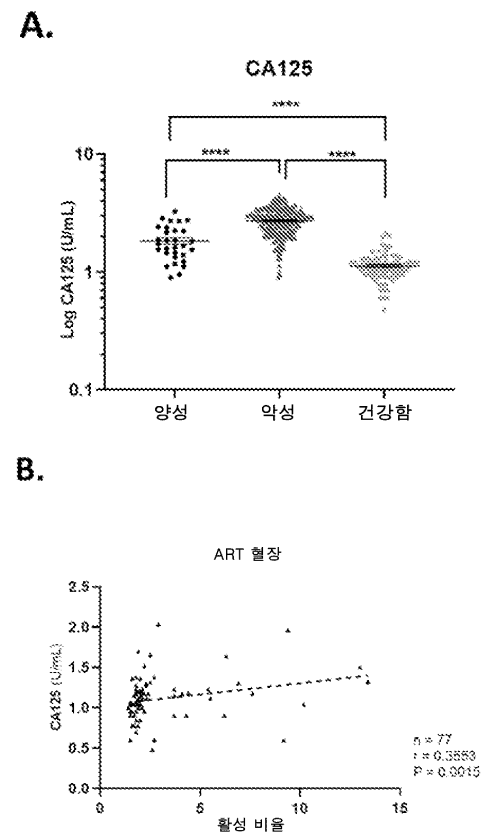
도면11



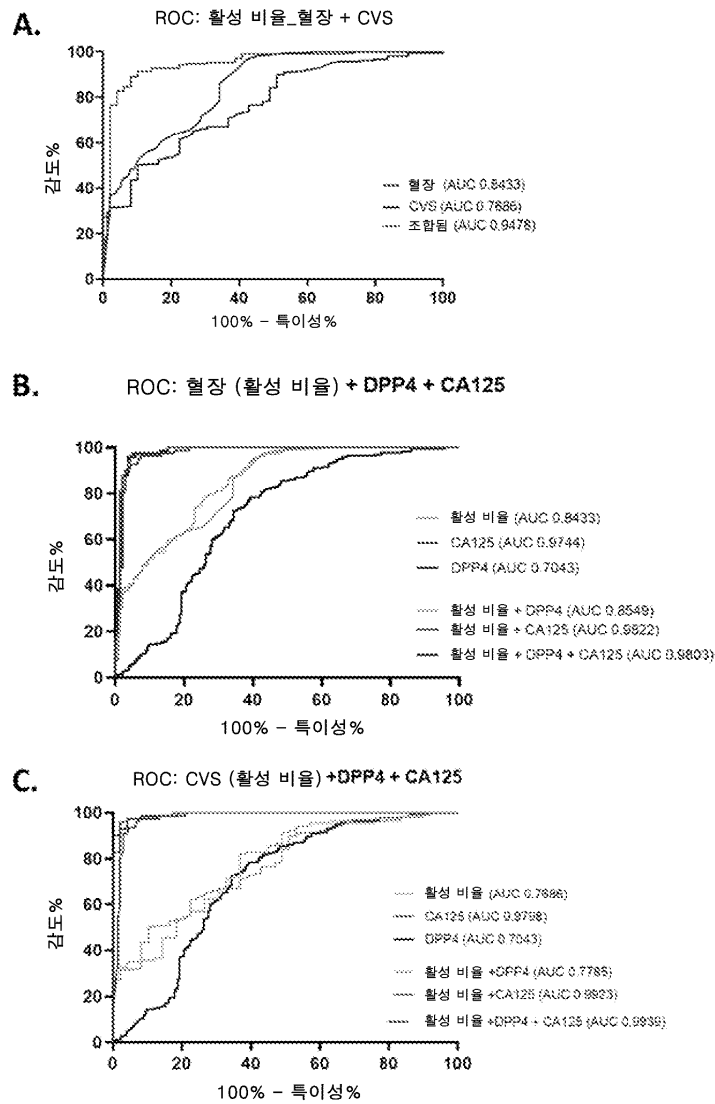
도면12



도면13

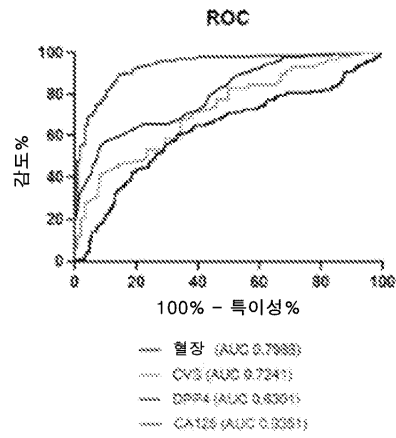


도면14

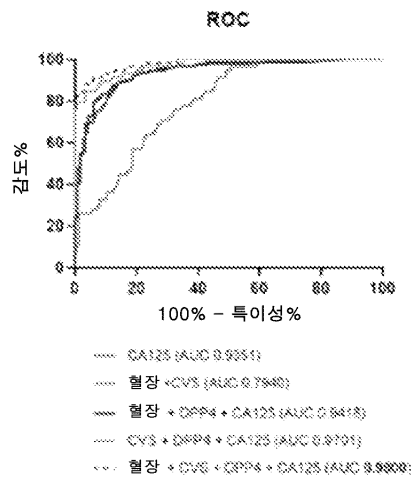


도면15

A.



B.



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Hudson Institute of Medical Research

<120> CXCL10 BINDING PROTEINS AND USES THEREOF

<130> 530866PCT

<150> AU 2019904859

<151> 2019-12-20

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asn Gln Thr Ala Ile Leu Ile Cys Cys Leu Ile Phe Leu Thr Leu

1 5 10 15

Ser Gly Ile Gln Gly Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys

20 25 30

Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu

35 40 45

Glu Ile Ile Pro Ala Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala

50 55 60

Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys

65 70 75 80

Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg

85 90 95

Ser Pro

<210> 2

<211> 77

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn

1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala

20 25 30

Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys

35 40 45

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

50 55 60

Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro

65 70 75

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody RA2

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Ala Thr His Tyr Asn Gln Met Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Asn Thr Arg His Asp Glu Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody RA2

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Lys Tyr

20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Tyr Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100 105 110
Thr Val Ser
115

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH CDR1 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RA2

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH CDR2 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RA2

<400> 6

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Ala Thr

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH CDR3 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RA2

<400> 7

Ala Asn Thr Arg His Asp Glu Ser

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL CDR1 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RA2

<400> 8

Gln Asp Ile His Lys Tyr

1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL CDR2 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RA2

<400> 9

Asp Thr Ser

1

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL CDR3 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RA2

<400> 10

Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody RG2

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Ala Trp Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Thr Gly Glu Phe Phe Tyr Asn Gly Ser Ser Tyr Val Ser

100 105 110

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Ala Thr Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody RG2

<400> 12

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 Lys Ser Val Ser Ser 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 Ser 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
 Asp Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser

115 120

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH CDR1 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RG2

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH CDR2 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RG2

<400> 14

Ile Asn Thr Asn Ser Gly Glu Pro

1 5

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH CDR3 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RG2

<400> 15

Ala Arg Tyr Thr Gly Glu Phe Phe Tyr Asn Gly Ser Ser Tyr Val Ser

1 5 10 15

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

20

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL CDR1 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RG2

<400> 16

Lys Ser Val Ser Ser Ser Gly Tyr Ser Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL CDR2 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RG2

<400> 17

Leu Ala Ser

1

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL CDR3 amino acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RG2

<400> 18

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 19

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH nucleotide sequence of anti-CXCL10 antibody RA2

<400> 19

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agtcactgga tgatctgggt gaagcagagg 120

ccctggacaag gccttgaatg gattggtatg attgacctt cagacagtgc aactcactac 180

aatcaaatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaatactagg 300

cacgacgagt cctggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 20

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL nucleotide acid sequence of anti-CXCL10 antibody

RA2

<400> 20

gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg cagagtcacc 60

atcacttgca aggcaagcca agacattcac aagtatatag cttggtacca acacaagcct 120

ggaaaaggtc ctagactgct catatatgac acatctacat tacagccagg catcccatca 180

aggttcactg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 240

gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgatgac tgtacacgtt cggagggggg 300

accaagctgg aaataaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatcc 345

<210> 21

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain VH nucleotide sequence of anti-CXCL10 antibody RG2

<400> 21

cagatccagt tggatgcagtc tggacctgac ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
tcctgcaagg ctctcgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct	120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgcctgg ataaacacca actctggaga gccaacatat	180
gctgaagagt tcaaggacg atttgccttg tctttggata cctctgccag cactgcctat	240
ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagatacacg	300
ggggaatttt ttacaatgg tagtagttac gtaagtact ggtacttcga tgtctggggc	360
gcaggggcca cggtcacctg ctccctca	387

<210> 22

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> light chain VL nucleotide acid sequence of anti-CXCL10 antibody
RG2

<400> 22

gacattgtgc tcacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc	60
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt tcactctggct atagtatat gcactgttac	120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccaa cctagaatct	180
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggtg tctgggtcag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga tcttcctgtg	300

acgttcggtg gaggcaccaa actggaaatc aaacgggctg atgtctgacc aactgtatcc	360
---	-----

<210> 23

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence comprising the intact N-terminus of human CXCL10

<400> 23

Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu

20	25
----	----

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> peptide sequence comprising the truncated N-terminus of human
CXCL10

<400> 24

Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro

1 5 10 15

Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu

20

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CXCL10 epitope

<400> 25

Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn

1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu

20

25

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CXCL10 epitope

<400> 26

Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro

1 5 10 15

Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu

20