



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월05일

(11) 등록번호 10-1591316

(24) 등록일자 2016년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01) C12N 5/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7014852

(22) 출원일자(국제) 2008년12월08일

심사청구일자 2013년11월28일

(85) 번역문제출일자 2010년07월05일

(65) 공개번호 10-2010-0097724

(43) 공개일자 2010년09월03일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2008/005011

(87) 국제공개번호 WO 2010/055366

국제공개일자 2010년05월20일

(30) 우선권주장

61/012,329 2007년12월07일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2007111714 A2*

US20070122413 A1

US20070172457 A1

WO2006105538 A2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

지모제넥티브, 인코포레이티드

미국 뉴저지 08543 프린스턴 루트 206 앤드 프로
빈스 라인 로드

(72) 발명자

재스퍼스, 스테판, 알.

미국 워싱턴 98026 에드몬즈 150 플레이스 사우스
웨스트 5829

릭슨, 마크, 더블유.

미국 워싱턴 98029 이사쿠아 248 플레이스 사우스
이스트 3724

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 14 항

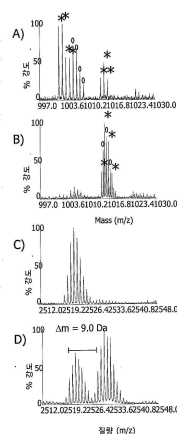
심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 항-사람 IL-21 단클론성 항체

(57) 요약

본 발명에서는 사람 항-사람 IL-21 단클론성 항체 및 그것을 생성하는 하이브리도마가 제공된다. 특정한 이들 항체는 고유한 사람 IL-21, 돌연변이 재조합 IL-21 단백질 및/또는 사람 IL-21의 펩티드 영역에 결합하는 능력을 가지고 있다. 이들 사람 항-IL-21 항체는 자가면역 및 염증성 질병, 특히 T 세포성 헬퍼 세포, B 세포, T_H 세포 또는 T_H17 세포에 의해 매개되는 질병의 치료적 처리에 유용하다.

대표도



(72) 발명자

딜론, 스테이지, 알.

미국 워싱턴 98115 시애틀 28 애비뉴 노스이스트
8057

람스펠, 프레드릭, 제이.

미국 워싱턴 98110 베인브리지 아일랜드 컨트리 뷰
레인 2205

크레사, 세실, 엠.

미국 워싱턴 98107 시애틀 9 애비뉴 노스웨스트
5216

이, 유진, 씨.

미국 워싱턴 98012 밀 크랙 3 드라이브 사우스이스트
15417

명세서

청구범위

청구항 1

사람 IL-21과 결합하는 분리된 항체, 또는 그것의 항원-결합 부분으로서,

I.

- (a) SEQ ID NO:31의 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR1;
 - (b) SEQ ID NO:33의 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR2;
 - (c) SEQ ID NO:35의 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR3;
- 및,
- (d) SEQ ID NO:39의 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR1;
 - (e) SEQ ID NO:41의 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR2;
 - (f) SEQ ID NO:43의 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는

II.

- (a) SEQ ID NO:47의 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR1;
 - (b) SEQ ID NO:49의 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR2;
 - (c) SEQ ID NO:51의 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역 CDR3;
- 및,
- (d) SEQ ID NO:55의 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR1;
 - (e) SEQ ID NO:57의 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR2;
 - (f) SEQ ID NO:59의 서열로 이루어진 경쇄 가변 영역 CDR3

을 포함하는 사람 IL-21과 결합하는 분리된 항체, 또는 그것의 항원-결합 부분.

청구항 2

제 1항에 있어서, (a) 중쇄는 SEQ ID NO:29의 아미노산 잔기 20 내지 145로 이루어지고, 경쇄는 SEQ ID NO:37의 아미노산 잔기 21 내지 126로 이루어지는, 또는 (b) 중쇄는 SEQ ID NO:45의 아미노산 잔기 20 내지 145로 이루어지고, 경쇄는 SEQ ID NO:53의 아미노산 잔기 21 내지 126로 이루어지는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 3

362.78.1.44 또는 362.597.3.15로 표시되는 하이브리도마로서, 하이브리도마는 각각 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 ATCC 특허 기탁 명칭 PTA-8790 또는 PTA-8786으로 기탁되어 있는 것을 특징으로 하는 하이브리도마.

청구항 4

제 3항의 하이브리도마에 의해 생성된 항체.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 항체의 Fc 부분은 이펙터 기능이 감소된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 항체의 Fc 부분은 IgG1 및 IgG4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는

항체.

청구항 7

제 1항, 제 2항 또는 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 크론씨병, 궤양성 대장염 및 염증성 장 증후군으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 염증성 장 질환(IBD)의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 8

제 1항, 제 2항 또는 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 류머티스성 관절염의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 9

제 1항, 제 2항 또는 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 다발성 경화증의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 10

제 1항, 제 2항 또는 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 타입 I 당뇨병(IDDM)의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 11

제 1항, 제 2항 또는 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 쇄그렌 증후군의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 12

제 1항, 제 2항 또는 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 체장염, 염증성 근육 질환(다발성 근염, 피부근염), 현미경적 다발성 동맥염, 자가면역 재생불량성 빈혈, 자가면역 갑상선염, 자가면역 간염, 베게너 증후군, 게실증, 강직성 척추염, 피부 경화증, 전신성 경화증, 건선성 관절염, 탈모증, 골관절염, 아토피성 피부염, 백반증, 이식편 대 숙주 질병(GVHD), 피부 T 세포 림프종(CTCL), 사구체신염, IgA 신병증, 고도로 민감한 이식환자, 항-인지질 증후군, 자가면역 포도막염 및 천식으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 자가면역 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 13

제 1항, 제 2항 또는 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 전신성 홍반성 낭창(SLE) 또는 건선의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 14

제 1항, 제 2항 또는 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 전신성 홍반성 낭창, 자가면역 난청, 그레이브스병, 심상성 천포창, 중증 근무력증, 시신경 척수염, Goodpasture 증후군, 자가면역 신염, 한랭글로불린혈증, 길랑-바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 자가면역 용혈성 빈혈, 및 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포성 헬퍼 세포-매개된 또는 B 세포-매개된 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

발명의 설명

배경 기술

[0001]

면역 시스템은 병원체, 즉 박테리아, 바이러스, 진균 등에 의해 유발된 질병뿐 아니라 신체 자체의 세포 및 조직 (즉 암성 종양)의 비정상적인 성장에 의해 유발된 질병에 대항하는 신체의 일차 방어이다. 정상적으로 면역 시스템은 신체의 정상 세포 또는 "자기"와 외래 병원균 또는 비정상 세포 또는 "비-자기" 사이를 구별할 수 있

다. 면역 시스템이 자기 자신의 신체에 반응하는 것을 삼가게 되는 과정은 내성으로 불린다. 때로 면역 시스템은 "자기"를 정상으로 인식하고 계속해서 조직 또는 세포에 대해 지시된 반응을 하는 능력을 손실하고, 그 결과 자가면역을 잃게 된다. 자가면역으로부터 유래하는 병리학은 자주 심각한 임상적 결과를 초래하며, 전 세계적으로, 특히 선진국에서 주요한 건강 문제 중 하나이다.

[0002]

IL-21은 IL-21R과 통상적인 감마 사슬로 구성된 이중이량체 수용체에 결합하는 강력한 면역조절성 4- α -나선 변형 I 사이토킨이다 (Spolski and Leonard, Annu Rev Immunol, Nov 8; 2007). IL-21은 NK-T 및 CD4+ T 세포 (배증심 반응에 중요한 전-염증성 Th17 세포 및 여포성 헬퍼 T_{FH} 세포를 포함한다)에 의해 생성되고, B 및 T 세포의 증강된 증식, CD8+ T 세포와 천연 킬러 (NK) 세포의 증가된 세포독성, B 세포의 면역글로불린-분비 형질 세포로의 분화, 및 Th17 세포 계통 (아래 참조)의 조절을 포함하여, 선천성 면역반응과 후천성 면역반응 둘 다에 다면 발현성 효과를 나타낸다. IL-21은 또한 수지상 세포의 항원-전달 기능을 억제할 수 있고, 특정 조건하에서는 B 세포와 NK 세포에서 아포토시스를 유도할 수 있다. IL-21은 강력한 항-종양 활성을 갖지만, 또한 전신성 홍반성 낭창 (SLE), 류머티스성 관절염 (RA), 염증성 장 질병 (IBD) 및 건선을 포함한 다양한 자가면역 질병의 발생과 관련된다 (Spolski and Leonard, Annu Rev Immunol, Nov. 8, 2007).

[0003]

IL-21은 B 세포에 직접 작용함으로써 항체 반응을 조절하는 것으로 밝혀졌다 (Mehta et al., J. Immunol., 170:4111-4118, 2003; Ozaki et al., Science, 298: 1630-1634, 2002; Suto et al., Blood, 100:4565-4573, 2002). IL-21은 미성숙한 사람 B세포의 항체-분비 형질 세포로의 분화를 유도할 수 있고 (Ozaki et al., J. Immunol., 173:5361, 2004; Ettinger et al., J Immunol., 175:7867-79, 2005; Ettinger et al., J Immunol., 128:2872-82, 2007; Kuchen et al., J Immunol., 179:5886-96, 2007), 사람 B 세포에서 IgE의 생성을 자극할 수 있다 (Kobayashi et al. Human Immunol. doi:10.1016/j.humimm.2008.10.). IL-21 또는 IL-21R 결핍 동물에서는 더 적은 수의 항체-분비 세포가 배증심 반응으로부터 생성되고 친화성 성숙은 감소된다 (Zotos et al., 생략). 자가면역에 포함된 여포외재성 항체 형성 세포는 IL-21을 분비하는 특수 CD4 T세포의 하위세트로부터의 동족성 도움을 필요로 한다 (Odegard, et al., JEM 205(12):2873-2886. 2008).

[0004]

동종이계의 MHC에 대한 항체의 생성은 이식 거부반응에서 중심적인 현상이다. 항-MHC 항체의 역가를 나타내는 이식 수용체 (고도로 민감한 이식 환자)는 만성 거부반응에 대한 t 위험이고, 새로운 이식의 항체 매개된 거부반응의 가능성으로 인해 새로운 이식편에 대한 불량한 후보이다 (Smith, et al., Am J Transplantation 8:1-11, 2008). 급성 신장 동종이식 거부반응에 대한 쥐 모델에서 IL-21 및 IL-21R은 신장 동종이식편의 혈관 내 단핵 세포에서 독특하게 증가되었지만, 동계이식편에서는 그렇지 않았다 (Hecker, et al., Immunobiology: doi: 10.1016/i.imbio.2008.04.004, (2008)). 거부반응을 보이는 사람 심장 이식에서, IL-21 및 IL-21R의 발현 수준은 ISHLT 거부반응 등급과 상관관계가 있으며, 가장 높은 수준의 발현은 등급 1R 및 2R에서 나타난다 (Baan, et al., Transplantation 83(11):1485-1492, 2007).

[0005]

이식편 대 숙주 질병 (GVHD)에서, 항-알로(allo) 반응은 숙주 조직에 대한 염증 반응을 지시하는, 이식편으로부터의 T 림프구의 조절되지 않은 활성화에 의해 매개된다. 조절성 T 세포 (Treg)는 이 반응을 동물 모델에서 매개할 수 있다. IL-21은 Treg의 조절성 기능을 방해하는 것으로 밝혀졌다 (Clough et al., J Immunol 180:5395-5401, 2008). GVHD의 마우스 모델에서, IL-21 결핍 T 세포의 전달은 WT T 세포와 비교하여 상당히 감소된 임상 신호 및 조직학적 기록과 증가된 생존을 초래한다. IFN-감마 분비 T 세포의 증가된 빈도와 증가된 Treg는 결장 점막에서 관찰되었다. 항-mIL-21 mAb 및 WT T 세포 전달을 사용한 IL-21 봉쇄는 유사한 결과를 유발한다 (Bucher et al., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008 112: Abstract #2342).

[0006]

또한 최근에는 IL-21이 마우스 전-염증성 Th17 세포에 의해 생성되고, 그 세포의 분화에 필요한 것으로 밝혀졌다 (Korn et al. Nature, 448:484-487, 2007; Nurieva et al. Nature 448:480-483, 2007; Zhou et al., Nat Immunol. 8:967-974, 2007; Wei et al. J Biol Chem. 282:34605-34610, 2007). 사람 Th17 세포는 또한 IL-21을 생성하고, IL-21이 마우스 Th17 세포에 대해 그런 것처럼, 사람 Th17 세포에 대한 자가분비 인자로서 작용하는지의 여부를 측정하기 위한 연구가 진행 중이다. 오자키 등은 IL-21 발현이 자가면역 프로세스의 초기 특성이 처음으로 명백하게 나타내는 나이에, 전신성 홍반성 낭창 (SLE)에 대한 모델인 낭창-경향성 BXSB-Yaa 마우스에서 상승된다는 것을 증명하였다 (Ozaki et al. J. Immunol., 173:5361, 2004). 가용성 마우스 IL-21 수용체 (mIL-21R-Fc)를 사용하여 이들 BXSB-Yaa 마우스를 처리하는 것은 사구체 신염을 포함하여, 다양한 질병 매개변수를 부분적으로 억제한다 (Bubier et al., Ann N Y Acad Sci. 1110:590-601. 2007). mIL-21R-Fc를 사용한 처리는 또한 SLE의 다른 전-임상 질병 모델, MRL/lpr 마우스 (Herber et al. J. Immunol., 178:3822-3830, 2007)에서뿐 아니라, 류머티스성 관절염의 콜라겐-유도 관절염 (CIA) 모델에서 (Young et al., Arthr Rheum

56:1152-1 163, 2007) 효과적인 것으로 나타났다. 예비 사람 데이터는 또한 SLE에서의 IL-21 및 IL-21R의 조절 장애를 시사한다 (Mitoma et al., Int. J. Mol. Med., 16:609-615, 2005; Wang et al., Chinese J. Cell. Mol. Immunol., 23(11):1041-1042, 2007; Sawalha et al., Ann Rheum Dis 67:458-461, 2008). 보다 최근에는, Rus 등이 24명의 SLE 환자 및 15명의 건강한 대조표준으로부터 데이터를 얻었다 (Nguyen et al., ACR/ARHP Scientific Meeting, 1760/482, 2008 Oct 24-29 San Francisco, CA). Rus 등은 1) IL-21 mRNA 발현은 대조표준에 비교하여 낭창 환자로부터의 CD4+ T 세포에서 상당히 증가되고, 2) IL-21 수준은 비활성 SLE 또는 대조표준과 비교하여 활성 환자로부터 얻어진 혈청에서 상당히 상승되며, 3) IL-21은 용량 의존성 방식으로 환자 및 대조표준에서 CD4+ T 세포 및 CD19+ B 세포 증식을 증강시키고, 4) IL-21은 정상적인 대조표준 및 SLE 환자에서 항-CD40 유도된 혈장 세포 분화를 증강시키며, 그리고 5) IL-21의 상승된 수준은 SLE에서 자가반응성 CD4+ T 세포의 증식 및 혈장 세포 분화에 기여할 수 있음을 밝혀냈다.

[0007]

몬텔레온 등은 IL-21 RNA 및 단백질 발현이 크론씨병 (CD) (및, 어느 정도까지는 궤양성 대장염) 환자로부터의 염증이 생기지 않은 조직이 아닌 염증이 생긴 조직에서 증가되고, CD 환자로부터의 고유관 단핵 세포로부터의 CD3+ 세포에 의한 IL-21 생성은 또한 증가된다는 것을 증명하였다 (Monteleone et al., Gastroenterology 128:687-694, 2005; Monteleone et al., Gut 55:1774-1780, 2006; Peluso et al., J Immunol 178:732-739, 2007). 상기 참고문헌의 저자들은 IL-21이 조절성 T 세포 (Treg)와 Th17 세포 사이의 균형을 조절함으로써 실험성 대장염을 조절한다고 제안하였다 (Fantini et al., Eur. J. Immunol., 37:3155-3163, 2007). 대장염의 마우스 또는 쥐 모델에서 가용성 IL-21 수용체를 사용하여 생체 내에서 IL-21을 억제하는 것은 대장염의 임상적 신호의 상당한 감소를 유발한다 (Young et al., US 2006/0039902).

[0008]

IL-21 수용체는 NK 세포에 의해 발현되고, NK 세포는 생체 내에서는 시험관 내에서 IL-21을 사용한 처리에 반응하는 것으로 나타났다. 종양학에서 재조합 사람 IL-21로 처리된 환자들은 NK 세포를 포함하여 림프구 하위세트에서 재순환 패턴이 달라졌고, NK 세포 활성화 및 세포용해성 이펙터 용량의 마커의 발현이 증가되는 것이 관찰되었다 (Frederiksen, et al., Cancer Immunol Immunother 57(10):1439-1449, 2008). 자가면역 질병에서, NK 세포 활성화는 염증 및 관련된 조직 손상을 촉진하는 데 역할을 할 수 있다. NK 세포의 조직 귀소성은 염증 부위에서 방출된 화학유인물질에 의해 지시된다 (Morris and Ley, Curr Mol Med., 4(4):431-8, 2004). 크론씨병 환자로부터의 고유관 NK 세포는 시험관 내에서 IL-21 및 IgG로 자극될 때, 대조표준의 LPNK 세포와 비교하여 더 많은 양의 IFN- γ 및 TNF- α 를 방출하였다 (Liu and Jiu, Chronic Inflammation of Liver and Gut, Falk Symposium abst. No. 163, 2008 Mar 14-15). NK 세포는 또한 수지상 세포 (DC)와의 상호작용을 통해, 미성숙한 또는 활성화된 DC를 죽임으로써, 그리고 DC의 활성화 상태 및 항원 전달 기능에 영향을 미치는 사이토키ンを 방출함으로써 자가면역성 및 이식 거부반응을 조절하는 것으로 보고된다 (Vivier et al., Nat Immunol 9(5):503-510, 2008; Laffont et al., Blood 112:661-671, 2008). 내성 및 비-내성 간 동종이식편 수용체로부터의 말초 혈 단핵 세포의 비교는 NK세포의 전사 프로그램의 변화를 나타냈다 (Martinez-Llordella et al., J Clin Invest 118(8):2845-2857, 2008). 그러므로 IL-21의 차단은 NK 세포의 활성화 상태를 조절할 수 있고, 자가면역 질병에서 조직 염증에 기여하는 것을 감소시킬 수 있으며, 이식 거부반응의 임상적 경과를 변경시킬 수 있다. NK 세포는 또한 수지상 세포 (DC)와의 상호작용을 통해, 미성숙한 또는 활성화된 DC를 죽임으로써, 및 DC의 활성화 상태에 영향을 미치고 항원 전달 기능을 변경시키는 사이토키ンを 방출함으로써 자가면역성 및 이식 거부반응을 조절하는 것으로 보고된다. 그러므로 IL-21의 차단은 NK 세포의 활성화를 조절할 수 있고, 자가면역 질병에서 조직 염증에 대한 기여도를 감소시킬 수 있다.

[0009]

본 발명은 항-사람 IL-21 단클론성 항체 및 자가면역 및 염증성 질환으로서 나타나고 IL-21/IL-21 수용체 상호작용과 관련된 증상 및 생물학적 활성을 억제하는 그런 항체를 사용하는 방법을 제공한다.

발명의 내용

[0010]

발명의 간단한 설명

[0011]

한 측면으로 본 발명은 SEQ ID NO:29의 아미노산 잔기 20 내지 145에 대한 최소한 80%의 동일성과 SEQ ID NO:37의 아미노산 잔기 21 내지 126에 대한 최소한 80%의 동일성을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 특정 구체예에서, 항체는 SEQ ID NO:31의 중쇄 가변 영역에서의 최소한 80%의 동일성의 변화를 포함한다.

[0012]

다른 측면으로 본 발명은 (a) (i) SEQ ID NO:31을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:33을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:35을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 중쇄 영역과 (b) (i) SEQ ID NO:39를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:41을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

(iii) SEQ ID NO:43을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 경쇄 영역을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:29의 아미노산 잔기 20 내지 145와 SEQ ID NO:37의 아미노산 잔기 21 내지 126을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 다른 구체예에서, 항체는 추가로 SEQ ID NO:29의 아미노산 잔기 1 내지 145와 SEQ ID NO:37의 아미노산 잔기 1 내지 126을 포함한다. 본 발명의 다른 구체예는 362.78.1.44로 표시되는 하이브리도마를 제공하는데, 이 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 ATCC 특허 기탁 명칭 PTA-8790으로 기탁되고, 본 발명은 이 하이브리도마에 의해 생성된 항체를 포함한다.

[0013]

본 발명의 다른 측면은 (a) (i) SEQ ID NO:47을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:49를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:51을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 중쇄 영역과 (b) (i) SEQ ID NO:55를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:57을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:59를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 경쇄 영역을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:45의 아미노산 잔기 20 내지 145와 SEQ ID NO:53의 아미노산 잔기 21 내지 126을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 다른 구체예에서, 발명은 추가로 SEQ ID NO:45의 아미노산 잔기 1 내지 145와 SEQ ID NO:53의 아미노산 잔기 21 내지 126을 포함한다. 본 발명의 다른 구체예는 362.597.3으로 표시되는 하이브리도마를 제공하는데, 이 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 ATCC 특허 기탁 명칭 PTA-8786으로 기탁되고, 본 발명은 이 하이브리도마에 의해 생성된 항체를 포함한다.

[0014]

다른 측면으로 본 발명은 SEQ ID NO:13의 아미노산 잔기 20 내지 141에 대해 최소한 80%의 동일성과 SEQ ID NO:21의 아미노산 잔기 21 내지 126에 대해 최소한 80%의 동일성을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 한 구체예에서, 본 발명은 모든 아미노산 변화가 보존성 아미노산 변화인 단클론성 항체를 포함한다.

[0015]

다른 측면으로, 본 발명은 (a) (i) SEQ ID NO:15를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:17을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:19를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 중쇄 영역과 (b) (i) SEQ ID NO:23을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:25를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:27을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 경쇄 영역을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:13의 아미노산 잔기 20 내지 141과 SEQ ID NO:21의 아미노산 잔기 21 내지 126을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 다른 구체예에서, 발명은 추가로 SEQ ID NO:13의 아미노산 잔기 1 내지 141과 SEQ ID NO:21의 아미노산 잔기 1 내지 126을 포함한다. 본 발명의 다른 구체예는 362.75.1.1로 표시되고, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 ATCC 특허 기탁 명칭 PTA-8791로 기탁된 하이브리도마, 및 이 하이브리도마에 의해 생성된 항체를 제공한다.

[0016]

또 다른 측면으로, 본 발명은 (a) (i) SEQ ID NO:79를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:81을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:83을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 중쇄 영역과 (b) (i) SEQ ID NO:87을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:89를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:91을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 경쇄 영역을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:77의 아미노산 잔기 20 내지 136과 SEQ ID NO:85의 아미노산 잔기 23 내지 129를 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 다른 구체예에서, 발명은 추가로 SEQ ID NO:77의 아미노산 잔기 1 내지 136과 SEQ ID NO:85의 아미노산 잔기 1 내지 129를 포함한다. 본 발명의 다른 구체예는 366.552.11로 표시되고, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 ATCC 특허 기탁 명칭 PTA-8787로 기탁된 하이브리도마, 및 이 하이브리도마에 의해 생성된 항체를 제공한다.

[0017]

또 다른 측면으로, 본 발명은 (a) (i) SEQ ID NO:63을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:65를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:67을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 중쇄 영역과 (b) (i) SEQ ID NO:71을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; (ii) SEQ ID NO:73을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 (iii) SEQ ID NO:75를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 경쇄 영역을 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 특정 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:61의 아미노산 잔기 20 내지 139와 SEQ ID NO:69의 아미노산 잔기 23 내지 129를 포함하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 제공한다. 다른 구체예에서, 발명은 추가로 SEQ ID NO:61의 아미노산 잔기 1 내지 139와 SEQ ID NO:69의 아미노산 잔기 1 내지 129를 포함한다. 본 발명의 다른 구체예는 366.328.10으로 표시되고, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 ATCC 특허 기탁 명칭 PTA-8789로 기탁된 하이브리도마, 및 이 하이브리도마에 의해 생성된 항체를 제공한다.

[0018]

다른 측면으로 본 발명은 366.345.6.11으로 표시되고, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 ATCC 특허 기탁 명칭 PTA-

8788로 기탁된 하이브리도마, 및 이 하이브리도마에 의해 생성된 항체를 제공한다.

- [0019] 본 발명의 또 다른 측면으로, 본 발명은 IL-21 단백질 상의 최소한 두 영역을 포함하는 불연속 에피토프에 결합하는 분리된 단클론성 항체를 제공하며, 상기 두 영역중 첫 번째 영역은 SEQ ID NO:2의 잔기 Ile45에서 잔기 Leu56의 아미노산으로 구성되고, 두 번째 영역은 SEQ ID NO:2의 잔기 Glu129에서 잔기 Leu144의 아미노산으로 구성된다. 한 구체예에서, 본 발명은 SEQ ID NO:2의 잔기 Ile45에서 잔기 Leu56의 아미노산으로 구성되는 첫 번째 영역과, SEQ ID NO:2의 잔기 Glu129에서 잔기 Leu144의 아미노산으로 구성되는 두 번째 영역을 제공한다.
- [0020] 상기에서 설명된 발명의 각각의 측면에는 단클론성 항체가 추가로 Fc 부분을 포함하는 구체예와, Fc 부분이 IgG1, IgG2 및 IgG4로 이루어지는 군으로부터 선택되고, Fc 부분은 감소된 이펙터 기능을 가지는 구체예가 포함된다.
- [0021] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에서 설명되는 특허청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 T 세포성 헬퍼 세포-매개된 또는 B 세포-매개된 질병을 치료하는 방법을 제공하는데, 이때 T 세포성 헬퍼 세포-매개된 또는 B 세포-매개된 질병은 전신성 홍반성 낭창, 자가면역 난청, 그레이브스병, 심상성 천포창, 중증 근무력증, 시신경 척수염, Goodpasture 증후군, 자가면역 신염, 한랭글로불린혈증, 길랑-바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증 (CIDP), 자가면역 용혈성 빈혈, 및 특발성 혈소판 감소성 자반증 (ITP)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0022] 다른 측면으로 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 TH1 세포-매개된 또는 TH17 세포-매개된 질병을 치료하는 방법을 제공하는데, 이때 TH1 세포-매개된 또는 TH17 세포-매개된 질병은 건선, 척추관절염, 반응성 관절염, 장질환성 관절염, 자가면역 심근염, 가와사키병, 만성 소화 장애증, 포도막염, 베타트병, 관상 동맥 질병, 만성 폐색성 폐질환 (COPD), 및 간질성 폐질환으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0023] 다른 측면으로 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 염증성 장 질병 (IBD)을 치료하는 방법을 제공하는데, 이때 염증성 장 질병은 크론씨병, 궤양성 대장염 및 과민성 대장증후군으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0024] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 류머티스성 관절염을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0025] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 다발성 경화증을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0026] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 제 I 유형 당뇨병 (IDDM)을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0027] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 쇄골 증후군을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0028] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 이식 거부반응을 치료하는 방법을 제공하는데, 이때 이식 거부반응은 억제되며, 이식 치료 처방 전 내성이 설정되거나 대상의 알로항체 역가가 감소한다.
- [0029] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 자가면역 질병을 치료하는 방법을 제공하는데, 이때 자가면역 질병은 췌장염, 염증성 근육 질병 (다발성 근염, 피부근염), 현미경적 다발성 동맥염, 자가면역 재생불량성 빈혈, 자가면역 갑상선염, 자가면역 간염, 베게너 증후군, 게실증, 강직성 척추염, 피부 경화증, 전신성 경화증, 건선성 관절염, 골관절염, 아토피성 피부염, 백반증, 이식편 대 숙주 질병 (GVHD), 피부 T 세포 림프종 (CTCL), 사구체신염, IgA 신병증, 고도로 민감한 이식 환자, 항-인지질 증후군, 및 천식, 및 다른 자가면역 질병, 또는 IL-21 및 IL-21 수용체 아고니스트에 의해 매개된 다른 질병으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0030] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 전신성 홍반성 낭창 (SLE)을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0031] 다른 측면으로, 본 발명은 본원에서 설명되는 청구되는 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 치료적 양을 투여함으로써 대상의 건선을 치료하는 방법을 제공한다.

- [0032] **발명의 설명**
- [0033] 본원에 설명된 발명의 이해를 촉진하기 위하여 다음의 정의를 제공한다.
- [0034] 본원에서 사용되는 용어 "아미노-말단" 및 "카르복실-말단"은 폴리펩티드 내에서의 위치를 규정하기 위해 사용된다. 매락이 허용하는 한 이들 용어는 근접성 또는 상대적인 위치를 표시하기 위해 폴리펩티드의 특정 서열 또는 부분을 참조로 하여 사용된다. 예를 들어 폴리펩티드 내의 참조 서열에 대해 카르복실-말단에 위치한 특정 서열은 참조 서열의 카르복실 말단에 아주 가깝게 위치하지만, 반드시 완전한 폴리펩티드의 카르복실 말단에 있는 것은 아니다.
- [0035] 용어 "길항체"는 다른 분자의 활성, 활성화 또는 기능을 감소시키는 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 항체, 항체 단편, 큰 분자, 또는 작은 분자 (10kD 미만)를 포함하여 모든 화합물을 말한다. IL-21 길항체는 다음 중 적어도 한 가지를 유발한다: NK 세포, 수지상 세포, T 세포 하위세트 및 B 세포 하위세트의 감소된 면역기능; IL-21 단백질과 그것의 수용체와의 상호작용이 차단되고, 억제되고, 감소되고, 또는 중화되도록 IL-21과 결합한다.
- [0036] "항체" (Ab) 및 "면역글로불린" (Ig)은 동일한 구조적 특성을 가지는 당단백질이다. 항체가 특이한 항원에 대한 결합 특이성을 나타내는 반면, 면역글로불린은 항체와 항원 특이성이 결핍된 다른 항체-유사 분자 둘 다를 포함한다. 후자의 폴리펩티드는 예를 들면 림프 시스템에 의해 저수준에서, 그리고 골수종에 의해 증가된 수준에서 생성된다. 그러므로 본원에서 사용되는 용어 "항체" 또는 "항체 펩티드(들)"은 무상 항체, 또는 특이적 결합에 대해 무상 항체와 결합하는 그것의 결합 단편을 나타내고, 예를 들면 키메라, 인간화된, 전체 사람, 및 이중특이적 항체를 포함한다. 특정 구체예에서, 결합 단편은 재조합 DNA 기법에 의해 제조된다. 추가의 구체예에서, 결합 단편은 무상 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 제조된다. 결합 단편의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 및 단일 사슬 항체, ScFv를 포함한다. "천연 항체 및 면역글로불린"은 통상 약 150,000 달톤의 이중사슬 당단백질이고, 두 개의 동일한 경쇄 (L)와 두 개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된다. 각각의 경쇄는 중쇄에 하나의 공유 이황화 결합에 의해 연결되는 한편, 이황화-연쇄의 수는 상이한 면역글로불린 이소타입의 중쇄들 사이에서 달라진다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 배치된 사슬내 이황화 가교를 가진다. 각 중쇄는 한쪽 단부에 가변 도메인 (VH)과 계속해서 많은 수의 불변 도메인을 가진다. 각 경쇄는 한쪽 단부에 가변 도메인 (VL)과 다른 쪽 단부에 불변 도메인을 가지는데, 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인과 일렬 배열되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 일렬 배열된다. 특별한 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다 (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 186:651 (1985); Novotny and Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4592 (1985)).
- [0037] 용어 "키메라 항체" 또는 "키메라 항체들"은 그것의 경쇄 및 중쇄 유전자가 전형적으로 유전자 공학에 의해, 상이한 종에 속하는 면역글로불린 가변 및 불변 영역 유전자들로부터 구성된 것을 의미한다. 예를 들어 마우스 단클론성 항체에서 유래하는 유전자의 가변 절편은 사람 불변 절편, 예컨대 감마 1 및 감마 3에 결합될 수 있다. 따라서 전형적인 치료용 키메라 항체는 마우스 항체로부터 유래한 가변 또는 항원-결합 도메인과 사람 항체로부터 유래한 불변 도메인으로 구성되는 하이브리드 단백질이며, 이때 다른 포유류 종이 사용될 수 있다. 구체적으로 키메라 항체는 면역글로불린 경쇄, 중쇄, 또는 둘 다의 힌지 및 불변 영역의 전부 또는 일부가 다른 동물의 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄로부터의 상응하는 영역에 대해 치환되어 있는 재조합 DNA 기법에 의해 제조된다. 이런 방식으로 원래의 단클론성 항체의 항원-결합 부분이 다른 종의 항체의 골격으로 이식된다.
- [0038] 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 단백질 결정기를 말한다. 에피토프 결정기는 통상 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹으로 구성되고, 보통 특이한 3차원 구조 특성과, 특이한 전하 특성을 가진다. 보다 구체적으로 본원에서 사용되는 용어 "IL-21 에피토프"는 동물, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 마우스 또는 사람에서 항원성 또는 면역원성 활성을 가지는 IL-21의 일부를 나타낸다. 면역원성 활성을 가지는 에피토프는 동물에서 항체 반응을 유도하는 IL-21 폴리펩티드의 부분이다. 항원성 활성을 가지는 에피토프는 당해 기술분야에 잘 알려져 있는 어떠한 방법에 의해 서든지, 예를 들면 면역분석에 의해 측정되는 바, 그것에 항체가 면역특이적으로 결합하게 되는 IL-21 폴리펩티드의 부분이다. "불연속 에피토프"는 IL-21 단백질의 일차 서열에 있는 최소한 두 개의 별도의 영역으로부터 형성된 형태적 에피토프이다. 형태적 에피토프는 변성 용매의 존재하에 (예컨대 웨스턴 블롯 분석시에) 특이적으로 결합하는 능력을 잃게 된다.
- [0039] 본 발명은 IL-21 단백질 및 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체 및 항체 단편을 제공한다. 폴리펩티드를 코드화하는 사람 및 마우스 IL-21 폴리펩티드, 단백질 및 폴리뉴클레오티드는 문헌에 설명되어 있다

(Parrish-Novak et al., *Nature* 408:57-63, 2003; 미국 특허 6,307,024호 및 6,686,178호; 및 7,250,274호). 본원에서는 치료적 단클론성 항체에 대한 표적으로서 확인된 바 있는 사람 IL-21 단백질의 영역 (에피토프)을 규정하는 구조적 및 기능적 특성이 설명된다. 예시적인 사람 항-사람 IL-21 단클론성 항체가 제공된다. 이들 항체 중 어떤 것들은 고유한 사람 IL-21, 재조합 야생형 사람 IL-21, 재조합 돌연변이 IL-21 단백질 및/또는 사람 IL-21의 펩티드 영역에 결합하는 능력을 가진다.

[0040]

본 발명은 자가면역 및 염증성 질병의 치료적 처리에 유용한 항-IL-21 항체를 제공한다. 예를 들어 항-IL-21 항체는 다음과 같은 질병의 치료에 유용하다: 건선, 궤양성 대장염, 유형 I 당뇨병 (IDDM), 그레이브스병, 염증성 장 질환 (IBD), 크론씨병, 궤양성 대장염, 과민성 대장 증후군, 다발성 경화증, 류머티스성 관절염, 반응성 관절염, 장질환성 관절염, 척추관절증, 자가면역 심근염, 가와사키병, 만성 소화 장애증, 포도막염, 베체트병, 관상 동맥 질환, 만성 폐색성 폐질환 (COPD), 간질성 폐질환, 염증성 근육 질환 (다발성 근염, 피부근염), 현미경적 다발성 동맥염, 자가면역 재생불량성 빈혈, 자가면역 갑상선염, 자가면역 간염, 베게너 증후군, 게실증, 전신성 홍반성 낭창, 강직성 척추염, 피부 경화증, 전신성 경화증, 건선성 관절염, 골관절염, 아토피성 피부염, 백반증, 이식편 대 숙주 질환 (GVHD), 피부 T 세포 림프종 (CTCL), 쇄골 증후군, 사구체신염, IgA 신병증, 자가면역 신증, 심상성천포창, 중증 근무력증, 자가면역 난청, 시신경 척수염, Goodpasture 증후군, 한랭글로불린 혈증, 길랑-바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발성경병증 (CIDP), 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판 감소성 자반증 (ITP), 이식 거부반응, 고도로 민감한 이식 환자, 항-인지질 증후군, 알레르기, 및 천식, 및 다른 자가면역 질환, 또는 IL-21 및 IL-21 수용체 아고니스트에 의해 매개된 다른 질병.

[0041]

면역글로불린의 5가지 부류, 즉 IgG, IgA, IgM, IgD, 및 IgE는 고등 척추동물에서 확인되었다. IgG, IgD, 및 IgE 단백질은 두 개의 동일한 중쇄와 두 개의 동일한 경쇄로 이루어진 특징적으로 이황화 연결된 이종사량체이다. 전형적으로 IgM은 사량체의 5량체로서 발견되는 한편, IgA는 사량체의 이량체로서 발견된다. 변형은 면역글로불린 부분에 도입될 수 있다.

[0042]

IgG는 정상적으로 혈장에서 발견되는 두 번째로 가장 풍부한 단백질로서 존재하기 때문에 주요 부류를 포함한다. 사람에서 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 표시된 4개의 하위 부류로 구성된다. 각각의 면역글로불린 중쇄는 주어진 하위부류에 대해 변하지 않는 불변 영역 단백질 도메인 (C_H1, 힌지, C_H2, 및 C_H3)으로 구성되는 불변 영역을 포함한다. IgG 부류의 중쇄 불변 영역은 그리스어 부호로 확인된다. 예를 들어 IgG1 하위 부류의 면역글로불린은 하나의 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[0043]

Fc 단편, 또는 Fc 도메인은 이황화 연결된 중쇄 힌지 영역, C_H2, 및 C_H3 도메인으로 구성된다. 면역글로불린 융합 단백질에서 IgG1 하위부류의 Fc 도메인은 자주 면역글로불린 부분으로서 사용되는데, IgG1이 혈청 단백질 중 어느 것보다 가장 긴 혈청내 반감기를 가지고 있기 때문이다. 너무 긴 혈청 내 반감기는 동물 연구 및 잠재적인 사람 치료 용도에 대해 바람직한 단백질 특성일 수 있다. 또한 IgG1 하위부류는 가장 강력하게 항체 매개된 이펙터 기능을 수행할 수 있는 능력을 가지고 있다. 면역글로불린 기능 단백질에서 가장 유용할 것 같은 일차 이펙터 기능은 IgG1 항체가 항체 의존성 세포의 세포독성을 매개하는 능력이다. 다른 한편으로 이것은 주로 길항체로서 기능하는 융합 단백질에 대해서는 바람직하지 않은 기능이 될 수 있다. IgG1 하위 부류의 항체 불변 영역-매개된 활성화에 중요한 특이한 아미노산 잔기가 여러 개 확인되었다. 그러므로 이들 특이한 아미노산의 포함 또는 배제는 특이한 면역글로불린 불변 영역-매개된 활성화의 포함 또는 배제를 가능하게 한다 (미국 특허 5,648,260호, 5,624,821호).

[0044]

변형된 사람 IgG1 Fc는 Fc 융합 단백질을 생성하기 위해 제조되었다. 예를 들어 FcγRI 결합 및 보체 C1q 결합을 감소시킴으로써 Fc에 의해 매개되는 이펙터 기능을 감소시키기 위한 Fc4, Fc5, 및 Fc6 돌연변이는 미국 특허 출원 2006-0034852에 설명되어 있다. 구체적으로 설명하자면, 세 개의 아미노산 치환이 FcγRI 결합을 감소시키기 위해 도입되었다. 이것들은 EU 색인 위치 234, 235, 및 237에서의 치환이다. 이들 위치에서의 치환으로 FcγRI에 대한 결합이 감소되는 것으로 나타났다 (Duncan et al., *Nature* 332:563 (1988)). 이들 아미노산 치환은 또한 FcγRIIa 결합과, 뿐만 아니라 FcγRIII 결합도 감소시킬 수 있다 (Sondermann et al., *Nature* 406:267 (2000); Wines et al., *J. Immunol.* 164:5313 (2000)). 이들 돌연변이는 세포이물흡수 재순환 경로를 통하여 IgG를 회복시킴으로써 긴 혈청 반감기를 촉진하는 FcRn에 대한 결합을 변경시키지는 않는다.

[0045]

보체 C1q 결합 및 계속되는 보체 고정에 있어서 EU 색인 위치 330과 331의 관련성에 대해 여러 연구 그룹이 설명한 바 있다 (Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483 (1991); Tao et al., *J. Exp. Med.* 128:661 (1993)). 이들 위치에서의 아미노산 치환은 보체 고정을 감소시키기 위하여 Fc4에 도입되었다. Fc4의 C_H3 도메

인은 중지 코돈을 제외하면, 클론된 DNA가 대장균의 dam 플러스 균주에서 성장할 때 잠재적인 dam 메틸화 부위를 제거하기 위해 TGA로부터 TAA로 바뀐, 상응하는 야생형 폴리펩티드에서 발견된 것과 동일하다. Fc5에서는, EU 색인 위치 218에 있는 아르기닌 잔기는 리신이고, Fc5 서열의 나머지는 Fc4에 대한 상기 설명과 매치된다.

[0046] 본 발명은 또한 상기 설명된 항체에 기능적으로 동등한 유전적으로 변경된 항체를 포함한다. 개선된 안정성 및/또는 치료적 효능을 제공하는 변형된 항체가 바람직하다. 변형된 항체의 실례로는 아미노산 잔기의 보존성 치환이 이루어진 항체, 및 항원 결합 활용성을 유의미하게 해롭게 변경시키지 않는 아미노산의 하나 또는 그 이상의 결실 또는 첨가가 이루어진 항체가 있다. 치환은 치료적 활용성이 유지되는 한 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 바꾸거나 변형시키는 것으로부터 한 영역을 완전히 재디자인하는 것에 이르기까지 다양할 수 있다. 본 발명의 항체는 번역 후에 변형되거나 (예컨대 아세틸화, 및 인산화) 합성에 의해 변형될 수 있다 (예컨대 표지화 기의 부착).

[0047] 본 발명의 항체는 그것들이 인지하거나 특이하게 결합하는 본 발명의 IL-21 폴리펩티드의 에피토프(들) 또는 부분(들)과 관련하여 설명되거나 명시될 수 있다. 에피토프(들) 또는 폴리펩티드 부분(들)은 본원에서 설명되는 것과 같이, 예컨대 N-말단 및 C-말단 위치에 의해, 또는 연속적인 아미노산 잔기에서 크기에 의해 명시될 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 그것들의 교차반응성의 관점에서 설명되거나 명시될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 어떠한 다른 유사체, 오르토토크(ortholog), 또는 동족체에 결합하지 않는 항체도 포함된다.

[0048] 에피토프 뭉치(뭉음ning)는 IL-21 단백질에 동시에 결합할 수 있거나 결합할 수 없음으로써 단백질 상의 동일한 또는 중첩하는 에피토프에 결합하는 항체를 확인할 수 있거나 없는 항체의 쌍을 확인하기 위해 경합 결합 분석을 사용하는 것을 말한다. 동일하거나 중첩하는 결합 특이성을 가지고 있는 항체 (또는 뭉음)의 패밀리리는 그런 다음 IL-21 상의 특이한 에피토프를 규정하는 것을 보조하기 위해 사용될 수 있다. 에피토프 뭉치 실험은 항원적으로 구별되는 에피토프가 존재한다는 증거를 제공한다. 그러나 저절로 그것들은 IL-21 단백질 분자상의 특이한 아미노산 서열 또는 위치에 대해 에피토프를 확인하거나 또는 "지도화"하지 않는다.

[0049] 결합에 대한 경합은 항체 또는 단편의 어떠한 쌍에 대해 평가될 수 있다. 예를 들어 적절한 검출 시약을 사용하여 어떠한 중/공급원으로부터의 항체의 결합 특이성 또는 단편 결합은 본원에 기술된 단클론성 항체의 결합 특이성에 비교될 수 있다. 에피토프 뭉치는 "분리된 항체" 또는 세포 배양 상층액을 사용하여 수행될 수 있다. 뭉치는 자주 나중의 개발을 위한 클론의 선택을 안내하기 위해 첫 번째 회기의 클론성 상층액을 사용하여 수행된다. 비교될 항체는 실질적으로 동질적인 항원 결합 도메인을 가져야 한다. "이중특이적" 또는 "이중기능적인" 항체의 경우, 두 개의 상이한 결합 부위의 결합 특이성은 독립적으로 평가되거나 뭉을 필요가 있다.

[0050] 본 발명은 리간드-특이적 항체를 특징으로 한다. 항체의 경합성 결합 외에, 에피토프 뭉치는 또한 리간드의 그것의 수용체에 대한 결합 또는 그것의 수용체의 리간드 매개된 활성화를 경합적으로 간섭하는 수용체 또는 리간드에 대한 항체를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 자주 항체의 패밀리 (또는 뭉음)의 바람직한 특성은 에피토프 빈에 의해 규정된 특이한 에피토프에 대한 결합과 상관관계가 있을 수 있다.

[0051] 경합 결합 실험은 결합 친화성을 직접 측정하지는 않지만, 시험하고자 하는 항체는 경합제로서 작용하기 위해 충분히 강력하게 결합해야 한다. 일반적으로 실험 조건은 결합 친화성에서의 차이의 효과를 최소화하기 위해 디자인된다.

[0052] 항-IL-21 항체는 또한 IL-21 단백질에 대한 진단 분석, 예컨대 특이한 세포, 조직, 또는 혈청에서 그것의 발현을 검출하는 데 유용할 수 있다. 상이한 빈에 대해 승인되고 IL-21의 상이한 면역원성 부분, 또는 에피토프에 결합할 수 있는 항체는 샌드위치 분석에 대한 시약으로서 사용될 수 있다. 샌드위치 분석에서 시험 샘플 분석물은 고체 지지체 상에 고정된 첫 번째 항체에 의해 포획된 후, 또한 분석물에 결합하는 두 번째 항체에 의해 검출되고, 그로써 불용성 3-부분 복합체를 형성한다 (미국 특허 4,376,110호 참조). 두 번째 항체는 그 자체로서 검출가능한 부분으로 표지되거나 (직접 샌드위치 분석) 또는 검출가능한 부분으로 표지되는 항-면역글로불린 항체를 사용하여 측정될 수 있다 (간접 샌드위치 분석). 예를 들어 한 유형의 샌드위치 분석은 ELISA 분석이고, 이 경우 검출가능한 부분은 효소이다.

[0053] 본 발명의 항체는 당해 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 방법에 의해서든지 특이한 결합에 대해 분석될 수 있다. 상이한 많은 경합 결합 분석 포맷(들)은 에피토프 뭉치에 대해 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 면역분석은, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 몇 가지 예를 들면 웨스턴 블롯과 같은 기법을 사용하는 경합성 및 비-경합성 분석 시스템, 방사성 면역분석, ELISA (효소 결합 면역흡착 분석), "샌드위치" 면역분석, 면역침전 분석, 침전소 반응, 겔 확산 침전소 반응, 면역확산 분석, 응집반응 분석, 보체-고정 분석, 면역방사 정량

분석, 형광 면역분석, 단백질 A 면역분석이 이다. 그러한 분석법들은 기본적인 것이고 당해 기술분야에 잘 알려져 있다 (Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). 예시적인 면역분석은 아래에서 간단하게 설명된다 (제한하려는 의도는 아니다). 추가로, 문헌에 설명되는 것과 같은 기본적인 교차-차단 분석이 수행될 수 있다 (in Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)).

[0054]

BIACORE[®] (GE Healthcare, Piscataway, NJ)는 단클론성 항체들의 에피토프 빈 패널에 대해 기본적으로 사용되는 다양한 표면 플라즈몬 공명 분석 포맷의 유일한 한 가지이다. 많은 참고문헌들 (예컨대 The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 66 Glenn E. Morris ed. Humana Press, 1996)은 항체를 묶기 위해 사용될 수 있고 IL-21 단백질에 대한 항체의 결합 특이성에 관한 비교할만한 정보를 제공하기 위해 예상될 수 있는 대체 방법들을 설명하고 있다. BIACORE[®] 시스템을 사용할 때 에피토프 묶기 실험은 가용성, 고유한 또는 재조합 항원을 사용하여 수행된다. 에피토프 묶기 연구는 BIACORE[®] 1000 시스템 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)상에서 수행될 수 있다. BIAlogue[®] v.1.2 소프트웨어가 작동 방법을 프로그래밍하기 위해 사용될 수 있다. IL-21에 대해 발생된 마우스 단클론성 항체를 저장하기 위해 BIACORE[®]를 사용하는 실험에 대해서는, 다클론성 염소 항-마우스 IgG Fc 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)가 사용되어 BIACORE[®] CM5 센서 칩에 공유결합에 의해 고정되고, 일차 단클론성 항체의 시험 시리즈를 칩에 결합 (포획)시킨다. 그런 다음 칩 상의 비어있는 Fc 결합 부위가 다클론성 IgG Fc 단편 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)을 사용하여 차단된다. 계속해서 IL-21 단백질이 주입되고 포획된 일차 단클론성 항체에 특이적으로 결합되는 것이 허용된다. BIACORE[®] 기기는 센서 칩에 결합된 단백질의 질량을 측정하고, 일차 항체 및 IL-21 항원 둘 다의 결합은 각 사이클에 대해 확인될 수 있다. 일차 항체 및 항원이 칩에 결합된 후에 가용성 이차 항체가 주입되어 이미 결합된 항원에 결합되는 것이 허용된다. 만약 이차 단클론성 항체가 일차 단클론성 항체와 동시에 IL-21 항원에 결합할 수 있다면, 그것의 결합은 BIACORE[®]에 의해 검출된다. 그러나 만약 이차 단클론성 항체가 일차 단클론성 항체와 동시에 IL-21 항원에 결합할 수 없다면, 추가의 결합은 검출되지 않는다. 각각의 단클론성 항체는 바탕 (결합 없음) 신호 수준을 설정하기 위해 네거티브 대조표준으로서 자체에 대해 시험된다.

[0055]

표지가 없는 경합 ELISA 포맷 (LFC-ELISA)이 또한 항체를 묶기 위해 사용될 수 있다. 이 방법은 나가타 등에 의해 설명된다 (Nagata et al., J. Immuno Methods 292: 141-155, 2004). 에피토프를 묶기 위한 이 방법은 비오틴화된 IL-21을 활용하였다. IL-21에 대해 발생된 마우스 단클론성 항체를 묶는 실험에 대해서, 미소역가 플레이트가 100 μ L/웰로 ELISA B (PBS, 0.1% 트윈 20, 1% BSA)에 희석된 1 μ g/mL의 염소 항-마우스 IgG Fc- γ 특이적 항체 (Jackson ImmunoResearch)로 코팅된다. 3시간 동안 주변 온도에서 있음으로써 이 코팅 항체가 결합된 후, 각각의 mAb-함유 조절 배지가 ELISA B로 희석되어 0.5 μ g/mL의 대략적인 mAb 농도를 만들어 4°C에서 염소 항-마우스 IgG 코팅된 플레이트에 결합되는 것을 허용한다 (mAb#1). 그것과 나란히, 두 번째 세트의 조절 배지 (mAb#2)를 폴리스티렌 시험 튜브에서 ELISA B에 대략 0.5 μ g/mL mAb로 희석하고, 50ng/mL의 비오틴화된 IL-21 항원과 혼합한 후, 4°C에서 밤새 인큐베이션한다. mAb#1을 코팅 항체와 함께 인큐베이션한 후에, 플레이트를 미관련 항체로 차단하여 플레이트 상의 비어있는 결합 부위를 포화시킨다. mAb#2-비오틴-IL-21 혼합물은 플레이트에 첨가되어 결합되는 것이 허용된다. 분석에서 (비-경합)에 대한 대조표준으로서 50ng/mL의 비오틴화된 IL-21이 직접 (mAb#2와의 사전 인큐베이션 없이) 고정된 mAb#1을 함유하고 있는 웰에 첨가된다. 비오틴화된 IL-21-mAb#2 복합체와의 인큐베이션 후에 스트렙타비딘-HRP (Pierce, Rockford, IL)가 플레이트에 0.5 μ g/mL로 첨가된다. 플레이트는 TMB 기질 (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD)을 사용하여 현상되고, 개별적인 웰의 450nm에서의 흡광도를 플레이트 판독기 (Molecular Devices SPECTRAMAX[®] 340, Sunnyvale, CA)를 사용하여 측정한다. 만약 mAb#1이 mAb#2와는 상이한 에피토프에 결합한다면, 비오틴-IL-21-mAb#2 복합체는 플레이트에 결합하여 높은 흡광도 판독값을 초래할 것이다. 만약 mAb#1이 mAb#2와 동일한 에피토프에 결합한다면, 비오틴-IL-21-mAb#2 복합체는 플레이트에 결합하지 않을 것이고, 낮은 흡광도 판독값을 초래할 것이다.

[0056]

본 발명의 리간드-특이적 항체는 단순히 IL-21에 결합하거나 IL-21의 길항체로서 작용할 수 있다. 예를 들어 본 발명은 IL-21의 수용체/리간드 상호작용을 파괴하지 않거나 또는 IL-21의 수용체/리간드 상호작용을 부분적으로 혹은 전체적으로 파괴하는 항체를 포함한다. 본 발명은 수용체 활성화를 방해하는 리간드-특이적 항체를 특징으로 한다. 본 발명은 리간드에 결합하여 리간드가 수용체, 및 리간드에 결합하는 항체에 결합하는 것을 방해함으

로써 수용체 활성화를 방해하지만, 리간드가 수용체에 결합하는 것은 막지 못하는 중화 항체를 포함한다. 수용체 활성화 (즉 신호화)는 본원에서 기술되는 또는 당해 기술분야에 공지되어 있는 기법들에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어 수용체 활성화는 면역침전과 이어서 웨스턴 블롯 또는 루미넥스(luminex) 기저 분석에 의해 수용체 또는 그것의 기질의 인산화 (예컨대 티로신 또는 세린/트레오닌)을 검출함으로써 측정될 수 있다. 특정 구획에서, 항체의 부재시에 리간드 또는 수용체 활성을, 활성의 최소한 90%, 최소한 80%, 최소한 70%, 최소한 60%, 또는 최소한 50% 억제하는 항체가 제공된다.

[0057]

항-IL-21 항체의 제조

[0058]

IL-21에 대한 항체는 예를 들면 IL-21 발현 벡터의 산물이거나 또는 항원으로서 천연 공급원으로부터 분리된 IL-21인 단백질을 사용하여 생성될 수 있다. 본 발명의 항-IL-21 항체는 IL-21에 "특이적으로 결합한다". 항체는 만약 항체가 다음의 두 가지 특성 중 최소한 한 가지를 나타낸다면 특이적으로 결합하는 것으로 간주된다: (1) 항체-결합 활성의 역치 수준으로 IL-21에 대해 결합하거나, (2) 항체가 IL-21에 관련된 폴리펩티드와 유의미하게 교차반응하지 않는다. 관련된 폴리펩티드는 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 및 IL-15와 같이 감마 공통 사슬(c)-함유 수용체에 결합하는 유형 1 사이토킨의 다른 구성원들의 폴리펩티드를 포함한다.

[0059]

첫 번째 특징과 관련하여, 항체는 만약 그것들이 측정된 친화성 상수로서 반영되는 것과 같이 IL-21 폴리펩티드, 펩티드 또는 에피토프에 특이적으로 결합한다. 친화성 특성을 측정하기 위하여, 역학률 상수의 측정, 평형 결합 상수, 및 평형 분해 상수가 표면 플라즈몬 공명을 경유하여 IL-21 항원과 IL-21 길항체와의 상호작용에 대해 평가되었다. 결합 속도 상수 (k_a ($M^{-1}s^{-1}$))는 항원-길항체 복합체 형성의 속도를 반영하는 값이다. 분해 속도 상수 (k_d (s^{-1}))는 이 복합체의 안정성을 반영하는 값이다. 평형 결합 친화성은 전형적으로 분해 평형 상수 (K_D (M)) 또는 결합 평형 상수 (K_A (M^{-1}))로서 표시된다. K_D 는 분해 속도 상수를 결합 속도 상수로 나눔으로써 (k_d/k_a) 얻어지는 한편, K_A 는 결합 속도 상수를 분해 속도 상수로 나눔으로써 (k_a/k_d) 얻어진다. 유사한 K_D (또는 유사한 K_A)를 가지는 길항체는 광범위하게 가변적인 결합 및 분해 속도 상수를 가질 수 있다. 따라서 k_a 및 k_d 뿐 아니라 K_A 또는 K_D 를 측정하는 것은 길항체-항원 상호작용의 친화성을 보다 더 독특하게 설명하는 것에 도움이 된다. 항체의 바람직한 친화성은 $10^6 M^{-1}$ 또는 그 이상, 바람직하게는 $10^7 M^{-1}$ 또는 그 이상, 보다 바람직하게는 $10^8 M^{-1}$ 또는 그 이상, 가장 바람직하게는 $10^9 M^{-1}$ 또는 그 이상의 K_A (평형 결합 상수)로 반영된다. 항체의 결합 친화성은 당업자에 의해, 예컨대 스캐처드 분석에 의해 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660, 1949), 또는 상업적으로 활용할 수 있는 바이오센서 기기를 사용하여 쉽게 측정될 수 있다. 두 번째 특징과 관련하여, 예를 들어 그것들이 표준 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 다른 공지된 폴리펩티드가 아닌 IL-21을 검출하거나, 또는 ELISA를 CAPTURE 한다면 항체는 관련된 폴리펩티드 분자와 유의미하게 교차반응하지 않는다. 공지된 관련 폴리펩티드의 실례는 IL-21이 속하는 IL-2 패밀리의 공지된 구성원들 (예를 들면 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 및 IL-15)을 포함한다.

[0060]

단클론성 항-IL-21 항체는 항원성 IL-21 에피토프-내포 펩티드 및 폴리펩티드를 사용하여 제조될 수 있다. 본 발명의 항체는 SEQ ID NO:2 내에 함유된 최소한 9, 또는 15 내지 약 30개의 아미노산 또는 본원에서 개시된 다른 아미노산 서열을 함유하는 항원성 에피토프-내포 펩티드 및 폴리펩티드에 결합한다. 그러나 30 내지 50 아미노산을 함유하는 아미노산 서열의 더 큰 부분, 또는 폴리펩티드의 전체 아미노산 서열에 가까운 어떠한 길이 및 전체 서열을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드가 또한 IL-21과 결합하는 항체를 유도하는데 유용하다. 에피토프-내포 펩티드의 아미노산 서열이 수성 용매에서 실질적인 용해도를 제공하기 위해 선택되는 것이 바람직하다 (즉 서열은 상대적으로 친수성 잔기를 포함하는 한편, 소수성 잔기는 전형적으로 회피된다). 더욱이 대규모 항체 제조를 위해서는 프롤린 잔기를 함유하는 아미노산 서열이 또한 바람직할 수 있다.

[0061]

단클론성 항-IL-21 항체는 당해 기술분야에 공지된 방법들에 의해 생성될 수 있다. 특이한 항원에 대한 설치류 단클론성 항체는 공지된 방법에 의해 얻어질 수 있다 (예를 들면 Kohler et al., Nature 256:495 (1975), Coligan et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, Vol. 1, pages 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"], Picksley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover et al. (eds.), page 93 (Oxford University Press 1995)).

[0062]

본 발명의 항체는 항체 합성에 대해 당해 기술분야에 공지된 어떠한 방법에 의해서든지, 특히 화학적 합성에 의

해, 또는 바람직하게는 재조합 발현 기법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 항체, 또는 그것의 단편, 유도체 또는 유사체, 예컨대 발명의 항체의 중쇄 또는 경쇄의 재조합 발현은 항체를 코드화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현벡터의 구성을 필요로 한다. 일단 본 발명의 항체분자 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 그것의 일부를 코드화하는 (바람직하게는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 함유하는) 폴리뉴클레오티드가 얻어지면, 항체 분자의 제조를 위한 벡터는 당해 기술분야에 널리 공지되어 있는 기법을 사용하여 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 그러므로 뉴클레오티드 서열을 코드화하는 항체를 함유하는 폴리뉴클레오티드를 발현함으로써 단백질을 제조하는 방법은 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 신호를 함유하는 발현 벡터를 구성하기 위해 사용될 수 있다. 이들 방법으로는 예를 들면 시험관 내 재조합 DNA 기법, 합성 기법, 및 생체 내 유전자 재조합이 있다. 그러므로 본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된 발명의 항체 분자, 또는 그것의 중쇄 또는 경쇄, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다. 그런 벡터는 항체 분자의 불변 영역을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고 (PCT 공보 WO 86/05807; PCT 공보 WO 89/01036; 및 미국 특허 5,122,464호), 항체의 가변 도메인은 그런 벡터 안에 전체 중쇄 또는 경쇄의 발현을 위해 클론될 수 있다.

[0063]

발현 벡터는 종래 기법에 의해 숙주 세포에 전달되고, 그런 다음 형질전환된 세포는 종래 기법에 의해 배양되어 발명의 항체가 제조된다. 그러므로 본 발명은 이중성 프로모터에 작동가능하게 연결된 발명의 항체, 또는 그것의 중쇄 또는 경쇄를 코드화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 숙주 세포를 포함한다. 이중 사슬 항체의 발현을 위해 바람직한 구체예에서, 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코드화하는 벡터는 아래에서 설명되는 것과 같이, 전체 면역 글로불린 분자의 발현을 위해 숙주 세포에서 함께 발현될 수 있다.

[0064]

발명의 항체 분자를 발현하기 위해 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 그런 숙주-발현 시스템은 그것에 의해 관심의 코딩 서열이 제조되고 계속해서 정제될 수 있는 비히클을 제공하며, 또한 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환되거나 트랜스펙션될 때 발명의 항체 분자를 제자리에서 발현할 수 있는 세포를 제공한다. 그러한 것들의 예를 들면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아 (예컨대 대장균, 고초균); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모 (예컨대 사카로마이세스, *Pichia*); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예컨대 배콜로바이러스)로 형질전환된 곤충 세포 시스템; 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예컨대 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예컨대 Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유류 세포로부터 유도된 프로모터 (예컨대 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유류 바이러스로부터 유도된 프로모터 (예컨대 MPSV, CMV, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구성물을 은닉하는 포유류 세포 시스템 (예컨대 COS, CHO, BHK, 293, 3T3 세포)이 있다. 바람직한 것은 대장균과 같은 박테리아 세포이고, 보다 바람직한 것은 진핵 세포가, 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위해 사용된다. 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO)와 같은 포유류 세포는 사람 사이토메갈로바이러스로부터 유도된 주요 중간 초기 유전자 프로모터 요소, CMV 인핸서 또는 MPSV 프로모터와 같은 벡터와 함께 항체에 대한 효과적인 발현 시스템이다 (Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2).

[0065]

박테리아 시스템에서, 많은 발현 벡터가 발현될 항체 분자에 대해 의도된 용도에 따라 유익하게 선택될 수 있다. 예를 들어 항체 분자의 약제학적 조성물의 생성을 위해 다량의 그런 단백질이 제조되어야 할 때, 쉽게 정제되는 융합 단백질 생성물의 고수준의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 것이다. 그런 벡터로는 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 항체 코딩 서열이 lacZ 코딩 영역과 한 프레임으로 벡터 안에 개별적으로 결합되어 융합 단백질이 제조될 수 있는 대장균 발현 벡터 pUR278 (Ruther et al., 1983, *EMBO J.* 2:1791); pIN 벡터 (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 11:3101-3109, 1985; Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509, 1989); 등이 있다. pGEX 벡터는 또한 글루타티온 S-트랜스페라제 (GST)를 포함하는 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로 그런 융합 단백질은 가용성이고 매트릭스 글루타티온-아가로오스 비드에 흡착되고 결합된 후 유리 글루타티온의 존재하에 용출됨으로써 용해된 세포로부터 쉽게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 디자인됨으로써 클론된 표적 유전자 산물이 GST 부분으로부터 방출될 수 있다.

[0066]

곤충 시스템에서, 오토그래파 칼리포니카 (*Autographa californica*) 핵 다각체 바이러스 (AcNPV)가 외래 유전자를 발현하기 위한 벡터로서 사용된다. 바이러스는 *Spodoptera frugiperda* 세포에서 성장한다. 항체 코딩 서열은 바이러스의 비필수 영역 (예를 들면 폴리헤드린 유전자)에 개별적으로 클론될 수 있고, AcNPV 프로모터 (예컨대

폴리헤드린 프로모터)의 조절하에 놓인다.

- [0067] 포유류 숙주 세포에서는 많은 바이러스-기저 발현 시스템이 활용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심의 항체 코딩 서열은 아데노바이러스 전사/번역 조절 복합체, 예컨대 후기 프로모터 및 3개의 별인 리더 서열에 결합될 수 있다. 그런 다음 이 키메라 유전자는 아데노바이러스 게놈에 시험관 내 또는 생체 내 재조합에 의해 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈 (예컨대 영역 E1 또는 E3)의 비-필수 영역으로의 삽입은 감염된 숙주에서 생존할 수 있고 항체 분자를 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 초래할 것이다 (Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359, 1984). 특이한 개시 신호는 또한 삽입된 항체 코딩 서열의 효과적인 번역에 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접한 서열을 포함한다. 나아가 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 원하는 코딩 서열의 리더 프레임이 있는 상에 존재해야 한다. 이들 외인성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 다양한 기원으로부터 유래하는 천연 및 합성적인 것일 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 요소, 전사 터미네이터 등의 포함에 의해 증강될 수 있다 (Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544, 1987).
- [0068] 또한 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 또는 원하는 특이한 방식으로 유전자 산물을 프로세스하는 숙주 세포 군주가 선택될 수 있다. 단백질 산물의 그런 변형 (예컨대 글리코실화) 및 프로세싱 (예컨대 절단)은 단백질 기능에 중요할 것이다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 산물의 후-번역 프로세싱 및 변형에 대해 특징적이고 특이한 메커니즘을 가진다. 발현된 외래 단백질의 정확한 변형 및 프로세싱을 보장하기 위해 적절한 셀라인 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 이 목적을 위해 일차 전사물의 적절한 프로세싱, 글리코실화, 및 유전자 산물의 인산화를 위한 세포의 기구를 가지는 진핵 숙주 세포가 사용될 수 있다. 그런 포유류 숙주 세포로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, 및 특히 유방암 셀라인, 예컨대 BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, 및 정상적인 유선 셀라인, 예컨대 CRL7030 및 Hs578Bst가 있다.
- [0069] 재조합 단백질의 장기간, 고수율 생성을 위해서는 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어 항체 분자를 안정하게 발현하는 셀라인이 공학적으로 제조될 수 있다. 바이러스 복제 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하기보다는 숙주 세포는 적절한 발현 조절 요소 (예컨대 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 터미네이터, 폴리아데닐화 부위 등), 및 선택가능한 마커에 의해 조절된 DNA로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입 후에 공학제조된 세포는 풍부한 배지에서 1 내지 2일 동안 성장하도록 방치된 후 선택성 배지에 스위치된다. 재조합 플라스미드의 선택가능한 마커는 선택에 대한 내성을 부여하고, 세포가 그것들의 염색체 안으로 플라스미드를 통합되고, 성장하여 병소가 형성되어 계속해서 클론되고 셀라인으로 팽창되는 것을 허용한다. 이 방법은 항체 분자를 발현하는 셀라인을 공학제조하는 데 유익하게 사용될 수 있다. 그런 공학제조된 셀라인은 특히 직접 또는 간접적으로 항체 분자와 상호작용하는 화합물의 선별 및 평가에 유용할 수 있다.
- [0070] 많은 선택 시스템이 사용될 수 있는데, 예를 들면 그것들에 한정되는 것은 아니지만 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 (Wigler et al., Cell 11:223, 1977), 히포크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스페라제 (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202, 1992), 및 아데닌 포스포리보실 트랜스페라제 (Lowy et al., Cell 22:817, 1980) 유전자가 tk-, hgprrt- 또는 aprt-세포에서 각각 사용될 수 있다. 또한 항대사산물 내성이 다음 유전자들에 대한 선택의 기초로서 사용될 수 있다: 메토타렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357, 1980; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527, 1981); 미코페놀산에 대한 내성을 부여하는 gpt (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072, 1981); 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 부여하는 neo (Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95, 1991; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596, 1993; Mulligan, Science 260:926-932, 1993; and Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217, 1993; TIB TECH 11 (5): 155-215, May, 1993); 및 하 이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygro (Santerre et al., Gene 30:147, 1984). 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술의 분야에서 공통적으로 공지되어 있는 방법들은 문헌에 설명되어 있다 (Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds.), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1, 1981).
- [0071] 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다 (Bebwington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). 항체를 발현하는 벡터 시스템에서 마커가 증폭할 수 있을 때, 숙주 세포의 배양시 존재하는 억제제의 수준의 증가는 마커 유전자의 복사물의 수의 증가도 초래할 것이다. 증폭

된 영역이 항체 유전자와 관련되기 때문에 항체의 생성은 또한 증가할 것이다 (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 2:257, 1983).

[0072] 숙주 세포는 발명의 두 개의 발현 벡터로 함께 트랜스펙션되는데, 첫 번째 벡터는 중쇄 유도된 폴리펩티드를 코드화하고, 두 번째 벡터는 경쇄 유도된 폴리펩티드를 코드화한다. 두 개의 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동등한 발현을 가능하게 하는 동일한 선택성 마커를 함유할 수 있다. 또는 달리, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 코드화하는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 그런 상황에서 경쇄는 독성 유리 중쇄의 과량을 피하기 위해 중쇄 앞에 놓여야 한다 (Proudfoot, Nature 322:52, 1986; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197, 1980). 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 RNA를 포함할 수 있다.

[0073] 일단 발명의 항체 분자가 재조합적으로 발현되며, 그것은 면역글로불린 분자의 정제를 위해 당해 기술 분야에 공지되어 있는 어떠한 방법에 의해서든지, 예를 들면 크로마토그래피 (예컨대 이온 교환, 친화성, 특히 단백질 A 후의 특이한 항원에 대한 친화성에 의해, 및 크기분류 칼럼 크로마토그래피)에 의해, 원심분리, 차등 용해도에 의해, 또는 단백질 정제를 위한 어떠한 다른 표준 기법에 의해 정제될 수 있다.

[0074] 특정 용도를 위해 항-IL-21 항체의 단편을 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 그런 항체 단편은 예를 들면 항체의 단백질 가수분해에 의해 얻어질 수 있다. 항체 단편은 중쇄 방법에 의해 전체 항체의 펩신 또는 파파인 소화 에 의해 얻어질 수 있다. 예를 들어 항체 단편은 F(ab')₂로 표시된 5S 단편을 제공하기 위해 항체를 펩신을 사용하여 효소적 절단함으로써 제조될 수 있다. 이 단편은 추가로 티올 환원제를 사용하여 절단됨으로써 3.5S Fab' 일가 단편이 제조될 수 있다. 임의로, 절단 반응은 이황화물 연쇄의 절단으로부터 유발되는 술포히드릴기에 대한 차단기를 사용하여 수행될 수 있다. 대안으로서, 펩신을 사용한 효소적 절단으로 두 개의 일가 Fab 단편과 Fc 단편이 직접 생성된다. 이들 방법은 문헌에 설명되어 있다 (Goldenberg, 미국 특허 4,331,647호, Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., in Methods in Enzymology Vol. 1, page 422 (Academic Press 1967), and by Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 및 2.10.-2.10.4).

[0075] 항체를 절단하는 다른 방법, 예를 들면 일가 경-중쇄 단편을 형성하기 위한 중쇄의 분리, 나아가 단편의 절단, 또는 다른 효소적, 화학적 또는 유전적 기법들이 또한, 무상 항체에 의해 인지되는 항원에 단편이 결합하는 한 사용될 수 있다.

[0076] 예를 들어 Fv 단편은 VH 및 VL 사슬의 결합을 포함한다. 이 결합은 비공유 결합일 수 있다 (Inbar et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659, 1972). 또는 달리 가변 사슬은 분자내 이황화 결합에 의해 연결되거나 또는 글루타르알데하이드와 같은 화합물에 의해 교차결합될 수 있다 (Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992).

[0077] Fv 단편은 펩티드 링커에 의해 연결된 VH 및 VL 사슬을 포함할 수 있다. 이들 단일-사슬 항원 결합 단백질 (scFv)은 올리고뉴클레오타이드에 의해 연결된 VH 및 VL 도메인을 코드화하는 DNA 서열을 포함하는 구조적 유전자를 구성함으로써 제조된다. 구조적 유전자는 나중에 계속해서 대장균과 같은 숙주 세포에 도입되는 발현 벡터 안에 삽입된다. 재조합 숙주 세포는 두 개의 V 도메인을 연결시키는 링커 펩티드를 사용하여 단일 폴리펩티드를 합성한다. scFv를 제조하는 방법은 예를 들면 문헌들에 설명되어 있다 (Whitlow et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97 (1991); Bird et al., Science 242:423, 1988, Ladner et al., 미국 특허 4,946,778호, Pack et al., Bio/Technology 11:1271, 1993, 및 Sandhu, 상기 참조).

[0078] 또한 단량체 도메인을 형성하기 위하여 단량체 단백질의 모음을 사용함으로써 대체 프레임워크를 구성하는 것이 가능하다. 이들 단량체 도메인은 조직을 통과하기에 충분히 작을 수 있다. 단량체 도메인은 천연-발생 또는 비-천연 변이체 또는 그것들의 조합일 수 있다. 단량체 도메인은 둘 또는 그 이상의 도메인의 다량체를 형성할 수 있다. 단량체 도메인은 표적 분자 상에 있는, 본원에서 설명된 에피토프에 유사한 위치에 결합한다. 어떤 경우에 다량체는 다양한 단량체 형태로부터 형성될 수 있다 (예컨대 미국 특허 출원 2004-0132028 및 미국 특허 출원 2006-0177831).

[0079] 본 발명의 항체는 변형된, 즉 IL-21이 결합하거나 수용체 활성화를 차단하는 것을 항체가 방해하지 못하게 만드는, 어떠한 유형의 항체 분자의 공유 부착에 의해 변형된 유도체를 포함한다. 제한하려는 의도는 아니지만, 예를 들어 항체 유도체는 예컨대 글리코실화, 아세틸화, 폐질화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질 가수분해성 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연쇄 등에 의해 변형된 항체들을 포함한다. 수많은 화학적 변형 중 어떠한 것이든지 공지된 기법들에 의해, 이를테면 그것들에 한정되는 것은 아니

지만 특이한 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사적 합성, 등에 의해 수행될 수 있다. 추가로 유도체는 하나 또는 그 이상의 비-고전적인 아미노산을 함유할 수 있다.

- [0080] 항-IL-21 항체는 검출가능한 표지와 포함됨으로써 항-IL-21 면역포합체가 형성될 수 있다. 적당한 검출가능한 표지로는, 예를 들면 방사성 동위원소, 형광 표지, 화학발광 표지, 효소 표지, 생체발광 표지 또는 콜로이드상금이 있다. 그런 검출가능하게 표지된 면역포합체를 제조하고 검출하는 방법들은 당업자에게 잘 알려져 있고, 아래에서 보다 상세하게 설명된다. 검출가능한 표지는 방사능 사진촬영에 의해 검출되는 방사성 동위원소일 수 있다. 본 발명의 목적에 대해 특히 유용한 동위원소는 ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S 및 ^{14}C 이다.
- [0081] 항-IL-21 면역포합체는 또한 형광 화합물로 표지될 수 있다. 형광-표지된 항체의 존재는 면역포합체를 적절한 파장의 빛에 노출시키고 그 결과의 형광을 검출함으로써 측정된다. 형광 표지 화합물은 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈로알데하이드, 알레사다이, 형광 비입자(예컨대 Q 돛트) 및 플루오레스카민을 포함한다.
- [0082] 또한 항-IL-21 면역포합체는 항체 성분을 화학발광 화합물에 결합시킴으로써 검출가능하게 표지될 수 있다. 화학발광-표지된 면역포합체의 존재는 화학적 반응 중에 발생하는 발광의 존재를 검출함으로써 측정된다. 화학발광 표지 화합물의 실례는 루미놀, 이소루미놀, 방향족 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 염 및 옥살레이트 에스테르를 포함한다.
- [0083] 유사하에, 생체발광 화합물은 본 발명의 항-IL-21 면역포합체를 표지하기 위해 사용될 수 있다. 생체발광은 촉매성 단백질이 화학발광 반응의 효율을 증가시키는 생물학적 시스템에서 발견되는 화학발광의 유형이다. 생체발광 단백질의 존재는 발광의 존재를 검출함으로써 측정된다. 표지화에 유용한 생체발광 화합물은 루시페린, 루시페라제 및 에퀴린을 포함한다.
- [0084] 또는 달리 항-IL-21 면역포합체는 항-IL-21 항체 성분을 효소에 연결시킴으로써 검출가능하게 표지될 수 있다. 항-IL-21-효소 포합체가 적절한 기질의 존재하에 인큐베이션될 때, 효소 부분은 기질과 반응하여 예를 들면 분광학적, 형광분석적, 또는 육안적인 수단에 의해 검출될 수 있는 화학적 부분이 생성된다. 다중특이성 면역포합체를 검출가능하도록 표지하기 위해 사용될 수 있는 효소의 실례로는 β -갈락토시다제, 글루코오스 옥시다제, 페록시다제 및 알칼리성 포스파타제가 있다.
- [0085] 당업자는 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 적당한 표지를 알게 될 것이다. 마커 부분의 항-IL-21 항체에의 결합은 당해 기술분야에 공지되어 있는 표준 기법들을 사용하여 이루어질 수 있다. 이런 관점에서 전형적인 방법은 다음의 문헌에서 설명된다: Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70:1, 1976; Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81:1, 1977; Shih et al., Int'l J. Cancer 46:1 101, 1990; Stein et al., Cancer Res. 50:1330, 1990; 및 Coligan, 상기 참조.
- [0086] 더욱이, 면역화학적 검출의 편리성 및 융통성은 아비딘, 스트렙타아비딘, 및 비오틴과 포함되어 있는 항-IL-21 항체를 사용함으로써 증강될 수 있다 (Wilchek et al. (eds.), "Avidin-Biotin Technology," Methods In Enzymology, Vol. 184 (Academic Press 1990), and Bayer et al., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology," in Methods In Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), pages 149- 162 (The Humana Press, Inc. 1992)).
- [0087] 면역분석을 수행하는 방법은 잘 규명되어 있다. (예를 들면 Cook and Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritter and Ladyman (eds.), pages 180-208, (Cambridge University Press, 1995), Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch and Lennox (eds.), pages 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995), and Diamandis, Immunoassay (Academic Press, Inc. 1996)).
- [0088] 생체 내 반감기가 증가된 항체 또는 그것의 단편은 당업자에게 공지되어 있는 기법들에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어 생체 내 반감기가 증가된 항체 또는 그것의 단편은 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 포함된 것으로 확인된 아미노산 잔기들을 변형시킴으로써 (예컨대 치환, 결실 또는 첨가에 의해) 생성될 수 있다 (국제 공보 WO 97/34631 및 WO 02/060919 참조). 생체 내 반감기가 증가된 항체 또는 그것의 단편은 상기 항체 또는 항체 단편에 중합체 분자, 예컨대 고분자량 폴리에틸렌글리콜 (PEG)을 부착시킴으로써 생성될 수 있다. PEG는 다중기능성 링커가 있거나 없는 상기 항체 또는 항체 단편에, 예를 들면 상기 항체 또는 항체 단편의 N-또는 C-말단에 PEG를 부위-특이적으로 포함시키거나 또는 리신 잔기에 존재하는 앰실론-아미노기를 경유하여 부

작될 수 있다. 생물학적 활성의 최소 손실을 초래하는 선형 또는 분지된 중합체 유도체화가 사용될 것이다. 포함 정도는 SDS-PAGE 및 분광학에 의해 치밀하게 모니터링되어 항체에 대한 PEG의 적절한 포함이 확인될 것이다. 미반응 PEG는 예컨대 크기 축출 또는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 포함체로부터 분리될 수 있다.

[0089] 약제학적 조성물

[0090] 본 발명은 나아가 약제학적으로 허용되는 담체와 본원에 기술된 폴리펩티드 또는 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 약제학적 조성물은 추가의 치료제, 이를테면, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 세포독성제, 세포독소, 예컨대 세포분열 억제제 또는 살생물제, 치료제 또는 방사성 금속 이온을 포함할 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 모든 제제를 포함한다. 예를 들면 팔시탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티옴 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로록시 안트라신 디온, 미토크산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 그것의 유사체 또는 동족체가 있다. 치료제로는, 그것들에 한정되는 않지만, 항대사산물 (예컨대 메토타렉세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시트라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예컨대 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 펠팔관, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로토스파미드, 부술관, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 플라티늄 (II) (DDP 시스플라틴), 안트라사이클린 (예컨대 다우노루비신 (구, 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생물질 (예컨대 닥티노마이신 (구, 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 및 항-유사분열제 (예컨대 빈크리스틴 및 빈블라스틴)가 있다. 예를 들어 약제학적 조성물은 원하는 생물학적 활성을 가지는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 그런 단백질로는 예를 들면 독소, 예컨대 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예컨대 종양 괴사 인자, α -IFN, β -IFN, 신경 성장 인자, 혈소판 유도된 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 혈전 제제 또는 항-혈관형성 제제, 예컨대 안지오테스틴 또는 엔도스테틴; 또는 생물학적 반응 변형제, 예컨대 림포카인, 인터류킨-1 (IL-1), 인터류킨 (IL-2), 인터류킨-6 (IL-6), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF), 생물학적 반응 변형제를 길항하기 위해 디자인된 항체, 다른 항체, 다른 Fc 융합 단백질 또는 다른 성장 인자들이 있다.

[0091] 치료목적에 대해서는, 항-IL-21 항체 분자 및 약제학적으로 허용되는 담체가 치료적으로 효과적인 양으로 환자에게 투여된다. 본 발명의 치료적 분자와 약제학적으로 허용되는 담체의 조합물은 투여되는 양이 생리적으로 충분하다면 "치료적으로 효과적인 양"으로 투여된 것으로 말할 수 있다. 제제는 그것의 존재가 수용체 환자의 생리학에서 검출가능한 변화를 초래한다면 생리적으로 중요하다. 예를 들어 염증을 치료하기 위해 사용된 제제는 그것의 존재가 염증성 반응을 개선한다면 생리적으로 유의미하다.

[0092] 분해가능한 중합체 미소구는 치료 단백질의 전신적으로 높은 수준을 유지하기 위해 디자인되었다. 미소구는 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(PLG), 다가 무수물, 폴리(오르토 에스테르), 비생체분해성 에틸비닐 아세테이트 중합체와 같은 분해가능한 중합체로부터 제조되며, 이때 단백질은 중합체에 싸여있다 (Gombotz and Pettit, Bioconjugate Chem. 6:332, 1995; Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," in Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), pages 51-93 (CRC Press 1995); Roskos and Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus et al., Science 281:1161, 1998; Putney and Burke, Nature Biotechnology 16:153, 1998; Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2:548, 1998). 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-코팅된 나노스피어가 또한 치료 단백질의 정맥내 투여를 위한 담체를 제공한다 (Gref et al., Pharm. Biotechnol. 10:167, 1997).

[0093] 다른 단위용량 형태들이 당업자에 의해 고안될 수 있다 (Ansel and Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995), and by Ranade and Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996)).

[0094] 약제학적 조성물은 중화 항-IL-21 항체를 포함하는 용기를 포함하는 키트로서 공급될 수 있다. 치료 폴리펩티드는 단일 또는 다중 용량에 대해 주사가능한 용액의 형태로, 또는 주사 전에 재구성될 멸균 분말로서 제공될 수 있다. 또는 달리, 그런 키트는 건조-분말 분산기, 액체 에어로솔 생성기, 또는 치료 폴리펩티드의 투여를 위한 분무기를 포함할 수 있다. 그런 키트는 추가로 약제학적 조성물의 용도 및 지시사항에 대한 문서로 된 정보를 포함할 수 있다.

[0095] 항-IL-21 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 액체 형태로, 에어로솔로 또는 고체 형태로 마감될 수 있다. 액체 형태의 예를 들면 주사가능한 용액, 에어로솔, 점적액, 위상적인 용액 및 경구용 현탁액이 있다. 예시적인 고체 형태로는 캡슐, 정제, 및 조절-방출 형태가 있다. 후자의 형태는 미니삼투 펌프 및 이식편으로 예시된다 (Bremer et al., Pharm. Biotechnol. 10:239,1997; Ranade, "Implants in Drug Delivery," in Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), pages 95-123 (CRC Press 1995); Bremer et al., "Protein Delivery with Infusion Pumps," in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey et al., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 93-117 (Plenum Press 1997)). 다른 고체 형태로는 크림, 페이스트, 다른 위상적 적용 등이 있다.

[0096] 항-IL-21 항체에 대한 치료 용도

[0097] IL-21은 최적의 CD8+ T 세포 매개된 면역성, NK 세포 활성화, 및 최적의 체액성 반응, 예컨대 항체 생성 및 B 세포 성숙에 중요한 CD4+ T 세포-유도된 사이토킨이다. IL-21은 많은 수의 전염증성 케모카인 및 사이토킨, 예컨대 IL-18, IL-15, IL-5, IL-6, IL-7A, IL-17F, TNFRII, sCD25, 및 RANTES를 유도하는 것으로 밝혀졌다. IL-21은 또한 IV 또는 SC 주사에 의해 투여될 때 비-사람 영장류와 사람에서 급성 상 반응을 유도한다 (Dodds et al., Cancer Immunol Immunother 2008 Oct 17 [electronic publication]). 시험관 내에서 IL-21은 다중 골수종 세포 및 급성 T-세포 백혈병과 같은 특정 신생 면역세포 집단의 성장을 자극한다 (Brenne et al Blood 99(10):3756-62 (2002), diCarlo E, et al Cancer Immunol Immunother 56(9):1323-1324 (2007)). IL-21은 또한 호지킨 림프종에서 호지킨 리드-스틴베르그 세포에 의해 생성된다 (Lamprecht et al., Blood 112(8):3339-47, 2008). IL-21 수용체의 증가된 발현은 전신성 경화증 (Distler et al., Arthritis & Rheumatism 52:865-864, 2004) 및 류머티스성 관절염 활막 섬유아세포 (Jungel et al., Arthritis & Rheumatism 50:1468-1476, 2004)를 가지는 환자의 표피에서 나타났다. 더욱이 자가면역 당뇨병 NOD 마우스는 IL-21 수용체 발현이 증가되었다 (King et al., Cell 117:265-277, 2004). IgG 및 IL-21 발현은 자가면역 홍반성 낭창-유사 질병을 나타내는 BXSb-Yaa 마우스 모델에서 증가되고 (Ozaki et al., J. Immunol. 173:5361-5371, 2004); IL-21 발현은 낭창-경향성 *sanroque* 마우스에서 더 높으며 (Vinuesa et al. Nature 435:452, 2005); IL-21 발현은 크론씨병 환자로부터의 비염증 소화관 조직에 비해 염증 소화관 조직에서 더 높다 (Monteleone, et al., Gastroenterology 128:687-694, 2005). IL-21은 또한 만성 소화장애증 (셀리악병) 환자의 점막에서 과잉생성된다 (Finn et al. Gut, PMID:17965065, 2007).

[0098] 항-IL-21 항체의 치료적으로 효과적인 양은 환자에게 투여될 때 질병 또는 질환과 관련된 증상 또는 생물학적 활성을 방지, 지연, 감소 또는 억제하기에 효과적인 항체의 양을 말한다. 투여는 단일 용량 또는 다중 용량으로 구성되며, 다른 약제학적 조성물과의 조합으로 제공될 수 있다.

[0099] 본 발명은 염증성 및 면역 질병 또는 질환, 예컨대 다음의 질병에서 항-IL-21 단클론성 항체를 사용하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다: 건선, 궤양성, 유형 I 당뇨병 (IDDM), 그레이브스병, 염증성 장 질병 (IBD), 크론씨병, 궤양성 대장염, 염증성 장 증후군, 다발성 경화증, 류머티스성 관절염, 반응성 관절염, 장질환성 관절염, 척추관절증, 자가면역 심근염, 가와사키병, 만성 소화 장애증, 포도막염, 베체트병, 관상 동맥 질병, 만성 폐색성 폐질환 (COPD), 간질성 폐질환, 염증성 근육 질병 (다발성 근염, 피부근염), 현미경적 다발성 동맥염, 자가면역 재생불량성 빈혈, 자가면역 갑상선염, 자가면역 간염, 베게너 증후군, 게실증, 전신성 홍반성 낭창, 강직성 척추염, 피부 경화증, 전신성 경화증, 건선성 관절염, 골관절염, 아토피성 피부염, 백반증, 이식편 대 숙주 질병 (GVHD), 피부 T 세포 림프종 (CTCL), 쇄골 증후군, 사구체신염, IgA 신병증, 자가면역 신증, 심상성 천포창, 중증 근무력증, 자가면역 난청, 시신경 척수염, Goodpasture 증후군, 한랭글로불린혈증, 길랑-바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증 (CIDP), 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판 감소성 자반증 (ITP), 이식 거부반응, 고도로 민감한 이식 환자, 항-인지질 증후군, 알레르기, 및 천식, 및 다른 자가면역 질병. 본 발명은 다발성 골수종, 급성 T-세포 백혈병, 또는 호지킨 림프종과 같은 특정 면역 세포 암에 대한 치료에 항-IL-21 단클론성 항체를 사용하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0100] 접촉성 피부염

[0101] 알레르기성 접촉성 피부염은 피부와 접촉하게 되는 항원에 대한 T 세포 매개된 면역 반응으로서 정의된다. CLA+ T 세포 집단은 알레르겐 의존성 T 세포 반응이 세포의 CLA+ 집단에 크게 국한되기 때문에 피부염의 개시에 포함되는 것으로 여겨진다 (Santamaria-Babi, et al., J Exp Med 181:1935, (1995)). 최근 데이터는 CD8+ T 세포가 아닌 단지 메모리 (CD45RO+) CD4+ CLA+가 증식하고 통상적인 접촉 과민성 알레르겐인 니켈에 반응하여 타입-1

(IFN- γ) 및 타입-2 (IL-5) 사이토키ンを 둘 다 생성한다는 것을 밝혀냈다. 나아가 CD4, CD45RO (메모리) 또는 CD69와 조합하여 CLA를 발현하는 세포는 니켈-특이적 자극 후에 증가하고 CCR6이 아닌 케모카인 수용체 CXCR3, CCR4, CCR10을 발현한다 (Moed et al., *Br J Dermatol* 51:32, (2004)).

[0102] 동물 모델에서, 알레르기성 접촉성 피부염은 T 세포-의존적이고, 알레르기-반응성 T 세포는 알레르겐 적용 부위로 이동하는 것으로 증명되었다 (Engeman, et al., *J Immunol* 164:5207, (2000); Ferguson & Kupper, *J Immunol* 150:1172, (1993); and Gorbachev & Fairchild, *Crit Rev Immunol* 21:451 (2001)).

[0103] 접촉 과민성의 마우스 모델에 항-IL-21 항체를 투여하는 것은 질병의 증상을 개선시키고 과정을 변경시키는 항-IL-21 항체의 임상적 활용성을 평가하기 위해 사용된다.

[0104] 아토피성 피부염

[0105] 아토피성 피부염 (AD)은 지난 수십 년에 걸쳐 발생률이 극적으로 증가하는 만성적으로 재발하는 염증성 피부 질환이다. 임상적으로 AD는 매우 가렵고, 자주 표피가 떨어져 나가며, 만성적으로 재발하는 플라크와 구진을 특징으로 한다. AD의 진단은 크게는 크고 작은 임상적 발진을 토대로 한다 (Hanifin J. M., *Arch Dermatol* 135:1551 (1999)). 조직병리학은 해면화, 돌기형 각질화 및 국소형 이상각화증인 급성 병변에서 나타나는 한편, 돌기형 각질화 및 이상 각화증이 수반되는 현저한 표피 과형성, 림프구와 풍부한 비만 세포가 있는 피부의 극세포증/과과립증 및 혈관주위 침윤은 만성 병변의 전형적인 특징이다.

[0106] T 세포는 조직의 국소적인 면역 반응의 개시에 중추적인 역할을 하고 증거는 피부를 침윤하는 T 세포가 특히 피부의 이상조절 면역 반응의 개시 및 유지에 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다. 피부 염증 부위의 대략 90%의 침윤성 T 세포가 내피 상의 유도성 점착 분자인 E-셀렉틴에 결합하는 피부의 림프구-결합 항원을 발현한다 (Santamaria-Babi, et al., *Eur J Dermatol* 14:13, (2004)). 대조 개인과 비교하여 AD 환자 중에서 순환하는 CLA+ T 세포의 상당한 증가가 증명된 한편 (Teraki, et al., *Br J Dermatol* 143:373 (2000), 다른 증거들은 AD 환자로부터의 메모리 CLA+ T 세포가 CLA- 집단에 비교하여 알레르겐 추출물에 우선적으로 반응하는 것을 증명하였다 (Santamaria-Babi, L.F., et al., *J Exp Med* 181:1935, (1995)). 사람에서, 피부의 아토피성 질환의 발병은 IL-5 및 IL-3과 같은 Th-2-형 사이토키인의 증가된 수준을 발현하는 CLA+ T 세포의 증가와 관련되어 있다 (Akdis et al., *Eur J Immunol* 30:3533 (2000); and Hamid et al., *J Allergy Clin Immunol* 98:225 (1996)).

[0107] NC/Nga 마우스는 생후 6 내지 8주쯤에 비-특화된 병원균-유리 (비-SPF) 조건에서 사육할 때, 많은 관점에서 사람 AD와 평행하는 AD-유사 병변, 이를테면 임상적 경과와 신호, 조직병리학 및 면역병리학을 자연스럽게 나타낸다. 대조적으로 SPF 조건하에서 유지된 NC/Nga 마우스는 피부 병변을 나타내지 않는다. 그러나 자연스러운 피부 병변의 시작과 급는 행동은 SPF 시설에서 사육된 NC/Nga 마우스에서 미정제 집먼지 진드기 항원을 매주 피부내 주사함으로써 동시에 발생될 수 있다 (Matsuoka et al., *Allergy* 58:39 (2003)). 그러므로 NC/Nga에서 AD의 발생은 AD의 치료를 위한 신규한 치료법을 평가하기 위한 유용한 모델이다.

[0108] 자연스러운 AD의 NC/Nga 모델 외에, OVA를 사용하여 마우스를 피부감작하는 것이 또한 감작된 마우스의 피부에서 단핵 침윤물로 인해 항원-의존성 상피 및 진피의 농밀화를 유도하기 위한 모델로서 사용될 수 있다. 이것은 통상적으로 총 및 특이한 IgE의 상승된 혈청 수준과 일치하지만, 이 모델에서 피부 장벽 기능장애나 가려움증이 정상적으로 일어나지 않는다 (Spergel et al., *J Clin Invest* 101:1614, (1998)). 이 프로토콜은 OVA로 DO11.10 OVA TCR 유전자도입 마우스를 감작시킴으로써 피부 장벽 조절장애 및 가려움증을 유도하기 위해 변형될 수 있다. 감작 항원을 인지할 수 있는 항원-특이적 T 세포의 수를 증가시키는 것은 가시적인 긁기 행동과 피부의 태선화/비늘벗겨짐을 유도하기 위해 피부의 염증 수준을 증가시킬 수 있다.

[0109] 아토피성 피부염의 마우스 모델에 항-IL-21 항체를 투여하는 것은 질병의 증상을 개선시키고 과정을 변경시키기 위해 항-IL-21 항체의 임상적인 활용성을 평가하기 위해 사용된다.

[0110] 관절염

[0111] 골관절염, 류머티스성 관절염, 손상 등의 결과로서 관절염 관절을 포함한 관절염은 항-염증성 항체 및 결합 폴리펩티드의 치료적 사용으로 인해 유익해질 수 있는 통상적인 염증성 질환이다. 예를 들어 류머티스성 관절염 (RA)은 신체 전체에 영향을 미치고 가장 통상적인 형태의 관절염 중 하나인 전신성 질환이다. 그것은 통증, 경직, 열기, 홍조 및 팽창을 유발하는, 관절에 덧대어진 막의 염증을 특징으로 한다. 염증 세포는 뼈와 연골을 소화할 수 있는 효소를 방출한다. 류머티스성 관절염의 결과로서, 염증이 생긴 관절 라이닝인 활막은 뼈와 연골에 침해하여 그것들을 손상시켜서 다른 생리적 효과들 중에서도 관절 악화와 심각한 통증을 유발한다. 포함된 관절

은 그것의 모양과 정렬형태를 잃을 수 있어서 통증과 운동성의 상실을 유발한다.

[0112] 류머티스성 관절염

[0113] 류머티스성 관절염 (RA)은 특히 심각한 장애와 사망률 증가를 유발하는 염증 및 후속적인 조직 손상을 특징으로 하는 면역-매개된 질병이다. 류머티스성 관절염에서는 국소적으로 다양한 사이토킨이 생성된다. 많은 연구들이 두 개의 원형적 전-염증성 사이토킨인 IL-1과 TNF-알파가 활막 염증과 점진적인 관절 파괴에 포함되는 메커니즘에서 중요한 역할을 한다는 것을 증명하였다. 실제로, RA 환자에서 TNF-알파와 IL-1 억제제의 투여는 임상적이고 생물학적인 염증 신호의 극적인 개선과 뼈 침식 및 연골 파괴의 방사선적 신호의 감소를 유도하였다. 그러나 이들 고무적인 결과에도 불구하고, 상당한 백분율의 환자가 이들 제제에 반응하지 않는데, 이것은 다른 매개물질들이 또한 관절염의 병리생리학에 포함된다는 것을 시사한다 (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2):135-149, 2002).

[0114] 당해 기술분야에 공지되어 있는 류머티스성 관절염에 대한 동물 모델이 여러 개 있다. 예를 들어 콜라겐-유도된 관절염 (CIA) 모델에서, 마우스는 사람 류머티스성 관절염을 매우 닮아있는 만성 염증성 관절염을 나타낸다. CIA가 RA와 유사한 면역학적 및 병리학적 특징을 공유하기 때문에, 이런 특징은 이 모델이 잠재적인 사람 항-염증성 화합물을 선별하기 위한 이상적인 모델이 되게 한다. CIA 모델은 면역 반응과 염증성 반응 둘 다에 의해 좌우되는 마우스에서 발생하는 잘 알려진 모델이다. 면역 반응은 항원으로 투여되어 항-콜라겐 항체의 생성을 유도하는 콜라겐에 대한 반응에서 B-세포와 CD4+ T 세포의 상호작용을 포함한다. 염증상은 마우스의 천연 콜라겐에 대하여 교차반응하고 보체 캐스케이드를 활성화하는 이들 항체의 일부의 결과로서, 염증의 매개자로부터 조직 반응의 결과이다. CIA 모델을 사용할 때의 장점은 발병의 기본적인 메커니즘이 공지되어 있다는 것이다. 타입 II 콜라겐 상의 관련된 T-세포 및 B-세포 에피토프가 이미 확인되었고, 면역-매개된 관절염과 관련된 다양한 면역학적 (예컨대 지연형 과민성 및 항-콜라겐 항체) 및 염증성 (예컨대 사이토킨, 케모카인, 및 매트릭스-분해 효소) 매개변수들이 측정되었으며, 따라서 CIA 모델에서 시험 화합물 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다 (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams et al, *Immunol.* 89:9784-788, 1992; Myers et al., *Life Sci.* 61:1861-78, 1997; and Wang et al., *Immunol.* 92:8955-959, 1995).

[0115] 이들 CIA 모델 마우스에 항-IL-21 항체를 투여하는 것은 질병의 증상을 개선시키고 과정을 변경시키기 위해 항-IL-21 항체를 사용하는 것을 평가하기 위해 사용된다.

[0116] 염증성 장 질병 (IBD)

[0117] 미국에선 대략 500,000명의 사람들이 결장 및 직장 (궤양성 대장염) 또는 소장과 대장 (크론씨병)에 영향을 미칠 수 있는 염증성 장 질병 (IBD)으로 고생한다. 이들 질병의 병인은 불분명하지만, 질병은 영향을 받은 조직의 만성 염증을 포함한다. 궤양성 대장염 (UC)은 보통 결장으로 불리는 대장의 염증성 질병이고, 결장의 점막 또는 가장 안쪽의 라이닝의 염증과 궤양 형성을 특징으로 한다. 이 염증은 결장이 자주 비는 것을 유발하여, 설사를 유발한다. 증상으로는 대변의 풀립 및 관련된 복부 경련, 열 및 체중 손실을 포함한다. 비록 정확한 UC의 원인이 알려지지 않았지만, 최근 연구는 신체의 자연 방어가 면역 시스템이 "비-자체"라고 생각하는 신체에서 단백질에 대해 작동하고 있음 ("자가면역 반응")을 시사한다. 아마도 그런 단백질은 소화관에서의 박테리아 단백질을 닮았기 때문에 그것들은 결장의 라이닝을 파괴하기 시작하는 염증 과정을 조장하거나 자극할 수 있다. 결장의 라이닝이 파괴됨에 따라 궤양은 점액, 고름 및 피를 방출시킨다. 질병은 통상 직장 영역에서 시작하고, 결국엔 전체 대장을 통해 퍼져나갈 수 있다. 반복된 염증 사건은 장과 직장의 벽을 두껍게 하며 흉터 조직을 남긴다. 결장 조직의 죽음 또한 패혈증은 심각한 질병과 함께 일어날 수 있다. 궤양성 대장염의 증상들은 심각성에 따라 달라지며 그것들은 점진적으로 또는 갑자기 나타날 수 있다. 공격은 호흡계 감염 또는 스트레스를 포함하여 많은 인자들에 의해 유발될 수 있다.

[0118] 비록 현재로서는 활용할 수 있는 UC에 대한 치료법이 없지만, 치료는 결장 라이닝의 비정상적인 염증 과정을 억제하는 것에 초점이 맞춰져 있다. 치료는 코르티코스테로이드 면역억제제 (예컨대 아자티오프린, 메르캅토프린, 및 메토포렉세이트)를 포함하며 아미노살리시테이트가 질병을 치료하는데 활용될 수 있다. 그러나 코르티코스테로이드 및 아지티오프린과 같은 면역억제제의 장기간 사용은 뼈의 약화, 백내장, 감염, 및 간과 골수 효과를 포함하여 심각한 부작용을 초래할 수 있다. 현재의 치료법이 성공적이지 못한 환자에서 수술이 선택적이 될 수 있다. 그러나 수술은 전체 결장 및 직장의 제거를 포함한다.

[0119] 부분적으로 만성 궤양성 대장염을 모방할 수 있는 동물 모델이 여러 개 있다. 가장 광범위하게 사용되는 모델은 2,4,6-트리니트로벤술폰산/에탄올 (TNBS) 유도된 대장염 모델로, 그것은 결장의 만성 염증 및 궤양 형성을 유도

한다. TNBS가 직장 내 주입을 통해 민감한 마우스의 결장에 도입될 때, 그것은 결장 점막에서 T-세포 매개된 면역 반응을 유도하며, 이때에 전체 대장 벽을 통해 T-세포와 대식세포가 조밀하게 침투하는 것을 특징으로 하는 심각한 점막 염증이 유발된다. 더욱이 이런 조직병리학적 특징은 점진적인 체중 손실 (소모성), 출혈성 설사, 직장 탈장, 및 대장 벽 농밀화와 같은 임상적 특징을 포함한다 (Neurath et al. *Intern. Rev. Immunol.* 19:51-62, 2000). 고유한 T 세포의 미미한 조직적합성 미스매치된 또는 동계의 면역손상된 마우스로의 선택성 전달은 건선을 닮은 피부 병변 (Schon MP et al., *Nat. Med.* 2:183-8, 1997; Davenport CM et al., *Int Immunopharmacol.* 5:653-72, 2002)뿐만 아니라 대장염의 발생을 유도한다 (Leach MW et al 1996, Powrie F et al, 1997). BALB/C 또는 B10.D2 마우스로부터 면역손상된 C.B-17 SCID 마우스로의 0.2 밀리온 정도로 적은 CD4+CD25- T 세포의 이식은 체중 손실, 잠혈 양성 대변 및 피부 병변의 발생을 초래한다. 이들 마우스의 증상들은 결장마다 다르다. 이 대장염/건선 모델은 사람 크론씨병과 건선에 일부 닮은 점이 있고, 사람에서 이들 질병에 대한 치료법의 효능을 시험하기 위해 광범위하게 사용되었다.

[0120]

다른 대장염 모델은 텍스트란 술페이트 나트륨 (SDS)을 사용하며, 그것은 출혈성 설사, 체중 손실, 결장의 단축 및 호중구 침윤이 포함된 점막 궤양이 나타나는 급성 대장염을 유도한다. DSS-유도된 대장염은 조직학적으로 염증성 세포의 고유관으로의 침윤이 나타나는 것이 특징이고, 림프종 과형성, 국소적인 한랭 손상, 및 상피 궤양 형성을 포함한다. 이들 변화는 상피에 나타난 DSS의 독성 효과로 인해, 그리고 고유관 세포의 세포 이물 흡수 및 TNF-알파 및 IFN-감마의 생성에 의해 발생하는 것으로 여겨진다. 그것의 공통적인 사용에도 불구하고, DSS-유도된 질병의 메커니즘과 관련된 여러 문제점들과 그것의 사람 질병과의 관련성은 해결되지 않은 채로 남아있다. DSS는 그것이 SCID 마우스와 같은 T 세포-결핍 동물에서 관찰되기 때문에 T-세포 의존성 모델로서 간주된다.

[0121]

항-IL-21 항체를 이들 TNBS, DSS 또는 CD4+ T 세포-전달 모델에 투여하는 것은 위장 질병의 증상을 개선하고 과정을 변경시키기 위한 IL-21 길항체의 사용을 평가하기 위해 사용될 수 있다. IL-21은 대장염의 염증성 반응에 역할을 할 것이고, IL-21 길항체를 투여함으로써 IL-21 활성을 중화하는 것은 IBD에 대한 잠재적인 치료적 접근법이다.

[0122]

건선

[0123]

건선은 수백만명 이상의 미국인에게 영향을 미치는 만성 피부 질환이다. 건선은 새로운 피부가 비정상적으로 자라서 피부의 염증, 팽창 및 인설 반흔을 초래함으로써 결국에는 케라틴 형성 세포의 분화가 변경될 때 일어난다. 가장 흔한 형태인 플라크 건선은 상부에 은빛의 백색 비늘이 덮이는 피부의 염증 반흔 ("병변")을 특징으로 한다. 건선은 소수의 플라크에 제한될 수도 있고, 또는 피부의 광범위한 영역에 적당히 퍼져 있으며, 가장 흔하게는 두피, 무릎, 팔꿈치 및 몸통에 나타난다. 눈으로 식별이 매우 쉽긴 하지만 건선은 전염성 질병이 아니다. 이 질병의 발병은 T 세포 활성화, 염증성 수지상 세포에 의한 변경된 항원 제공 및 사이토킨 생성, 및 영향을 받은 조직의 만성 염증을 포함한다. 본 발명의 항-IL-21 항체는 건선, 다른 염증성 피부 질병, 피부 및 점막 알레르기, 및 관련된 질병에서의 염증 및 병리학적 효과를 감소시키기 위한 가치있는 치료제로서 작용할 수 있다.

[0124]

건선은 상당한 불편을 유발할 수 있는 피부의 T-세포 매개된 염증성 질환이다. 건선은 그것에 대한 치료법이 없고, 모든 연령대의 사람들에게 영향을 미치는 질병이다. 건선은 대략 유럽 및 북미 인구의 2%에 영향을 미친다. 비록 경미한 건선을 나타내는 개인들이 그들의 질병을 국소 제제로 제어할 수 있긴 하지만, 전 세계적으로 1백만 명 이상의 환자들이 자외선 치료 또는 전신성 면역억제 치료를 필요로 한다. 그러나 불행하게도 자외선 방사의 불편함과 위험 및 많은 치료법의 독성이 그것들의 장기간 사용을 제한하게 된다. 더욱이 환자들은 보통 건선이 재발되고, 어떤 경우에는 면역억제 치료법을 중단한 직후에 재발되기도 한다. 항-IL-21 항체는 CD4+ CD45RB 전달 모델을 토대로 한 최근에 개발된 모델을 사용하여 시험될 수 있다 (Davenport et al., *Internat. Immunopharmacol.*, 2:653-672, 2002).

[0125]

본원에서 설명되는 다른 질병 모델 외에, 사람 건선 병변으로부터 유도된 염증성 조직에 미치는 항-IL-21 항체의 활성은 생체 내에서 엄격한 조합 면역 결핍 (SCID) 기저 마우스 모델을 사용하여 측정될 수 있다. 사람 세포 또는 조직 이식편이 면역결핍 마우스에 이식되는 여러 마우스 모델 (포괄적으로 이종이식편 모델로 언급된다)이 개발되었다 (Cattan and Douglas, *Leuk. Res.* 18:513-22, 1994 and Flavell, *Hematological Oncology* 14:67-82, 1996). 건선에 대한 생체 내 이종이식편 모델로서, 사람 건선 피부 조직은 SCID 마우스에 이식되고, 그 마우스들은 계속해서 적절한 길항체로 도전된다. 더욱이 당해 기술분야의 다른 건선 동물 모델이 IL-21 길항체를 평가하기 위해 사용될 수 있는데, 예를 들면 사람 건선 피부 이식편이 AGR129 마우스 모델에 이식되거나 적절한

길항체로 도전된다 (Boyman et al., *J. Exp. Med.* Online publication #20031482, 2004). 유사하게 사람 대장염, IBD, 관절염, 또는 다른 염증성 병변으로부터 유도된 조직 또는 세포는 본원에서 기술되는 항-IL-21 항체의 항-염증성 성을 평가하기 위해 SCID 모델에서 사용될 수 있다.

[0126] 치료의 효능은 당해 기술분야에 잘 알려져 있는 방법들을 사용하여 치료된 집단 내에서 시간 경과에 따라 나타나는 증가된 항-염증 효과로서 측정되고 통계적으로 평가된다. 몇 가지 예시적인 방법은, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 건선 모델에서, 상피 두께, 상부 피부의 염증 세포의 수, 및 이상각화증의 정도를 측정하는 것을 포함한다. 그런 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 본원에서 설명된다 (Zeigler et al., *Lab Invest* 81:1253, 2001 ; Zollner et al., *J. Clin. Invest.* 109:671, 2002; Yamanaka et al., *Microbiol. Immunol.* 45:507, 2001; Raychaudhuri et al., *Br. J. Dermatol.* 144:931, 2001 ; Boehncke et al., *Arch. Dermatol. Res.* 291:104, 1999; Boehncke et al., *J. Invest. Dermatol.* 116:596, 2001 ; Nickoloff et al., *Am. J. Pathol.* 146:580, 1995; Boehncke et al., *J. Cutan. Pathol.* 24:1, 1997; Sugai et al., *J. Dermatol. Sci.* 17:85, 1998; and Villadsen et al., *J. Clin. Invest.* 112: 1571, 2003). 염증은 또한 시간 경과에 따라 잘 알려져 있는 방법, 예를 들면 샘플에 존재하는 염증성 또는 병변 세포의 수, IBD에 대한 기록 (체중 손실, 설사, 직장 출혈, 결장 길이), CIA RA 모델에 대해 발 절병 기록 및 염증 기록을 정량하기 위하여 유세포 분석 (또는 PCR)을 사용하여 모니터링될 수 있다.

[0127] 이들 건선 모델 마우스에 항-IL-21 항체를 투여하는 것은 질병의 증상을 개선하고 과정을 변경시키기 위해 항-IL-21 항체를 사용하는 것을 평가하기 위해 사용된다.

[0128] 전신성 홍반성 낭창

[0129] 전신성 홍반성 낭창 (SLE)은 신체의 어디에나 있는 자체 항원에서 지시된 만성 IgG 항체 생성 (예컨대 항-dsDNA)을 특징으로 하는 면역-복합체 관련 질환이다. SLE의 효과는, 비록 사구체신염이 몇몇 경우 (즉 낭창 신염)를 초래할 수 있긴 하지만 특정 기관에 국소적이기보다는 전신성이다. 다중 염색체 유전자좌가 질병에 관련되어 있고, 질병의 상이한 측면, 예컨대 항-dsDNA 항체 및 사구체신염에 기여할 수 있다. CD4+ T 세포는 SLE의 마우스 모델에서 능동적인 부분을 차지하는 것으로 밝혀졌다 (Horwitz, *Lupus* 10:319-320, 2001; Yellin and Thienel, *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2:24-37, 2000). CD8+ T 세포에 대한 역할은 분명하게 규명되지 않았으나, "억제제" CD8+ T 세포 기능이 낭창 환자에게서 손상되었다는 것을 시사하는 증거가 있다 (Filaci et al, *J. Immunol.*, 166:6452-6457, 2001; Sakane et al, *J. Immunol.*, 137:3809-3813, 1986).

[0130] IL-21은 고유한 사람 B 세포가 항체-분비 혈장 세포로 분화되는 것을 유도하는 것으로 확실하게 밝혀졌다 (Ozaki et al, *J. Immunol.* 173:5361, 2004; Ettinger et al., *J Immunol.* 175:7867-79, 2005; Ettinger et al, *J Immunol.* 178:2872-82, 2007; Kuchen et al. *J Immunol.* 179:5886-96, 2007). 오자키 등 (Ozaki et al., *J. Immunol.* 173:5361, 2004)은 또한 IL-21 발현이 SLE에 대한 모델인 낭창-경향성 BXSB-Yaa 마우스에서, 초기 자가면역 과정의 특징이 처음으로 분명해지는 월령에 상승되는 것을 입증하였다. 쥐과의 IL-21 길항체로 이들 BXSB-Yaa 마우스를 처리하는 것은 사구체신염을 포함하여 부분적으로 다양한 질병 매개변수를 억제한다 (Bubier et al., *Ann N Y Acad Sci.* 1110:590-601, 2007). 동일한 IL-21 길항체는 또한 SLE의 다른 전-임상 질병 모델인 MRL/lpr 마우스에서 효력을 나타내는 것으로 밝혀졌다 (Herber et al. *J. Immunol.* 178:3822-3830, 2007). 더욱이 IL-21이 Treg 세포의 발생을 제한하기 때문에, 항-IL-21 항체의 투여는 그 기능이 손상된 낭창 환자에게서 보다 강력한 T 세포 억제제 기능을 제공할 수 있다 (Lamprecht et al. *Blood.* 112(8):3339-47, 2008).

[0131] 24명의 SLE 환자와 15명의 건강한 대조표준으로부터 얻은 데이터는 1) IL-21 mRNA 발현은 대조표준에 비교하여 낭창 환자로부터의 CD4+ T 세포에서 상당히 증가되고, 2) IL-21 수준은 상업적인 IL-21 ELISA 키트 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 측정되는 바, 무상 SLE 또는 대조표준에 비교하여 환자로부터의 혈청에서 상당히 상승되며, 3) IL-21은 용량 의존성 방식으로 환자 및 대조표준에서 모두 CD4+ T 세포 및 CD19+ B 세포 증식을 증강시키고, 4) IL-21은 정상적인 대조표준 및 SLE 환자에서 항-CD40 유도된 혈장 세포 분화를 증강시키며, 그리고 5) IL-21의 상승된 수준은 SLE에서 자동반응성 CD4+ T 세포의 증식 및 혈장 세포 분화에 기여할 수 있다는 것을 보여주었다 (Rus, V., *ACR Presentation #1760*, 2008 American College of Rheumatology meeting, October 24-29, 2008).

[0132] 항-IL-21 항체는 이미 자가면역에 사용되어 온 다른 제제, 이를테면 IFN γ , NOVANTRONE[®], ENBREL[®], BETAIFERON[®], REMICADE[®], LEUKINE[®] 및 PROLEUKIN[®]과 같은 면역 조절제와 함께 투여될 수 있다. 항-IL-21 항체

는 전부터 다발성 골수종, 호지킨 림프종 또는 급성 T-세포 백혈병의 암치료에 사용되어 오던 제제, 예컨대 THALOMID® 또는 텍사메타손 또는 프레드니손과 같은 스테로이드와 조합하여 투여될 수 있다. 최적의 용량 수준을 설정하고 항-IL-21 항체에 대한 투여계획을 세우는 것은 다양한 수단, 이를테면 항-IL-21 항체의 약리역학 및 약물역학의 연구; 동물 모델에서의 효과적인 용량의 측정, 및 항-IL-21 항체의 독성의 평가에 의해 이루어진다. 그런 다음 영상류 및 임상 시도에서 이루어진 직접적인 약물역학적 측정은 환자에게서 생물학적 반응을 이루기에 충분한 양과 기간인 혈장 항-IL-21 항체 수준을 이루는 환자에서의 이론적인 용량을 예측하는 데 사용될 수 있다.

[0133] 이식 거부반응

[0134] 이식된 고체 기관의 수용체는 조직부합성 미스매치로 인한 동종이식편의 급성 또는 만성 거부반응을 나타낼 수 있다. 이들 환자에서 HLA 분자 (동종항체)에 대해 지시된 항체의 생성은 T 세포에 대한 외래 항원의 제공으로부터 유발된다. 동종항체는 결합된 동종항체에 의해 지시된 면역 복합체의 형성, 보체 고정, 및 항체 매개된 세포의 세포독성을 통해 이식편에서의 조직 손상을 매개할 수 있다. 보체 캐스케이드는 또한 내피 세포를 활성화하고 이식편 내에서 혈관병증을 유발하는 국소 인자들을 방출한다. 보체 산물인 C4d는 급성 및 만성 이식 거부반응 둘 다에서 초기 마커이며, 공공연한 병리적 변화 전에 하위-임상적 경우에서 검출될 수 있다 (Racusen and Haas, *Clin J Am Soc Nephrol* 1:415-420, 2006; Moll and Pascual, *Am J Transplantation* 5:2611-2618, 2005; Tinkam and Chandraker, *Clin J Am Soc Nephrol* 1:404-414, 2006). 환자들은 이식 전에 항-HLA 동종항체 (패널 반응성 항체)에 대해 선별된다. 환자들은 이전의 동종이식 실패, 혈액 수혈, 또는 다태임신으로 인하여 고도로 민감할 수 있다. 고도로 민감한 이식 환자에서 동종항체의 존재는 그들의 돌봄을 복잡하게 만드는데, 증가된 면역억제 치료법이 요구될 수 있고, 급성 거부반응의 기회도 높다 (Baid et al., *Curr Opin Immunol* 13:577-581, 2001). 어떤 경우에 B 세포 표적화제 (미코페놀산 또는 리툭시맵)가 사용되며, 이 치료 전략은 직접적으로 항체-분비 혈장 세포를 표적으로 하지는 않는다. 순환하는 면역글로불린을 감소시키기 위하여 또한 혈장분리관출술이 사용된다. 모든 경우에, 이식 수용체는 T 세포 표적화된 면역억제제로 치료되어 거부반응의 위험이 감소되며, 이식편에 대한 내성이 규명되기 때문에 이들 처방으로부터 서서히 "분리될" 수 있다 (Seyfort-Margolis and Turka, *J Clin Invest* 118(8):2684-2685, 2008; Taylor et al., *Crit Rev Oncol Hematol* 56:23-46, 2005; Amante and Ejercito, *Transplant Proc* 40:2274-2280, 2008).

[0135] 항체 분비 혈장 세포의 발생은 혈장 세포 생존을 지지하는 특수화된 미소환경 외에 CD4 T 세포로부터의 동종 도움을 필요로 한다 (Tarlington et al., *Curr Opin Immunol* 20:162-169, 2008). 활성화된 T 세포에 의한 사이토킨 분비는 혈장 세포의 분화 및 생존에 필요하며, 항체 반응 및 Ig 이소타입의 성질에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 쥐 및 비-사람 영상류 중에서 T 세포 의존성 항체 반응을 모니터링하기 위한 모델이 존재한다. 이들 방법은 당업자들에 의해 잘 이해될 것이다. 오브알부민, 파상풍 독소, 양 적혈구, 또는 트리니트로페닐 변형 키호울 림프 헤모시아닌과 같은 모델 펩티드 항원에 대한 일차 또는 이차 항체 반응의 역학 및 크기는 치료된 동물의 혈청에서 IgG 하위타입, IgM, IgE, 또는 IgA를 포함한 총 또는 항원-특이적 항체를 검출하는 분석법을 사용하여 모니터링된다. 어떤 모델에서 항체의 친화성 성숙이 또한 모니터링될 수 있다. 이들 모델은 T 세포에 의한 B 세포 도움을 변경시키고, 혈장 세포 분화 및 생존에 중요할 것으로 여겨지는 사이토킨을 차단하는 치료 약물의 효과를 시험하기 위해 사용될 수 있다.

[0136] 동종이식편 거부반응에 대한 연구는 많은 동물 중에서 수행된다. 예를 들어 게잡이 원숭이에서의 신장 이식 모델은 사람에서의 만성 동종항체 매개된 신장 동종이식 거부반응의 효과를 나타낼 수 있다. 동종이식을 견디는 처방이 어떤 경우에 이식 전에 수행된다. 공여체-특이적 동종항체의 존재는 미스매치된 말초혈 백혈구를 지는 수용체 혈청의 유세포 분석에 의해 모니터링되고, 보체 산물 C4d의 침착은 신장 동종이식편으로부터의 생검에서 검출된다 (Smith et al., *Am J Transplant* 6: 1790-1798, 2006; Smith et al., *Am J Transplant* 8:1-11, 2008). 급성 및 만성 이식 모델은 당업자에 의해 쥐과 중에서 수행될 수 있다.

[0137] T 세포 의존성 항체 반응의 모델 또는 동종이식편 거부반응의 모델에서 항-IL-21 항체를 투여하는 것은 동종항체 반응을 감소시키기 위해, 동종이식 거부반응의 증상을 개선하거나, 또는 고도로 민감해진 이식 환자를 포함하여 이식 수용체에 대한 이식-전 치료적 또는 내성 처방의 일부로서 항-IL-21 항체의 임상적 활용성을 평가하기 위해 사용된다.

[0138] 본 발명은 아래의 비-제한 실시예에 의해 한층 더 예시한다.

도면의 간단한 설명

[0139] 도 1은 클론 번호 362.78.1.44(78), 362.597.3(597), 362.75.1.1(75), 366.552.11(552), 366.328.10(328)로 표시되는 항체의 가변 중쇄 영역을 포함하는 아미노산 잔기의 배열을 도시한다.

도 2는 상기에서 설명된 항체의 가변 경쇄 영역을 포함하는 아미노산의 배열을 도시한다.

도 3은 IL-21 단독 및 IL-21 면역 복합체로부터 얻어진 IL-21 펩티드 서열 영역의 MALDI/TOF 질량 스펙트럼을 도시한다. IL-21의 유리 상태의 IL-21 펩티드 서열, EKKPPKEF (SEQ ID NO: 2, 잔기 129 내지 136) (m/z, 1002.5619 Da) 및 LERFKSLL (SEQ ID NO: 2, 잔기 137 내지 144) (m/z, 1005.6091 Da) (A). IL-21 mAb의 존재 하에 아미드 중수소화의 보유로 인한 펩티드 질량 변동 (B). IL-21의 유리 상태의 또 다른 IL-21 펩티드 서열 영역, KSLQKMIHQHLSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 2, 잔기 141 내지 162) (m/z, 2519.2451) (C). IL-21 mAb의 존재 하에 아미드 중수소화의 보유로 인한 부분적인 펩티드 질량 변동 (D).

도 4는 아세틸화된 및 비-아세틸화된 펩티드의 선택된 이온 크로마토그램을 도시한다. IL-21 단독으로부터 분리된 아세틸화된 TCPSCDSYEKKPPKEF (SEQ ID NO: 2, 잔기 119 내지 136) (m/z, 1986 Da)의 선택된 단일 이온 크로마토그램 (A)과 IL-21 면역 복합체의 동일한 크로마토그램 기록 (B). 중간의 질량 스펙트럼은 펩티드 덩어리 (m/z, 662.9)의 3중으로 대전된 상태이다. 세 번째 기록은 IL-21 단독으로부터 분리된 아세틸화된 KSLQKMI (SEQ ID NO: 2, 잔기 141 내지 148)인 m/z 1018 Da에서의 펩티드의 이온의 선택된 이온 크로마토그램 (C) 및 IL-21 면역 복합체의 동일한 크로마토그램 기록 (D)을 나타낸다. 중간의 질량 스펙트럼은 펩티드 덩어리 (m/z, 509.1)의 이중으로 대전된 상태이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0140] **실시예**

[0141] 실시예 1 - IL-21 단백질 및 항체의 제조

[0142] A. 면역화 및 하이브리도마

[0143] IL-21 단백질을, 미국 특허 7,520,274호에서 설명한 대로 제조하였다. 가용성 IL-21 수용체 단백질을 미국 특허 출원 2007-0122413호 및 미국 특허 6,777,539호에서 설명한 대로 제조하였다. 항-IL-21 단클론성 항체를 쥐 항체를 생성하는 야생형 마우스에서 및 전 사람 항체 (Medarex, Princeton, NJ)를 생성하는 유전자도입 마우스에서 제조하였다. 마우스들을 사람 IL-21 단백질로 면역시켰다. 간단하게 설명하자면, 마우스를 초기에 BSA (Imject Pharmalink Immunogen Kit, Pierce)에 포함되고 제조업체의 지시대로 CpG (올리고뉴클레오타이드 쥐 TLR9 리간드 및 GM-CSF (과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, R&D, Minneapolis, MN) 및 Emulsigen[®]-P 보조제 (MVP Laboratories, INC, Omaha, NE)와 함께 투여되는 30 μ g의 정제된 재조합 IL-21 (ZymoGenetics에서 대장균에서 생성됨)을 피하 주사함으로써 면역시켰다. 초기 면역 후에, 각 마우스에게 추가로 Emulsigen[®]-P 보조제 중의 30 μ g의 IL-21을 일주일 간격으로 피하 경로를 통해 3회 제공하였다. 네 번째 면역 후 7일 후에, 마우스들을 안와 정맥총을 통해 출혈시키고, 혈액으로부터 혈청을 분리하여 IL-21에 결합하는 능력에 대해 분석하였다.

[0144] 비장세포를 수득하여 2마리의 고역가의 BALB/c 마우스 또는 유전자도입 마우스로부터 모아서 P3-X63-Ag8.653 마우스 골수종 세포에 단일 융합 과정으로 PEG 1450을 사용하여 융합시켰다 (2:1 융합 비율, 비장세포 대 골수종 세포, "Antibodies: A Laboratory Manual", E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Press). 융합 후 9일 동안 성장시킨 후, 특이한 항체-생성 하이브리도마 풀을, 태그가 붙지 않은 것과 사람 IgG Fc 태그가 붙은 재조합 IL-21 단백질을 특이한 항체 표적으로서 사용하여 다이렉트 & 캡처 ELISA에 의해 확인하였다. 포지티브 하이브리도마 풀을 추가로 수용체 결합에 대한 리간드를 차단하는 하이브리도마의 능력에 대해 분석하였는데, 그것을 IL-21 수용체 서열을 발현하는 BaF3 세포상의 정제된 재조합 IL-21 단백질의 리간드-수용체 상호작용 후의 STAT3-인산화 수준 ("인-STAT3 중화 분석")으로서 측정한다. 조직 배양 배지로부터 정제된 단클론성 항체를 그것이 수용체 서열을 발현하는 BaF3 세포 상의 정제된 재조합 IL-21의 리간드-수용체 상호작용을 차단하는 능력에 대해 특성확인하였다 ("인-STAT3 중화 분석"). "중화" 단클론성 항체를 이 방식으로 확인하였다.

[0145] "인-STAT3 중화 분석" 및 ELISA 포맷에 의해 포지티브 결과를 낳는 하이브리도마 풀을 최소한 2번 제한 희석에 의해 클론하였다. 이들 분석에서 샘플을 표준 저밀도 희석 (1세포/웰 미만으로)을 사용하여 적정하여 어떤 클론이 가장 높은 OD 판독값을 유지할 것인지를 보았다. 중화 및 적정 분석 둘 다로부터의 결과를 사용하여 각 초기 마스터 웰로부터의 두 개의 특이적인 클론을 선택하여 추가로 분석하였다. 그것들에 대해 추가 희전의 클로닝을 수행하여 배양 균질성을 확인하고, 직접 ELISA를 사용하여 선별하였다. 한 번 더 적정 분석한 후에, 두 개의 최

중 IL-21 클론을 선택하였다. 하이브리도마 클론을 2mM의 L-글루타민, 100 μ g/mL의 페니실린, 및 100 μ g/mL의 스트렙토마이신 술페이트, 및 10%의 태아 클론 I 혈청 (Hyclone Laboratories)이 첨가된 90%의 이스코브 변형 돌베코 배지의 성장 배지에서 배양하였다. 클론을 2×10^5 세포/ml로 배양물을 심고 1×10^5 및 5×10^5 세포/ml 사이에서, 37°C 및 5 내지 6% CO₂에서 유지시킴으로써 증식하였다. 세포를 후속 전달시 혈청 유리 조건에 적용시켰다. 세포를 90% 혈청, 10% DMSO에서 냉동시켜서 액체 질소 냉동기의 증기상에서 보관하였다.

[0146] 하이브리도마 클론에 의해 제조한 정제된 단클론성 항체를 묶기 (즉 각 항체가 어떠한 다른 항체의 결합을 억제할 수 있는지를 측정한다), 펩티드를 사용한 에피토프 지도화, 상대적 친화성, 및 중화를 포함하는 많은 방법으로 특성확인하였다.

[0147] 유전자도입 마우스로부터 이중성 항체를 제조하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들면 Lonberg, Nat. Biotech. 23(9):1117-25, 2005; Tomizuka et al. PNAS 97(2):722-727, 2000; 및 미국 특허 5,625,126호 참조).

[0148] 쥐과의 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 생성하는 다음의 하이브리도마를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC, Manassas, VA)에 기탁하였다: 클론 338.5.4 ATCC No. (PTA-8317), 클론 338.11.5 ATCC No. (PTA-8314), 클론 338.14.3 ATCC No. (PTA-8313), 클론 338.15.5 ATCC No. (PTA-8315), 클론 338.17.3 ATCC No. (PTA-8316), 클론 338.24.5 ATCC No. (PTA-8430), 클론 338.25.6 ATCC No. (PTA-8431), 클론 338.39.5 ATCC No. (PTA-8432), 클론 338.29.2 ATCC No. (PTA-8433), 클론 338.28.6 ATCC No. (PTA-8434).

[0149] 사람 항-사람 IL-21 단클론성 항체를 생성하는 다음의 하이브리도마를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC, Manassas, VA)에 기탁하였다. 아래의 표 1은 항체의 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL)의 완전한 아미노산 서열을 제공한다. 또한 표에는 각 항체에 대한 VH 및 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3에 대한 서열이 포함된다. 상응하는 뉴클레오타이드 서열은 서열 목록에 나타낸다. 또한 기탁에는 표 1에 있는 것만이 아니라 366.345.6.11, ATCC No. PTA-8788로 표시되는 하이브리도마가 있다.

표 1

클론 번호	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	완전한 서열
362.75.1.1.7	PTA-8791	SRTYR WG SEQ ID NO: 15	SIYRG STFYNP SLKS SEQ ID NO: 17	QSGYS GYDWF DP SEQ ID NO: 19	RASQS VSSFLA SEQ ID NO: 23	DASNR AT SEQ ID NO: 25	QQRSN WIT SEQ ID NO: 27	VH MKHLWFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGGLVKPSETLSL TCTVSGGSISRTYRWGWIRPPGKELEWIGSIYRGSTF YNPSLKRVTVSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR QSGYSGYDWFDPWGQGTLLVTVSS SEQ ID NO: 13 VH MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSFLAWYQKPGQAPRLIYDASNRATGIP ARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWITFGQ GTRLEIK SEQ ID NO: 21

클론 번호	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	완전한 서열
362.78.1. 44	PTA- 8790	SYGMH SEQ ID NO: 31	FIWYD GSDKY YADSV KG SEQ ID NO: 33	DGDSS DWYGD YYFGM DV SEQ ID NO: 35	RASQS VSSSYL A SEQ ID NO: 39	GASSR AT SEQ ID NO: 41	QQYGS WT SEQ ID NO: 43	VH MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPRSLR LSCAASGFTSSYGMHWVROAPGKLEWVAFIWDGSD KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRADTA CARDGSDSDWYGDYFYGMDVWGQGTITVSS SEQ ID NO: 29 VL METPAQLLLFLLLLWLPDITTEIVLTQSPGTLISLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLIYGASSRATGIP DRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSWTFGQ GTKVEIK SEQ ID NO: 37

[0151]

클론 번호	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	완전한 서열
362.597. 3.15	PTA- 8786	TYGMH SEQ ID NO: 47	FIWYD GSDKY YADSV KG SEQ ID NO: 49	DGDSS DWYGD YYFGM DV SEQ ID NO: 51	RASQS VSSSYL A SEQ ID NO: 55	GASSR AT SEQ ID NO: 57	QYGS WT SEQ ID NO: 59	VH MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWYDGS DKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGSDSWYGDYYFGMDVWGQGTITVTVSS SEQ ID NO: 45 VL METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLIYGASSRATGIP DRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYVYQQYGSWTFGQ GTKVEIK SEQ ID NO: 53

[0152]

클론 번호	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	완전한 서열
366.328. 10.63	PTA- 8789	SYSMN SEQ ID NO: 63	SITSGS YYIHY ADSVK G SEQ ID NO: 65	ERGWG YYGMD V SEQ ID NO: 67	RASQDI DSALA SEQ ID NO: 71	DASSLE S SEQ ID NO: 73	QQFNS YPYT SEQ ID NO: 75	VH MELGLRWVFLVAILEGVQCEVOLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFIFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSITSGSYYIH YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCV RERGWGYYGMDVWGQGTITVSS SEQ ID NO: 61 VL MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLASVGD RVTTTCRASQDIDSALAWYQQKPGKAPKILIHDAASSLESG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPYTF GQGTKLEIK SEQ ID NO: 69

클론 번호	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	완전한 서열
366.552.11.31	PTA-8787	SDFWG SEQ ID NO: 79	YISSRG STNYN- PSLKR SEQ ID NO: 81	SAGVT DFDF SEQ ID NO: 83	RASQGI SSWLA SEQ ID NO: 87	VASSLQ S SEQ ID NO: 89	QOANS FPLT SEQ ID NO: 91	<u>VH</u> MKHLWFFLLLVAAPRVVLNQVQLQESGPGLVKPSSETLS LTCVSGGSSSDFWGWRQPPGKGLWIGYISSRGSTNY NPSLKRRTVISVDTSRNQFSLKLSVTAADTA VYYCARS AGVTDFDFWGGQGLVTYSS SEQ ID NO: 77 <u>VL</u> MDMMVPAQLLGLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVG DRVTTCRASQGISSWLA WYQHKGKAPKLLIYVASSLQ SGVPSRFSGSGGTDFLTITSLQPEDFATYCYCQANSFPL TFGGGKVEIK SEQ ID NO: 85

[0154]

[0155]

1B. 362.78-CHO를 제조하기 위한 포유류 셀라인에서 클론 362.78.1.44 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자의 발현

[0156]

사람 항-사람 IL-21 단클론성 항체 (하이브리도마 클론 362.78.1.44로부터 유도됨)를 CHO 세포에서 두 개의 발현 카세트를 사용하여 발현시켰다. VH 사슬을 변형된 사람 IgG1 불변 영역에 융합시켰다. 변형된 IgG1, IgG1.1은 5개의 아미노산 치환을 함유하여 이펙터 기능을 감소시켰다. 사람 항-사람 IL-21 중쇄를 내부 리보솜 유입부위 (IRES) 서열을 포함하는 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 선택성 마커에 연결시켰다. 사람 항-사람 IL-21 중쇄 및 DHFR 선택성 마커의 발현은 사람 사이토메갈로바이러스 (CMV) 인핸서와 골수증식성 육종 바이러스 (MPSV) 인핸서/프로모터의 융합물로 이루어진 구성성 합성 프로모터에 의해 지시되었다. 유인원 바이러스 40 (SV40) 폴리아데닐화 신호를 사용하여 DHFR 선택성 마커의 단부에서 전사를 종결시켰다. VL 사슬을 사람 면역글로불린 카파 불변 영역에 융합시켰다. 사람 항-사람 IL-21 경쇄를 IRES 서열이 있는 퓨로마이신 내성 (puroR) 선택성 마커에 연결시켰다. 사람 항-사람 IL-21 경쇄 및 puroR 선택성 마커의 발현은 사람 CMV 인핸서와 MPSV

인헨서/프로모터의 융합물로 구성된 구성성 합성 프로모터에 의해 지시되었다. SV40 폴리아데닐화 신호를 사용하여 puroR 선택성 마커의 단부에서 전사를 종결시켰다. 사람 항-사람 IL-21 중쇄 및 경쇄 발현 카세트를 CHO DXB-11 숙주 세포에 함께 형질전환시켰다. 메토틱세이트 선택 후에 퓨로마이신 선택을 하여 사람 항-사람 IL-21 단클론성 항체의 안정한 발현을 고수준으로 얻었다. IL-21 mAb 클론 362.78.1.44의 CHO-발현된 버전을 이하의 실시예에서 "362.78-CHO"로 언급할 것이다.

[0157] 실시예 2 - 항-IL-21 단클론성 항체는 사람 IL-21 단백질 및 펩티드에 결합한다

[0158] 2A. 펩티드의 결합 및 중화

[0159] 항-사람 IL-21 결합 및 중화 단클론성 항체의 사람 IL-21, 돌연변이 사람 IL-21 단백질, 및 사람 IL-21 서열 유도된 합성 펩티드에 결합하는 능력을 직접 ELISA 분석 포맷으로 증명하였다.

[0160] 다음의 펩티드를 사용하였다:

[0161] 펩티드 #1 (SEQ ID NO:3) pyroGlu GQDRHMIRMRLIDIVDQLKC;

[0162] 펩티드 #2 (SEQ ID NO:4) NDLVPEFLPAPEDVETNC;

[0163] 펩티드 #3 (SEQ ID NO:5) NVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTC;

[0164] 펩티드 #4 (SEQ ID NO:6) CDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLS.

[0165] 재조합 사람 IL-21 (SEQ ID NO:2), 사람 IL-21 서열 유도된 합성 펩티드, 및 재조합 돌연변이 사람 IL-21 (SEQ ID NO:7)을, 별도로 96 웰 폴리스티렌 ELISA 플레이트의 표면 위에, 코팅 완충액 (0.1M Na₂CO₃, pH 9.6)중의 1 µg/mL의 농도로 100 µL/웰의 부피로 고정시켰다. 플레이트를 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 미결합 단백질을 흡인하고, 플레이트를 300 µL/웰의 세척 완충액 (0.137M NaCl, 0.0022M KCl, 0.0067M Na₂HPO₄, 0.0020M KH₂PO₄, 0.05% v/w 폴리스orb에이트 20, pH 7.2로서 규정된 PBS-트윈)으로 2회 세척하였다. 웰을 200 µL/웰의 차단 완충액 (PBS-트윈 + 1% w/v 우혈청 알부민 (BSA))으로 1시간 동안 차단한 후, 플레이트를 세척 완충액으로 2회 세척하였다. 항체 희석액을 5%의 태아 우혈청 (FBS)/이스코브스 변형 둘베코 배지 (IMDM)로 제조하여 1ug/ml로 조정하였다. 그런 다음 각 항체 희석액의 2개 한 벌 샘플을 분석 플레이트에 100 µL/웰로 옮겨서 항-사람 IL-21 단백질에 결합시켰다. 주변 온도에서 1시간 동안 인큐베이션한 후에 웰을 흡인하고 플레이트를 상기에서 설명한 것과 같이 2회 세척하였다. 양고추냉이 과산화효소 (HRP) 표지된 염소 항 마우스 IgG, Fc 특이적 또는 염소 항 쥐 IgG, Fc 특이적, 또는 염소 항 사람 IgG, Fc 특이적 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)을 5% FBS/IM의 배지로 1:5000으로 희석하여 각 웰에 100 µL/웰로 첨가하고, 플레이트를 주변 온도에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 미결합 HRP 포함된 항체를 제거한 후에 플레이트를 5회 세척하고, 각 웰에 100 µL/웰의 테트라 메틸 벤지딘 (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD)을 첨가한 후, 플레이트를 주변 온도에서 3분 동안 인큐베이션하였다. 색 발생을 100 µL/웰의 450nm TMB 중지 시약 (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD)을 첨가함으로써 중지시키고, 웰의 흡광도를 450nm에서 Molecular Devices Spectra MAX 340 기기상에서 판독한다.

표 2

사람 IL-21 단백질, 돌연변이 사람 IL-21 단백질 및 사람 IL-21 서열 유도된 펩티드에 대한 단클론성
마우스 항-사람 IL-21 항체 반응성

마우스 항- 사람 IL-21 Ab 클론 번호	결합 (B) 중화 (N) 이소타입	정제된 Ab Lot#	IL-21	펩티드 1	펩티드 2	펩티드 3	펩티드 4	IL-21 돌연변이
338.5.4	B/N	E10274	+/-	0	0	0	0	+/-
	IgG1							
338.11.5	B	E10276	+++	0	+++	0	0	+++
	IgG1							
338.14.3	B	E10273	+/-	0	0	0	0	0
	IgG1							
338.15.5	B	E10275	+++	0	0	0	+++	0
	IgG1							
338.28.6	B	E10329	+++	0	0	0	0	+
	IgG1							
338.39.5	B	E10330	+++	0	0	+++	0	+++
	IgG1							
반응성 :		없음 (0)	약함 (+)	중간 (++)	강함 (+++)			

[0166]

표 3

사람 IL-21 단백질, 돌연변이 사람 IL-21 단백질 및 사람 IL-21 서열 유도된 펩티드에 대한 단클론성
사람 항-사람 IL-21 항체 반응성

사람 항- 사람 IL-21 Ab 클론 번호	결합 (B) 중화 (N) 이소타입	정제된 Ab Lot#	IL-21	펩티드 1 N- 말단	펩티드 2	펩티드 3	펩티드 4 C-말단	IL-21 돌연변이
362.75.1.1	B/N	E10364	+++	0	0	0	+++	0
	IgG							
362.78.1.44	B/N	E10554	++	0	0	0	0	+
	IgG							
362.597.3	B/N	E10366	+++	0	0	0	0	++
	IgG							
366.328.10	B/N	E10416	+++	0	0	0	0	+++
	IgG							
366.345.6.11	B	E10476	+++	0	0	0	0	++
	IgG							
366.552.11	B/N	E10435	+++	0	0	0	++	0
	IgG							
반응성 :		없음 (0)	약함 (+)	중간 (++)		강함 (+++)		

[0167]

[0168]

2B. 표면 플라즈몬 공명 (Biacore)에 의한 사람 IL-21 및 게잡이 원숭이 IL-21에 대한 항-사람 IL-21 단클론성 항체 362.78-CHO의 결합 친화성의 측정

[0169]

항-IL-21 단클론성 항체 362.78-CHO를, 사람 재조합 IL-21 및 게잡이 원숭이 재조합 IL-21에 대한 그것의 결합 친화성에 대해 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 평가하였다.

[0170]

친화성 측정: 역학 속도 상수 및 평형 분해 상수를, 항-사람 IL-21 단클론성 GKC에 362.78-CHO와 사람 IL-21 및 게잡이 원숭이 IL-21과의 상호작용에 대해 표면 플라즈몬 공명을 통해 측정하였다. 결합 속도 상수 (k_a ($M^{-1}s^{-1}$))는 항원-항체 복합체 형성의 속도를 반영하는 값이다. 분해 속도 상수 (k_d (s^{-1}))는 이 복합체의 안정성을 반영하는 값이다. 분해 속도 상수를 결합 속도 상수로 나눔으로써 (k_d/k_a) 평형 분해 상수 (K_D (M))가 얻어진다. 이 값은 상호작용의 결합 친화성을 설명한다. 유사한 K_D 를 가지는 항체는 광범위하게 달라질 수 있는 결합 및 분해 속도 상수를 가질 수 있다. 따라서 항체의 k_a 및 k_d 를 둘 다 측정함으로써 항체-항원 상호작용의 친화성을 보다 독특하게 설명하는 것이 촉진된다.

[0171]

재료 및 방법: 결합 역학 및 친화성 연구를 Biacore T100™ 시스템 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 상에서 수행하였다. Biacore T100™에 대한 방법을 BIACORE T 100™ 컨트롤 소프트웨어, v 1.1.1을 사용하여 프로그래밍하였다. 이들 실험에 대해 362.78-CHO 항체를 염소 항-사람 IgG Fc-감마 항체 (Jackson immunoResearch, West Grove, PA)를 통해 CM4 센서 칩 위에 포획시키거나, 또는 PBS pH 7.4의 완충액 중의 술포-NHS-LC-비오틴

(Pierce, Rockford, IL)의 1:100 중량비로 최소한으로 비오틴화한 다음, 스트렙타아비딘 (SA) 칩 상에 포획시켰다. 모든 결합 실험을 25℃에서 10mM의 HEPES, 300mM의 NaCl, 5mM의 CaCl₂, 0.05% 계면활성제 P20 (Biacore), 1mg/mL의 우혈청 알부민, pH 8.0의 완충액 중에서 수행하였다.

[0172]

DUATH 항-사람 IgG Fc-감마 항체를 사용한 실험을 위해, 포획 항체를 10mM의 아세트산 나트륨 pH 5.0 중에서 50 µg/mL의 농도로 희석한 후, 아민 결합 화학 (EDC:NHS)을 사용하여 CM4 센서 칩의 4개의 모든 흐름 세포에 공유 고정시켰다. 항체를 고정시킨 후에 남아있는 흐름 세포 상의 활성 부위를 1M의 에탄올아민으로 차단하였다. 대략 3500RU의 포획 항체 밀도를 얻었다. 항-IL-21 항체 362.78-CHO를 세 개의 상이한 밀도 (25에서 150RU의 범위)로 CM4 칩의 흐름 세포 2, 3 및 4위에 포획시켰다. 고정된 표면에 대한 362.78-CHO의 포획은 10 µL/분의 유속으로 수행하였다. Biacore 기기는 센서 칩 표면에 결합된 단백질 덩어리를 측정하고, 그로써 시험 항체의 포획을 각 사이클에 대해 증명하였다. 사람 재조합 IL-21 또는 게잡이 원숭이 재조합 IL-21 (ZymoGenetics)의 연속 희석액을 40nM 에서 0.003nM (1:5 연속 희석)로 제조하였다. 연속 희석액을 표면 위에 주입하고, 센서 칩상에 포획된 362.78-CHO 항체에 특이하게 결합하도록 놓아두었다. 각각의 IL-21 항원 농도를 2개 한 벌로 주사하는 것은 6.5 또는 7분의 결합시간과 10, 15, 또는 60분의 분해 시간으로 수행하였다. 역학 결합 연구를 50 µL/분의 유속으로 수행하였다. 사이클 사이에 흐름 세포를 20mM의 염산으로 세척하여 표면을 재생하였다. 이 세척 단계로 포획된 시험 항체와 모든 결합 항원이 둘 다 고정된 항체 표면으로부터 제거되었다. 362.78-CHO 항체를 계속해서 다음 사이클에서 다시 포획시켰다.

[0173]

최소한으로 희석된 362.78-CHO를 사용한 실험에 대해서는, 비오틴화된 항체를 세 개의 상이한 밀도 (150에서 1200RU의 범위)로 SA 칩의 흐름 세포 2, 3 및 4위에 포획시켰다. 표면에 대한 비오틴화된-362.78-CHO의 포획은 10 µL/분의 유속으로 수행하였다. 사람 재조합 IL-21 또는 게잡이 원숭이 재조합 IL-21 (ZymoGenetics)의 연속 희석액을 50nM 에서 0.001nM (1:4 연속 희석)로 또는 40nM 에서 0.003nM (1:5 연속 희석)로 제조하였다. 이들 연속 희석액을 표면 위에 주입하고, 센서 칩상에 포획된 362.78-CHO 항체에 특이하게 결합하도록 놓아두었다. 각각의 IL-21 항원 농도를 2개 한 벌로 주사하는 것은 6.5 또는 7분의 결합시간과 10, 15, 또는 60분의 분해 시간으로 수행하였다. 역학 결합 연구를 50 µL/분의 유속으로 수행하였다. 사이클 사이에 흐름 세포를 20mM의 염산으로 세척하여 표면을 재생하였다. 이 세척 단계로 모든 결합 항원이 고정된 항체 표면으로부터 제거되었다. 세척 사이클로는 센서 표면으로부터 비오틴화된 362.78-CHO 항체를 제거하지 못하였고, 항체는 계속해서 다음 항원 샘플을 결합하는 데 활용하였다.

[0174]

데이터를 BIACORE T100™ 평가 소프트웨어 (버전 1.1.1)을 사용하여 얻었다. 데이터를 참조 흐름 세포와 블랭크 주사를 뺀으로써 처리하였다. 재생 단계가 주입 순서를 통해 일관된 결합 표면을 제공하는 것을 보장하기 위해 바탕 안정성을 평가하였다. 2회 한 벌의 주입 곡선을 재생성에 대해 체크하였다. 일가 IL-21의 이가 항체에 대한 결합을 토대로, 1:1 결합 상호작용 모델을 적절한지 측정하였다. 세 개의 흐름 세포 (FC2-1, FC3-1, FC4-1)로부터의 참조를 뺀 결합 곡선을 1:1 결합 모델에 포괄적으로 맞추고, 이때 다중 Rmax와 RI를 0으로 설정하였다. 데이터는 1:1 결합 모델에 잘 맞았고, 실험적인 결합 곡선과 이론적인 결합 곡선 사이가 잘 일치하였다. 맞춤과 관련된 χ^2 및 표준 에러는 낮았다. 나머지에 기울기는 없었다.

[0175]

결과: 362.78-CHO와 사람 IL-21의 상호작용에 대해 데이터를 4개의 별도의 실험으로부터 편집하였다. 다중 실험의 k_a 는 $3E+07$ 에서 $5+07$ ($M^{-1}s^{-1}$)까지의 범위였고, k_d 는 $3E-06$ 에서 $3E-05$ (s^{-1})까지였다. 계산된 K_D 는 $0.9E-13$ 에서 $8E-13(M)$ 까지였다.

[0176]

실시예 3 - 종 교차 반응성 실험

[0177]

쥐 또는 게잡이 원숭이 IL-21 단백질 또는 사람 IL-21 서열 유도된 합성 펩티드와 교차 반응하고 결합하는 항-사람 IL-21 항체의 능력의 측정

[0178]

종 교차-반응성 연구는 치료 길항제 개발 전략을 위한 특이성을 증명하기 위해 중요할 수 있다. 본원에서 설명된 항-사람 IL-21 결합 및 중화 실험이 쥐 또는 게잡이 원숭이 IL-21에 교차 반응하고 결합하는지를 측정하기 위해 (따라서 게잡이 원숭이 또는 마우스를 생존 시험 종으로서 판단하기 위해), 다양한 분석 포맷으로 재조합 사람, 쥐 및 게잡이 원숭이 IL-21에 대한 항체의 비교할만한 결합을 증명하는 것이 필요하였다. 단클론성 항체의 결합을 시험하기 위한 방법들 중 하나는 면역블롯 (웨스턴 블롯) 분석에서의 항체의 성능에 의한 것이다. 오브알부민, 또는 무관한 대조 사이토킨, 재조합 사람 IFN- λ (ZymoGenetics)에 포함된 재조합 사람 IL-21 (SEQ ID NO:2), 재조합 쥐 IL-21 (SEQ ID NO:11), 재조합 게잡이 원숭이 IL-21 (SEQ ID NO:9), 사람 IL-21 서열 유도된

합성 펩티드: 펩티드 #1 pyr30-K50 (Seq ID 3), 펩티드 #2 N54-C71 (Seq ID NO:4), 펩티드 #3 N97-C122 (Seq ID NO:5), 펩티드 #4 C125-S153 (Seq ID NO:6)을 4 내지 12%의 BisTris 폴리아크릴아미드 겔 (Invitrogen, Inc.)을 사용하여 도데실 황산나트륨-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)을 수행하고, 표준 방법 및 25mM Tris, 186mM 글리신 및 40% 메탄올을 함유하는 완충액을 사용하여 니트로셀룰로오스 막에 옮겼다.

[0179]

웨스턴 블롯에 대해서는 막의 비-특이적 부위들을 20mM의 Tris, pH 7.4, 0.5mM EDTA, 0.5% IGEPAL CA-630, 150mM NaCl, 0.25% 젤라틴, 및 1% 카제인 가수분해물 차단 용액을 함유하는 완충액 (Western Blocking Reagent, Roche Diagnostics, Inc., Basel Switserzerland) (차단 완충액)으로 차단하였다. 그런 다음 막을 2시간 동안 실온에서 차단 완충액 중에서 정제된 단클론성 항체 (10ng/ml 또는 100ng/ml)와 함께 인큐베이션한 후 2시간 동안 과산화효소 포함된 당나귀 항-사람 IgG (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)와 함께 인큐베이션하였다. 막을 카제인 가수분해물이 결핍된 Tris/EDTA/IGEPAL/NaCl/젤라틴 차단 완충액으로 5회 세척하고, SUPERSIGNAL™ DuraWest 루미놀/인핸서/과산화효소 용액 (Pierce, Rockford, IL)으로 전개시켜서 화학발광을 검출하였다. 블롯을 X-선 필름 기초 표준 방법을 사용하여 가시화하였다.

표 4

웨스턴 블롯 분석에서 단클론성 사람 항-사람 IL-21 항체 반응성

클론 *	Hu IL-21	Cyno IL-21	Mu IL-21	+Hu IL-21 펩티드 A1744	+Hu IL-21 펩티드 A1750	+Hu IL-21 펩티드 A1751	+Hu IL-21 펩티드 A1752
362.35.1.2	0	0	0	0	0	0	0
362.37.3	+++	+++	+++	0	0	0	0
362.75.1.1	+++	+++	+++	0	0	0	+++
362.78.1	++	++	0	0	0	0	0
362.108.1.2	0	0	0	0	0	0	0
362.172.2	+++	+++	+++	0	0	0	0
362.216.2	0	+/-	0	0	0	0	0
362.256.1	0	0	0	0	0	0	0
362.303.1.1	0	0	0	0	0	0	0
362.378.1	+++	+++	+++	0	0	0	+
362.468.3	+/-	+	0	0	0	0	0
362.564.1.4	++	++	0	0	0	0	0
362.597.3	++	++	+/-	0	0	0	0
362.632.2	+++	+++	+++	0	0	0	+++
366.328.10	+	+	0	0	0	0	0
366.342.8	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.345.6.11	0	0	0	0	0	0	0
366.353.11.12	+	++	0	0	0	0	0
366.398.36	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.453.30	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.462.24.10	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.479.13	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.552.11	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.565.7	0	0	0	0	0	0	0
366.617.7	+++	+++	+++	0	0	0	0
366.618.20	++	++	+	0	0	0	0
367.752.5	+++	+++	+++	0	0	0	0
368.626.24	+++	+++	++	0	0	0	0
반응성	없음 (0)	약함 (+)	중간 (++)	강함 (+++)	*IFN-λ로 관찰된 신호 없음 +펩티드가 오브알부민에 결합되었음		

[0180]

[0181] 실시예 4 - 항-사람 IL-21 항체의 사람 γ c-패밀리 사이토킨 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15에 교차반응하고 결합하는 능력의 평가

[0182] 특이한 항체의 다른 중요한 특징은 항체가 표적 단백질(들)에 결합하고 길항하지만, 관련된 단백질(비-표적)에는 유의미하게 결합하지 않는 능력이다. 관련된 사이토킨에 결합하는 항-사람 IL-21 항체의 능력을 웨스턴 블롯 포맷으로 시험하였다. γ c-사이토킨 패밀리의 모든 구성원의 샘플을 얻어서 SDS-PAGE에서 작동시킨 후 블롯팅을 위해 니트로셀룰로오스 막에 옮겼다. 재조합 사람 IL-2 (202-IL/CF), 사람 IL-4 (204-IL/CF), 사람 IL-7 (207-IL/CF), 사람 IL-9 (209-IL/CF), 사람 IL-15 (247-IL/CF) (모두 R&D Systems (Minneapolis, MN)로부터 얻음), 사람 IL-21 (ZymoGenetics) 및 사람 IFN- λ (미국 특허 6,927,040호; 7,252,969호)를 사용하여 항체의 특이성을 평가하였다. 시험한 모든 항체는 γ c-패밀리 사이토킨에 대한 바탕값 이상의 검출가능한 결합을 나타내지 않았고, 단 사람 IL-21만이 분명한 결합을 나타냈는데, 이것은 이들 항체를 사용한 이전의 웨스턴 블롯 (실시예 3)과 일치한다.

표 5

웨스턴 블롯에서 사이토킨에 대한 단클론성 항-사람 IL-21 항체 반응성

클론	Hu IL-2	Hu IL-4	Hu IL-7	Hu IL-9	Hu IL-15	Hu IL-21	Hu IFN λ 네거티브 대조표준
362.597.3	0	0	0	0	0	++	0
362.75.1.1	0	0	0	0	0	+++	0
362.78.1	0	0	0	0	0	+	0
362.564.1.4	0	0	0	0	0	++	0
366.328.10.63	0	0	0	0	0	++	0
366.552.11.31	0	0	0	0	0	+++	0
366.617.7	0	0	0	0	0	+++	0
반응성 :	없음 (0)	약함 (+)	중간 (++)	강함 (+++)			

[0183]

표 6

웨스턴 블롯 분석에서 단클론성 마우스 및 쥐 항-사람 IL-21 항체 반응성

클론 *	Hu IL-21	Cyno IL-21	Mu IL-21	+Hu IL-21 펩티드 A1744	+Hu IL-21 펩티드 A1750	+Hu IL-21 펩티드 A1751	+Hu IL-21 펩티드 A1752
마우스 클론							
338.5.4	0	0	0	0	0	0	0
338.11.5	+++	+++	+/-	0	+++	0	0
338.14.3	+	+	0	0	0	0	0
338.15.5	+++	+++	++	0	0	0	+++
338.17.3	+++	++	+	0	0	++	0
338.24.5	+++	+	0	0	0	++	0
338.25.6	+++	+++	+++	0	0	0	0
338.28.6	+/-	0	0	0	0	0	0

[0184]

클론 *	Hu IL-21	Cyno IL-21	Mu IL-21	+Hu IL-21 펩티드 A1744	+Hu IL-21 펩티드 A1750	+Hu IL-21 펩티드 A1751	+Hu IL-21 펩티드 A1752
338.29.2	+++	+++	.0	+++	0	0	0
338.39.5	+++	+++	0	0	0	0	0
쥘 클론							
272.19.1.1.4.2	+++	+++	+++	++	0	0	0
272.21.1.3.4.2	+++	+++	+	0	0	0	0
반응성	없음 (0)	약함 (+)	중간 (++)	강함 (+++)	*IFN-λ 로 관찰된 신호 없음		+펩티드가 오브알 부민에 결합되었음.

[0185]

[0186]

실시예 5 - 경합 에피토프 묶음 연구

[0187]

에피토프 묶음 실험을 수행하여 항-IL-21 단클론성 항체가 사람 IL-21에 동시에 결합할 수 있는지를 측정하였다. 사람 및 마우스 항체 둘 다를 준비하였다. 항원상의 동일한, 또는 중첩하는 결합 부위 (에피토프) 에 결합하는 항-IL-21 단클론성 항체들은 동시에 결합할 수 없고 기능상 단일 패밀리 또는 "에피토프 묶음"으로 분류된다. 항원상의 동일한 결합 부위에 결합하지 않는 항-IL-21 단클론성 항체들은 동시에 결합할 수 있고, 별도의 패밀리 또는 "에피토프 묶음"으로 분류된다. 실험을 BIACORE T100™ 기기를 사용하여 수행하였다. 에피토프 묶음 실험을 가용성, (ZymoGenetics) 사람 IL-21을 항원으로 사용하여 수행하였다.

[0188]

에피토프 묶음 연구를 BIACORE T100™ 시스템 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 상에서 수행하였다. 방법은 BIACORE T100™ 조절 소프트웨어, v 1.1.1을 사용하여 프로그램하였다. 개별적인 항-IL-21 단클론성 항체를 BIACORE CM4 센서 칩의 별도의 흐름 세포에 공유결합에 의해 고정시켰다. 계속해서 IL-21 항원을 주입하고 센서 칩에 고정된 단클론성 항체에 특이하게 결합되도록 놓아두었다. BIACORE 기기는 센서 칩 표면에 결합된 단백질 덩어리를 측정하고, 그로써 각 시험 사이클에 대해 시험 쌍의 일차 항체의 고정 및 일차 항체에 대한 IL-21 항원의 특이한 결합을 증명하였다. IL-21 항원이 결합된 후에, 이차 항-IL-21 단클론성 항체를 주입하고 결합하도록 놓아두었다. 만약 이차 항-IL-21 단클론성 항체가 일차 단클론성 항체와 동시에 항원에 결합할 수 있다면 칩 표면의 덩어리의 증가, 또는 결합이 검출되었다. 그러나 만약 이차 항-IL-21 단클론성 항체가 일차 단클론성 항체와 동시에 항원에 결합할 수 없다면, 추가의 덩어리나 결합은 검출되지 않았다. 자체에 대해 시험된 각 항-IL-21 단클론성 항체를 네거티브 대조표준으로서 사용하여 바탕 (결합 없음) 신호의 수준을 규명하였다.

[0189]

일련의 실험을, 사람 IL-21에 대해 면역된 마우스의 비장의 하이브리도마 융합물로부터 얻어진 정제된 항-IL-21 단클론성 항체의 결합 특성을 시험하기 위해 수행하였다. 시험 쌍의 첫 번째 항-IL-21 단클론성 항체를 EDC:NHS 를 사용하여 대략 1000 RU의 밀도로 공유결합에 의해 고정시켰다. 계속해서 시험 쌍의 이차 항체를 5μg/mL (대략 32.2nM)로 희석하고, 포획된 IL-21 항원에 결합하도록 하였다. 항-IL-21 단클론성 항체의 하위셋을 이차 항-IL-21 단클론성 항체의 전체 패널과 함께 일차 항체로서 시험하였다. 결합 실험을 30μL/분의 유속으로 25℃ 에서 수행하였다. 이들 연구에 대한 완충액은 10mM의 Hepes, 0.3M의 NaCl, 0.05%의 계면활성제 P20, 5mM의 CaCl₂, 1mg/mL의 우혈청 알부민, pH 8.0으로 구성되었다. 각 사이클 사이에 칩 상의 항체를 20mM의 염산으로 재생시켰다. 데이터를 BIACORE T100™ 평가 소프트웨어 (버전 1.1.1)를 사용하여 편집한 후 EXCEL™ 에 로딩하여 추가로 데이터를 처리하였다.

[0190]

정제된 항-IL-21 단클론성 항체를 특성확인하고, 에피토프 묶음으로 배정하였다. BIACORE에 의해 기록된 신호 (RU, 반응 유닛)는 직접 센서 칩 표면상의 덩어리에 상관관계가 있다. 일단 네거티브 대조표준과 관련된 바탕 신호 (RU)의 수준이 규명되면 (동일한 항-IL-21 단클론성 항체가 일차 및 이차 두 가지의 항체로서 사용됨), 묶음 결과를 포지티브 또는 네거티브 결합으로서 기록하였다. 포지티브 결합은 두 개의 상이한 항-IL-21 단클론성 항체가 동시에 항원에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다. 네거티브 결합은 두 개의 상이한 항-IL-21 단클론성 항체가 항원에 동시에 결합할 수 없음을 나타낸다. 이 실험에서 포지티브와 네거티브 반응값의 차이는 상당하였고, 따라서 그것을 이용하여 항-IL-21 단클론성 항체를 6개의 구별되는 패밀리, 또는 에피토프 묶음으로

로 분명하게 배정하였다. 첫 번째 에피토프 묶음은 예를 들면 클론 338.5.4; 362.78.1; 및 362.597.3으로부터의 항-IL-21 단클론성 항체로 표시하였다. 두 번째 묶음은 예를 들면 클론 338.14.3; 362.75.1.1; 및 366.328.10으로부터의 항-IL-21 단클론성 항체로 표시하였다. 추가로 세 번째 묶음은 묶음 #1과 묶음 #2 항체의 결합 에피토프와 중첩하는 것으로 밝혀졌다. 그것은 예를 들면 클론 366.552.11로부터의 단클론성 항체로 표시하였다. IL-21을 중화하는 항체는 이들 세 묶음의 각각에서 발견된다.

[0191] 세 개의 추가의 에피토프 묶음을 확인하였다. 이들 묶음은 각각 예를 들면 하이브리도마 클론 366.345.6.11 (묶음 #4), 338.28.6 (묶음 #5), 및 338.39.5 (묶음 #6)로부터의 단클론성 항체로 표시하였다. 이들 세 개의 묶음에서 확인된 항체는 사람 IL-21 생체활성을 중화하지 않는다.

[0192] 실시예 6 - 가용성 수용체 경합 연구

[0193] 항-사람 IL-21 단클론성 항체가 IL-21 가용성 수용체와 동시에 IL-21에 결합할 수 있는지를 측정하기 위하여 경합 실험을 수행하였다. 항원 상의 동일한, 또는 중첩하는 결합 부위 (에피토프)에 대해 가용성 수용체와 경합하는 항-사람 IL-21 단클론성 항체는 동시에 결합할 수 없다. 항원 상의 동일한 결합 부위에 대한 가용성 수용체와 경합하지 않는 항-IL-21 단클론성 항체는 동시에 결합할 수 있다. 경합 실험을 항원으로서 가용성 재조합 사람 IL-21을 사용하여 수행하였다. IL-21 항원을 IL-21 가용성 수용체와 경합하기 전에 단클론성 항체에 결합하도록 허용하였다. 두 버전의 IL-21 가용성 수용체 (둘 다 ZymoGenetics 제품)를 이들 연구에서 단클론성 항체 분석에 대해 활용하였다: 한 버전의 수용체는 사람 면역글로불린으로부터 유도된 Fc 분자에 융합된 IL-21 수용체의 세포외재성 도메인으로 구성된 단일이량체 수용체 (IL-21R-Fc)로 이루어진다. 두 번째 가용성 수용체 형태는 공동 소유의 미국 특허 6,777,539호에서 설명된 것과 같은, 사람 면역글로불린으로부터 유도된 Fc 분자에 융합된 IL-21 수용체의 세포 외재성 도메인을 포함하는 한 하위유닛과 사람 면역글로불린으로부터 유도된 Fc 분자에 융합된 공동 사슬의 세포외재성 도메인을 포함하는 두 번째 하위유닛으로 구성되는 이종이량체 수용체 (IL-21R/c-Fc)였다.

[0194] 경합 연구를 BIACORE T100™ 시스템 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 상에서 수행하였다. 방법은 BIACORE T100™ 조절 소프트웨어, v 1.1.1을 사용하여 프로그램하였다. 개별적인 항-IL-21 단클론성 항체를 BIACORE CM4 센서 칩의 별도의 흐름 세포에 공유결합에 의해 고정시켰다. 계속해서 IL-21 항원 (SEQ ID NO:2)을 주입하고 센서 칩에 고정된 단클론성 항체에 특이하게 결합되도록 허용하였다. Biacore 기기는 센서 칩 표면에 결합된 단백질 덩어리를 측정하고, 그로써 각 시험 사이클에 대해 일차 항체의 고정 및 일차 항체에 대한 IL-21 항원의 특이한 결합을 증명하였다. IL-21 항원이 결합된 후에, 가용성 수용체를 주입하고 결합하도록 놓아두었다. 만약 가용성 수용체가 일차 단클론성 항체와 동시에 항원에 결합할 수 있다면 칩 표면의 덩어리의 증가, 또는 결합이 검출되었다. 그러나 만약 가용성 수용체가 일차 단클론성 항체와 동시에 항원에 결합할 수 없다면, 추가의 덩어리나 결합은 검출되지 않았다. 자체에 대해 시험된 각 항-IL-21 단클론성 항체를 네거티브 대조표준으로서 사용하여 바탕 (결합 없음) 신호의 수준을 규명하였다. 포지티브 대조표준으로서 각 항-IL-21 단클론성 항체를 상이한 에피토프 묶음으로부터의 항-IL-21 항체에 대해 시험하여 포지티브 (결합) 신호의 수준을 측정하였다.

[0195] 일련의 실험을, 사람 IL-21에 결합하는 5개의 정제된 항-IL-21 단클론성 항체 (하이브리도마 클론 362.78.1, 366.75.1.1, 366.328.10, 366.552.11.31, 및 366.345.6.11로부터의 항체들)의 결합 특성을 시험하기 위해 수행하였다. 시험 쌍의 첫 번째 항-IL-21 단클론성 항체를 0.4M의 EDC [N-에틸-N'-(3-디에틸아미노-프로필)카보디이미드]와 0.1M의 HNS (N-히드록시숙신이미드)의 혼합물을 사용하여 대략 1000 RU의 밀도로 공유결합에 의해 고정시켰다. 항체를 고정한 후에 흐름 세포상의 활성 부위를 1M의 에탄올아민으로 차단하였다. IL-21 항원을 100nM로 희석하고, 고정된 항체의 표면위를 흐르도록 허용하였다. 계속해서 가용성 수용체를 10μg/mL로 희석하고, 포획된 IL-21 항원에 결합하도록 하였다. 결합 실험을 30μL/분의 유속으로 25℃에서 수행하였다. 이들 연구에 대한 완충액은 10mM의 HEPES, 0.3M의 NaCl, 0.05%의 계면활성제 P20, 5mM의 CaCl₂, 1mg/mL의 우혈청 알부민, pH 8.0으로 구성되었다. 각 사이클 사이에 흐름 세포를 20mM의 염산으로 세척하여 표면을 재생시켰다. 이 세척 단계로 IL-21 항원과 어떠한 결합된 가용성 수용체를 고정된 항체 표면으로부터 제거하였고, 계속해서 다음 시험 샘플의 결합을 허용하였다.

[0196] 정제된 항-IL-21 단클론성 항체를, IL-21 항원에 대한 결합에 대해 사람 IL-21 가용성 수용체와 경합하는 그것의 능력을 특성확인하였다. BIACORE에 의해 기록된 신호 (RU, 반응 유닛)는 직접 센서 칩 표면상의 덩어리에 상관관계가 있다. 일단 네거티브 대조표준과 관련된 바탕 신호 (RU)의 수준이 설정되면 (동일한 항-IL-21 단클론성 항체가 일차 및 이차 두 가지의 항체로서 사용됨), 경합 결과를 포지티브 또는 네거티브 결합으로서 기록하

었다. 포지티브 결합은 항-IL-21 단클론성 항체와 IL-21 가용성 수용체가 동시에 항원에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다. 네거티브 결합은 항-IL-21 단클론성 항체와 IL-21 가용성 수용체가 항원에 동시에 결합할 수 없음을 나타낸다. 이 실험에서 포지티브와 네거티브 반응값의 차이는 상당하였고, 따라서 그것을 이용하여 항-IL-21 단클론성 항체와 IL-21 가용성 수용체 사이의 결합을 분명하게 측정할 수 있다.

[0197]

하이브리도마 클론 362.78.1 및 366.552.11.31로부터의 단클론성 항체는 사람 IL-21 항원에 대한 결합에 대해 IL-21 가용성 수용체의 두 버전 (단일이량체 IL-21R-Fc 및 이동이량체 IL-21R/c-Fc)과 결합하였다. 하이브리도마 클론 366.328.10과 366.345.6.11로부터의 단클론성 항체는 항원에의 결합에 대해 어떠한 버전의 가용성 수용체와도 결합하지 않았다. 하이브리도마 클론 362.75.1.1로부터의 단클론성 항체는 두 형태의 가용성 수용체와 결합에 대해 부분적으로 결합하는 것으로 나타났다. 이들 연구는 단클론성 항체에 사전 결합된 IL-21 항원을 사용하여 수행하였다. 이들 항체 중 세 가지 (362.78.1, 366.328.10, 366.552.11.31)가 사람 IL-21을 중화하는 것으로 밝혀진 한편, 하이브리도마 클론 362.75.1.1 및 366.345.6.11로부터의 단클론성 항체는 분석법에 따라 매우 약하거나 사람 IL-21 생체활성을 중화시키지 못한다.

[0198]

실시예 7 - IL-21 Baf3/huIL-21R STAT3 분석

[0199]

하이브리도마 상층액과 정제된 항-IL-21 항체에 의한 IL-21 중화의 상대적 수준뿐 아니라 쥐 혈청의 중화 항-IL-21 역가를 측정하기 위해 일차 선별로서 다음의 인산화된-STAT3 생체분석을 사용하였다. IL-21 활성을 Baf3/KZ134/huIL-21R 세포에서 리간드-수용체 상호작용 후의 STAT3-인산화의 수준을 측정함으로써 측정하였다 (Spolski and Leonard, *Annu Rev Immunol.* Nov 8; 2007). 상대적인 중화 활성을 IL-21의 EC₅₀ 농도와 길항체 역가를 사용하여 인산화된-STAT3 수준의 감소를 토대로 측정하였다.

[0200]

Baf3/KZ134/huIL-21R 세포를 분석 배지 (5%의 우태아 혈청, 1x 글루타맥스, 1%의 피루브산 나트륨, 및 2 μM β-메르캅토에탄올 (모두 Invitrogen, CA 제품)이 첨가된 RPMI 1640)로 2회 세척한 후, 96-웰의 바닥이 둥근 배양 플레이트 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)에 40,000 세포/웰로 플레이트하였다. 세포를 37°C 세포 배양 인큐베이터에 넣고, 한편으로 시험 용액을 제조하였다. 이 분석에서 IL-21의 EC₅₀과 EC₉₀ 농도를 측정하기 위하여, 제조한 사람 IL-21의 연속 희석액을 분석 배지로 제조하여 별도의 96-웰 U-바닥 플레이트에 넣었다. 또는 달리 IL-21 중화에 대해 시험하기 위하여, IL-21의 EC₅₀ 농도 (33pM로 측정됨)를 IL-21-면역된 마우스 혈청의 연속 희석액, 사용한 하이브리도마 배지, 정제된 가용성 사람 IL-21R/c-Fc 또는 정제된 단클론성 항-IL-21 항체와 함께 예비인큐베이션하였다. 그런 다음 세포 플레이트와 용액 플레이트를 가슴조절된 조직 배양 챔버에서 30분 동안 37°C 및 5% CO₂에서 인큐베이션하여 평형화하였다. 30분 후에 IL-21 용액을 세포 플레이트에 전달하고 10분 동안 37°C 및 5% CO₂에서 인큐베이션함으로써 반응을 개시하였다.

[0201]

10분 인큐베이션 후에 플레이트를 얼음 위에 놓고 125 μL의 빙냉 세포 세척 완충액 (BIO-PLEX 세포 용해 키트, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA)을 각 웰에 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 그런 다음 세포를 1500rpm 및 4°C에서 5분 동안 회전시키고 배지를 흡인하였다. 세포를 용해하기 위해 50 μL/웰의 용해 완충액 (제조업체의 지시에 따라 제조됨, BIO-RAD Labs)을 각 웰에 첨가하였다. 그런 다음 세포 용해물을 얼음 위에서 피펫을 5회 사용하여 취하여 마이크로플레이트 플랫폼 진동기상에서 20분 동안 600rpm 및 4°C에서 교반하였다. 그런 다음 플레이트를 3000rpm 및 4°C에서 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 수집하여 새로운 마이크로 역가 플레이트에 옮기고 분석 완충액 (BIO-RAD)과 1:1로 혼합하여 -20°C에서 보관하였다.

[0202]

포획 비드 (BIO-PLEX 인-STAT3 분석, BIO-RAD Laboratories)를 제조업체의 지시를 따라 희석하여 96-웰 필터 플레이트 (Millipore Corporation Laboratories)에 놓았다. 플레이트를 세척 완충액 (BIO-RAD)으로 2회 세척하고 50 μL의 세포 용해 혼합물을 각 웰에 넣었다. 각 플레이트를 알루미늄 포일로 감싸서 밤새 실온에서 및 300rpm에서 진동시켰다. 다음날, 플레이트를 미소역가 진공 장치에 옮기고 세척 완충액으로 2회 세척하였다. 거기에 25 μL/웰의 검출 항체 (BIO-RAD)를 첨가한 후에, 포일로 덮인 플레이트를 실온에서 30분 동안 300rpm에서 진동하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 여과하고 세척 완충액으로 2회 세척하였다. 스트렙타비딘-PE (BIO-RAD; 50 μL/웰)를 첨가하고, 포일로 덮인 플레이트를 실온에서 15분 동안 300rpm에서 진동하면서 인큐베이션하였다. 플레이트를 여과하고 2회 세척한 다음 125 μL/웰의 비드 재현탁 완충액 (BIO-RAD)에 재현탁하였다. 그런 다음 인산화된-STAT3의 수준을 제조업체의 지시에 따라 배열 판독기 (BIO-PLEX, BIO-RAD Laboratories)를 사용하여 평가하였다. 데이터를 분석 소프트웨어 (BIO-PLEX MANAGER 3.0, BIO-RAD Laboratories) 분석하였다. 용해물에 존재하는 인산화된 STAT3 전사 인자의 수준의 증가는 IL-21 수용체-리간드 상호작용을 나타냈다. 중화 분석의 경우, 용해물에 존재하는 인산화된 STAT3 전사 인자의 수준의 감소는 IL-21 수용체-리간드 상호작용의 중화

를 나타냈다. IC₅₀ (리간드 활성의 50% 억제를 유발하는 길항체의 농도) 값을 GraphPad 프리즘[®] 4 소프트웨어 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA)를 사용하여 계산하고, 중화 분석의 각 시약에 대해 몰농도로서 표시하였다.

[0203] EC₅₀ 농도를 사용하여 용량 의존성 방식으로 측정된 사람 IL-21 유도된 STAT3 인산화는 대략 33pM이었다. 아래의 표 7은 본원에서 설명된 포지티브 대조표준 (가용성 사람 IL-21R/γ c-Fc 융합 단백질)에 대한 IC₅₀ 값과 IL-21 중화 항체를 요약한 것이다. 이들 데이터는 IL-21 중화 항체가 활성이었고, IL-21 유도된 STAT3 인산화를 감소시키는 데 있어서 포지티브 대조표준과 같거나 더 양호하였다.

표 7

[0204] STAT3-인산화 분석에서 IC₅₀ 값

	IC ₅₀ (pM) 실험 #1	IC ₅₀ (pM) 실험 #2	IC ₅₀ (pM) 실험 #3 *
가용성 hIL-21R/γ c-Fc	25	102	140.2
IL-21 mAb 클론#			
362.75.1	중화 없음		
362.78.1	14	60	
362.78.1.44		41	66.7
362.78-CHO (A2162F)			42.0
366.328.10.63	210		
366.552.11.31	59		
366.617.7	69		
366.345.6.11	약함		

[0205] * - 실험 3은 96pM의 IL-21을 사용하여 수행하였다.

[0206] 실시예 8 - IL-21 Baf3/huIL-21 STAT-루시페라제 생체활성 분석

[0207] 이 24-시간 분석은 Baf3/KZ134/huIL-21R 형질전환된 세포에서 IL-21-유도된 STAT-루시페라제 활성을 측정한다. Baf3/KZ134/huIL-21R 형질전환된 세포를 분석 배지 (5% 우태아 혈청, 1x 글루타맥스, 1% 피루브산 나트륨, 및 2 μM β-메르캅토에탄올 (모두 Invitrogen, Carlsbad, CA 제품)이 첨가된 페놀 레드-유리 RPMI 1640)로 2회 세척한 후 96-웰의 평평한 바닥의 불투명한 백색 배양 플레이트 (Corning/Costar, Lowell, MA)에 40,000세포/웰로 플레이트팅하였다. 그런 다음 세포를 조직 배양 인큐베이터에 넣고, 한편으로 시험 용액을 제조하였다. 별도의 플레이트에서 사람 IL-21을 배지 또는 한 세트의 IL-21 길항체 (단클론성 항체 또는 가용성 사람 IL-21 수용체/γ c-Fc)와 혼합하였다. 일단 혼합한 후 이 플레이트를 또한 가습된 37°C 조직 배양 인큐베이터에 옮겼다. 30분 후에 시험 용액을 세포 플레이트에 옮기고 혼합하였다. 그런 다음 이 플레이트를 다시 인큐베이터에 넣고 24시간 동안 두었다. 24시간 후에 세포를 인큐베이터에서 꺼내어 실온으로 냉각시켰다. 그런 다음 각 웰을 100 μL 부피의 Steady-Glo 루시페라제 시약 (Promega, Madison, WI)으로 1:1로 희석하고 철저하게 혼합하였다. 플레이트를 덮고 실온에서 10분 동안 혼돈 다음 상대적인 루시페라제 유닛 (RLU)을 광도계상에서 측정하였다.

[0208] 이 분석에서 IL-21의 EC₅₀ 및 EC₉₀ 농도를 측정하기 위하여, 0 내지 100ng/mL 범위의 재조합 IL-21의 일련의 희석액을 시험하였다. 약 15ng/mL (961pM)의 IL-21의 EC₉₀ 농도를 후속적인 중화 실험에 사용하였다. 이들 실험에서 클론 362.78.1 (및 그것의 하위클론 362.78.1.44 및 CHO-발현된 대응물, 362.78-CHO; 실시예 1 참조) 및 362.328.10.63은 대부분의 강력한 항-IL-21 활성을 입증하였고, 이때 IC₅₀ 농도는 300 내지 850 pM의 범위였으며, 한편 가용성 사람 IL-21 수용체/γ c-Fc 대조표준에 대한 IC₅₀ 값의 범위는 650 내지 1830 pM이었다. 본원에서 설명된 중화 항체의 상대적인 활성을 아래의 표 8에 나타낸다.

표 8

[0209]

24시간 STAT-루시페라제 분석에서 IC₅₀ 값

	IC ₅₀ (pM) 실험 #1	IC ₅₀ (pM) 실험 #2	IC ₅₀ (pM) 실험 #3*
가용성 hIL-21R/ γ c-Fc	650-850	1830	
IL-21 mAb 클론#			
362.75.1	중화 없음		
362.78.1	400	775	760
362.78.1.44		850	
362.78-CHO (A2162F)			533
366.328.10.63	300-500		
366.552.11.31	2400		
366.617.7	6360		
366.345.6.11	3184		

[0210]

실시에 9 - 게잡이 원숭이, 마우스 또는 쥐 IL-21 활성화에 대한 교차 반응

[0211]

중 교차-반응 연구 ((특히 비-사람 영장류 교차반응성에 대해)는 치료 길항체를 개발할 때 임상전 약리학/독물학에 앞서 완료하는 데 중요하다. 본원에서 설명된 항-사람 IL-21 중화 항체가 게잡이 원숭이 IL-21, 쥐과의 IL-21 또는 쥐 IL-21에 의해 유도된 활성화와 교차반응하여 중화하는지를 측정하기 위하여 (그로써 게잡이 원숭이, 마우스 및/또는 쥐가 생존 시험 중으로서 타당한지 측정하기 위하여), 재조합 게잡이 원숭이, 쥐과 및 쥐 IL-21 생체활성을 증명하는 것이 먼저 필요하였다. 실시에 8에서 설명된 IL-21 STAT-루시페라제 활성화 분석에 대한 방법을 사용하여 재조합 사람 IL-21, 게잡이 원숭이, 쥐과 IL-21 및 쥐 IL-21 (모두 ZymiGenetics 제품)DP 대한 EC₅₀과 EC₉₀ 값을 측정하였다. 그 결과는 사람, 게잡이 원숭이 및 쥐과의 IL-21에 의해 유도된 STAT-루시페라제 활성화의 수준이 이 분석에서 광범위하게 달랐음을 나타냈다. 계속되는 실험에서 사용된 EC90 값은 다음과 같은 것으로 측정되었다: 사람 IL-21에 대해서는 961 pM; 게잡이 원숭이 IL-21에 대해서는 102pM; 마우스 IL-21에 대해서는 6.41pM; 및 쥐 IL-21에 대해서는 1.08pM. IL-21 가용성 수용체 (hIL-21R/ γ c-Fc)는 게잡이 원숭이, 쥐과 및 쥐의 효과를 중화하였다.

[0212]

IL-21. 아래의 표 9에 나타난 정제된 항-IL-21 단클론성 항체의 첨가는 다양한 정도로 게잡이 원숭이 IL-21을 중화하였지만, 쥐과 또는 쥐의 IL-21을 중화하지 못하였다 (주: 쥐 IL-21에 대해서는 오직 362.78-CHO와 366.552.11만을 시험하였다). 본원에 설명된 중화 항체에 의한 게잡이 원숭이 IL-21의 중화에 대한 IC₅₀ 값은 대략 100pM로부터 431pM까지 범위였고, 아래의 표 9에 나타낸다. 최상의 사람 IL-21 중화 항체는 모두 게잡이 원숭이 IL-21을 효과적으로 중화할 수 있었지만, 쥐과 IL-21 또는 쥐 IL-21을 중화하지 못하였다는 것을 주지하여야 한다. 또한 CHO-세포 생성된 IL-21 mAb (362.78-CHO)를 게잡이 원숭이 IL-21의 800pM 농도를 사용하여 별도의 실험으로 시험하였다.

표 9

[0213]

STAT-루시페라제 분석에서 게잡이 원숭이, 쥐과 및 쥐 IL-21에 대한 hIL-21 길항체의 교차 반응

	게잡이 원숭이 IL-21 IC ₅₀ ([cIL-21]=100pM)		쥐과 IL-21 IC ₅₀ ([mIL-21]=6.41nM)		쥐 IL-21 IC ₅₀ ([rIL-21]=1.08nM)	
	ng/mL	물농도	ng/mL	물농도	ng/mL	물농도
가용성 hIL-21R/ γ c-Fc	20	385pM	425.8	8.06nM	707.5	13.4nM
IL-21 mAb 클론:						
362.75.1	약함	--	없음	없음	N/T	N/T
362.78.1	60	400pM	없음	없음	N/T	N/T
362.78-CHO (A2162F)*	255	1.7nM	없음	없음		
366.328.10	15	100pM	없음	없음	N/T	N/T
366.552.11	23	156pM	없음	없음	없음	없음
366.617.7	65	431pM	없음	없음	N/T	N/T

- [0214] * 주: 클론 362.78-CHO (실시예 1b)를 다른 실험에서 사용한 100pM 대신에 800pM 농도의 cIL-21을 사용하여 시험하였다. N/T = 시험하지 않음.
- [0215] 실시예 10 - 세포-기초 분석에서 IL-4에 대한 잠재적인 교차 반응의 평가
- [0216] 치료 사이토킨 길항체를 개발할 때, 그것이 구조적으로 관련된 사이토킨과 교차반응하고 중화시킬 것인지를 아는 것이 중요하다. 이 일차 B 세포 증식 분석을, 본원에서 기술된 IL-21 중화 항체가 사람 IL-4에 교차반응하고 중화시키는 지를 시험하기 위해 디자인하였다.
- [0217] 일차 B 세포의 분리: 일차 B 세포를 얻기 위하여, 200mL의 말초혈을 건강한 사람 지원자 (ZymoGenetics)로부터 수집하였다. 혈액을 실온의 PBS로 400mL로 희석하고, 35mL의 분취액을 50mL의 원뿔 모양 튜브에 만들었다. 14mL의 실온 피콜/하이파크 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 밑에 놓고 튜브를 20분 동안 2000rpm에서 회전시켰다. PBMC 계면층을 흡인하고 MACS 완충액 (PBS, HEPES 20mM, 및 1% BSA; Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 2회 세척하였다. 세포를 계수하고 B 세포를 Miltenyi Biotec (Auburn, CA)사의 B 세포 분리 키트를 사용하여 제조업체가 개관한 프로토콜을 따라 음성적으로 선택하였다. 정제된 B 세포의 소량 샘플을 FACS 분석에 의해 순도에 대해 시험하였고, 그 결과 모든 실험에서 CD19+ B 세포는 97% 이상으로 순수한 것으로 나타났다.
- [0218] 증식 분석: B 세포는 고정된 항-IgM과의 IL-4 공동 배양에 반응하여 증식한다. 항-IL-21 mAb에 의한 IL-4의 잠재적인 교차반응 및 중화를 측정하기 위하여, 이미 분리된 B세포를 먼저 1.0 μ g/mL의 항-IgM (Southern Biotech, Birmingham, AL)로 미리 코팅된 96-웰 U-바닥 조직 배양 플레이트 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)에 40,000 내지 50,000 세포/웰로 플레이팅하였다. 그런 다음 세포를 10ng/mL 재조합 사람 IL-4 (R&D Systems; Minneapolis, MN)로 처리하고, IL-21 길항체 (시험 항체 또는 대조표준)로 차례로 적정하였다. 그런 다음 세포를 3일 동안 가습된 조직 배양 인큐베이터에서 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 3일 후에, 세포를 1 μ Ci/웰의 [³H]-티미딘 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)으로 펄스하였다. 16시간 후에, 세포를 유리-섬유 필터상에서 수득하고, [³H]-통합의 양을 베타 카운터 (Topcount NXT, Packard)를 사용하여 정량하였다. 시험한 세 개의 항-IL-21 단클론성 항체 (362.78.1, 366.328.10.6 및 366.552.11.31)중에서 어느 것도, 250-배 몰 과량에서도 IL-4-유도된 증식을 전혀 중화하지 않았다.
- [0219] 실시예 11
- [0220] 11A. 세포-기초 분석에서 IL-2 및 IL-5에 대한 잠재적인 교차 반응의 평가
- [0221] 치료 사이토킨 길항체를 개발할 때, 그것이 구조적으로 관련된 사이토킨과 교차반응하고 중화시킬 것인지를 측정하는 것이 중요하다. 쥐과의 T 셀라인, CTLL-2는 사람 IL-2 또는 IL-15에 대한 반응으로 증식되는 것이 유도될 수 있다. 그러므로 이 분석은 본원에서 기술된 IL-21 중화 항체가 사람 IL-2 및 IL-15에 교차반응하고 중화시키는 지를 시험하기 위해 선택되었다.
- [0222] CTLL-2 세포를 증식 생체분석 배지 (2x 글루타맥스, 10% FBS, 2x NaPyr, 1x B-메르캅토에탄올 및 20mM Hepes가 첨가된 RPMI 1640; Invitrogen, Carlsbad, CA)로 3회 세척하고, 96-웰 둥근 바닥 조직 배양 플레이트 (Becton Dickinson, Franklin Falls, NJ)에 50,000 세포/웰로 플레이팅하였다. 이들 세포에 예정된 EC₉₀ 용량의 IL-2 (3.0ng/mL) 또는 IL-15 (0.5ng/mL)를 IL-21 중화 항체의 연속적인 희석액과 함께 첨가하였다. 사이토킨의 항체에 대한 비율은 250배 몰 초과량부터 1:1 비율까지의 범위였다. 항-IL-21 또는 항-IL-15 중화 항체 (둘 다 R&D Systems, Minneapolis, MN)를 포지티브 대조표준으로서 사용하였다. 그런 다음 세포를 24시간 동안 가습된 조직 배양 인큐베이터에서 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 24시간 후에 세포를 1 μ Ci/웰의 [³H]-티미딘 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)으로 펄스하였다. 16시간 후에, 세포를 유리-섬유 필터상에서 수득하고, [³H]-통합의 양을 베타 카운터 (Topcount NXT, Packard)를 사용하여 정량하였다.
- [0223] 결과: 시험한 세 개의 항-IL-21 단클론성 항체 (362.78.1, 366.328.10.6 및 366.552.11.31)중에서 어느 것도, IL-2 또는 IL-15 유도된 증식을 어떤 것도 중화하지 않았다.
- [0224] 11B. 표면 플라스몬 공명 (Biacore)을 사용한, IL-21 mAb 362.78-CHO가 IL-21 관련된 사람 사이토킨 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 또는 IL-15에 결합하지 않는 것에 대한 확인
- [0225] 항-IL-21 mAb 362.78-CHO를 사람 IL-2, 사람 IL-4, 사람 IL-7, 사람 IL-9, 및 사람 IL-15에 대한 잠재적인 교

차 반응성에 대해 표면 플라스몬 공명을 통해 평가하였다.

[0226] 재료 및 방법: 사람 IL-21, 사람 IL-4, 사람 IL-7, 사람 IL-9, 및 사람 IL-15에 대한 항-IL-21 단클론성 항체 362.78-CHO의 교차반응성을 시험하기 위하여 실험을 수행하였다. 결합 연구를 BIACORE T100™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ)상에서 수행하였다. 방법을 BIACORE T100™ 조절 소프트웨어, v 2.0을 사용하여 프로그램하였다. 염소 항-사람 IgG Fc-감마 특이적 항체 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)를 아민 결합 화학 (EDC:NHS)을 사용하여 CM4 센서 칩의 흐름 세포 1 및 2에 공유결합에 의해 고정하였다. 정제된 항-IL-21 단클론성 항체 362.78-CHO를 계속해서 대략 240RU의 밀도에서 센서 칩의 흐름 세포 2 위에 포획시켰다. 흐름 세포 1을 참조 표면으로서 사용하였다.

[0227] IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 및 IL-15 (모두 R&D Systems, Minneapolis, MN 제품)를 포획된 항체 표면 (흐름 세포 2) 및 참조 흐름 세포 (흐름 세포 1) 위에 100, 20, 및 4nM의 농도로 주입하였다. 이 세트의 실험에 대한 포지티브 대조표준으로서, IL-21 (ZymoGenetics 제품)을 또한 동일한 농도로 주입하였다. 결합 연구를 25 µL/분의 유속, 2분의 결합 시간, 및 3분의 분해 시간을 사용하여 수행하였다. 모든 결합 실험을 25℃에서, 10mM의 HEPES, 300mM의 NaCl, 5mM의 CaCl₂, 0.05%의 계면활성제 P20 (Biacore), 1mg/mL의 우혈청 알부민, pH 8.0의 완충액 중에서 수행하였다. 각 사이클 사이에 흐름 세포를 20mM의 염산으로 세척하여 표면을 재생시켰다. 이 세척 단계로 포획된 362.78-CHO 항체와 어떠한 미결합 항원이 칩 표면으로부터 제거되었다. 데이터를 BIACORE T100™ 평가 소프트웨어 (버전 2.0)를 사용하여 편집하였다. 데이터를 참조 흐름 세포와 블랭크 주입을 뺀으로서 처리하였다. 바탕 안정성을 평가하여 재생단계가 주입 순서를 통틀어서 일관된 결합 표면을 제공하였는지의 여부를 확인하였다.

[0228] 결과: 362.78-CHO 항체에 대한 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 또는 IL-15의 결합은 관찰되지 않았다. 대조적으로 IL-21 포지티브 대조표준은 이전의 연구와 일치하는 용량 의존성 결합을 증명하였다.

[0229] 이런 교차반응성의 결핍을 계속해서 클론 362.78의 에피토프 지도화 연구에 의해 설명하였다 (실시예 17 참조). IL-21의 D-나선의 안과 가까이에 위치한 아미노산들은 클론 362.78 (EKKPPKEFLERFKSLL; SEQ ID NO: 2, 잔기 129 내지 144)이, 아래의 표 10에 열거된 것과 같이, 관련된 사람 감마-사슬 사이토킨 중에서 잘 보존되지 않지만, 마우스 IL-21 내에서는 잘 보존된 것으로 보아 결합된 것으로 나타났다.

표 10

IL21_HUMAN	-----TCPSCDSYEKK--PPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSTHGSEDS
IL21_MOUSE	-----KCPSCDSYEKR--TPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS
IL15_HUMAN	-----CKECEEELEEK--NIKEFLQS FVHVIVQMFINTS
IL2_HUMAN	-----TTFMCEYADET-ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
IL4_HUMAN	---GLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS
IL7_HUMAN	----SLEENKSLKEQKK-LNDLCFLKRLQEIKTWNKILMGTKHEH
IL9_HUMAN	-----CEQPCNQTTAG--NALTFLKSLL EIFQKEKMRGMRGKI

[0231] IL-21 사람은 SEQ ID NO:2로서 표시되고; IL-21 마우스는 SEQ ID NO:11로서 표시되며; IL-15 사람은 SEQ ID NO:92로서 표시되고; IL-2 사람은 SEQ ID NO:93으로서 표시되며; IL-4 사람은 SEQ ID NO:94로서 표시되고; IL-7 사람은 SEQ ID NO:95로서 표시되며; IL-9 사람은 SEQ ID NO:96으로서 표시된다.

[0232] 실시예 12 - B 세포 증식 분석

[0233] 일차 B 세포 분석

[0234] IL-21 중화 항체의 활성을 추가로 시험하기 위하여, 두 개의 일차 B 세포 분석을 개발하였다. B 세포 증식 분석을 4일에 걸쳐 IL-21 유도된 증식의 중화를 증명하기 위해 사용하였고, B 세포 분화 분석은 8일에 걸쳐 IL-21 유도된 원형질 세포 분화의 중화를 증명하였다. 이들 실험으로 장기간 생물학적 관련 분석에서 IL-21의 중화가 증명되었다.

[0235] 일차 사람 B 세포의 분리: 일차 B 세포를 얻기 위하여, 200mL의 말초혈을 건강한 지원자로부터 수집하였다

(ZymoGenetics). 혈액을 200mL의 실온 PBS로 희석하고, 35mL의 분취액을 50mL의 원뿔형 튜브에서 만들었다. 14mL의 실온 피콜/하이파크 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 밑에 놓고 튜브를 20분 동안 2000rpm에서 회전시켰다. PBMC 계면층을 흡인하고 MACS 완충액 (PBS, HEPES 20mM, 및 1% BSA; Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 2회 세척하였다. 세포를 계수하고 B 세포를 Miltenyi Biotec (Auburn, CA)사의 B 세포 분리 키트를 사용하여 제조업체가 개관한 프로토콜을 따라 음성적으로 선택하였다. 정제된 B 세포의 소량 샘플을 FACS 분석에 의해 순도에 대해 시험하였고, 그 결과 모든 실험에서 97% 이상으로 순수한 것으로 나타났다.

[0236]

증식 분석: B 세포는 항-CD40 및 IL-21과의 공동 배양에 반응하여 증식한다. 항-IL-21 mAb의 중화 활성을 측정하기 위하여, B세포를 96-웰 U-바닥 조직 배양물로 처리된 플레이트 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)에 40,000 내지 50,000 세포/웰로 플레이트팅하였다. 그런 다음 세포를 0.1 μ g/mL 항-CD40 (염소 항-사람 CD40 다클론성; R&D Systems, Minneapolis, MN), 50ng/mL (3.21nM)의 재조합 IL-21 (ZymoGenetics, A1207F)로 처리하고, IL-21 길항체 (시험 항체 또는 대조표준)로 적정하였다. 그런 다음 세포 플레이트를 3일 동안 가습된 인큐베이터에서 37°C 및 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 3일 후에, 세포를 1 μ Ci/웰의 [³H]-티미딘 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)으로 펄스하였다. 16시간 후에, 세포를 유리-섬유 필터상에서 수득하고, [³H]-통합의 양을 베타 카운터 (Topcount NXT, Packard)를 사용하여 정량하였다. IL-21 유도된 증식의 효과적인 중화를 측정하는 IC₅₀ 곡선을 계산하고, 몰 농도로서 표시하였다. 본원에 기술된 상부 중화 mAb에 대한 IC₅₀ 값은 0.71nM 내지 6.55nM의 범위였고, 결과를 아래의 표 11에 나타낸다.

표 11

[0237]

B 세포 증식 분석에서 IL-21의 중화

IL-21 길항체	IC ₅₀ (nM)
가용성 hIL-21R/ c-Fc	3.5
362.75.1	중화 없음
362.78.1	1.17
366.328.10	0.71
366.552.11	4.75
366.617.7	6.55

[0238]

B 세포 분화 분석: 천연 B 세포의 항체-생성 원형질 세포로의 분화는 IL-21이 항-CD40 및 IL-4와 조합될 때 시험관 내에서 크게 촉진된다 (Ettinger et al., *J Immunol.* 175:7867-79, 2005; Ettinger et al., *J Immunol.* 178:2872-82, 2007; Kuchen et al. *J Immunol.* 179:5886-96, 2007). 실시예 7 및 8에서 설명된 두 가지 Baf3-기초 선별 분석보다 더 긴 기간의 분석에서 활성을 증명하기 위하여, 본원에서 설명된 중화 항체를 사용하여 IL-21을 중화하고, 사람 원형질 세포 분화를 억제하였다. 이것을 이루기 위하여 일차 사람 B 세포를 96-웰 평평한 바닥의 조직 배양물 처리된 플레이트 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)에 150,000 세포/웰로 플레이트팅하였다. 그런 다음 세포를 0.1 μ g/mL의 항-CD40 (염소 항-사람 CD40 다클론성; R&D Systems, Minneapolis, MN), 10ng/mL의 재조합 사람 IL-4 (R&D Systems) 및 25ng/mL (1.6nM)의 재조합 사람 IL-21 (ZymoGenetics)로 처리하였다. 그런 다음 IL-21 길항체 (시험 mAb 또는 대조표준)를 첨가하고 세포를 가습된 인큐베이터에서 37°C, 5% CO₂에서 8일 동안 인큐베이션하였다. 8일이 끝날 때에 조건 배지를 수집하고 (항체 역가를 위해), 세포를 이어지는 유세포 분석을 위해 펠릿화하였다.

[0239]

유세포 분석을 사용한 B 세포 분석: 세포를 사람 FACS 완충액 (HBSS, 20mM HEPES, 1% BSA (모두 Invitrogen 제품) 및 2% 사람 Ab 혈청 (Gemini BIO-Products, Woodland, CA))에 5분 동안 재현탁하여 Fc 수용체를 차단하였다. 그런 다음 세포를 원심분리하고 (1200rpm에서 5분), 흡인하였다. 항체를 사람 FACS 완충액으로 1:100으로 희석하고 샘플당 100 μ L로 분산시킴으로써 얼룩을 제조하였다. 단일 얼룩 (사이토머 보상 설정을 조정하기 위해) 및 다중 얼룩 혼합물을 다음의 항체들을 사용하여 제조하였다: 항-CD138-FITC, 항-IgD-PE, 항-CD38-PE-Cy5.5 및 항-CD19-APC. 원형질 세포를 큰 (전방 광산란에 의해 평가됨) CD19⁺, IgD^{lo}, CD38⁺ 및 CD138⁺ 세포로서 규정하였다. 총 세포에 대한 원형질 세포의 백분율을 사용하여 본원에 기술된 중화 항체의 효율을 측정하였다.

[0240]

결과: IL-21을 IL-4 및 항-CD40과 조합했을 때, 8일째에 살아있는 큰 B 세포의 대략 50%는 IgD^{low}, CD138⁺ 원형질 세포였다. IL-21이 없이, 원형질 세포의 비율은 큰 B 세포의 ~8%였다. 다양한 IL-21 길항체를 IL-21-함유 배

양물에 첨가하는 것은 용량-의존성 방식으로 원형질 세포의 비율을 감소시켰다. 클론 362.78.1이 가장 효과적인 중화제였고, IL-21 활성을 10:1 및 2.5:1의 길항체:리간드 비율에서 거의 완전하게 중화시켰다. 시험한 다른 항체, 즉 클론 366.328.10.63 및 366.552.11.31은 IL-21 유도된 분화를 중화하는 데 거의 효과적이었다. 이 데이터를 아래의 표 12에 요약한다.

표 12

[0241]

항-hIL-21 mAb 중화에 의한 사람 원형질 세포 분화의 억제

	길항체: 리간드 비율			
	10:1	2.5:1	0.6:1	0.16:1
IL-21 길항체	% IgD-low, CD138+원형질 세포			
362.78.1	13.7	15.5	34.1	42.8
366.328.10.63	15.4	20.2	41.4	52.1
366.552.11.31*	15.4	26.4	44.8	50.3
IL-21 수용체	23.4	41.7	54.2	66.7

[0242]

* 클론 366.552.11.31에 대한 실제의 길항체:리간드 비율은 14.4, 3.6, 0.9 및 0.22:1이었음을 주지하라.

[0243]

실시예 13 - DTH 마우스 모델

[0244]

DTH 반응은 CD4+ T 세포에 의해 개시되고 T 세포, 호중구 및 대식세포에 의해 매개되는 고전적인 면역 반응이다. DTH 반응은 CD4+ T 세포 매개된 반응의 양호한 표지제이다. 마우스들을 2개의 보조제, 즉 완전 프로인트 보조제 (CFA; Sigma) 또는 Ribi (Sigma; aka MPL+TDM+CWS 보조제) 중의 닭 오브알부민 단백질 (OVA)로 피하주사에 의해 면역한다. 이 단계를 면역감작 단계 (0 내지 6일)로 부른다. 7일 후에 귀를 측정한다. 그런 다음 마우스의 귀에 대조표준 PBS (왼쪽 귀) 또는 OVA (오른쪽 귀)를 주사한다. 이 단계를 도전 단계 (7 내지 8일)로 부른다. OVA에 대해 생성된 면역 반응은 귀에 염증을 유발하고, 그 결과 OVA로 처리한=하고 24시간 이내에 귀 두께의 증가를 초래하지만, PBS로 처리한 귀에서는 변화가 없다. 이것은 캘리퍼스를 사용하여 측정한다.

[0245]

C57BL/6 마우스 (n=8/군)를 총 부피 200 μ l로 CFA에 유화된 100 μ g의 닭 오브알부민 (OVA)로 등을 면역시킨다. 만약 CFA 대신 Ribi를 사용하면, 0.5mg/ml의 오브알부민을 단일 바이알의 RIBI에 첨가하고, 2분 동안 격렬하게 와동시켜서 마우스에게 주사할 에멀션을 형성한다. 면역 후 7일 후에 마우스에 10 μ l의 PBS를 왼쪽 귀에 (대조표준), 그리고 10 μ l의 총 부피로 PBS 중의 10 μ g의 OVA를 오른쪽 귀에 주사한다. 마우스의 귀에 주사하기 전에 모든 마우스의 귀 두께를 측정한다 (0 측정). 귀 두께를 도전 후 24시간 후에 측정한다. 0 측정과 24시간 측정 사이의 귀 두께의 차이를 계산하고, 그 결과는 귀의 염증을 반영한다. 마우스 군에 PBS 또는 상이한 농도의 항-IL-21 항체를 0 내지 6일에 (면역감작 단계) 또는 7 내지 8일에 (도전 단계) 복강 내로 주사한다. 제 7일 및 8일의 주사는 0 및 24시간 전에 귀 두께를 측정하기 2시간 전에 제공한다. 24시간 주기가 끝날 때 일단 귀 두께를 측정하고, 귀를 잘라서 조직학적 분석을 위해 포르말린에 넣는다.

[0246]

실시예 14 - 다발성 경화증에 대한 마우스 모델

[0247]

항-IL-21이 다발성 경화증에 어떠한 영향을 미치는지를 시험하기 위해, 실험적인 자가면역 뇌척수염 (EAE-MS)을 억제하기 위한 항-IL-21 항체의 능력을 시험하기 위해, MS에 대한 마우스 모델을 시험한다. 특성확인이 잘 되어 있는 C57BL/6마우스에서의 T 세포-의존성 미엘린 올리고수지상 당단백질 (MOG)35-55 펩티드 면역 모델을 사용한다. DC 매개된 항원 제공에 의해 또는 CD8 T 세포 반응을 증강시킴에 의해 항-IL-21 항체가 EAE에서 질병 기록을 지연 및/또는 억제할 수 있는지를 측정하기 위해 실험을 실시한다. 이 모델에서 효과적인 CD8 T 세포 반응의 부재는 EAE를 악화시킨다 (Malipiero et. al., *Eur. J. Immunol.*, 27:3151-3160, 1997). EAE 모델에서 용량 의존성 방식으로 지연된 질병의 개시는 항-IL-21 항체의 사용이 MS에서 유익할 수 있음을 시사한다.

[0248]

EAE는 MS에 대한 마우스 모델이다. 그런 한 모델에서, C57BL/6 마우스를 CFA 보조제 중에 유화된 100 μ g의 MOG 펩티드 (MOG35-55) 또는 100 μ g의 재조합 MOG 단백질로 면역시킨다. PBS 중의 MOG35-55의 0.5mg/ml 제제의 2ml을 CFA의 바이알에 첨가하고 격렬하게 와동시켜서 용액을 유화하거나 CFA중의 재조합 MOG의 1:1 비율을 제조한다. 마우스 등의 털을 깎고 100 μ g의 MOG/CFA를 마우스 등에 피하 주사한다. 마우스의 체중을 면역 전 2일 전에 측정하고 면역 후 매일 측정한다. 그런 다음 제 2일에 마우스에 200 μ l의 백일해 독소 (PT)를 최종 농도 200ng/마우스로 정맥 내 주사한다. 마우스를 매일 임상 경과에 대해 모니터한다. 마우스 군을 0 내지 20일까지, 또는 3주 동안 일주일에 3회, 200 μ l의 PBS, 10 μ g의 BSA, 200 μ l 부피의 10 μ g 내지 200 μ g의 항-IL-21 항체를 복강 내

주사한다. 마우스의 체중, 임상 경과 및 발생을 평가하고 분석을 위해 도표화한다.

- [0249] 실시예 15 - 항-IL-21 항체는 T-세포 적응성 전달 대장염 및 건선의 마우스 모델에서 질병 발생과 진행을 감소시킨다
- [0250] 고유한 T 세포의 주요하지 않은 조직적합성 미스매치된 또는 상조적인 면역손상된 마우스로의 적응성 전달은 건선을 닮은 피부 병변 (Schon MP et al., *Nat Med.* 2:183-8, 1997; Davenport CM et al., *Int Immunopharmacol.* 5:653-72, 2002)뿐 아니라 대장염 (Leach MW et al 1996, Powrie F et al, 1997)의 발생을 유발한다. BALB/C 또는 B10.D2 마우스로부터 면역손상된 C.B-17 SCID 마우스로의 0.2×10^6 정도로 적은 수의 CD4+CD25- T 세포의 이식은 체중 손실, 잠혈 양성 대변 및 피부 병변의 발생을 초래한다. 이들 마우스에서의 증상은 집단별로 다르다.
- [0251] 대장염/건선의 이 모델은 사람 크론씨병과 건선과 일부 유사한 점이 있고, 따라서 사람에서 이들 질병의 치료 효능을 시험하기 위해 광범위하게 사용되어 왔다. 이 실험을 위해 마우스들 (8마리의 B10.D2 암컷 마우스 공여체; 50마리의 C.B-17 SCID 암컷 수용체)을 Jackson Laboratories 또는 Charles River Laboratories로부터 각각 얻었다. 8 마리의 B10.D2 마우스로부터 비장을 수집하였다. CD4+ CD25- T-세포를 당해 기술분야에 알려져 있는 표준 방법을 사용하여 모아진 비장으로부터 분리하였다. T-세포 집단의 순도를 유세포 분석에 의해 평가하였다.
- [0252] 고유한 C.B-17 SCID 마우스에 제 0일에 정맥 내 주사를 통해 5×10^5 의 CD4+ CD25- T-세포 (B10.D2 마우스의 비장으로부터 분리됨)를 받았다. 모든 마우스의 체중을 일주일에 최소한 5회 측정하고 체중 손실에 대해 주의깊게 관찰하였는데, 그것은 대장염과 관련이 있을 수 있다. 또한 임상적인 대장염 경과 (대변의 일관성과 대변중의 혈액)를 일주일에 최소한 하루 동안 살폈다. 마우스를 또한 일주일에 최소한 5일 동안 주의깊게 모니터하고, 건선 증상의 신호에 대한 경과 (탈모, 긁기, 대머리 등)를 분류하여 기록하였다.
- [0253] 쥐 항-마우스 IL-21 (mIL-21) 항체, 쥐 이소타입 대조 항체, 또는 비히클 (PBS)을 제 0일에 시작하여 마우스 군에 투여하였다. 치료는 복강 내 주사로서, 일주일에 2회 전달되었고, 따라서 항체는 용량 당 마우스당 0.2 또는 0.8mg 투여되었다. 마우스들은 또한 유사한 투약 처방 또는 다른 투여 경로를 사용하여 전달받을 수 있다. 항-IL-21 항체 군에는 군당 9 내지 10마리의 마우스가 있고, 이소타입 대조 항체 군에는 군당 6 내지 7마리의 마우스가 있으며, PBS 군에는 군당 10마리의 마우스가 있다. 이 투약 처방은 "예방 투약"으로 언급된다.
- [0254] 별도의 실험으로 상기에서 설명된 것과 동일한 항체 및 용량으로 투약된 마우스 군 (군 당 10마리)은 세포 전달 후 제 12일에 치료를 시작하였는데, 그날은 대략 마우스가 건선 및/또는 대장염의 신호를 나타내기 시작한 날이다. 이 투약 처방은 "치료 투약"으로 언급한다.
- [0255] 연구가 끝날 때 (45일), 결장 조직을 대장염의 조직학적 증거를 위해 떼어내고, 사이토킨과 케모카인 수준의 분석을 위해 혈청을 취하였다.
- [0256] 예방 투약의 결과: 0.2 및 0.8mg 용량의 항-mIL-21 항체를 둘 다 받은 마우스들은 전 실험 기간을 통해 PBS 또는 0.2mg의 이소타입 대조 단클론성 항체를 투여한 마우스들과 비교하여, 체중 손실의 상당한 (최소한 $p < 0.05$ 또는 더 좋은) 감소와 건선 피부와 대장염 증상에 상당한 감소가 일어나는 것이 특징이었다. 연구가 끝날 때 (45일), 두 용량 중 어느 하나의 mIL-21 항체로 치료된 마우스들은 그들의 출발 체중의 대략 100%를 유지한 반면, PBS로 처리된 마우스들은 그들의 출발 체중의 평균 16%가 빠졌고, 이소타입 대조 항체로 치료된 마우스들은 그들의 출발 체중의 10 내지 15%를 잃었다. 45일째에 어느 한 용량의 mIL-21 항체로 치료된 마우스들은 대략 6.5 내지 7배 더 낮은 평균 대장염 임상 경과 및 대략 5 내지 7배 더 낮은 평균 건선성 피부 경과를 보였다. 0.2mg의 항-mIL-21 항체로 치료된 마우스 중에서 단지 20%만이 경미한 건선을 나타낸 한편, 0.8mg의 용량으로 치료된 마우스들은 건선성 피부 증상을 나타내지 않았다. 다른 한편으로, PBS로 처리된 마우스들은 100% 건선을 나타냈고, 이들 마우스중 대략 50%는 심각한 증상을 나타냈다. 연구가 끝났을 때, PBS- 및 0.2mg의 이소타입-대조표준 치료된 마우스에 비교하여 항-mIL-21 항체 치료된 마우스에서 대장염의 조직학적 표식 (장 염증, 병변 및 구조에 대한 경과)은 상당히 감소되었다.
- [0257] 항-mIL-21 항체로 치료된 마우스들은 PBS로 처리된 마우스에 비하여 상당히 더 낮은 혈청 IL-6, RANTES, TNF-, 및 MIP-1 수준을 보였고, 나아가 이것은 항-mIL-21 항체에 대한 항염증 역할을 지지한다.
- [0258] 치료 투약의 결과: T 세포를 전달하고 12일 후부터 시작하여, 0.2 및 0.8mg 의 두 가지 용량의 항-mIL-21 항체를 모두 받은 마우스들은, 전 실험 기간을 통하여 이소타입 대조 단클론성 항체를 투여한 마우스들에 비교하여 체중 손실의 감소와 대장염 증상의 상당한 감소가 특징적으로 나타났다. 45일째에 어느 한 용량의 항-mIL-21 항

제로 치료된 마우스는 이소타입 대조 항체로 치료된 마우스에 비교하여 대략 3.5 내지 4배 더 낮은 평균의 대장염 임상 경과를 나타냈다.

[0259] 요약: 이들 결과는 함께 항-mIL-21 항체의 생체 내 투여가 쥐과의 T 세포 전달 모델에서 대장염 및 건선의 개시 및 심각성을 줄이는 데 효과적이었음을 나타내며, 이것은 항-mIL-21 항체가 사람 염증성 장 질병 및/또는 건선을 치료하는데 효과적일 수 있음을 시사한다.

[0260] 실시예 16 - 접촉 과민성 마우스 모델

[0261] 접촉 과민성은 디니트로플루오로벤젠 (DNFB) 및 옥사졸론을 포함한 다양한 접촉 알레르겐을 사용하여 마우스에서 유도될 수 있다. 마우스를 아세톤 및 올리브유의 비히를 중의 알레르겐으로 국소적으로 민감화시킨 후 귀에 올리브유 단독에 담긴 알레르겐으로 도전시켰다. 귀 두께의 변화는 알레르겐에 대한 면역 반응의 척도이다. 항-IL-21 항체를 감작 단계 (0 내지 5일)에서나 도전 단계 (5 내지 6일) 중에 투여한다. IL-21를 길항함으로써 귀 두께를 억제하는 것은 접촉 과민성을 유도하는 데 있어 IL-21의 역할을 나타낸다.

[0262] C57B1/6 마우스를 아세톤:올리브유 (4:1)중의 0.5% DNFB 또는 아세톤:올리브유 단독으로 제 0일에 등에 도포하였다. 제 5일에 마우스의 귀 두께를 캘리퍼스를 사용하여 측정하고 마우스를 올리브유 단독 (대조표준) 또는 올리브유 중의 0.25% DNFB를 25 μ l의 용액으로 귀에 한 방울씩 떨어뜨림으로써 도전시켰다. 귀 두께의 변화를 제 6일에 측정하고, 염증을 제 5일과 6일 사이의 귀 두께의 차이로서 계산한다. 마우스 군에 PBS 또는 10 내지 100 μ g의 항-IL-21 항체를 0 내지 5일에 또는 5일 내지 6일에 복강 내로 주사한다.

[0263] 항-IL-21 항체에 의한 귀 두께의 억제는 항-IL-21 항체가 접촉 과민성을 억제하는 데 유용할 수 있음을 증명한다.

[0264] 실시예 17 - 에피토프 지도화

[0265] A. 수소-중수소 교환 (HDx) 실험

[0266] 항-IL-21 mAb 362.78.1.44, 362.597.3, 366.328.10, 366.552.11 및 가용성 hIL-21R/γc-Fc를 중화함으로써 인식되는 IL-21의 에피토프 영역을 확인하기 위한 노력으로, 면역친화성-기초 수소 중수소 교환 (HDx0 방법을 질량 분광 분석 후에 적용하였다. 구체적으로, 정제된 mAb를 CNBr-활성화된 세파로오스 비드 위에 고정하고 중수소 완충액으로 교환하였다. 중수소 처리된 IL-21을 인큐베이션에 의해 면역친화성 비드에 결합시키고, 비드를 중수소화된 완충액으로 세척하여 미결합 단백질을 제거하였다. 그런 다음 항원-항체 복합체에 PBS 용액을 적용하여 IL-21의 미결합 영역위에 아마이드 수소로의 후면-교환을 개시하였다. 그런 다음 중수소-수소 교환을 퀀칭하고, IL-21을 낮은 pH 완충액에서 용출한 다음 고정된 펩신에 의해 단백질 가수분해성 소화를 수행하였다. 그런 다음 펩티드 덩어리 맵을 MALDI-TOF 질량 분광학에 의해 생성하고, PBS 용액으로 희석함으로써 중수소 처리된 IL-21로부터 아마이드 수소로 교환된, 유리 상태의 IL-21로부터 생성된 대조 샘플의 그것과 비교하였다. 도 3은 유리 상태의 IL-21 (도 3A 및 3C)과 항체-결합된 IL-21 (도 3B 및 3D) 두 가지의 펩신-소화된 펩티드의 확대된 질량 스펙트럼을 도시한다. 도 3A에 도시된 것과 같이, 중첩하는 펩티드 동위원소를 유리 상태의 IL-21의 상응하는 펩티드 EKKPPKEF (SEQ ID NO: 2, 잔기 129 내지 136) (m/z, 1002.5619 Da) 및 LERFKSLL (SEQ ID NO: 2, 잔기 137 내지 144) (m/z, 1005.6091 Da)에 배정하였고, 이때 이론적인 펩티드 질량은 10 ppm 질량 정확도 내에 있다. 소량의 잔류 중수소 처리된 펩티드를 불완전한 아마이드 수소 교환으로 인해 m/z, 1002.5619 Da 근처에서 관찰하였다.

[0267] 도 3B는 1014.49m/z 및 1015.00m/z에서 단일 동위원소 이온을 가지는 두 개의 중첩하는 펩티드 동위원소 엔벨로프를 나타내는 도 3A의 동일한 질량 범위의 스펙트럼이다. 두 펩티드 이온이 동일한 질량 범위 근처에서 클러스터를 형성하기 때문에, 두 이온 사이의 각 펩티드 동일성을 배정하는 것은 어렵다. 그러나 도 3A 및 3B의 펩티드 이온의 탠덤형 질량 분광 데이터는 그것들이 동일한 펩티드 단편 패턴을 가지는 것을 보여주었다 (데이터는 제시하지 않음). 비록 항원-항체 복합체로부터 얻어진 샘플로부터 작은 백분율의 비-중수소화 펩티드가 검출되었지만, 펩티드 이온의 대부분은 중수소로 남아있고, 항체/항원 결합 영역에 대한 제한된 용매 접근성에 의해 더 높은 질량 영역으로 변동되며, 이것은 mAb 결합 부위가 아마도 영역 EKKPPKEFLERFKSLL (SEQ ID NO: 2, 잔기 129 내지 144)을 함유하는 것을 나타낸다.

[0268] 유리 상태의 IL-21 및 항원-항체 복합체 두 가지로부터의 다른 펩신-소화된 펩티드를 도 3C 및 3D에 도시된 것과 같이 관찰하였고, 그것을 IL-21의 펩신-소화된 펩티드 단편의 이론적인 질량을 토대로 KSLQKMIHQHLSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 2, 잔기 141 내지 162) (m/z, 2519.2451)로서 확인하였다. 도 3D에 도시된 것과 같이, 이 22개의 아마노산 잔기 펩티드의 질량 변동 (Δ 질량=9.0Da)을 두 개의 상류 잔기 (도 2B,

EKKPPKEF (SEQ ID NO: 2, 잔기 129 내지 136) 및 LERFKSLL (SEQ ID NO: 2, 잔기 137 내지 144))의 질량 변동과 비교해보면, 이 영역은 mAb의 결합시 유일하게 가가스로 보호되었고, 이것은 이 펩티드 부분만이 mAb에 대한 결합에 포함될 수 있음을 나타낸다. 실제로 이 펩티드 서열은 C-말단 꼬리이고, 그것은 mAb에 의해 유일하게 보호되는 것으로 보이는 펩티드 (LERFKSLL (SEQ ID NO: 2, 잔기 137 내지 144))와 중첩하는 4개의 아미노산 잔기를 함유한다. 이들 중수소 보유에 대한 질량 분광 측정을 토대로, 본 발명자들은 IL-21 에피토프가 mAb EKKPPKEFLERFKSLL (SEQ ID NO: 2, 잔기 129 내지 144) 및 KSLQKMIHQHLSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 2, 잔기 141 내지 162)의 상류 서열에 결합한다고 추정하였다.

[0269]

B. 리신 표지화 보호 실험

[0270]

HDx 분석을 사용하여 IL-21 mAb 결합 에피토프 영역을 추정하였고, 추정된 결합 에피토프 영역에 5개의 리신 잔기가 있음을 관찰하였다 (IL-21중의 총 12개의 리신 잔기로부터). 리신 잔기는 대부분 그것의 대전된 특징으로 인해 용매에 접근이 용이한 단백질의 영역에 존재하는 것으로 보이기 때문에, 리신은 항원 에피토프 영역의 평행한 결정기에 대한 선택적인 화학적 변형을 위한 이상적인 선택인 것으로 보인다. 화학적 변형 전략 배후의 개념은, 항체의 존재 및 부재시에 항원의 리신 변형의 보호는 그것의 결합 에피토프에 상관관계가 있다는 것이다 (Scholten et al., *J. Amer. Soc. Mass Spectr.* 17:983-994, 2006). 그러므로 mAb의 결합에 포함된 추가의 에피토프 영역의 특성확인 및 그런 리신 잔기의 측정에 대해, 리신 잔기 상의 선택적인 아세틸화를 친화성 결합된 및 유리 상태 둘 다의 IL-21에서 수행하였다. 리신 변형/보호의 부위를 MALDI-TOF를 사용한 전체 질량 및 펩티드 지도화 분석 및 전자 분무 이온화 (ESI) 질량 분광 분석에 의해 측정하였다.

[0271]

솔튼 등 (Scholten et al., *J. Amer. Soc. Mass Spectr.* 17:983-994, 2006)은 아세틸화 영역 (NHS-아세테이트)과 용매 접근성 리신 잔기의 전체 아세틸화에 대한 항원 사이의 물비를 연구조사하였고, 그 결과 표지화는 3분 반응에서 250배 몰과량의 시약에서 효과적이었음을 발견하였다. 결합 에피토프를 측정하기 위하여, 동일한 표지화 반응 조건을 유리 상태의 IL-21과 친화성 결합된 IL-21 둘 다에 대해 사용하였고, 이때 여러 개의 중화 IL-21 mAb와, 또한 IL-21 이중이량체 수용체 단백질 (IL-21R/c-Fc)이 포함된다. 표지화 반응 조건이 제공될 때, IL-21 단독 및 친화성-결합된 IL-21의 리신 잔기의 상이한 용매 접근성은 IL-21 분자 상에 리신 아세틸화 (아세틸 사용)의 분포를 유발하였다. 친화성-결합된 IL-21 상의 보호된 리신 잔기의 수를 가장 강력한 이온에 의해 IL-21 단독과 비교하였다. 가장 강력한 이온을 토대로 한 스펙트럼 배열은 상이한 면역 복합체로부터 분리된 항원의 리신 아세틸화의 수가 서로 다르다는 것을 분명하게 보여주었다. 리신 표지화 시약은 친화성-결합된 IL-21에 친화성-결합된 IL-21에 쉽게 접근할 수 없다는 것이 명백하였다. 그러므로 아세틸화는 항원의 항체에 대한 결합에 의해 감소되었다.

[0272]

mAb의 결합체 포함될 수 있는 아세틸화 보호된 리신을 추가로 프로테아제 소화에 의해 프로브한 후, 액체 크로마토그래피 질량 분광분석을 사용하여 펩티드 질량 지도화 분석을 수행하였다. 공유결합으로 고정된 리신 잔기가 트립신 분해에 내성을 보이기 때문에, 펩신 단백질 가수분해성 효소를 사용하여 질량 분광분석으로 검출될 수 있는 더 많은 펩티드를 생성하여 리신 변형을 보다 상세하게 연구하였다. 단일 펩티드 이온 크로마토그래피를 사용하는 개별적인 펩티드의 변형을 연구조사하였다. 도 4에 도시된 것과 같이, 선택된 이온 크로마토그램을 대조표준 (IL-21 단독) 및 시험 샘플 (친화성 결합된 IL-21 분자) 둘 다로부터 얻어서 아세틸화된 및 비-아세틸화된 리신 잔기를 측정하였다. 도 4A는 주어진 크로마토그래피 조건에서 56.22분에 용출하는 단백질 가수분해 펩티드의 선택된 이온 크로마토그램이고, 단일동위원소 펩티드 이온 질량은 662.9Da였으며, 그것은 삽입된 질량 스펙트럼에 표시된 것과 같이 3중으로 대전된 상태 ($\Delta m = 0.3Da$)에 있는 것으로 나타났다. 이 펩티드를 3중으로 대전된 상태에서 리신 아세틸화된 펩신-소화된 펩티드 단편, TCPSCDSYEKK.PPKEF (SEQ ID NO: 2, 잔기 119 내지 136) (m/z , 1986 Da)로서 확인하였고, 반면 비-아세틸화된 펩티드 질량은 1860 Da (m/z)였다. 질량 차이 (아세틸화된 펩티드/비-아세틸화된 펩티드)는 126Da였는데, 이것은 이 펩티드의 세 개의 모든 리신 잔기가 유리 상태의 IL-21에서 아세틸화되었음을 나타낸다. 그러나 친화성 결합된 IL-21의 선택된 이온 크로마토그램은 펩티드의 흔적을 보이지 않았고 (도 4B), 이것은 세 개의 리신 잔기가 IL-21 항체 결합에 의해 완전하게 보호되었음을 나타낸다.

[0273]

추가 펩신-소화된 펩티드 (KSLQKMI (SEQ ID NO: 2, 잔기 141 내지 148))는 IL-21 mAb의 결합시에 보호되는 것으로 나타났다 (도 4C 및 4D). 그것의 단일동위원소 이온은 509Da(m/z)에서 이중으로 대전된 이온이었고 ($\Delta = 0.5Da$), 질량 차이 (아세틸화된 펩티드/비-아세틸화된 펩티드)는 42Da였으며, 이것은 이 펩티드의 두 개의 리신 잔기 중 하나만이 보호되었음을 나타낸다. 이전의 H/D 교환 실험은 펩티드 서열, KSLQKMIHQHLSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 2, 잔기 141 내지 162)의 C-말단 꼬리의 리신 상류가 항체 결합에 의해 대부분 보호된 것으로 보인다.

다는 것을 나타낸다. 그러므로 K113은 K119 대신에 항체 결합에 포함되는 것으로 보인다.

[0274] 4개의 리신 잔기 (K102, K103, K106 및 K113)를 클론 362.78.1.44 및 362.597.3 결합에 의해 아세틸화로부터 보호하였고, 그것들은 HDx 분석으로부터 측정된 것과 같이 추정된 IL-21 mAb 결합 에피토프 영역 내에 위치하였다. 포괄적으로 아세틸화 보호 분석은 항원-항체 상호작용에 특이한 리신 잔기가 포함된다는 것을 보여주고, 나아가 HDx 분석으로부터 추정된 에피토프 서열을 확인하였다.

[0275] 17C. 다양한 종으로부터의 IL-21 아미노산 서열의 비교

[0276] 실시예 3 및 9의 종 교차반응성 결과를 더 잘 이해하기 위하여, IL-21 mAb에 의해 결합된 IL-21 상의 규정된 에피토프의 관점에서 (실시에 17A 및 B), 아미노산 서열을 얻어서 다양한 종을 가로지르는 IL-21에 대해 비교하였다 (표 13). 전체 사람 서열은 게잡이 원숭이 및 붉은 털 원숭이 서열에 96% 이상 동일하였고, 반면 설치류 IL-21 서열에 대해서는 단지 61 내지 65% 동일하였다. 실시예 17에서 설명되는 것과 같이 클론 362.78.1.44 및 362.597.3에 의해 결합된 불연속적인 에피토프가 사람, 게잡이 원숭이 및 붉은 털 원숭이 IL-21에서 동일한 한편 (표 13에서 밑줄로 표시), 쥐 IL-21 서열은 사람 IL-21과 이들 영역에서 6개의 잔기가 상이하고, 마우스 IL-21 서열은 7개의 잔기가 상이하다는 것이 주지된다.

표 13

사람, 게잡이 원숭이, 붉은 털 원숭이, 쥐 및 마우스 IL-21에 대한

IL-21 아미노산 서열 배열

Hu IL-21	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSS	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLV
CynoIL-21	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSS	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLD
RhesusIL-21	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSS	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLD
Rat IL-21	MERTLVCLILIFLGLTVHKSSP	QRPDHLIRLRHLM DIVEQLKIYENDLD
MuIL-21	MERTLVCLVVIFLGLTVHKSSP	QGPDRLLIRLRHLDIVEQLKIYENDLD
Hu	PEFLPAPEDVETNCEWSAFCFQKAQLKSANTGNNERIINVS	SIKKLKRKPP
Cyno	PEFLPAPEDVETNCEWSAFCFQKAQLKSANTGNNERIINLS	SIKKLKRKSP
Rh	PEFLPAPEDVETNCEWSAFCFQKAQLKSANTGNNERIINLS	SIKKLKRKSP
Rat	PELLTAPQDVKGQCEHAFAFCFQKAKLKPSNTGNNTKFINDLLAQLRRRLP	
Mu	PELLSAPQDVKGHCEHAFAFCFQKAKLKPSNPGNNKTFIIDLVAQLRRRLP	
Hu	STNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS	SRTHGSEDS
Cyno	STGAERRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS	SRTHGSEDS
Rh	STGAERRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS	SRTHGSEDS
Rat	AKRTGNKQRHMAKCPSCDLYEKKTPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS	
Mu	ARRGGKKQKHIAKCPSCDSYEKRTPEFLERLKWLLQKMIHQHLS	

[0277]

[0278] IL-21 사람은 SEQ ID NO:2로서 표시되고; IL-21 마우스는 SEQ ID NO:11로서 표시되며; IL-21 게잡이 원숭이는 SEQ ID NO:9로서 표시되고; IL-21 붉은 털 원숭이는 SEQ ID NO:9로서 표시되며; IL-21 쥐는 SEQ ID NO:97로서 표시된다.

[0279] 두 개의 고도로 관련된 항-hIL-21 mAb 362.78.1 및 362.597.3에 대해 측정된 불연속 에피토프는 상기에서 밑줄이 그어져 있다.

[0280] 실시예 18 - 임상 전 및 임상 면역분석에 사용하기 위한 362.78-CHO에 대한 항-이디오타입 단클론성 항체

[0281] 임상전 및 임상 면역분석에 적용하기 위해 362.78-CHO에 특이적인 항-이디오타입 mAb를, 이 치료적인 항-IL-21 mAb로 처리된 잠재적인 항-362.78-CHO 항체 반응이 특이하게 측정될 수 있도록 제조하였다.

[0282] 이 실시예에서 그 자체가 항체인 면역원 (362.78-CHO)과 항-이디오타입 항체 사이를 구별하기 위하여, 면역원을 Ab1으로서 표시하고, 항-이디오타입 항체를 Ab2로서 표시할 것이다. 항-이디오타입 항체는 Ab1의 그것의 항원 (IL-21)에 대한 결합을 억제 (중화)해야 한다. 그러나 과정에서 항-이디오타입이 아닌 항-Ab1 항체가 생성될 것임이 주지되어야 한다. 정의하자면, 이것들은 항-362.78-CHO 결합, 비-중화 항체일 것이며, 또한 임상전 및 임상 면역분석에서 사용될 수 있다.

[0283] 방법: 362.78-CHO로 마우스를 면역하기 위하여, 5마리의 6 내지 8주의 BALB/c마우스 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA)를 362.78-CHO로 면역시켰다. 마우스를 ~50 μ g의 정제된 362.78-CHO를 Emulsigen

[®]-P 보조제 (MVP Laboratories INC, Omaha, NE)와 함께 제조업체의 지시대로 피하 주사함으로써 초기 면역시켰다. 초기 면역화 후에 각 마우스에게 추가로 Emulsigen[®]-P 보조제 중의 50 μ g의 362.78-CHO를 피하 경로를 통하여 6주 기간 동안 격주로 주사하였다. 세 번째 및 네 번째 면역화 후 7일 후에 마우스를 안와 정맥총을 통해 출혈시키고, 혈청을 혈액으로부터 분리하여 그것이 362.78-CHO에 결합하는 능력을 분석하였다.

[0284] 융합 동물의 선택은 포획 분석과 중화 분석을 둘 다 사용한다:

[0285] 포획 분석: 항혈청 중의 마우스 항-362.78-CHO (Ab2, 항-이디오타입) 항체가 362.78-CHO (Ab1, CHO 세포에서 생성된다, lot # E10569)에 결합하는 능력을 포획 사이클 ELISA 분석을 사용하여 평가하였다. 이 분석에서 96-웰 폴리스티렌 ELISA 플레이트의 웰을 먼저 코팅 완충액 (0.1M Na₂CO₃, pH 9.6) 중의 1 μ g/mL의 농도의 100 μ L/웰의 염소 항-사람 IgG, Fc 특이적 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)로 코팅하였다. 플레이트를 밤새 4℃에서 인큐베이션한 후, 미결합 항체를 흡인제거하고 플레이트를 300 μ L/웰의 세척 완충액 (PBS-Tween, 0.137M NaCl, 0.0022M KCl, 0.0067M Na₂HPO₄, 0.0020M KH₂PO₄, 0.05% v/w 폴리소르베이트 20, pH 7.2)으로 2회 세척하였다. 웰을 200 μ L/웰의 차단 완충액 (PBS-트윈 + 1% w/v 우혈청 알부민 (BSA))으로 60분 동안 실온 (RT)에서 차단하고, 흡인한 후, 플레이트를 300 μ L/웰의 PBS-트윈으로 2회 세척하였다. 웰을 362.78-CHO (Ab1, CHO 세포에서 생성된 ZGI, lot # E10569)와 함께 1g/ml (PBS-트윈 중의 1% BSA중의)의 농도로 인큐베이션하였다. RT에서 1시간 후, 웰을 흡인하고 플레이트를 상기에서 설명한 것과 같이 2회 세척하였다. 항혈청 (Ab2)의 연속적인 10-배 희석액 (PBS-트윈 중의 1% BSA 중의)을 1:1000의 초기 희석으로 시작하여 1:1,000,000의 범위로 제조하였다. 그런 다음 각 희석액의 이중 샘플을 분석 플레이트에 100 μ L/웰로 옮겼다. 정상적인 마우스 혈청을 네거티브 대조표준으로서 사용하였다. 1시간 동안 RT에서 인큐베이션한 후, 웰을 흡인하고 플레이트를 상기에서 설명한 것과 같이 2회 세척하였다. 그런 다음 웰에 1:5000의 희석으로 염소 항-마우스 IgG, Fc 특이적, HRP 포함된 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 100 μ L/웰로 첨가하였다. 1시간 동안 RT에서 인큐베이션한 후에 미결합 검출 항체를 웰로부터 흡인 제거하고 플레이트를 2회 세척하였다. 흡인 후에, 100 μ L/웰의 테트라메틸 벤지딘 (TMB)(BioFX Laboratories, Owings Mills, MD)을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 1분 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 색 발생을 100 μ L/웰의 중지 시약 (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD)을 첨가함으로써 중지시키고, 웰의 흡광도 값을 Molecular Devices Spectra MAX 340 기기상에서 450nm에서 판독한다.

[0286] 중화 분석: 항혈청 중의 마우스 항-362.78-CHO 항-이디오타입 항체 (Ab2)가 362.78-CHO (Ab1)의 결합 활성을 억제 (중화)하는 능력을 플레이트 기저 중화 분석을 사용하여 평가하였다. 이 분석에서 96-웰 폴리스티렌 ELISA 플레이트의 웰을 먼저 코팅 완충액 (0.1M Na₂CO₃, pH 9.6) 중의 1 μ g/mL의 농도의 100 μ L/웰의 사람 IL-21 리간드 (lot # A1207F)로 코팅하였다. 플레이트를 밤새 4℃에서 인큐베이션한 후, 미결합 리간드를 흡인제거하고 플레이트를 300 μ L/웰의 세척 완충액 (PBS-Tween, 0.137M NaCl, 0.0022M KCl, 0.0067M Na₂HPO₄, 0.0020M KH₂PO₄, 0.05% v/w 폴리소르베이트 20, pH 7.2)으로 2회 세척하였다. 웰을 200 μ L/웰의 차단 완충액 (PBS-트윈 + 1% w/v 우혈청 알부민 (BSA))으로 1시간 동안 차단한 후, 플레이트를 세척 완충액으로 2회 세척하였다. 항혈청 (Ab2)의 연속적인 10-배 희석액 (PBS-트윈 중의 1% BSA 중의)을 1:100의 초기 희석으로 시작하여 1:100,000의 범위로 제조하였다. 정상적인 마우스 혈청을 네거티브 대조표준으로서 사용하였다. 그런 다음 각 희석액의 이중 샘플을 96-웰 희석 플레이트에 100 μ L/웰의 농도로 옮겼다. Ab1을 2x 용액으로서 100 μ L/웰로 첨가하였다. RT에서 45분 동안 인큐베이션한 후에, 100 μ L/웰을 분석 플레이트에 옮긴 후 차단 완충액을 흡인하였다. 1시간 동안 RT에서 인큐베이션한 후에 웰을 흡인하고 플레이트를 상기에서 설명한 것과 같이 2회 세척하였다. 그런 다음 1:5000으로 희석된 양고추냉이 과산화효소-표지된 염소 항 사람 IgG, Fc 특이적, HRP 포함된 항체 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)를 각 웰에 100 μ L/웰로 첨가하고, 1시간 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 미결합 검출 항체를 제거한 후에, 플레이트를 2회 세척하고, 각 웰에 100 μ L/웰의 테트라 메틸 벤지딘 (TMB)(BioFX Laboratories, Owings Mills, MD)을 첨가하고, 플레이트를 2분 동안 RT에서 인큐베이션하였다. 색 발생을 100 μ L/웰의 중지 시약 (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD)을 첨가함으로써 중지시키고, 웰의 흡광도 값을 Molecular Devices Spectra MAX 340 기기상에서 450nm에서 판독한다.

[0287] 융합: 가장 높은 항-362.78-CHO 중화 역가를 나타내는 2마리의 마우스를 마지막으로 보조제 없이 PBS 중의 대략 50g의 362.78-CHO (Ab1)으로 피하 주사를 통해 면역시켰다. 4일 후에 이들 마우스의 비장과 림프절을 수득하였다. 림프구를 마우스 골수종 P3-X63-Ag8.653 세포 (American Type Culture Collection, CRL 1580)와 1:1 림프구-골수종 비율로 융합하기 위해, 당해 기술분야에 공지되어 있는 표준 방법을 사용하고, Cyto-pulse CEEF-50

장치 (Cyto Pulse Sciences Inc., Glen Burnie, MD)를 사용하여 전기융합을 수행하였다. 융합 혼합물을 96-웰 평평한 바닥 플레이트에 분배하였다. 융합 플레이트의 웰에 70% 대체된 하이브리도마 성장 배지 (1x L-글루타민 (100x), 1x 페니실린-스트렙토마이신 (100x) (모두 Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA 제품), 10% Fetalclone1 혈청, 비-열 비활성화된 (HyClone, Logan, UT), 10% 하이브리도마 클로닝 인자 (BM Condimed HI Roche Diagnostic, Indianapolis, IN), 1x HAT 보충물 (50x, Gibco Invitrogen)이 첨가된 IMDM)로 3회 공급하였다. 웰을 융합물을 플레이트하고 10일 후에 분석하였다.

[0288] 마스터 웰의 선택: 96-웰 융합 플레이트를 상기에서 설명된 것과 같이 코히 스타일 ELISA를 사용하여 마우스 항-362.78-CHO 이디오타입 항체의 존재에 대해 선별하였는데, 단 하이브리도마 상층액을 배양 플레이트로부터 회석하지 않은 채로 시험하였다. 포지티브 웰의 하이브리도마 세포는 24-웰 플레이트에서 배양시에 성공적으로 팽창하였다. 24-웰 배양물의 밀도가 대략 4 내지 6×10^5 세포/mL이 되었을 때, 상층액 (대략 1.5mL)을 각 웰에 대해 개별적으로 수집하여 보관하고, 각 웰로부터의 세포를 저온 보존하였다. 냉동 배지는 90%의 Fetalclone 1 혈청과 10%의DMSO로 구성되었다. 24-웰 상층액의 각각을 상기에서 설명된 포히 ELISA 및 플레이트 기저 중화 ELISA 분석 두 가지로 재분석하였다. 그 결과 팽창 후에 모든 마스터 웰 상층액은 용액 중에서 362.78-CHO 항체 (Ab1)을 인식하는 능력을 보유하였다. 마스터 웰 상층액 중 7개가 사람 IL-21 리간드에 대한 Ab1의 결합을 중화시키는 능력을 보유하였다.

[0289] 클로닝: 5개의 마스터 웰로부터의 세포를 그것들의 중화 활성에 따라 선택하고, 그것들을 관심의 중화 mAb를 생성하는 클론성 하이브리도마를 분리하기 위해 1x HT (100x, Gibco Invitrogen)가 첨가된 하이브리도마 성장 배지에 클론하였다. 세포를 표준 저밀도 희석 (웰당 1세포 미만) 접근법을 사용하여 96-웰 미소역가 세포 배양 플레이트에 클론하였고, 단일클론성을 분석 전 성장의 단일 초점에 대해 웰을 현미경으로 조사함으로써 평가하였다. 플레이트 후 6일 후에, 모든 플레이트를 항-362.78-CHO 항-이디오타입 억제 항체에 대한 중화 ELISA에 의해 선별하였다. 포지티브 세포로부터의 하이브리도마 세포는 성공적으로 24-웰 플레이트로 팽창되었다.

[0290] 첫 번째 라운드 클론의 선택: 특이한 mAb에 대해 포지티브이고 단지 한 콜로니에서만 하이브리도마가 성장한 웰로부터 유래한 각각의 클론된 하이브리도마 라인의 대략 6개의 웰로부터의 상층액을 각 클로닝 세트로부터 수집하고, 중화 ELISA로 다양한 희석물에서 재선별하여 최상의 중화 mAb 생성 클론을 확인하였다. 24-웰 배양물의 최상 클론의 밀도가 대략 4 내지 6×10^5 세포/mL이 되었을 때, 상층액을 각 웰에 대해 개별적으로 수집하여 보관하고, 각 웰로부터의 세포를 저온보관하였다.

[0291] 요약: 재조합 발현된 362.78-CHO 항체 (Ab1)에 대해 반응하는 마우스 단클론성 항체 (Ab2)가 생성되었고, 사람 IL-21에 대한 362.78-CHO 항체의 결합을 차단할 수 있는 중화 활성을 나타낸다. 이들 항체는 임상전 및 임상 면역분석에서 시약으로서 사용될 수 있다.

[0292] 실시에 19 - IL-21 mAb 362.78.1.44에 의한 고유한 세포내 사람 및 게잡이 원숭이 IL-21 (마우스 또는 쥐 IL-21은 제외)의 결합

[0293] 본원에 기술된 중화 항-IL-21 단클론성 항체를 사람 면역글로불린 유전자를 발현하고 재조합 사람 IL-21로 면역된 유전자도입 마우스로부터 생성되었다 (실시에 1 참조). IL-21 mAb 클론 362.78.1.44는 IL-21의 재조합 형태 외에 고유한 사람 IL-21에 결합하고, 그것을 중화하는 것을 확인하는 것이 중요하였다. 또한 임상전 독물학 연구를 지지하기 위하여, 다양한 종에 고유한 IL-21에 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44의 결합 용량을 이해하는 것이 도움이 될 것이다. 이것을 시험하기 위한 한 접근법은 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44를 형광 염료로 표지하고, 그것을 유세포 분석에 의해 활성화된 T 세포에서 세포내 IL-21을 검출하기 위해 사용하는 것이다. 이 연구에서, 새롭게 분리된 사람 및 게잡이 원숭이 말초혈 백혈구와 쥐 및 마우스 비장세포를 시험관 내에서 PMA와 이오노마이신을 사용하여 24시간 동안 활성화시켜서 IL-21 생성을 유도하였다. 세포를 수득하고, 고정시키고, 투과시킨 후 ALEXA FLUOR-647 (AF-647)로 표지된 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44를 사용하여 CD3 또는 CD4의 발현 (헬퍼 T 세포 집단을 규정하기 위하여) 및 IL-21의 발현을 위해 염색하고, 이소타입-매치된 대조 항체에 의해 유도된 염색 세기와 비교하였다. 이 분석에서 이소타입 대조 mAb에 대해 관찰된 것보다 높은 포지티브 신호는 특이한 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44가, 비록 그것이 IL-21 중화 활성의 표시제가 아니더라도 시험 종의 내인성 IL-21에 결합하는 것을 증명한다. 항-사람 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44와 결합하는 IL-21에 대한 포지티브를 시험하는 종에서 IL-21 중화를 증명하기 위해 추가의 연구가 필요하다 (실시에 20 참조).

[0294] 사람 PBMC의 분리: 100mL의 말초혈을 건강한 사람 지원자 (ZymoGenetics)로부터 그린 탑 헤파린 Vacutainer 튜브 (Becton Dickinson, San Jose, CA)에 수집하였다. 혈액을 100mL의 실온의 PBS로 희석하고, 35mL의 분취액을

50mL의 원뿔형 튜브에 분배하였다. 14mL의 실온의 피콜/파크 PLUS (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 밑에 넣고 튜브를 20분 동안 2000rpm에서 회전시켰다. PBMC 계면층을 제거하고, 분석 배지 (페니실린/스트렙토마이신, 10% 우태아 혈청, 피루브산 나트륨, 2 μ M β -메르타포에탄올 (모두 Invitrogen, Carlsbad, CA 제품)이 첨가된 RPMI 1640)로 2회 세척하였다. 표준 기법을 사용하여 생존 세포를 트립판 블루로 계수하였다.

[0295] 계잡이 원숭이 PBMC의 분리: 40mL의 말초혈을 시애틀의 워싱턴 주립대학에서 사육하는 계잡이 원숭이로부터 그 린-탐 헤파린 Vacutainer 혈액 수집 튜브 (BD Biosciences)에 수집하였다. 혈액을 40mL의 실온 PBS로 희석하 고, 35mL의 분취액을 50mL의 원뿔형 튜브에 분배하였다. 14mL의 실온의 피콜/파크 PLUS (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 밑에 넣고 튜브를 20분 동안 2000rpm에서 회전시켰다. PBMC 계면층을 제거하고, 분석 배지 (페니실린 /스트렙토마이신, 10% 우태아 혈청, 피루브산 나트륨, 2 μ M β -메르타포에탄올 (모두 Invitrogen, Carlsbad, CA 제품)이 첨가된 RPMI 1640)로 2회 세척하였다. 표준 기법을 사용하여 생존 세포를 트립판 블루로 계수하였다.

[0296] 쥐과 및 쥐 비장세포의 분리: 쥐와 마우스 비장세포 두 가지를 모두 다음 프로토콜에 따라 제조하였다. 새롭게 수집된 비장을 두 개의 반투명 유리 슬라이드의 끝을 사용하여 부드럽게 파괴하여 단일 세포 현탁액을 만들었다. 그런 다음 세포를 70 μ M 나일론 메쉬를 통과시켜서 클립프를 제거하였다. 세포 펠릿을 2mL의 ACK 용 해 완충액에서 10분 동안 실온에서 재현탁함으로써 적혈구를 용해하였다. 이 반응을 분석 배지를 첨가함으로써 중지시킨 후 세포를 원심분리하고 (1200 RPM, 5분), 재현탁하고 또 다른 나일론 메쉬 필터를 통과시켜서 과편을 제거하였다. 생존 세포를 표준 기법을 사용하여 트립판 블루로 계수하였다.

[0297] PMA 및 이오노마이신을 사용한 세포의 밤샘 활성화: 모든 종으로부터의 세포를 mL당 2.0×10^6 세포로 재현탁하 였다. 그런 다음 1mL의 세포를 20ng/mL의 PMA 및 200ng/mL의 이오노마이신과 함께 혹은 그것들 없이 24-웰 플레 이트에 놓고 37°C에서 20시간 동안, 가습된 5% CO₂ 조직 배양 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 20시간 후에 1.0 μ L의 GolgiPlug (BD Pharmingen)를 각 웰에 첨가하고 웰을 추가로 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[0298] 세포 수득 및 표면 염색: 위에서 설명된 24시간 인큐베이션 후에 세포를 수득하고, 저온 FACS 완충액으로 세척 한 후에 웰당 2.0×10^5 내지 5.0×10^5 세포로 96-웰 조직 배양 플레이트 (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ)에 플레이트하였다. 그런 다음 세포를 1 μ g/mL의 하나 또는 그 이상의 다음 항체: 항-쥐과 CD4-PE, 항 -쥐 CD3-PE, 항-쥐 B220-PE, 또는 항-원숭이 CD4-PE, 또는 항-사람 CD4-PE로 얼음 위에서 20분 동안 적절하게 염색하였다. 그런 다음 세포를 PBS로 2회 세척하여 고정용 제제를 만들었다.

[0299] 세포 고정 및 투과 처리: 세포를 고정하기 위하여, 각 세포 펠릿을 200 μ L의 2% 파라포름알데하이드에 재현탁하 고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 원심분리하고 (1200rpm에서 5분), 상층액을 흡인한 후 세포를 투과처리 완충액 [0.1% 사포닌(Calbiochem) 및 0.5% BSA (Sigma)]에서 10분 동안 실온에서 재현탁하 였다.

[0300] 세포내 염색: 고정 및 투과처리 후에 세포를 약 1 μ g/mL의 다음의 표지된 항체 중 하나로 염색하였다: 항-마우스 IL-21-AF647, 항-사람 IL-21 클론 362.78.1.44-AF647 (둘 다 ZymoGenetics 제품) 또는 비교할만한 항-사람 IL- 21-AF647 항체 (BD Pharmingen). 그런 다음 세포를 실온에서 어두운 곳에서 40분 동안 인큐베이션하였다. 40분 후에 세포를 FACS 완충액 (1% BSA, 2% 사람 AB 혈청 및 0.05% HEPES가 보충된 HBSS)으로 2회 세척하였다.

[0301] 데이터 획득 및 분석: 염색 및 세척을 완료했을 때 세포를 400 μ L의 FACS 완충액에 재현탁하고, CellQuest 소프 트웨어를 작동시키는 FACS 칼리버 (BD Pharmingen)을 사용하여 데이터를 수집하였다. 데이터를 FCS Express 데 이터 분석 소프트웨어 (De Novo software, Los Angeles, CA)를 사용하여 분석하였다.

[0302] 결과:

[0303] PMA+이오노마이신 자극된 사람 T 세포에서의 사람 IL-21의 검출: CD3+ T 세포의 단지 0.015%만이 이소타입 대조 표준을 사용하여 포지티브 염색된 반면, 대략 9%의 CD4+ T 세포가 AF-647로 표지된 IL-21 mAb클론 362.78.1.44 를 사용하여 IL-21에 대해 포지티브로 염색되었다. 동일한 분획의 IL-21+ 세포가 상업적으로 이용할 수 있는 IL-21 mAb (eBioscience)를 사용하여 검출되었다. 이것은 IL-21 mAb가 사람 CD4+ T 세포에서 내인성으로 생성 된 IL-21에 결합할 수 있다는 것을 증명한다.

[0304] PMA+이오노마이신 자극된 말초혈 단핵세포에서 계잡이 원숭이 IL-21의 검출: 대략 3.6%의 CD3+ 계잡이 원숭이 T 세포가 AF-647로 표지된 IL-21 mAb클론 362.78.1.44를 사용하여 IL-21에 대해 포지티브로 염색되었다. 이 숫자 는 eBioscience로부터 상업적으로 구매할 수 있는 항-사람 IL-21 mAb를 사용하여 검출된 것보다 더 높다. 이런 차이는 계잡이 원숭이 IL-21에 대한 eBioscience의 보다 약한 결합 친화성으로 인한 것일 수 있다. 이들 결과는

항-사람 IL-21 mAb 클론 362.78.144가 게잡이 원숭이 CD3+ T 세포에서 내인성으로 생성된 IL-21에 결합할 수 있음을 증명한다.

[0305] PMA+이오노마이신 자극된 비장세포에서 쥐 IL-21의 검출: 대조표준으로서 ZymoGenetics에서 생성된 쥐 항-쥐 IL-21 단클론성 항체를 사용하여, 대략 13.5%의 활성화된 마우스 CD4+ T 세포가 IL-21에 대해 포지티브였다. 그러나 웨스턴 블롯으로부터 예상된 것과 같이, 중화 생체활성 분석은 항-사람 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44가 마우스 IL-21에 결합하지 않거나 중화하지 못하는 것을 보여주었고 (실시예 3 및 9 참조), AF647로 표지된 항-사람 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44는 어떠한 IL-21-포지티브 세포를 검출하지 못하였다. 이것은 추가로 항-사람 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44가 쥐 IL-21에 결합하지 못하는 것을 증명한다.

[0306] PMA+이오노마이신 자극된 비장세포에서 쥐 IL-21의 검출: 쥐 비장세포를 밤새 PMA 및 이오노마이신의 존재하에 자극하였다. 이들 자극 조건은 사람, 게잡이 원숭이 및 쥐 T 세포에서 IL-21 포지티브 T 세포를 생성하기에 충분하였다. 이 실험에서 항-마우스 IL-21 mAb나 항-사람 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44는 IL-21에 대해 포지티브인 어떠한 세포도 검출하지 못하였다. 그러나 이 실험에서 포지티브 대조표준이 없기 때문에, 이런 네거티브 결과는 결론적으로 항-사람 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44가 쥐 IL-21에 결합할 수 있다는 가능성을 제거하지 못하였다. 그러나 이들 데이터는 다른 분석법에서 (실시예 9 참조) 항-사람 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44에 의해 쥐 IL-21 생체 활성의 중화가 없다는 것을 함께 고려할 때 이 mAb가 아마도 쥐 IL-21에 결합하지 못한다는 것을 강력하게 시사한다.

[0307] 결론: 본원에서 기술되는 IL-21 MAb 클론 362.78.1.44는 IL-21 단백질의 고유한 사람 및 게잡이 원숭이 형태에는 분명하게 결합하지만 쥐 또는 쥐 IL-21에는 결합하지 않는다.

표 14

종	이소타입 대조표준	항-사람 IL-21 mAb (클론 78)	항-IL-21 포지티브 대조표준
사람	0.015%의 CD3+ T 세포가 hIgG4-AF647 대조표준으로 포지티브 염색되었다	9%의 CD3+ T 세포는 IL-21+였다	10%의 CD3+ T 세포는 IL-21+였다 (eBioscience α IL-21 mAb+)
게잡이 원숭이	0.1%의 CD3+ T 세포가 hIgG4-AF647 대조표준으로 포지티브 염색되었다	3.6%의 CD3+ T 세포는 IL-21+였다	0.2%의 CD3+ T 세포는 IL-21+였다*
마우스	사용된 이소타입 대조표준 없음	검출되지 않음	13.5%의 CD4+ T 세포는 IL-21+였다
쥐	사용된 이소타입 대조표준 없음	검출되지 않음	활용할 수 없음

[0309] * (이 mAb는 게잡이 원숭이 IL-21에 강력하게 결합할 수 없다).

[0310] 실시예 20 - 클론 362.78.1.44에 의한 고유한 사람 IL-21 생체 활성의 결합 및 중화

[0311] 본원에서 설명된 중화 항-IL-21 단클론성 항체 (IL-21 mAb)를 사람 면역글로불린 유전자를 발현하는 유전자도입 마우스로부터 생성하고, 제조한 사람 IL-21로 면역시켰다 (실시예 1 참조). IL-21 mAb 클론 362.78.1.44가 IL-21의 제조한 형태 외에 고유한 사람 IL-21에 결합하고 중화할 수 있는지를 확인하는 것이 중요하였다. 고유한 IL-21의 중화를 증명하기 위하여, 앞에서 설명한 (실시예 7 참조) Baf3/IL-21R pSTAT 세포-기저 분석을 활용하였고, 활성화된 CD4+ T 세포 조건 배지 샘플을 고유한 IL-21의 공급원으로서 사용하였다. 이 실험에서 T 세포 조건 배지 샘플을 다양한 양의 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44와 함께 사전 인큐베이션한 후, Baf3/hIL-21R 형질 전환체에서 IL-21 유도된 STAT3 인산화 (pSTAT3)의 수준을 측정하였다. 고유한 IL-21의 중화를 별도의 건강한 4명의 공여체로부터 얻은 활성화된 T 세포 조건 배지 샘플을 사용하여 증명하였다.

[0312] 사람 PBMC의 분리 및 T 세포 조건 배지 샘플의 제조: 100mL의 말초혈을 4명의 건강한 지원자 (ZymoGenetics)로부터 그린 탑 헤파린 Vacutainer 튜브 (Becton Dickinson, San Jose, CA)에 수집하였다. 그런 다음 혈액을 100mL의 실온 PBS로 희석하고, 35mL의 분취액을 50mL의 원뿔형 튜브에 분배하였다. 14mL의 실온의 피콜/파크 PLUS (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 밑에 놓고 튜브를 20분 동안 2000rpm에서 회전시켰다. PBMC 계면층을 제거하고, 분석 배지 (페니실린/스트렙토마이신, 10% 우태아 혈청, 피루브산 나트륨, 2μM β-메르캅토에탄올 (모두 Invitrogen, Carlsbad, CA 제품)이 첨가된 RPMI 1640)로 2회 세척하였다. 표준 기법을 사용하여 생존 세포를 트립판 블루로 계수하였다. T 세포를 Milteny Biotec (Auburn, CA)로부터의 사람 CD4+ T 세포 선택 키트를

제조업체가 개관한 프로토콜을 따라 사용하여 네거티브로 선택하였다. 표준 면역표현형 검사 기법을 사용하여, CD4+ T세포를 계속해서 유세포 분석에 의해 95% 이상 순수한 것으로 측정하였다. 그런 다음 T 세포를 3일 동안 웰당 5×10^5 세포로, $5.0 \mu\text{g/mL}$ 의 항-IFN, $1.0 \mu\text{g/mL}$ 의 항-CD28 (모두 Becton Dickinson 제품) 및 10 ng/mL 의 재조합 IL-21 (R&D Systems, Minneapolis, MN)을 함유하는 Th1 비대칭 배지에서 $5.0 \mu\text{g/mL}$ 의 항-CD3 항체로 예비 코팅하였다. 3일 후에 세포를 세척하고, 25 ng/mL 의 PMA 및 500 ng/mL 의 이오노마이신을 함유하는 배지에서 다시 플레이트한 후 5시간 동안 37°C 에서 인큐베이션하였다. 5시간 후에 조건 배지 샘플을 수득하고 냉동한 후 실험 일까지 -80°C 에서 보관하였다.

[0313] T 세포 조건 배지 샘플에서 대략적인 IL-21 농도를 추정하기 위해, 1:4 연속 희석액을 제조하고 Baf3/hIL-21R 형질전환체에서 STAT3 인산화의 유도에 대해 시험하였다. 10분 동안 실시예 7에서 개관한 pSTAT3 생체분석 프로토콜을 따른 후에 각 조건 배지 샘플 중의 IL-21의 상대 농도를, pSTAT3의 수준을 재조합 IL-21의 적정을 사용하여 생성된 것과 비교함으로써 측정하였다. 이들 데이터를 사용하여 4개의 조건 배지 샘플 각각의 IL-21의 농도를 5.0 과 10.0 ng/mL 사이에 있는 것으로 측정하였다.

[0314] 고유한 IL-21-유도된 STAT3 인산화의 중화를 증명하기 위하여 1:10 희석물 (0.5 와 1.0 ng/mL 사이의 최종 IL-21 농도)의 4개의 T 세포 조건 배지 샘플을 30분 동안 37°C 에서 1:4 연속 희석물의 IL-21 mAb 클론 362.78.1.44와 함께 예비인큐베이션하였다. 클론 362.78.1.44의 농도는 0.4 내지 400 ng/mL 사이였다. 30분 후에 조건 배지 + IL-21 mAb 샘플을 Baf3/hIL-21R 세포 플레이트에 옮기고, 추가로 10분 동안 37°C 에서 인큐베이션하였다. 10분 후에 반응을 저온 세척 완충액을 사용하여 중지시키고, 세포를 용해한 후 pSTAT3의 양을 실시예 7에 설명한 방법을 사용하여 측정하였다.

[0315] 4개의 모든 조건 배지 샘플에서 클론 362.78.1.44 mAb는 IL-21 활성을 효과적으로 중화하였다 (데이터는 아래의 표 15에 나타냄). 이들 데이터는 클론 362.7.8.1.44가 고유한 사람 IL-21에 효과적으로 결합하고 중화하는 것을 명백하게 증명한다.

표 15

[0316] IL-21 mAb 클론 362.78.1.44에 의한 고유한 IL-21의 중화

IL-21 mAb 농도 (ng/mL)	pSTAT3 유도 (바탕값 이상의 배율)			
	공여체 1	공여체 2	공여체 3	공여체 4
0.4	69.49	56.32	61.11	62.73
1.6	70.84	61.73	68.24	65.41
6.25	70.76	10.46	7.51	60.65
25	2.16	1.62	1.70	2.49
100	168	1.43	1.51	1.49
400	1.59	1.30	1.14	1.51

[0317] 실시예 21

[0318] 21A. 게잡이 원숭이에서 IL-21 mAb 362.78-CHO를 사용한 파일럿 독성 연구

[0319] IL-21 mAb 362.78-CHO의 에피토프 특이성을 사람, 붉은 털 원숭이 및 게잡이 원숭이 (실시예 17 및 17b)와 공유하므로, IL-21 mAb의 허용도 및 독성을 안전성 평가를 위해 관련된 종인 게잡이 원숭이에서 시험하였다.

[0320] 게잡이 원숭이를 IL-21 mAb 362.78-CHO를 단일 주사하여 처리하고, 처리 후 4 내지 8주 동안 임상 신호에 대해 모니터링하였다. IL-21 mAb를 피하 또는 정맥 내 주사에 의해 5 또는 100 mg/kg 의 용량으로 전달하였다. 임상 신호는 관찰되지 않았다. 체중 또는 응집에서 의미있는 변화는 관찰되지 않았다. 약물 독성에 기여하는 혈청 화학이나 조직학에서의 변화도 관찰되지 않았다. 5 또는 100 mg/kg 의 IL-21 mAb 362.78-CHO로 단일 처리하는 것을 모든 동물이 잘 견디었다.

[0321] 고-용량 (100 mg/kg) 동물에 대해 부검을 수행하였다. 총 해부학적 변화가 관찰되지 않았다. 고용량 동물의 조직 병리학적 분석은 림프종 조직에서 최소한의 림프종 과형성을 나타냈다. 림프종 조직의 면역조직화학적 분석은 여포 크기와 여포-관련 세포 유형의 중간 정도의 증가를 나타냈다. 이들 변화는 IL-21 mAb 362.78-CHO의 약리학적 활성에 관련될 수 있는데, 왜냐하면 IL-21이 림프종 여포로부터의 B 세포의 발생 및 탈출에 영향을 미치고 등급 전환, 친화성 성숙 및 원형질 세포 발생을 지지하는 것으로 알려져 있기 때문이다.

- [0322] IL-21 mAb362.78-CHO의 약리역학적 양식 및 생체 내 활용성을 게잡이 원숭이에서 단일 용량 연구로 모니터링하였다. 8마리의 수컷 게잡이 원숭이를 IL-21 mAb 362.78-CHO로 처리하였다. 세 마리를 5mg/kg의 피하 주사로 처리하고, 세 마리를 5mg/kg의 정맥 내 주사로 처리하였다. 나머지 두 마리는 100mg/kg의 정맥 내 주사로 처리하였다. 혈청 샘플을 취하여 100mg/kg 군에 대한 처리 후 4주 동안 IL-21 mAb 362.78-CHO 수준과 두 개의 5mg/kg 군에 대한 처리 후 8주 동안의 IL-21 mAb 362.78-CHO 수준을 분석하였다. 약리역학적 프로파일의 비구획 분석은 5 또는 100mg/kg의 IL-21 mAb를 정맥 내 투여할 때 용량-비례하는 방식으로 노출이 증가되었음을 나타냈다. IL-21 mAb 362.78-CHO의 생체 내 활용성은 피하 투여 후 대략 50%였다. IL-21 mAb에 대한 추정된 말단 반감기는 10 내지 14일이었다. 게잡이 원숭이에서 IL-21 mAb *삽입: 362.78-CHO의 추정되는 말단 반감기는 10 내지 14일이었다.
- [0323] 21B. 게잡이 원숭이에서 362.78-CHO를 사용한 파일럿 약리학 연구
- [0324] IL-21 mAb 362.78-CHO의 에피토프 특이성을 사람, 붉은 털 원숭이 및 게잡이 원숭이 (실시에 17 및 17b)와 공유하므로, IL-21 mAb의 생체 내 약리학을 약리역학적 평가를 위해 관련된 종인 게잡이 원숭이에서 시험하였다.
- [0325] 게잡이 원숭이를 IL-21 mAb 362.78-CHO를 단일 주사하여 처리하고, 처리 후 4 내지 8주 동안 임상 신호에 대해 모니터링하였다. IL-21 mAb를 피하 또는 정맥 내 주사에 의해 5 또는 100mg/kg의 용량으로 전달하였다. 모든 동물을 유세포 분석에 의해 말초혈 백혈구 조성의 변화에 대해 모니터링하였다. 단핵세포 또는 B 세포 농도에서 처리-관련 변화는 없었고, T 세포 CD4 및 CD8 하위세트에서나 CD4의 CD8 세포에 대한 비율에서도 변화는 관찰되지 않았다. NK 세포 농도의 감소는 IL-21 mAb 362.78-CHO를 투여한 후에 관찰되었다. 모든 처리 군에서 말초혈 NK 세포는 바탕값과 비교하여 처리 후 24시간 후에 감소하였다. 8마리 동물 중 5마리에서 NK 수준은 최소한 2주 동안 바탕값의 60% 아래로 유지되었다. 이런 관찰을 확인하기 위하여 말초혈 NK 세포 농도의 가변성의 다른 근원 및 취급 스트레스를 적절히 조절하는 확인 연구가 필요할 것이다.
- [0326] 실시에 22 - 마우스 콜라겐 유도된 관절염 (CIA) 모델에서 항-IL-21 항체는 질병 발생 및 진행을 감소시킨다
- [0327] 마우스 콜라겐 유도된 관절염 (CIA) 모델:
- [0328] 당해 기술분야에 공지되어 있는 류머티스성 관절염에 대한 동물 모델은 여러 개가 있다. 예를 들어 콜라겐-유도된 관절염 (CIA) 모델에서, 마우스는 사람 류머티스성 관절염을 매우 닮은 만성 염증성 관절염을 나타낸다. CIA가 유사한 면역학적 및 병리적 특징들을 RA와 공유하기 때문에 이런 사실은 이 모델을 잠재적인 사람 항-염증성 화합물을 선별하기 위한 이상적인 모델로 만든다. CIA 모델은 발생하기 위해서는 면역 반응과 염증성 반응 둘다에 좌우되는, 잘 알려져 있는 마우스 모델이다. 면역 반응은 콜라겐에 대한 반응으로 B-세포와 CD4+ T 세포의 상호작용을 포함하고, 그것은 항-콜라겐 항체의 생성을 유도한다. 염증 단계는 염증의 매개자로부터 조직 반응의 결과이고, 마우스 고유의 콜라겐에 대해 교차반응하고 보체 캐스케이드를 활성화하는 이들 항체 중 일부의 결과이다. CIA 모델을 사용할 때의 장점은 발병의 기본적인 메커니즘이 알려져 있다는 것이다. 타입 II 콜라겐상의 관련된 T-세포 및 B-세포 에피토프는 확인되었고, 면역-매개된 관절염과 관련된 다양한 면역학적 (예컨대 지연형 과민성 및 항-콜라겐 항체) 및 염증성 (예컨대 사이토킨, 케모카인, 및 매트릭스-분해 효소) 매개변수들이 측정되었으며, 따라서 CIA 모델에서 시험 화합물 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다 (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams et al., *Immunol.* 89:9784-788, 1992; Myers et al., *Life Sci.* 61:1861-78, 1997; and Wang et al., *Immunol.* 92:8955-959, 1995). ZymoGenetics 제품인 쥐 항-마우스 IL-21 mAb의 잠재적인 효능을 아래에서 설명되는 것과 같이 CIA 모델에서 시험하였다.
- [0329] 생후 10주 된 수컷 DBA/1J 마우스 (Jackson Labs)를 치료 투약에 사용하였다 (즉 규명된 질병에 걸린 마우스로서 사용함). -21일에 모든 동물에게 꼬리의 피부내 주사에 의해 완전 프로인트 보조제 (Chondrex, Redmond, WA 제품)중에 제형된 100 μ l의 1mg/mL 닭 유형 II 콜라겐을 투여하고, 3주 후인 제 0일에 그 동물들에게, 불완전 프로인트 보조제 중에 제조한 것을 제외한 동일한 주사를 제공하였다. 마우스가 규명된 질병을 보이자마자 바로 항-IL-21 항체 또는 비히클 (PBS)을 복강 내 주사에 의해 격일로 총 6회 투여하였다. 마우스 (n=7/처리)에게 용량당 마우스당 0.15mg의 항-IL-21 항체, 또는 비히클 대조표준인 PBS (Life Technologies, Rockville, MD)중 하나를 투여하였다. 동물들은 두 번째 콜라겐 주사 후에 관절염 증상을 나타내기 시작하였고, 대부분의 동물은 1~2주 내에 염증을 전개하였다. 질병의 정도를 발에서 캘리퍼스를 사용하여 발 두께를 측정하고, 각 발에 대해 임상적인 경과 (0 내지 3)를 배정함으로써 평가하였다.
- [0330] 질병의 모니터링:
- [0331] 동물들은 두 번째 콜라겐을 주사한 직후에 발에 염증 신호를 나타내기 시작했고, 일부 동물은 심지어 두 번째

콜라겐을 주사하기 전에 이미 발가락에 염증 신호를 나타내기 시작하였다. 대부분의 동물은 추가 주사 후 1~2주 내에 관절염을 나타냈지만, 일부는 더 긴 기간을 필요로 하기도 하였다. 이 모델에서 질병의 발생은 전형적으로 90 내지 100%이고, 60마리의 동물을 사용한 연구에서 전형적으로 0 내지 5마리의 비-반응 (관찰을 시작하고 6주 후에 측정함)도 볼 수 있었다. 이 연구는 오직 규명된 질병에 걸린 마우스만을 포함하였기 때문에 관절염을 전 개하지 않은 마우스들은 사용하지 않았다. 염증이 시작됨에 따라 통상적으로 변동이 심한 저등급 발 또는 발가락 염증의 일시적인 발생도 생길 수 있다. 이런 이유로 동물을 현저하고 지속적인 발 팽창이 전개될 때까지 규명된 질병에 걸린 것으로 간주하지 않았다.

[0332] 모든 동물을 매일 관찰하여 그들의 발의 질병 상태를 평가하였는데, 그것을 각 발에 정량적인 임상 경과를 배경 함으로써 실시하였다. 매일 각 동물을 그것의 임상적인 질병 상태에 따라 4개의 발에 대해 기록하였다. 임상 경과를 측정하기 위하여 발을 3개의 부분, 즉 발가락, 발 자체 (manus 또는 pes), 및 발목 또는 발목 관절을 가지고 있는 것으로 생각하였다. 이들 부분에 관련된 염증의 정도 및 심각성을 다음의 것들을 포함하여 고려하였다: 각 발가락의 팽창에 대한 관찰; 발톱의 찢어짐이나 발가락의 빨개짐; 어느 발에서든 부종 또는 빨개짐의 모든 증거에 대한 표시; 힘줄이나 뼈의 미세한 해부학적 경계의 어떠한 손실에 대한 표시; 발목의 어떠한 부종 또는 빨개짐에 대한 평가; 및 염증이 다리로부터 확장되었는지에 대한 표시. 1, 2 또는 3의 발 점수는 처음에는 전체 적인 심각성의 인식을 토대로 하였고, 두 번째로는 얼마나 많은 부분이 포함되었는지를 토대로 하였다. 임상 기록에 사용한 척도를 아래에 제시한다.

[0333] 임상 기록:

[0334] 0 = 정상

[0335] 0.5 = 하나 또는 그 이상의 발가락이 포함되지만, 발가락에만 염증이 있다.

[0336] 1 = 발 (1 부분)을 포함한 경미한 염증, 발가락 하나 또는 여러 개를 포함할 수 있다.

[0337] 2 = 발의 중간 정도의 염증이며, 일부 발가락 및/또는 발목 (2 부분)을 포함할 수 있다.

[0338] 3 = 발, 발목, 및 일부 또는 발가락 전체 (3 부분)의 심각한 염증.

[0339] 규명된 질병을 1 또는 그 이상의 등급으로, 계속해서 2일 동안 지속되는 발 염증의 정성적인 경과로서 규정하였다. 일단 규명된 질병이 존재하면, 그 날을 기록하고 그 동물의 "규명된 질병"을 보이는 첫 번째 날로 표시하였다.

[0340] 항-mIL-21 항체를 받은 마우스들은 특징적으로, 실험의 전 과정에 걸쳐 발 팽창이 감소되었고, PBS를 받은 마우스에 비교하여 대략적으로 평균 25% 더 낮은 관절염 경과를 나타냈다. 이들 결과는 항-mIL-21 항체가 이 관절염 모델과 관련된 발 팽창과 질병 진행을 감소시켰음을 나타내며, 항-IL-21 항체가 사람 관절염의 치료에서도 효과적인 수 있음을 시사한다.

[0341] 실시예 23 - 사람 건선 피부 샘플에서 IL-21R의 발현

[0342] IL-21R의 발현은 일반적으로 조혈세포 기원의 세포에 국한된다. 그러나 염증성 질병의 환경에서, 비-조혈세포 상에서의 IL-21R 발현은 영향을 받은 조직의 기능적 변화를 매개하는 세포 유형에 대한 직접적인 자극을 제공할 수 있다. 건선에서 케라틴 생성 세포 성장은 이상조절되고, 건선형 상피의 과형성, 비정상적인 말단 분화, 및 표피 각질층의 불완전한 발생이 일어난다. 건선 피부에 Th1 및 Th17 세포를 침투시킴으로써 생성된 IL-21은 케라틴 생성 세포의 기능성 변화, 이를테면 세포 증식, 케모카인의 생성, 및 변경된 분화를 촉진할 수 있을 것이다. 따라서 건선 피부 병변에서 케라틴 생성 세포상의 IL-21의 존재에 대해 연구하였다.

[0343] 방법: ZymoGenetics에서 생산된 사람 IL-21R에 대한 마우스 IgG1 항체를 사용하여, 4명의 정상인 공여자 및 9명의 건선 환자로부터 얻은 18개의 피부 생검 샘플을 면역조직화학적으로 분석하였다. 건선 환자의 경우 하위 세트 (5)는 병변과 비-병변 피부 두 곳으로부터의 샘플을 제공하였다. 모든 공여자로부터 얻은 병변성 피부의 조직병리학적 조사에서 고도의 상피 과형성이 주지되었다. 특이한 세포 유형에 대한 IL-21R의 면역반응성 (염색)을 포지티브 세포의 빈도와 염색의 세기를 토대로 기록하였다.

[0344] 결과: 정상인 피부와 건선 환자의 비-병변성 피부에서, IL-21R에 대한 염색은 때로는 표피 내 단핵 (MNC), 산재한 대식세포 및 섬유아세포-유사 세포상에서 포지티브였다. IL-21R에 대한 포지티브 염색은 건선 환자로부터의 모든 병변성 샘플에서 대다수의 MNC상에 존재하였다. 마우스 이소타입 대조 항체로 염색된 샘플은 네거티브였다. 정상인 피부로부터의 표피 케라틴 생성세포상에는 IL-21R에 대한 염색이 최소 또는 전혀 존재하

지 않았다. 건선 환자로부터의 비-병변성 피부 생검에서는 경미한 염색이 4개의 샘플의 표피 케라틴 생성세포에서 관찰되었고, 중간 염색이 5번째의 샘플에서 표피 각질층에서 관찰되었다. 9명의 건선 환자 중 8명으로부터 얻은 병변성 샘플에서 케라틴 생성세포의 국소적인 영역에 경미한 것에서부터 강력한 염색이 있었다.

[0345]

결론: 건선 피부 병변에서 IL-21R의 발현은 침투하는 백혈구에 한정되지 않지만, 또한 표피 케라틴 생성세포에 대해서는 상향조절된다. 정상 대조표준과 비교하여 건선 환자로부터 얻은 비-병변성 피부의 표피 케라틴 생성세포상에서의 IL-21에 대한 염색이 증가되었다는 것은, 포함되지 않은 피부에서조차 케라틴 생성세포는 IL-21 자극에 대하여 비정상적으로 반응할 수 있다는 것을 시사한다. 염증의 존재시에 침투하는 MNC 상에서 및 과형성되는 표피층에서 증가된 IL-21R이 주지되었다. 그러므로 건선을 IL-21 차단 항체로 치료하는 것은 염증성 세포와 표피 케라틴 생성세포 둘 다에 대해 IL-21 신호를 차단함으로써 염증을 억제할 수 있다.

표 16

[0346]

정상, 비-병변성 및 병변성 건선 피부에서 IL-21R 면역반응성¹

피부 유형 (N)	표피 ²	MNC ²
정상 (4)	0	1
건선 비-병변성 (5)	1	1
건선 병변성 ³ (9)	2	3

[0347]

¹ 척도: 0 = 없음, 1 = 경미함, 2 = 중간, 및 3 = 강력함, IL-21R 발현에 대해.

[0348]

² 시험된 모든 샘플의 중간 기록

[0349]

³ 샘플 중 5개가 공여자-매치된 비-병변성 피부 생검을 가졌다.

수탁번호

[0350]

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8786

수탁일자 : 20071115

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8787

수탁일자 : 20071115

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8788

수탁일자 : 20071115

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8789

수탁일자 : 20071115

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8790

수탁일자 : 20071115

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8791

수탁일자 : 20071115

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8430

수탁일자 : 20070515

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8431

수탁일자 : 20070515

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8432

수탁일자 : 20070515

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8433

수탁일자 : 20070515

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8434

수탁일자 : 20070515

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8313

수탁일자 : 20070403

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8314

수탁일자 : 20070403

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8315

수탁일자 : 20070403

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8316

수탁일자 : 20070403

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : PTA-8317

수탁일자 : 20070403

도면

도면1

도면2

Anti-IL-21 VL 배양

1	METPAQLLEFLLLWLPLD TTGEIVLTQSPGTLSSLSPGER		78 VL
			597 VL
MDRV.. .. G GAPCA.Q . . . SS . A.V.D.			328 VL
MD.MV.. .. G F.GSRCD.QM . . . SSV.A.V.D.			552 VL
A A			75 VL

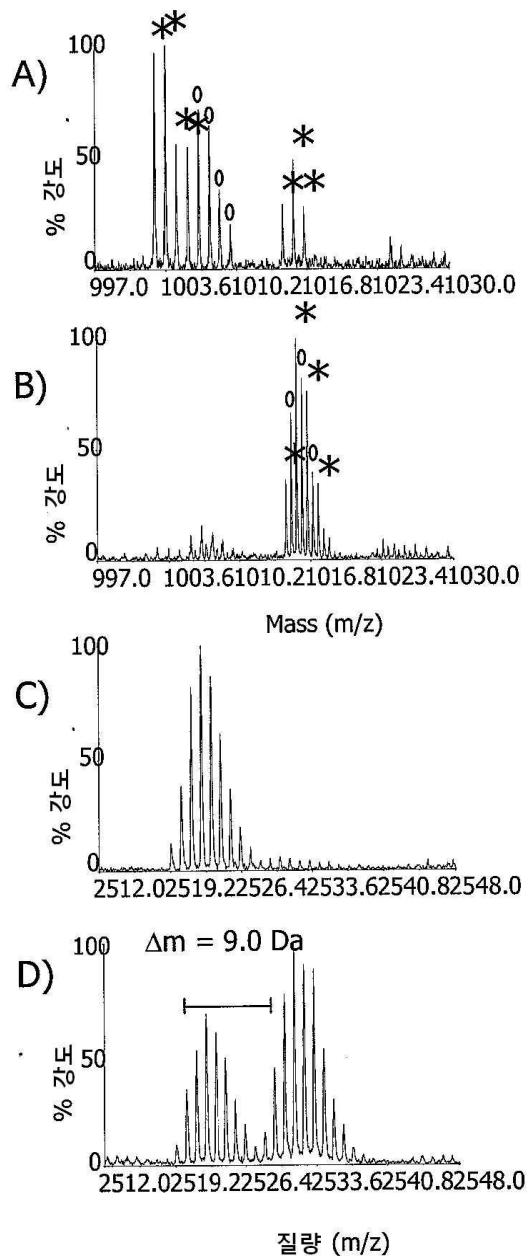
20										30										40										50												
A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	I	G	A	S	S	R	A	T	G	78 VL	
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	597 VL
V	.	I	T	.	.	.	.	-	D	I	D	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	328 VL
V	.	I	T	.	.	.	.	-	G	I	.	.	W	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	552 VL
V	.	I	T	.	.	.	.	-	S	V	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	75 VL
CDR 1															CDR 2																											

60										70										80										90										
I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Y	G	S	-	-	W	T		78 VL
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	597 VL
V	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	Q	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	F	N	.	Y	P	Y	.	328 VL	
V	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	Q	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	A	N	.	F	P	L	552 VL	
V	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	Q	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	R	S	N	-	W	I	597 VL
CDR 3																																								

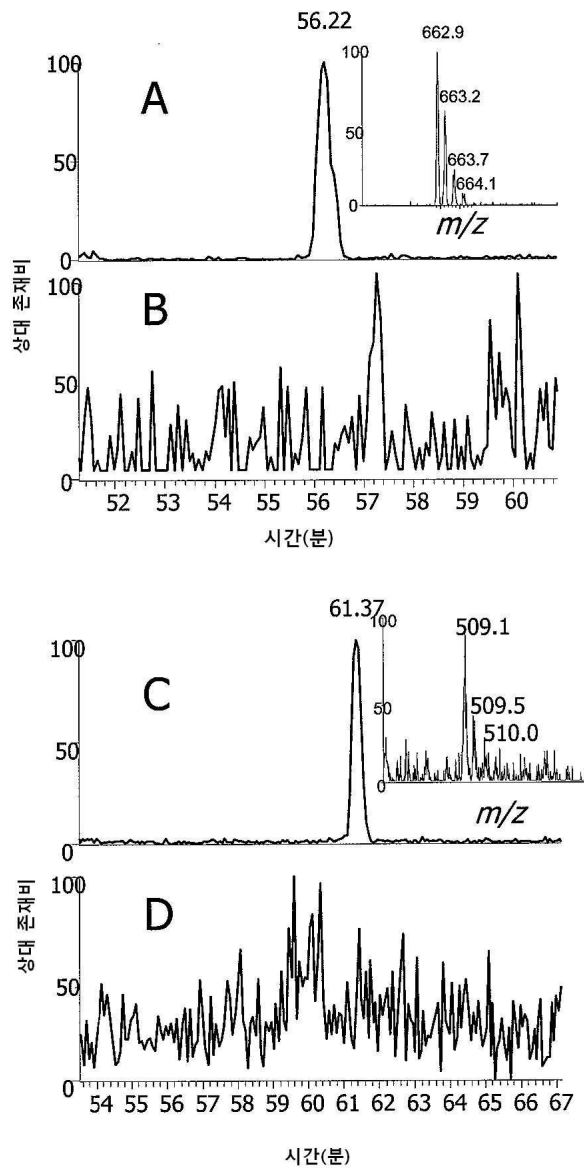
[illegible]

적색으로 표시된 신호 서열
Kabat에 따른 CDR 정의 및 V-영역 넘버링
-78VH와의 서열 동일성을 나타냄
-전체 서열 상동성을 최대화 하기 위해 삽입된 결실을 나타냄

도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

Jaspers, Stephen R.

Rixon, Mark W.

Dillon, Stacey R.

Ramsdell, Frederick J.

Cecile M. Krejsa

Eugene Yi

<120> ANTI-HUMAN IL-21 MONOCLONAL ANTIBODIES

<130> 07-16PC

<140> PCT/IB2008/005011

<141> 2008-12-08

<150> 61/012,329

<151> 2007-12-07

<160> 97

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 642

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc 60
tggcaacatg gagaggattg tcactctgtct gatggtcac ttcttgggga cactgggtcca 120
caaatcaagc tccaaggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat 180
tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttggtcctt gaatttctgc cagctccaga 240
agatgtagag acaaaactgtg agtggtcagc ttttctctgt tttcagaagg cccaactaaa 300
gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag 360
gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcatg 420
tgattcttat gagaanaaac cacccaaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca 480

```

```

aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc 540
taacttgcag ttggacacta tgttacatac tctaataatag tagtgaaagt catttctttg 600
tattccaagt ggaggagccc tattaaatta tataaagaaa ta 642

```

<210> 2

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met

1 5 10 15

Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln

20					25					30						
Asp	Arg	His	Met	Ile	Arg	Met	Arg	Gln	Leu	Ile	Asp	Ile	Val	Asp	Gln	
35					40					45						
Leu	Lys	Asn	Tyr	Val	Asn	Asp	Leu	Val	Pro	Glu	Phe	Leu	Pro	Ala	Pro	
50					55					60						
Glu	Asp	Val	Glu	Thr	Asn	Cys	Glu	Trp	Ser	Ala	Phe	Ser	Cys	Phe	Gln	
65					70					75					80	
Lys	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser	Ala	Asn	Thr	Gly	Asn	Asn	Glu	Arg	Ile	Ile	
85					90					95						
Asn	Val	Ser	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn	Ala	
100					105					110						
Gly	Arg	Arg	Gln	Lys	His	Arg	Leu	Thr	Cys	Pro	Ser	Cys	Asp	Ser	Tyr	
115					120					125						
Glu	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Leu	
130					135					140						
Gln	Lys	Met	Ile	His	Gln	His	Leu	Ser	Ser	Arg	Thr	His	Gly	Ser	Glu	
145					150					155					160	

Asp Ser

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> IL-21 synthetic peptide #1

<400> 3

Glu Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Cys

20

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IL-21 synthetic peptide #2

<400> 4

Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Asn

1 5 10 15

Thr Asn Cys

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IL-21 synthetic peptide #3

<400> 5

Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala

1 5 10 15

Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys

20 25

<210> 6

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IL-21 synthetic peptide #4

<400> 6

Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe

1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser

20 25

<210> 7

<211> 162

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutant recombinant IL-21 aa

<400> 7

Met Asp Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met

1 5 10 15

Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln

20 25 30

Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln

35 40 45

Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro

50 55 60

Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln

65 70 75 80

Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile

85 90 95

Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala

100 105 110

Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr

115 120 125

Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu

130 135 140

Asp Lys Met Asp His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu

145 150 155 160

Asp Ser

<210> 8

<211> 545

<212> DNA

<213> Macaca fascicularis

<400> 8

cgagaccaag gtctagctct actgttggta cttatgagat ccagtcctgg caacatggag 60
 aggatagtca tctgtctgat ggtcatcttc ttggggacac tggccacaa atcaagctcc 120
 caaggtcaag atcgccacat gattagaatg cgtcaactta tagatattgt tgatcagctg 180
 aaaaattatg tgaatgactt ggaccctgaa tttctgccag ctccagaaga tgtagagaca 240
 aactgtgagt ggtcagctat ttctgtttt cagaaggccc aactaaagtc agcaaataca 300
 ggaacaatg aaaggataat caatttatca attaaaaagc tgaagaggaa atcaccttcc 360

acaggtgcag agagaagaca gaaacacaga ctaacatgcc cttcatgtga ttcttatgag 420
 aaaaaaccac ccaaagaatt cctagaaaga ttcaaatcac ttctcaaaa gatgattcat 480
 cagcatctgt cctctagaac acatggaagt gaagattcct gaggatctaa cttgcagttg 540
 gacac 545

<210> 9

<211> 162

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 9

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met

1 5 10 15

Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln

20 25 30

Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln

35 40 45

Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Asp Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro

50 55 60

Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Ile Ser Cys Phe Gln

65 70 75 80

Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile

85 90 95

Asn Leu Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Ser Pro Ser Thr Gly Ala

100 105 110

Glu Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr

115 120 125

Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu

130 135 140
Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu

145 150 155 160
Asp Ser

<210> 10
<211> 3072
<212> DNA
<213> Mus Musculus
<400> 10

gagaaccaga ccaaggccct gtcacagct cctggagact cagttctggt ggcatggaga 60
ggacccttgt ctgtctgta gtcaccttct tggggacagt ggcccataaa tcaagcccc 120
aagggccaga tcgctcctg attagacttc gtcaccttat tgacattgtt gaacagctga 180
aaatctatga aaatgacttg gatcctgaac ttctatcagc tccacaagat gtaaaggggc 240
actgtgagca tgcagctttt gcctgttttc agaaggccaa actcaagcca tcaaaccctg 300

gaaacaataa gacattcattc attgacctcg tggcccagct caggaggagg ctgcctgcca 360
ggaggggagg aaagaacag aagcacatag ctaaatgccc ttctgtgat tcgtatgaga 420
aaaggacacc caaagaattc ctagaagac taaatggct cttcaaaag atgattcattc 480
agcatctctc ctagaacaca taggacctga agattcctga ggatccgaga agattcccga 540
ggactgagga gacgccggac actatagacg ctacacgaatg caggagtaca tcttgctct 600
tgggattgca agtggagaag tacgatacgt tatgataaga acaactcaga aaagctatag 660
gttaagatcc tttcgcccat taactaagca gacattgtgg ttccctgcac agactccatg 720
ctgtcaacat ggaaaatctc aactcaaca gagcccagct tcccgtgtca gggatttctg 780

gtgcttctca agctgtggct tcattctatt gcccaactgt gacattcttt gattggaagg 840
ggaaaactaa agcttttagc aaaaatacag ctagggaatt tgcgactctg cgagagtaag 900
acctcttatg atcctaacgg aatgatgtaa gctggaaata ataagcataa gatgaaattg 960
aaaatgaag tctttattct ttaagaaaaa ctttgtactt gaaagcatgt ctgaagagtt 1020
tactcattac cacaacatc tagcatattg ataactaaca tctttatact ctacaagaga 1080
ggctttccag ataggtacag tttttcttct ctattaggtc tatcaaaatt taacctatta 1140
tgagggtcac ccctgctttt cactgttttt ctaaagaggc aagggtgtag taagaagcag 1200
gcttaagttg ccttctctcc aatgtcaagt tctttataa gctaatagtt taatcttgtg 1260

aagatggcaa tgaaagcctg tggaagtgca aacctcacta tcttctggag ccaagtagaa 1320
 ttttcaagtt tgtagctctc acctcaagtg gttatgggtg tcctgtgatg aatctgctag 1380
 ctccagctc agtctcctc cccacatcct ttcctttctt tctctttga aacttctaag 1440
 aaaaagcaat ccaacaagt tcagcactta agacacattg catgcacact tttgataagt 1500
 taaatccaac catctattta aaatcaaat caggagatga gccaagagac cagaggttct 1560
 gttccagttt taaacagact ttactgaac atcccaatct ttaaccaca gaggctaaat 1620
 tgagcaaata gttttgcat ttgatataat ttccaacagt atgtttcaat gtcaagttaa 1680
 aaagtctaca aagctatttt ccctggagtg gtatcatcgc ttgagaatt tcttatggtt 1740

aaaatggatc tgagatccaa gcatggcctg ggggatggtt ttgatctaag gaaaaagtg 1800
 tctgtacctc acagtgcctt taaaacaagc agagatcccg tgtaccgcc taagatagca 1860
 cagactagtg ttaactgatt cccagaaaag tgtcacaatc agaaccaacg cattctctta 1920
 aactttaaaa atatgtattg caaagaactt gtgtaactgt aaatgtgtga ctgttgatga 1980
 cattatacac acatagccca cgtaagtgtc caatggtgct agcattggtt gctgagtttg 2040
 ctgctcgaaa gctgaagcag agatgcagtc cttcacaag caatgatgga cagagagggg 2100
 agtctccatg ttttattctt ttgttgttgc tggctgtgta actgttgact tcttgacatt 2160
 gtgattttta tatttaagac aatgtattta ttttggtgtg tttattgttc tagcctttta 2220

aatcactgac aatttctaata caagaagtac aaataattca atgcagcaca ggctaagagc 2280
 ttgtatcgtt tggaaaagcc agtgaaggct tctccactag ccatgggaaa gctacgcttt 2340
 agagttaaact agacaaaatt gcacagcagt cttgaacctc tctgtgctca agactcagcc 2400
 agtcccttga cattattgtt cactgtgggt gggaaacacat tggacctgac acactgttgt 2460
 gtgtccatga aggttgccac tgggtgaagc ttttttgggt ttccattctc ttatctgtag 2520
 aacaagaatg tggggcttgc ctaagtctat tctgtatttt attctgaact tcgtatgtct 2580
 gagttttaat gttttgagta ctcttacagg aacacctgac cacacttttg agttaaat 2640
 tatcccaagt gtgatattta gttgttcaaa aagggaaggg atatacatat atacatacat 2700

acatacatat atatatatat atatatatat atatatatat gtatatatat 2760
 atatatatag agagagagag agagagagag agagaaagag agagaggttg ttgtaggtca 2820
 taggagtcca gaggaatca gttatggccg ttaatactgt agctgaaagt gtttctttg 2880
 tgaataaatt catagcatta ttgatctatg ttattgctct gttttattta cagtcacacc 2940
 tgagaattta gttttaatat gaatgatgta ctttataact taatgattat ttattatgta 3000
 tttggttttg aatgtttgtg ttcattggctt cttatttaag acctgatcat attaaatgct 3060
 acccagtcgc ga 3072

<210

> 11

<211> 146

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val

1 5 10 15

Ala His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu

20 25 30

Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp

35 40 45

Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys

50 55 60

Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser

65 70 75 80

Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu

85 90 95

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

100 105 110

Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu

115 120 125

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His

130 135 140

Leu Ser

145

<210> 12

<211> 423

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(423)

<400> 12

atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc aga tgg 48

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

gtc ctg tcc cag cta caa ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag 96

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

20 25 30

cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc 144

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35 40 45

agc agt agg act tac cgc tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag 192

Ser Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

gaa ctg gag tgg att ggg agt atc tat tat aga ggg agt acc ttc tac 240

Glu Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr

65 70 75 80

aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc acc gta tcc gta gac acg tcc aag 288

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys

85 90 95

aac cag ttc tcc ctg aaa ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct 336

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

gtg tat tac tgt gcg aga cag agt gga tat agt ggc tac gac tgg ttc 384

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe

115 120 125

gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 423

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 13

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35 40 45

Ser Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys

50 55 60

Glu Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr

65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys

85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe

115 120 125

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(21)

<400> 14

agt agg act tac cgc tgg ggc

21

Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly

1 5

<210> 16

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(48)

<400> 16

agt atc tat tat aga ggg agt acc ttc tac aac ccg tcc ctc aag agt 48

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(36)

<400> 18

cag agt gga tat agt ggc tac gac tgg ttc gac ccc 36

Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe Asp Pro

1 5 10

<210> 20

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(378)

<400> 20

atg gaa gcc cca gct cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

gat acc acc gga gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct 96

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

20 25 30

ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35

40

45

gtt agc agc ttc tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc 192

Val Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50

55

60

agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc 240

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

65

70

75

80

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc 288

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

85

90

95

agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc 336

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser

100

105

110

aac tgg atc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 378

Asn Trp Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

115

120

125

<210> 21

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1

5

10

15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 22

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(33)

<400> 22

agg gcc agt cag agt gtt agc agc ttc tta gcc 33

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(21)

<400> 24

gat gca tcc aac agg gcc act 21

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(24)

<400> 26

cag cag cgt agc aac tgg atc acc 24

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Ile Thr

1 5

<210> 27

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Ile Thr
 1 5
 <210> 28
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(435)
 <400> 28
 atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

 gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

 cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc 144
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

 agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

 gag tgg gtg gcg ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca 240
 Glu Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288

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

85 90 95

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336

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

100 105 110

tat tac tgt gcg aga gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr

115 120 125

tac ttc ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc 432

Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

130 135 140

tca 435

Ser

145

<210> 29

<211> 145

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr
115 120 125
Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
130 135 140

Ser

145

<210> 30

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(16)

<400> 30

agc tat ggc atg cac t 16

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 32
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(51)
 <400> 32
 ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca gac tct gtg aag 48
 Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

ggc 51
 Gly

<
 210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 34
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(51)
 <400> 34
 gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac tac ttc ggt atg gac 48
 Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1 5 10 15

gtc 51

Val

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 36

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(378)

<400> 36

atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct 96

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

20 25 30

ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

gtt agc agc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct 192

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

50 55 60

ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca 240

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

65 70 75 80

gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc 288

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

85 90 95

agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat 336

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr

100 105 110

ggt agc tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 378

Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 37

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

65 70 75 80
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 38

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(36)

<400> 38

agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc tac tta gcc 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(21)

<400> 40

ggt gca tcc agc agg gcc act

21

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(21)

<400> 42

cag cag tat ggt agc tgg acg

21

Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr

1 5

<210> 44

<211> 435

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(435)

<400> 44

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gaa tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20 25 30

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc 144

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

35 40 45

agt acc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192

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

50 55 60

gag tgg gtg gcc ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca 240

Glu Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288

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

85 90 95

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336

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

100 105 110

tat tac tgt gcg aga gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr

115 120 125

tac ttc ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc 432

Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

130 135 140

tca 435

Ser

145

<210> 45

<211> 145

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

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

85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr
 115 120 125
 Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

130 135 140

Ser

145

<210> 46

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(15)

<400> 46

acc tat ggc atg cac

15

Thr Tyr Gly Met His

1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Thr Tyr Gly Met His

1 5

<210> 48

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(51)

<400> 48

ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca gac tct gtg aag 48

Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

ggc 51

Gly

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 50

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(51)

<400> 50

gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac tac ttc ggt atg gac 48

Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1 5 10 15

gtc 51

Val

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1 5 10 15
Val

<210> 52

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(378)

<400> 52

atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct 96

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

20 25 30

ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

gtt agc agc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct 192

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

50 55 60

ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca 240

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

65 70 75 80

gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc 288

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

85 90 95

agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat 336

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr

100 105 110

ggt agc tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 378

Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 53

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro

65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 54

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(36)

<400> 54

agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc tac tta gcc 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(21)

<400> 56

ggt gca tcc agc agg gcc act 21
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 58
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(21)
 <400> 58

cag cag tat ggt agc tgg acg 21
 Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
 1 5

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
 1 5

<210> 60
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(417)

<400> 60

atg gaa ctg ggg ctc cgc tgg gtt ttc ctt gtt gct att tta gaa ggt 48

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ctg gtc aag 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30

cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc atc ttc 144

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

35 40 45

agt agc tat agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg 192

Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

gag tgg gtc tca tcc att act agt ggt agt tat tac ata cac tac gca 240

Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile His Tyr Ala

65 70 75 80

gac tca gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac 288

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

85 90 95

tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336

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

100 105 110

tat tac tgt gtg aga gag aga gga tgg ggc tac tac ggt atg gac gtc 384
Tyr Tyr Cys Val Arg Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
115 120 125

tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 417

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 61

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

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

Tyr Tyr Cys Val Arg Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 62

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(15)

<400> 62

agc tat agc atg aac

15

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 64

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(51)

<400> 64

tcc att act agt ggt agt tat tac ata cac tac gca gac tca gtg aag 48

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

1 5 10 15

ggc

51

Gly

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

1 5 10 15

Gly

<210> 66

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(33)

<400> 66

gag aga gga tgg ggc tac tac ggt atg gac gtc 33

Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 68

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(387)

<400> 68

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctt ctg ctg ctc tgg 48

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

ctc cca ggt gcc aga tgt gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc 96

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

20 25 30

ctg tct gca tct gtt gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt 144

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

cag gac att gac agt gct tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa 192

Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50 55 60

gct cct aag atc ctg atc cat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc 240

Ala Pro Lys Ile Leu Ile His Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val

65 70 75 80

cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 288

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag 336

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

100 105 110

ttt aat agt tac ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc 384

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

115 120 125

aaa 387

Lys

<210> 69

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50 55 60

Ala Pro Lys Ile Leu Ile His Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Lys

<210> 70

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(33)

<400> 70

cgg gca agt cag gac att gac agt gct tta gcc

33

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala

1

5

10

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala

1

5

10

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(21)

<400> 72

gat gcc tcc agt ttg gaa agt

21

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser

1

5

<210> 74

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(27)

<400> 74

caa cag ttt aat agt tac ccg tac act 27

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 76

<211> 408

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

>

<221> CDS

<222> (1)...(408)

<400> 76

atg aaa cat ctg tgg ttc ttc ctt ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

gtc ctg tcc cag gta cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag 96

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

20 25 30

cct tgc gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc 144

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35

40

45

agt agt gac ttc tgg ggc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag gga ctg 192

Ser Ser Asp Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

gag tgg att gga tat atc tct tcc cgt ggg agc acc aac tac aac ccc 240

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro

65

70

75

80

tcc ctc aag agg cga gtc acc ata tca gtc gac acg tcc agg aac cag 288

Ser Leu Lys Arg Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln

85

90

95

ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct gcg gac acg gcc gtg tat 336

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

100

105

110

tac tgt gcg aga tct gcg gga gta acg gat ttt gac ttc tgg ggc cag 384

Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe Trp Gly Gln

115

120

125

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 408

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130

135

<210> 77

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35 40 45

Ser Ser Asp Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro

65 70 75 80

Ser Leu Lys Arg Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe Trp Gly Gln

115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 78

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(15)

<400> 78

agt gac ttc tgg ggc

15

Ser Asp Phe Trp Gly

1 5

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Asp Phe Trp Gly

1 5

<210> 80

<211> 49

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(49)

<400> 80

tat atc tct tcc cgt ggg agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag agg 48

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

1 5 10 15

c 49

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

1 5 10 15

<210> 82

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(27)

<400> 82

tct gcg gga gta acg gat ttt gac ttc 27

Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe

1 5

<210> 84

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(387)

<400> 84

atg gac atg atg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg 48

Met Asp Met Met Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

ttc cca ggt tcc aga tgc gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc 96

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

gtg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt 144

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

35 40 45

cag ggt att agc agc tgg tta gcc tgg tat cag cat aaa cca ggg aaa 192

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys
50 55 60

gcc cct aag ctc ctg atc tat gtt gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc 240

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 288

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag 336

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

gct aat agt ttc cct ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc 384

Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

aaa 387

Lys

<210> 85

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Met Asp Met Met Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20

25

30

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

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

85 90 95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125
Lys

<210> 86

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(33)

<400> 86

cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg tta gcc 33

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(21)

<400> 88

gtt gca tcc agt ttg caa agt

21

Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 90

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(27)

<400> 90

caa cag gct aat agt ttc cct ctc act

27

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 92

<211

> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

100 105 110

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

115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

145 150

<210> 93

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala

1 5 10 15

Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln

20 25 30

Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys

35 40 45

Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr

50 55 60

Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr

65 70 75 80

Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln

85 90 95

Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg

100 105 110

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

115 120 125

Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met

130 135 140

Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser

145 150

<210> 94

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr

1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His

20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala

35 40 45

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile

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

115 120 125
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
130 135 140
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145 150 155 160
Thr Ser

<210> 95

<211> 177

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

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

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
85 90 95
Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110
Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125
Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
145 150 155 160
Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175
His

<210> 96

<211> 144

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Met Leu Leu Ala Met Val Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Cys Ser Val
1 5 10 15
Ala Gly Gln Gly Cys Pro Thr Leu Ala Gly Ile Leu Asp Ile Asn Phe
20 25 30
Leu Ile Asn Lys Met Gln Glu Asp Pro Ala Ser Lys Cys His Cys Ser
35 40 45
Ala Asn Val Thr Ser Cys Leu Cys Leu Gly Ile Pro Ser Asp Asn Cys
50 55 60
Thr Arg Pro Cys Phe Ser Glu Arg Leu Ser Gln Met Thr Asn Thr Thr
65 70 75 80
Met Gln Thr Arg Tyr Pro Leu Ile Phe Ser Arg Val Lys Lys Ser Val
85 90 95
Glu Val Leu Lys Asn Asn Lys Cys Pro Tyr Phe Ser Cys Glu Gln Pro

100 105 110
 Cys Asn Gln Thr Thr Ala Gly Asn Ala Leu Thr Phe Leu Lys Ser Leu
 115 120 125
 Leu Glu Ile Phe Gln Lys Glu Lys Met Arg Gly Met Arg Gly Lys Ile
 130 135 140
 <210> 97
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

 <400> 97
 Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Ile Leu Ile Phe Leu Gly Thr Val
 1 5 10 15
 Ala His Lys Ser Ser Pro Gln Arg Pro Asp His Leu Leu Ile Arg Leu
 20 25 30
 Arg His Leu Met Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp
 35 40 45
 Leu Asp Pro Glu Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly Gln Cys
 50 55 60

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

 Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His
 130 135 140
 Leu Ser
 145