

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.⁸*A61K 38/20* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 37/00* (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0015482

(43) 공개일자 2006년02월17일

(21) 출원번호 10-2005-7017652

(22) 출원일자 2005년09월20일

번역문 제출일자 2005년09월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2004/008833

국제출원일자 2004년03월22일

(87) 국제공개번호 WO 2004/084835

국제공개일자 2004년10월07일

(30) 우선권주장 60/456,920 2003년03월21일 미국(US)

(71) 출원인 와이어쓰
미국 뉴저지주 07940 매디슨 파이프 지랄다 팜즈(72) 발명자 콜린스 마리
미국 메사추세츠 01760 나틱 라트번 로드 54
친 엘라인 와이
미국 메사추세츠 01742 콩코드 피바디 코트 2
세니세스 마이라
미국 메사추세츠 01906 상구스 홀덴 에비뉴 5
영 데보라 에이
미국 메사추세츠 02176 펠로제 벨슨 로드 39(74) 대리인 최규팔
이은선

심사청구 : 없음

(54) 인터루킨-21/인터루킨-21 수용체의 작용제를 이용한면역장애의 치료

요약

본 발명은 IL-21 또는 IL-21 수용체 ("IL-21R" 또는 "MU-1")의 작용제를 이용하여 인터루킨-21 (IL-21)/IL-21 수용체 (MU-1)의 활성을 조절하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 신경계의 면역장애와 연관된 증상 예를 들어 다발 경화증의 치료(예를 들어 개선)를 위해 IL-21/IL-21R 작용제는 그 자체로 또는 5 항-염증제와 조합되어 사용될 수 있다.

명세서

기술분야

관련 출원의 참조

본 출원은 2003년 3월 21일에 출원된 미국 특허출원 제60/456,920호에 기초하여 우선권을 주장하고 있으며, 선출원의 내용은 여기에 참고로서 전체가 포함되어 있다.

본 발명의 분야

본 발명은 IL-21 또는 IL-21 수용체의 작용제 예를 들어 IL-21 폴리펩티드 또는 그것의 활성 단편을 이용하여 신경계 면역 장애 예를 들어 다발 경화증을 치료하거나 예방하는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경기술

인간 IL-21은 사이토카인이다. 인간 IL-21의 성숙 형태는 길이가 약 131-아미노산이고, IL-2, IL-4 및 IL-15에 대해 서열 상동성을 가지고 있다(Parrish-Novak et al. (2000) Nature 408: 57-63). 인터루킨 사이토카인간의 낮은 서열 상동성에도 불구하고, 이러한 사이토카인은 특징적인 "4-헬릭스-다발" 구조를 포함하는 공통 접기(fold)를 공유하고 있다. 대부분의 사이토카인은 클래스 I 또는 클래스 II 사이토카인 수용체에 결합한다. 클래스 I 사이토카인은 IL-10 및 인터페론에 수용체를 포함하지만, 클래스 I 사이토카인 수용체는 IL-2, IL-7, IL-9, IL-11-13, IL-15, 혈액형성 성장 인자, 렙틴(leptin) 및 성장 호르몬에 대한 수용체를 포함하고 있다(Cosman, D. (1993) Cytokine 5: 95-106).

인간 IL-21R은 림프 세포, 특히 NK, B 및 T 세포에 의해 발현되는 클래스 I 사이토카인 수용체이다(Parrish-Novak et al. (2000) supra). 인간 인터루킨-21(IL-21) 및 그것의 수용체(IL-21R)를 코딩하는 대표적인 핵산 서열은 대응하는 아미노산 서열로서 WO 00/53761, WO01/85792, Parrish-Novak et al. (2000) supra 및 Ozaki et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 11439-11444에 개시되어 있다. IL-21R은 IL-2 수용체 β 사슬 및 IL-4 수용체 α 사슬과 높은 서열 상동성을 보인다(Ozaki et al. (2000) supra). 리간드가 결합하면, IL-21R은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 및 IL-15에 의해 공유되는 공통 감마 사이토카인 수용체 사슬 (γ c)(Ozaki et al. (2000) supra ; Asao et al. (2001) J. Immunol. 167:1-5)과 회합한다. IL-21R의 림프에서의 넓은 분포는 IL-21이 면역 조절에서 어떤 역할을 할 지 모른다는 것을 암시한다. 실제로, 인 비트로(in vitro) 연구는 IL-21이 B 세포, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포, 및 NK 세포의 기능을 상당히 조절한다는 것을 밝혔다(Parrish-Novak et al. (2000) supra; Kasaian, M. T. et al. (2002) Immunity. 16: 559-569). 패리쉬-노박 등(2000)은 IL-21이 자연살(NK) 세포의 증식 및 성숙, 항-CD40에 의해 함께 자극된 성숙 B-세포 집단의 증식, 및 항-CD3에 의해 함께 자극된 T 세포의 증식을 활성화하거나 자극하는 기능을 한다고 제시했다.

발명의 상세한 설명

발명의 요약

본 발명은 IL-21 또는 IL-21R의 작용제(여기에서, 또한 "IL-21/IL-21R 작용제" 또는 "작용제"라고 지칭)를 이용하여 인터루킨-21 (IL-21) 및 IL-21 수용체 (여기에서, 또한 "IL-21R" 또는 "MU-1"로 지칭)의 활성 및/또는 이들 간의 상호작용을 증가시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 그러한 방법 및 조성물은 신경계 면역장애를 조절하거나, IL- 결핍과 연관된 질병 또는 장애를 조절하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법 및 조성물은 다발 경화증 (MS)를 치료하거나 예방하는데 사용될 수 있다.

예를 들어, 우리는 IL-21/IL-21R 작용제 예를 들어 무런 IL-21 폴리펩티드로 마우스를 예방 처리를 한 결과, 실험 자가면역 뇌척수염에 (EAE) 대한 마우스 모델에서 증상이 개선됨을 알았다. 미엘린 희소돌기 아교세포 당단백질 (MOG) 펩타이드 (예를 들어, MOG 35-55) 및 단백질지질 단백질 (PLP; 예를 들어 PLP 139-151)에 의해 생산된 마우스 모델에서 EAE 증상의 조절이 검출되었다. 인 비트로에서 IL-21은 T 세포 증식을 유도하였다. IL-21의 존재하에 배양된 림프구는 증가된 수준(level)의 IL-10 및 감소된 수준의 인터페론- γ (IFN- γ)을 생산하였다. 따라서, IL-21/IL-21R 활성의 작용제는 신경계 면역장애를 (예를 들어, 다발 경화증을 포함하는 신경계의 만성적 면역장애) 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다.

따라서, 한 측면으로 본 발명은 개체(subject)에서 신경계 면역장애의 (예를 들어, 다발 경화증을 포함하는 신경계의 만성적 면역장애) 치료방법 (예를 들어, 치료, 억제, 개선, 감소 또는 지연) 또는 예방방법을 (예를 들어, 병의 개시 또는 재발을 예방) 특징으로 한다. 방법은 다음을 포함한다: IL-21/IL-21R 작용제를 면역세포 활성 및/또는 수를 (예를 들어, 사이토카인의 수준을 조절 (예를 들어, 사이토카인 발현, 생산 및/또는 방출)) 조절하는데 충분한 양으로 개체에 투여함으로써, 신경계 면역장애 예를 들어 다발 경화증을 치료 또는 예방한다. 한 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 예를 들어 증상을 지연하거나, 증상의 발생 또는 재발을 예방하기 위해 증상의 개시 전에 투여된다. 예를 들어, IL-21/IL-21R 작용제는 완화증의

개체 예를 들어 MS환자에게 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 증상의 발생 또는 발병 후에 투여된다. MS의 대표적인 일반 증상은 떨림, 나쁜 협조(poor coordination), 보행곤란(difficulty walking) 및 다른 문제들이다.

IL-21/IL-21R 작용제는 단독으로 또는 여기에 기술되는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 바람직하게는, 개체는 포유동물 예를 들어 다발 경화증과 같은 신경계 면역장애를 겪고 있는 인간이다.

한 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 바람직하게는 포유동물 예를 들어 인간 IL-21 또는 IL-21R과 작용하고 (예를 들어, IL-21 또는 IL-21R과 결합), 하나 이상의 IL-21 및/또는 IL-21R 활성을 증가시키거나 강화한다. IL-21의 작용제는 여기에서 "IL-21 작용제"로 지칭되고, IL-21R의 작용제는 여기에서 "IL-21 작용제R"로 지칭된다. IL-21 폴리펩티드는 그 자체로 IL-21R 작용제이다. 바람직한 작용제는 IL-21 또는 IL-21R에 높은 친화력 예를 들어 적어도 약 $10^7 M^{-1}$ 의 친화상수, 바람직하게는 약 $10^8 M^{-1}$ 의 친화상수, 가장 바람직하게는 $10^9 M^{-1}$ 내지 $10^{10} M^{-1}$ 또는 더 강한 친화상수를 가지고 결합한다. IL-21/IL-21R 작용제는 예를 들어 IL-21 폴리펩티드 또는 그것의 활성 단편, IL-21 융합 단백질, 펩타이드 작용제, 항체 작용제 또는 그것의 항원-결합 단편, 또는 저분자(small molecule) 작용제일 수 있다.

한 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 IL-21 폴리펩티드 (예를 들어, 인간, 보바인 또는 무린 IL-21 폴리펩티드) 또는 그것의 활성 단편 (예를 들어, 서열번호:2의 아미노산 서열, 서열번호:1의 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열들과 적어도 85%, 90%, 95%, 98% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하는 인간 IL-21 폴리펩티드)이다. 다른 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 무린 IL-21 폴리펩티드 또는 그것의 활성 단편 (예를 들어, 서열번호:4의 아미노산 서열, 서열번호:3의 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열들과 적어도 85%, 90%, 95%, 98% 또는 그 이상 동일한 서열을 포함하는 무린 IL-21 폴리펩티드)이다. 다른 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 IL-21 폴리펩티드 (예를 들어 인간 또는 무린 IL-21 폴리펩티드 또는 그것의 단편) 및 (예를 들어 융합된) 두번째 모이어티(moiety)를 (예를 들어 단백질 (예를 들어, GST, Lex-A, MBP 폴리펩티드 서열 또는 예를 들어, Fc 단편, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE를 포함하는 다양한 아이소타입의 중쇄불변구역을 포함하는 이뮤노글로블린 사슬)) 포함하는 융합 단백질; 작용제 항체 또는 그것의 항원-결합 단편; 또는, 저분자 또는 펩티드 작용제이다. 다른 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 예를 들어 발현, 기능성 IL-21의 처리 및/또는 분비를 증가시킴으로써 IL-21의 활성 또는 수준을 증가시키는 약제이다. IL-21/IL-21R 작용제를 코딩하는 핵산은 또한 개체에 투여될 수 있다.

융합 단백질은 첫번째 모이어티를 (예를 들어, IL-21 단편) 두번째 부분과 (예를 들어, 이뮤노글로블린 단편)과 연결시키는 링커 서열을 추가로 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 발현, 입체 유연성, 검출 및/또는 분리 또는 정제를 촉진하기 위해 추가적인 아미노산 서열이 융합 단백질의 N- 또는 C-말단에 추가될 수 있다.

여기에 기재된 IL-21/IL-21R 작용제는 (예를 들어, 여기에 기재된 IL-21 폴리펩티드 또는 융합 단백질) 유도체화 되거나 다른 기능 분자 예를 들어 다른 펩티드 또는 단백질에 (예를 들어, Fab' 단편) 연결될 수 있다. 예를 들어, 특히 융합 단백질 또는 항체, 또는 항원-결합 부분은 항체 (예를 들어, 양특이성 또는 다-특이성 항체), 독소, 방사성 동위원소, 세포 독성제 또는 세포 증식 억제제와 같은 하나 이상의 다른 분자 엔티티(entity)에 기능적으로 연결될 수 (예를 들어, 화학 커플링, 유전적 융합, 비-공유 회합 또는 다른 것에 의해) 있다.

다른 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 IL-21R 바람직하게는 인간 IL-21R에 대한 항체 (예를 들어 작용(agonistic) 항체 또는 그것의 항원-결합 단편)이다. 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 인간화, 키메라, 인간 (예를 들어, 인 비트로 생성된) 항체 또는 그것들의 항원-결합 단편이다. 한 구체예에서, 항체는 양특이성 항체 예를 들어 IL-21R 및 다른 수용체 사슬과 작용할 수 있는 항체이다.

한 구체예에서, 방법은 개체에서 IL-10 패러미터를 평가하는 것을 포함한다. "IL-10 패러미터"는 IL-10의 수준 또는 활성에 (예를 들어, IL-10 mRNA 또는 단백질 수준 또는 활성) 대한 정성적 또는 정량적 정보이다. 정보는 예를 들어 개체의 하나 이상의 조직 또는 하나 이상의 샘플의 IL-10 농도를 포함할 수 있다. 개체는 예를 들어 투여 전에 (예를 들어, 적어도 첫 번째 용량 투여 전) 평가될 수 있다. 개체는 투여 후에 (예를 들어, 한번 이상의 투여 후에 예를 들어 정기적으로, 또는 연속 투여하는 경우에는 하나 이상의 간격 후에) 평가될 수 있다. 개체는 투여 전 및 투여 후에 평가될 수 있다. IL-10 패러미터 평가로부터 얻은 정보는 IL-21/IL-21R 작용제의 투여를 조절하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 정상 범위의 값에 대한 IL-10 패러미터의 증가는 바람직한 치료효과를 나타낼 수 있다. IL-10 패러미터의 감소는 불충분한 투여 또는 비-반응을 나타낼 수 있다. 유사하게, 대응 IFN γ 패러미터를 평가하는 것도 가능하다. 그러한 경우에, 정상 범위의 값에 대한 IFN γ 패러미터의 감소는 바람직한 치료효과를 나타낼 수 있다. IFN γ 패러미터의 증가는 불충분한 투여 또는 비-반응을 나타낼 수 있다. 또한, 표 3에 다른 사이토카인 및 인자와 관련하여 평가할 수 있는 다른 패러미터를 제공하였다.

한 구체예에서, 방법은 개체에서 신경계 면역장애의 (예를 들어, 다발 경화증) 위험도 또는 그거한 장애의 하나 이상의 증상을 평가하는 것을 포함한다. 위험도를 평가하는 방법 중 하나는 IL-10 패러미터 평가를 포함한다.

한 실시에서, IL-21/IL-21R 작용제는 개체의 상태 변화에 반응하여 예를 들어 MS와 연관된 플레어-업(flare-up) 또는 발작에 반응하여 투여된다.

IL-21/IL-21R 작용제는 단일 투여량(single dose) 또는 일, 주 또는 월의 간격으로 분리된 일련의 투여량(series of dose)의 형태로 투여될 수 있다. IL-21/IL-21R 작용제는 주입하여 예를 들어 개체의 중추 신경계에 주입함으로써 투여될 수 있다. 예를 들어, IL-21/IL-21R 작용제는 허리 뇌척수액(경막내)에 투여될 수 있다. 다른 구체예에서 IL-21/IL-21R 작용제는 정맥내에 투여될 수 있다.

한 구체예에서, 여기에 기재된 IL-21/IL-21R 작용제는 (예를 들어, 그것의 약제학적 조성물) 병용요법, 즉 다른 약제와 (예를 들어, 다발 경화증과 같은 신경계 면역장애의 치료 및 예방에 유용한 치료제) 병용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 병용요법은 하나 이상의 추가 치료제와 (예를 들어, 여기에 자세하게 기재되는 하나 이상의 사이토카인 및 성장 인자 억제제, 면역 억제제, 항-염증제, 대사 억제제, 효소 억제제, 및/또는 세포 독성제 또는 세포증식 억제제) 함께 조제되거나 및/또는 함께 투여되는 하나 이상의 IL-21/IL-21R 작용제를 (예를 들어, IL-21 폴리펩티드 또는 그것의 활성 단편, IL-21 융합 단백질, 펩티드 작용제, 항체 작용제 또는 저분자 작용제) 포함할 수 있다.

다발 경화증을 치료하기 위해 하나 이상의 IL-21/IL-21R 작용제와 함께 투여되거나 및/또는 함께 조제될 수 있는 치료제의 예는 이에 한정되지는 않지만 다음 중의 하나 이상을 포함한다: 인터페론- β 예를 들어 IFN β -1a, IFN β -1 β ; 미엘린 염기성 단백질을 자극하는 단백질 (예를 들어, 글라티라머 아세테이트, COPAXONE^R과 같은 합성 단백질); 코르티코스테로이드; IL-1 억제제; TNF 억제제; CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체; IL-12 및 IL-23의 길항제 예를 들어 IL-12 및 IL-23의 p40 서브유니트의 길항제 (예를 들어, p40 서브유니트에 대한 억제 항체); IL-22 항체; 저분자 억제제 예를 들어 메토트렉세이트(methotrexate), 레플루노미드(leflunomide), 시롤리무스(sirolimus) (라파마이신(rapamycin)) 및 그것의 유사체 예를 들어 CCI-779; Cox-2 및 cPLA2 억제제; NSAIDs; p38 억제제; TPL-2; M κ -2; NF κ B 억제제; RAGE 또는 수용성 RAGE; P-셀렉틴 또는 PSGL-1 억제제 (예를 들어, 저분자 억제제, 그것에 대한 항체 예를 들어 P-셀렉틴에 대한 항체); 에스트로겐 수용체 베타 (ERB) 작용제 또는 ERB-NF κ B 길항제.

TNF 억제제의 예는 다음을 포함한다: 예를 들어 TNF에 결합하는 키메라, 인간화된, 사실상(effective) 인간의, 인간 또는 인 비트로 생성된 항체, 또는 그것들의 항원-결합 단편; TNF 수용체의 수용성 단편 예를 들어 p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 그것의 유도체 예를 들어 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질, ENBRELTM), p55 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질; 및 TNF 효소 길항제 예를 들어 TNF α 전환 효소 (TACE) 억제제.

하나 이상의 IL-21/IL-21R 작용제와 함께 투여되거나 및/또는 함께 조제될 수 있는 추가 치료제는 이에 한정되지는 않지만 다음 중의 하나 이상을 포함한다:

인터페론- β 예를 들어 IFN β -1a, IFN β -1 β ; COPAXONE^R; 코르티코스테로이드; IL-1 억제제; TNF 길항제 (예를 들어, TNF 수용체의 수용성 단편 예를 들어 p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 그것의 유도체 예를 들어 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질, ENBRELTM)); CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체; IL-12 및 IL-23의 길항제 예를 들어 IL-12 및 IL-23의 p40 서브유니트의 길항제 (예를 들어, IL-12 및 IL-23의 p40 서브유니트에 결합하는 억제 항체); 메토트렉세이트(methotrexate), 레플루노미드(leflunomide), 시롤리무스(sirolimus) (라파마이신(rapamycin)) 및 그것의 유사체 예를 들어 CCI-779.

또다른 측면으로, 본 발명은 면역세포 활성 및/또는 수를 (예를 들어, 면역세포 예를 들어 림프구 (예를 들어, T 세포) 또는 면역세포 집단의 (예를 들어, 혼합된 또는 실질적으로 정제된 면역 세포 집단) 활성 및/또는 수) 조절하는 예를 들어 증가시키거나 감소시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 면역세포 예를 들어 여기에 기재된 면역세포를 면역세포 활성 및/또는 수를 조절 예를 들어 증가시키거나 감소시키는데 충분한 양의 IL-21/IL-21R 작용제 예를 들어 여기에 기재된 작용제와 접촉시키는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 활성은 사이토카인 활성 또는 수준의 조절 예를 들어 증가 또는 감소를 포함한다. 예를 들어, IL-21/IL-21R 작용제는 림프구의 IL-10 생산 또는 IL-10의 수준을 증가시키거나 및/또는 인터페론- γ 의 생산 또는 수준을 감소시킬 것이다.

목적 방법은 배양 중인 세포에 예를 들어 인 비트로 또는 엑스 비보(ex vivo)로 사용될 수 있다. 예를 들어, 면역세포 예를 들어 여기에 기재된 T 세포는 배지에서 인 비트로로 배양될 수 있고, 하나 이상의 IL-21/IL-21R 작용제 예를 들어 여기에 기재된 작용제를 배지에 가함으로써 접촉 단계를 실행할 수 있다. 대체적으로, 이 방법은 인 비보(in vivo) (예를 들어, 치료 또는 예방의) 프로토콜의 일부를 따라 개체에 존재하는 세포에서 (예를 들어, 여기에 기재된 면역세포) 수행될 수 있다.

면역세포 활성의 변화는 다음 중의 어느 한 변화 예를 들어 증가/감소를 포함한다: 콘트롤 예를 들어 비처리 면역세포와 비교하여 IL-21/IL-21R 작용제와 접촉시킨 면역세포의 특히 증식, 사이토카인 분비 및/또는 생산, 생존, 분화, 세포 반응 (예를 들어, 민감소실), 세포용해 활성, 작용세포 활성, 유전자 발현. 예를 들어, IL-21/IL-21R 작용제 예를 들어 IL-21 폴리펩티드와 면역세포의 접촉은 다음 중의 하나 이상을 유발할 있다: 가슴샘 세포, 림프구, 림프절 T 세포, 성숙 CD4+ T 세포, 성숙 CD8+ T 세포 또는 마크로파지 중의 어느 하나의 증식, 세포용해 활성, 작동세포 기능 또는 사이토카인 분비. 한 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 림프구의 IL-10 생산 또는 IL-10의 수준을 증가시키거나 및/또는 인터페론- γ 의 생산 또는 수준을 감소시킬 것이다.

또다른 측면으로, 본 발명은 포유동물 개체에서 IL-10 결핍 또는 IL-10 결핍과 연관된 장애를 조절하는 방법을 특징으로 한다. 이 방법은 인터루킨-21(IL-21) 폴리펩티드를 IL-10 발현 또는 활성을 증가시키는데 충분한 양으로 (예를 들어, 적어도 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 5 또는 10배 증가, 예를 들어 1.2-2.5배 사이로 증가 또는 2.5-5배 사이로 증가, 5-10배 증가, 또는 10 또는 20배 보다 크게 증가) 개체에 투여하는 것을 포함한다. "IL-10 결핍"은 대응하는 정상 개체에 비해 상대적으로 IL-10이 통계학적으로 유의하게 감소한 것이다. 예를 들어, 이 감소는 0.05 보다 작은 P 값을 가진다. IL-21 또는 다른 IL-21/IL-21R 작용제가 IL-10의 수준 또는 활성을 증가시키는데 사용될 수 있으므로, IL-21 및 그러한 작용제는 IL-10 결핍을 조절하는데 사용될 수 있다.

예를 들어, 피, 혈청 또는 척수액의 IL-10 수준을 모니터링할 수 있다. IL-10 결핍과 연관된 대표적인 질병은 다발 경화증, 중요한 염증 사건 (허혈 재관류 손상을 포함), 건선 및 천포창(pemphigus)을 포함한다. IL-21이 IL-10의 수준을 증가시키기 때문에, IL-21은 이러한 장애 또는 IL-10 결핍과 연관된 다른 장애의 적어도 하나의 증상을 치료하는데 사용될 수 있다.

또다른 측면으로, 본 발명은 포유동물 개체 예를 들어 인간의 다발 경화증을 개선하는 방법을 특징으로 한다. 이 방법은 다음을 포함한다: 인터루킨-21 (IL-21) 폴리펩티드를 다발 경화증 또는 개체에서 나타나는 다발 경화증의 증상 중 적어도 하나를 개선하는데 충분한 양으로 개체에 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 개체가 인간인 경우에, IL-21 폴리펩티드는 인간 IL-21 폴리펩티드일 수 있다 (예를 들어, 서열번호:2 또는 사실상 인간 IL-21 폴리펩티드). 예를 들어, 폴리펩티드는 재조합 방법에 의해 예를 들어 세균 세포에서 생산된다. 한 구체예에서, 이 방법은 인터루킨-21 (IL-21) 폴리펩티드를 개체의 IL-10 발현 또는 활성을 증가시키는데 충분한 양으로 (예를 들어, 적어도 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 5 또는 10배 증가, 예를 들어 1.2-2.5배 사이로 증가 또는 2.5-5배 사이로 증가, 5-10배 증가, 또는 10 또는 20배 보다 크게 증가) 개체에 투여하는 것을 포함한다. 이 방법은 여기에 기재된 다른 특징을 포함할 수 있다.

또다른 측면으로, 본 발명은 포유동물 개체에서 면역장애를 치료하거나 예방하는 방법을 특징으로 한다. 이 방법은 포유동물 개체에서 IL-10 패러미터를 평가하는 것을 포함하고; 및 인터루킨-21 (IL-21) 폴리펩티드를 IL-10 패러미터 평가 결과에 좌우되는 양으로 개체에 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, IL-10 패러미터는 IL-10 단백질 또는 IL-10 mRNA의 수준에 관한 정성적 또는 정량적 정보를 포함한다. 또다른 실시예에서, IL-10 패러미터는 IL-10 단백질 활성에 관한 정량적 정보를 포함한다.

한 구체예에서, 면역장애는 신경계 장애이다. 예를 들어, 개체는 인간이고, 면역장애는 다발 경화증 또는 미엘린 수초를 손상시키거나 변경시키는 면역장애이다. 이 방법은 여기에 기재된 다른 특징을 포함할 수 있다.

또다른 구체예에서, 본 발명은 포유동물 개체에서 다발 경화증의 치료를 평가하는 방법을 특징으로 한다. 이 방법은 다음을 포함한다: 인터루킨-21(IL-21)/IL-21 수용체(IL-21R)의 작용제 (예를 들어, IL-21 폴리펩티드, 작용 항-IL-21R 항체 및 작용 항-IL-21R 항체의 항원-결합 단편)를 개체에 투여하고; 및 IL-10 패러미터를 개체에서 평가한다. 한 구체예에서, 이 방법은 평가된 IL-10 패러미터의 기능에 따라 작용제의 두번째 용량을 개체에 투여하는 것을 추가로 포함한다.

한 구체예에서, 개체는 인간이고, IL-21 폴리펩티드는 인간 IL-21 폴리펩티드 예를 들어 서열번호:2를 포함하는 폴리펩티드이다.

한 구체예에서, 두번째 용량 또는 어느 후속 용량은 예를 들어 첫번째 치료 전에 인터루킨-21(IL-21) 폴리펩티드를 개체의 IL-10 발현 또는 활성을 증가시키는데 충분한 양으로 (예를 들어 기저선(baseline)에 상대적으로 예를 들어 적어도 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 5 또는 10배 증가, 예를 들어 1.2-2.5배 사이로 증가 또는 2.5-5배 사이로 증가, 5-10배 증가, 또는 10 또는 20배 보다 크게 증가) 전달하도록 맞추어진다. 관련 방법에서 첫번째 용량도 그렇게 맞추어진다. 이 방법은 여기에 기재된 다른 특징을 포함할 수 있다.

또다른 측면으로, 본 발명은 조성물 예를 들어 약제학적으로 허용되는 담체 및 여기에 기재된 적어도 하나의 IL-21/IL-21R 작용제를 (예를 들어, 여기에 기재된 IL-21 폴리펩티드 또는 융합 단백질) 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 한 구체예에서, 이 조성물은 (예를 들어, 약제학적 조성물) 전술한 IL-21/IL-21R 작용제의 둘 이상의 병용을 포함한다. IL-21/IL-21R 작용제 및 의약 (예를 들어, 치료제의 (예를 들어, 여기에 자세하게 기재된 하나 이상의 사이토카인 및 성장 인자 억제제, 면역 억제제, 항-염증제, 대사 억제제, 효소 억제제 및/또는 세포독성제 또는 세포증식 억제제) 병용은 또한 본 발명의 범위내에 있다.

한 구체예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체내에 IL-21/IL-21R 작용제 및 적어도 하나의 추가 치료제를 포함하는 약제학적 조성물이다. 조성물 예를 들어 약제학적 조성물에서 하나 이상의 IL-21/IL-21R 작용제와 함께 조제될 수 있는 바람직한 추가 치료제의 예는 이에 한정되지는 않지만 다음 중의 하나 이상을 포함한다: 인터페론- β 예를 들어 IFN β -1a 및 IFN β -1a; 미엘린 염기성 단백질을 자극하는 단백질 (예를 들어, COPAXONE^R); 코르티코스테로이드; IL-1 억제제; TNF 억제제 (예를 들어, TNF 수용체의 수용성 단편 예를 들어 p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 그것의 유도체 예를 들어 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질, ENBRELTM); CD40 리간드 및 CD80에 결합하는 항체; IL-12 및/또는 IL-23의 길항제 예를 들어 IL-12 및 IL-23의 p40 서브유닛의 길항제 (예를 들어, p40 서브유닛에 대한 억제 항체); 메토크렉세이트, 레플루노미드, 시롤리무스 (라파마이신) 및 그것의 유사체 예를 들어 CCI-779.

한 구체예에서, 본 발명은 (i) IL-21 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물의 단위 용량을 하나 이상 가지는 용기; 및 (ii) 다발 경화증을 가졌거나, 가진 것으로 의심되는 개체에 대한 단위 용량 투여 설명서를 포함하는 물건을 특징으로 한다. 예를 들어, 설명서는 라벨 위에 제공된다. 라벨은 용기의 외부 표면에 부착될 수 있다. 한 구체예에서, 물건은 예를 들어 IL-21 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물의 추가 단위 용량을 가지는 두번째 용기를 포함한다. 한 구체예에서, 물건은 다발 경화증을 치료하는 약제 (즉, IL-21외의 약제) 포함하는 두번째 약제학적 조성물을 가지는 두번째 용기를 추가로 포함한다. 예를 들어, 약제는 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate) 또는 여기에 기재된 다른 약제이다. 다른 구체예에서, 첫번째 용기에 IL-21 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물은 다발 경화증의 치료를 위한 두번째 치료제 예를 들어 글라티라머 아세테이트를 추가로 포함한다.

용어 "MU-1" 및 "IL-21R"은 여기에서 상호 교환적으로 사용된다. 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 여기에서 상호 교환적으로 사용된다. 단백질은 하나 이상의 사슬을 포함할 수 있다.

통계학적 유의성은 당업계에 공지된 어떤 방법으로도 결정될 수 있다. 대표적인 통계학적 시험은 다음을 포함한다: 스튜던트 T-검증, 만 휘트니 U 비-패러미터 검증 및 월콕슨 비-패러미터 통계 검증. 통계학적으로 유의한 어떤 관계는 0.05 또는 0.02 보다 작은 P 값을 가진다. IL-21/IL-21R 작용제에 의해 중개되는 특정 효과는 통계학적으로 유의한 (예를 들어, 0.05 또는 0.02 보다 작은 P 값) 차이를 보일 수 있다. 두 상태간에 구분할 수 있는 정성적 또는 정량적 차이를 나타내는 용어인 "유발", "억제", "강화(potentiate)", "상승", "증가", 감소" 등은 두 상태간의 차이 예를 들어 통계학적으로 유의한 차이를 지칭할 수 있다.

다르게 정의되지 않는다면, 여기에 사용된 모든 기술 및 과학용어는 본 발명이 속하는 분야에서 통상적인 지식을 가진 자에 의해 공통적으로 이해되는 의미와 동일하다. 여기에 기재된 것과 유사 또는 균등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질은 아래에 기재되어 있다. 여기에 언급된 모든 간행물, 특허출원, 특허 및 다른 참고자료는 참고로서 전체가 포함되어 있다. 충돌이 있는 경우, 정의를 포함한 본 명세서에 따른다. 또한, 물질, 방법 및 실시에는 설명을 위한 것일 뿐 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명 및 청구범위에서 명백할 것이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 IL-21 또는 IL-21 수용체의 ("IL-21R" 또는 "MU-1") 작용제를 이용하여 인터루킨-21(IL-21)/IL-21 수용체 (MU-1) 활성을 조절하는 방법 및 조성물을 제공한다. 한 구체예에서, 출원인은 IL-21/IL-21R 작용제 예를 들어 뮤린 IL-21 폴리펩티드를 이용한 마우스의 치료가 실험 자가면역 뇌척수염(EAE)에서 증상을 개선시킴을 보였다. EAE 증상의 조절은 미에린 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG) 펩티드 (예를 들어, MOG 35-55) 및 단백질질질 단백질(PLP)을 이용하여 제조한 마우스 모델에서 검출되었다. IL-21은 인 비트로에서 T 세포 증식을 유발하였다. IL-21의 존재하에 배양된 림프구는 IL-10의 증가된 수준 및 인터페론- γ 의 감소된 수준을 생산하였다. 따라서, IL-21/IL-21R 활성의 작용제는 신경계 면역장애를 (예를 들어, 다발 경화증을 포함하는 신경계 만성 면역장애) 치료하거나 예방하는데 사용될 수 있다.

본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위해, 일부 용어를 처음에 정의하였다. 명세서 전반에 걸쳐 추가로 정의할 것이다.

용어 "인터루킨-21", "IL-21" 및 "IL-21 폴리펩티드"는 IL-21R과 (예를 들어, 포유동물 예를 들어 뮤린 또는 인간 단백질) 작용할 수 있는 예를 들어 결합할 수 있고, 다음의 특징 중 하나를 가질 수 있는 단백질을 (예를 들어, 포유동물 예를 들어 뮤린 또는 인간 단백질) 지칭한다: (i) 포유동물의 천연 IL-21 아미노산 서열 또는 그것의 단편 예를 들어 서열번호:2 (인간) 또는 서열번호:4 (뮤린)의 아미노산 서열 또는 그것의 단편; (ii) 서열번호:2 (인간) 또는 서열번호:4 (뮤린)의 아미노산 서열 또는 그것의 단편과 실질적으로 상동성을 가지는 예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 상동성을 가지는 아미노산 서열; (iii) 포유동물 천연 IL-21 핵산 서열 또는 그것의 단편(예를 들어, 서열번호:1 (인간) 또는 서열번호:3 (뮤린) 또는 그것의 단편 예를 들어 성숙 형태를 코딩하는 영역)에 의해 코딩되는 아미노산 서열; (iv) 서열번호:1 (인간) 또는 서열번호:3의 (뮤린) 핵산 또는 그것의 단편(예를 들어, 성숙 형태를 코딩하는 영역)과 실질적으로 상동성을 가지는 예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 상동성을 가지는 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열; (v) 천연 IL-21 핵산 서열 또는 그것의 단편 예를 들어 서열번호:1 (인간) 또는 서열번호:3의 (뮤린) 핵산 또는 그것의 단편(예를 들어, 성숙 형태를 코딩하는 영역)의 축퇴성 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는 (vi) 엄격한 조건 예를 들어 매우 엄격한 조건에서 전술한 핵산 중의 어느 하나의 상보체에 혼성화하는 핵산 서열에 의해 코딩되고 적어도 115 아미노산을 가지는 아미노산 서열(예를 들어, 핵산 서열은 성숙 IL-21 단백질 코딩 영역에 혼성화한다). IL-21R에 대한 IL-21의 결합은 stat5 또는 stat3 신호를 일으킨다(Ozaki et al. (2000) supra). IL-21 폴리펩티드는 신호서열을 포함하는 신생 단백질로부터 신호서열이 제거된 성숙 단백질로 처리될 수 있다.

"사실상(effectively) 인간" IL-21 폴리펩티드는 폴리펩티드가 정상 인간에서 면역반응을 일으키지 않고, IL-21 폴리펩티드가 인간 IL-21R과 반응하도록 충분한 수의 인간 아미노산 위치(position)를 포함하는 IL-21 폴리펩티드이다.

용어 "MU-1", "MU-1 단백질", "인터루킨-21 수용체" 또는 "IL-21R"은 IL-21과 (예를 들어, 포유동물 예를 들어 뮤린 또는 인간 IL-21) 작용할 수 있는 예를 들어 결합할 수 있고, 다음의 특징 중 하나를 가질 수 있는 수용체를 (예를 들어, 포유동물 예를 들어 뮤린 또는 인간 기원) 지칭한다: (i) 포유동물의 천연 MU-1 폴리펩티드 IL-21R/MU-1 아미노산 서열 또는 그것의 단편 예를 들어 서열번호:6 (인간) 또는 서열번호:8 (뮤린)의 아미노산 서열 또는 그것의 단편 (예를 들어, 성숙 영역); (ii) 서열번호:6 (인간) 또는 서열번호:8 (뮤린)의 아미노산 서열 또는 그것의 단편(예를 들어, 성숙 영역)과 실질적으로 상동성을 가지는 예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 상동성을 가지는 아미노산 서열; (iii) 포유동물 천연 IL-21R/MU-1 핵산 서열 (예를 들어, 서열번호:5 (인간) 또는 서열번호:7 (뮤린)) 또는 그것의 단편(예를 들어, 성숙 영역)에 의해 코딩되는 아미노산 서열; (iv) 서열번호:5 (인간) 또는 서열번호:7의 (뮤린) 핵산 또는 그것의 단편(예를 들어, 성숙 영역)과 실질적으로 상동성을 가지는 예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 상동성을 가지는 핵산에 의해 코딩되는 아미노산 서열; (v) 천연 IL-21R/MU-1 핵산 서열 또는 그것의 단편 예를 들어 서열번호:5 (인간) 또는 서열번호:7의 (뮤린) 핵산 또는 그것의 단편(예를 들어, 성숙 영역)의 축퇴성 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는 (vi) 엄격한 조건 예를 들어 매우 엄격한 조건에서 전술한 핵산 중의 어느 하나와 혼성화하는 핵산 서열에 의해 코딩되고 적어도 450 아미노산을 가지는 아미노산 서열. 서열번호:6에 리스트된 IL-21R/MU-1의 성숙 영역은 아미노산 약 20-538이다.

대표적인 IL-21R/MU-1 cDNA는 어메리칸 타입 컬처 콜렉션에 1998년 3월 10일 기탁되었고, 기탁번호는 ATCC 98687이다.

IL-21R은 클래스 I 사이토카인 패밀리 수용체이고, 또한 NIRL로 알려져 있다 (WO01/85792 ; Parrish-Novak et al. (2000) Nature 408: 57-63; Ozaki et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 11439-11444). IL-21R은 IL-2 및 IL-15 수용체의 공유된 β 사슬, 및 IL-4 수용체의 α 사슬과 상동성이 있다(Ozaki et al. (2000) supra). 리간드가 결합하는 경우에, IL-21R/MU-1은 공통 γ 사이토카인 수용체 사슬(γ c)과 상호작용할 수 있고(Asao et al.(2001) J. Immunol. 167: 1-5), STAT1 및 STAT3 (Asao et al. (2001)) 또는 STAT5 (Ozaki et al. (2000))의 인산화를 유도할 수 있다. IL-21R은 림프 조직에 넓게 분포하고 있다.

전체 길이(full length) 보다 작은 IL-21 단백질의 형태는 그것이 IL-21R 폴리펩티드에 결합할 수 있는 능력을 가지고 있다면 여기에 기재된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 전체 길이 보다 작은 IL-21 단백질은 전체-길이 IL-21을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 대응 단편을 숙주세포에서 발현시킴으로써 또는 수정된 단백질을 (예를 들어, 하나 이상의 내부 아미노산이 제거된 단백질) 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 전체 길이 보다 작은 IL-21 폴리펩티드의 한 형태는 성숙 IL-21 예를 들어 서열번호:2의 IL-21이다. 전체 길이 보다 작은 폴리펩티드의 다른 형태는 성숙 IL-21 예를 들어 131,130, 129, 128 또는 125 아미노산 보다 적은 예를 들어 길이가 115 및 130 아미노산 사이인 IL-21이다. 예를 들어, 서열번호:2로 부터 유도된 IL-21 폴리펩티드는 마지막 8 아미노산 또는 그것의 서브세트가 없을 수 있다 (예를 들어, IL-21 폴리펩티드는 아미노산 1-122를 포함한다). 대응 폴리뉴클레오티드 단편은 또한 본 발명의 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 상술한 수정된 폴리뉴클레오티드는 적절하고 바람직한 결절 변이체의 구성, 자리-지시(site-directed) 돌연변이법을 포함하는 표준 분자생물학 기술 또는 적절한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 이용하여 제조될 수 있다.

MU-1 또는 IL-21R 폴리펩티드의 "생물학적 활성"은 이에 한정되지는 않으나 다음의 것을 포함하는 대응 성숙 MU-1 단백질의 생물학적 활성의 하나 이상을 지칭한다: (1) IL-21 폴리펩티드(예를 들어, 인간 IL-21 폴리펩티드)와 상호작용 예를 들어 결합; (2) 신호 전달 분자(예를 들어, γc , jak1)와 회합; (3) stat 단백질(예를 들어, STAT5 및/또는 STAT3)의 인산화 및/또는 활성화를 자극; 및/또는 (4) 면역세포(예를 들어, T 세포(CD8+, CD4+ T 세포), NK 세포, B 세포, 마크로파지 및 거핵세포)의 증식, 분화, 작동세포 기능, 세포용해 활성, 사이토카인 분비 및/또는 생존을 조절 예를 들어 자극 또는 감소.

여기에 사용된 "IL-21/IL-21R 작용제"는 IL-21R/MU-1 폴리펩티드의 생물학적 활성(예를 들어, 여기에 기재된 생물학적 활성)을 강화, 유도 또는 증가시키는 약제를 지칭한다. 예를 들어, 작용제는 IL-21R/MU-1 폴리펩티드와 상호작용 예를 들어 결합한다. 한 구체예에서, 작용제는 IL-21R 및 다른 수용체 사슬 예를 들어 γ 사이토카인 수용체 사슬과 상호작용한다. 예를 들어, 작용제는 IL-21R 및 γ 사이토카인 수용체 사슬을 가교(crosslink)시킨다.

여기에 사용된 IL-21/IL-21R 작용제의 "치료적으로 유효한 양"은 일회량 또는 다회량을 개체(예를 들어, 인간 환자) 투여하는 경우에 장애 예를 들어 여기에 기재된 장애를 치료, 장애의 심각성을 감소, 장애의 하나 이상의 증상을 개선 또는 치료가 없는 경우에 예상되는 것보다 개체의 생존을 길게하는데 유효한 IL-21/IL-21R 작용제의 양을 지칭한다.

여기에 사용된, IL-21/IL-21R 작용제의 "예방적으로 유효한 양"은 일회량 또는 다회량을 개체(예를 들어, 인간 환자) 투여하는 경우에 장애 예를 들어 여기에 기재된 장애의 발병 또는 재발을 예방하거나 지연시키는데 유효한 IL-21/IL-21R 작용제의 양을 지칭한다.

두 상태간의 정량적 차이를 나타내는 용어인 "유발", "억제", "강화", "상승", "증가", 감소" 등은 적어도 두 상태간의 통계학적으로 유의한 차이를 지칭한다.

명세서 내의 용어 "병용하여"는 약제를 실질적으로 동일한 시기에 (동시 또는 순차적으로) 투여하는 것을 의미한다. 만약 순차적으로 투여된다면, 바람직하게는 두번째 화합물의 투여시에 두 화합물 중 첫번째 화합물이 치료 부위에서 유효 농도로 검출될 수 있어야 한다.

여기에 사용된 "융합 단백질"은 둘 이상의 작동 가능하게(operably) 회합된 (예를 들어 연결된) 모이어티(예를 들어 단백질 모이어티)를 포함하는 단백질을 지칭한다.

여기에 개시된 서열과 유사한 또는 상동성 (예를 들어, 적어도 약 85% 서열 동일성) 서열은 또한 본 발명의 일부이다. 어떤 구체예에서, 서열 동일성은 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상일 수 있다. 대체적으로, 선택적 혼성화 조건(예를 들어, 매우 엄격한 혼성화 조건)에서 핵산 세그먼트가 상보성 가닥에 혼성화한다면, 실질적 동일성이 있다. 핵산은 전세포, 세포 용해물 또는 부분 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다.

두 서열간의 "상동성" 또는 "서열 동일성" 계산은 (여기에서 상기 용어는 상호 교환적으로 사용된다) 다음과 같이 수행된다. 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다 (예를 들어, 최적의 정렬을 위해 첫번째 및 두번째 아미노산의 어느 하나 또는 양자 모두에 또는 핵산 서열에 갭이 도입될 수 있고, 비-상동성 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 바람직한 구체예에서, 비교 목적으로 정렬된 참고 서열의 길이는 참고 서열길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 50%, 더 바람직하게는 적어도 40%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 더 바람직하게는 적어도 60% 및 가장 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 100%이다. 그 후에, 아미노산 위치 또는 핵산 위치에 대응하는 아미노산 잔기 또는 핵산을 비교한다. 첫번째 서열

의 위치가 두번째 서열의 대응하는 위치에 있는 아미노산 또는 핵산과 동일한 동일한 것에 의해 채워져 있는 경우에, 분자는 그 위치에서 동일하다(여기에 사용된 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동등하다). 두 서열간의 퍼센트 동일성은 두 서열을 최적으로 정렬하기 위해 도입된 갭의 수 및 각 갭의 길이를 고려한, 상기 서열에 의해 공유되는 동일 위치의 개수에 대한 함수이다.

두 서열간의 서열 비교 및 퍼센트 동일성의 결정은 수학 알고리즘을 이용하여 행할 수 있다. 비교는 GCG 소프트웨어 패키지(www.gcg.com)의 GAP 프로그램 및 갭 페널티 12, 갭 연장 페널티 4 및 틀이동 갭 페널티 5를 가지는 Blossum 62 스코어링 매트릭스를 이용한다.

여기에서 사용되는 용어 "엄격한 조건에서 혼성화"는 혼성화 및 세척에 관한 조건을 나타낸다. 엄격한 조건은 당업자에게 알려져 있고, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6에서 찾을 수 있다. 수성 및 비수성 방법이 상기 레퍼런스에 기재되어 있고, 사용될 수 있다. 엄격한 혼성화 조건의 한 예는 약 45°C, 6× 염화 나트륨/시트르산 나트륨(SSC)에서 혼성화하고, 50°C, 0.2× SSC, 0.1% SDS에서 적어도 한번 세척하는 것이다. 엄격한 혼성화 조건의 다른 예는 약 45°C, 6× SSC에서 혼성화하고, 55°C, 0.2× SSC, 0.1% SDS에서 적어도 한번 세척하는 것이다. 엄격한 혼성화 조건의 다른 예는 약 45°C, 6× SSC에서 혼성화하고, 60°C, 0.2× SSC, 0.1% SDS에서 적어도 한번 세척하는 것이다. 엄격한 혼성화 조건의 추가 예는 약 45°C, 6× SSC에서 혼성화하고, 65°C, 0.2× SSC, 0.1% SDS에서 적어도 한번 세척하는 것이다. 매우 엄격한 조건은 (및 분자가 혼성화 한계에 있는지를 확인하기 위해 적용해야할 조건이 불확실한 경우 사용되는 조건) 65°C, 0.5M 인산 나트륨, 7% SDS에서 혼성화하고, 65°C, 0.2× SSC, 1% SDS에서 적어도 한번 세척하는 것이다.

IL-21/IL-21R 작용제는 그들의 기능에 실질적인 영향을 주지 않는 추가의 보존성 또는 비-필수적 아미노산 치환을 가질 수 있다. "보존성 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 결사슬을 가지는 아미노산 잔기로 치환되는 이다. 유사한 결사슬을 가지는 아미노산 패밀리는 당업계에서 정의되어 있다. 이러한 패밀리는 염기성 결사슬 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 결사슬 (예를 들어, 아스파틱 에시드, 글루탐릭 에시드), 비하전 극성 결사슬 (예를 들어, 글리신, 아스파라진, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 결사슬 (예를 들어, 알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프로린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-가지친 결사슬(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소루이신) 및 방향족 결사슬을 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘) 가지는 아미노산을 포함한다.

IL-21/IL-21R 작용제

본 발명의 방법 및 조성물에 사용되는 IL-21/IL-21R 작용제는 IL-21 폴리펩티드 예를 들어, 인간 또는 뮤린 IL-21 폴리펩티드 또는 그것의 활성 단편 (예를 들어, 서열번호:2의 아미노산 서열, 서열번호:1의 핵산 서열에 의해 코딩되는 영역을 포함하는 아미노산 서열 또는 그것과 적어도 85%, 90%, 95%, 98% 이상 동일한 서열을 포함하는 인간 IL-21 폴리펩티드) (예를 들어, 성숙 IL-21 폴리펩티드를 코딩하는 서열번호:1의 영역) 일 수 있다.

다른 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 뮤린 IL-21 폴리펩티드 또는 그것의 활성 단편 (예를 들어, 서열번호:4의 아미노산 서열, 서열번호:3의 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 그것과 적어도 85%, 90%, 95%, 98% 이상 동일한 서열을 포함하는 뮤린 IL-21 폴리펩티드), 또는 다른 포유동물 예를 들어 비-인간 영장류, 소 등으로부터 유래된 IL-21 폴리펩티드이다.

IL-21 폴리펩티드의 아미노산 서열은 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 IL-21의 핵산 및 아미노산 서열은 GENBANK[®]Acc. No.X011082에서 얻을 수 있다. 공지된 대표적인 인간 IL-21 핵산 서열은 다음과 같다:

```

1 gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtc
61 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggcctc ttcttgggga cactgggtcca
121 caaatcaagc tcccaaggc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat
181 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttggtccct gaatttctgc cagctccaga
241 agatgtagag acaactgtg agtggtcagc ttttctctgc ttccagaagg cccaactaaa
301 gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag
361 gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcctg
421 tgattcttat gagaaaaaac caccctaaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca
481 aaagatgatt catcagcatc tgctctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc
541 taacttgcag ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg
601 tattccaagt ggaggag (서열번호: 1)
    
```

핵산 서열에 관한 추가 정보는 예를 들어 대표적인 IL-21 폴리펩티드를 코딩하는 642 bp mRNA 서열을 제공하는 AF254069 [gi:11093535]에서 얻을 수 있다. 어떤 구체예에서, 성숙 IL-21(예를 들어 신호서열을 코딩하는 영역이 없는)을 코딩하는 핵산 서열 영역을 이용하기에 충분하다.

대표적인 성숙 인간 IL-21 폴리펩티드의 아미노산 서열은 다음과 같다:

QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANT
GNNERIINVSICKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKM
IHQHLSSRTHGSEDS (서열번호: 2)

성숙 서열은 Parrish-Novak et al. (2000) Nature 408:57-63에 기초한다. 전체 길이 서열은 다음과 같다:

MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTLVHKSSSQQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPE
EFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSICKLKRKPPSTNAGRRQ
KHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (서열번호: 10)

인간 IL-21 폴리펩티드의 아미노산 서열을 제공하는 추가의 엔트리(entry)는 다음과 같다: gi | 11141875 | ref | NP_068575.1 | 인터루킨 21 [호모 사피엔스]; gi | 11093536 | gb | AAG29348.1 | 인터루킨 21 [호모 사피엔스]; gi | 42542586 | gb | AAH66259.1 | 인터루킨 21 [호모 사피엔스]; gi | 42542588 | gb | AAH66260.1 | 인터루킨 21 [호모 사피엔스]; gi | 42542657 | gb | AAH66261.1 | 인터루킨 21 [호모 사피엔스]; gi | 42542659 | gb | AAH66258.1 | 인터루킨 21 [호모 사피엔스]; 및 gi | 42542807 | gb | AAH66262.1 | 인터루킨 21 [호모 사피엔스]. 인간 IL-21 폴리펩티드는 기능을 보유하고 있다면 여기에 기재된 폴리펩티드의 변이체일 수 있다.

IL-21 폴리펩티드는 여기에 기재된 조건 예를 들어 매우 엄격한 조건(예를 들어, $0.1 \times$ SSC, 65°C)에서 서열번호:1, 서열번호:3, 서열번호:5 또는 서열번호:7, 또는 그것의 상보성 서열과 혼성화하는 핵산에 의해 코딩되는 것일 수 있다. IL-21/IL-21R 단백질 또는 융합 단백질을 코딩하고, 서열번호:1, 서열번호:3, 서열번호:5 또는 서열번호:7의 핵산 서열과 유전 코드의 축퇴에 의해 상이한 분리된 핵산이 사용될 수 있다. 점 돌연변이 또는 유도 수정(induced modifications)에 의해 야기된 서열번호:1, 서열번호:3, 서열번호:5 또는 서열번호:7에 따른 핵산의 변이체도 또한 사용될 수 있다.

다른 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 IL-21 폴리펩티드 (예를 들어, 인간 또는 무인 IL-21 폴리펩티드) 또는 그것의 단편 및 (예를 들어, 융합되는) 두번째 모이어티 예를 들어 폴리펩티드를 (예를 들어, GST, Lex-A, MBP 폴리펩티드 서열 또는 예를 들어 Fc 단편, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE를 포함하는 다양한 아이소타입의 중쇄를 변이체를 포함하는 이뮤노글로블린 사슬) 포함하는 융합 단백질이다.

융합 단백질은 IL-21 또는 IL-21R 단편을 두번째 모이어티에 결합시키는 링커 서열을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 펩티드 링커 예를 들어 아미노산의 길이가 약 4 내지 20, 바람직하게는 5 내지 10의 펩티드 링커이다; 펩티드 링커는 길이가 8 아미노산이다. 펩티드 링커의 각 아미노산은 Gly, Ser, Asn, Thr 및 Ala으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다; 펩티드 링커는 Gly-Ser 성분을 포함한다. 다른 구체예에서, 융합 단백질은 펩티드 링커를 포함하고, 펩티드 링커는 식 (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly, 서열번호:11)y (여기에서, y는 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8이다) 을 가지는 서열을 포함한다.

다른 구체예에서, 발현, 검출 및/또는 분리 또는 정제를 촉진하기 위해 융합 단백질의 N- 또는 C-말단에 추가의 아미노산 서열이 더해질 수 있다. 예를 들어, IL-21 융합 단백질은 하나 이상의 추가 모이어티에 예를 들어 GST, His6 태그, FLAG 태그에 연결될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 융합 단백질 서열이 GST(즉, 글루타티온 S-전이효소) 서열의 C-말단에 융합된 GST 융합 단백질에 추가로 연결될 수 있다. 이러한 융합 단백질은 융합단백질의 정제를 촉진한다.

다른 구체예에서, 융합 단백질은 이중유래 신호서열을 (즉, IL-21 핵산에 의해 코딩된 폴리펩티드에는 존재하지 않는 폴리펩티드 서열) 그것의 N-말단에 포함할 수 있다. 예를 들어, 자연 신호서열은 제거되고, 다른 단백질의 신호서열로 대체된

다. 어떤 숙주세포(예를 들어, 포유동물 숙주세포)에서, IL-21/IL-21R 작용제의 발현 및/또는 분비는 이중유래 신호서열을 사용함으로써 증가될 수 있다. IL-21R 단백질 및 그것의 단편은 또한 유사한 방법(예를 들어, IL-21R과 상호작용하는 작용화 항체를 얻기 위해 면역원을 제공하는 방법)을 이용하여 제조될 수 있다.

키메라 또는 융합 단백질은 표준 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 다른 폴리펩티드 서열을 코딩하는 DNA 단편은 통상의 기술(예를 들어, 결찰(ligation)을 위한 둔단(blunt-ended) 또는 엇갈림단(stagger-ended), 적절한 말단을 제공하기 위한 제한효소 소화, 점착종단(cohesive end)의 적절한 채움, 원치않는 결합을 방지하기 위한 알칼린 포스파타제 처리 및 효소적 결찰을 채용)에 따라 함께 인-프레임(in-frame)에 결찰된다. 다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동 DNA 합성기를 포함하는 통상의 기술에 의해 합성될 수 있다. 대체적으로 유전자 단편의 PCR 증폭은 키메라 유전자 서열을 생성하기 위해 계속적으로 어닐링(annealing)되고 재증폭되는 두 연속(consecutive) 유전자 단편의 상보적 겹침을 야기하는 앵커(anchor) 프라이머를 이용하여 수행될 수 있다(예를 들어, Ausubelet al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992를 참조). 게다가, 융합 모이어티(예를 들어, 이뮤노글로블린 중쇄의 Fc 영역)를 코딩하는 많은 발현 벡터가 시중에서 구입 가능하다. IL-21/IL-21R 작용제를 코딩하는 핵산은 융합 모이어티가 이뮤노글로블린에 인-프레임 연결되도록 그러한 발현 벡터에 클로닝 될 수 있다.

어떤 구체예에서, 융합 폴리펩티드는 디머 (예를 들어, 호모- 또는 헤테로-디머) 또는 트리머 같은 올리고머로 존재할 수 있다. 첫번째 폴리펩티드 및/또는 첫번째 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 만들 수 있다.

어떤 구체예에서, 첫번째 폴리펩티드는 전체-길이 IL-21/IL-21R 작용제 폴리펩티드를 (예를 들어, IL-21 자체)를 포함한다. 대체적으로, 첫번째 폴리펩티드는 전체-길이보다 적은 IL-21/IL-21R 폴리펩티드를 포함한다. 융합 단백질에 포함되는 신호 펩티드는 MPLLLLLLLLLPSPLHP (서열번호:9)이다. 바람직하게는 하나 이상의 아미노산이 IL-21/IL-21R 작용제 모이어티를 포함하는 첫번째 폴리펩티드 모이어티와 두번째 폴리펩티드 모이어티 사이에 추가로 삽입될 수 있다.

두번째 폴리펩티드는 바람직하게는 수용성이다. 어떤 구체예에서, 두번째 폴리펩티드는 연결된 폴리펩티드의 반감기(예를 들어, 혈청 반감기)를 증가시킨다. 어떤 구체예에서, 두번째 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드와 두번째 IL-21/IL-21R 작용제 폴리펩티드와의 회합을 촉진하는 서열을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 두번째 폴리펩티드는 이뮤노글로블린 폴리펩티드의 적어도 한 영역을 포함한다. 이뮤노글로블린 폴리펩티드는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허번호 516,964호; 5,225,538호; 5,428,130호; 5,514,582호; 5,714,147호; 및 5,455,165호에 개시되어 있다.

어떤 구체예에서, 두번째 폴리펩티드는 전체-길이 이뮤노글로블린 폴리펩티드를 포함한다. 대체적으로, 두번째 폴리펩티드는 전체-길이 보다 적은 이뮤노글로블린 폴리펩티드(예를 들면, 중쇄, 경쇄, Fab, Fab₂, Fv 또는 Fc)를 포함한다. 두번째 폴리펩티드는 이뮤노글로블린 폴리펩티드의 중쇄를 포함할 수 있다. 두번째 폴리펩티드는 이뮤노글로블린 폴리펩티드의 Fc 영역을 포함할 수 있다.

어떤 구체예에서, 두번째 폴리펩티드는 와이드-타입 이뮤노글로블린 중쇄의 Fc 영역의 작동 기능보다 더 약한 작동 기능을 가진다. Fc 작동 기능은 예를 들어 Fc 수용체 결합, 보체 고정 및 T 세포 결핍 활성화(depleting activity)를 포함한다(예를 들어, 미국 특허번호 6,136,310호를 참조). T 세포 결핍 활성화, Fc 작동 기능 및 항체 안정성을 분석하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 한 구체예에서 두번째 폴리펩티드는 Fc 수용체에 대해 친화력이 낮거나 전혀 없다. 대체적인 구체예에서, 두번째 폴리펩티드는 보체 단백질 C1q에 대해 친화력이 낮거나 전혀 없다.

여기에 기재된 분리된 IL-21/IL-21R 작용제 폴리뉴클레오티드는 단백질을 재조합에 의해 제조하기 위해 Kaufman et al., Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991)에 개시된 pMT2 또는 pED 발현 벡터와 같은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 발현 조절 서열에 적합한 많은 것들이 당업계에 공지되어 있다. 재조합 단백질을 발현하는 일반적인 방법 또한 알려져 있고, R.Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566 (1990)에 설명되어 있다. 여기에 정의된 "작동 가능하게 연결된"은 관심 단백질을 코딩하는 특정 폴리뉴클레오티드 및 발현 조절 서열을 효소적 또는 화학적으로 결찰하여 공유결합을 형성하는 것을 의미하고, 그러한 방법에 의해 관심 단백질(예를 들어, IL-21 또는 다른 IL-21/IL-21R 작용제)이 결찰된 폴리뉴클레오티드/발현 조절 서열로 트랜스폼(트랜스펙트)된 숙주세포에 의해 발현된다.

여기에 사용된 용어 "벡터"는 그것이 연결된 다른 핵산을 전달, 유지, 복제할 수 있게 하는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 종류는 "플라스미드"이고, 이것은 추가적인 DNA 세그먼트가 삽입될 수 있는 환상의 이중 가닥 DNA 고리를 지칭한다. 벡터의 또다른 타입은 바이러스 벡터이고, 추가적인 DNA 세그먼트가 바이러스 지놈(genome)로 결찰될 수 있다. 어떤 벡터는 그들이 도입된 숙주세포에서 자가 복제할 수 있다(예를 들어, 세균 복제 기원을 가지는 세균 벡터 및 에피솜(episomal) 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피소말 포유동물 벡터)는 도입된 숙주세포의 지놈에 통합될 수 있

고, 숙주 지놈과 함께 복제된다. 또한, 어떤 벡터는 그들이 효과적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 그러한 벡터는 여기에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단한 "발현 벡터")라고 지칭된다. 일반적으로 재조합 DNA 기술에서 사용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 플라스미드가 가장 흔하게 사용되는 벡터 형태이므로, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 균등한 기능을 가지는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 손상 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터를 포함한다.

용어 "조절 서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소(예를 들어, 폴리아데닐레이션 신호)를 포함한다. 이러한 조절 서열은 예를 들어 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)에 기재되어 있다. 당업자는 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 설계가 트랜스폼된 숙주세포, 원하는 단백질의 발현량 등과 같은 인자에 의존한다는 것을 알것이다. 포유동물 숙주세포 발현을 위한 바람직한 조절 서열은 FF-1a 프로모터 및 BGH 폴리 A, 사이토메갈로바이러스(CMV) (CMV 프로모터/인핸서와 같은), 시미안 바이러스 40(SV40) (SV40 프로모터/인핸서와 같은), 아데노바이러스, (예를 들어, 아데노바이러스 메이저 레이트 프로모터(AdMLP)) 및 폴리오마에서 유래된 프로모터 및/또는 인핸서와 같은 포유동물 세포에서 단백질 발현을 높은 수준으로 지시하는 바이러스 요소를 포함한다. 바이러스 조절 요소 및 그것의 서열에 대한 더 많은 내용은 Stinski의 미국 특허 번호 5,168,062호, Bell et al의 미국 특허 번호 4,510,245호 및 Schaffner et al의 미국 특허 번호 4,968,615호를 참조.

재조합 발현 벡터는 숙주세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예를 들어, 복제 기점) 및 선택 표지(selectable marker) 유전자와 같은 추가 서열을 가지고 있을 수 있다. 선택 표지 유전자는 벡터가 도입된 숙주세포의 선택을 용이하게 한다(예를 들어, Axel et al에 의한 미국 특허 번호 4,399,216호, 4,634,665호 및 5,179,017호를 참조). 예를 들어, 전형적인 선택 표지 유전자는 벡터가 도입된 숙주세포에 대해 G418, 히그로마이신 또는 메토틱세이트와 같은 약물에 대한 내성을 부여한다. 바람직한 선택 표지 유전자는 이소소폴산 리덕타제 (DHFR) 유전자 (메토틱세이트 선택/증폭을 가지는 dhfr⁻ 숙주세포에서 사용하기 위한) 및 네오 유전자(G418 선택을 위한)를 포함한다.

많은 종류의 세포 타입이 IL-21/IL-21R 작용제 단백질 또는 그것의 융합 단백질을 발현하기 위한 적합한 숙주세포로 작용할 수 있다. 기능성 IL-21/IL-21R 단백질을 발현할 수 있는 세포 타입은 어떤 것도 사용될 수 있다. 적합한 포유동물 숙주세포는 예를 들어 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 인간 신장 293 세포, 인간 표피 A431 세포, 인간 Colo205 세포, 3T3 세포, CV-1 세포, 다른 트랜스폼된 영양류 세포주, 정상 두배수체 세포, 일차 조직의 인 비트로 배양으로부터 유래된 세포주, 일차 체외 이식조직, HeLa 세포, 마우스 L 세포, BHK, HL-60, U937, HaK, Rat2, BaF3,32D, FDCP-1, PC12, M1x 또는 C2C12 세포를 포함한다.

IL-21/IL-21R 작용제 단백질 또는 그것의 융합 단백질은 또한 이러한 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 하나 이상의 곤충 발현 벡터의 적합한 콘트롤 서열에 작동 가능하게 연결하고, 곤충 발현계를 채택함으로써 제조될 수 있다. 바쿨로 바이러스(baculovirus)/곤충 세포 발현계를 위한 물질 및 방법은 예를 들어 Invitrogen, San Diego, Calif. U.S.A. (MAXBAC^Rkit)에서 키트로 구매할 수 있고, 그러한 방법은 여기에 참고로서 포함된 Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)에 기재된 것처럼 당업계 잘 공지되어 있다. MU-1 단백질의 수용성 형태가 또한 상술한 적절한 분리 폴리뉴클레오티드를 이용하여 곤충 세포에서 제조될 수 있다.

대체적으로, IL-21/IL-21R 작용제 단백질 또는 그것의 융합 단백질은 효모와 같은 저극 진핵세포 또는 세균과 같은 원핵 세포에서 제조될 수 있다. 적합한 효모주는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* 주, *Candida* 또는 이중유래 단백질을 발현할 수 있는 효모주 어떤 것이라도 포함한다. 적합한 세균주는 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, 또는 이중유래 단백질을 발현할 수 있는 세균주 어떤 것이라도 포함한다.

한 구체예에서, IL-21은 신호서열 없이 (예를 들어, 원핵 또는 진핵 신호서열 없이) 세균에서 제조된다. 세균에서의 발현은 재조합 단백질을 포함하는 인공입체(inclusion body) 형성을 일으킬 수 있다. 따라서, 활성 또는 보다 활성 물질을 얻기 위해서는 재조합 단백질의 되접기(refolding)가 필요할 수 있다. 세균 봉입체로부터 올바르게 접힌 이중유래 단백질을 얻는 많은 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 일반적으로 봉입체로부터 단백질을 수용화하고, 무질서 유발제를 이용하여 단백질을 완전히 변성시키는 것을 포함한다.

단백질의 일차 아미노산 서열에 시스테인 잔기가 존재하면, 단백질은 이황화 결합의 올바른 형성을 촉진하는 환경(예를 들어, 산화환원계)에서 되접힐 수 있다. 되접기에 관한 일반적인 방법은 Kohno, Meth. Enzym., 185: 187-195 (1990), EP 0433225 및 미국 5,399,677호에 개시되어 있다. Asano et al. (2002) *FEBS Lett.* 528 (1-3): 70-6는 세균 세포에서 제

조된 IL-21의 되접기에 관한 대표적인 방법을 기재하고 있다. 예를 들어, rIL-21(재조합 IL-21)은 *E. coli*에서 불용성 봉입체로 발현되고, 그 후에 수용화되고 (예를 들어, 변성을 이용하여) 산화환원제가 사용된 수정된 투석방법을 이용하여 되접힌다.

IL-21/IL-21R 작용제 단백질 또는 그것의 융합 단백질은 또한 트랜스제닉 동물의 생성물로 (예를 들어, IL-21/IL-21R 작용제 단백질 또는 그것의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 체세포 또는 생식세포에 의해 특징지어지는 트랜스제닉 소, 염소, 돼지, 또는 양의 우유 성분으로서) 발현될 수 있다.

IL-21/IL-21R 작용제 단백질 또는 그것의 융합 단백질은 원하는 단백질을 발현하는데 필요한 배양 조건에서 트랜스포넨 숙주세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 생성된 발현 단백질은 그 후 배지 또는 세포 추출물로부터 정제될 수 있다. IL-21/IL-21R 작용제 단백질 또는 그것의 융합 단백질의 수용성 형태는 적응용 배지(conditioned media)에서 정제될 수 있다. MU-1 단백질의 막-부착 형태는 발현 세포로부터 전체 막 분획을 제조하고, 막을 Triton X-100과 같은 비-이온 계면활성제로 추출함으로써 정제할 수 있다.

IL-21/IL-21R 작용제 단백질 또는 그것의 융합 단백질은 당업자에게 알려진 방법을 이용하여 정제될 수 있다. 예를 들어 IL-21/IL-21R 작용제 단백질은 시중에서 구입할 수 있는 단백질 농축 여과기 예를 들어 AMICON^R 또는 MILLIPORE^R PELLICONTM 초여과(ultrafiltration) 유닛트를 이용하여 농축될 수 있다. 농축 단계 후에, 농축물은 젤 여과 매질과 같은 정제 매트릭스에 적용될 수 있다. 대체적으로 음이온 교환수지(예를 들어, 디에틸아미노에틸(DEAE) 또는 폴리에틸렌이민(PEI) 기를 자기는 매트릭스 또는 기질)가 사용될 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 셀룰로오스 또는 단백질 정제에 일반적으로 채용되는 다른 타입일 수 있다. 대체적으로 양이온 교환 단계가 채택될 수 있다. 적합한 양이온 교환기는 술포프로필 또는 카복시메틸기를 가지는 다양한 불용성 매트릭스를 포함한다. 술포프로필기가 바람직하다 (예를 들어, S-세파로즈^R 컬럼). 배양 상등액으로부터 MU-1 단백질 또는 융합 단백질의 정제는 또한 콘카나발린 A-아가로스, 헤파린-TOYOPEARL^R 또는 시바크롬 블루 3GA 세파로즈와 같은 친화 수지에 대한; 또는 페닐, 에테르, 부틸 에테르 또는 프로필 에테르와 같은 수지를 이용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한; 또는 면역친화(immunoaffinity) 크로마토그래피에 의한 하나 이상의 컬럼 단계를 포함할 수 있다. 마지막으로, IL-21/IL-21R 작용제 단백질을 더 정제하기 위해 소수성 RP-HPLC 매질(예를 들어, 펜던트 메틸 또는 다른 지방족기를 가지는 실리카젤)을 채용하는 하나 이상의 역상 HPLC (RP-HPLC) 단계가 채용될 수 있다. IL-21/IL-21R 작용제 단백질에 대한 항체를 포함하는 친화 컬럼이 또한 공지된 방법으로 사용될 수 있다. 다른 공지된 방법과 다양하게 조합되는 전술한 정제 단계의 일부 또는 전부가 실질적으로 정제되고 분리된 재조합 단백질을 제공하기 위해 채용될 수 있다. 바람직하게는 분리된 IL-21/IL-21R 작용제 단백질은 실질적으로 포유동물 단백질 또는 세균에서 제조되었다면 실질적으로 다른 세균 단백질 (예를 들어, 엔도톡신)이 없도록 정제된다.

다른 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 예를 들어 IL-21R 바람직하게는 포유동물 (예를 들어, 인간 또는 무린) IL-21 또는 IL-21R에 결합하고 IL-21R 활성을 활성화시키는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이다.

여기에 사용된 용어 "항체"는 적어도 하나 바람직하게는 적어도 두개의 중쇄(H) 가변 영역 (VH로 약칭) 및 적어도 하나 바람직하게는 적어도 두개의 경쇄(L) 가변 영역 (VL로 약칭)을 포함하는 단백질을 지칭한다. VH 및 VL 영역은 "골격영역 (FR)"이라고 하는 보다 보존된 구역에 의해 변화가 생기는 "상보성 결정 영역(CDR)"이라고 하는 초가변 영역에 따라 더 분류된다. 골격영역 및 CDR's의 범위는 정확히 정해졌다(여기에 참고로서 포함된 Kabat, E. A., et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917를 참조). 각 VH 및 VL은 세계의 CDR's 및 네개의 FR로 이루어져 있고, 아미노-말단에서 카복시-말단으로 가면서 다음 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

항체는 중쇄 및 경쇄 이뮤노글로블린 사슬을 형성하는 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 각각 더 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 항체는 두개의 중쇄 이뮤노글로블린 사슬 및 두개의 경쇄 이뮤노글로블린 사슬로 된 테트라머이고, 중쇄 및 경쇄 이뮤노글로블린 사슬은 예를 들어 이황화 결합에 의해 내부가 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 세계의 도메인인 CH1, CH2 및 CH3로 이루어져 있다. 경쇄 불변 영역은 한개의 도메인인 CL로 이루어져 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변 영역은 전형적으로 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 작동 세포) 및 전통 보체계의 첫번째 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 항체 결합을 매개한다.

여기에 사용된 용어 "이뮤노글로블린"은 이뮤노글로블린 유전자에 의해 실질적으로 코딩되는 하나 이상의 폴리펩티드로 구성된 단백질을 지칭한다. 인지된 인간 이뮤노글로블린 유전자는 카파, 람다, 알파(IgA1 및 IgA2), 감마(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), 델타, 입실론 및 뮤 불변 영역 유전자, 및 미리아드 이뮤노글로블린 가변 유전자를 포함한다. 전체-길이 이뮤노글로브린 "경쇄"(약 25 Kd 또는 214 아미노산)는 가변 영역 유전자에 의해 NH₂-말단(약 110 아미노산)이 코딩되고, 카파 또는 람다 불변 영역 유전자에 의해 COOH-말단이 코딩된다. 전체-길이 이뮤노글로브린 "중쇄"(약 50 Kd 또는 446 아미노산)는 가변 영역 유전자(약 116 아미노산)에 의해 유사하게 코딩되고, 전술한 다른 불변 영역 유전자의 하나(약 330 아미노산을 코딩)에 의해 코딩된다.

여기에 사용된, "아이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 클래스(예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다.

여기에 사용된, 용어 항체의 "항원-결합 단편" (또는 단순히 "항체 부분" 또는 "단편")은 항원(예를 들어, IL-21R)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 전체-길이 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다.

항체의 "항원-결합 단편"의 범위에 속하는 결합 단편의 예는 다음을 포함한다: (i) Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 단가 단편; (ii) F(ab')₂ 단편, 이황화 결합에 의해 힌지영역에서 연결된 두개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 싱글암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546); 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역 (CDR). 또한, Fv 단편의 두 도메인, VL 및 VH이 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 그들은

재조합 방법을 이용함으로써 그들은 VL 및 VH 영역이 짝을 지어 형성되는 단가 분자인 하나의 단백질 사슬로 만들어 주는 합성링커에 의해 접합될 수 있다(단일 사슬 Fv (scFv)로 알려짐; 예를 들어, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; 및 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883를 참조). 이러한 단일 사슬 항체는 또한 항체의 "항원-결합 단편"의 범위안에 속한다. 이러한 항체 단편은 당업계에 알려진 통상적인 기술을 이용하여 얻을 수 있고, 이용하기 위해 완전한 항체와 같은 방식으로 선별할 수 있다. "사실상 인간" 이뮤노글로블린 가변 영역은 이뮤노글로블린 가변 영역이 정상 인간에서 면역원성 반응을 일으키지 않도록 충분한 수의 인간 골격 아미노산 위치를 포함하는 이뮤노글로블린 가변 영역이다. "사실상 인간" 항체는 항체가 정상 인간에서 면역원성 반응을 일으키지 않도록 충분한 수의 인간 골격 아미노산 위치를 포함하는 항체이다. 인간 및 사실상 인간 이뮤노글로블린 가변 영역 및 항체가 사용될 수 있다.

IL-21/IL-21R 작용제 단백질과 특이적으로 반응하고 IL-21R을 활성화할 수 있는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 얻기 위해, IL-21 또는 IL-21R 단백질은 동물(예를 들어, 비-인간 동물 및 인간 이뮤노글로블린 유전자를 포함하는 비-인간 동물)을 면역화하는데 사용될 수 있다. 이러한 항체는 전체 IL-21/IL-21R 작용제 단백질을 면역원으로 사용하거나 IL-21/IL-21R의 단편을 이용하여 얻을 수 있다. 펩티드 면역원은 카복실 말단에 시스테인 잔기를 추가로 포함할 수 있고, 열쇠구멍 샷갯조개 헤모시아닌 (KLH)로서 합텐에 접합될 수 있다. 티로신 잔기를 술페이트된 티로신 잔기로 치환함으로써 추가 펩티드 면역원을 제조할 수 있다. 이러한 펩티드를 합성하는 방법은 예를 들어, R. P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85,2149-2154 (1963); J. L. Krstenansky, et al., FEBS Lett. 211,10 (1987)처럼 당업계에 공지되어 있다.

IL-21 또는 IL-21R에 대해 지시된 인간 모노클로날 항체(mAbs)는 마우스계 보다는 인간 이뮤노글로블린 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 제조될 수 있다. 관심 항원으로 면역화된 이러한 트랜스제닉 마우스에서 얻은 비 세포 (Splenocyte)는 인간 단백질의 에피토프에 특이적 친화성을 가진 인간 mAbs를 분리하는 하이브리도마를 제조하는데 사용될 수 있다(예를 들어, WO 91/00906, WO 91/10741; WO 92/03918; WO 92/03917; Lonberg, N. et al. 1994 Nature 368: 856-859; Green, L. L. et al. 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S. L. et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855; Bruggeman et al. 1993 Year Immunol 7: 33-40; Tuailon et al. 1993 PNAS 90: 3720-3724; Bruggeman et al. 1991 Eur J Immunol 21: 1323-1326를 참조).

모노클로날 항체는 또한 재조합 DNA 기술 분야의 기술자에게 알려진 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. "결합 항체 디스플레이(combinatorial antibody display)" 방법으로 지칭되는 대체적인 방법이 특정 항원 특이성을 가지는 항체 단편을 분리하고 동정하기 위해 개발되어 왔으며, 모노클로날 항체를 제조하는데 이용될 수 있다(결합 항체 디스플레이에 관한 자세한 사항은 Sastry et al. 1989 PNAS 86: 5728; Huse et al. 1989 Science 246: 1275; 및 Orlandi et al. 1989 PNAS 86: 3833를 참조). 상술한 바와 같이 면역원으로 동물을 면역화한 후에, 생성되는 B-세포 풀의 항체 레퍼토리가 클론되었다. 올리고머 프라이머 및 PCR을 이용함으로써 이뮤노글로블린 분자의 다양한 집단에서 가변 영역의 DNA 서열을 얻는 방법이 일반적으로 알려져 있다. 예를 들어, 5' 선도 (신호 펩티드) 서열 및/또는 골격1 (FR1) 서열에 대응하는 혼합 올리고뉴

클레오티드 프라이머 및 보존된 3'불변 영역 프라이머에 대한 프라이머가 수많은 뮤린 항체로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 PCR 증폭하는데 사용될 수 있다(Larrick et al., 1991, Biotechniques 11: 152-156). 유사한 전략이 또한 인간 항체로부터 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 증폭하는데 사용될 수 있다(Larrick et al., 1991, Methods : Companion to Methods in Enzymology 2: 106-110).

키메라 이뮤노글로블린 사슬을 포함하는 키메라 항체가 당업계에 알려진 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 뮤린(또는 다른 종) 모노클로날 항체 분자의 Fc 불변 영역을 코딩하는 유전자는 뮤린 Fc를 코딩하는 영역을 제거하기 위해 제한 효소로 소화되고, 인간 Fc 불변 영역을 코딩하는 유전자의 균등 부분으로 치환된다(Robinson et al., 국제특허공개 PCT/US86/02269; Akira, et al., 유럽 특허출원 184,187; Taniguchi, M., 유럽 특허출원 171,496; Morrison et al., 유럽 특허출원 173,494; Neuberger et al., 국제출원 WO 86/01533; Cabilly et al. 미국 특허 4,816,567; Cabilly et al., 유럽 특허출원 125,023; Better et al. (1988 Science 240: 1041-1043); Liu et al. (1987) PNAS 84: 3439-3443; Liu et al., 1987, J Immunol. 139: 3521-3526; Sun et al. (1987) PNAS 84: 214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47: 999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314: 446-449; 및 Shaw et al., 1988, J. Natl Cancer Inst. 80: 1553-1559를 참조).

항체 또는 이뮤노글로블린 사슬은 당업계에 공지된 방법으로 인간화(humanize)될 수 있다. 인간화 이뮤노글로블린 사슬을 포함하는 인간화 항체는 항원 결합에 직접 참여하지 않는 Fv 가변 영역의 서열을 인간 Fv 가변 영역의 균등한 서열로 치환함으로써 제조될 수 있다. 인간화 항체를 제조하는 일반적인 방법은 Morrison에 의해 S. L., 1985, Science 229: 1202-1207, Oi et al에 의해 1986, BioTechniques 4: 214 및 Queen et al에 의해 US 5,585,089호, US 5,693,761호 및 US 5,693,762호에 개시되어 있으며, 모든 내용이 여기에 참고로서 포함되었다. 이러한 방법은 중쇄 또는 경쇄의 적어도 하나 종의 이뮤노글로블린 Fv 가변 영역의 전부 또는 일부를 코딩하는 핵산 서열을 분리, 조작 및 발현하는 것을 포함한다. 그러한 핵산의 출처는 당업자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 선결정된 목표에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마로부터 얻을 수 있다. 인간화 항체 또는 그것의 단편을 코딩하는 재조합 DNA는 적절한 발현벡터로 클로닝될 수 있다.

인간화 또는 CDR-이식 항체 분자(또는 이뮤노글로블린)는 이뮤노글로블린 사슬의 한개, 두개 또는 모든 CDR's이 치환될 수 있는 CDR-이식 또는 CDR 치환에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 5,225,539호; Jones et al. 1986 Nature 321: 552-525; Verhoeyan et al. 1988 Science 239: 1534; Beidler et al. 1988 J. Immunol. 141: 4053-4060; Winter US 5,225,539를 참조, 이것의 모든 내용은 참고로서 여기에 포함되었다). Winter는 인간화 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 CDR-이식 방법에 대해 개시하였고(영국 특허출원 GB 2188638A, 1987년 3월 26일 출원; Winter US 5,225,539), 이것의 내용은 참고로서 포함되었다. 특정 인간 항체의 모든 CDR은 적어도 비-인간 CDR의 일부에 의해 치환될 수 있거나 단지 CDR의 일부만이 비-인간 CDR로 치환될 수 있다. 단지, 선결정된 항원에 대한 인간화 항체의 결합에 필요한 수의 CDR을 치환하는 것이 필요하다.

어떤 실시에서, 모노클로날, 키메라 및 인간화 항체는 예를 들어 항체의 다른 부분(예를 들어, 불변 영역)의 결실, 추가 또는 치환에 의해 수정될 수 있다. 예를 들어, 항체는 다음과 같이 수정될 수 있다: (i) 불변 영역의 결실; (ii) 불변 영역을 다른 불변 영역 예를 들어 항체의 반감기, 안정성 또는 친화성을 증가시키는 불변 영역, 다른 종의 불변 영역 또는 다른 항체 클래스의 불변 영역으로 치환; 또는 (iii) 예를 들어, 특히 글리코실레이션 자리, 작동세포 기능, Fc 수용체 (FcR) 결합, 보체 고정을 변경하기 위해 불변 영역의 아미노산을 하나 이상 수정.

항체 불변 영역을 변경하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 변경된 기능 예를 들어 세포상의 FcR 또는 보체의 C1 성분과 같은 작동 리간드에 대한 변경된 친화성을 가지는 항체는 항체의 불변 영역의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 다른 잔기로 치환함으로써 제조될 수 있다(예를 들어, EP 388,151 A1, US 5,624,821 및 US 5,648,260를 참조). 뮤린 또는 다른 종의 이뮤노글로블린에 적용된다면, 이러한 기능을 감소시키거나 없애는 유사한 타입이 변경이 있을 수 있다.

예를 들어, 특정 잔기를 결사슬에 적당한 기능성을 가진 잔기로 치환함으로써, 글루타메이트나 아스파테이트와 같은 하전 기능기 또는 페닐알라니, 티로신, 트립토판 또는 알라닌과 같은 방향족 비-극성 잔기를 도입함으로써 항체(예를 들어, 인간 IgG과 같은 IgG) Fc 영역의 FcR (예를 들어, Fc 감마 R1) 또는 C1q 결합에 대한 친화성을 변경하는 것이 가능하다(예를 들어, US 5,624, 821를 참조).

한 구체예에서, IL-21R의 작용제는 IL-21R 및 다른 수용체 서브유닛 예를 들어 γ_c 와 상호작용하는 약제이다. 예를 들어, 약제는 IL-21R 및 다른 수용체 서브유닛 예를 들어 γ_c 와 상호작용하는 단백질일 수 있다. 이 단백질은 예를 들어 IL-21R과 상호작용하는 하나의 항원 결합 자리 및 γ_c 와 상호작용하는 다른 항원 결합 자리를 포함하는 양특이성 항체일 수 있다. 이러한 단백질의 결합은 수용체를 교차결합하고 작용화하는데 사용될 수 있다(예를 들어, STAT3 또는 STAT5 신호를 활성화하거나 또는 증가시킨다).

한 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제는 예를 들어 IL-21/IL-21R의 하나 또는 양자와 결합하여, IL-21/IL-21R 상호작용을 안정화하는 약제이다(예를 들어, 이뮤노글로블린).

IL-21/IL-21R 단백질의 작용제는 당업계에서 알려진 방법을 이용하여 IL-21R 폴리펩티드에 대한 결합 및/또는 IL-21R 폴리펩티드의 활성화에 대해 스크리닝될 수 있다. 고정되거나 고정되지 않은 바람직한 결합 단백질을 이용한 결합 분석은 당업계에 공지되어 있고, 여기에 기재된 IL-21R 단백질을 이용하여 이러한 목적에 사용될 수 있다. 정제된 세포 기초 또는 단백질 기초 (세포 없음) 스크리닝 분석법이 그러한 작용제 동정에 사용될 수 있다. 예를 들어, IL-21R 단백질은 정제된 형태로 담체에 고정될 수 있고, 정제된 IL-21R 단백질에 대한 결합 또는 잠재적 리간드가 평가될 것이다. IL-21R 활성 STAT3 또는 STAT5 신호를 평가하는 세포-기초 분석법은 공지되어 있다. 실시예가 여기에 기재되어 있다.

약제학적 조성물

IL-21/IL-21R-작용제는 약제학적으로 허용되는 담체와 결합되어 약제학적 조성물로 사용될 수 있다. 그러한 조성물은 IL-21/IL-21R-작용제 및 담체외에 다양한 희석제, 충전제, 염, 완충액, 안정제, 용해화제 및 당업계에 잘 알려진 다른 물질을 포함할 수 있다. 용어 "약제학적으로 허용되는"은 활성 성분의 생물학적 활성의 유효성을 간섭하지 않는 비-독성 물질을 의미한다. 담체의 특성은 투여 경로에 의존한다.

약제학적 조성물은 아래에 자세하게 기재된 다른 항-염증제를 추가로 포함할 수 있다. 그러한 추가 인자 및/또는 약제는 IL-21/IL-21R 작용제와 시너지 효과를 제공하기 위해 또는 IL-21/IL-21R-작용제에 의해 야기되는 부작용을 감소시키기 위해 약제학적 조성물에 포함될 수 있다. 반대로, IL-21/IL-21R 작용제는 항-염증제의 부작용을 감소시키기 위해 특정 항-염증제 제제에 포함될 수 있다.

약제학적 조성물은 IL-21/IL-21R 작용제가 다른 약제학적으로 허용되는 담체외에 수용액에서 미셀, 불용성 단층, 지질 결정 또는 판층(lamella layer)과 같이 응집형으로 존재하는 지질과 같은 양성성 약제와 결합된 리포솜 형태일 수 있다. 리포솜 제제에 적합한 지질은 제한이 없지만 모노글리세리드, 디글리세리드, 술포티드(sulfatide), 리소레시틴(lysolecithin), 인지질, 사포닌, 담즙산 등을 포함한다. 그러한 리포솜 제제의 제조는 당업계의 기술수준에 속하고, 예를 들어 미국 특허 번호 4,235,871호; 미국 특허 번호 4,501,728호; 미국 특허 번호 4,837,028호; 및 미국 특허 번호 4,737,323호에 개시되어 있고, 여기에 참고로 포함되었다.

여기에 사용된, 용어 "치료적으로 유효한 양"은 의미있는 환자 잇점 예를 들어 그러한 질병 증상의 개선, 치료 또는 치료 속도의 증가를 보이는데 충분한 약제학적 조성물 또는 방법의 각 활성 성분의 총량을 의미한다. 각 활성 성분에 적용되면 (단독으로 투여되면), 상기 용어는 그 성분 자체만을 지칭한다. 조합에 적용되는 경우에, 상기 용어는 병용, 연속 또는 동시 투여되었는지와 관계 없이 치료 효과를 나타내는 활성 성분의 조합된 양을 지칭한다.

치료방법 또는 용도를 실시하는 경우에, IL-21/IL-21R-작용제의 치료적으로 유효한 양이 개체 예를 들어 포유동물(예를 들어, 인간)에 투여된다. IL-21/IL-21R 작용제는 단독으로 또는 항-염증제를 채택하는 치료와 같은 다른 치료와 병용하여 투여될 수 있다. 하나 이상의 약제와 함께 투여되는 경우에, IL-21 및/또는 IL-21R 작용제는 두번째 약제와 동시 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적으로 투여되면, 주치의는 다른 약제와 병용되는 IL-21/IL-21R 작용제의 적절한 투여 순서를 결정할 수 있다.

약제학적 조성물에 사용된 IL-21/IL-21R 작용제의 투여 또는 본 발명의 방법을 실시하는 경구(oral ingestion), 두개내, 흡입 또는 피부, 피하조직 또는 정맥내 주입 또는 투여와 같은 다양한 통상적인 방법으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 경막외로 또는 그렇지 않다면 예를 들어 뇌척수액으로 전달될 수 있다.

IL-21/IL-21R-작용제의 치료적으로 유효한 양이 경구 투여된 경우에, 결합제는 정제, 캡슐, 분말, 용액 또는 엘릭시르 형태일 것이다. 정제로 투여되는 경우에, 약제학적 조성물은 젤라틴 또는 보조약(adjuvant)과 같은 고형 담체를 추가로 포함할 수 있다. 정제, 캡슐 및 분말은 약 5 내지 95%의 결합제, 바람직하게는 약 25 내지 95%의 결합제를 포함한다. 액체 형태로 투여하는 경우에, 물, 석유, 땅콩유, 미네랄 오일, 대두유 또는 참깨유와 같은 동물성 또는 식물성 기름, 또는 합성유와 같은 액체 담체가 첨가될 수 있다. 약제학적 조성물의 액체 형태는 생리 식염수, 텍스트로스 또는 다른 당류 용액, 또는 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜을 추가로 포함할 수 있다. 액체 형태로 투여하는 경우에, 약제학적 조성물은 약 0.5 내지 90 중량%의 결합제, 바람직하게는 약 1 내지 50 중량%의 결합제를 포함한다.

IL-21/IL-21R-작용제의 치료적으로 유효한 양이 정맥내, 피부 또는 피하조직 주입에 의해 투여되는 경우에, 결합제는 피로젠이 없는 비경구적으로 허용되는 수용액 형태일 것이다. 적절한 pH, 등장성, 안정성 등을 가지는 그러한 비경구적으로 허용되는 단백질 용액의 제조는 당업계의 기술범위에 있다. 정맥내, 피부 또는 피하조직 주입을 위한 바람직한 약제학적 조성물은 결합제 외에 염화나트륨 주사액, 링게르 주사액, 텍스트로스 주사액, 텍스트로스 및 염화나트륨 주사액, 젯산 링게르 주사액 또는 당업계에 공지된 운반체와 같은 등장성 운반체를 포함해야 한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 안정화제, 보존제, 완충액, 항산화제 또는 당업계에 공지된 다른 첨가제를 포함할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물 중의 IL-21/IL-21R-작용제의 양은 치료 중인 질병의 성질과 경중도 및 환자에 대한 이전 치료의 성질에 의존할 수 있다. 주치의는 각 환자에게 투여되는 작용제의 양을 결정할 수 있다. 처음에, 예를 들어 주치의는 낮은 용량의 결합제를 투여하고, 환자의 반응을 조사할 수 있다. 환자에서 최적의 치료 효과가 얻어질 때까지 또는 사이토카인의 양 또는 하나 이상의 증상을 모니터링함으로써 보다 많은 양의 결합제가 투여될 수 있고, 그 시점에서 투여량은 일반적으로 더 증가하지 않는다. 본 발명의 방법을 실시하는데 사용되는 다양한 약제학적 조성물은 IL-21/IL-21R-작용제를 kg 체중당 약 0.1 μ g 내지 약 100mg을 포함해야 할 것이다. 예를 들어, IL-21/IL-21R-작용제의 유용한 투여량은 kg 체중당 약 10 μ g-1mg, 0.1-5mg 및 3-50mg 사이를 추가로 포함한다.

약제학적 조성물을 이용한 정맥내 투여의 적용시간은 치료하고 있는 질병의 경중도, 조건 및 각 환자의 잠재적 특이 반응에 따라 다양할 수 있다. IL-21/IL-21R-작용제의 각 적용시간은 예를 들어 12 내지 24시간 범위 내의 연속 정맥 투여일 수 있다.

IL-21/IL-21R 작용제가 단백질인 경우에 추가하여, 그러한 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 투여하여 또는 이용하여 질병 또는 장애를 치료하거나 예방할 수 있다(예를 들어, 유전자 치료에서 또는 DNA 도입을 위한 적합한 벡터와 같은).

면역 반응을 증가시키기 위한 IL-21/IL-21R-작용제의 용도

한 측면으로, 본 발명은 개체의 신경계 면역장애(예를 들어, 다발 경화증을 포함하는 신경계 만성성 면역장애)를 치료 또는 예방하는(예를 들어, 치료, 억제, 개선, 지연, 발병의 예방 또는 재발의 예방)방법을 제공한다. 이 방법은 다음을 포함한다: IL-21/IL-21R 작용제를 면역세포 활성화 및/또는 수를 (예를 들어, 사이토카인의 양을 조절 (예를 들어, 사이토카인 발현, 생산 및/또는 발현)) 조절하는데 충분한 양으로 개체에 투여함으로써, 신경계 면역장애 예를 들어 다발 경화증을 치료 또는 예방한다.

다발 경화증(MS)은 염증 및 적합한 신경 기능에 필요하고 신경을 절연하는 미엘린 수초-지방 물질의 손실을 특징으로 하는 중추 신경계 질병이다. IL-21에 의해 매개되는 면역 반응에 의해 발생한 염증은 여기에 기재된 IL-21/IL-21R 작용제로 예방하거나 치료할 수 있다. 다발 경화증에 대한 실험 자가면역 뇌척수염(EAE) 마우스 모델에 관한 실험(Tuohy et al. (J.Immunol). (1988) 141: 1126-1130), Sobel et al. (J.Immunol. (1984) 132: 2393- 2401) 및 Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114-129)에서, EAE 유도 전(및 계속하여)의 마우스에 IL-21을 주입하여 치료한 결과 질병의 증상을 감소시켰다. 따라서, 여기에 기재된 IL-21/IL-21R 작용제는 인간 다발 경화증을 치료 또는 예방하기 위해 유사하게 사용될 수 있을 것이다.

그러한 치료에 적합한 환자는 MS의 진단에 관한 워크샵에서 정해진 MS의 임상적 확정진단 기준에 의해 확인될 수 있다 (Poser et al., Ann. Neurol. 13: 227, 1983). 요약하면, 임상적으로 명확한 MS를 가지는 개체는 두번의 발병(attack) 및 두개의 병변(lesion)의 임상적 증거 또는 한 병변의 임상적 증거 및 다른, 별개 병변의 증세원적(paraclinical) 증거를 가지고 있다. 명확한 MS는 또한 두개의 발병 및 뇌척수액의 IgG의 올리고클로날 밴드에 의해 진단될 수 있고, 또한 발병, 두 병변의 증거 및 뇌척수액의 IgG의 올리고클로날 밴드에 의해 진단될 수 있다. 임상적 가능 MS의 진단을 위해 좀더 낮은 기준이 사용될 수 있다.

다발 경화증의 유효한 치료는 여러 다양한 방법으로 조사될 수 있다. 다음 기준 중의 어느 것을 만족하면 치료는 유효한 것이다. 세가지 기준이 사용된다: EDSS (연장 장애 상태 척도(extended disability status scale)), 악화 양상(appearance of exacerbations) 또는 MRI (자기 공명 영상). EDSS는 MS에 의한 임상 장애를 등급화하는 수단이다(Kurtzke, Neurology 33: 1444,1983). 신경계 장애의 타입 및 심각성에 대해 여덟개의 기능계가 평가된다. 요약하면, 치료 전에 환자는 다음계에서 장애가 평가된다: 피라밋의, 소뇌, 뇌줄기, 감각의, 창자 및 방광, 시각, 뇌 및 다른 것. 추적 검사는 정해진 간격을 두고 행해진다. 척도는 0(정상)에서 10(MS로 사망)의 범위를 갖는다. 한 전체 스텝의 감소는 본 발명의 명세서에서 유효한 치료로 정의된다(Kurtzke, Ann. Neurol. 36: 573-79,1994). 악화는 MS에 기인하고, 적합한 새로운 신경계 이상에 수반되는 새로운 증상의 출현으로 정의된다(IFNB MS Study Group, supra). 추가로, 악화는 적어도 24 시간 지속되어야

하고, 적어도 30일간의 안정 및 개선이 선행되어야 한다. 요약하면, 임상적은 환자에 대해 표준 신경 검사를 행한다. 악화는 신경 평가 척도(neurological rating scale)의 변화에 따라 가벼운, 중간의 또는 심각한 수 있다(Sipe et al., Neurology 34: 1368,1984). 년 악화 비율 및 악화-없는 비율이 결정된다. 이러한 측정을 위해 치료된 그룹과 위약 그룹간의 악화-없는 환자의 비율 또는 부분에 있어 통계학적으로 유의한 차이가 있다면 치료는 유효한 것이다. 추가로, 첫번째 악화 시기 및 악화 지속시간 및 심각성은 또한 측정될 수 있다. 이와 관련하여, 컨트롤 그룹과 대비하여 치료된 그룹에서 첫번째 악화 시기 또는 악화 지속시간 및 심각성에서 통계학적으로 유의한 차이가 치료 유효성의 기준(measure)이다.

MRI는 가돌리늄-DTPA-증가 영상(McDonald et al. Ann. Neurol. 36: 14, 1994)을 이용하여 활성 환부를 측정하는데 사용되고, 또는 T2-웨이트드(weighted) 기술을 이용하여 환부의 위치 및 정도를 측정하는데 사용될 수 있다. 요약하면, 기준선 MRI가 얻어진다. 동일한 영상 평면 및 환자 위치가 각각의 후속 연구에 위해 사용된다. 배치 및 영상 순서는 환부 검출을 최대화하고, 환부 추적을 촉진하도록 선택될 수 있다. 동일한 배치 및 영상 순서가 뒤의 연구에 사용될 수 있다. MS 환부의 존재, 위치 및 정도가 방사선 의사에 의해 결정될 수 있다. 환부 영역은 윤곽이 잡히고, 총 환부 면적을 계산하기 위해 얇게 썬 조각들은 합쳐질 수 있다. 세가지 분석이 행해질 수 있다: 새로운 환부에 관한 증거, 활성 환부의 발생 비율, 환부 영역의 퍼센트 변화(Paty et al., Neurology 43: 665,1993). 치료에 기인한 개선은 기준선과 대비한 또는 위약 그룹에 대한 치료 그룹의 각 환자의 통계학적으로 유의한 개선에 의해 확인될 수 있다.

다발 경화증과 연관된 대표적 증상은 다음을 포함한다: 시각 신경염, 겹보임, 눈떨림, 안구운동 조절이상, 신경핵사이 눈근육마비, 운동 및 소리 섬광시(phosphenes), 구심성 동공운동장애, 불완전마비, 홑팔다리마비, 하반신마비, 반불완전마비, 꼬드라파레스시스(quadruparesis), 눈근육마비, 양측마비, 편마비, 사지마비, 콰드라플레지아(quadruplegia), 경직, 말더듬증, 근 위축, 스파즘(spasms), 경련, 근육긴장저하, 클로누스, 간대성근경련증, 근육잔떨림, 하지불편증후군, 발치짐, 기능장애 반사, 착각각, 아나에스테시아(anaesthesia), 신경통, 신경병 및 신경성 고통, 아이'헤르미테스(I'hermitte's), 고유감각 기능장애, 삼차신경통, 조화운동불능, 활동떨림, 운동거리조절이상, 전정성 운동실조, 현기증, 언어실조증(speech ataxia), 근육긴장이상, 되풀이운동장애, 빈뇨(frequent micturation), 방광경직, 방광이완, 배뇨근조임근협동장애, 발기기능장애, 이상성감증, 불감증, 변비, 대변 절박, 대변실금, 우울증, 인지 기능장애, 치매, 기분동요, 감정 불안정성, 다행증, 양극성 증후군, 불안, 언어상실증, 언어장애, 피로, 우토프 증후군, 위식도 역류, 및 수면장애.

예방이 필요한 후보 환자는 유전적 요인의 존재에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, MS 환자의 대부분은 HLA-타입 DR2a 및 DR2b를 가진다. MS에 대한 유전적 경향을 가지며 치료에 적합한 MS 환자는 두 그룹으로 나누어진다. 첫번째는 재발 완화 타입의 초기 질병을 가진 환자이다. 엔트리 기준은 1년 보다 많은 질병 지속시간, 1.0 내지 3.5의 EDSS 점수, 0.5/년 보다 많은 악화 속도 및 연구 전 2달간 임상적 악화되지 않았음을 포함한다. 두번째 그룹은 과거 2년 동안 1.0 EDSS 단위/년 보다 큰 질병 진행을 가지는 사람을 포함한다. 예방에 간한 후보 환자는 사이토카인 패러미터를 예를 들어 IL-10 또는 IL-21 패러미터를 평가함으로써 확인될 수 있다.

본 발명의 명세서에서 IL-21/IL-21R 작용제의 유효성은 다음 기준에 따라 판단한다: 한계 회색으로 결정된 MBP 반응성 T 세포의 빈도, MBP 반응성 T 세포주 및 클론의 증식 반응, 환자로부터 확립된 MBP에 대한 T세포주 및 클론의 사이토카인 프로파일. 유효성은 반응성 세포의 빈도 감소, 자연 펩티드에 비해 변경된 펩티드의 티미딘 편입 감소 및 TNF와 IFN- α 의 감소에 의해 정해진다. 임상 측정은 1년 또는 2년 간격의 재발 비율 및 EDSS 1.0 단위를 기준선으로 6개월간 계속된 시간 진행을 가지는 EDSS에서의 변화를 포함한다. Kaplan-마이어(Kaplan-Meier) 곡선에서, 장애의 지속된 진행의 지연은 유효성을 나타낸다. 다른 기준은 MRI의 T2 영상의 영역 및 양의 변화를 포함하고, 가돌리늄 증가 영상에 의해 결정된 환부의 수 및 양을 포함한다.

한 구체예에서, IL-21/IL-21R 작용제 예를 들어 그것의 약제학적 조성물은 병용요법으로 투여된다(즉, 다른 약제 예를 들어 뇌의 면역 및 염증 장애(예를 들어, 다발 경화증)와 같은 질병 또는 장애를 치료하는데 유용한 치료제와 병용하여 투여된다). 명세서 내의 용어 "병용하여"는 약제를 실질적으로 동일한 시기에 (동시 또는 순차적으로) 투여하는 것을 의미한다. 만약 순차적으로 투여된다면, 바람직하게는 두번째 화합물의 투여시에 두 화합물 중 첫번째 화합물이 치료 부위에서 유효 농도로 검출될 수 있어야 한다.

예를 들어, 병용요법은 하나 이상의 추가 치료제와 (예를 들어, 여기에 자세하게 기재되는 하나 이상의 사이토카인 및 성장 인자 억제제, 면역 억제제, 항-염증제, 대사 억제제, 효소 억제제, 및/또는 세포 독성제 또는 세포증식 억제제) 함께 조제되거나 및/또는 함께 투여되는 하나 이상의 IL-21/IL-21R 작용제를 (예를 들어, IL-21 폴리펩티드 또는 융합 단백질, 펩티드 작용제, 항체 작용제 또는 저분자 작용제) 포함할 수 있다. 또한, 여기에 기재된 하나 이상의 IL-21/IL-21R 작용제는 여기에 기재된 둘 이상의 치료제와 병용하여 사용될 수 있다. 그러한 병용요법은 치료제를 적은 용량으로 사용할 수 있는 잇점이 있으므로, 다양한 단일요법과 연관된 가능한 독성 및 합병증을 필할 수 있다. 더욱이, 여기에 개시된 치료제는 IL-21/

IL-21R 수용체 경로와 작용 경로가 상이하므로 IL-21/IL-21R 작용제의 효과를 증가 및/또는 시너지할 것으로 예측된다. IL-21/IL-21R 작용제와 병용하여 사용되는 바람직한 치료제는 자가면역 및 이어지는 염증 반응의 다른 단계에 작용하는 약제이다.

IL-21-/IL21R 작용제와 병용하여 다발 경화증을 치료하거나 예방하는 약제의 비-제한적인 예는 다음을 포함한다: 인터페론 예를 들어 인터페론-베타-1 α (예를 들어, AVONEXTM; Biogen) 및 인터페론-1 β (BETASERONTM; 17번 위치에서 치환된 인간 인터페론 β ; Berlex/Chiron); 글라티라머 아세테이트 (또한, Copolymer 1, Cop-1 ; COPAXONETM; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.라고도 부름); 고압산소; 정맥내 이뮤노글로블린(intravenous immunoglobulin); 클라브리빈(clabribine); 여기에 기재된 TNF 길항제; 코르티코스테로이드; 프레드니솔론; 메틸프레드니솔론; 아자티오프린; 시클로포스파미드; 시클로스포린; 메토틱렉세이트; 4-아미노피리딘; 및 티자니딘. IL-21-/IL21R 작용제와 병용하여 사용될 수 있는 추가적인 길항제는 다른 인간 사이토카인 또는 성장 인자에 대한 항체 또는 다른 인간 사이토카인 또는 성장 인자의 길항제를 포함하고, 예를 들어 TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL- 16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF 및 PDGF가 있다. 여기에 기재된 IL-21 작용제는 CD2,CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 또는 그들의 리간드와 같은 세포 표면 분자에 대한 항체와 병용될 수 있다. IL-21 작용제는 또한 메토틱렉세이트, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil), 레플루노미드, NSAIDs, 예를 들어, 이부프로펜, 프레드니솔론과 같은 코르티코스테로이드, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 작용제, 항혈전제, 보체 억제제, 아드레날린성약, 여기에 기재된 전염증성 사이토카인에 의한 신호전달에 작용하는 약제, IL-1 β 전환 효소 억제제 (예를 들어, Vx740), 항-P7s, PSGL, TACE 억제제, T-세포 신호 억제제 (여기에 기재된, 키나아제 억제제, 금속 단백질분해효소 억제제, 술파살라진, 아카틀로프린(azathloprine), 6-머갑토피린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 수용성 사이토카인 수용체 및 그것의 유도체와 같은) 및 항-염증성 사이토카인 (예를 들어, IL-4,IL-10, IL-13 및 TGF).

IL-21-/IL21R 작용제와 병용하여 다발 경화증을 치료하거나 예방하는 치료제의 예는 다음을 포함한다: 인터페론 예를 들어 인터페론- β 예를 들어 인터페론 β -1 α 및 인터페론 β -1 β ; 글라티라머 아세테이트 (예를 들어, COPAXONETM), 코르티코스테로이드, IL-1 억제제, TNF 억제제, CD40 리간드와 CD80에 대한 항체 및 IL-12 길항제. 추가적인 예는 MS의 하나 이상의 증상 또는 부작용을 치료하는데 사용될 수 있는 약제를 포함하고, 예를 들어 아만타딘, 바클로펜(baclofen), 미네칼 오일, 파파베린, 메클리진, 히드록시진, 술파메톡사졸, 시프로프록사신, 도쿠사테(docusate), 시프로프록사신, 페몰린, 단트롤렌, 데스모프레신, 데스모프레신, 텍사메타존, 프레드니손, 톨테로딘(tolterodine), 페니토인, 옥시부티닌 (확장된 방출 제제), 비사코딜, 벤라팍신, 아미트리프틸린, 도쿠사테 변 연화 설사제(docusate stool softener laxative), 인산 나트륨, 메테나민, 바클로펜 (경막내), 클로나제팜, 이소니아지드, 바르테나필, 니트로푸란토인, 실리엄 소수성 무실로이드, 알프로스타딜, 가바펜틴, 미톡산트론, 옥시부티닌, 노르트리프틸린, 파록세틴, 마그네슘 하이드록시드, 프로판텔린 브로바이드, 알프로스타딜, 모다피닐, 플루옥세틴, 페나조피리딘, 글리세린, 메틸프레드니솔론, 카바마제핀, 이미프라민, 디아제팜, 실테나필, 부프로피온, 티자니딘 및 세르트랄린.

이러한 약제의 예는 IL-12(바람직하게는 인간 IL-12)에 결합하는 키메라, 인간화, 인간 또는 인 비트로 제조된 항체(또는 그것의 항원-결합 단편)와 같은 IL-12 길항제를 포함하고, 예를 들어 WO 00/56772, Genetics Institute/BASF에 개시된 항체; IL-12 수용체 억제제, 예를 들어, 인간 IL-12 수용체에 대한 항체; 및 IL-12 수용체의 수용성 단편, 예를 들어, 인간 IL-12 수용체가 있다. IL-15 길항제의 예는 IL-15 또는 그것의 수용체에 대한 항체(또는 그것의 항원-결합 단편)를 포함하고, 예를 들어, 인간 IL-15 또는 그것의 수용체에 대한 키메라, 인간화, 인간 또는 인 비트로 제조된 항체, IL-15 수용체의 수용성 단편 및 IL-15-결합 단백질이 있다. IL-18 길항제의 예는 항체를 포함하고, 예를 들어, 인간 IL-18에 대한 키메라, 인간화, 인간 또는 인 비트로 제조된 항체(또는 그것의 항원-결합 단편), IL-18 수용체의 수용성 단편 및 IL-18-결합 단백질이 있다(IL-18BP, Mallet et al. (2001) Circ. Res. 28). IL-1 길항제의 예는 Vx740, IL-1 길항제와 같은 인터루킨-1-전환 효소 (ICE) 억제제를 포함하고, 예를 들어 IL-1RA (ANIKINRA, AMGEN),sIL1RII (Immunex), 및 항-IL-1 수용체 항체 (또는 그것의 항원-결합 단편)가 있다.

TNF 길항제의 예는 TNF(예를 들어, 인간 TNF)에 대한 키메라, 인간화, 인간 또는 인 비트로 제조된 항체(또는 그것의 항원-결합 단편)를 단편을 포함하고, 예를 들어 D2E7 (인간 TNF α 항체, U.S. 6,258,562호; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (인간화 항-TNF α 항체; Celltech/Pharmacia), cA2 (키메라 항-TNF α 항체; RemicadeTM, Centocor); 항-TNF 항체 단편 (예를 들어, CPD870); TNF 수용체의 수용성 단편, 예를 들어 p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 그것의 유도체, 예를 들어 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질, ENBRELTM; Immunex ; 예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1994) Vol. 37, S295 ; J. Invest. Med. (1996) Vol. 44, 235A를 참조), p55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF 수용체-IgG 융합 단백질(LENERCEPTTM)); 효소 길항제, 예를 들어 TNF α 전환효소 (TACE) 억제제 (예를 들어

어, 알파-술포닐 히드록사믹 에시드 유도체, WO01/55112, 및 N-하이드록시포름아미드 TACE 억제제 GW 3333, -005, 또는 -022; 및 TNF-bp/s-TNFR (수용성 TNF 결합 단백질; 예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284; Amer. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology (1995) Vol. 268, pp. 37-42를 참조)이 있다. 바람직한 TNF 길항제는 TNF 수용체의 수용성 단편이고, 예를 들어 p55 또는 p75 인간 TNF 수용체 또는 그것의 유도체 예를 들어 75 kdTNFR-IgG, 및 TNFa 전환효소 (TACE) 억제제가 있다.

다른 구체예에서, 여기에 기재된 IL-21-/IL21R 작용제는 다음 중의 하나 이상과 병용 투여될 수 있다: IL-13 길항제 예를 들어 수용성 IL-13 수용체(sIL-13) 및/또는 IL-13에 대한 항체; IL-2 길항제 예를 들어 DAB 486-IL-2 및/또는 DAB 389-IL-2 (IL-2 용합 단백질; Seragen; 예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1993) Vol. 36,1223를 참조), 및/또는 IL-2R에 대한 항체, 예를 들어 항-Tac (인간화 항-IL-2R; Protein Design Labs, Cancer Res. 1990 Mar 1; 50 (5): 1495-502). 다른 조합은 비-결핍(depleting) 항-CD4 억제제(IDEC-CE9.1/SB 210396 (비-결핍 영양류화 항-CD4 항체; IDEC/SmithKline)와 병용되는 IL-21 길항제를 포함한다. 다른 바람직한 조합은 항체, 수용성 수용체 또는 길항 리간드를 포함하는 공-자극 경로 CD80 (B7.1) 또는 CD86 (B7.2)의 길항제; 및 p-셀렉틴 당단백질 리간드 (PSGL), 항-염증성 사이토카인, 예를 들어 IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; 제조합 IL-10 DNAX/Schering); IL-13과 TGF, 및 그것의 작용제 (예를 들어, 작용 항체)를 포함한다.

다른 구체예에서, 하나 이상의 IL-21-/IL21R 작용제가 하나 이상의 항-염증성 의약, 면역 억제제, 대사 억제제 또는 효소 억제제와 함께 조제되거나 및/또는 함께 투여될 수 있다. 여기에 기재된 IL-21 작용제와 병용되어 사용될 수 있는 의약 또는 억제제의 비-제한적인 예는 이제 한정되지는 않으나 다음 중의 하나 이상을 포함한다: 비-스테로이드계 항-염증성 의약 (NSAIDs), 예를 들어 이부프로펜, 테니답 (예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S280를 참조), 나프록센 (예를 들어, Neuro Report (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213를 참조), 멜록시캄, 피록시캄, 디클로페낙 및 인도메타신; 술파살라진 (예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281를 참조); 프레드니솔론과 같은 코르티코스테로이드; 사이코카인 억제 항-염증성 의약 (CSAIDs); 뉴클레오타이드 생합성 억제제, 예를 들어 푸린 생합성 억제제, 엽산 길항제 (예를 들어, 메토틱세이트(N-[4-[(2,4-디아미노-6-프테리딜)메틸]메틸아미노]벤조일]-L-글루탐산); 및 피리미딘 생합성 억제제, 예를 들어 디하이드로오로테이트 탈수소효소 (DHODH) 억제제, 예를 들어 레플루노미드 (예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S131; Inflammation Research (1996) Vol. 45, pp. 103-107를 참조). IL-21/IL-21R 길항제와 병용하여 사용되는 바람직한 치료제는 NSAIDs, CSAIDs, (DHODH) 억제제 (예를 들어, 레플루노미드), 및 엽산 길항제 (예를 들어, 메토틱세이트)를 포함한다.

추가 억제제의 예는 다음 중의 하나 이상을 포함한다: 코르티코스테로이드 (경구, 흡입 및 국소 주입); 면역 억제제, 예를 들어 시클로스포린, 타크롤리무스 (FK-506); 및 mTOR 억제제, 예를 들어 시롤리무스 (라파마이신) 또는 라파마이신 유도체, 예를 들어 수용성 라파마이신 유도체 (예를 들어, 에스테르 라파마이신 유도체, 예를 들어 CCI-779 (Elit. L. (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3 (8): 1249-53; Huang, S. et al. (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3 (2): 295-304); TNFa 또는 IL-1과 같이 전염증성 사이토카인에 의한 신호전달을 방해하는 약제 (예를 들어, IRAK, NIK,IKK, p38 또는 MAP 키나아제 억제제); COX2 억제제, 예를 들어 셀레콕시브 및 그것의 변이체, MK-966 (예를 들어 Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S81를 참조); 포스포디에스테라제 억제제, 예를 들어 R973401 (포스포디에스테라제 타입 IV 억제제; 예를 들어, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282를 참조); 포스포리파제 억제제, 예를 들어 세포질 포스포리파제 2 (cPLA2) 억제제 (예를 들어, 트리플루오로메틸 케톤 유사체 (U.S. 6,350,892호)); 혈관 내피세포 성장인자 또는 성장인자 수용체의 억제제, 예를 들어 VEGF 억제제 및/또는 VEGF-R 억제제; 및 혈관형성 억제제. IL-21/IL-21R 길항제와 병용 사용되는 바람직한 치료제는 다음중의 하나 이상을 포함한다: 면역 억제제, 예를 들어 시클로스포린, 타크롤리무스 (FK-506); 및 mTOR 억제제, 예를 들어, 시롤리무스 (라파마이신) 또는 라파마이신 유도체, 예를 들어 수용성 라파마이신 유도체 (예를 들어, 에스테르 라파마이신 유도체, 예를 들어 CCI-779); COX2 억제제, 예를 들어 셀레콕시브 및 그것의 변이체; 및 포스포리파제 억제제, 예를 들어 세포질 포스포리파제 2 (cPLA2) 억제제 (예를 들어, 트리플루오로메틸 케톤 유사체).

IL-21/IL-21R 길항제와 병용 사용될 수 있는 치료제의 추가예는 다음 중의 하나 이상을 포함한다: 6-머캅토프린 (6-MP); 아자티오프린 술파살라진; 메살라진; 올살라진 클로로퀸/하이드록시클로로퀸; 펜실라민; 아우로티오르날레이트(aurothiornalate) (근육내 및 경구); 아자티오프린; 코키신(cochicine); 베타-2 아드레노수용체 작용제 (salbutamol, terbutaline, salmeteral); 잔틴(xanthine) (테오필린, 아미노필린); 크로모글리케이트(cromoglycate); 네도크로밀; 케토티펜; 이프라트로피움 및 옥시트로피움; 마이코페놀레이트 모페틸; 아데노신 작용제; 항혈전제; 보체 억제제; 및 아드레날린성 약제.

본 발명의 또다른 측면은 따라서 IL-21/IL21R 길항제와 다른 치료 화합물의 병용 투여를 수행하기 위한 키트에 관한 것이다. 한 구체예에서, 키트는 약제학적 담체에 조제된 하나 이상의 결합제 및 하나 이상의 별개 약제학적 제제로 적절하게 조제된 적어도 하나의 약제 예를 들어 치료제를 포함한다.

사이토카인의 수준을 평가하는 분석법

샘플 또는 개체에서 사이토카인 수준을 평가하기 위해 어떤 표준 분석법도 사용할 수 있다. 예를 들어, 샘플은 개체에서 얻을 수 있고, 또는 배양 세포를 포함할 수 있다. 대표적인 샘플은 하나 이상의 세포, 조직, 체액 (혈액, 뇨, 림프액, 뇌척수액 또는 양수와 같은), 배양 세포 (예를 들어, 조직 배양 세포), 구강 면봉채취, 양치물, 변, 조직 슬라이스 및 생검 물질(예를 들어, 흡인생검)로부터 얻거나 유래될 수 있다.

사이토카인 수준을 평가하는 방법은 관심 사이토카인(예를 들어, IL-10 또는 IL-21)을 코딩하는 mRNA 또는 cDNA을 검출하기 위한 핵산 평가 또는 사이토카인 자체를 검출하기 위한 단백질 평가를 포함한다. 핵산은 예를 들어 RT-PCR (예를 들어, 정량 PCR) 또는 핵산 마이크로어레이(microarray)를 이용하여 평가될 수 있다. 단백질은 예를 들어 질량분석기 또는 면역분석을 이용하여 평가될 수 있다.

ELISA는 면역분석의 편리한 형태를 제공한다. 예를 들어, Biosource International, Camarillo CA은 < 0.2 pg/ml의 감도로 IL-10을 검출할 수 있고, < 2 pg/ml의 감도로 IL-12를 검출할 수 있는 시약을 제공한다. 유사하게, R&D Systems은 < 8 pg/ml의 감도로 IFN- γ 를 검출하고, < 7 pg/ml의 감도로 TGF- β 1을 검출하는 시약을 제공한다.

SEARCHLIGHTTM Proteome Array System (Pierce, Boston Technology Center)는 한번에 복수의 사이토카인을 평가하기 위한 종합적인 시약을 제공한다.

이러한 방법은 IL-21/IL-21R 작용제 투여를 평가하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 그러한 작용제가 사이토카인(예를 들어 IL-10 또는 IFN γ)의 수준에서 통계학적으로 유의한 변화를 야기하는지를 결정하기 위해, 또는 예를 들어 정상 범위에 있는 사이토카인(예를 들어 IL-10 또는 IFN γ)의 수준에 대해 허용가능한 변화를 야기하는지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 평가로부터 얻은 정보는 작용제의 투여량을 조절하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, IL-10의 수준이 정상 개체의 범위 내로 증가하지 않았다면, 예를 들어 투여량 또는 투여횟수를 늘림으로써 작용제의 투여량을 늘릴 수 있다. 역으로, IL-10의 수준이 바람직한 범위보다 많아졌다면, 예를 들어 투여량 또는 투여횟수를 줄임으로써 작용제의 투여량을 줄일 수 있다.

면역 활성화제로서의 IL-21/IL21R 작용제 활성을 평가하는 분석법

면역계의 활성화제로서의 IL-21/IL21R 작용제의 활성은 무엇보다도 다음 방법을 이용하여 측정될 수 있다:

가슴샘 세포 또는 비 세포 세포독성에 대한 적합한 분석법은 제한이 없지만 다음에 기재된 것을 포함한다: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 2488-2492, 1981; Herrmann et al., J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handa et al., J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Herrmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 2488-2492, 1981; Herrmann et al., J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handa et al., J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bowman et al., J. Virology 61: 1992-1998; Takai et al., J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Bertagnoli et al., Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Brown et al., J. Immunol. 153: 3079-3092, 1994.

T-세포-의존 이뮤노글로블린 반응 및 아이소타입 스위칭에 대한 분석법(무엇보다도, T-세포 의존 항체 반응을 매개하고 Th1/Th2 프로파일에 영향을 주는 단백질을 동정한다)은 제한이 없지만 다음에 기재된 것을 포함한다: Maliszewski, J. Immunol. 144: 3028-3033, 1990; 및 Assays for B cell function: In vitro antibody production, Mond, J. J. and Brunswick, M. In Current Protocols in Immunology. J. E.e.a. Coligan eds. Vol1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

혼합 림프구 반응 (MLR) 분석법(무엇보다도, Th1 및 CTL 반응을 우세하게 생성하는 단백질을 동정한다)은 제한이 없지만 다음에 기재된 것을 포함한다: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Bertagnolli et al., J. Immunol. 149: 3778-3783, 1992.

가지세포-의존 분석법(무엇보다도, 자연 T-세포를 활성화시키는 가지세포에 의해 발현되는 단백질을 동정한다)은 제한이 없지만 다음에 기재된 것을 포함한다: Guery et al., J. Immunol. 134: 536-544, 1995; Inaba et al., Journal of Experimental Medicine 173: 549-559, 1991; Macatonia et al., Journal of Immunology 154: 5071-5079, 1995; Porgador et al., Journal of Experimental Medicine 182: 255-260, 1995; Nair et al., Journal of Virology 67: 4062-4069, 1993; Huang et al., Science 264: 961-965, 1994; Macatonia et al., Journal of Experimental Medicine 169: 1255-1264, 1989; Bhardwaj et al., Journal of Clinical Investigation 94: 797-807, 1994; 및 Inaba et al., Journal of Experimental Medicine 172: 631-640, 1990.

림프구 생존/세포사멸에 대한 분석법(무엇보다도, 초항원 도입 후에 세포사멸을 방지하는 단백질 및 림프구 항상성을 조절하는 단백질을 동정한다)은 제한이 없지만 다음에 기재된 것을 포함한다: Darzynkiewicz et al., Cytometry 13: 795-808, 1992; Gorczyca et al., Leukemia 7: 659-670, 1993; Gorczyca et al., Cancer Research 53: 1945-1951, 1993; Itoh et al., Cell 66: 233-243, 1991; Zacharchuk, Journal of Immunology 145: 4037-4045, 1990; Zamai et al., Cytometry 14: 891-897, 1993; Gorczyca et al., International Journal of Oncology 1: 639-648, 1992.

T-세포 참가 및 발달 초기 단계에 영향을 주는 단백질에 대한 분석법은 제한이 없지만 다음에 기재된 것을 포함한다: Antica et al., Blood 84: 111-117, 1994; Fine et al., Cellular Immunology 155: 111-122, 1994; Galy et al., Blood 85: 2770-2778, 1995; Toki et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88: 7548-7551, 1991.

STAT의 활성을 평가하기 위한 분석법은 예를 들어 Gilmour et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10772-10776에 기재되어 있다. 예를 들어, 평가된 세포는(예를 들어, 작용제 또는 작용제 후보로 처리된 세포) 용해될 수 있고, 티로신 포스폴리레이티드 단백질은 항-포스포티로신 항체와 함께 면역침강될 수 있다. 그 후, 침강된 물질은 신호 전달 분에 특이적인 항체(예를 들어, STAT(예를 들어, STAT5)에 대한 항체)를 이용하여 평가될 수 있다.

사이토카인 생산 및 세포 증식/분화에 관한 매개자로서의 IL-21/IL21R 작용제 활성을 측정하는 분석법

사이토카인 생산 및 세포 증식/분화에 관한 매개자로서의 IL-21/IL21R 작용제 활성은 제한되지는 않으나 다음을 포함하는 세포주에 대한 수많은 일상 인자 의존 세포 증식 분석법(routine factor dependent cell proliferation assay) 중의 어느 하나를 이용하여 시험될 수 있다: 32D, DA2, DAIG, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e 및 CMK.

T-세포 또는 가슴샘 세포 증식에 대한 분석법은 제한이 없으나 다음에 기재된 것을 포함한다: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bertagnolli et al., J. Immunol. 145: 1706-1712, 1990; Bertagnolli et al., Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Bertagnolli, et al., J. Immunol. 149: 3778-3783, 1992; Bowman et al., J. Immunol. 152: 1756-1761, 1994.

사이토카인 생산 및/또는 비 세포, 림프절 세포 또는 가슴샘 세포의 증식에 대한 분석법은 제한이 없으나 다음에 기재된 것을 포함한다: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A. M. and Shevach, E. M. In Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto. 1994; 및 Measurement of mouse and human Interferon gamma, Schreiber, R. D. In Current Protocols in Immunology. J. Coligan eds. Vol1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

조혈세포와 림프구 생성세포의 증식 및 분화에 대한 분석법은 제한이 없으나 다음에 기재된 것을 포함한다: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. In Current Protocols in Immunology. J. Coligan eds. Vol1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; deVries et

al., J. Exp. Med. 173: 1205-1211, 1991; Moreau et al., Nature 336:690-692, 1988; Greenberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2931-2938, 1983; Measurement of mouse and human interleukin 6-Nordan, R. In Current Protocols in Immunology. J. E.e.a. Coligan eds. Vol1 pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 1857-1861, 1986; Measurement of human Interleukin11-Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. E.e.a. Coligan eds. Vol1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Measurement of mouse and human Interleukin 9-Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto. 1991.

항원에 대한 T-세포 클론 반응 분석법(무엇보다도, APC-T 세포 상호작용에 영향을 미치고, 증식 및 사이토카인 생산을 조화시킴으로써(measuring) T-세포 작동을 지시하는 단백질을 동정한다)은 제한이 없지만 다음에 기재된 것을 포함한다: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function; Chapter 6, Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 6091-6095, 1980; Weinberger et al., Eur. J. Immun. 11: 405-411, 1981; Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140: 508-512, 1988.

도면의 간단한 설명

도 1a는 뮤린 IL-21 20ng/ml 존재하에 다양한 희석 조건에서 배양된 림프절 세포의 증식 증가를 나타내는 선형 그래프이다. 예를 들어, 1 : 50 희석에서, IL-21은 펩티드 단독으로 자극한 세포와 비교하여 림프절 세포의 증식 증가를 야기하였다.

도 1b는 단지 단백질지질 단백질 (PLP) 1 μ g/ml로 처리한 세포와 비교하여 지정 농도의 (ng/ml) 뮤린 IL-21 및 PLP 1 μ g/ml에서 배양한 PLP 트랜스제닉 마우스의 T 세포 증식 증가를 나타내는 선형 그래프이다. 이 그래프는 IL-21이 PLP 트랜스제닉 마우스에서 T 세포 증식을 유발하는 것을 보인다.

도 2는 미처리 세포와 비교하여 지정 농도의 마우스 IL-21의 존재하에 IL-10의 분비 증가를 나타내는 막대 그래프이다. 반응은 포화되었고, IL-21의 시험농도 중 가장 높은 농도에서 (25 ng/ml) 세포는 콘트롤 그룹보다 약 2.5배 많은 IL-10을 생산하였다. IL-10 증가량의 생산은 IL-21 처리가 항원-특이적 세포를 Th2 프로파일(profile)로 치우치게 할 수 있음을 제시한다.

도 3은 콘트롤 세포와 비교하여 지정농도의 뮤린 IL-21로 처리된 지라 세포 및 림프절 세포에 의한 IFN β 의 분비 감소를 나타내는 막대 그래프이다. 면역화된 마우스의 MOG 33-35-자극 지라 세포에 대한 IL-21의 첨가는 IFN β 를 두배 감소시켰고, IL-21R의 첨가는 두배 증가시켰다.

도 4는 EAE 모델에서 질병의 임상 증상이 감소한 것을 나타낸다. 도는 IL-21이 IFN β 를 억제하고, IL-10을 강화함을 보여준다. 도 4는 미처리 배양과 비교한 IL-21-처리 PLP 지라 세포에서 검출되는 EAE 증상의 감소를 인 비보 전이 후의 일수에 대해 나타낸 선형 그래프이다.

도 5는 EAE 모델에서 질병의 임상 증상이 감소한 것을 나타낸다. 도는 콘트롤 마우스와 대비하여 낮은 양 (100 ng/day) 또는 높은 양의 (1 μ g/day) 뮤린 IL-21로 처리한 마우스에서 EAE의 심각성이 감소되는 것을 나타내는 막대 그래프이다.

실시예

다음의 비-제한적인 실시예에서, 우리는 특히 IL-21이 EAE 마우스에서 부분 보호를 일으키는 것에 대해 설명한다

실시예 : IL-21은 EAE 마우스에서 부분 보호를 일으킨다.

시약

마우스

C57BL/6 암컷 마우스 및 SJL/J 암컷 마우스를 Jackson Laboratory에서 얻었다. 동물을 AAALAC-인증 배리어 시설에 수용하고, 기생충, 세균성 및 바이러스성 병원체에 대해 모니터링하였다. 모든 마우스는 8-10 주령에 사용되었다.

증식 반응

마우스 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG)₃₅₋₅₅ 펩티드를 접종한 C57BL/6 암컷 마우스로부터 림프절 세포를 면역화하고 20일 후에 수확하였다. 세포는 10% 소태아혈청(FCS)을 함유하는 돌베코의 수정된 Eagle's Media (DME)에서 배양되었다. 세포를 MOG₃₅₋₅₅ 펩티드(25 μ g/ml)로 재자극하고, 96-웰 미량 역가판의 평평한 바닥에서 묶린 IL-21의 존재하에 또는 부존재하에 배양하였다. 72 시간 후에, 웰당 0.5 uCi로 적정된 티미딘으로 판을 펄스(pulse)하고, 4 내지 6 시간 동안 성장시켰다. 세쌍의 웰에서 DNA에 편입된 티미딘의 평균양을 섬광 계수기로 측정하였다.

사이토카인 정량

면역화된 마우스에서 유래된 림프절 세포를 25 μ g/ml의 MOG₃₅₋₅₅ 펩티드로 인 비트로 활성화하였다. 세포를 10% FCS, IL-2 (10 U/ml) 및 5 ng/ml 내지 25 ng/ml 범위에서 다양한 농도의 묶린 IL-21를 함유하는 (DME)에서 배양하였다. 배양 상등액을 72 시간 후에 수집하고 SEARCHLIGHTTM Proteome Array System (Pierce, Boston Technology Center)을 이용하여 사이토카인 및 케모카인의 생산을 분석하였다.

실험 자가면역 뇌척수염(EAE)의 유도 및 분석

800 μ g의 *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra (Difco Laboratories)로 보강한 프로인트 완전아주반트에 에멀전시킨 100 μ g의 단백질지질 단백질(PLP)₁₃₉₋₁₅₁ 펩티드를 피하조직에 주입하여 암컷 SJL/J 마우스를 면역화시켰다. 또한, 면역화 시 및 48 시간 이후에 400 ng의 백일해(pertussis) 독소를 (List Biological Laboratories) 마우스 복강내에 주입하였다. 다음의 척도에 따라 동물의 EAE의 임상 징후를 매일 평가하였다: 0, 질병 없음; 1, 꼬리가 약해짐; 2, 뒷다리 약화 또는 부분 마비; 3, 뒷다리 완전 마비; 4, 앞다리 및 뒷다리 마비; 및 5, 빈사상태. 각 그룹에 있는 마우스의 개별 점수를 평균내어 평균 임상 점수를 계산하였다.

IL-21의 인 비보 투여

EAE에 대해 민감해진 마우스에 묶린 IL-21을 100 ng/day 또는 1 μ g/day 함유하는 0.2 ml의 PBS를 복막내 주입하였다. 콘트롤 마우스에는 0.2 ml의 식염수를 주입하였다. 처리는 PLP139-151 펩티드로 면역화하기 전날 시작되었고, 총 열번의 투여를 다른 날에 계속하였다.

묶린 IL-21에 의해 유발된 증식 반응 및 사이토카인 생산

MOG₃₅₋₅₅-특이적 T 세포 반응의 유도 및 확장에 대한 IL-21의 작용이 평가되었다. 결과는 IL-21이 투여량 의존 방식으로 림프구 증식을 유도하는 것을 나타냈다. 도 1a 및 표 1에서, 20 ng/ml의 IL-21로 배양된 림프구는 펩티드 단독으로 자극된 세포와 비교하여 증식에서 3.5배의 상당한 증가를 보였다. 사이토카인을 적정한 결과, 상기 세포는 콘트롤 세포와 비슷한 증식능을 보였다.

표 1: IL-21 존재하의 림프구 증식

희석	콘트롤 CPM/bgd	IL-21 CPM/bgd	ng/ml
1:50	1.14	3.57	20
1:250	0.95	3.01	4
1:1250	1.04	2.02	0.8
1:6250	1.49	1.86	0.16
1:31250	1.13	1.70	0.032
1:156250 희석	1.77	1.45	0.0064

도 1b는 단지 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 PLP로만 처리된 세포와 비교하여 지정된 농도의 무린 IL-21 (ng/ml)으로 배양된 단백질 (PLP) 트랜스제닉 마우스에서 T 세포의 증식 증가를 보인다.

증식적인 T 세포 반응과 사이토카인 생산의 상관 여부를 확인하기 위해, 림프구를 IL-21로 배양하였다. IL-21은 비처리된 세포와 비교하여 Th2 사이토카인인 IL-10의 분비 증가를 유도하였다. 이 반응은 포화되었고(도 2 및 표 2), IL-21의 가장 높은 시험농도(25ng/ml)에서 세포는 콘트롤 그룹보다 IL-10을 약 2.5배 많이 생산하였다.

표 2: IL-21은 IL-10분비를 유발한다

IL-21 (ng/ml)	IL-10 검출 (pg/ml)
0	189.3
5	260.8
10	457.3
15	466.8
20	486.1
25	515.0

도 3은 콘트롤 세포와 비교하여 지정된 농도의 무린 IL-21로 처리된 비 세포의 IFN γ 분비 감소를 나타낸다. 면역화된 마우스에서 얻은 MOG 33-55-자극 비 세포에 대한 IL-21의 첨가는 IFN γ 의 두배 감소를 야기했지만, IL-21R의 첨가는 두배 증가를 야기하였다. 림프절 세포를 IL-21로 처리하는 경우, IFN γ 양은 20,000 pg/ml(콘트롤) 또는 15840 pg/ml (mock) 처리)에서 3260 pg/ml (IL-21 처리)로 감소하였다.

IL-21 또는 IL-21R 처리에 의한 사이토카인의 분비 변화를 표 3에 요약하였다.

표 3: 사이토카인 분비의 변화

	IL-21 처리	IL-21R 처리
증가	IL-10	IL-12, IFN γ , TGF β
감소	IL-1 α , IL-2, IL-6, IFN γ , IL-18	없음
변화 없음	IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, TNF α , TGF β , MIP-1 α , GM-CSF	IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, TNF α , MIP-1 α , GM-CSF

IL-21 처리된 마우스에서 EAE의 발달

EAE 발달에 대한 IL-21의 역할을 결정하기 위해, 마우스를 뇌염유발 PLP₁₃₉₋₁₅₁ 펩티드 및 백일해 독소를 함유한 CFA로 면역화하고, IL-21의 예방요법으로 처리하였다. EAE의 임상 과정은 식염수 또는 IL-21로 처리된 마우스에서 비교되었다.

표 4에 무린 IL-21의 존재하에 또는 비존재하에 처리된 두개의 시험적인 PLP 배양에서 사이토카인 분비의 평균 변화를 기재하였다. 비처리 콘트롤 세포의 사이토카인 양을 100으로 표준화하였다.

표 4

사이토카인	콘트롤	mIL-21로 처리
IL2	100	59
IL5	100	73
IL6	100	56
IL10	100	250
IFNg	100	39
TNFa	100	56
GMCSF	100	15

도 4 및 5에서 보이는 바와 같이, 콘트롤 마우스는 질병에 매우 감수성이 있다. 대조적으로, 낮은(100 ng/일) 또는 높은(1 µg/일) 용량의 IL-21로 처리된 마우스는 낮은 중증 임상 점수를 가졌다.

표 5

일수	NaCl	100 ng IL-21	1 µg IL-21
8	0.7	0.0	0.1
10	2.9	0.0	0.8
12	2.8	1.0	0.8
14	3.3	1.0	1.0
16	3.5	1.2	1.7
18	3.5	1.6	1.9
21	3.5	1.4	1.9
23	3.6	1.3	2.4
25	3.8	1.7	2.1

우리의 발견은 IL-21이 EAE 진행을 조절하는데 관여되고, 이러한 경로는 IL-10의 상향조절(upregulation)에 의해 매개 되는 것을 나타낸다.

본 명세서에 전체적으로 인용된 모든 참고문헌, 출원중인 특허출원 및 공개된 특허는 참로로서 여기에 포함되어 있다.

균등물

당업자는 반복 실험을 통하여 본 발명의 특정 구체예에 관한 많은 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 균등물은 청구항의 범위에 속한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

IL-21 폴리펩티드, 작용(agonistic) 항-IL21R 항체 및 작용 항-IL21R 항체의 항원-결합 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 인터루킨-21(IL-21)/IL-21 수용체(IL-21R)의 작용제를 다발 경화증의 증상을 개선하는데 충분한 양으로 개체(subject)에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 다발 경화증의 증상을 개선하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 작용제는 서열번호:2의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하고 IL-21R에 결합할 수 있는 서열을 포함하는 IL-21 폴리펩티드인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 작용제는 서열번호:2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하고 IL-21R에 결합할 수 있는 서열을 포함하는 IL-21 폴리펩티드인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 작용제는 서열번호:2의 아미노산 서열을 포함하는 IL-21 폴리펩티드인 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 작용제는 작용 항-IL21R 항체 또는 그것의 항원-결합 단편인 방법.

청구항 6.

제5항에 있어서, 작용 항-IL21R 항체는 인간 항체인 방법.

청구항 7.

제1항에 있어서, 적어도 하나의 항-염증제를 개체에 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8.

제7항에 있어서, 항-염증제는 IFN β -1 α , IFN β -1 β , TNF 길항제, IL-12 길항제, IL-23 길항제, 메토트렉세이트(methotrexate), 레플루노미드(leflunomide), 시롤리무스(sirolimus) (라파마이신(rapamycin)) 및 CCI-779로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 9.

제1항에 있어서, 개체는 포유동물인 방법.

청구항 10.

제1항에 있어서, IL-21/IL-21R 작용제는 단일 투여량의 형태로 투여되는 방법.

청구항 11.

제1항에 있어서, IL-21/IL-21R 작용제는 일, 주 또는 월의 간격으로 분리된 일련의 투여량으로 투여되는 방법.

청구항 12.

제1항에 있어서, IL-21/IL-21R 작용제는 주사로 투여되는 방법.

청구항 13.

제12항에 있어서, IL-21/IL-21R 작용제는 중추신경계에 주사되는 방법.

청구항 14.

제12항에 있어서, IL-21/IL-21R 작용제는 경막내 또는 정맥내 주사되는 방법.

청구항 15.

제12항에 있어서, IL-21/IL-21R 작용제는 허리 뇌척수액에 주사되는 방법.

청구항 16.

제1항에 있어서, 개체의 IL-10 패러미터를 평가함으로써 개체의 다발 경화증 위험도를 평가하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 17.

제1항에 있어서, 투여 전에, 개체의 IL-10 패러미터를 평가하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 18.

제17항에 있어서, 투여 후에, IL-10 패러미터의 증가가 치료효과를 나타내는 개체의 IL-10 패러미터를 평가하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 19.

제1항에 있어서, 투여 후에, 개체의 IL-10 패러미터를 평가하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 20.

IL-21 폴리펩티드, 작용 항-IL21R 항체 및 작용 항-IL21R 항체의 항원-결합 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 IL-21/IL-21R 작용제 및 항-염증제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 21.

제20항에 있어서, IL-21 폴리펩티드는 서열번호:2의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일하고 IL-21R에 결합할 수 있는 서열을 가지는 약제학적 조성물.

청구항 22.

제20항에 있어서, IL-21 폴리펩티드는 서열번호:2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하고 IL-21R에 결합할 수 있는 서열을 가지는 약제학적 조성물.

청구항 23.

제20항에 있어서, IL-21/IL-21R 작용제는 서열번호:2의 아미노산 서열을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 24.

제20항에 있어서, 항-염증제는 IFN β -1 α , IFN β -1 β , TNF 길항제, IL-12 길항제, IL-23 길항제, 메토틱세이트, 레플루노미드, 시롤리무스 (라파마이신) 및 CCI-779로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 25.

제20항에 있어서, 작용제는 작용 항-IL21R 항체 또는 그것의 항원-결합 단편인 약제학적 조성물.

청구항 26.

제25항에 있어서, 작용 항-IL21R 항체는 인간 항체인 약제학적 조성물.

청구항 27.

IL-21 폴리펩티드, 작용 항-IL21R 항체 및 작용 항-IL21R 항체의 항원-결합 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 IL-21/IL-21R 작용제 및 수초 염기성 단백질을 자극하는 단백질을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 28.

제27항에 있어서, IL-21/IL-21R 작용제는 IL-21 폴리펩티드를 포함하는 단백질이고, 수초 염기성 단백질을 자극하는 단백질은 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate)인 약제학적 조성물.

청구항 29.

인터루킨-21 (IL-21) 폴리펩티드를 다발 경화증 또는 다발 경화증의 적어도 하나의 증상을 개선하는데 충분한 양으로 개체에 투여하는 것을 포함하는, 포유동물 개체에서 다발 경화증을 개선하는 방법.

청구항 30.

제29항에 있어서, 개체는 인간이고, IL-21 폴리펩티드는 인간 IL-21 폴리펩티드인 방법.

청구항 31.

제30항에 있어서, IL-21 폴리펩티드는 서열번호:2를 포함하는 방법.

청구항 32.

제30항에 있어서, IL-21 폴리펩티드는 재조합으로 제조된 것인 방법.

청구항 33.

제30항에 있어서, IL-21 폴리펩티드는 세균 세포내에서 재조합으로 제조된 것인 방법.

청구항 34.

인터루킨-21(IL-21) 폴리펩티드를 개체의 IL-10 발현 또는 활성을 증가시키는데 충분한 양으로 개체에 투여하는 것을 포함하는, 포유동물 개체의 IL-10 결핍증 또는 IL-10 결핍 연관 장애를 조절하는 방법.

청구항 35.

포유동물 개체의 IL-10 패러미터를 평가하고; 및

인터루킨-21(IL-21) 폴리펩티드를 IL-10 패러미터 평가 결과에 좌우되는 양으로 개체에 투여하는 것을 포함하는, 포유동물 개체의 면역장애를 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 36.

제35항에 있어서, IL-10 패러미터는 IL-10 단백질 또는 IL-10 mRNA의 농도에 대한 정량적인 정보를 포함하는 방법.

청구항 37.

제35항에 있어서, IL-10 패러미터는 IL-10 단백질 활성 수준에 대한 정량적인 정보를 포함하는 방법.

청구항 38.

제35항에 있어서, 면역장애는 신경계 장애인 방법.

청구항 39.

제38항에 있어서, 개체는 인간이고 면역장애는 다발 경화증인 방법.

청구항 40.

제38항에 있어서, 면역장애는 미엘린 수초를 손상시키거나 변경시키는 것인 방법.

청구항 41.

인터루킨-21 (IL-21)/IL-21 수용체(IL-21R)의 작용제를 개체에 투여하고; 및 개체의 IL-10 패러미터를 평가하는 것을 포함하는, 포유동물 개체의 다발 경화증 치료를 평가하는 방법.

청구항 42.

제41항에 있어서, 평가된 IL-10 패러미터의 기능에 따라 작용제의 두번째 용량을 개체에 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 43.

제41항에 있어서, 작용제는 IL-21 폴리펩티드, 작용 항-IL21R 항체 및 작용 항-IL21R 항체의 항원-결합 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 방법.

청구항 44.

제43항에 있어서, 작용제는 IL-21 폴리펩티드인 방법.

청구항 45.

제44항에 있어서, 개체는 인간이고, IL-21 폴리펩티드는 인간 IL-21 폴리펩티드인 방법.

청구항 46.

제44항에 있어서, IL-21 폴리펩티드는 서열번호:2를 포함하는 방법.

청구항 47.

- (i) IL-21 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물의 단위 용량을 하나 이상 가지는 용기; 및
- (ii) 다발 경화증을 가졌거나, 가진 것으로 의심되는 개체에 대한 단위 용량 투여 설명서를 포함하는 물건.

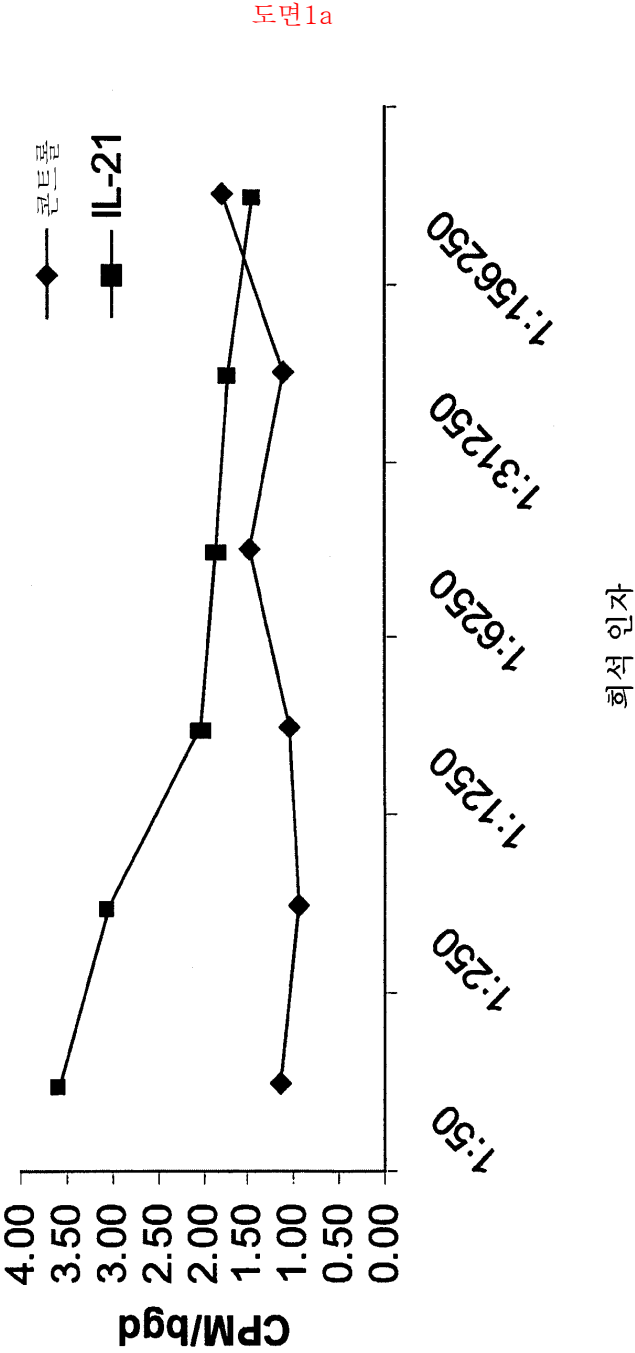
청구항 48.

제47항에 있어서, 설명서는 라벨 위에 제공되는 물건.

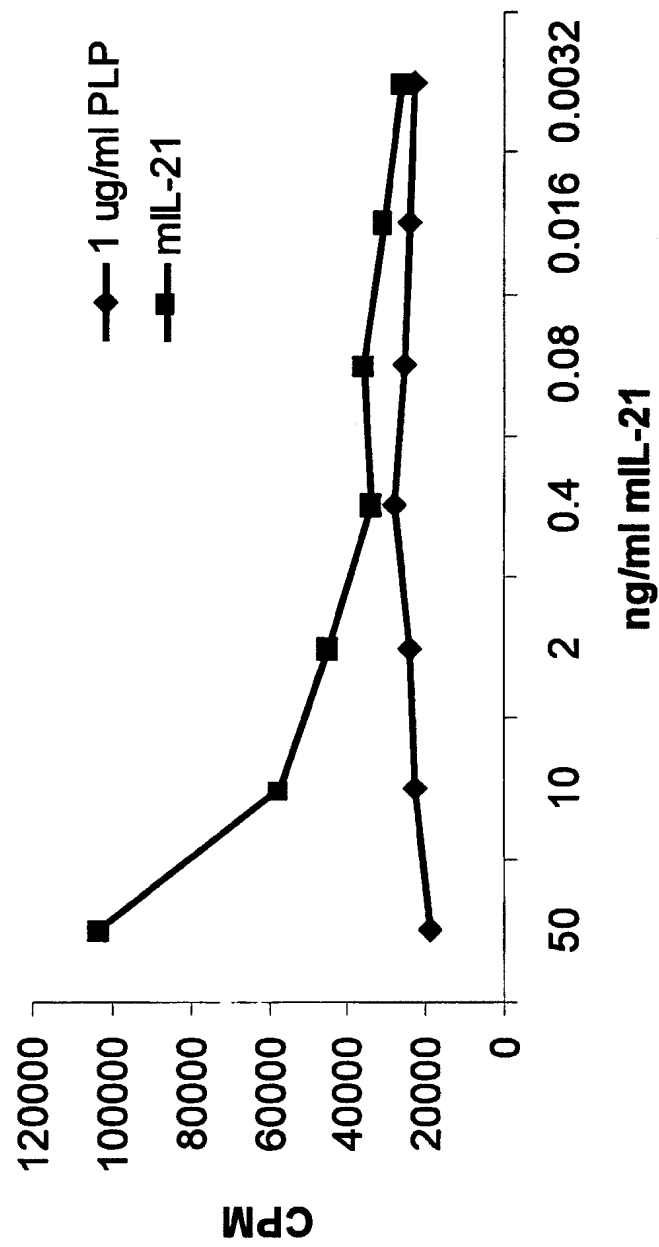
청구항 49.

제48항에 있어서, 라벨은 용기의 외부 표면에 부착된 물건.

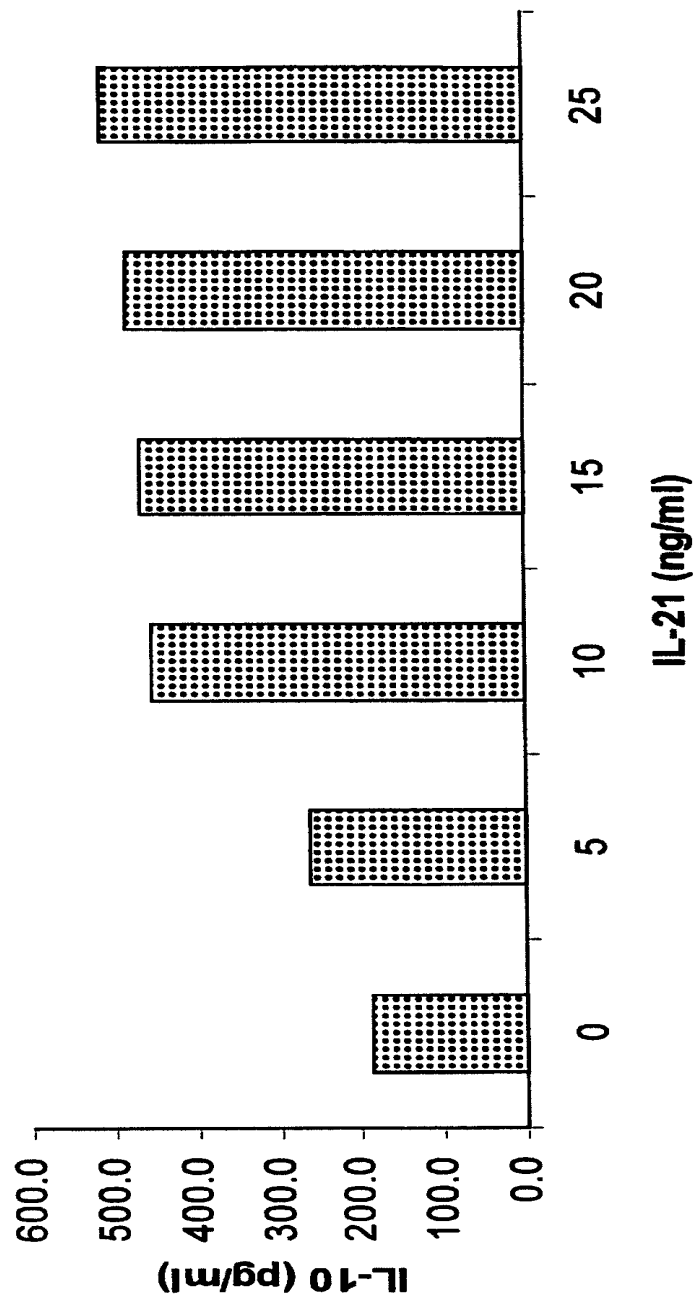
도면



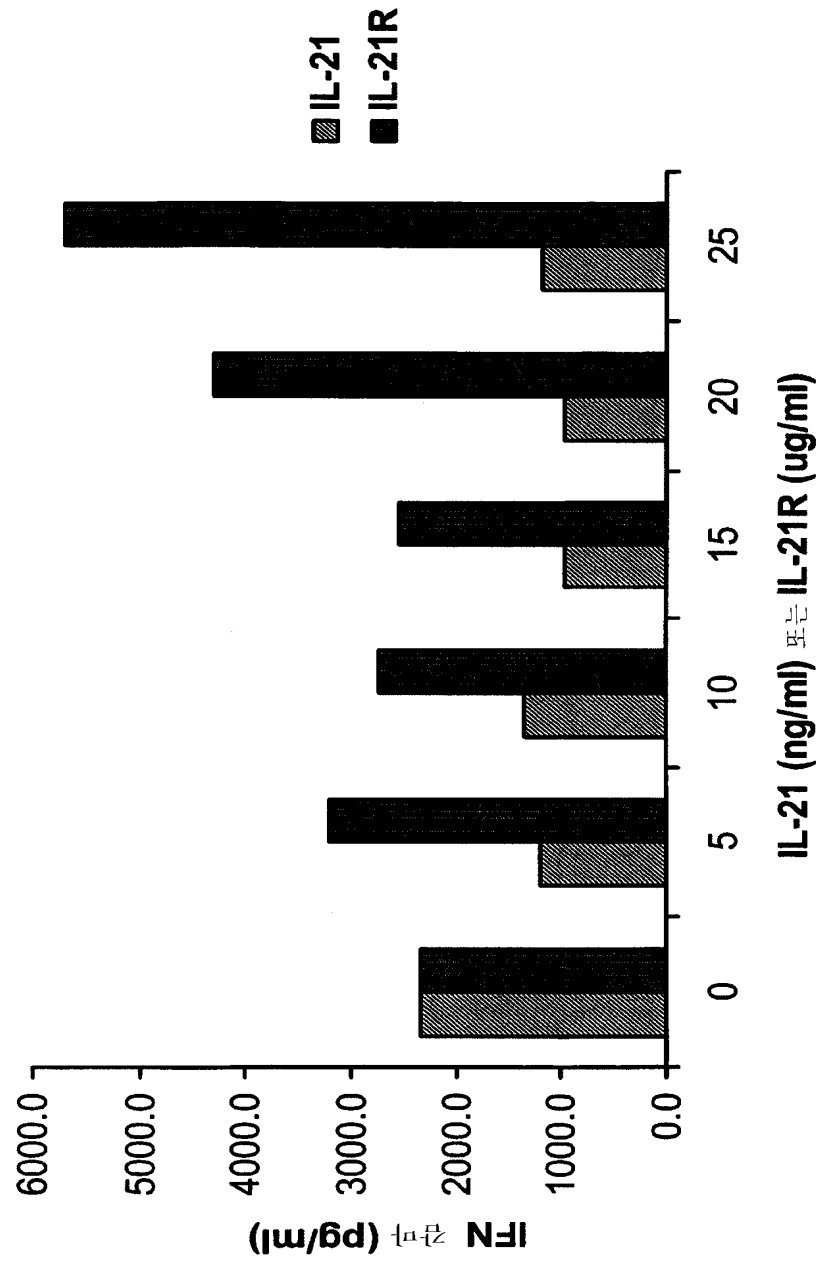
도면1b



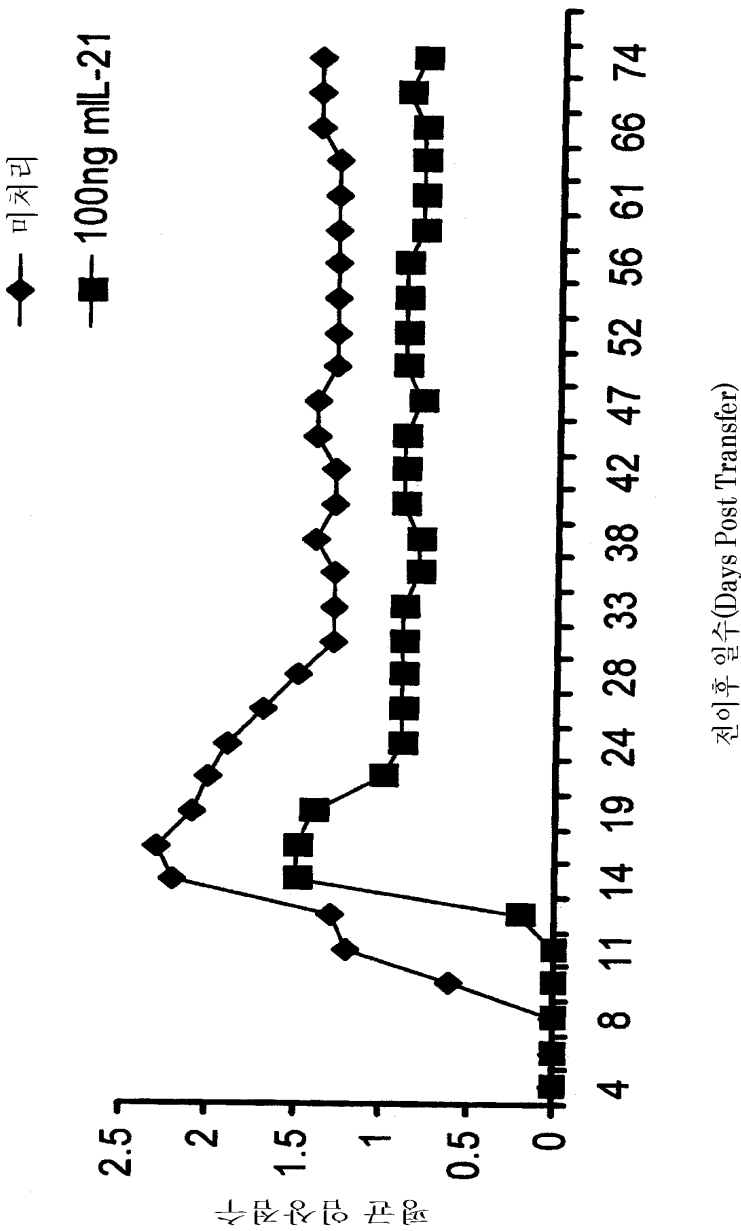
도면2



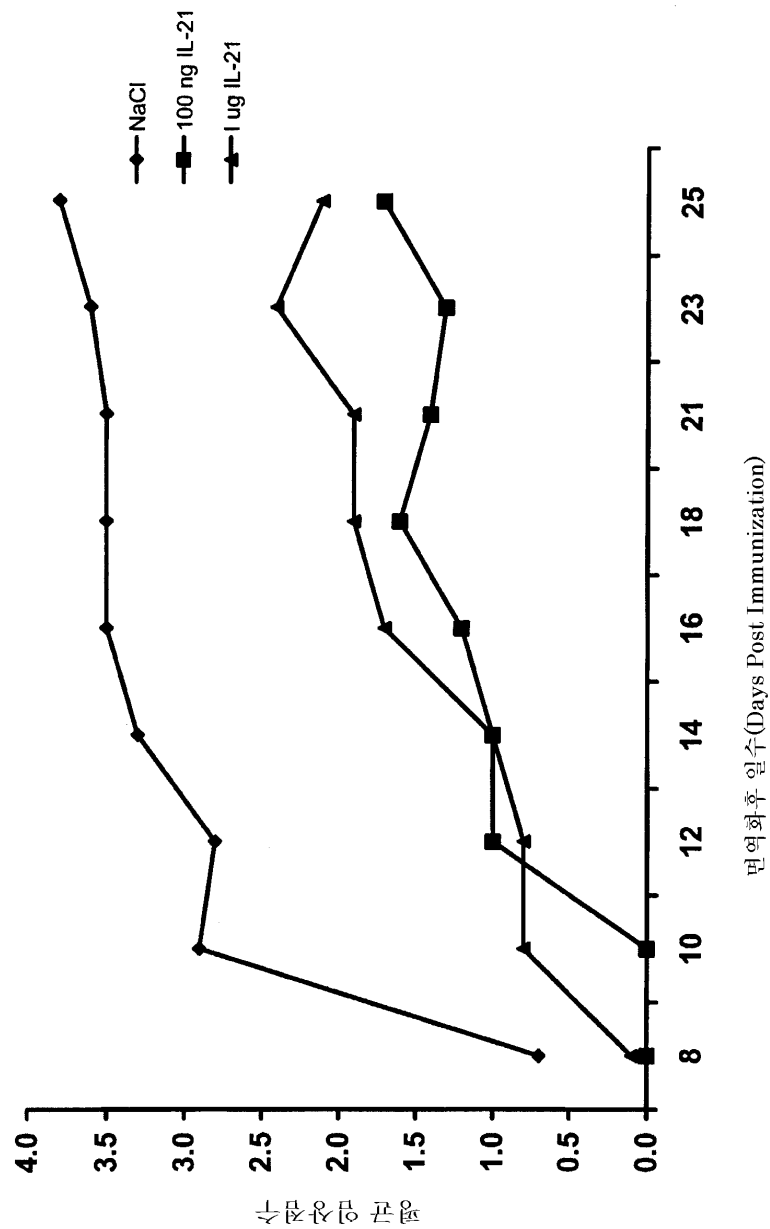
도면3



도면4



도면5



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> TREATING IMMUNOLOGICAL DISORDERS USING AGONISTS OF
INTERLEUKIN-21/ INTERLEUKIN-21 RECEPTOR

<130> 01997.043200.PC

<150> US 60/456,920

<151> 2003-03-21

<160> 13

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 617

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc      60
tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcatc ttcttgggga cactgggtcca    120
caaatcaagc tccaagggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat      180
tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttgggtcct gaatttctgc cagctccaga     240
agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc tttttcctgc tttcagaagg cccaactaaa     300
gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag      360
gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcatg     420
tgattcttat gagaaaaaac cacccaaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca     480
aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc     540
taacttgtag ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg     600
tattccaagt ggaggag                                           617

```

<210> 2

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

```

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala
20           25           30

```

```

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe
35           40           45

```

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

Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn
65 70 75 80

Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser
85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu
100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser
115 120 125

Glu Asp Ser
130

<210> 3
<211> 3072
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
gagaaccaga ccaaggccct gtcatcagct cctggagact cagttctggt ggcattggaga 60
ggacccttgt ctgtctggta gtcattcttct tggggacagt ggcccataaa tcaagccccc 120
aagggccaga tcgcctcctg attagacttc gtcaccttat tgacattggt gaacagctga 180
aaatctatga aaatgacttg gatcctgaac ttctatcagc tccacaagat gtaaaggggc 240
actgtgagca tgcagctttt gcctgttttc agaaggccaa actcaagcca tcaaaccctg 300
gaaacaataa gacattcatc attgacctcg tggcccagct caggaggagg ctgcctgcc 360
ggaggggagg aaagaaacag aagcacatag cttaaagccc ttctgtgat tcgtatgaga 420
aaaggacacc caaagaattc ctagaaagac taaaatggct ccttcaaaag atgattcatc 480
agcatctctc ctagaacaca taggacctga agattcctga ggatccgaga agattcccga 540
ggactgagga gacgccggac actatagacg ctcacgaatg caggagtaca tcttgcctct 600

tgggattgca agtggagaag tacgatacgt tatgataaga acaactcaga aaagctatag	660
gttaagatcc tttcgcccat taactaagca gacattgttg ttccctgcac agactccatg	720
ctgtcaacat ggaaaatctc aactcaacaa gagcccagct tcccgtgtca gggatttctg	780
gtgcttctca agctgtggct tcatcttatt gcccaactgt gacattcttt gattggaagg	840
ggaaaactaa agcttttagc aaaaatacag ctagggaatt tgtcgatctg cgagagtaag	900
acctcttatg atcctaacgg aatgatgtaa gctggaaata ataagcataa gatgaaattg	960
aaaattgaag tctttattct ttaagaaaaa ctttgtactt gaaagcatgt ctgaagagtt	1020
tactcattac cacaacatc tagcatattg ataactaaca tctttatact ctacaagaga	1080
ggctttccag ataggtacag tttttcttct ctattaggtc tatcaaaatt taacctatta	1140
tgagggtcac ccctggcttt cactgttttt ctaaagaggc aagggtgtag taagaagcag	1200
gcttaagttg ccttcctccc aatgtcaagt tcctttataa gctaatagtt taatcttgtg	1260
aagatggcaa tgaaagcctg tggaagtgca aacctcacta tcttctggag ccaagtagaa	1320
tttcaagtt tgtagctctc acctcaagtg gttatgggtg tcctgtgatg aatctgctag	1380
ctccagcctc agtctcctct ccacatcct ttcttttctt tcctctttga aacttctaag	1440
aaaaagcaat ccaaacaagt tcagcactta agacacattg catgcacact tttgataagt	1500
taaatccaac catctattta aaatcaaaat caggagatga gccaagagac cagaggttct	1560
gttccagttt taaacagact tttactgaac atcccaatct tttaaccaca gaggctaaat	1620
tgagcaaata gttttgcat ttgatataat ttccaacagt atgtttcaat gtcaagttaa	1680
aaagtctaca aagctatttt ccctggagtg gtatcatcgc tttgagaatt tcttatggtt	1740
aaaatggatc tgagatccaa gcatggcctg ggggatgggt ttgatctaag gaaaaagggtg	1800
tctgtacctc acagtgcctt taaaacaagc agagatcccg tgtaccgccc taagatagca	1860
cagactagtg ttaactgatt ccagaaaaag tgtcacaatc agaaccaacg cattctctta	1920
aactttaaaa atatgtattg caaagaactt gtgtaactgt aaatgtgtga ctgttgatga	1980
cattatacac acatagccca cgtaagtgtc caatgggtgct agcattgggt gctgagtttg	2040
ctgctcgaaa gctgaagcag agatgcagtc cttcacaaag caatgatgga cagagagggg	2100
agtctccatg ttttattctt ttgttgtttc tggctgtgta actgttgact tcttgacatt	2160

gtgattttta tattttaagac aatgtatttta ttttggtgtg tttattgttc tagcctttta 2220
aatcactgac aattttctaata caagaagtag aaataattca atgcagcaca ggctaagagc 2280
ttgtatcggt tggaaaagcc agtgaaggct tctccactag ccatgggaaa gctacgcttt 2340
agagtaaaact agacaaaatt gcacagcagt cttgaacctc tctgtgctca agactcagcc 2400
agtcctttga cattattgtt cactgtgggt gggaacacat tggacctgac acactgttgt 2460
gtgtccatga aggttgccac tgggtgaagc tttttttggt tttcattctc ttatctgtag 2520
aacaagaatg tggggctttc ctaagtctat tctgtatttt attctgaact tcgtatgtct 2580
gagttttaat gttttgagta ctcttacagg aacacctgac cacacttttg agttaaat 2640
tatcccaagt gtgatattta gttgttcaaa aagggaaggg atatacatat atacatacat 2700
acatacatat atatatatat atatatatat atatatatat atatatatat gtatatatat 2760
atatatatag agagagagag agagagagag agagaaagag agagagggtg ttgtagggtca 2820
taggagttca gaggaaatca gttatggccg ttaatactgt agctgaaagt gttttctttg 2880
tgaataaatt catagcatta ttgatctatg ttattgctct gttttattta cagtcacacc 2940
tgagaattta gttttaatat gaatgatgta ctttataact taatgattat ttattatgta 3000
tttggttttg aatgtttgtg ttcattggctt cttattttaag acctgatcat attaaatgct 3060
accagtcgcg ga 3072

<210> 4
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala
20 25 30

Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe
35 40 45

Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe
50 55 60

Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg
65 70 75 80

Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser
85 90 95

Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu
100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser
115 120

<210> 5
<211> 2665
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
gtcgactgga ggcccagctg cccgtcatca gagtgacagg tcttatgaca gcctgattgg 60
tgactcgggc tgggtgtgga ttctcacccc aggctctctgc ctgctttctc agaccctcat 120
ctgtcacccc cacgctgaac ccagctgcca cccccagaag cccatcagac tgcccccagc 180
acacggaatg gatattctgag aaagaagccg aaacagaagg cccgtgggag tcagcatgcc 240
gcgtggctgg gccgccccct tgctcctgct gctgctccag ggaggctggg gctgccccga 300
cctcgtctgc tacaccgatt acctccagac ggtcatctgc atcctggaaa tgtggaacct 360
ccaccccagc acgctcaccc ttacctggca agaccagtat gaagagctga aggacgaggc 420
cacctcctgc agcctccaca ggtcggccca caatgccacg catgccacct acacctgcca 480
catggatgta ttccacttca tggccgacga cattttcagt gtcaacatca cagaccagtc 540
tggcaactac tcccaggagt gtggcagctt tctcctggct gagagcatca agccggctcc 600
ccctttcaac gtgactgtga ccttctcagg acagtataat atctcctggc gctcagatta 660
cgaagaccct gcctttctaca tgctgaaggg caagcttcag tatgagctgc agtacaggaa 720
ccggggagac ccctgggctg tgagtccgag gagaaagctg atctcagtgg actcaagaag 780
tgtctccctc ctccccctgg agttccgcaa agactcgagc tatgagctgc aggtgcgggc 840

agggcccatg cctggctcct cctaccaggg gacctggagt gaatggagtg acccggtcat	900
ctttcagacc cagtcagagg agttaaagga aggctggaac cctcacctgc tgcttctcct	960
cctgcttgct atagtcttca ttcttgctt ctggagcctg aagaccatc cattgtggag	1020
gctatggaag aagatatggg ccgtccccag ccctgagcgg ttcttcatgc ccctgtacaa	1080
gggctgcagc ggagacttca agaaatgggt ggggtgcaccc ttcactggct ccagcctgga	1140
gctgggaccc tggagcccag aggtgccctc caccctggag gtgtacagct gccaccacc	1200
acggagcccg gccaaagaggc tgcagctcac ggagctacaa gaaccagcag agctggtgga	1260
gtctgacggt gtgccaagc ccagcttctg gccgacagcc cagaactcgg ggggctcagc	1320
ttacagtgag gagagggatc ggccatacgg cctgggtgtcc attgacacag tgactgtgct	1380
agatgcagag gggccatgca cctggccctg cagctgtgag gatgacggct acccagccct	1440
ggacctggat gctggcctgg agcccagccc aggcctagag gaccactct tggatgcagg	1500
gaccacagtc ctgtcctgtg gctgtgtctc agctggcagc cctgggctag gagggcccct	1560
gggaagcctc ctggacagac taaagccacc ccttgcagat ggggaggact gggctggggg	1620
actgccctgg ggtggccggt cacctggagg ggtctcagag agtgaggcgg gctcacccct	1680
ggccggcctg gatatggaca cgtttgacag tggctttgtg ggctctgact gcagcagccc	1740
tgtggagtgt gacttcacca gccccgggga cgaaggaccc ccccgagct acctccgcca	1800
gtgggtggtc attcctccgc cactttcgag ccctggaccc caggccagct aatgaggctg	1860
actggatgtc cagagctggc caggccactg ggccctgagc cagagacaag gtcacctggg	1920
ctgtgatgtg aagacacctg cagcctttgg tctcctggat gggcctttga gcctgatgtt	1980
tacagtgtct gtgtgtgtgt gtgcatatgt gtgtgtgtgc atatgcatgt gtgtgtgtgt	2040
gtgtgtctta ggtgcgagc ggcatgtcca cgtgtgtgtg tgattgcacg tgctgtggg	2100
cctgggataa tgcccatggt actccatgca ttcacctgcc ctgtgcatgt ctggactcac	2160
ggagctcacc catgtgcaca agtgtgcaca gtaaacgtgt ttgtgggtcaa cagatgacaa	2220
cagccgtcct ccctcctagg gtcttgtgtt gcaagttggg ccacagcatc tccggggctt	2280
tgtgggatca gggcattgcc tgtgactgag gggagacca gccctccagc gtctgcctcc	2340
aggagctgca agaagtccat attgttcctt atcacctgcc aacaggaagc gaaaggggat	2400

```

ggagtgagcc catggtgacc tcgggaatgg caattttttg ggcggcccct ggacgaaggt    2460
ctgaatcccg actctgatac cttctggctg tgctacctga gccaaagtcgc ctcccctctc    2520
tgggctagag tttccttata cagacagtgg ggaaggcatg acacacctgg gggaaattgg    2580
cgatgtcacc cgtgtacggt acgcagccca gagcagaccc tcaataaacg tcagcttcct    2640
tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaat ctaga                                         2665

```

<210> 6
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1              5              10              15

```

```

Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
              20              25              30

```

```

Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
              35              40              45

```

```

Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
50              55              60

```

```

Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65              70              75              80

```

```

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
              85              90              95

```

```

Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
100              105              110

```

```

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

```

```

Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
130              135              140

```


Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
165 170 175

Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
180 185 190

Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
195 200 205

Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
210 215 220

Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu
225 230 235 240

Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys
245 250 255

Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser
260 265 270

Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe
275 280 285

Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly
290 295 300

Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His
305 310 315 320

Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu
325 330 335

Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp
340 345 350

Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp
355 360 365

Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala
370 375 380

Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro
385 390 395 400

Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp
405 410 415

Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser
420 425 430

Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg
435 440 445

Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro
450 455 460

Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser
465 470 475 480

Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly
485 490 495

Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp
500 505 510

Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro
515 520 525

Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
530 535

<210> 7
<211> 2628
<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

gtcgacgcgg	cggtaccagc	tgtctgcccc	cttctcctgt	ggtgtgcctc	acggtcactt	60
gcttgtctga	ccgcaagtct	gcccattccct	ggggcagcca	actggcctca	gcccgtgccc	120
caggcgtgcc	ctgtctctgt	ctggctgccc	cagccctact	gtcttcctct	gtgtaggctc	180
tgcccagatg	cccggctggg	cctcagcctc	aggactatct	cagcagtgc	tcccctgatt	240
ctggacttgc	acctgactga	actcctgccc	acctcaaacc	ttcacctccc	accaccacca	300
ctccgagtcc	cgctgtgact	cccacgcccc	ggagaccacc	caagtgcctc	agcctaaaga	360
atggctttct	gagaaagacc	ctgaaggagt	aggtctggga	cacagcatgc	cccggggccc	420
actggctgcc	ttactcctgc	tgattctcca	tggagcttgg	agctgcctgg	acctcacttg	480
ctacactgac	tacctctgga	ccatcacctg	tgtcctggag	acacggagcc	ccaaccccag	540
catactcagt	ctcacctggc	aagatgaata	tgaggaactt	caggaccaag	agaccttctg	600
cagcctacac	aggtctggcc	acaacaccac	acatatatgg	tacacgtgcc	atatgcgctt	660
gtctcaattc	ctgtccgatg	aagttttcat	tgtcaatgtg	acggaccagt	ctggcaacaa	720
ctcccaagag	tgtggcagct	ttgtcctggc	tgagagcatc	aaaccagctc	cccccttgaa	780
cgtgactgtg	gccttctcag	gacgctatga	tatctcctgg	gactcagctt	atgacgaacc	840
ctccaactac	gtgctgaggg	gcaagctaca	atatgagctg	cagtatcgga	acctcagaga	900
cccctatgct	gtgaggccgg	tgaccaagct	gatctcagtg	gactcaagaa	acgtctctct	960
tctccctgaa	gagttccaca	aagattctag	ctaccagctg	caggtgcggg	cagcgcctca	1020
gccaggcact	tcattcaggg	ggacctggag	tgagtggagt	gaccccgctc	tctttcagac	1080
ccaggctggg	gagcccaggg	caggctggga	ccctcacatg	ctgctgctcc	tggctgtctt	1140
gatcattgtc	ctgggttttca	tgggtctgaa	gatccacctg	ccttggaggc	tatggaaaaa	1200
gatatgggca	ccagtgccca	cccctgagag	tttcttccag	cccctgtaca	gggagcacag	1260
cgggaaacttc	aagaaaatggg	ttaatacccc	tttcacggcc	tccagcatag	agttggtgcc	1320
acagagttcc	acaacaacat	cagccttaca	tctgtcattg	tatccagcca	aggagaagaa	1380
gttcccgggg	ctgccgggtc	tgggaagagca	actggagtgt	gatggaatgt	ctgagcctgg	1440
tcactggtgc	ataatcccct	tggcagctgg	ccaagcggtc	tcagcctaca	gtgaggagag	1500

agaccggcca tatggtctgg tgtccattga cacagtgact gtgggagatg cagagggcct 1560
 gtgtgtctgg ccctgtagct gtgaggatga tggctatcca gccatgaacc tggatgctgg 1620
 ccgagagtct ggccctaatt cagaggatct gctcttggtc acagaccctg cttttctgtc 1680
 ttgcggctgt gtctcaggta gtggtctcag gcttggaggc tccccaggca gcctactgga 1740
 caggttgagg ctgtcatttg caaaggaagg ggactggaca gcagacccaa cctggagaac 1800
 tgggtcccca ggagggggct ctgagagtga agcaggttcc ccccttggtc tggacatgga 1860
 cacatttgac agtggctttg caggttcaga ctgtggcagc cccgtggaga ctgatgaagg 1920
 accccctcga agctatctcc gccagtgggt ggtcaggacc cctccacctg tggacagtgg 1980
 agcccagagc agctagcata taataaccag ctatagttag aagaggcctc tgagcctggc 2040
 atttacagtg tgaacatgta ggggtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 2100
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtcttgggt tgtgtgttag cacatccatg ttgggatttg 2160
 gtctgttgct atgtattgta atgctaaatt ctctacccaa agttctaggc ctacgagtga 2220
 attctcatgt ttacaaaactt gctgtgtaaa ccttgttcct taatttaata ccattggtta 2280
 aataaaaattg gctgcaacca attactggag ggattagagg tagggggctt ttgagttacc 2340
 tgtttggaga tggagaagga gagaggagag accaagagga gaaggaggaa ggagaggaga 2400
 ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggctgccgtg 2460
 aggggagagg gaccatgagc ctgtggccag gagaaacagc aagtatctgg ggtacactgg 2520
 tgaggaggtg gccaggccag cagttagaag agtagattag gggtgacctc cagtatttgt 2580
 caaagccaat taaaataaca aaaaaaaaaa aaaagcggcc gctctaga 2628

<210> 8

<211> 529

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
 20 25 30

Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
35 40 45

Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
50 55 60

Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
65 70 75 80

Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
85 90 95

Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
100 105 110

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

Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
130 135 140

Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160

Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
165 170 175

Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
180 185 190

Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
195 200 205

Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
210 215 220

Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu
225 230 235 240

Leu Leu Ala Val Leu Ile Ile Val Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile
245 250 255

His Leu Pro Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr
260 265 270

Pro Glu Ser Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Arg Glu His Ser Gly Asn Phe
275 280 285

Lys Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val
290 295 300

Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro
305 310 315 320

Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu
325 330 335

Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu
340 345 350

Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro
355 360 365

Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly
370 375 380

Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met
385 390 395 400

Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu
405 410 415

Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser
420 425 430

Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg
435 440 445

Leu Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg
450 455 460

Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro
465 470 475 480

Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys
485 490 495

Gly Ser Pro Val Glu Thr Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg
500 505 510

Gln Trp Val Val Arg Thr Pro Pro Pro Val Asp Ser Gly Ala Gln Ser
515 520 525

Ser

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Leu His Pro
1 5 10 15

<210> 10
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic linker

<400> 11

Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 12
<211> 122
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 12

Gln Asp Arg Leu Phe Ile Arg Leu Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp
1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Asp Pro Glu Phe Leu Pro Ala
20 25 30

Pro Glu Asp Val Lys Arg His Cys Glu Arg Ser Ala Phe Ser Cys Phe
35 40 45

Gln Lys Val Gln Leu Lys Ser Ala Asn Asn Gly Asp Asn Glu Lys Ile
50 55 60

Ile Asn Ile Leu Thr Lys Gln Leu Lys Arg Lys Leu Pro Ala Thr Asn
65 70 75 80

Thr Gly Arg Arg Gln Lys His Glu Val Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser
85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Tyr Leu Glu Arg Leu Lys Ser Leu
100 105 110

Ile Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser
115 120

<210> 13

<211> 146

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

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