



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0123315
 (43) 공개일자 2017년11월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/24 (2013.01)
C07K 16/244 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7025046
- (22) 출원일자(국제) 2016년03월09일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년09월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/055026
- (87) 국제공개번호 WO 2016/142426
 국제공개일자 2016년09월15일
- (30) 우선권주장
 62/131,285 2015년03월11일 미국(US)

- (71) 출원인
글락소스미스클라인 인텔렉추얼 프로퍼티 디벨로프먼트 리미티드
 영국 미들섹스 브렌트포드 그레이트 웨스트 로드 980 (우: 티더블유8 9지에스)
- (72) 발명자
아메드, 파린
 영국 에스취1 2엔와이 하트퍼드셔 스티브니지 거늘즈 우드 로드 글락소스미스클라인
바틀로뮤, 미셸 앤
 영국 에스취1 2엔와이 하트퍼드셔 스티브니지 거늘즈 우드 로드 글락소스미스클라인
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 심미성

전체 청구항 수 : 총 40 항

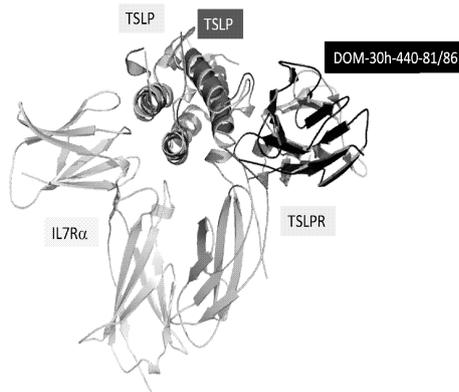
(54) 발명의 명칭 **TSLP 결합 단백질**

(57) 요약

본 개시내용은 TSLP 결합 단백질, 예컨대 항-TSLP 단일 가변 도메인, 이러한 TSLP 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 TSLP 결합 단백질을 포함하는 제약 조성물 및 키트, 및 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 TSLP 신호전달과 연관된 질환, 예컨대 천식의 치료에서의 이러한 TSLP 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도7

TSLP- DOM-30h-440-81/86 (흑색 리본)과 문헌 복합체 TSLP/IL7Rα/TSLPR 복합체 (PDB: 4NN7, 보다 연한 회색 음영 내)의 X선 구조의 오버레이



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/544 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/567 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/70 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)

(72) 발명자

델라 크리스티나, 피에트로

영국 에스퀴1 2엔와이 하트퍼드셔 스티브니지 거늘
즈 우드 로드 글락소스미스클라인 내

디메치, 캐롤린

영국 에스퀴1 2엔와이 하트퍼드셔 스티브니지 거늘
즈 우드 로드 글락소스미스클라인

몰리, 피터

영국 에스퀴1 2엔와이 하트퍼드셔 스티브니지 거늘
즈 우드 로드 글락소스미스클라인

샤, 라차나 샤일레쉬

영국 에스퀴1 2엔와이 하트퍼드셔 스티브니지 거늘
즈 우드 로드 글락소스미스클라인

털링, 파울라

영국 에스퀴1 2엔와이 하트퍼드셔 스티브니지 거늘
즈 우드 로드 글락소스미스클라인

명세서

청구범위

청구항 1

- a. 서열식별번호: 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형을 갖는 이들 CDR 중 어느 하나 또는 모두의 변이체; 또는
- b. 서열식별번호: 9의 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하며;
- 5 nM 이하의 IC50을 갖는 TSLP 결합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, CDR1의 변이체에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 28에 상응하는 잔기가 Pro이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 30에 상응하는 잔기가 Arg이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 31에 상응하는 잔기가 Asn이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 32에 상응하는 잔기가 Trp이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 34에 상응하는 잔기가 Asp이고; CDR2의 변이체에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 50에 상응하는 잔기가 Gly이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 53에 상응하는 잔기가 His이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 55에 상응하는 잔기가 Gln이고; CDR3의 변이체에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 91에 상응하는 잔기가 Ile, Leu, Val 또는 Phe이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 92에 상응하는 잔기가 Gly 또는 Ala이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 93에 상응하는 잔기가 Glu, Phe, Asp 또는 Ser이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 94에 상응하는 잔기가 Asp인 TSLP 결합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, CDR2의 변이체에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 46에 상응하는 잔기가 Leu인 TSLP 결합 단백질.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, CDR3이 서열 $X_1GlnX_2X_3X_4AspProX_5Thr$ 로 이루어지고, 여기서 X_1 은 Lys, Trp, Val, Met 또는 Ile를 나타내고, X_2 는 Val, Leu, Ile 또는 Phe를 나타내고, X_3 은 Gly 또는 Ala를 나타내고, X_4 는 Glu, Phe, Asp 또는 Ser을 나타내고, X_5 는 Val 또는 Thr을 나타내는 것인 TSLP 결합 단백질.

청구항 5

제2항 또는 제3항에 있어서, 인간 및 시노물구스 TSLP의 사용 시 IC50에서 5배 이하의 차이를 나타내고, 서열식별번호: 9에서 잔기 91에 상응하는 잔기가 Ile, Leu 또는 Val인 TSLP 결합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, CDR3이 서열 $X_1GlnX_2X_3X_4AspProX_5Thr$ 로 이루어지고, 여기서 X_1 은 Lys, Trp, Val 또는 Met을 나타내고, X_2 는 Val, Leu 또는 Ile를 나타내고, X_3 은 Gly 또는 Ala를 나타내고, X_4 는 Glu, Phe, Asp 또는 Ser을 나타내고, X_5 는 Val 또는 Thr을 나타내는 것인 TSLP 결합 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 서열식별번호: 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 TSLP 결합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, CDR1이 서열식별번호: 1로 정의된 서열로 이루어지고, CDR2가 서열식별번호: 4로 정의된 서열로 이루어지고, CDR3이 서열식별번호: 7로 정의된 서열로 이루어진 것인 TSLP 결합 단백질.

청구항 9

제7항에 있어서, CDR1이 서열식별번호: 1로 정의된 서열로 이루어지고, CDR2가 서열식별번호: 5로 정의된 서열로 이루어지고, CDR3이 서열식별번호: 7로 정의된 서열로 이루어진 것인 TSLP 결합 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 인간 TSLP에 2 nM 미만의 해리 상수 (KD)로 결합하는 TSLP 결합 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 인간 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁하는 TSLP 결합 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, IL-7에 대해 어떠한 유의한 결합도 나타내지 않는 TSLP 결합 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 가변 도메인인 TSLP 결합 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, 단일 가변 도메인이 V_K 단일 가변 도메인인 TSLP 결합 단백질.

청구항 15

제14항에 있어서, V_K 단일 가변 도메인이 RT로 끝나는 C-말단을 갖는 것인 TSLP 결합 단백질.

청구항 16

제14항에 있어서, V_K 단일 가변 도메인이 R로 끝나지 않는 C-말단을 갖는 것인 TSLP 결합 단백질.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 9에서 잔기 27에 상응하는 잔기가 Arg이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 29에 상응하는 잔기가 Ile이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 89에 상응하는 잔기가 Val이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 96에 상응하는 잔기가 Val인 TSLP 결합 단백질.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 9에서 잔기 49에 상응하는 잔기가 Trp인 TSLP 결합 단백질.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 9에서 잔기 36에 상응하는 잔기가 Tyr이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 38에 상응하는 잔기가 Gln이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 44에 상응하는 잔기가 Pro이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 67에 상응하는 잔기가 Ser이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 87에 상응하는 잔기가 Tyr이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 98에 상응하는 잔기가 Phe이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 100에 상응하는 잔기가 Gln인 TSLP 결합 단백질.

청구항 20

서열식별번호: 9의 아미노산 서열로 이루어진 TSLP 결합 단백질.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 TSLP 결합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 22

제21항에 있어서, 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 11로 이루어진 단리된 핵산 분자.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 24

제21항 또는 제22항에 따른 핵산 또는 제23항에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 25

제24항에 따른 숙주 세포를 상기 핵산 또는 벡터의 발현에 적합한 조건 하에 유지시킴으로써, TSLP 결합 단백질을 생산하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 TSLP 결합 단백질을 생산하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로 사용하기 위한 TSLP 결합 단백질.

청구항 27

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, TSLP 신호전달과 연관된 질환을 치료하는데 사용하기 위한 TSLP 결합 단백질.

청구항 28

TSLP 신호전달과 연관된 질환의 치료를 위한 의약의 제조에서의, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 TSLP 결합 단백질의 용도.

청구항 29

TSLP 신호전달과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 인간 환자에게 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 TSLP 결합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간 환자에서 TSLP 신호전달과 연관된 질환을 치료하는 방법.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, TSLP 신호전달과 연관된 질환이 천식, 특발성 폐 섬유증, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 비염, 니트레토 증후군, 호산구성 식도염 (EoE), 식품 알레르기, 알레르기성 설사, 호산구성 위장염, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA), 알레르기성 진균 부비동염, 압, 류마티스 관절염, COPD, 전신 경화증, 켈로이드, 궤양성 결장염, 만성 비부비동염 (CRS), 비강 폴립증, 만성 호산구성 폐렴, 호산구성 기관지염, 복강 질환, 처그-스트라우스 증후군, 호산구성 근육통 증후군, 과다호산구성 증후군, 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증 및 염증성 장 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, TSLP 결합 단백질 또는 TSLP 결합 단백질의 용도 또는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, TSLP 신호전달과 연관된 질환이 천식, 특발성 폐 섬유증, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 비염, 니트레토 증후군, 호산구성 식도염 (EoE), 식품 알레르기, 알레르기성 설사, 호산구성 위장염, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA), 알레르기성 진균 부비동염, 압, 류마티스 관절염, COPD, 전신 경화증, 켈로이드, 궤양성 결장염, 만성 비부비동염 (CRS) 및 비강 폴립증으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, TSLP 결합 단백질 또는 TSLP 결합 단백질의 용도 또는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, TSLP 신호전달과 연관된 질환이 천식인, TSLP 결합 단백질 또는 TSLP 결합 단백질의 용도 또

는 방법.

청구항 33

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 TSLP 결합 단백질, 및 임의로 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제 및/또는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 34

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 TSLP 결합 단백질 및 상기 TSLP 결합 단백질을 흡입하기 위한 장치를 포함하는 키트.

청구항 35

전장 인간 TSLP의 하기 잔기: Tyr15, Lys31, Ser32, Thr33, Phe35, Asn36, Asn37, Ser40, Cys41, Ser42, Ser114, Gln115, Gln117, Gly118, Arg121, Arg122, Arg125, Pro126, Leu128 및 Lys 129를 포함하는 에피토프에 결합하는 TSLP 결합 단백질.

청구항 36

제35항에 있어서, 에피토프가 하기 잔기: Ser20, Ile24, Glu34, Thr38, Val39, Asn43, His46, Asn124 및 Leu127을 추가로 포함하는 것인 TSLP 결합 단백질.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 항체인 TSLP 결합 단백질.

청구항 38

제35항 또는 제36항에 있어서, 단일 가변 도메인인 TSLP 결합 단백질.

청구항 39

제38항에 있어서, V_K 도메인인 TSLP 결합 단백질.

청구항 40

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, IL-7에 대해 어떠한 유의한 결합도 나타내지 않는 TSLP 결합 단백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 TSLP 결합 단백질, 예컨대 항-TSLP 단일 가변 도메인, 이러한 TSLP 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 TSLP 결합 단백질을 포함하는 제약 조성물 및 키트, 및 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 TSLP 신호전달과 연관된 질환, 예컨대 천식의 치료에서의 이러한 TSLP 결합 단백질의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전장 흉선 기질 림포포이에틴 (TSLP)은 원래 마우스 흉선 기질 세포로부터의 상청액 중 인자로서 확인되었고, 이는 프리-B 세포의 증식을 유도할 수 있다 (Friend, et al., Exp Hematol. 22(3):321, 1994). 무린 단백질은 이후에 확인되었고 (Sims. et al., J Exp Med. 2000 Sep 4;192(5):671-80), 바로 이어서 2001년에 2개의 별개 군에 의해 인간 TSLP가 확인되었다 (Quentmeier, et al., Leukemia. 2001 Aug;15(8):1286-92, Reche, et al.. J Immunol. 2001 Jul 1;167(1):336-43).

[0003] 전장 TSLP는 IL-7R α 및 고유한 TSLPR 쇠 (CRFL2)로 이루어진 이중이량체 수용체 복합체인 기능적 TSLP 수용체 (TSLPR)를 통해 신호 전달자 및 전사 활성화인자 (STAT5) 인산화를 유도하는 단쇄 4개 α -나선 다발 시토키인이다 (Park et al., JEM 192(5):659-682 (2002)). 또한, 대안적 전사 개시 부위로부터 발현된 TSLP의 짧은 이소

형 (sfTSLP)은 인간 세포에서는 발현되는 것으로 보이지만, STAT5를 활성화하는 것으로는 보이지 않고, 전장 TSLP와 상이한 기능을 제공할 수 있다 (Bjerkan et al., Mucosal immunology 8(1) 49-56 (2015)).

- [0004] TSLP는 피부, 장 및 폐의 장벽 표면에 정렬된 상피 및 기질 세포에 의해 거의 대부분 생산되지만, 또한 알레르기성 질환과 연루된 다른 세포 유형 (예를 들어, 수지상 세포, 비만 세포, 평활근 세포)에 의해서도 생산된다. 생산은 프로테아제 알레르겐 (Kouzaki et al., J Immunol. 183(2):1427-34 (2009)), 바이러스, 박테리아, 염증 매개체, 담배 연기 및 환경 미립자 (Bleck et al., J Clin Immunol 28(2):147-156 (2008))를 포함한 수많은 인자에 대한 노출 시 유도된다.
- [0005] TSLP는 넓은 범위의 세포 유형 (예를 들어 수지상 세포, CD4+ T 세포, 호산구, 호염기구, 비만 세포 및 유형 2 선천성 림프성 세포 (ILC2) (Mjosberg et al., Immunity 37(4):649-59 (2012))에 대해 작용하여 염증, 및 특히 유형 2 염증 (시토카인 IL-5, IL-13 및 IL-4의 생산을 특징으로 함)을 유도한다. 유형 2 염증은 천식 및 다른 알레르기성 질환 예컨대 아토피성 피부염 및 니트레토 증후군의 특색이다. TSLP는 동물에서 섬유모세포 축적 및 콜라겐 침착을 유발하는 것으로 발견된 바 있고, 이는 섬유화 장애를 촉진하는데 있어서의 추가의 역할을 입증한다.
- [0006] 알레르기성 질환의 발생 및 유지에서의 TSLP의 중요한 역할은 전임상 동물 모델 데이터에 의해 지지된다. TSLP 신호전달이 결핍된 마우스는 천식의 발생에 대해 저항성이고 (Zhou et al., Nat Immunol 6(10): 1047-1053 (2005)), 항체에 의한 TSLP 또는 그의 수용체의 중화는 무린 또는 영양류 천식 또는 비염 모델에서 효과적이다. 예를 들어, 영양류 천식 모델 (아스카리스 수움(Ascaris suum) 항원에 대해 자연 감각된 시노물구스 원숭이)에서 항-TSLPR mAb를 사용하여 TSLP를 차단하는 것은 호산구증가증 기도 저항성 및 IL-13 수준을 감소시켰다 (Cheng et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology 132(2):455-462 (2013)).
- [0007] TSLP는 천식 대상체의 폐의 상피 및 고유관에서 mRNA 및 단백질의 수준 둘 다에서 과다발현되고 (Ying et al. J Immunol. 181(4):2790-2798 (2008); Shikotra et al. J Allergy Clin Immunol. 129(1):104-111 (2012); Kaur et al. Chest. 142(1):76-85 (2012)), 심지어 고용량 흡입용 코르티코스테로이드를 제공받은 환자에서도 그러하다. 천식에서 TSLP의 중요성에 대한 강한 지지 데이터는 경도의 천식환자에서의 알레르겐 챌린지 연구에서 항-TSLP 모노클로날 항체 (AMG-157/MEDI9929)의 효능으로부터 유래된다 (Gavreau et al., N Engl J Med. 370(22):2102-2110 (2014)). AMG-157에 의한 치료 (매월 1회 투여) 6 또는 12주 후에, FEV₁, 및 혈액 및 객담 호산구 카운트, 및 FeNO 수준에서의 변화에 의해 측정되는 초기 및 후기 반응에서 유의한 효과가 관찰되었다.
- [0008] 천식은 전세계에서 추정 3억명의 사람들에게 영향을 미치는 흔한 만성 질환이고, 증상은 많은 환자에서 질환의 중증도에 따라 기관지확장제 (예를 들어 β₂-아드레날린성 수용체 효능제) 및 흡입용 또는 경구 코르티코스테로이드를 사용하여 제어될 수 있다. 그러나, 다수의 중증도 및 중증 천식환자는 대증적이고 불충분하게 제어되는 상태로 남아있어, 삶의 질에 영향을 미치고 유의한 건강관리 부담을 나타낸다. 특히, 중증 천식을 갖는 많은 환자는 고용량 스테로이드에 대해 미반응성이거나 불량하게 반응할 수 있다.
- [0009] 오말리주맵 (졸레이어(Xolair)TM)은 인간화 IgG1 mAb-표적화 가용성 IgE이고, 통년성 공중 알레르겐에 대해 양성 피부 검사 또는 시험관내 반응성을 갖고 그의 증상이 흡입용 코르티코스테로이드에 의해 불충분하게 제어되는 중증도 내지 중증 지속성 천식을 갖는 성인 및 청소년 (12세 이상)의 치료에 대해 승인받았다. 현행 요법에 대한 보조제로서 사용되었을 때, 이는 악화를 감소시키는 것으로 증명된 바 있다 (Busse et al. Curr Med Res Opin. 2007 Oct;23(10):2379-86). 그러나, 오말리주맵은 모든 천식환자에게 적합하지 않고, 그의 용도는 특정한 규정된 기준, 예컨대 혈청 IgE 30-700 IU/ml를 충족시키는 환자로 제한된다.
- [0010] 따라서, 기존 표준 관리 요법에서 비제어되는 환자를 위한, 독립적 요법일 수 있거나 부가적 요법으로서 사용될 수 있는, 신규 천식 치료에 대한 상당한 필요가 존재한다.

발명의 내용

- [0011] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열식별번호: 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형을 갖는 이들 CDR 중 어느 하나 또는 모두의 변이체; 또는 서열식별번호: 9의 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 TSLP 결합 단백질을 제공한다.
- [0012] CDR 변이체는 적어도 1개의 아미노산에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 변형은 아미노산 서열의 화학적 또는 부분적 변경일 수 있고, 변형은 변이체가 비변형된 서열의 생물학적 특징을 보유하도록 한다. CDR 아미노산 서열의 부분적 변경은 1개 이상의 아미노산의 결실 또는 치환에 의한 것, 또는 1개 이상의

아미노산의 부가 또는 삽입에 의한 것, 또는 그의 조합에 의한 것일 수 있다. CDR 변이체는 아미노산 서열에서 1, 2 또는 3개의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 임의의 조합으로 함유할 수 있다.

[0013] 전형적으로, 변형은 예를 들어 하기 표 1에 제시된 바와 같은, 치환 또는 보존적 치환이다. 한 실시양태에서, CDR은 최대 3개의 아미노산, 예를 들어 1 또는 2개의 아미노산, 예를 들어 1개의 아미노산의 치환에 의해 변형된다. 한 실시양태에서 3개의 CDR 각각은 다른 2개의 CDR과 독립적으로 2, 1개의 아미노산 잔기에 의해 변형되거나, 또는 변형되지 않는다.

[0014] 표 1:

측쇄	구성원
소수성	Met, Ala, Val, Leu, Ile
중성 친수성	Cys, Ser, Thr
산성	Asp, Glu
염기성	Asn, Gln, His, Lys, Arg
쇄 배향에 영향을 미치는 잔기	Gly, Pro
방향족	Trp, Tyr, Phe

[0015]

[0016] 특정 CDR1 변이체에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 28에 상응하는 잔기는 Pro이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 30에 상응하는 잔기는 Arg이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 31에 상응하는 잔기는 Asn이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 32에 상응하는 잔기는 Trp이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 34에 상응하는 잔기는 Asp이다. 특정 CDR2 변이체에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 50에 상응하는 잔기는 Gly이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 53에 상응하는 잔기는 His이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 55에 상응하는 잔기는 Gln이다. 보다 특정한 CDR2 변이체에서, 이전에 확인되는 잔기에 더하여, 서열식별번호: 9에서 잔기 46에 상응하는 잔기는 Leu이다. 특정 CDR3 변이체에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 91에 상응하는 잔기는 Ile, Leu, Val 또는 Phe이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 92에 상응하는 잔기는 Gly 또는 Ala이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 93에 상응하는 잔기는 Glu, Phe, Asp 또는 Ser이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 94에 상응하는 잔기는 Asp이다. 보다 특정한 CDR3 변이체에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 91에 상응하는 잔기는 Ile, Leu 또는 Val이다.

[0017] 한 실시양태에서, CDR3은 서열 $X_1GlnX_2X_3X_4AspProX_5Thr$ 로 이루어지고, 여기서 X_1 은 Lys, Trp, Val, Met 또는 Ile를 나타내고, X_2 는 Val, Leu, Ile 또는 Phe를 나타내고, X_3 은 Gly 또는 Ala를 나타내고, X_4 는 Glu, Phe, Asp 또는 Ser을 나타내고, X_5 는 Val 또는 Thr을 나타낸다. 보다 특히, 서열 $X_1GlnX_2X_3X_4AspProX_5Thr$ 로 이루어지고, 여기서 X_1 은 Lys, Trp, Val 또는 Met을 나타내고, X_2 는 Val, Leu 또는 Ile를 나타내고, X_3 은 Gly 또는 Ala를 나타내고, X_4 는 Glu, Phe, Asp 또는 Ser을 나타내고, X_5 는 Val 또는 Thr을 나타낸다.

[0018] 보다 특정한 실시양태에서, TSLP 결합 단백질은 서열식별번호: 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다.

[0019] 상기 실시양태에서, CDR은 임의의 넘버링 규정, 예를 들어 카바트, 코티아, AbM 및 접촉 규정에 의해 정의될 수 있다. 대안적으로, CDR은 최소 결합 단위 (카바트, 코티아, AbM 및 접촉 정의에 의해 CDR의 일부를 형성하는 그러한 잔기)일 수 있다. 각각의 방법에 의해 정의된 서열식별번호: 9에 대한 CDR 영역이 표 2에 제시된다. 숙련된 관독자는 각각의 CDR1, CDR2 및 CDR3이 상이한 넘버링 규정에 의해 정의될 수 있거나, 또는 1종 초과 CDR이 동일한 넘버링 규정에 의해 정의될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0020] 표 2

	CDR1	CDR2	CDR3
카바트 CDR	RASRPIRNWLD (SEQ ID NO:1)	GASHLQS (SEQ ID NO:4)	VQIGEDPVT (SEQ ID NO:7)
코티아 CDR	RASRPIRNWLD (SEQ ID NO:1)	GASHLQS (SEQ ID NO:4)	VQIGEDPVT (SEQ ID NO:7)
AbM CDR	RASRPIRNWLD (SEQ ID NO:1)	GASHLQS (SEQ ID NO:4)	VQIGEDPVT (SEQ ID NO:7)
접촉 CDR	RNWLWDWY (SEQ ID NO:2)	LLIWGASHLQ (SEQ ID NO:5)	VQIGEDPV (SEQ ID NO:8)
최소 결합 단위	RNWLWD (SEQ ID NO:3)	GASHLQ (SEQ ID NO:6)	VQIGEDPV (SEQ ID NO:8)

[0021]

[0022]

상기 결합 단백질의 특정 실시양태에서, 모든 CDR은 카바트 넘버링 규정에 따라 정의되어, CDR1은 서열식별번호: 1로 정의된 서열 또는 그의 변이체로 이루어지고, CDR2는 서열식별번호: 4로 정의된 서열 또는 그의 변이체로 이루어지고, CDR3은 서열식별번호: 7로 정의된 서열 또는 그의 변이체로 이루어진다 (여기서 허용되는 변경은 상기 약속됨). 보다 특정한 실시양태에서, 모든 CDR은 카바트 넘버링 규정에 따라 정의되어, CDR1은 서열식별번호: 1로 정의된 서열로 이루어지고, CDR2는 서열식별번호: 4로 정의된 서열로 이루어지고, CDR3은 서열식별번호: 7로 정의된 서열로 이루어진다.

[0023]

또 다른 실시양태에서, CDR1 및 CDR3은 카바트 넘버링 규정에 따라 정의되어, CDR1은 서열식별번호: 1로 정의된 서열 또는 그의 변이체로 이루어지고, CDR3은 서열식별번호: 7로 정의된 서열 또는 그의 변이체로 이루어지고, CDR2는 접촉 넘버링 시스템에 따라 정의되어, 이는 서열식별번호: 5로 정의된 서열 또는 그의 변이체로 이루어진다. 보다 특정한 실시양태에서, CDR1은 서열식별번호: 1로 정의된 서열로 이루어지고, CDR3은 서열식별번호: 7로 정의된 서열로 이루어지고, CDR2는 서열식별번호: 5로 정의된 서열로 이루어진다.

[0024]

보다 특정한 실시양태에서, TSLP 결합 단백질은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 여기서

[0025]

(i) CDR1은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같거나, 또는 Val로 치환된 Ile 29 및 Met, Val, Ile 또는 Phe로 치환된 Leu 33으로부터 선택된 1종 이상의 치환을 갖는 이러한 서열의 변이체이고,

[0026]

(ii) CDR2는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같거나, 또는 Ala 51이 Thr로 치환된 이러한 서열의 변이체이고,

[0027]

(iii) CDR3은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같거나, 또는 Gln, Ser, Gly, Phe 또는 Leu로 치환된 Val 89; Asn 또는 His로 치환된 Gln 90; Val 또는 Phe로 치환된 Ile 91; Ala로 치환된 Gly 93; Ser로 치환된 Glu 93; Glu로 치환된 Asp 94; Pro, Tyr, Arg, Ile, Trp 또는 Phe로 치환된 Val 96으로부터 선택된 1종 이상의 치환을 갖는 이러한 서열의 변이체이다.

[0028]

본 발명의 문맥에서, 예를 들어 어구 "Val로 치환된 Ile29"에서의 용어 "로 치환된"은 첫번째 언급된 잔기 (이 경우에 Ile29)의 두번째 언급된 잔기 (이 경우에 Val)로의 대체를 지칭한다.

[0029]

상기 결합 단백질의 특정한 실시양태에서, TSLP 결합 단백질은 5 nM 이하의 IC50을 갖는다. 예를 들어, 본 발명은 서열식별번호: 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형을 갖는 이들 CDR 중 어느 하나 또는 모두의 변이체; 또는 서열식별번호: 9의 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 TSLP 결합 단백질을 제공하며; TSLP 결합 단백질은 5 nM 이하의 IC50을 갖는다.

[0030]

IC50은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 실시예 1에 기재된 수용체 결합 검정 또는 실시예 2에 기재된 세포 검정에서 또는 실시예 5에 기재된 인간 전혈 검정에서의 TSLP-유도된 TARC의 억제 (CCL17)에 의해 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, IC50은 실시예 2에 기재된 세포 검정에 의해 측정된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상이한 실험으로부터 계산된 IC50의 개별 값에서 변동이 존재한다는 것을 인지할 것이다. 한 실시양태에서, IC50 값은 적어도 3회의 실험으로부터 계산된 평균이다. 또 다른 실시양태에서, IC50 값은 적어도 3회의 실험으로부터 계산된 기하 평균이다.

- [0031] 상기 결합 단백질의 특정한 실시양태에서, TSLP 결합 단백질은 전장 인간 TSLP에 2 nM 미만의 해리 상수 (KD)로 결합한다. 한 실시양태에서, KD 값은 적어도 3회의 실험으로부터 계산된 평균이다.
- [0032] 상기 결합 단백질의 특정한 실시양태에서, TSLP 결합 단백질은 IL-7에 대해 어떠한 유의한 결합도 (한 실시양태에서, 어떠한 결합도) 나타내지 않는다. 결합 친화도는 평형 방법 (예를 들어, 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA) 또는 방사선면역검정 (RIA)) 또는 동역학 (예를 들어, 비아코어(Biacore)TM 분석)에 의해 결정될 수 있다.
- [0033] 상기 결합 단백질의 특정 실시양태에서, TSLP 결합 단백질은 전장 인간 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁한다.
- [0034] 상기 결합 단백질 중 임의의 것의 한 실시양태에서, TSLP 결합 단백질은 항-TSLP 단일 가변 도메인이다. 특정한 실시양태에서 단일 가변 도메인은 VL 도메인이다. 특정한 실시양태에서 VL 도메인은 V_K 도메인이다.
- [0035] TSLP 결합 단백질이 V_K 도메인인 한 실시양태에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 27에 상응하는 잔기는 Arg이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 29에 상응하는 잔기는 Ile이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 89에 상응하는 잔기는 Val이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 96에 상응하는 잔기는 Val이다. 한 실시양태에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 49에 상응하는 잔기는 Trp이다. 한 실시양태에서, 서열식별번호: 9에서 잔기 36에 상응하는 잔기는 Tyr이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 38에 상응하는 잔기는 Gln이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 44에 상응하는 잔기는 Pro이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 67에 상응하는 잔기는 Ser이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 87에 상응하는 잔기는 Tyr이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 98에 상응하는 잔기는 Phe이고, 서열식별번호: 9에서 잔기 100에 상응하는 잔기는 Gln이다.
- [0036] 보다 특정한 실시양태에서, 항-TSLP 단일 가변 도메인은 서열식별번호: 9로 정의된 서열, 또는 최대 10개의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 갖는 것에서 상이한 서열식별번호: 9의 변이체로 이루어지며, 단 부가, 결실, 또는 치환은 서열식별번호: 9의 잔기 28, 30, 31, 32, 34, 50, 53, 55, 91, 92, 93 및 94에 상응하는 위치가 아니다. 보다 특히, 항-TSLP 단일 가변 도메인은 서열식별번호: 9로 정의된 서열, 또는 최대 10개의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 갖는 것에서 상이한 서열식별번호: 9의 변이체로 이루어지며, 단 부가, 결실, 또는 치환은 서열식별번호: 9의 잔기 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 50, 53, 55, 89, 91, 92, 93, 94 및 96에 상응하는 위치가 아니다. 보다 더 특히, 항-TSLP 단일 가변 도메인은 서열식별번호: 9로 정의된 서열, 또는 최대 10개의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 갖는 것에서 상이한 서열식별번호: 9의 변이체로 이루어지며, 단 부가, 결실, 또는 치환은 서열식별번호: 9의 잔기 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 46, 49, 50, 53, 55, 89, 91, 92, 93, 94 및 96에 상응하는 위치가 아니다. 보다 특히, 항-TSLP 단일 가변 도메인은 서열식별번호: 9로 정의된 서열, 또는 최대 10개의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 갖는 것에서 상이한 서열식별번호: 9의 변이체로 이루어지며, 단 부가, 결실, 또는 치환은 서열식별번호: 9의 잔기 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 38, 44, 46, 49, 50, 53, 55, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 96, 98 및 100에 상응하는 위치가 아니다. 보다 특히, 항-TSLP 단일 가변 도메인은 서열식별번호: 9로 정의된 서열, 또는 최대 10개의 아미노산 부가, 결실 또는 치환을 갖는 것에서 상이한 서열식별번호: 9의 변이체로 이루어지며, 단 부가, 결실, 또는 치환은 서열식별번호: 9의 잔기 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 38, 44, 46, 49, 50, 53, 55, 67, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 96, 98 및 100에 상응하는 위치가 아니다. 상기 기재된 항-TSLP 단일 가변 도메인의 보다 더 특정한 실시양태에서, CDR은 상기 실시양태 중 임의의 것에 기재된 바와 같이 정의된다.
- [0037] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 서열식별번호: 9의 변이체가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 임의의 조합으로 함유할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 전형적으로, 변형은 치환이다. 한 실시양태에서, 서열은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산의 치환에 의해 변형된다. 보다 특정한 실시양태에서, 변형은 보존적 치환 (1개의 아미노산 잔기의 표 2의 동일한 군에서의 또 다른 잔기로의 치환)이다.
- [0038] 또 다른 실시양태에서, TSLP 결합 단백질 (항-TSLP 단일 가변 도메인)은 서열식별번호: 9로 정의된 서열 또는 서열식별번호: 9의 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 서열로 이루어진다. 보다 특정한 실시양태에서, 서열식별번호: 9와의 백분율 동일성은 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99 이상이다.
- [0039] 질의 아미노산 서열과 대상 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성은 백분율로 표현되는 동일성 값이고, 이는 쌍별 BLASTP 정렬을 수행한 후 대상 아미노산 서열이 질의 아미노산 서열과 100% 질의 적용범위를 갖는 경우에 BLASTP 알고리즘에 의해 계산된다. 질의 아미노산 서열과 대상 아미노산 서열 사이의 이러한 쌍별 BLASTP 정렬

은 국립 생명공학 연구 센터의 웹사이트 상에서 이용가능한 BLASTP 알고리즘의 디폴트 세팅을 사용하고 낮은 복잡성 영역에 대한 필터를 턴 오프하여 수행한다.

- [0040] 백분율 동일성은 질의 서열의 전체 길이에 걸쳐 결정될 수 있다. 대안적으로, 백분율 동일성은 고정된/무손상인 특정한 잔기를 제외할 수 있다. 한 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 28, 30, 31, 32, 34, 49, 50, 53, 55, 91, 92, 93 및 94에 상응하는 잔기는 고정된다. 보다 특정한 실시양태에서, 서열식별번호: 9의 위치 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 50, 53, 55, 89, 91, 92, 93 및 96에 상응하는 잔기는 고정된다. 보다 더 특히, 서열식별번호: 9의 위치 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 46, 49, 50, 53, 55, 89, 91, 92, 93, 94 및 96에 상응하는 잔기는 고정된다. 보다 더 특히, 서열식별번호: 9의 위치 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 38, 44, 46, 49, 50, 53, 55, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 96, 98 및 100에 상응하는 잔기는 고정된다. 보다 특히, 서열식별번호: 9의 위치 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 38, 44, 46, 49, 50, 53, 55, 67, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 96, 98 및 100에 상응하는 잔기는 고정된다. 한 실시양태에서, 고정된 위치를 제외하고 서열식별번호: 9와의 백분율 동일성은 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99 이상이다.
- [0041] 또 다른 실시양태에서, 백분율 동일성은 CDR (상기 실시양태 중 임의의 것에 기재된 바와 같이 규정될 수 있음) 및 서열식별번호: 9의 위치 49에 상응하는 잔기를 제외할 수 있다. 보다 특히, 백분율 동일성은 CDR (상기 실시양태 중 임의의 것에 기재된 바와 같이 규정될 수 있음) 및 서열식별번호: 9의 위치 36, 38, 44, 46, 49, 87, 98 및 100에 상응하는 잔기를 제외할 수 있다. 보다 더 특히, 백분율 동일성은 CDR (상기 실시양태 중 임의의 것에 기재된 바와 같이 규정될 수 있음) 및 서열식별번호: 9의 위치 36, 38, 44, 46, 49, 67, 87, 98 및 100에 상응하는 잔기를 제외할 수 있다. 한 실시양태에서, 고정된 위치를 제외하고 서열식별번호: 9와의 백분율 동일성은 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99 이상이다.
- [0042] 한 실시양태에서, 항-TSLP 단일 가변 도메인은 서열식별번호: 9로 정의된 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0043] 한 실시양태에서, 항-TSLP 단일 가변 도메인은 서열식별번호: 12, 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 서열식별번호: 28, 서열식별번호: 29, 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 33, 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 35 및 서열식별번호: 36으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 보다 특정한 실시양태에서, 아미노산 서열은 RT로 끝나는 C-말단을 갖는다. 대안적 실시양태에서, 아미노산 서열은 R로 끝나지 않는 C-말단을 갖는다.
- [0044] 한 실시양태에서, 항-TSLP 단일 가변 도메인은 서열식별번호: 12, 서열식별번호: 23, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 27, 서열식별번호: 28, 서열식별번호: 29, 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 32, 서열식별번호: 33, 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 35 및 서열식별번호: 36으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0045] 한 실시양태에서, 상기 기재된 항-TSLP 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드가 제공된다.
- [0046] 또 다른 측면에서, 본 발명은 특정한 에피토프에 결합하는 TSLP 결합 단백질을 제공한다. 한 실시양태에서, 특정한 TSLP 결합 단백질에 대한 에피토프 잔기는 Qt-PISA v2.0.1 소프트웨어 (Protein Interfaces, Complexes and Assemblies; Krissinel and Henrick (2007))를 사용하여, TSLP 결합 단백질에의 결합 시 노출된 표면적의 20% 이상이 매립되게 되는 전장 인간 TSLP 상의 그러한 잔기인 것으로 확인될 수 있다. 에피토프 잔기는 따라서 전장 인간 TSLP의 하기 잔기: Tyr15, Lys31, Ser32, Thr33, Phe35, Asn36, Asn37, Ser40, Cys41, Ser42, Ser114, Gln115, Gln117, Gly118, Arg121, Arg122, Arg125, Pro126, Leu128 및 Lys 129를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 특정한 TSLP 결합 단백질에 대한 에피토프 잔기는 Qt-PISA v2.0.1 소프트웨어 (Protein Interfaces, Complexes and Assemblies; Krissinel and Henrick (2007))를 사용하여, TSLP 결합 단백질에의 결합 시 % 매립된 표면적에서 증가를 나타내는 전장 인간 TSLP 상의 그러한 잔기인 것으로 확인될 수 있다. 이미 확인된 잔기에 더하여, 에피토프 잔기는 따라서 전장 인간 TSLP의 하기 잔기: Ser20, Ile24, Glu34, Thr38, Val39, Asn43, His46, Asn124 및 Leu127을 추가로 포함할 수 있다.
- [0047] 한 실시양태에서, 상기 기재된 에피토프에 결합하는 TSLP 결합 단백질은 항체이다. 보다 특히, 상기 언급된 에피토프에 결합하는 TSLP 결합 단백질은 단일 가변 도메인이다. 보다 특정한 실시양태에서 단일 가변 도메인은 VL 도메인이다. 보다 특히, VL 도메인은 V_K 도메인이다. 한 실시양태에서, 상기 언급된 에피토프에 결합하는 단일 가변 도메인은 비-자연 발생이다.
- [0048] 특정한 실시양태에서, 상기 기재된 에피토프에 결합하는 TSLP 결합 단백질은 IL-7에 대해 어떠한 유의한 결합도 (한 실시양태에서, 어떠한 결합도) 나타내지 않는다. 결합 친화도는 평형 방법 (예를 들어, 효소-연결된 면역

흡착 검정 (ELISA) 또는 방사선면역검정 (RIA)) 또는 동역학 (예를 들어, 비아코어™ 분석)에 의해 결정될 수 있다.

- [0049] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 CDR: 서열식별번호: 9로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 이들 CDR 중 어느 하나 또는 모두의 변이체를 포함하는 TSLP 결합 단백질을 제공하며, 여기서 TSLP 결합 단백질은 TSLP에 2nM 미만의 해리 상수 (KD)로 결합하거나 또는 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁한다. 의심을 피하기 위해, TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁하는 TSLP 결합 단백질은 또한 서열식별번호: 9로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 이들 CDR 중 어느 하나 또는 모두의 변이체를 가져야 한다. 경쟁 연구에 사용되는 TSLP는, 한 실시양태에서, 전장 인간 TSLP이다.
- [0050] 보다 특정한 실시양태에서, 본 발명은 하기 CDR: 서열식별번호: 9로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 이들 CDR 중 어느 하나 또는 모두의 변이체를 포함하는 TSLP 결합 단백질을 제공하며, 여기서 TSLP 결합 단백질은 TSLP에 2nM 미만의 해리 상수 (KD)로 결합하고 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁한다.
- [0051] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은
- [0052] (i) 서열식별번호: 1에 따른 CDR1, 또는 Ile 29가 Val로 치환되고; Leu 33이 Met, Val, Ile 또는 Phe로 치환된 서열식별번호: 1의 변이체;
- [0053] (ii) 서열식별번호: 4에 따른 CDR2, 또는 Ala 51이 Thr로 치환된 서열식별번호: 4의 변이체, 및
- [0054] (iii) 서열식별번호: 7에 따른 CDR3, 또는 Val 89가 Gln, Ser, Gly, Phe 또는 Leu로 치환되고; Gln 90이 Asn 또는 His로 치환되고; Ile 91이 Phe 또는 Val로 치환되고; Glu 93이 Ser로 치환되고; Val 96이 Pro, Tyr, Arg, Ile, Trp 또는 Phe로 치환된 서열식별번호: 7의 변이체
- [0055] 를 포함하는 TSLP 결합 단백질을 제공하며;
- [0056] 여기서 TSLP 결합 단백질은 TSLP에 2nM 미만의 해리 상수 (KD)로 결합할 수 있고/거나 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁한다.
- [0057] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 TSLP에 2nM 미만의 해리 상수 (KD)로 결합하고/거나 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁하는, 최대 10개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 임의의 조합으로 갖는 서열식별번호: 9에 따른 아미노산 서열을 포함하는 항-TSLP 단일 가변 도메인을 제공한다.
- [0058] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 개시내용의 항-TSLP 단일 가변 도메인을 포함하는 단리된 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 상기 단리된 폴리펩티드는 TSLP에 결합한다.
- [0059] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 개시내용의 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을, 그것을 포함하는 벡터 및 숙주 세포 및 그것을 생산하는 방법과 함께 제공한다.
- [0060] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 개시내용의 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 이러한 폴리펩티드 또는 제약 조성물은 TSLP 신호전달과 연관된 질환의 치료에 사용될 수 있다.
- [0061] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 개시내용의 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드, 및 상기 개시내용의 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드를 흡입하기 위한 장치를 포함하는 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 항-TSLP dAb의 생성, 최적화 및 특징화를 제시하는 흐름도이다.
- 도 2는 기존 인간 항-V_K (HAVK) 항체에 대한 dAb의 결합을 제시하는 그래프이다: DOM-30h-440-87, DOM-30h-440-88, DOM-30h-440-90 및 DOM-30h-440-91 (C-말단에 -R 또는 +T 변형을 갖는 V_K dAb)은 DT02-K-044-085 (비변형된 천연 C-말단)와 비교 시 기존 HAVK 항체에 대해 감소된 결합을 갖는다.
- 도 3은 DOM-30h-440-81/86이 재조합 인간 TSLP (1ng/ml) 및 천연 인간 TSLP (인간 폐 섬유모세포로부터의 상청액)의 TSLP 수용체 복합체에 대한 결합을 억제한다는 것을 제시하는 그래프이다 (TSLP 수용체 결합 검정 (RBA)).
- 도 4는 dAb DT02-K-044-085 (비변형된 천연 C-말단)와 비교 시 DOM-30h-440-81/86 (-R C-말단)에 대한 기존 항

체를 함유하는 건강한 인간 공여자 혈청 샘플의 빈도를 제시하는 그래프이다.

도 5는 150L 규모로의 DOM30h-440-81/86의 생산을 위한 발효 공정을 제시하는 흐름도이다.

도 6은 정화된 발효 브로쓰로부터 DOM30h-440-81/86의 정제를 위한 하류 정제 공정을 제시한다.

도 7은 TSLP- DOM30h-440-81/86 (흑색 리본)과 문헌 복합체 TSLP/IL7R α/TSLPR 복합체 (PDB: 4NN7, 보다 연한 회색 음영 내)의 X선 구조의 오버레이이다.

도 8은 TSLP의 개별 잔기에 대한 TSLP- DOM30h-440-81/86 복합체 형성 시 매립된 % 표면적을 제시한다.

도 9는 DOM30h-440-81/86의 개별 잔기에 대한 TSLP- DOM30h-440-81/86 복합체 형성 시 매립된 % 표면적을 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 개시내용은 TSLP 결합 단백질, 특히, 항-TSLP 단일 가변 도메인 (항-TSLP 도메인 항체 또는 dAb)에 관한 것이다. 개시내용의 TSLP 결합 단백질이 본원에 기재된 천식 및 다른 질환의 치료 또는 예방을 위한 이상적인 후보가 되게 하는 주요 특색/특징이 하기 기재된다:
- [0064] 크기: 항-TSLP 단일 가변 도메인은 모노클로날 항체, f(Ab')₂ 또는 fAb 단편보다 더 작고, 따라서 보다 큰 분자와 비교 시 보다 많은 수의 길항제 dAb 분자가 폐로 전달될 수 있기 때문에 (단백질 mg당) 흡입 전달을 위한 치료제로서 이점을 갖는다. 비변형된 도메인 항체 (Fc 도메인이 결여된 것)는 신장 여과에 의해 전신 구획으로부터 신속하게 소거되고, 따라서, 전신 노출을 최소화하면서 폐 노출을 최대화하기 위해 흡입 전달에 적합할 수 있다.
- [0065] 친화도/효력: 본 발명의 한 실시양태는 인간 TSLP의 중화를 가능하게 하기에 적합하게 높은 친화도/효력의 길항제를 제공한다. 친화도/효력이 충분히 높지 않으면, 결합 단백질은 TSLP를 효과적으로 중화시킬 수 없고/거나, 신체에서 TSLP를 억제하는데 요구되는 용량이 높아지고 이는 달성가능하지 않거나 상업적으로 실행가능하지 않을 수 있다. 본원에 기재된 dAb 분자는 시험된 검정에서 인간 TSLP의 중화를 제공하는 친화도/효력을 갖기 위해 선택 및 최적화되고, 이들 dAb는 인간에서, 예를 들어 흡입 전달 후 폐에서 TSLP의 중화에 적합하다.
- [0066] 메카니즘: TSLP 수용체 복합체는 항원-제시 세포 상에 존재하기 때문에, 본 발명의 한 측면은 TSLP 결합 단백질이 TSLP가 TSLP 수용체 복합체에 결합하는 것을 방지하는 것을 제공한다. IL-7R α 쇄의 동원을 방지함으로써 또는 TSLPR (또는 IL-7R α)에 직접적으로 결합함으로써 작용하는 TSLP 길항제는, TSLP에 결합하여 TSLP와의 복합체로서 용액 중에 체류하는 TSLP 길항제보다 항원으로서 더 효과적으로 내재화되고 프로세싱될 수 있다. 실시예 14 및 도 7은 DOM30h-440-81/86이 TSLP가 TSLP 수용체 복합체에 결합하는 것을 방지한다는 것을 제시하고, 인간 전장 TSLP 상의 DOM30h-440-81/86에 대한 에피토프를 형성하는 잔기를 확인시켜준다. 이러한 에피토프에 대한 파라토프를 형성하는 잔기가 또한 확인된다.
- [0067] 선택성: 본원에 기재된 TSLP 결합 단백질은 인간 TSLP에 결합하고 중화시키지만, 관련된 시토카인 IL-7에 대해서는 유의한 결합을 갖지 않는 것을 포함한다. IL-7은 림프성 세포에 대한 성장 인자로서의 작용을 포함하여 신체에서 별개의 작용을 갖기 때문에, 본 발명의 한 측면은 이러한 TSLP 결합 단백질을 제공한다. TSLP 및 IL-7 둘 다의 활성을 증화시키는 길항제는 TSLP-선택적 길항제와 비교 시 인간에서 상이한 효과를 야기할 가능성이 있다.
- [0068] 인간 TSLP의 억제: 본원에 기재된 TSLP 결합 단백질은 재조합적으로 생산된 (예를 들어 이. 콜라이(E. coli) 또는 HEK - 인간 배아 신장 - 세포로부터 발현된) 전장 인간 TSLP 및 천연 인간 TSLP (예를 들어 염증성 시토카인을 사용하여 인간 폐 섬유모세포를 자극함으로써 생산됨)에 결합하고 중화시킨다. 예를 들어, DOM30h-440-81/86은 전장 재조합 인간 TSLP (이. 콜라이 (표 9) 또는 HEK 세포 (표 10)로부터 발현됨) 및 인간 세포로부터 발현된 천연 인간 TSLP (실시예 7) 둘 다에 결합하고 중화시킨다. 본 발명의 한 실시양태에서, 천연 인간 TSLP는 글리코실화될 수 있는 반면에, 이. 콜라이에서 발현된 재조합 인간 TSLP는 글리코실화되지 않는다. 실시예 9는 DOM30h-440-81/86이 전장 인간 TSLP에 결합하고 짧은 이소형에는 결합하지 않는다는 것을 제시한다.
- [0069] 발현 수준: 많은 양의 항-TSLP 단일 가변 도메인 길항제의 제조를 용이하게 하기 위해, dAb 분자는 효율적으로 발현될 수 있다. 본원에 기재된 dAb 분자는 이. 콜라이로부터 높은 수준으로 발현될 수 있다. 실시예 10 및 도 5는 DOM30h-440-81/86의 생산을 위한 발효 공정을 기재한다.

- [0070] 하류 정제 공정: 많은 양의 TSLP 길항제의 제조를 용이하게 하기 위해, 본 발명의 한 측면은 dAb 항-TSLP 단일 가변 도메인이 세포 상정액으로부터 효율적으로 정제될 수 있다는 것을 제공한다. 본원에 기재된 dAb 분자는 단백질 L에 대한 그의 높은 친화도로 인해 친화성 크로마토그래피 방법을 사용하여 효율적으로 정제될 수 있다. 실시예 10 및 도 6은 DOM30h-440-81/86의 생산을 위한 하류 정제 공정을 기재한다.
- [0071] 생물물리학적 특징: 인간에의 투여를 용이하게 하기 위해, 본 발명의 한 실시양태는 TSLP 결합 단백질이 용액 중 높은 용해도 및 낮은 수준의 응집 및/또는 단편화 둘 다를 갖는다는 것을 제공한다. DOM30h-440-81/86에 의해 예시되는 항-TSLP dAb 분자는 높은 열적 안정성, pH 및 온도 스트레스에 대한 저항성 및 낮은 수준의 응집을 제시하였다.
- [0072] 분무 건조에 대한 안정성: TSLP 결합 단백질의 건조 분말 제제의 전달을 용이하게 하기 위해, 본 발명의 한 측면은 항-TSLP 단일 가변 도메인이 동결-건조 및/또는 분무-건조 공정에 대해 안정하다는 것을 제공한다. 온도 스트레스 및 전단 스트레스에 대한 안정성은 높은 용융 온도 (T_m)를 갖는 TSLP를 선택하는 것에 의해 최대화될 수 있다. 특히, DOM30h-440-81/86은 시험된 것 중 최고 T_m을 갖는다.
- [0073] 본 발명의 실시양태는 분명하고 간결한 명세서가 쓰여질 수 있도록 하는 방식으로 기재된다. 실시양태는 개시 내용으로부터 벗어나지 않으면서 다양하게 조합되거나 분리될 수 있는 것으로 의도되며, 그러한 것을 인지해야 한다.
- [0074] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 관련 기술분야의 (예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학, 혼성화 기술 및 생화학의) 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 표준 기술이 분자적, 유전자적 및 생화학적 방법 (일반적으로, 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 및 Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc.] 참조) 및 화학적 방법에 사용된다.
- [0075] 본원에 사용된 용어 "TSLP 결합 단백질"은 TSLP에 결합할 수 있는 항체 및 다른 단백질 구축물, 예컨대 도메인을 지칭한다. 용어 "항원 결합 단백질" 및 "TSLP 결합 단백질"은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0076] 본원에 사용된 "TSLP"는 자연 발생 또는 내인성 포유동물 TSLP 단백질 및 자연 발생 또는 내인성 TSLP 단백질의 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질 (예를 들어, 재조합 단백질, 합성 단백질)을 지칭한다. 따라서, 본원에 정의된 바와 같은 이러한 용어는 성숙 TSLP 단백질, TSLP의 다형성 또는 대립유전자 변이체 및 다른 이소형 및 상기한 것의 변형 및 비변형된 형태 (예를 들어, 지질화, 글리코실화)를 포함한다. 인간 TSLP는, 예를 들어, 문헌 [Liu et al. (Annu. Rev. Immunol. 2007. 25:193-219)]에 기재되어 있다. 성숙 인간 TSLP (전장 TSLP로도 공지됨)는 131-아미노산 (15KD) 4개 α-나선 다발 시토키인이다. 인간 TSLP의 2종의 다른 스플라이스 변이체가 예측된다: 하나의 스플라이스 변이체는 동일한 131-아미노산 분비된 단백질을 코딩하고, 다른 스플라이스 변이체는 대략 60개의 아미노산의 말단절단된 C-말단 이소형을 생성한다.
- [0077] 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드와 관련된 용어 "항-TSLP"는 TSLP를 인식하고 이에 결합하는 모이어티를 의미한다. 한 실시양태에서, "항-TSLP"는 인간 TSLP를 특이적으로 인식하고/거나 이에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, TSLP 결합 단백질은 TSLP:IL-7Rα 복합체에 대한 TSLP의 결합에 수반되는 인간 TSLP의 잔기에 결합한다.
- [0078] 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고, 이뮤노글로불린-유사 도메인을 갖는 분자 (예를 들어, IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE)를 지칭하며, 모노클로날, 재조합, 폴리클로날, 키메라, 인간, 인간화, 이중특이적 항체를 포함한 다중특이적 항체, 및 이중접합체 항체; 단일 가변 도메인 (예를 들어, VH, VHH, VL), 항원 결합 항체 단편, Fab, F(ab')₂, Fv, 디설피드 연결된 Fv, 단일 쇠 Fv, 디설피드 연결된 scFv, 디아바디, TANDABS™ 등, 및 상기 중 임의의 것의 변형된 버전을 포함한다.
- [0079] 대안적 항체 포맷은 항원 결합 단백질의 1개 이상의 CDR이 적합한 비-이뮤노글로불린 단백질 스캐폴드 또는 골격 상에 배열될 수 있는 대안적 스캐폴드, 예컨대 아피바디, SpA 스캐폴드, LDL 수용체 클래스 A 도메인, 아비머 또는 EGF 도메인을 포함한다.
- [0080] 용어 "도메인"은 단백질의 나머지와 독립적으로 그의 3차 구조를 유지하는 폴딩된 단백질 구조를 지칭한다. 일반적으로, 도메인은 단백질의 별개의 기능적 특성을 담당하고, 다수의 경우에서, 단백질의 나머지 및/또는 도메인의 기능 상실 없이 다른 단백질에게 부가되거나, 제거되거나 또는 옮겨질 수 있다.

- [0081] 용어 "단일 가변 도메인"은 항체 가변 도메인의 서열 특징을 포함하는 폴딩된 폴리펩티드 도메인을 지칭한다. 따라서, 이는 완전한 항체 가변 도메인, 예컨대 VH, VHH 및 VL, 및 예를 들어 1개 이상의 루프가 항체 가변 도메인의 특징이 아닌 서열로 대체된 변형된 항체 가변 도메인, 또는 말단절단되거나 N- 또는 C-말단 연장을 포함하는 항체 가변 도메인, 뿐만 아니라 적어도 전장 도메인의 결합 활성 및 특이성을 보유하는 가변 도메인의 폴딩된 단편을 포함한다. 단일 가변 도메인은 상이한 가변 영역 또는 도메인과 독립적으로 항원, 이 경우에는 TSLP, 또는 에피토프에 결합할 수 있다. "도메인 항체" 또는 "dAb"는 "단일 가변 도메인"과 동일한 것으로 간주될 수 있다. 단일 가변 도메인은 인간 단일 가변 도메인일 수 있지만, 또한 다른 종으로부터의 단일 가변 도메인 예컨대 설치류, 너스 상어 및 낙타류 VHH dAb를 포함한다. 낙타류 VHH는 낙타, 라마, 알파카, 단봉낙타 및 구아나코를 포함한 종으로부터 유래된 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인 폴리펩티드이고, 이는 자연적으로 경쇄가 결합된 중쇄 항체를 생산한다. 이러한 VHH 도메인은 관련 기술분야에서 이용가능한 표준 기술에 따라 인간화될 수 있고, 이러한 도메인은 "단일 가변 도메인"인 것으로 간주된다. 본원에 사용된 VH는 낙타류 VHH 도메인을 포함한다. 특정한 실시양태에서 단일 가변 도메인은 VL 도메인이다. 특정한 실시양태에서 VL 도메인은 V_K 도메인이다. 한 실시양태에서, 단일 가변 도메인은 비-자연 발생이다.
- [0082] 항원 결합 단편은 비-항체 단백질 스캐폴드 상의 1개 이상의 CDR의 배열에 의해 제공될 수 있다. 본원에 사용된 "단백질 스캐폴드"는 4 쇠 또는 2 쇠 항체일 수 있거나, 또는 항체의 Fc 영역만을 포함할 수 있거나, 또는 항체로부터의 1개 이상의 불변 영역을 포함할 수 있고 불변 영역은 인간 또는 영장류 기원일 수 있거나, 또는 인간 및 영장류 불변 영역의 인공 키메라일 수 있는 이뮤노글로불린 (Ig) 스캐폴드, 예를 들어 IgG 스캐폴드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0083] 단백질 스캐폴드는 Ig 스캐폴드, 예를 들어 IgG 또는 IgA 스캐폴드일 수 있다. IgG 스캐폴드는 항체의 도메인의 일부 또는 모두 (즉, CH1, CH2, CH3, VH, VL)를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 IgG4PE로부터 선택된 IgG 스캐폴드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 스캐폴드는 IgG1일 수 있다. 스캐폴드는 항체의 Fc 영역으로 이루어질 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있거나, 또는 그의 일부이다.
- [0084] 단백질 스캐폴드는 CTLA-4, 리포칼린, 단백질 A 유래된 분자 예컨대 단백질 A의 Z-도메인 (아피바디, SpA), A-도메인 (아비머/맥시바디); 열 쇼크 단백질 예컨대 GroE1 및 GroES; 트랜스페린 (트랜스-바디); 안키린 반복 단백질 (DARPin); 펩티드 압타머; C-유형 렉틴 도메인 (테트라렉틴); 인간 γ -결정질 및 인간 유비퀴틴 (아필린); PDZ 도메인; 인간 프로테아제 억제제의 전갈 독소 쿠니츠 유형 도메인; 및 피브로넥틴/애드넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 스캐폴드의 유도체일 수 있으며; 이는 천연 리간드와 다른 항원, 예컨대 TSLP에 대한 결합을 수득하기 위해 단백질 조작에 적용된 바 있다.
- [0085] "dAb 접합체"는 약물이 공유 또는 비공유 연결에 의해 화학적으로 접합된, 본원에 개시된 바와 같은 항-TSLP dAb를 포함하는 조성물을 지칭한다. 한 실시양태에서, dAb 및 약물은 공유 결합된다. 이러한 공유 연결은 펩티드 결합을 통해 또는 다른 수단 예컨대 변형된 측쇄를 통해 이루어질 수 있다. 비공유 결합은 직접적 (예를 들어, 정전기적 상호작용, 수소성 상호작용) 또는 간접적 (예를 들어, 상보적 결합 파트너 (예를 들어, 비오틴 및 아비딘)의 비공유 결합을 포함)일 수 있으며, 여기서 1개의 파트너는 약물에 공유 결합되고 상보적 결합 파트너는 dAb에 공유 결합된다. 상보적 결합 파트너가 사용되는 경우에, 결합 파트너 중 하나는 약물에 직접적으로 또는 적합한 링커 모이어티를 통해 공유 결합될 수 있고, 상보적 결합 파트너는 dAb에 직접적으로 또는 적합한 링커 모이어티를 통해 공유 결합될 수 있다.
- [0086] 본원에 사용된 "dAb 융합"은 본원에 개시된 바와 같은 항-TSLP dAb 및 폴리펩티드 약물 (dAb 또는 mAb일 수 있음)을 포함하는 융합 단백질을 지칭한다. dAb 및 폴리펩티드 약물은 단일 연속 폴리펩티드 쇠의 개별 부분 (모이어티)으로서 존재한다.
- [0087] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 항원 결합 단백질은 인간 TSLP와 또 다른 종으로부터의 TSLP, 예컨대 시노물구스 원숭이 TSLP 사이에 교차-반응성을 제시한다. 또 다른 실시양태에서, 개시내용의 항원 결합 단백질은 인간 및 원숭이 TSLP에 특이적으로 결합한다. 이러한 교차-반응성은 약물 개발이 전형적으로 약물을 인간에서 시험하기 전에 리드 약물 후보를 동물 시스템에서 시험하는 것을 필요로하기 때문에 유용하다. 인간 및 원숭이 종에 결합할 수 있는 약물의 제공은 이들 시스템에서 결과를 시험하고, 동일한 약물을 사용한 데이터를 병렬 비교하는 것을 가능하게 한다. 이러한 약물을 제공하는 것은 설치류 또는 원숭이 TSLP에 대해 불리하게 작용하는 약물 및 인간 TSLP에 대해 불리하게 작용하는 별개의 약물을 발견해야 하는 필요의 복잡성을 피하고, 또한 비-동일한 약물을 사용하여 인간 및 동물에서 결과를 비교해야 하는 필요를 피한다. 한 실시양태에서, 개시내용의 항원 결합 단백질은 인간 및 시노물구스 원숭이 TSLP에 특이적으로 결합한다.

- [0088] 임의로, 적어도 시노물구스 TSLP에 대한 항원 결합 단백질의 결합 친화도와 인간 TSLP에 대한 결합 친화도는 2, 5, 10, 50 또는 100배 이하만큼 상이하다. 한 실시양태에서, 시노물구스 TSLP에 대한 결합 친화도와 인간 TSLP에 대한 결합 친화도는 5배 이하만큼 상이하다. 또 다른 실시양태에서, 시노물구스 TSLP에 대한 결합 친화도와 인간 TSLP에 대한 결합 친화도는 2배 이하만큼 상이하다.
- [0089] 친화도는 하나의 분자, 예를 들어 개시내용의 항원 결합 단백질의 또 다른 것, 예를 들어 그의 표적 항원에 대한 단일 결합 부위에서의 결합 강도이다. 항원 결합 단백질의 그의 표적에 대한 결합 친화도는 평형 방법 (예를 들어 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA) 또는 방사선면역검정 (RIA)) 또는 동역학 (예를 들어 비아코어™ 분석)에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 실시예 1에 기재된 비아코어™ 방법이 결합 친화도를 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0090] 한 실시양태에서, 항원 결합 단백질-TSLP 상호작용, 특히 항원 결합 단백질-인간 TSLP 상호작용의 평형 해리 상수 (KD)는 100 nM 이하, 10 nM 이하, 5nM 이하, 2 nM 이하 또는 1 nM 이하이다. 또 다른 실시양태에서, KD (인간 TSLP에 대한 것)는 2nM 미만이다. 대안적으로 KD (인간 TSLP에 대한 것)는 0.5 내지 2 nM일 수 있다. KD (인간 TSLP에 대한 것)는 500 pM 내지 1 nM일 수 있다. 통상의 기술자는 KD 수치가 더 작을수록 결합은 더 강하다는 것을 인지할 것이다. KD의 역수 (즉 1/KD)는 단위 M⁻¹을 갖는 평형 회합 상수 (KA)이다. 통상의 기술자는 KA 수치가 더 클수록 결합은 더 강하다는 것을 인지할 것이다.
- [0091] 해리율 상수 (kd) 또는 "오프-레이트"는 항원 결합 단백질-TSLP 복합체의 안정성, 즉 초당 붕괴되는 복합체의 분율을 기재한다. 예를 들어, 0.01 s⁻¹의 kd는 초당 1%의 복합체 붕괴와 동등하다. 한 실시양태에서, 해리율 상수 (kd)는 1x10⁻³ s⁻¹ 이하이다. kd는 1x10⁻⁴ s⁻¹ 내지 1x10⁻³ s⁻¹일 수 있다.
- [0092] 회합률 상수 (ka) 또는 "온-레이트"는 항원 결합 단백질-TSLP 복합체 형성의 비율을 기재한다. 한 실시양태에서, 회합률 상수 (인간 TSLP에 대한 것) (ka)는 1x10⁵ M⁻¹s⁻¹ 초과이다. 한 실시양태에서, 인간 TSLP에 대한 ka는 4x10⁵ M⁻¹s⁻¹ 내지 8 x10⁵ M⁻¹s⁻¹이다.
- [0093] TSLP 결합 단백질과 참조 단일 가변 도메인, 예를 들어 서열식별번호: 9 사이의 경쟁은 경쟁 ELISA, FMAT 또는 비아코어에 의해 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, 경쟁 검정은 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 수행된다. 이러한 경쟁에 대한 여러 가능한 이유가 존재한다: 2종의 단백질은 동일 또는 중첩 에피토프에 결합할 수 있거나, 결합의 입체 역제가 존재할 수 있거나, 또는 제1 단백질의 결합이 제2 단백질의 결합을 방지하거나 감소시키는 항원에서의 입체형태적 변화를 유도할 수 있다. 한 실시양태에서, 개시내용의 TSLP 결합 단백질은 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁한다. 한 실시양태에서, 경쟁 검정에 사용된 TSLP는 전장 인간 TSLP이다.
- [0094] 생물학적 활성의 감소 또는 억제는 부분적이거나 전체적일 수 있다. 중화 항원 결합 단백질은 TSLP의 활성을 TSLP 결합 단백질의 부재 시의 TSLP 활성에 비해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중화할 수 있다.
- [0095] 본원에 사용된 용어 "중화하다"는 TSLP의 생물학적 활성이, 시험관내 또는 생체내에서, 항원 결합 단백질의 부재 하의 TSLP의 활성과 비교 시, 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질의 존재 하에 감소된다는 것을 의미한다. 중화는 그의 수용체에의 TSLP 결합의 차단, TSLP가 그의 수용체를 활성화하는 것의 방지, TSLP 또는 그의 수용체의 하향 조절, 또는 이펙터 기능성에 영향을 미치는 것 중 1종 이상으로 인한 것일 수 있다. 예를 들어, 실시예 1에 기재된 수용체 결합 검정 (RBA) 방법은 TSLP 결합 단백질의 중화 능력을 평가하는데 사용될 수 있다.
- [0096] "CDR"은 항원 결합 단백질의 상보성 결정 영역 아미노산 서열로 정의된다. 이는 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 추가변 영역이다. 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR (또는 CDR 영역)이 이뮤노글로불린의 가변 부분에 존재한다. 따라서, 본원에 사용된 "CDR"은 모든 3개의 중쇄 CDR, 모든 3개의 경쇄 CDR, 모든 중쇄 및 경쇄 CDR, 또는 적어도 2개의 CDR을 지칭한다. 단일 가변 도메인의 경우에 3개의 CDR이 존재한다.
- [0097] 본 명세서 전체에서, 가변 도메인 서열 및 전장 항체 서열 내의 아미노산 잔기는 카바트 넘버링 규정에 따라 넘버링된다. 유사하게, 실시예에서 사용되는 용어 "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3"은 카바트 넘버링 규정을 따른다. 추가의 정보에 대해서는, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National

Institutes of Health (1991)]을 참조한다.

[0098] 상기 논의된 바와 같이, 가변 도메인 서열 및 전장 항체 서열 내의 아미노산 잔기에 대한 대안적 넘버링 규정이 존재한다. 또한, CDR 서열에 대한 대안적 넘버링 규정, 예를 들어 문헌 [Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883]에 제시된 것이 존재한다. 항체의 구조 및 단백질 폴딩은 다른 잔기가 CDR 서열의 일부로 간주된다는 것을 의미할 수 있고, 통상의 기술자에 의해 그와 같이 이해될 것이다.

[0099] 통상의 기술자에게 이용가능한 CDR 서열에 대한 다른 넘버링 규정은 "AbM" (유니버시티 오브 베쓰) 및 "접촉" (유니버시티 칼리지 런던) 방법을 포함한다. "최소 결합 단위"를 제공하기 위해, 카바트, 코티아, AbM 및 접촉 방법 중 적어도 2종을 사용하여 최소 중첩 영역을 결정할 수 있다. 하기 표 3은 각각의 CDR 또는 결합 단위에 대한 각각의 넘버링 규정을 사용한 하나의 정의를 나타낸다. 가변 도메인 아미노산 서열을 넘버링하기 위해 카바트 넘버링 스킴이 표 1에 사용된다. CDR 정의의 일부는 사용된 개별 공개물에 따라 달라질 수 있다는 것을 주목한다.

[0100] 표 3

	카바트 CDR	코티아 CDR	AbM CDR	접촉 CDR	최소 결합 단위
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

[0101] 따라서, 서열식별번호: 9로부터의, 특히 상기 표 2에 제시된 바와 같은 CDR 중 어느 하나 또는 그의 조합, 또는 그의 CDR 변이체를 포함하는 TSLP 결합 단백질이 제공된다. 한 실시양태에서 CDRL1은 서열식별번호: 1, 2 또는 3 중 어느 하나로 이루어진다. 한 실시양태에서 CDRL2는 서열식별번호: 4, 5 또는 6 중 어느 하나로 이루어진다. 한 실시양태에서, CDRL3은 서열식별번호: 7 또는 8 중 어느 하나로 이루어진다.

[0103] CDR 또는 최소 결합 단위는 적어도 1종의 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 변형되어 CDR 변이체를 형성할 수 있고, 여기서 변이체 항원 결합 단백질은 비변형된 단백질의 생물학적 특징, 예컨대 인간 및 시노몰구스 원숭이 TSLP에 특이적으로 결합하는 능력을 실질적으로 보유한다.

[0104] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 각각의 CDR이 단독으로 또는 임의의 다른 CDR과 임의의 순열 또는 조합으로 조합되어 변형될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0105] CDR 변이체는 적어도 1개의 아미노산에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 변형은 아미노산 서열 (예를 들어 5개 이하의 아미노산)의 화학적 또는 부분적 변경일 수 있고, 변형은 변이체가 비변형된 서열의 생물학적 특징을 유지하는 것을 허용한다. CDR 아미노산 서열의 부분적 변경은 1 내지 여러 개의 아미노산의 결실 또는 치환에 의한 것, 또는 1 내지 여러 개의 아미노산의 부가 또는 삽입에 의한 것, 또는 그의 조합에 의한 것일 수 있다 (예를 들어 5개 이하의 아미노산). CDR 변이체는 아미노산 서열에서 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 임의의 조합으로 함유할 수 있다.

[0106] 전형적으로, 변형은 예를 들어 상기 표 1에 제시된 바와 같은, 치환 또는 보존적 치환이다. 한 실시양태에서, CDR은 최대 5개의 아미노산, 예를 들어 최대 4개의 아미노산, 예를 들어 최대 3개의 아미노산, 예를 들어 1 또는 2개의 아미노산, 예를 들어 1개의 아미노산의 치환에 의해 변형된다. 한 실시양태에서 단일 가변 도메인의 3개의 CDR 각각은 다른 2개의 CDR과 독립적으로 2, 1개의 아미노산 잔기에 의해 변형되거나, 또는 변형되지 않는다. 한 실시양태에서 단지 CDR1 및/또는 CDR2만이 변형된다.

[0107] 특정한 예에서, 변이체 CDR에서, 최소 결합 단위의 아미노산 잔기는 동일하게 유지될 수 있지만, 카바트 또는 코티아 정의(들)의 일부로서 CDR을 포함하는 플랭킹 잔기는 보존적 아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 한 실시

양태에서, 항-TSLP 단일 가변 도메인은 서열식별번호: 9로부터의 최대 3개의 변이체 CDR을 포함하며, 여기서 CDR1은 서열식별번호: 3의 최소 결합 단위를 포함하고, CDR2는 서열식별번호: 6의 최소 결합 단위를 포함하고, CDR3은 서열식별번호: 8의 최소 결합 단위를 포함한다.

- [0108] 상기 기재된 바와 같은 변형된 CDR 또는 최소 결합 단위를 포함하는 이러한 항원 결합 단백질은 또한 본원에서 "기능적 CDR 변이체" 또는 "기능적 결합 단위 변이체"로 지칭될 수 있다.
- [0109] 한 실시양태에서, TSLP 결합 단백질은 서열식별번호: 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3 또는 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3의 변이체를 포함하고, (i) TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9와 경쟁하고/거나 (ii) TSLP에 대해 2nM 이하의 KD를 갖는다.
- [0110] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항원 결합 단백질의 특정한 결합 도메인과 접촉하는 항원의 그러한 부분을 지칭한다. 에피토프는 선형 또는 입체형태적/불연속적일 수 있다. 입체형태적 또는 불연속적 에피토프는 다른 서열에 의해 분리된, 즉, 항원의 1차 서열에서 연속적인 서열이 아닌 아미노산 잔기를 포함한다. 잔기는 펩티드 쇄의 상이한 영역으로부터의 것일 수 있지만, 이들은 항원의 3차원 구조에서 매우 근접해있다. 다량체 항원의 경우에, 입체형태적 또는 불연속적 에피토프는 상이한 펩티드 쇄로부터의 잔기를 포함할 수 있다. 에피토프 내에 포함되는 특정한 잔기는 컴퓨터 모델링 프로그램을 통해 또는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 X선 결정학을 통해 획득된 3차원 구조를 통해 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, TSLP 결합 단백질의 에피토프를 포함하는 잔기는 상기 TSLP 결합 단백질에의 결합 시 용매에 보다 더 접근불가능하게 되는 TSLP 상의 그러한 잔기이다. 한 실시양태에서, 특정한 TSLP 결합 단백질에 대한 에피토프 잔기는 Qt-PISA v2.0.1 소프트웨어 (Protein Interfaces, Complexes and Assemblies; Krissinel and Henrick (2007))를 사용하여, TSLP 결합 단백질에의 결합 시 노출된 표면적의 20% 이상이 매립되게 되는 전장 인간 TSLP 상의 그러한 잔기인 것으로 확인될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 특정한 TSLP 결합 단백질에 대한 에피토프 잔기는 Qt-PISA v2.0.1 소프트웨어 (Protein Interfaces, Complexes and Assemblies; Krissinel and Henrick (2007))를 사용하여, TSLP 결합 단백질에의 결합 시 % 매립된 표면적에서 증가를 나타내는 전장 인간 TSLP 상의 그러한 잔기인 것으로 확인될 수 있다.
- [0111] CDR L1, L2, L3, H1, H2 및 H3은 유한수의 주쇄 입체형태 중 하나를 구조적으로 나타내는 경향이 있다. CDR의 특정한 정규 구조 부류는 CDR의 길이 및 루프 패킹 둘 다에 의해 정의되고, CDR 및 프레임워크 영역 (구조적 결정 잔기 또는 SDR) 둘 다 내의 주요 위치에 위치하는 잔기에 의해 결정된다. 문헌 [Martin and Thornton (1996; J Mol Biol 263:800-815)]은 "주요 잔기" 정규 주형을 정의하기 위한 자동 방법을 생성한 바 있다. CDR의 세트에 대한 정규 부류를 정의하는데 클러스터 분석이 사용되고, 이어서 매립된 소수성, 수소-결합 잔기, 및 보존된 글리신 및 프롤린을 분석함으로써 정규 주형이 확인된다. 항체 서열의 CDR은 서열을 주요 잔기 주형과 비교하고, 동일성 또는 유사성 매트릭스를 사용하여 각각의 주형을 스코어링함으로써 정규 부류로 할당될 수 있다.
- [0112] 개시내용의 범주 내의 CDR 정규의 예가 하기에 주어진다. 사용된 아미노산 넘버링은 카바트이다.
- [0113] 서열식별번호: 9로부터의 CDRL1에 대한 정규의 예 (예를 들어, 서열식별번호: 1, 2 또는 3)는: Ile 29가 Val로 치환된 것; Leu 33이 Met, Val, Ile 또는 Phe로 치환된 것이다.
- [0114] 서열식별번호: 9로부터의 CDRL2에 대한 정규의 예 (예를 들어, 서열식별번호: 4, 5 또는 6)는: Ala 51이 Thr로 치환된 것이다.
- [0115] 서열식별번호: 9로부터의 CDRL3에 대한 정규의 예 (예를 들어, 서열식별번호: 7 또는 8)는: Val 89가 Gln, Ser, Gly, Phe 또는 Leu로 치환된 것; Gln 90이 Asn 또는 His로 치환된 것; Ile 91이 Phe 또는 Val로 치환된 것; Glu 93이 Ser로 치환된 것; Val 96이 Pro, Tyr, Arg, Ile, Trp 또는 Phe로 치환된 것이다.
- [0116] CDR당, 결합 단위당, 단일 가변 영역당, 및 TSLP 결합 단백질당 다중 변이체 CDR 정규 위치가 존재할 수 있고, 따라서 CDR의 정규 구조가 항원 결합 단백질이 TSLP에 특이적으로 결합할 수 있도록 유지되는 한, 치환의 임의의 조합이 본 개시내용의 TSLP 결합 단백질에 존재할 수 있다.
- [0117] 상기 논의된 바와 같이, CDR의 특정한 정규 구조 부류는 CDR의 길이 및 루프 패킹 둘 다에 의해 정의되고, CDR 및 프레임워크 영역 둘 다 내의 주요 위치에 위치하는 잔기에 의해 결정된다.
- [0118] 따라서, 상기 열거된 CDR에 더하여, 개시내용의 TSLP 결합 단백질의 정규 경쇄 프레임워크 잔기는 (카바트 넘버링을 사용하여): 위치 2에서 Ile, Leu 또는 Val; 위치 3에서 Val, Gln, Leu 또는 Glu; 위치 4에서 Met 또는

Leu; 위치 23에서 Cys; 위치 46에서 Leu, Arg 또는 Val; 위치 49에서 Tyr, His, Phe, Lys 또는 Trp; 위치 71에서 Tyr 또는 Phe; 위치 88에서 Cys; 및 위치 98에서 Phe를 포함할 수 있다.

- [0119] 한 실시양태에서, 경쇄 프레임워크는 하기 잔기: 위치 2에서 Ile, 위치 3에서 Gln, 위치 4에서 Met, 위치 23에서 Cys, 위치 46에서 Leu, 위치 49에서 Trp, 위치 71에서 Phe, 위치 88에서 Cys, 및 위치 98에서 Phe를 포함한다.
- [0120] 상기 기재된 프레임워크 위치 중 어느 하나, 임의의 조합, 또는 모두는 개시내용의 항원 결합 단백질에 존재할 수 있다. 단일 가변 영역당 및 TSLP 결합 단백질당 다중 변이체 프레임워크 정규 위치가 존재할 수 있고, 따라서, 프레임워크의 정규 구조가 유지되는 한, 개시내용의 TSLP 결합 단백질에 임의의 조합이 존재할 수 있다.
- [0121] 질의 핵산 서열과 대상 핵산 서열 사이의 "퍼센트 동일성"은 백분율로 표현되는 "동일성" 값이며, 이는 대상 핵산 서열이 쌍별 BLASTN 정렬을 수행한 후 질의 핵산 서열과 100% 질의 적용범위를 가질 때 BLASTN 알고리즘에 의해 계산된다. 질의 핵산 서열과 대상 핵산 서열 사이의 이러한 쌍별 BLASTN 정렬은 국립 생명공학 연구 센터의 웹사이트 상에서 이용가능한 BLASTN 알고리즘의 디폴트 세팅을 사용하고 낮은 복잡성 영역에 대한 필터를 턴 오프하여 수행한다. 중요하게는, 질의 핵산 서열은 본원의 하나 이상의 청구범위에서 확인되는 핵산 서열에 의해 기재될 수 있다. 한 실시양태에서, 질의 아미노산 서열은 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 11이다.
- [0122] 질의 아미노산 서열과 대상 아미노산 서열 사이의 "퍼센트 동일성"은 상기 정의된 바와 같다. 한 실시양태에서, 질의 아미노산 서열은 서열식별번호: 9 또는 서열식별번호: 12이다.
- [0123] 질의 서열은 대상 서열과 100% 동일할 수 있거나, 또는 % 동일성이 100% 미만이라도 하는 대상 서열과 비교 시 특정 정수 이하의 아미노산 또는 뉴클레오티드 변경을 포함할 수 있다. 예를 들어, 질의 서열은 대상 서열과 적어도 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일하다. 이러한 변경은 적어도 1개의 아미노산 결실, 치환 (보존적 및 비보존적 치환 포함), 또는 삽입을 포함하고, 여기서 상기 변경은 질의 서열의 아미노- 또는 카르복시-말단 위치에서 또는 그러한 말단 위치 사이의 임의의 곳에서 발생하며, 질의 서열 내의 아미노산 또는 뉴클레오티드 사이에 개별적으로 또는 질의 서열 내의 1개 이상의 인접한 군 내에 산재될 수 있다. 특정한 실시양태에서 개시내용의 TSLP 결합 단백질은 서열식별번호: 9와 95, 96, 97, 98, 또는 99% 이상 동일하다.
- [0124] % 동일성은 CDR(들)을 포함하는 질의 서열의 전체 길이에 걸쳐 결정될 수 있다. 대안적으로, % 동일성은 CDR(들)을 제외할 수 있으며, 예를 들어 CDR(들)은 대상 서열과 100% 동일하고, % 동일성 변이는 질의 서열의 나머지 부분에 존재하여, CDR 서열은 고정/무손상이다. 특정한 실시양태에서 개시내용의 TSLP 결합 단백질은 서열식별번호: 9의 CDR과 동일한 CDR을 갖고, 서열식별번호: 9의 프레임워크와 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일한 프레임워크를 갖는다.
- [0125] 변이체 서열은 비변형된 단백질의 생물학적 특징, 예컨대 인간 및 시노몰구스 원숭이 TSLP에의 결합 및 그의 중화 및 IL-7 결합의 결여를 실질적으로 보유한다.
- [0126] VH 또는 VL 서열은 최대 10개 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 갖는 변이체 서열일 수 있다. 예를 들어, 변이체 서열은 예를 들어 서열식별번호: 9 또는 12와 비교 시 최대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들), 부가(들) 또는 결실(들)을 가질 수 있다. 한 실시양태에서 변이체 서열은 예를 들어 서열식별번호: 9 또는 12와 비교 시 최대 10개의 아미노산 치환, 예를 들어 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산 치환을 갖는다.
- [0127] 서열 변이는 CDR(들)을 제외할 수 있고, 예를 들어 CDR(들)은 VH 또는 VL 서열과 동일하고 변이는 VH 또는 VL 서열의 나머지 부분에 존재하여, CDR 서열은 고정/무손상이다. 특정한 실시양태에서 개시내용의 TSLP 결합 단백질은 서열식별번호: 9의 CDR과 동일한 CDR을 갖고, 서열식별번호: 9와 비교 시 최대 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산 치환(들), 부가(들) 또는 결실(들)을 갖는 프레임워크를 갖는다.
- [0128] 전형적으로, 변이는 예를 들어 표 1에 제시된 바와 같은, 치환 또는 보존적 치환이다.
- [0129] 변이체 서열은 비변형된 단백질의 생물학적 특징, 예컨대 인간 및 시노몰구스 원숭이 TSLP에의 결합 및 그의 중화 및 IL-7 결합의 결여를 실질적으로 보유한다. 통상의 기술자는, 항원 결합 단백질 예컨대 항체의 생산 시, 사용되는 세포주 및 항원 결합 단백질의 특정한 아미노산 서열에 의존하여, 번역후 변형이 발생할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 예를 들어, 이는 특정 리더 서열의 절단, 다양한 당 모이어티의 다양한 글리코실화 및 인산화 패턴으로의 부가, 탈아미드화, 산화, 디설피드 결합 스크램블링, 이성질체화, C-말단 리신 클리핑, 및 N-말

단 글루타민 고리화를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 1회 이상의 번역후 변형에 적용된 바 있거나, 또는 이를 거친 바 있는 항원 결합 단백질의 사용을 포괄한다. 따라서 본 개시내용의 "항원 결합 단백질" 또는 "항체"는 본원에 기재된 바와 같은 번역후 변형을 거친 바 있는, 이전에 정의된 바와 같은 "항원 결합 단백질" 또는 "항체"를 각각 포함한다.

- [0130] 탈아미드화는 주로 아스파라긴 (N)을 이소-아스파르트산 및 아스파르트산 (D)으로 대략 3:1 비로 전환시키는 효소적 반응이다. 훨씬 더 적은 정도로, 탈아미드화는 글루타민 잔기와 함께 유사한 방식으로 일어날 수 있다. 산화는 생산 및 저장 동안 발생할 수 있고 (즉, 산화 조건의 존재 하에), 반응성 산소 종에 의해 직접적으로 또는 산화성 스트레스의 2차 부산물과의 반응에 의해 간접적으로 유도되는 단백질의 공유 변형을 발생시킨다. 산화는 주로 메티오닌 잔기에서 일어나지만, 때때로 트립토판 및 유리 시스테인 잔기에서 발생할 수 있다.
- [0131] 디설피드 결합 스캐프olding은 생산 및 기본 저장 조건 동안 발생할 수 있다. 특정 상황 하에, 디설피드 결합은 파괴되거나 부정확하게 형성되어 쌍형성되지 않은 시스테인 잔기 (-SH)를 발생시킬 수 있다. 이들 유리 (쌍형성되지 않은) 설프히드릴 (-SH)은 서플링을 촉진할 수 있다.
- [0132] 이성질화는 전형적으로 생산, 정제, 및 (산성 pH에서의) 저장 동안 발생하고, 통상적으로 아스파르트산이 화학적 공정을 통해 이소아스파르트산으로 전환될 때 발생한다.
- [0133] 중쇄 및/또는 경쇄에서 N-말단 글루타민은 피로글루타메이트 (pGlu)를 형성할 가능성이 있다. 대부분의 pGlu 형성은 생산 생물반응기에서 일어나지만, 가공 및 저장 조건의 pH 및 온도에 따라, 비-효소적으로 형성될 수 있다. pGlu 형성은 제조합 mAb에 대한 주요 분해 경로 중 하나로 간주된다.
- [0134] C-말단 리신 클리핑은 카르복시펩티다제에 의해 촉매되는 효소적 반응이고, 제조합 mAb에서 통상적으로 관찰된다. 이러한 과정의 변이체는 하나 또는 둘 다의 중쇄로부터의 리신의 제거를 포함한다. 리신 클리핑은 생물활성에 영향을 미치는 것으로 보이지 않고, mAb 이펙터 기능에 어떠한 영향도 미치지 않는다.
- [0135] 자연 발생 자가항체는 인간에 존재하며 단백질에 결합할 수 있다. 자가항체는 따라서 내인성 단백질 (나이프 대상체에 존재) 뿐만 아니라 치료를 위해 대상체에게 투여된 단백질 또는 펩티드에도 결합할 수 있다. 치료 단백질-결합 자가항체 및 약물 치료에 반응하여 새롭게 형성된 항체는 집합적으로 항-약물 항체 (ADA)로 불린다. 대상체에게 투여된 분자 예컨대 치료 단백질 및 펩티드에 대한 기존 항체는 그의 효능에 영향을 미칠 수 있고, 치료된 환자에서 투여 반응, 과민성, 변경된 임상 반응, 및 분자를 유지, 제거 또는 중화하는 것에 의한 변경된 생체이용률을 발생시킬 수 있다. 감소된 면역원성 (즉 대상체, 특히 인간 대상체에게 투여된 경우에 기존 ADA에 결합하는 감소된 능력)을 갖는 인간 이뮤노글로불린 (항체) 단일 가변 도메인 또는 dAb를 포함하는 요법을 위한 분자를 제공하는 것은 유리할 수 있다.
- [0136] 따라서, 본 개시내용의 한 실시양태에서 등가의 비변형된 분자와 비교 시 기존 항체 (ADA)에 결합하는 감소된 능력을 갖는 변형된 dAb 또는 이러한 변형된 dAb를 포함하는 폴리펩티드가 제공된다. 결합하는 감소된 능력은 변형된 분자가 기존 ADA에 감소된 친화도 또는 감소된 결합력으로 결합한다는 것을 의미한다. 상기 변형된 dAb는 1종 이상의 C-말단 변형 (부가, 연장, 결실 또는 태그)을 포함한다.
- [0137] 한 실시양태에서 변형된 dAb는 VL dAb이고, 서열 VEIK_pR_qX로 이루어진 C-말단 서열을 포함하며; 여기서
- [0138] p 및 q는 각각 0 또는 1을 나타내어, p가 1을 나타내는 경우에 q는 0 또는 1일 수 있고, p가 0을 나타내는 경우에 q도 또한 0을 나타내고;
- [0139] X는 존재하거나 부재할 수 있고, 존재하는 경우에 이는 1 내지 8개의 아미노산 잔기의 아미노산 연장, 예를 들어 단일 트레오닌 연장, 또는 TV, TVA, TVAA, TVAAP, TVAAPS 연장을 나타내고;
- [0140] 단 추가로 X가 부재하면;
- [0141] p 및/또는 q는 0이고/거나, VEIK_pR_qX로 끝나는 dAb는 상기 아미노산 치환 중 1종 이상을 포함한다.
- [0142] 한 실시양태에서, VL dAb는 C-말단에 아미노산 RT를 포함한다.
- [0143] 한 실시양태에서, VL dAb는 C-말단에 아미노산 R을 포함하지 않는다.
- [0144] 한 실시양태에서 변형된 dAb는 C 말단에 존재하는 태그를 포함할 수 있다. 태그는 관련 기술분야에 공지된 임의의 태그 예를 들어 친화성 태그 예컨대 myc-태그, FLAG 태그, his-태그, 화학적 변형 예컨대 PEG, 또는 단백질 도메인 예컨대 항체 Fc 도메인일 수 있다.

- [0145] C 말단 부가 또는 연장 또는 태그는 분자의 C 말단과의 직접 융합 또는 접합체로서 존재할 수 있다.
- [0146] 실시예 11에 기재된 특정 면역검정은 변형된 dAb가 ADA에 대해 감소된 결합을 갖는지 확인하는데 사용될 수 있다. ADA에 대해 감소된 결합을 갖는 dAb는 검정에서 감소된 발광 신호를 제공한다
- [0147] 상기 논의된 바와 같이, 흡입 전달이 의도되는 경우에, 작은 크기가 바람직하다. 그러나, 다른 투여 방식이 고려되는 경우에, 개시내용의 결합 단백질 및 항-TSLP dAb는, 예를 들어 PEG 기, 혈청 알부민, 트랜스페린, 트랜스페린 수용체 또는 적어도 그의 트랜스페린-결합 부분, 항체 Fc 영역의 부착에 의해, 또는 항체 도메인에 대한 접합에 의해 보다 큰 유체역학적 크기를 갖도록 포맷화될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 dAb™ 및 길항제는 항체의 더 큰 항원-결합 단편으로서 또는 항체로서 포맷화될 수 있다 (예를 들어, Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv로서 포맷화).
- [0148] 본원에 사용된 "유체역학적 크기"는 수용액을 통한 분자의 확산에 기초한 분자 (예를 들어, 항원 결합 단백질)의 겔보기 크기를 지칭한다. 단백질의 겔보기 크기를 유도하기 위해 용액을 통한 단백질의 확산 또는 이동이 프로세싱될 수 있고, 여기서 크기는 단백질 입자의 "스트로크 반경" 또는 "유체역학적 반경"에 의해 주어진다. 단백질의 "유체역학적 크기"는 질량 및 형상 (입체형태) 둘 다에 의존하므로, 동일한 분자 질량을 갖는 2종의 단백질은 단백질의 전체적인 입체형태 및 전하에 기초하여 상이한 유체역학적 크기를 가질 수 있다. 유체역학적 크기에서의 증가는 신장 클리어런스에서의 연관된 감소를 제공할 수 있고, 이는 반감기 (t_{1/2})에서 관찰되는 증가로 이어질 수 있다.
- [0149] 개시내용의 항원 결합 단백질 (예를 들어, 도메인 항체 단량체 및 다량체)의 유체역학적 크기는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 단백질의 유체역학적 크기를 결정하는데 겔 여과 크로마토그래피가 사용될 수 있다. 항원 결합 단백질의 유체역학적 크기를 결정하기 위한 겔 여과 매트릭스의 예는 가교된 아가로스 매트릭스를 포함하며, 이는 널리 공지되어 있고 용이하게 입수가 가능하다.
- [0150] 항원 결합 단백질 포맷의 크기 (예를 들어, 도메인 항체 단량체에 부착된 PEG 모이어티의 크기)는 목적하는 용도에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 단백질이 순환을 벗어나 말초 조직 내로 진입하는 것이 의도되는 경우에, 항원 결합 단백질의 유체역학적 크기는 혈류로부터의 유출을 용이하게 하기 위해 낮게 유지될 수 있다. 대안적으로, 항원 결합 단백질이 체순환 중에 더 오랜 기간 동안 남아있도록 하기 위해, 예를 들어 Ig 유사 단백질로서 포맷화함으로써, 항원 결합 단백질의 크기를 증가시킬 수 있다.
- [0151] 어구, "반감기" ("t_{1/2}") 및 "혈청 반감기"는 개시내용에 따른 항원 결합 단백질의 혈청 (또는 혈장) 농도가 생체내에서, 예를 들어 항원 결합 단백질의 분해 및/또는 천연 메카니즘에 의한 항원 결합 단백질의 클리어런스 또는 격리로 인해, 50%만큼 감소되는데 소요된 시간을 지칭한다.
- [0152] 증가된 반감기 또는 반감기 연장은 작은 크기의 항원 결합 단백질, 항체, 항체 단편의 생체내 적용에 유용할 수 있다. 이러한 단편 (Fv, 디스펩티드 결합된 Fv, Fab, scFv, dAb)은 일반적으로 신체로부터 신속하게 소거된다. 개시내용에 따른 항원 결합 단백질은 생체내 증가된 혈청 반감기를 제공하여 결과적으로 신체 내에서의 항원 결합 단백질의 보다 긴 지속성, 또는 체류, 기능적 활성 시간을 제공하기 위해 적합화 또는 변형될 수 있다. 적합하게는, 이러한 변형된 분자는 비-적합화된 분자와 비교 시 감소된 클리어런스 및 증가된 평균 체류 시간을 갖는다. 증가된 반감기는 치료 분자의 약동학적 및 약역학적 특성을 개선시킬 수 있고, 또한 개선된 환자 순응도를 위해 중요할 수 있다.
- [0153] 개시내용의 항원 결합 단백질은 분해 및/또는 클리어런스 또는 격리에 저항성인 분자 ("반감기 연장 모이어티" 또는 "반감기 연장 분자")에의 결합에 의해 생체내 안정할 수 있고 그의 반감기가 증가될 수 있다. 적합한 반감기 연장 전략은: PEG화, 폴리시알릴화, HES화, 재조합 PEG 모방체, N-글리코실화, O-글리코실화, Fc 융합, 조작된 Fc, IgG 결합, 알부민 융합, 알부민 결합, 알부민 커플링 및 나노입자를 포함한다.
- [0154] 한 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티 또는 분자는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 또는 PEG 모방체이다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 (임의로, 여기서 상기 모이어티는 약 20 내지 약 50 kDa의 크기를 가짐, 임의로 약 40 kDa 선형 또는 분지형 PEG)에 연결된 개시내용의 단일 가변 도메인을 포함한다 (임의로 이로 이루어진다). 또 다른 실시양태에서, 길항제는 PEG에 연결된 도메인 항체 단량체로 이루어지며, 여기서 도메인 항체 단량체는 개시내용에 따른 단일 가변 도메인이다.
- [0155] 항체의 Fc 영역과 다양한 Fc 수용체 (FcγR) 사이의 상호작용은 항체 또는 항체 단편의 식세포작용 및 반감기/클리어런스를 매개하는 것으로 여겨진다. 신생아 FcRn 수용체는 항체 클리어런스 및 조직을 가로지른 세포통과

들 다에 수반되는 것으로 여겨진다. 한 실시양태에서, 반감기 연장 모이어티는 항체로부터의 Fc 영역일 수 있다. 이러한 Fc 영역은 목적하는 특성에 의존하여 다양한 변형을 혼입할 수 있다. 예를 들어, 혈청 반감기를 증가시키기 위해 설페이트 수용체 결합 에피토프가 항체에 혼입될 수 있다.

- [0156] 인간 FcRn과 직접적으로 상호작용하는 것으로 결정된 인간 IgG1 잔기는 Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 및 His435를 포함한다. 따라서, 본 섹션에 기재된 위치 중 임의의 곳에서의 치환은 혈청 반감기를 증가시킬 수 있고/거나 항체의 이펙터 특성을 변경시킬 수 있다.
- [0157] 전형적으로, 생체내 혈청 반감기를 증진시키는 폴리펩티드, 즉 반감기 연장 분자는, 생체내에서 자연 발생하고, 유기체 (예를 들어, 인간)로부터 원치않는 물질을 제거하는 내인성 메카니즘에 의한 분해 또는 제거에 저항하는 폴리펩티드이다. 전형적으로, 이러한 분자는 그 자체가 생체내에서 긴 반감기를 갖는 자연 발생 단백질이다.
- [0158] 예를 들어, 생체내에서 혈청 반감기를 증진시키는 폴리펩티드는 세포외 매트릭스로부터의 단백질, 혈액에서 발견되는 단백질, 혈액 내 장벽에서 또는 신경 조직 내에서 발견되는 단백질, 신장, 간, 근육, 폐, 심장, 피부 또는 골에 국재하는 단백질, 스트레스 단백질, 질환-특이적 단백질, 또는 Fc 수송에 수반되는 단백질일 수 있다.
- [0159] 이러한 접근법은 또한 개시내용에 따른 항원 결합 단백질, 예를 들어 단일 가변 도메인의 관심 조직에의 표적화 전달을 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 개시내용에 따른 고친화도 단일 가변 도메인의 표적화 전달이 제공된다.
- [0160] 한 실시양태에서, 개시내용에 따른 항원 결합 단백질, 예를 들어 단일 가변 도메인은 혈청 알부민, 그의 단편 및 유사체에 연결, 즉 접합 또는 회합될 수 있다.
- [0161] 또 다른 실시양태에서, 개시내용에 따른 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 리간드는 트랜스페린, 그의 단편 및 유사체에 연결, 즉 접합 또는 회합될 수 있다.
- [0162] 또 다른 실시양태에서, 반감기 연장은 생체내 반감기를 증가시키는 항원 또는 에피토프를 표적화함으로써 달성될 수 있다. 항원 결합 단백질의 유체역학적 크기 및 그의 혈청 반감기는, 자연 발생 분자에 결합하고 생체내 반감기를 증가시키는 결합 도메인에 개시내용의 항원 결합 단백질을 접합 또는 회합시킴으로써 증가될 수 있다.
- [0163] 예를 들어, 개시내용에 따른 항원 결합 단백질은 항-혈청 알부민 (SA) 또는 항-신생아 Fc 수용체 항체 또는 항체 단편, 예를 들어 항-SA 또는 항-신생아 Fc 수용체 dAb, Fab, Fab' 또는 scFv, 또는 항-SA 아피타디 또는 항-신생아 Fc 수용체 아피타디 또는 항-SA 아비머, 또는 비제한적으로 CTLA-4, 리포칼린, SpA, 아피타디, 아비머, GroEl 및 피브로넥틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 스캐폴드를 포함하는 항-SA 결합 도메인에 접합 또는 연결될 수 있다. 접합은 결합 도메인 예컨대 혈청 알부민에 결합하는 결합 도메인에 (공유 또는 비공유) 결합된 개시내용의 폴리펩티드, dAb 또는 길항제를 포함하는 구성을 지칭한다.
- [0164] 또 다른 실시양태에서, 결합 도메인은 폴리펩티드 도메인, 예컨대 알부민 결합 도메인 (ABD), 또는 알부민에 결합하는 소분자일 수 있다.
- [0165] 한 실시양태는 개시내용에 따른 항원 결합 단백질 및 항-혈청 알부민 또는 항-신생아 Fc 수용체 항체 또는 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.
- [0166] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 단일 가변 도메인은 우선적으로 단량체인 것으로 확인된다. 또 다른 실시양태는 (실질적으로) 순수한 단량체를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 단일 가변 도메인은 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 순수 또는 100% 순수한 단량체이다. 단일 가변 도메인이 용액 중에서 단량체인지 또는 보다 고차의 올리고머를 형성하는지 여부를 결정하기 위해, 이를 SEC-MALLS에 의해 분석할 수 있다. SEC MALLS (크기 배제 크로마토그래피 및 다중-각도-레이저-광-산란)는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 친숙한, 용액 중 거대분자의 특징화를 위한 비-침습적 기술이다. 간략하게, 단백질은 (완충제 둘베코 PBS 중 1mg/mL의 농도에서) 크기 배제 크로마토그래피 (칼럼: TSK3000; S200)에 의해 그의 유체역학 특성에 따라 분리된다. 분리 후, 다중-각도-레이저-광-산란 (MALLS) 검출기를 사용하여 광을 산란시키는 단백질의 성향이 측정된다. 단백질이 검출기를 통과하는 동안 산란광의 강도는 각도의 함수로서 측정된다. 이 측정값을 굴절률 (RI) 검출기를 사용하여 결정된 단백질 농도와 함께 사용하면 적절한 방정식 (분석 소프트웨어 아스트라 v.5.3.4.12의 적분 부분)을 사용한 몰 질량의 계산이 가능해진다.
- [0167] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 단일 가변 도메인은 열적으로 안정하다. 또 다른 실시양태에서 본 개시내용의 단일 가변 도메인은 분당 3°C의 스캐닝 속도 및 1 mg/ml의 단백질 농도를 사용하여 DSC에 의해 측정 시 50°C 이

상의 Tm을 갖는다.

- [0168] 항원 결합 단백질은 다수의 통상적인 기술 중 임의의 것에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 단백질은 그것을 자연적으로 발현하는 세포로부터 정제될 수 있거나 (예를 들어, 항체는 그것을 생산하는 하이브리도마로부터 정제될 수 있음), 또는 제조할 발현 시스템에서 생산될 수 있다.
- [0169] 수많은 상이한 발현 시스템 및 정제 요법이 개시내용의 항원 결합 단백질을 생성하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 숙주 세포는 목적하는 항원 결합 단백질을 코딩하는 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환된다. 원핵생물 (그람 음성 또는 그람 양성 박테리아, 예를 들어 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실루스 종, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 종 포함), 효모 (예를 들어 사카로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)), 진균 (예를 들어 아스페르길루스 종)을 포함한 진핵생물, 또는 곤충 세포 및 포유동물 기원의 세포주 (예를 들어, CHO, Perc6, HEK293, HeLa)를 포함한 고등 진핵생물을 포함한 광범위한 숙주 세포가 사용될 수 있다.
- [0170] 숙주 세포는 단리된 숙주 세포일 수 있다. 숙주 세포는 통상적으로 다세포 유기체 (예를 들어, 식물 또는 동물)의 부분이 아니다. 숙주 세포는 비-인간 숙주 세포일 수 있다.
- [0171] 박테리아, 진균, 효모, 및 포유동물 세포 숙주와 함께 사용하는데 적절한 클로닝 및 발현 벡터 및 클로닝 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0172] 세포는 항원 결합 단백질의 발현을 촉진하는 조건 하에 배양될 수 있고, 통상적인 단백질 정제 절차에 의해 폴리펩티드가 회수될 수 있다. 본원에서의 사용이 고려되는 항원 결합 단백질은 오염 물질이 실질적으로 부재하는 실질적으로 균질한 항원 결합 단백질을 포함한다.
- [0173] 통상의 기술자는, 항원 결합 단백질의 생산 시, 특히 사용되는 세포주 및 항원 결합 단백질의 특정한 아미노산 서열에 의존하여, 번역후 변형이 발생할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 이러한 번역후 변형은 특정 리더 서열의 절단, 다양한 당 모이어티의 다양한 글리코실화 패턴으로의 부가, 탈아미드화 (예를 들어 아스파라긴 또는 글루타민 잔기에서), 산화 (예를 들어 메티오닌, 트립토판 또는 유리 시스테인 잔기에서), 디설피드 결합 스크램블링, 이성질체화 (예를 들어 아스파르트산 잔기에서), C-말단 리신 클리핑 (예를 들어 하나 또는 둘 다의 중쇄로부터), 및 N-말단 글루타민 고리화 (예를 들어 중쇄 및/또는 경쇄에서)를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 1회 이상의 번역후 변형에 적용된 바 있거나, 또는 이를 거친 바 있는 항체의 사용을 포괄한다. 변형은 CDR, 가변 프레임워크 영역, 또는 불변 영역에서 발생할 수 있다. 변형은 분자의 전하에서의 변화를 발생시킬 수 있다.
- [0174] 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 단백질은 본원에 기재된 인간 질환의 치료에 사용하기 위해 제약 조성물 내로 혼입될 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 본원에 개시된 바와 같은 항원 결합 단백질, 예를 들어 서열식별번호: 9 또는 12의 단일 가변 도메인을, 임의로 1종 이상의 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제와 조합하여 포함한다. 추가 실시양태에서, 제약 조성물은 본 발명의 TSLP 결합 단백질, 예를 들어 서열식별번호: 9 또는 12의 단일 가변 도메인, 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다.
- [0175] 이러한 조성물은 허용되는 제약 실시예에 의해 공지되고 언급되는 제약상 허용되는 담체를 포함한다.
- [0176] 제약 조성물은 주사 또는 연속 주입에 의해 투여될 수 있다 (예는 정맥내, 복강내, 피내, 피하, 근육내 및 문맥내를 포함하나 이에 제한되지는 않음). 제약 조성물은 국소 투여 (표피, 흡입, 비강내 또는 안구 투여를 포함하나 이에 제한되지는 않음) 또는 경장 투여 (경구 또는 직장 투여를 포함하나 이에 제한되지는 않음)에 적합할 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 흡입된다. 제약 조성물은 0.3 μg 내지 100mg의 TSLP 결합 단백질을, 예를 들어 1 μg 내지 30mg의 TSLP 결합 단백질을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 2 mg 내지 50 mg, 예를 들어 2 mg, 5 mg, 15 mg 및 50 mg을 함유한다. 대안적으로, 조성물은 1 μg 내지 15 mg, 예를 들어 1 μg 내지 10 mg을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서 제약 조성물은 250 μg 내지 5mg, 예를 들어 500 μg 내지 2.5mg의 TSLP 결합 단백질을 포함한다.
- [0177] 이러한 제약 조성물의 제조 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 사용되는 투여 방식 및 특정한 단백질에 적절한 것으로서 다른 부형제가 조성물에 첨가될 수 있다. 상이한 부형제의 예 및 그 용도가 문헌 [Lowe et al., *Adv Protein Chem Struct Biol*, 84, 41-61 (2011)]에 기재되어 있다.
- [0178] TSLP 결합 단백질을 투여하는 것에 대한 유효 용량 및 치료 요법은 환자의 연령, 체중 및 건강 상태 및 치료될 질환과 같은 인자에 의존할 수 있다. 이러한 인자는 담당 의사의 권한 내에 있다. 적절한 용량을 선택하는데

있어서의 안내는 예를 들어 문헌 [Bai et al., Clin Pharmacokinet, 51, 119-35 (2012)]에서 찾아볼 수 있다.

- [0179] 제약 조성물은 다른 의약과 함께 TSLP 결합 단백질의 부분들의 키트를, 임의로 사용에 대한 지침서와 함께 포함할 수 있다. 편의상, 키트는 시약을 미리 결정된 양으로, 사용에 대한 지침서와 함께 포함할 수 있다.
- [0180] 개시내용의 한 실시양태에서, TSLP 결합 단백질, 특히 항-TSLP 단일 가변 도메인은 흡입에 의한 환자에의 투여를 위해 적합화된 투여 형태, 예를 들어 건조 분말, 에어로졸, 현탁액 또는 용액 조성물로서 지시된다. 한 실시양태에서, 개시내용은 건조 분말로서, 흡입에 의한 환자에의 투여를 위해 적합화된 투여 형태로 지시된다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 네블라이저를 통한, 흡입에 의한 환자에의 투여를 위해 적합화된 투여 형태를 제공한다.
- [0181] 본 발명의 제제는 적합한 완충제의 첨가에 의해 완충될 수 있다.
- [0182] 흡입에 의한 폐에의 전달을 위한 건조 분말 조성물은 전형적으로 TSLP 결합 단백질을 미분된 분말로서 포함하고, 이는 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제와 별개의 미분된 분말로서 또는 TSLP 결합 단백질과 동일한 분말 입자 내에서 함께할 수 있다. 건조 분말로 사용하기 위해 적합화된 제약상 허용되는 부형제는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 락토스, 전분, 만니톨, 모노-, 디- 및 폴리사카라이드, 아미노산 또는 소형 펩티드, 염 또는 1- 또는 2-가 양이온 및 지질을 포함한다. 미분된 분말은 예를 들어 마이크로화 밀링에 의해 또는 직접적 입자 형성 방법 예컨대 분무-건조, 프린트(PRINT)TM (리퀴디아(Liquidia)) 또는 초임계 유체 침전에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 미분된 분말은 약 1 내지 약 10 마이크로미터 (예를 들어 레이저 회절을 사용하여 측정된 바와 같음)의 D50 값에 의해 정의될 수 있는 단백질의 입자 또는 단백질을 함유하는 입자로 이루어진다.
- [0183] 건조 분말은 건조 분말 형태의 다중 (계량되지 않은 용량)의 의약을 저장하기에 적합한 저장소를 갖는 저장소 건조 분말 흡입기 (RDPI)를 통해 환자에게 투여될 수 있다. RDPI는 전형적으로 저장소로부터 전달 위치로 각각의 의약 용량을 계량하기 위한 수단을 포함한다. 예를 들어, 계량 수단은 계량 컵을 포함할 수 있으며, 이는 저장소로부터의 의약이 컵에 충전될 수 있는 제1 위치로부터, 계량된 의약 용량이 흡입으로 환자에게 이용가능하도록 하는 제2 위치로 이동가능하다.
- [0184] 대안적으로, 건조 분말은 캡슐 (예를 들어 젤라틴 또는 플라스틱), 카트리지 또는 다중-용량 건조 분말 흡입기 (MDPI)에 사용하기 위한 블리스터 팩으로 제공될 수 있다. MDPI는 의약의 다중 규정된 용량 (또는 그의 일부)을 함유 (또는 다르게는 운반)하는 다중-용량 팩 내에 의약이 포함된 흡입기이다. 건조 분말이 블리스터 팩으로서 제공되는 경우에, 이는 건조 분말 형태의 의약의 수용을 위한 다중 블리스터를 포함한다. 블리스터는 전형적으로 그로부터의 의약의 방출을 용이하게 하기 위한 규칙적인 방식으로 배열된다. 예를 들어, 블리스터는 일반적으로 디스크형 블리스터 팩 상에 원형 방식으로 배열될 수 있거나, 또는 블리스터는, 예를 들어 스트립 또는 테이프를 포함하는 형태로 연장될 수 있다. 각각의 캡슐, 카트리지 또는 블리스터는 예를 들어 15 µg-10mg의 TSLP 결합 단백질을 함유할 수 있다. MDPI의 적합한 예는, 비제한적으로, 디스크스(Diskus)TM (GB2242134, 미국 특허 번호 6,032,666, 5,860,419, 5,873,360, 5,590,645, 6,378,519 및 6,536,427 참조) 또는 디스크할러 (GB 2178965, 2129691 및 2169265, 미국 특허 번호 4,778,054, 4,811,731, 5,035,237 참조)에서와 같이 예시되는 것, 뿐만 아니라 사용 시 계량되는 것 (예를 들어 터부할러(Turbuhaler) (EP 0069715 참조), 또는 미국 특허 번호 6,321,747에 기재된 장치에서와 같은 것)을 포함한다. 사용될 수 있는 단위-용량 장치의 예는 로타할러(Rotahaler) (GB 2064336 참조)이다. 다른 적합한 MDI는, 비제한적으로, 트윈-블리스터 스트립 장치, 예를 들어 엘립타(Ellipta)TM 장치에 관한 것 (예를 들어 미국 특허 번호 8,113,199; 8,161,968; 8,511,304; 8,534,281 및 8,746,242 참조)을 포함한다.
- [0185] 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한, 예를 들어 젤라틴인, 캡슐 및 카트리지는 TSLP 결합 단백질, 또는 TSLP 결합 단백질과 1종 이상의 부형제 및 적합한 분말 기재 예컨대 락토스, 만니톨 또는 전분의 미립자 제제의 흡입을 위한 분말 믹스를 함유하여 제제화될 수 있다. 각각의 캡슐 또는 카트리지는 일반적으로 15 µg 내지 10mg의 TSLP 결합 단백질, 또는 TSLP 결합 단백질과 1종 이상의 부형제의 미립자 제제를 함유할 수 있다. 한 실시양태에서, 캡슐 또는 카트리지는 2 mg 내지 50 mg의 TSLP 결합 단백질 또는 TSLP 결합 단백질과 1종 이상의 부형제의 미립자 제제, 예를 들어 2 mg, 5 mg, 15 mg 및 50 mg을 함유한다. 대안적으로, TSLP 결합 단백질 또는 TSLP 결합 단백질과 1종 이상의 부형제의 미립자 제제는 추가의 분말 기재 부형제 예컨대 락토스, 만니톨 또는 전분 없이 제공될 수 있다.
- [0186] 개시된 국부 조성물 내의 TSLP 결합 단백질의 비율은 제조할 제제의 정확한 유형에 의존하지만, 일반적으로

0.001 내지 100 중량%의 범위 내일 것이다. 일반적으로, 대부분의 유형의 제제의 경우에, 사용되는 비율은 0.005 내지 90%, 예를 들어 0.01 내지 80%의 범위 내일 것이다.

- [0187] 본 발명의 한 실시양태에서, MDPI에서 블리스터에 의해 전달되는 전체 1일 용량 및 계량된 용량은 각각의 계량된 용량이 15 µg 내지 13mg, 20 µg 내지 2000 µg, 또는 500 µg 내지 1500 µg의 TSLP 결합 단백질을 함유하도록 배열된다. 투여는 1일 1회 또는 1일 수회, 예를 들어 2, 3, 4 또는 8회일 수 있고, 예를 들어 각각의 회에 1, 2 또는 3 용량이 주어질 수 있다. 에어로졸에 의한 전체 1일 용량은 100 µg 내지 20mg, 또는 200 µg 내지 2000 µg의 범위 내일 것이다. 흡입기 또는 취입기에서 캡슐 및 카트리지에 의해 전달되는 전체 1일 용량 및 계량된 용량은 일반적으로 MDPI에 의해 전달되는 것의 최대 3배일 것이다.
- [0188] TSLP 결합 단백질을 포함하는 현탁액 및 용액은 또한 네블라이저를 통해 환자에게 투여될 수 있다. 연무화에 사용되는 용매 또는 현탁액제는 임의의 제약상 허용되는 액체 예컨대 물, 수성 염수, 알콜 또는 글리콜, 예를 들어 에탄올, 이소프로필알콜, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등 또는 그의 혼합물일 수 있다. 염수 용액은 투여 후에 약리학적 활성을 거의 또는 전혀 나타내지 않는 염을 사용한다. 유기 염, 예컨대 알칼리 금속 또는 암모늄 할로젠 염, 예를 들어 염화나트륨, 염화칼륨 또는 유기 염, 예컨대 칼륨, 나트륨 및 암모늄 염 또는 유기 산, 예를 들어 아스코르브산, 시트르산, 아세트산, 타르타르산 등 둘 다가 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다.
- [0189] 다른 제약상 허용되는 부형제가 현탁액 또는 용액에 첨가될 수 있다. TSLP 결합 단백질은 무기 산, 예를 들어 염산, 질산, 황산 및/또는 인산; 유기 산, 예를 들어 아스코르브산, 시트르산, 아세트산 및 타르타르산 등, 착물화제 예컨대 EDTA 또는 시트르산 및 그의 염; 또는 항산화제 예컨대 비타민 E 또는 아스코르브산 또는 아미노산 기반 항산화제 예컨대 메티오닌의 첨가에 의해 안정화될 수 있다. 이들 무기 산은 단독으로 또는 함께 사용되어 TSLP 결합 단백질을 안정화할 수 있다. 보존제 예컨대 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤조산 및 그의 염이 첨가될 수 있다. 계면활성제는 현탁액의 물리적 안정성을 개선시키기 위해 첨가될 수 있다. 이들은 레시틴, 이나트륨 디옥틸술포숙시네이트, 올레산 및 소르비탄 에스테르를 포함한다.
- [0190] 용어 "개체", "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 한 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 예컨대 영장류, 예를 들어 마모셋 또는 원숭이이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0191] 본원에 기재된 TSLP 결합 단백질을 또한 치료 방법에 사용될 수 있다. 치료는 치유적, 예방적 또는 방지적일 수 있다. 치료는 질환의 적어도 한 측면 또는 증상의 완화, 감소 또는 방지를 포괄하고, 본원에 기재된 질환의 방지 또는 치유를 포괄한다.
- [0192] 본원에 기재된 TSLP 결합 단백질을 치유적, 예방적 또는 방지적 치료를 위한 유효량으로 사용된다. 본원에 기재된 항원 결합 단백질의 치료 유효량은 질환의 하나 이상의 증상을 호전 또는 감소시키거나, 또는 그러한 질환을 방지 또는 치유하는데 유효한 양이다.
- [0193] 본원에 기재된 TSLP 결합 단백질을 특히 하기 장애 중 어느 하나를 치료하는데 사용하기 위한 의약으로서 사용될 수 있다.
- [0194] 본원에 기재된 TSLP 결합 단백질을 하기 장애 중 어느 하나를 치료하는데 사용하기 위한 의약의 제조에 사용될 수 있다.
- [0195] TSLP 발현 및/또는 기능은 수많은 염증성 장애, 우세하게는 자연에서 알레르기성 (이뮤노글로불린 E (IgE)-관련된 면역학적 반응을 특징으로 함), 뿐만 아니라 비-알레르기성인 질환과 연관된다. 이들 질환은 천식 (중증 천식 포함), 특발성 폐 섬유증, 아토피성 피부염 (AD), 알레르기성 결막염, 알레르기성 비염 (AR), 니트레토 증후군 (NS), 호산구성 식도염 (EoE), 식품 알레르기, 알레르기성 설사, 호산구성 위장염, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA), 알레르기성 진균 부비동염, 암 (예를 들어, 유방암, 췌장암, B-세포 급성 림프모구성 백혈병), 류마티스 관절염, COPD, 전신 경화증, 켈로이드, 췌양성 결장염, 만성 비부비동염 (CRS) 및 비강 폴립증을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 TSLP가 유형 2 시토카인 IL-5, IL-13 및 IL-4의 생산을 자극하기 때문에, 이는 또한 이들 시토카인이 연관된 질환, 예컨대 비제한적으로 천식, 알레르기성 비염, 만성 호산구성 폐렴, 호산구성 기관지염, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증, 복강 질환, 호산구성 위장염, 처그-스트라우스 증후군, 호산구성 근육통 증후군, 과다호산구성 증후군, 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증, 호산구성 식도염, 및 염증성 장 질환에 연루된다.
- [0196] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 TSLP 신호전달과 연관된 질환을 치료하는데 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 TSLP 결합 단백질을 제공한다. 또한 TSLP 신호전달과 연관된 질환의 치료를 위한 의약의 제조에서의

본원에 정의된 바와 같은 TSLP 결합 단백질의 용도가 제공된다. 본 발명은 TSLP 신호전달과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 인간 환자에게 본원에 정의된 바와 같은 TSLP 결합 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간 환자에서 TSLP 신호전달과 연관된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

- [0197] 한 실시양태에서, TSLP 신호전달과 연관된 질환은 천식, 특발성 폐 섬유증, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 비염, 니트레토 증후군, 호산구성 식도염 (EoE), 식품 알레르기, 알레르기성 설사, 호산구성 위장염, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA), 알레르기성 진균 부비동염, 암, 류마티스 관절염, COPD, 전신 경화증, 켈로이드, 궤양성 결장염, 만성 비부비동염 (CRS), 비강 폴립증, 만성 호산구성 폐렴, 호산구성 기관지염, 복강 질환, 처그-스트라우스 증후군, 호산구성 근육통 증후군, 과다호산구성 증후군, 다발혈관염을 동반한 호산구성 육아종증 및 염증성 장 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 특정한 실시양태에서, TSLP 신호전달과 연관된 질환은 천식, 특발성 폐 섬유증, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 비염, 니트레토 증후군, 호산구성 식도염 (EoE), 식품 알레르기, 알레르기성 설사, 호산구성 위장염, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA), 알레르기성 진균 부비동염, 암, 류마티스 관절염, COPD, 전신 경화증, 켈로이드, 궤양성 결장염, 만성 비부비동염 (CRS) 및 비강 폴립증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 더 특정한 실시양태에서, TSLP 신호전달과 연관된 질환은 천식이다.
- [0198] 천식은 가변성 및 재발성 증상, 가역적 기류 폐쇄 및 기관지연축을 특징으로 하는 기도의 혼한 만성 염증성 질환이다. 공통 증상은 천명, 기침, 흉부 압박 및 숨가쁨을 포함한다. 천식은 유전적 및 환경적 요인의 조합에 의해 유발되는 것으로 생각되고, 기관지확장제 및 흡입용 또는 경구 코르티코스테로이드의 사용에 의해 주로 다루어진다.
- [0199] 흡입용 코르티코스테로이드는 플루티카손 프로피오네이트, 플루티카손 푸로에이트, 베클로메타손 디프로프리오네이트, 부데소니드, 시클레소니드, 모메타손 푸로에이트, 트리암시놀론 및 플루니솔리드를 포함한다.
- [0200] 기관지확장제는 β 2-아드레날린수용체 효능제 및 무스카린성 길항제를 포함한다. 예시적인 β 2-아드레날린수용체 효능제는 빌란테롤, 살메테롤, 살부타몰, 포르모테롤, 살메파롤, 페노테롤 카르모테롤, 에탄테롤, 나민테롤, 클렌부테롤, 피르부테롤, 플레르부테롤, 레프로테롤, 밤부테롤, 인다카테롤, 테르부탈린 및 그의 염, 예를 들어 살메테롤의 크시나포에이트 (1-히드록시-2-나프탈렌카복실레이트) 염, 살부타몰의 술페이트 염 또는 유리 염기, 포르모테롤의 푸마레이트 염, 또는 빌란테롤의 트리페나테이트 염을 포함한다. 예시적인 무스카린성 길항제는 우메클리디늄, 티오토로피움, 글리코피롤레이트, 이프라트로피움 및 그의 염 예컨대 우메클리디늄의 브로마이드 염 (우메클리디늄 브로마이드)을 포함한다.
- [0201] 중증 천식은 "비제어"되는 것을 방지하기 위해 이전 연도 동안 GINA 단계 4-5 천식에 대한 의약 (고용량 흡입용 코르티코스테로이드 (CS) 및 LABA 또는 류코트리엔 조절제/테오필린) 또는 이전 연도의 $\geq 50\%$ 동안 전신 CS가 제안된 가이드라인에 의한 치료를 필요로 하였거나, 또는 이러한 요법에도 불구하고 "비제어"로 남아있는 천식이다.
- [0202] COPD는 거의 종종 흡연과 연관되고 만성 기관지염 및 기종을 특징으로 하는 진행성 폐 질환이다. 저하되는 폐 기능, 호흡곤란, 점액 과다생산 및 기침은 질환의 특징적인 특색이다. COPD는 주로 약리적으로 기관지확장제 및 스테로이드에 의해 및 산소 요법에 의해 다루어진다.
- [0203] 아토피성 피부염 (AD)은 피부 병변, 상승된 혈청 총 IgE, 및 높은 수준의 IL-4, IL-5 및 IL-13을 야기하는 과대 Th2 (Leung et al. Current Opinion in Immunology 15(6):634-638 (2003)) 반응을 특징으로 하는 피부의 만성 및 재발성 염증성 습진성 질환을 특징으로 한다. AD의 촉발자는 잘 이해되지 않지만, 유전 요인 및 또한 알레르겐의 역할을 할 수 있는 환경 요인의 조합을 포함한다.
- [0204] 호산구성 식도염 (EoE)은 식도 점막의 호산구성 침윤을 특징으로 하는 만성 염증성 질환이다 (Roman et al. Digestive and Liver Disease 45(11):871-878 (2013)). EoE는 성인 및 소아 둘 다에 영향을 미치고, 식도 협소화와 연관되고, 종종 음식 박힘, 연하곤란, 불량한 체중 증가, 구토 및 감소된 식욕으로 나타내어진다. 국소 점성 코르티코스테로이드 또는 식이 배제가 최적 치료이다.
- [0205] 니트레토 증후군 (NS)은 AD-유사 병변, 뿐만 아니라 세린 프로테아제 억제제 LEKTI를 코딩하는 SPINK5 유전자에서의 돌연변이로부터 유래된 다른 알레르기성 징후를 특징으로 하는 중증 피부 질환이다. TSLP는 NS를 갖는 개체의 피부에서 강하게 발현된다.
- [0206] 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 단독으로 또는 다른 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. TSLP 결합 단백질 및 1

중 이상의 다른 치료제는 개별적으로, 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

- [0207] 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 흡입용, 비강내 또는 비경구 코르티코스테로이드 예컨대 플루티카손 푸로에이트, 플루티카손 프로피오네이트, 부테소니드, 시클레소니드, 베클로메타손 디프로피오네이트, 모메타손 푸로에이트, 트리암시놀론 아세토니드 및 프레드니솔론과 조합되어 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 흡입용 코르티코스테로이드와의 고정 용량 조합물로서 예컨대 플루티카손 푸로에이트 또는 플루티카손 프로피오네이트와의 고정 용량 조합물로서 투여될 수 있다.
- [0208] 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 기관지확장제 예컨대 베타-2 아드레날린수용체 효능제 및/또는 무스카린성 길항제와 조합되어 투여될 수 있다. 적합한 베타-2 아드레날린수용체 효능제는 빌란테롤, 살메테롤, 살부타몰, 포르모테롤, 살메파롤, 페노테롤, 카르모테롤, 에탄테롤, 나민테롤, 클렌부테롤, 피르부테롤, 플레르부테롤, 레프로테롤, 밤부테롤, 인다카테롤, 테르부탈린, 및 그의 염을 포함한다. 적합한 무스카린성 길항제는 우메클리디늄, 티오트로피움, 글리코피롤레이트, 이프라트로피움 및 그의 염 예컨대 우메클리디늄의 브로마이드 염을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 베타-2 아드레날린수용체 효능제 및/또는 무스카린성 길항제와의 고정 용량 조합물로서, 예컨대 빌란테롤 트리페나테이트, 우메클리디늄 브로마이드, 또는 빌란테롤 트리페나테이트와 우메클리디늄 브로마이드의 이중 조합물과의 고정 용량 조합물로서 투여될 수 있다.
- [0209] 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 1종 이상의 기관지확장제 및 흡입용 스테로이드의 조합물과 함께 투여될 수 있다. 이러한 조합물은 이중 조합물 예컨대 플루티카손 푸로에이트와 빌란테롤 트리페나테이트, 플루티카손 푸로에이트와 우메클리디늄 브로마이드, 플루티카손 프로피오네이트와 살메테롤, 부테소니드와 포르모테롤, 모메타손과 포르모테롤, 및 3중 요법 예컨대 플루티카손 푸로에이트, 빌란테롤 트리페나테이트와 우메클리디늄 브로마이드를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 흡입용 코르티코스테로이드 및 1종 이상의 기관지확장제와의 고정 용량 조합물로서, 예컨대 플루티카손 푸로에이트와 빌란테롤 트리페나테이트, 또는 플루티카손 프로피오네이트와 살메테롤, 또는 플루티카손 푸로에이트와 우메클리디늄 브로마이드, 또는 플루티카손 푸로에이트, 빌란테롤 트리페나테이트와 우메클리디늄 브로마이드와의 고정 용량 조합물로서 투여될 수 있다.
- [0210] 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 항-류코트리엔 길항제 예컨대 몬테루카스트, 자피르루카스트 및 프란루카스트; PDE4 억제제 예컨대 로플루밀라스트; 크산텐; 항-IgE 항체 예컨대 오말리주맵; IL-5의 길항제 예컨대 메폴리주맵, 벤탈리주맵 및 레슬리주맵; IL-13의 길항제 예컨대 레브리키주맵 및 트랄로키누맵; IL-4/IL-13의 길항제 예컨대 두필루맵; IL-6의 길항제 예컨대 시루쿠맵 및 IL-1, IL-4, IL-33, IL-25 및 TNF- α 의 길항제와 조합되어 투여될 수 있다.
- [0211] 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 항-히스타민 예컨대 세티리진 히드로클로라이드, 레보세티리진, 데스로라티딘, 로라티딘, 펙소페나딘 히드로클로라이드 또는 아젤라스틴과 조합되어 투여될 수 있다.
- [0212] 본 발명의 TSLP 결합 단백질은 피르페니돈 또는 닌테다닙 또는 avB6 길항제, 예를 들어 WO2014/154725에 개시된 것과 조합되어 투여될 수 있다.
- [0213] 본 발명의 특정한 실시양태는 하기를 포함한다:
- [0214] 실시양태 1. 하기 CDR: 서열식별번호: 9로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3 또는 이들 CDR 중 어느 하나 또는 모두의 변이체를 포함하며, TSLP에 2nM 미만의 해리 상수 (KD)로 결합하고/거나 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁하는 TSLP 결합 단백질.
- [0215] 실시양태 2.
- [0216] (i) 서열식별번호: 1에 따른 CDR1, 또는 Pro 28이 Asn, Ser, Asp, Thr 또는 Glu로 치환되고; Ile 29가 Val로 치환되고; Arg 30이 Asp, Leu, Tyr, Val, Ile, Ser, Asn, Phe, His, Gly 또는 Thr로 치환되고; Asn 31이 Ser, Thr, Lys 또는 Gly로 치환되고; Trp 32가 Phe, Tyr, Asn, Ala, His, Ser 또는 Arg로 치환되고; Leu 33이 Met, Val, Ile 또는 Phe로 치환되고; Asp 34가 Ala, Gly, Asn, Ser, His, Val 또는 Phe로 치환된 서열식별번호: 1의 변이체,
- [0217] (ii) 서열식별번호: 4에 따른 CDR2, 또는 Ala 51이 Thr, Gly 또는 Val로 치환된 서열식별번호: 4의 변이체, 및
- [0218] (iii) 서열식별번호: 7에 따른 CDR3, 또는 Val 89가 Gln, Ser, Gly, Phe 또는 Leu로 치환되고; Gln 90이 Asn 또는 His로 치환되고; Ile 91이 Asn, Phe, Gly, Ser, Arg, Asp, His, Thr, Tyr 또는 Val로 치환되고; Gly 92가 Asn, Tyr, Trp, Thr, Ser, Arg, Gln, His, Ala 또는 Asp로 치환되고; Glu 93이 Asn, Gly, His, Thr, Ser,

Arg, 또는 Ala로 치환되고; Asp 94가 Tyr, Thr, Val, Leu, His, Asn, Ile, Trp, Pro 또는 Ser로 치환되고; Val 96이 Pro, Leu, Tyr, Arg, Ile, Trp 또는 Phe로 치환된 서열식별번호: 7의 변이체를 포함하는 TSLP 결합 단백질이며;

- [0219] 를 포함하는 TSLP 결합 단백질이며;
- [0220] TSLP에 2nM 미만의 해리 상수 (KD)로 결합하고/거나 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁하는 TSLP 결합 단백질.
- [0221] 실시양태 3. 실시양태 1 또는 2에 있어서, CDR1이 서열식별번호: 1로 이루어지고/거나; CDR2가 서열식별번호: 4로 이루어지고/거나; CDR3이 서열식별번호: 7로 이루어진 것인 TSLP 결합 단백질.
- [0222] 실시양태 4. 실시양태 1 내지 3 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하기 잔기: 위치 2에서 Ile, Leu 또는 Val; 위치 3에서 Val, Gln, Leu 또는 Glu; 위치 4에서 Met 또는 Leu; 위치 23에서 Cys; 위치 35에서 Trp; 위치 36에서 Tyr, Leu 또는 Phe; 위치 46에서 Leu, Arg 또는 Val; 위치 49에서 Tyr, His, Phe, Lys 또는 Trp; 위치 71에서 Tyr 또는 Phe; 위치 88에서 Cys; 및 위치 98에서 Phe를 포함하는 경쇄 프레임워크를 포함하는 TSLP 결합 단백질.
- [0223] 실시양태 5. 실시양태 4에 있어서, 경쇄 프레임워크가 하기 잔기: 위치 2에서 Ile, 위치 3에서 Gln, 위치 4에서 Met, 위치 23에서 Cys, 위치 35에서 Trp, 위치 36에서 Tyr, 위치 46에서 Leu, 위치 49에서 Trp, 위치 71에서 Phe, 위치 88에서 Cys, 및 위치 98에서 Phe를 포함하는 것인 TSLP 결합 단백질.
- [0224] 실시양태 6. 실시양태 1 내지 5 중 어느 한 실시양태에 있어서, 단일 가변 도메인인 TSLP 결합 단백질.
- [0225] 실시양태 7. 실시양태 6에 있어서, 단일 가변 도메인이 V_K 단일 가변 도메인인 TSLP 결합 단백질.
- [0226] 실시양태 8. 실시양태 7에 있어서, V_K 단일 가변 도메인이 RT로 끝나는 C-말단을 갖는 것인 TSLP 결합 단백질.
- [0227] 실시양태 9. 실시양태 7에 있어서, V_K 단일 가변 도메인이 R로 끝나지 않는 C-말단을 갖는 것인 TSLP 결합 단백질.
- [0228] 실시양태 10. 실시양태 5에 있어서, 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인을 포함하는 TSLP 결합 단백질.
- [0229] 실시양태 11. TSLP에 2nM 미만의 해리 상수 (KD)로 결합하고/거나 TSLP에의 결합에 대해 서열식별번호: 9의 단일 가변 도메인과 경쟁하는, 최대 10개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 임의의 조합으로 갖는, 서열식별번호: 9에 따른 아미노산 서열을 포함하는 항-TSLP 단일 가변 도메인.
- [0230] 실시양태 12. 실시양태 11에 있어서, 상기 아미노산 치환, 결실 또는 부가가 CDR3 내에 있지 않는 것인 항-TSLP 단일 가변 도메인.
- [0231] 실시양태 13. 실시양태 12에 있어서, 상기 아미노산 치환, 결실 또는 부가가 CDR 중 임의의 것 내에 있지 않는 것인 항-TSLP 단일 가변 도메인.
- [0232] 실시양태 14. 서열식별번호: 9에 따른 아미노산 서열로 이루어진 항-TSLP 단일 가변 도메인.
- [0233] 실시양태 15. TSLP에 결합하는, 실시양태 9-14 중 어느 한 실시양태에 따른 항-TSLP 단일 가변 도메인을 포함하는 단리된 폴리펩티드.
- [0234] 실시양태 16. 실시양태 1-15 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 TSLP에 결합하는 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드.
- [0235] 실시양태 17. 실시양태 16에 있어서, 시노몰구스 TSLP에 또한 결합하는 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드.
- [0236] 실시양태 18. 실시양태 16에 있어서, TSLP 활성을 중화시키는 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드.
- [0237] 실시양태 19. 실시양태 18에 있어서, TSLP의 TSLP 수용체에 대한 결합을 억제하는 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드.
- [0238] 실시양태 20. 실시양태 1-19 중 어느 한 실시양태에 따른 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산.

- [0239] 실시양태 21. 실시양태 20에 있어서, 서열식별번호: 10 또는 서열식별번호: 11을 포함하는 단리된 핵산 분자.
- [0240] 실시양태 22. 실시양태 20 또는 실시양태 21에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터.
- [0241] 실시양태 23. 실시양태 20 또는 21에 따른 핵산 또는 실시양태 22에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0242] 실시양태 24. 실시양태 23에 따른 숙주 세포를 상기 핵산 또는 벡터의 발현에 적합한 조건 하에 유지시킴으로써, TSLP 결합 단백질 또는 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 생산하는 것을 포함하는, 실시양태 1-15 중 어느 한 실시양태에 따른 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 생산하는 방법.
- [0243] 실시양태 25. 실시양태 1-15 중 어느 한 실시양태에 있어서, 의약으로 사용하기 위한 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드.
- [0244] 실시양태 26. 실시양태 1-15 중 어느 한 실시양태에 따른 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물.
- [0245] 실시양태 27. 실시양태 1-15 및 26 중 어느 한 실시양태에 있어서, TSLP 신호전달과 연관된 질환의 치료를 위한 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인, 폴리펩티드, 또는 제약 조성물.
- [0246] 실시양태 28. TSLP 신호전달과 연관된 질환의 치료를 위한 의약의 제조에서의, 실시양태 1-15 중 어느 한 실시양태에 따른 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드의 용도.
- [0247] 실시양태 29. 실시양태 27 또는 28에 있어서, TSLP 신호전달과 연관된 질환이 천식, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 알레르기성 비염, 니트레토 증후군, 호산구성 식도염 (EoE), 알레르기성 설사, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA), 알레르기성 진균 부비동염, 암, 류마티스 관절염, COPD, 전신 경화증, 만성 비부비동염 (CRS), 및 비강 폴립증으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 제약 조성물, 또는 용도.
- [0248] 실시양태 30. TSLP-매개 상태의 치료를 필요로 하는 인간 환자에게 실시양태 1-15 중 어느 한 실시양태에 따른 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 인간 환자에서 TSLP-매개 상태를 치료하는 방법.
- [0249] 실시양태 31. 실시양태 1-15 중 어느 한 실시양태에 따른 TSLP 결합 단백질, 항-TSLP 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드 및 상기 TSLP 결합 단백질, 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드를 흡입하기 위한 장치를 포함하는 키트.
- [0250] 실시예
- [0251] 실시예 1 TSLP에 결합하는 나이브 dAb의 확인
- [0252] TSLP에 특이적인 도메인 항체를 표준 파지 디스플레이 기술을 사용하여 확인하였다. 항체 단일 가변 도메인을 디스플레이하는 도만티스 나이브 파지 라이브러리를 사용하여 비오틴화된 재조합 시노물구스 TSLP에 대해 패닝하였다. TSLP에 결합된 dAb를 dAb ELISA에 의해 확인하였다. TSLP-특이적 dAb를 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 및/또는 TSLP 수용체 결합 검정 (RBA)에서 추가로 특징화하였다. 양성 히트의 정체를 서열분석에 의해 결정하고, 이들 히트를 '나이브 dAb'로 명명하였다. 이들 초기 나이브 선택에서, 목적은 20-2000nM 범위 내의 효력 (RBA 또는 세포 검정에 의해 측정된 IC50)을 갖는 dAb를 확인하는 것이었다. dAb DOM30h-440-81/86 및 dAb Dom30h-440-87/93, 및 본원에 개시된 바람직한 특성을 갖는 다른 고친화도 dAb를 생성하는데 수반되는 이러한 단계 및 후속 단계를 예시하는 흐름도를 도 1에 제시한다.
- [0253] dAb ELISA 스크리닝
- [0254] 인간 및 시노물구스 TSLP-특이적 dAb를 ELISA에 의해 확인하였다. 간략하게, 뉴트라비딘으로 사전코팅된 96-웰 맥시소르프(Maxisorp)TM 면역 플레이트 (뉴크(Nunc), 덴마크)를 비오틴화된 시노물구스 TSLP 또는 비오틴화된 인간 TSLP로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 웰을 PBST로 세척한 다음, PBS 중 2% 마벨 (2%MPBS)로 차단시켰다. dAb 상청액을 2% MPBS 중에 1:1 혼합물로 첨가하였다. 결합된 dAb를 모노클로날 항-FLAG M2-퍼옥시다제 접합된 항체 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 영국)를 사용하여 검출하였다. 퍼옥시다제 접합된 항체의 검출을 위해, 비색 기질을 사용하였고 (슈어블루(SureBlue) 1-성분 TMB 마이크로웰 퍼옥시다제 용액), 450 nm에서 광학 밀도 (OD)를 측정하였다. 시노물구스 TSLP에 대한 양성 결합체는 OD450이 2x 검정 배경인 경우에 확인되었다.

- [0255] 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 검정 (TSLP의 1급 아민 커플링)
- [0256] 비아코어™ T200을 사용하여, 결합 동역학 및 인간 TSLP, 시노몰구스 TSLP 및 인간 IL-7 시토카인에의 결합에 대한 친화도에 대해 dAb를 평가하였다. 인간 TSLP, 시노몰구스 TSLP 및 인간 IL-7을 1급 아민 커플링에 의해 CM4 칩 상에 고정시켰다. 시험 dAb를 고정된 시토카인 위로 HBS-EP 완충제 중 160nM, 40nM, 10nM, 2.5nM, 0.63nM 및 0.156nM로 통과시키고, 결합 곡선을 기록하였다. 이것을 동일한 비아코어 실행 내에서 25°C에서 이중으로 실행시켰다. 완충제 주입 곡선을 사용하여 곡선을 이중-참조하고, 이어서 비아코어 T200 평가 소프트웨어에 고유한 1:1 결합 모델에 피팅시켰다.
- [0257] TSLP 수용체 결합 검정 (RBA)
- [0258] TSLP 중화 활성을 갖는 dAb를 확인하기 위해, TSLP가 그의 수용체 복합체에 결합하는 것을 차단하는 능력에 대해 가용성 dAb를 시험하였다. 인간 TSLPR 및 IL-7R의 세포외 도메인 (알앤디 시스템즈(R&D Systems))을 ELISA 플레이트 상에 코팅하여, 자기 회합하여 TSLP 수용체 이중이량체를 형성하도록 하였다. dAb를 단일 농도로, 또는 농도 범위로 희석하여 (예를 들어 3.8µM - 1µM) 시험하였고, 미리 결정된 농도 (예를 들어 1.5ng/ml)의 인간 또는 시노몰구스 원숭이 TSLP와 1시간 동안 사전-인큐베이션하였다. 이어서 dAb - TSLP 복합체를 2시간 동안 마이크로웰 플레이트에 첨가하고, 비오틴화된 TSLP 검출 항체 및 스트렙타비딘:HRP (흡광도를 스펙트라맥스 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 측정함) 또는 루테닐화된 TSLP 검출 항체 (전기화학발광을 MSD 섉터 이미지를 사용하여 측정함)를 사용하여 결합된 TSLP의 양을 정량화하였다. 4개 파라미터 로지스틱 피트 모델을 사용하여 데이터를 플롯팅하여 효력 값을 수득하였다.
- [0259] 상청액 중 dAb의 농도를 결정하기 위한 검정
- [0260] C-말단 FLAG 태그와 함께 발현된 dAb를 상청액에서 FLAG 에피토프의 검출에 의해 정량화하였다. 검정은 Cy3b-표지된 FLAG 펩티드와 테르븀-표지된 항-FLAG 항체 사이의 HTRF 신호에 의존한다. FLAG-태그와 함께 발현된 dAb는 이러한 상호작용과 경쟁할 수 있고 HTRF 신호를 감소시킬 수 있다.
- [0261] C-말단 FLAG- 태그를 갖는 공지된 농도의 대조군 dAb를 2xYT 배양 배지 중에서 연속 희석하고, 이어서 PBS 중에서 추가로 1:10 희석하여 배양 배지의 최종 농도를 감소시켰다. 각각의 샘플의 7µl를 384 웰 백색 LV 검정 플레이트 (그라이너(Greiner))의 웰에 첨가하였다. 이것은 dAb 표준 곡선의 역할을 하였다.
- [0262] 미지의 농도의 시험 dAb (상청액)를 2xYT 배지 중에서 희석하고 (그대로, 1:2, 1:4, 1:8), 이어서 PBS 중에서 추가로 1:10 희석하여 배양 배지의 최종 농도를 감소시켰다. 각각의 샘플을 7µl/웰로 검정 플레이트에 첨가하였다.
- [0263] 형광 표지된 FLAG 펩티드 (H-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Gly-Gly-Cys(Cy3B)-OH) (캠브리지 리서치 바이오키칼스(Cambridge Research Biochemicals))를 0.2mM BSA 및 1mM CHAPS 완충제 중 항-Flag M2 테르븀-표지된 항체 (시스바이오(Cisbio) 카탈로그 번호 61FG2TLB)와의 혼합물 중 1µM의 최종 농도 (1/2000 희석)로 제조하였다.
- [0264] FLAG 펩티드/항-FLAG mAb 혼합물 7µl를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 1000rpm에서 1분 동안 회전시켜 웰의 바닥에 용액을 수집하였다. 플레이트를 암실에서 10분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 이어서 엔비전 플레이트 판독기 (퍼킨 엘머)를 사용하여 형광을 판독하였다. HTRF 방출을 2개의 상이한 파장, 615nm (공여자) 및 665nm (수용자)에서 측정하여 웰 대 웰 변동을 감소시켰다 (비율계 측정). 연속 희석된 대조군 dAb의 표준 곡선으로부터 상청액 샘플 중 dAb의 농도를 결정하였다.
- [0265] 정제된 dAb의 농도를 결정하기 위한 검정
- [0266] 완충제 중 정제된 dAb의 농도는 분광광도계로, 나노드롭 1000 기기 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 사용하여 280nm에서의 UV 광의 흡광도의 측정에 의해 결정하였다.
- [0267] 실시예 2: TSLP에 대한 dAb의 친화도를 증가시키기 위한 친화도 성숙.
- [0268] CDR 영역을 재-다양화하기 위해 축중성 돌연변이유발을 사용하여 DOM30h-440 나이브 dAb에 대해 친화도 성숙을 수행하였다. CDR 다양화는 각각의 CDR 내의 모든 돌연변이를 포괄하도록 설계된 단일 축중성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 구축한 도핑된 라이브러리를 사용하여 수행하였다. 단일 위치에서 다중 아미노산이 코딩되도록 하는 축중성 코돈을 사용하여 다양화될 아미노산을 구체화하였다. 재-다양화된 dAb를 감소하는 양의 비오틴화된 시노몰구스 TSLP 항원 (100nM, 50nM, 10nM, 1nM)에 대한 5 라운드의 선택에 적용시켰다. 확인된

dAb의 예를 도 4에 제시한다.

[0269] 표 4: TSLP 수용체 결합 검정 (RBA)에서의 스크리닝에 의한 항-TSLP dAb의 확인

클론 명칭	DOM30h-440-81/86과의 서열 동일성 (%)	시노볼구스 TSLP				인간 TSLP			
		기하 평균 IC50 (nM)	+/- SD (nM)	N	KD (nM)	기하 평균 IC50 (nM)	+/- SD (nM)	n	KD (nM)
DOM30h-440	94.39	2050	586 - 7171	7	622.6	572	146 - 2240	7	86.5
DOM30h-440-1	94.39	159	N/A	1	27.5	19	N/A	1	18.4
DOM30h-440-2	94.39	1666	N/A	1	ND	80	N/A	1	ND
DOM30h-440-3	95.33	542	N/A	1	73.7	106	N/A	1	41.1
DOM30h-440-30	95.33	483	330 - 706	2	ND	132	21 - 842	2	ND
DOM30h-440-31	95.33	605	568 - 644	2	ND	289	137 - 610	2	ND
DOM30h-440-32	94.39	1015	716 - 1438	2	ND	89	50 - 160	2	ND

[0270]

DOM30h-440-33	95.33	309	224 - 427	2	43.4	45	35 - 56	2	33.8
DOM30h-440-34	95.33	59	38 - 91	8	28.5	8	3.1 - 19	8	17.4
DOM30h-440-35	98.13	65	29 - 142	6	26.1	4	2.6 - 7.5	4	16.3
DOM30h-440-37	94.39	466	312 - 697	3	52.5	83	70 - 98	2	36.4
DOM30h-440-38	93.46	5825	3406 - 9964	2	ND	>16982	N/A	1	ND
DOM30h-440-39	95.33	62	24 - 163	4	45.6	8	2 - 27	3	61.6
DOM30h-440-4	95.33	975	N/A	1	394	NT			89.9
DOM30h-440-40	95.33	549	185 - 1630	4	307.6	32	11 - 94	3	119.6
DOM30h-440-41	95.33	142	61 - 329	4	283.6	68	36 - 129	2	280.6
DOM30h-440-42	95.33	104	17 - 635	4	79.2	57	N/A	1	70.7
DOM30h-440-43	93.46	6690	N/A	1	ND	1308	841 - 2034	2	ND
DOM30h-440-6	95.33	2090	N/A	1	ND	673	N/A	1	ND
DOM30h-440-7	95.33	97	N/A	1	78.1	NT			11.8
DOM30h-440-9	95.33	796	N/A	1	279.8	23	N/A	1	74.6

[0271]

- [0272] 파지미드 시스템을 사용하여 DOM30h-440-35 dAb에 대해 추가의 친화도 성숙을 수행하여, 선택 동안 표적 항원 (비오틴화된 TSLP)과 1:1 상호작용할 수 있게 하고 고유 친화도에 기초하여 개선된 dAb 클론의 선택이 가능하도록 하였다. 제2 라운드 친화도 성숙은 2종의 돌연변이유발 접근법, NNK 위킹 및 오류 유발 돌연변이유발을 사용하여 수행하였다. NNK 위킹은 표적화된 잔기에 대한 모든 돌연변이를 포괄하도록 설계된 단일 축중성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 구축한 NNK 라이브러리에 의해 CDR 영역의 재-다양화를 발생시킨다. 오류 유발 돌연변이유발은 전체 dAb 서열을 dAb당 4.5-9개의 아미노산 변화의 중간 돌연변이율의 다양화에 적용시키며, 이는 프레임워크 및 CDR 영역 둘 다를 포함한다. NNK 파지미드 라이브러리 및 오류 유발 라이브러리 둘 다를 10nM, 1nM, 1nM, 0.1 nM (각각 라운드 1, 2, 3, 4) 비오틴화된 시노물구스 TSLP에 대한 4 라운드의 선택에 적용시켰다 (개별적으로 또는 다른 라이브러리와 폴로서). dAb를 서열분석하고, TSLP 수용체 결합 검정 (RBA) (실시에 1에서의 방법론)에 의해 스크리닝하고/거나 세포 기반 검정 (하기 방법론)에서 시험하였다. 정제된 dAb의 친화도를 표면 플라즈몬 공명 (SPR) (하기 방법론)에 의해 결정하였다.
- [0273] 세포 검정 (SW756 세포에서의 TSLP-유도된 pSTAT5의 억제)
- [0274] 친화도 성숙된 dAb를, 질 암종 세포주 SW756(ATCC)에서의 신호 전달자 및 전사 활성화인자 5의 TSLP 자극된 인산화를 억제하는데 있어서의 효력을 결정하기 위해 평가하였다. 이들 세포는 mRNA 분석에 의해 결정된 바와 같이 내인성 TSLP 수용체를 발현하고, STAT5 인산화에 의해 입증된 바와 같이 TSLP에 반응하는 것으로 제시된 바 있다. 간략하게, SW756 세포를 96-웰 플레이트에 25,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하고, 5% CO₂ 중 37°C에서 밤새 인큐베이션하여 부착되도록 하였다. 인간 또는 시노물구스 TSLP를, 1ng/ml의 EC₇₅ 농도에서, 0.05-1000nM 농도 범위의 dAb와 1시간 동안 사전-인큐베이션하였다. TSLP/dAb 복합체를 세포에 첨가하고, 5% CO₂ 중 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였고, 세포 용해가 이어졌다. 용해물을 메소스케일 디스커버리 (MSD)에 의해 분석하여, MSD 섹터 이미저 6000을 사용하여 제조업체의 프로토콜 (K15163D-3)에 따라 pSTAT5를 정량화하였다. 4개 파라미터 로지스틱 피트 모델을 사용하여 데이터를 플롯팅하여 효력 값을 획득하였다.
- [0275] 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 검정 (비오틴화된 TSLP)
- [0276] dAb를 결합 동역학 및 비오틴화된 인간 TSLP 및 비오틴화된 시노물구스 TSLP에의 결합에 대한 친화도에 대해 평가하였다. 이는 비아코어™ 4000을 사용하여 측정하였다. 비오틴화된 인간 TSLP 및 비오틴화된 시노물구스 TSLP를 SA-비오틴 커플링에 의해 SA 칩 상에 고정시켰다. 시험 dAb를 고정된 시토키인 위로 HBS-EP 완충제 중 1000nM, 100nM, 10nM 및 0nM로 통과시키고, 결합 곡선을 기록하였다. 이것을 동일한 비아코어 실행 내에서 25°C에서 실행시켰다. 완충제 주입 곡선을 사용하여 곡선을 이중 참조하고, 이어서 비아코어™ 4000 평가 소프트웨어에 고유한 1 대 1 결합 모델에 피팅시켰다.
- [0277] 친화도 성숙 스크리닝의 목적은 5nM 미만의 효력 (RBA 또는 세포 검정에 의해 측정된 IC₅₀)을 갖고 시노물구스 TSLP와 우수한 교차-반응성 (바람직하게는 인간 및 시노물구스 TSLP 사이에 IC₅₀에서 5-배 미만의 차이)을 보유하는 dAb를 확인하기 위한 것이다. 표 5는 RBA 또는 세포 검정에서 5 nM 미만의 효력 (IC₅₀)을 갖는 클론을 열거한다.

[0278] 표 5: dAb의 특징화

클론 번호	DOM30h- 440- 81/86과의 % 서열 동일성 (CDR 제외)	ELISA RBA 기하 평균 IC50 (nM)		SW756 세포에서의 pSTAT5 검정 기하 평균 IC50 (+/-SD) (nM)		친화도 (KD) (nM)		소규모 수율 (mg/L)	Tm °C
		인간	시노물	인간	시노물	인간	시노물		
		TSLP	구스 TSLP	TSLP	구스 TSLP	TSLP	구스 TSLP		
DOM30h -440-53	97 (98)	2.00 (0.65- 6.11)	1.30 (1.20- 1.40)	1.92 (1.41- 2.61)	7.28 (3.11- 17.01)	3.05	5.79	48	52.2
DOM30h -440-54	(98)	2.15 (1.31- 3.50)	0.67 (0.46- 0.97)	1.52 (0.83- 2.75)	2.45 (1.22- 4.92)	3.82	6.24	7	40.4
DOM30h -440-55	99 (98)	0.87 (0.67- 1.14)	0.55 (0.40- 0.76)	1.10 (0.63- 1.80)	3.12 (1.34- 7.30)	2.78	1.61	49	54.8
DOM30h -440-56	97 (97)	0.56 (0.48- 0.65)	0.55 (0.28- 1.07)	0.99 (0.88- 1.13)	4.74 (2.31- 9.74)	2.47	2.97	95	43.2
DOM30h -440-57	96 (97)	0.34 (0.26- 0.44)	0.36 (0.35- 0.37)	0.56 (0.32- 0.98)	1.60 (0.85- 3.02)	1.50 ¹	1.92 ²	48	45.2
DOM30h -440-58	(98)	1.41 (0.88- 2.28)	0.21 (0.11- 0.40)	1.91 (1.37- 2.65)	3.43 (1.7- 6.90)	2.65	3.42	46	49.2
DOM30h -440-60	97 (98)	0.32 (0.16- 0.63)	2.65 (1.52- 4.60)	0.70 (0.40- 1.20)	11.24 (5.95- 21.23)	0.14	7.81	51	54.2
DOM30h -440-63	97 (98)	1.55 (1.42- 1.70)	0.83 (0.64- 1.08)	2.21 (1.90- 2.61)	2.40 (0.75- 7.79)	4.22	5.98	43	47.6
DOM30h -440-64	98 (98)	0.95 (0.54 - 1.65)	0.87 (0.69 - 1.10)	3.26 (1.38- 7.70)	3.36 (1.74- 6.48)	6.17	4.29	87	50.6
DOM30h -440-65	98 (98)	0.69 (0.45 - 1.05)	0.29 (0.17- 0.48)	0.78 (0.37- 1.66)	3.8 (0.70- 20.21)	3.84	3.11	29	49.8

[0279]

[0280] ¹ 1000 nM 농도는 제외한 값 (모든 농도에 의하면 3.48)

[0281] ² 1000 nM 농도는 제외한 값 (모든 농도에 의하면 4.95)

[0282] 실시예 3: IC50 < 5 nM을 갖는 클론에 대한 "컨센서스" CDRL3의 확인

[0283] 표 6은 표 5에 열거된 각각의 클론에 대한 CDR3의 서열을 (카바트 넘버링 규정에 따라) 제공한다.

[0284] 표 6: dAb의 CDR 서열

클론 번호	서열 식별자	CDRL3
DOM30h-440-53	SEQ ID NO: 23	LQVGEDPVT (SEQ ID NO: 15)
DOM30h-440-54	SEQ ID NO: 24	WQLAFDPTT (SEQ ID NO: 16)
DOM30h-440-55	SEQ ID NO: 25	VQIGEDPVT (SEQ ID NO: 7)
DOM30h-440-56	SEQ ID NO: 26	MQIGEDPVT (SEQ ID NO: 17)
DOM30h-440-57	SEQ ID NO: 27	MQIGDDPVT (SEQ ID NO: 18)
DOM30h-440-58	SEQ ID NO: 28	LQIADDPVT (SEQ ID NO: 19)
DOM30h-440-60	SEQ ID NO: 29	IQFGEDPVT (SEQ ID NO: 20)
DOM30h-440-63	SEQ ID NO: 30	MQIGSDPVT (SEQ ID NO: 21)
DOM30h-440-64	SEQ ID NO: 31	LQIGEDPVT (SEQ ID NO: 22)
DOM30h-440-65	SEQ ID NO: 32	MQIGEDPVT (SEQ ID NO: 17)

[0285]

[0286]

클론 사이에 CDRL3의 서열에서 변이가 존재한다. 인간 TSLP를 사용한 수용체 결합 검정에서 및/또는 인간 TSLP를 사용한 세포 검정에서 5 nM 이하의 IC50을 갖는 모든 클론으로부터의 서열 CDRL3을 포함하는 CDRL3에 대해 컨센서스 서열을 확인하는 것이 가능하며: X₁GlnX₂X₃X₄AspProX₅Thr, 여기서 X₁은 Lys, Trp, Val, Met 또는 Ile를 나타내고, X₂는 Val, Leu, Ile 또는 Phe를 나타내고, X₃은 Gly 또는 Ala를 나타내고, X₄는 Glu, Phe, Asp 또는 Ser을 나타내고, X₅는 Val 또는 Thr을 나타낸다.

[0287]

또한, 인간 및 시노몰구스 TSLP를 사용한 세포 검정에서 IC50에서 5배 이하의 차이가 존재하는 것이 요구되는 경우에, 컨센서스 서열은 X₁GlnX₂X₃X₄AspProX₅Thr이 되며, 여기서 X₁은 Lys, Trp, Val 또는 Met을 나타내고, X₂는 Val, Leu 또는 Ile를 나타내고, X₃은 Gly 또는 Ala를 나타내고, X₄는 Glu, Phe, Asp 또는 Ser을 나타내고, X₅는 Val 또는 Thr을 나타낸다.

[0288]

실시예 4: 친화도 성숙 dAb의 C-말단 변형은 기존 인간 항-V_K (HAVK) 항체에 대한 결합을 감소시킨다

[0289]

DOM30h-440-55 및 DOM30h-440-57은 인간 및 시노몰구스 원숭이 TSLP에 대해 개선된 효력을 갖는, 친화도 성숙 후에 확인된 dAb의 예이다. DOM30h-440-55의 경우에 이 dAb는 또한 보다 높은 열적 안정성 (T_m)을 갖는 것으로

제시되었다. 기존 HAVK 항체에 대한 결합을 감소시키기 위한 C-말단 변형 및 다른 프레임워크 돌연변이를 표 7에 상술한 바와 같이 이들 dAb에 대해 행하였다. 기존 HAVK 항체에 대한 결합에 대한 C-말단 변형의 영향을 결정하기 위해 Dom30h-440-87, Dom30h-440-88, Dom 30h-440-90 및 Dom30h-440-91을 검정에서 시험하였다.

[0290] 기존 HAVK 항체에 대한 결합에 대한 검정

[0291] 변형된 C-말단을 갖지 않는 V_K dAb (DT02-K-044-085 dAb - 아미노산 서열은 W02013014208에서 서열식별번호: 105로서 공개됨)를 사용하여, 항-TSLP dAb의 V_K dAb 프레임워크에 대한 C-말단 변형이 V_K 프레임워크에 결합하는 기존 인간 항-V_K (HAVK) 항체에 대한 결합을 감소시킬 수 있는지 여부를 시험하기 위한 검정 (확인 검정)을 개발하였다. 10명의 공지된 HAVK 양성 인간 공여자로부터의 혈청 샘플을 검정에 사용하였다.

[0292] 마이크로타이타 검정 플레이트에서, HAVK 양성 인간 혈청 샘플을 함유하는 샘플 및 시험 물질 (예컨대 DT02-K-044-085 dAb 대조군 또는 변형된 dAb)을 실온에서 1시간 동안 사전-인큐베이션한 다음, 최종 농도가 5% HAVK 양성 인간 혈청, 10 µg/mL 시험 물질 (예컨대 DT02-K-044-085 dAb 또는 변형된 dAb), 0.2 µg/mL 비오틴닐화된 DT02-K-044-085 및 0.1 µg/mL 루테닐화된 ("sulfo-태그"TM) DT02-K-044-085 dAb이도록, 검정 희석제 (PBS 중 1% 카세인) 중 비오틴닐화된 DT02-K 044-085 및 루테닐화된 ("sulfo-태그"TM) DT02-K-044-085 dAb의 균질 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 RT에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 검정 샘플을 MSDTM 스트랩타비딘 플레이트 (이전에 PBS 중 카세인 (1%) 150 µL/웰로 RT에서 1-2시간 동안 차단시키고, 세척 없이 차단제를 제거함)로 옮겼다. MSDTM 플레이트를 암실에서 1시간 동안 RT에서 인큐베이션한 다음, 3회 세척하고, 150 µL/웰 판독 완충제를 첨가하고, MSD 섹터 이미저 상에서 플레이트를 판독하였다.

[0293] 검정에서 발광 신호는 DT02-K-044-085 dAb의 비오틴닐화 및 루테닐화된 분자가 샘플 중에 존재하는 항체와 가교되는 경우에 생성된다. 유리, 비표지된 DT02-K-044-085 dAb는 본 검정에서 HAVK 결합과 경쟁하여 감소된 신호 강도를 발생시켰다 (높은 % 신호 억제). 본 검정을 사용하여 V_K 항-TSLP dAb의 변형된 버전이 ADA 결합에 대해 DT02-K-044-085 dAb와 경쟁할 수 있는지 여부를 결정하였다. 결과를 도 2에 신호의 % 억제로서 제시한다. 신호의 % 억제가 낮을수록 더 적은 변형된 dAb가 HAVK 항체에 결합할 수 있다. 확인 검정을 사용하여, C-말단에서 -R 또는 +T 변형을 갖는 dAb가 DT02-K-044-085 dAb와 비교 시 기존 HAVK 항체에 대해 감소된 결합을 갖는 것으로 결정되었다.

[0294] 표 7: 변형을 갖는 dAb의 생성

모 dAb	모와 비교되는 프레임워크 돌연변이	C-말단 변형	비 코돈 최적화된 명칭	코돈 최적화된 명칭
DOM-30h-440-55	없음	-R	DOM30h-440-81	DOM30h-440-86
DOM-30h-440-55	K45E	-R	DOM30h-440-93	DOM30h-440-87
DOM-30h-440-57	M89V	-R	DOM30h-440-92	DOM30h-440-88
DOM-30h-440-55	없음	+T	DOM30h-440-94	DOM30h-440-89
DOM-30h-440-55	K45E	+T	DOM30h-440-95	DOM30h-440-90
DOM-30h-440-57	M89V	+T	DOM30h-440-96	DOM30h-440-91

[0295] 변형된 dAb의 아미노산 서열에 대한 서열 식별자를 하기 열거한다:

[0297] 서열식별번호: 9: Dom30h-440-81/86

[0298] 서열식별번호: 12: Dom30h-440-87/93

[0299] 서열식별번호: 33: Dom30h-440-88/92

[0300] 서열식별번호: 34: Dom30h-440-89/94

[0301] 서열식별번호: 35: Dom30h-440-90/95

[0302] 서열식별번호: 36: Dom30h-440-91/96

[0303] 실시예 5: DOM30h-440-81/86의 추가의 특징화.

[0304] [-R] 및 [+T] C-말단 변형 둘 다는 기존 HAVK 항체에 대한 dAb의 결합을 감소시키는데 동등하게 효과적인 것으로 제시되었다. 원래의 C-말단을 생성하기 위한 생체내에서의 [+T] C-말단 잔기의 클리핑의 이론적 위험을 고려하였다. 따라서 높은 효력, 시노물구스 원숭이 TSLP와의 교차-반응성 및 소규모로의 허용되는 수율의 조합에 기초하여 제2 라운드 친화도 성숙으로부터 DOM30h-440-81/86 (-R) 및 DOM30h-440-87/93 (-R)을 선택하였다. 2종 중 DOM30h-440-81/86이 보다 높은 열적 안정성 (Tm)으로 인해 바람직하였다.

[0305] 인간 및 시노물구스 원숭이 TSLP에 대한 DOM30h-440-81/86의 친화도를 이전에 기재된 바와 같이 비오틴닐화된 TSLP를 사용하여 SPR에 의해 결정하였다. 예시적인 데이터를 표 8에 제시한다.

[0306] 표 8: 재조합 인간 및 시노물구스 원숭이 TSLP에 대한 DOM30h-440-81/86의 친화도 (2회 실험으로부터 유래된 평균 데이터)

리간드	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (nM)
인간 TSLP	6.19x10 ⁵	5.08x10 ⁻⁴	8.67x10 ⁻¹⁰	0.87
시노물구스 TSLP	1.62x10 ⁶	7.74 x10 ⁻⁴	5.11 x10 ⁻¹⁰	0.51
인간 IL-7	유의한 결합 없음	유의한 결합 없음	유의한 결합 없음	유의한 결합 없음

[0307]

[0308] RBA에서의 TSLP의 억제에 대한 효력 및 SW756 세포에서의 TSLP-유도된 pSTAT5의 억제에 대한 효력을 이전에 기재된 바와 같이 결정하였다 (표 9). 또한, 인간 전혈에서의 인간 TSLP-유도된 TARC (CCL17)의 억제에 대한 DOM30h-440-81/86의 효력을 결정하였다. 예시적인 데이터를 표 9에 제시한다.

[0309] 인간 전혈에서의 TSLP-유도된 TARC (CCL17)의 억제

[0310] 나트륨 헤파린 (1000IU/100ml) 중의 건강한 지원자 공여자 (UK 인간 조직법을 준수하는 적절한 동의를 받음)로부터의 혈액을 GSK 스테버니지 현혈실로부터 수득하였다. dAb를 농도 범위 (예를 들어 0.04nM - 100nM)로 희석하고, 이어서 EC₇₅ 농도의 재조합 인간 TSLP (1ng/ml)와 실온에서 1시간 동안 사전-인큐베이션하였다. 각각의 공여자로부터의 혈액을 TSLP:dAb 복합체에 첨가하고, 37°C 및 5% CO₂에서 추가로 48시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 혈장을 수거하고, MSD 섉터 이미지를 사용하여 제조업체의 프로토콜 (K151BGC-4)에 기재된 바와 같이 MSD에 의해 TARC 수준을 분석하기 위해 -80°C에서 동결시켰다. 4개 파라미터 로지스틱 피트 모델을 사용하여 데이터를 플롯팅하여 효력 값을 수득하였다.

[0311] 표 9: 이. 콜라이로부터 발현된 인간 및 시노물구스 원숭이 TSLP의 억제에 대한 DOM30h-440-81/86의 효력

	DOM30h-440-81/86 기하 평균 IC50 (+/-SD) nM		
	TSLP 수용체 복합체에 대한 TSLP의 결합의 억제 (RBA) (n=2)	SW756 세포에서의 TSLP-유도된 pSTAT5의 억제 (n=5)	전혈에서의 TSLP-유도된 TARC의 억제 (n=7)
이. 콜라이로부터의 인간 TSLP	1.94 (1.32-2.85)	1.92 (0.85 - 4.36)	2.4 (0.4 - 14.4)
이. 콜라이로부터의 시노물구스 TSLP	2.05 (1.13 - 3.72)	4 (2.9 - 4.4)	일어나지 않음

[0312]

[0313] 실시예 6: HEK 세포로부터 발현된 글리코실화된 재조합 인간 TSLP의 억제에 대한 DOM30h-440-81/86의 효력

[0314] 세포 검정 (SW756 세포에서의 TSLP-유도된 pSTAT5의 억제) 또는 전혈 검정 (인간 전혈에서의 TSLP-유도된 TARC (CCL17)의 억제)을 사용하여, 인간 배아 신장 (HEK) 세포로부터 발현된 인간 TSLP를 억제하는 DOM30h-440-81/86의 효력을 결정하였다.

[0315] 표 10:

DOM30h-440-81/86 기하 평균 IC50 (+/- SD) nM		
	SW756 세포에서의 TSLP-유도된 pSTAT5의 억제 (n=3)	전혈에서의 TSLP-유도된 TARC의 억제 (n=6)
HEK 세포로부터의 인간 TSLP	0.55 (0.43 - 0.70)	3.10 (1.6 - 6.2)

[0316]

[0317] 실시예 7 DOM30h-440-81/86은 천연 인간 TSLP를 억제한다

[0318] 염증성 시토카인 (10ng/ml IL-1β 및 10ng/ml TNF α)에 의해 48시간 동안 자극된 인간 폐 섬유모세포로부터의 상청액을 천연 인간 TSLP의 공급원으로서 사용하였다. 천연 인간 TSLP를 RBA 검정에 사용하여 효력을 결정하였다. 이들 실험에서 천연 TSLP는 보다 낮은 검정 신호를 나타내었지만, DOM30h-440-81/86은 천연 TSLP를 용량-의존성 방식으로 억제한다는 것이 결정되었다. 예시적인 데이터를 도 3에 제시한다.

[0319] 유사하게, 염증성 시토카인 (48시간 동안 1ng/ml TNF α 및 10ng/ml IL-4)에 의해 자극된 인간 폐 섬유모세포로부터의 상청액을 천연 TSLP의 공급원으로서 사용하였다 (대략 2ng/ml). 세포 검정 (SW756 세포에서의 TSLP-유도된 pSTAT5의 억제)을 사용하면, DOM30h-440-81/86은 천연 TSLP-유도된 STAT5 인산화를 0.86nM (0.51-1.45nM)의 기하 평균 IC50 (+/- SD)으로 억제하였다.

[0320] 실시예 8 DOM30h-440-81/86은 TSLP, IL-33 및 IL-25의 혼합물에 의해 자극된 인간 PBMC로부터 IL-5 생산을 억제한다

[0321] 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 DOM30h-440-81/86과 함께 1시간 동안 사전-인큐베이션한 후, 10ng/ml의 각각의 인간 TSLP, 인간 IL-25 및 인간 IL-33 (알앤디 시스템즈)으로 자극하였다. 세포를 5% CO₂ 중 37°C에서 96 시간 동안 인큐베이션하고, 상청액을 수거하였다. IL-5를 비드 기반 검정 (루미넥스(Luminex))을 사용하여 측정하였다. DOM30h-440-81/86은 TSLP, IL-33 및 IL-25의 혼합물로 자극된 인간 PBMC로부터 IL-5 생산을 129 nM +/- 91 nM의 기하 평균 IC50 (+/- SD)으로 (평균 6명의 공여자) 억제하였다.

[0322] 실시예 9: DOM30h-440-81/86은 TSLP의 짧은 이소형에 결합하지 않는다

[0323] 짧은 형태 TSLP (sfTSLP - 성숙 전장 TSLP의 잔기 69-131을 포함하는 합성 비오틴화된 63개 아미노산 펩티드) 또는 전장 TSLP:his에 대한 DOM30h-440-81/86의 결합을 포르테바이오 옥테트 표지-무함유 상호작용 분석 기기를 사용하여 결정하였다. 토끼 항-TSLP 폴리클로날 항체 (pAb) (암캠(Abcam) 카탈로그 번호 ab47943)를 TSLP의 둘 다의 형태에의 결합에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. 스트렙타비딘 및 항-his티딘 (his) 센서 팁을 IgG-무함유 PBS 완충제 중에서 사전 인큐베이션하였다. 개별적으로, 비오틴화된 sfTSLP 및 전장 TSLP:his를 IgG-무함유 PBS 완충제 중에 10 μg/mL로 희석하였다. 이어서 스트렙타비딘 센서 팁을 비오틴화된 sfTSLP에 침지시키고, 항-his 센서 팁을 전장 TSLP:his에 침지시켰다. 또한 IgG-무함유 PBS 완충제 중에 잠기게 함으로써 비오틴화된 sf TSLP 및 전장 TSLP:his가 없는 블랭크 센서를 제조하였다. 다음으로, 센서를 500 또는 1000 nM의 농도의 DOM30h-440-81/86 또는 폴리클로날 항체 용액에 침지시키고, 결합 반응을 측정하였다. 완충제를 또한 블랭크 대조군으로서 사용하였다. 결합 역치를 0.1 반응 단위로 설정하고, 연구를 25°C에서 수행하였다.

[0324] 시험된 조건 하에서, 폴리클로날 항체 (ab47943)는 전장 TSLP 및 sfTSLP 둘 다에 결합하였다. DOM30h-440-81/86은 전장 TSLP 단백질에는 결합하였지만 sfTSLP에는 결합하지 않았다. pAb의 블랭크 센서에 대한 일부 비-특이적 결합이 관찰되었지만, 이는 단지 훨씬 더 높은 1000 nM의 농도를 사용한 경우에만 그러하였다.

[0325] 표 11:

		sFTSLP		전장 TSLP	
샘플		반응 단위		반응 단위	
ID	Conc (nM)	sf TSLP	블랭크	TSLP	블랭크
TSLP dAb pAb 47943 완충제	1000	0.04	0.02	0.32	0.02
	1000	5.90	0.15	5.16	0.60
	0	-0.01	-0.01	-0.12	0.01
TSLP dAb pAb 47943 완충제	500	0.07	0.00	0.25	0.04
	500	4.53	0.02	3.69	0.01
	0	0.07	0.00	-0.13	0.00

[0326]

[0327]

실시에 10 항-TSLP dAb 개발가능성 평가

[0328]

Dom30h440-81/86을 생산하는 이. 콜라이 세포주는 뛰어난 역가 및 공정 강건성을 제시하였고, 예를 들어 50L 발효 공정은 >2g/L (n=5)의 역가를 입증하였다. 강건성은 성장, 공정 제어 및 역가의 관점에서 입증되었다. 플라즈미드 안정성을 50L 규모에서 평가하였고, 플라즈미드를 발현하는 생성물 수율 >95%를 제시하였다. 목적하는 생성물 품질로 대략 70%의 총 공정 회수가 달성되었다. 150 L 규모로의 Dom30h440-81/86의 제조 및 정제를 위한 공정이 개발된 바 있다. 도 5는 발효 공정을 제시하고, 도 6은 하류 정제 공정을 제시한다. 이러한 공정의 실시예 착수하여 64.5%의 총 생성물 회수를 달성하였다. 비아코어 (실시예 1에 기재된 방법론 사용)에서 결합이 입증된 생성물은 SEC (크기 배제 크로마토그래피 HPLC)에 의한 결정 시 98.4% 단량체인 것으로 입증되었고, RP-HPLC에 의하면 순도 >93% 주요 피크를 가졌다. DOM30h440-81/86은 광범위한 pH 및 이온 강도 조건에 걸쳐 시험하였을 때 매우 우수한 생물물리학적 특징을 제시하였다. 용해도는 네이키드 완충제 중에서 적어도 40mg/ml, 및 pH2.5 내지 9.0 NaCl 및 0.0 내지 2.0M 범위의 NaCl 농도를 함유하는 완충제 중에서 10mg/ml까지 달성되었다. 약간의 응집은 단지 극단의 pH 즉 pH2.5 및 9.0에서만 나타났다. 약간의 입체형태적 변화는 단지 낮은 pH (pH4.5 이하)에서만 나타났다. 생물물리학적 스크리닝에 적용된 DOM30h440-81/86 샘플은 표준 시차 주사 열량측정 (DSC) 기술에 의해 측정된 매우 우수한 열적 안정성을 입증하였다 (Tm 범위 53.8 내지 67.2°C).

[0329]

제제 연구는 DOM30h440-81/86이 분무 건조된 또는 동결건조된 생성물로서 제제화될 수 있다는 것을 제시하였다. 이들 제제를 안정성 연구의 일부로서 다양한 조건 (온도 및 시간) 하의 평가에 적용하였다. 상이한 조건 하에서의 3개월 저장 후, 분무 건조된 또는 동결건조된 제제에서 어떠한 극복불가능한 물리적 또는 화학적 분해 또는 산화도 관찰되지 않았다.

[0330]

예시적인 분무 건조된 제제를 도 6에서의 하류 정제 공정의 생성물로부터 제조할 수 있다 (20 mM 포스페이트 중 45-55 mg/ml Dom30h440-81-86). 9.5- 11.5 g 트레할로스 2수화물 및 6.4-7.7 g L-류신을 물 중에 용해시킨 다음, 1000 gTSLP 결합 단백질을 용액을 첨가하고, 추가로 물로 희석시켜 5% 용액 농도를 달성하고, 이어서 GEA 니로 SD 마이크로(GEA Niro SD Micro)를 사용하여 125°C의 유입구 온도 및 70°C의 유출구 온도, 30 kg/h의 건조 기체 유동 및 5 kg/h의 분무화 기체 유동으로 분무 건조시켜 하기 분말을 제공하였다:

물질	분무 건조된 중량 농도 범위 (%)*
Dom30h440-81-86	67.3-68.0
포스페이트 완충제	3.3-4.0
트레할로스 2수화물	14.3
L-류신	9.5

[0331]

[0332]

* 5% 잔류 수분 함량이 예상됨

[0333]

의도되는 블렌드 강도 및 양을 생성하기 위해 분무 건조된 분말 및 DPPC/락토스 담체의 적합한 양을 칭량함으로써, 예를 들어 분무 건조된 분말 30 g 및 DPPC/락토스 20 g을 용기에 첨가하여, 분무 건조된 분말로부터 예시적인 블렌드를 제조할 수 있다. 마지막으로 터블라 시스템을 사용하여 2종의 성분을 60분 동안 46분⁻¹로 블렌딩한다.

물질	블렌드 농도 범위 (%)
분무 건조된 분말	0.3-60
DPPC/락토스	40-99.7

[0334]

[0335]

[0336]

[0337]

[0338]

[0339]

[0340]

[0341]

[0342]

[0343]

[0344]

[0345]

[0346]

[0347]

[0348]

[0349]

[0350]

실시에 11 건강한 공여자 혈청 중 DOM30h-440-81/86에 대한 항-약물 항체 (ADA)의 빈도

특이적 면역검정을 사용하여 건강한 공여자 혈청 중 DOM30h-440-81/86에 대한 항-약물 항체 (ADA)의 빈도를 결정하였다.

항-약물 항체에 대한 dAb의 결합을 결정하기 위한 특이적 면역검정

1. 마이크로타이터 검정 플레이트에서, 검정 희석제 (PBS 중 1% 카세인) 중 5% 혈청 샘플을 검정 희석제 (PBS 중 1% 카세인) 중 0.1 µg/mL 비오틴화된 시험 물질 (예를 들어, DOM30h-440-81/86) 및 0.2 µg/mL 루테닐화된 ("술포-태그"TM) 시험 물질 (예를 들어, DOM30h-440-81/86)을 함유하는 균질 혼합물과 함께 인큐베이션하였다.

2. MSDTM 스트렙타비딘 플레이트를 진탕하면서 1시간 동안 실온 (RT)에서 150 µl 차단 완충제 (PBS 중 1% 카세인)로 차단시켰다. 차단제는 세척없이 제거되었다.

3. 샘플 (50 µl)을 검정 플레이트에서 MSDTM 스트렙타비딘 플레이트로 옮기고, RT에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

4. 1시간 인큐베이션 후에, MSD 플레이트를 이어서 PBS-트윈으로 3회 세척하고, 판독 완충제 (150 µL/웰)를 첨가하고, MSD 색터 이미지를 사용하여 플레이트를 판독하였다.

5. 검정에서 발광 신호는 시험 물질, 예를 들어 DOM30h-440-81/86의 비오틴화 및 루테닐화된 분자가 혈청 샘플 중에 존재하는 항체와 가교되는 경우에 생성되었다.

6. 백분율 양성률은 검정 컷포인트를 초과하는 샘플의 %로서 결정되었다. 검정 컷포인트는 임의의 이상치의 제거 후의 [집단의 평균 발광 +1.654 x 표준 편차]로서 정의되었다.

예시적인 데이터를 도 4에 제시한다. DOM30h-440-81/86에 대해 양성 신호 (검정 컷포인트 초과)를 제공하는 건강한 대상체로부터의 혈청의 빈도는 6.7%로, DT02-K-044-085의 경우의 11%와 비교되었다.

실시에 12: DOM30h-440-81/86의 흡입

1마리의 수컷 및 1마리의 암컷 시노물구스 원숭이에게 비히클 (락토스 중 1% w/w 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC)) 중 공칭 농도 20%로 제제화된 분무 건조된 조성물 (DOM30h-440-81/86 (61.07%), 포스페이트 완충 염 (3.94%), 트레할로스 (30% w/w), 류신 (5% w/w))을 14일 동안 0, 880, 2272 또는 7046 mg/kg/일의 전체 추정 용량으로 매일 1시간 페이스 마스크 흡입에 의해 투여하였다. 제1일 및 제14일에 투여 직후 및 1시간 흡입 기간이 종료되고 0.5, 1, 2, 5, 8, 12 및 23시간 후에 혈장 샘플을 채취하였다. 기관지폐포 세척 (BAL) 샘플은 부검 시 동물로부터 대략 10 ml의 등장성 염수 용액으로의 단일 세척에 의해 채취하였다. 상업적으로 입수가 가능한 퀴티크롬(QuantiChrom) 검정을 사용하여 각각의 혈장 샘플 5 µl (탈이온수로 2.5배 희석됨) 및 각각의 BAL 샘플 50 µl를 우레아에 대해 분석하였다. 제14일에 동물당 혈장 및 종말 BAL 샘플에서 평균 내인성 우레아의 측정에 의해 BAL 샘플에 함유된 상피 폐액 (ELF)의 부피를 추정하여 ELF 희석을 결정하였다. 50 µl의 각각의 혈장/BAL 샘플 (슈퍼블록(SuperBlock)[®]T20 중 5배 희석됨)을 또한 DOM30h-440-81/86 농도에 대해, 하기와 같이 분석하였다:

1. 슈퍼블록[®]T20 (PBS) 중 35 µl 비오틴화된 인간 TSLP (4 µg/ml)를 96 웰 소형 스팟 스트렙타비딘 플레이트 (메소스케일 디스커버리(MesoScale Discovery))의 각 웰에 적용하였다. 플레이트를 밀봉하고, 진탕시키면서 37°C에서 대략 1시간 동안 인큐베이션하였다.

2. 플레이트를 300 µl 세척 완충제 (10 mM 인산나트륨, 150 mM NaCl, 0.1% 트윈 20, pH 7.5)로 5회 세척하였다.

3. 200 µl 차단 완충제 (슈퍼블록[®]T20 (써모, 제품 번호 37516) + 5% NHP 혈장)를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 진탕시키면서 37°C에서 대략 1시간 동안 인큐베이션하였다.

4. 플레이트를 300 µl 세척 완충제 (10 mM 인산나트륨, 150 mM NaCl, 0.1% 트윈 20, pH 7.5)로 5회 세척하였

다.

- [0351] 5. 35 μ l 샘플 (또는 보정 표준)을 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 진탕시키면서 37°C에서 대략 2시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0352] 6. 플레이트를 300 μ l 세척 완충제 (10 mM 인산나트륨, 150 mM NaCl, 0.1% 트윈 20, pH 7.5)로 5회 세척하였다.
- [0353] 7. 35 μ l 리포터 태그 용액 (슈퍼블록 $\text{\textcircled{R}}$ T20 (써모, 제품 번호 37516) 중 HBR-9 (써모, 파트 번호 3KC564)의 1:50 희석 중 0.5 μ g/ml 루테늄 표지된 항-V카파 mAb)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 진탕시키면서 37°C에서 대략 1시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0354] 8. 플레이트를 300 μ l 세척 완충제 (10 mM 인산나트륨, 150 mM NaCl, 0.1% 트윈 20, pH 7.5)로 5회 세척하였다.
- [0355] 9. 150 μ l 발색 기질 (계면활성제 함유 0.87 X MSD 판독 완충제 T (MSD, 카탈로그 번호 R92TC-1))을 각 웰에 첨가하였다. 1.5-2분 후에, 플레이트 판독기를 사용하여 전계발광을 측정하였다.
- [0356] 혈장 샘플을 혈장 보정 라인에 대해 분석하는 한편 BAL 샘플은 BAL 보정 라인에 대해 분석하였다. ELF 희석 배율을 사용하여 BAL 샘플 내에 함유된 ELF 중 DOM30h-440-81/86의 농도를 계산하였다. 수컷 및 암컷 군에 대한 주요 혈장 약동학적 파라미터를 표 12 및 13에 제공하고, 상피 내층액 중 DOM30h-440-81/86의 농도를 표 14에 요약한다.

[0357] 표 12

파라미터	기간	수컷 (n=1/군)		
		DOM30h-440-81/86의 추정 흡입 용량 (μ g/kg/일) ^a		
		880	2272	7046
AUC _{0-t} ^b (ng.h/mL)	제1일	1360	1230	7550
	제14일	188	1240	1900
C _{max} ^b (ng/mL)	제1일	217	135	1040
	제14일	24.2	150	178
T _{max} ^c (h)	제1일	3.0	1.5	6.0
	제14일	3.0	2.0	3.0

[0358]

[0359] 표 13

파라미터	기간	암컷 (n=1/기)		
		DOM30h-440-81/86의 추정 흡입 용량 (μ g/kg/일) ^a		
		880	2272	7046
AUC _{0-t} ^b (ng.h/mL)	제1일	1770	2230	6670
	제14일	717	1050	4540
C _{max} ^b (ng/mL)	제1일	269	341	831
	제14일	97.6	157	440
T _{max} ^c (h)	제1일	3.0	3.0	1.5
	제14일	3.0	1.5	3.0

[0360]

- [0361] a. 전체 연구에 대한 전체적인 추정 흡입 용량
- [0362] b. 성별당 개별 TK 샘플링 경우에 대한 용량-정규화 및 전체 연구에 대한 전체적인 추정 흡입 용량에 의한 재-정규화에 의해 계산됨
- [0363] c. T_{max} 값은 1시간 흡입 기간의 시작으로부터임.

[0364] 표 14

추정 흡입 용량 ^a ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{일}$)	성별	DOM30h-440-81/86의 농도 ($\text{ng}/\text{mL ELF}$)
0	M	NC
	F	NC
880	M	78.6
	F	141
2272	M	340
	F	260
7046	M	770
	F	1310

[0365]

[0366] NC = 계산되지 않음

[0367] a. 전체적인 추정 흡입 용량

[0368] DOM30h-440-81/86은 비히클 대조군 동물로부터 수집된 혈장 및 BAL 샘플 중 어느 것에서도 정량화가능하지 않았다. DOM30h-440-81/86이 투여된 동물에서, ELF 중 DOM30h-440-81/86의 농도는 일반적으로 용량을 증가시키는 것에 의해 증가된다. 전신 노출은 일반적으로 제1일보다 제14일에 더 낮았다. 작은 샘플 크기 ($n=1/\text{성별}/\text{군}$)는 성별 사이의 전신 노출 또는 용량 사이의 비례성에서의 차이를 결론내리는 것을 어렵게 하였다.

[0369] 실시예 13: DOM30h-440-81/86은 TSLP, IL-33 및 IL-25의 혼합물에 의해 자극된 인간 비강 폴립 세포로부터의 IL-5 및/또는 IL-13 생산을 억제한다

[0370] 비강 폴립 조직 (UK 인간 조직법을 준수하는 적절한 동의를 받음)을 단편으로 미세하게 세단하고, 이것을 진탕 하면서 37°C에서 1시간 동안 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내독소 무함유 콜라게나제 (리베라제(Liberase)TM, 로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics)) 및 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase (시그마-알드리치)로 소화시켜 단세포 현탁액을 수득하였다. 세포를 AIM V 혈청-무함유 배지 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))로 2회 세척한 다음, AIM V 배지 중 4×10^6 개 세포/ml로 재현탁시켰다. DOM30h-440-81/86을 4배 최종 요구 농도로 희석하고, 50 μl /웰을 편평-바닥 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 이어서 각각의 시토카인의 10ng/ml의 최종 농도를 제공하기 위해 40ng/ml의 각각의 TSLP, IL-25 및 IL-33 (알앤디 시스템즈)을 함유하는 AIM V 배지 50 μL 를 첨가한 다음, 100 μl 의 세포 현탁액을 첨가하였다 (웰당 4×10^5 개 세포). 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 96시간 동안 인큐베이션하고, 그 후 상청액을 수집하고, 루미넥스 멀티플렉스 검정을 사용하여 IL-5 및 IL-13을 측정하였다.

[0371] 비강 조직 검정에서 관찰된 자극 반응은 고도로 가변적이었고, DOM30h-440-81/86은 연구된 공여자 조직에 의존하여, IL-5 및/또는 IL-13의 무 억제, 부분 억제 및 완전 억제 사이의 범위의, 다양한 정도의 효능을 상응하게 제시하였다.

[0372] 실시예 14: 인간 TSLP와 복합체화된 DOM30h-440-81/86의 결정 구조

[0373] 정제된 재조합 재폴딩된 인간 TSLP (이. 콜라이로부터) 24.6mg을 20mg 재조합 DOM30h-440-81/86 (0.91 hTSLP 대 DOM30h-440-81/86의 몰비)과 혼합하여 복합체를 제조한 후, 5k 분자량 컷오프 막 (비바스핀(VivaSpin) 20 사로리우스(Sarorius): 카탈로그 번호 VS2012)이 피팅된 원심분리 농축 장치를 사용하여 ~2ml의 부피로 농축시켰다. 이어서 0.5M 아르기닌을 함유하는 PBS의 구동 완충제로 평형화된 슈퍼텍스 S75 크기 배제 칼럼 (지이 헬스케어(GE Healthcare) 17-1180-01)을 사용하여 복합체를 비복합체화된 물질로부터 정제하였다. 분해된 복합체를 비바스핀 20을 사용하여 다시 농축시킨 후, 20 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl의 최종 완충제로 투석하였다. 최종 수율은 57.78mg/ml의 53 μl 의 단백질이었다 (280nm에서의 흡광도에 의해 측정된 바와 같음). 복합체 성분

을 단백질 무손상 질량 분광측정법 및 SDS-PAGE 겔에 의해 확인하였다.

- [0374] 33.4mg/ml의 20 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl 중 인간 TSLP- DOM30h-440-81/86 정제된 복합체를 1:1 비의 웰 대 단백질 용액으로 이루어진 시팅 드롭에서 침전제로서 20% w/v PEG 3350 및 0.02M Na K 포스페이트를 사용하여 공-결정화하였다. 결정을 20% PEG200 및 파라톤을 함유하는 웰 용액으로 이루어진 동결보호제를 사용하여 동결보호한 후, 액체 질소 중에서 급속 동결시켰다. 단결정으로부터의 데이터를 유럽 싱크로트론 방사선 설비 (그르노블)에서 수집하고, AUTOPROC (Vonrhein, C., et al. (2011) Acta Cryst. D67, 293-302.) 내의 XDS (Kabsch, W. (2010) XDS. Acta Cryst. D66, 125-132.) 및 AIMLESS (Evans, P.R., et al. (2013) Acta Cryst. D69, 1204-1214)를 사용하여 1.84 Å으로 프로세싱하였다. PHENIX (Adams PD, (2010) Acta Cryst. D66, 213-221) 내의 PHASER (J. Appl. Cryst. (2007). 40, 658-674)를 사용하여 ASU 중 4종의 복합체를 함유하는 분자 대체 용액을 결정화하였다. COOT (Emsley, P., et al. (2004)Acta Cryst., D60, 2126-2132)를 사용하여 반복적인 매뉴얼 모델 구축을 수행하고, PHENIX를 사용하여 정밀화하였다. 인간 TSLP- DOM30h-440-81/86 상호작용 계면이 잘 규정되었고, ASU 내의 모든 4종의 복합체에서 일치하였다.
- [0375] hTSLP- DOM30h-440-81/86 복합체의 구조는 래트 TSLP/ILRa/TSLP 수용체 복합체의 구조 상에 오버레이될 수 있다 (도 8). 이는 DOM30h-440-81/86이 TSLP와 TSLPR 사이의 상호작용을 직접적으로 방해한다는 것을 제시한다. 상기 논의된 바와 같이, IL-7R α 쇄의 동원을 방지함으로써 또는 TSLPR (또는 IL-7R α)에 직접적으로 결합함으로써 작용하는 TSLP 길항제가 TSLP에 결합하여 TSLP와의 복합체로서 용액 중에 체류하는 TSLP 길항제보다 항원으로서 더 효과적으로 내재화되고 프로세싱될 수 있기 때문에, 이는 고도로 바람직하다.
- [0376] DOM30h-440-81/86에 대한 에피토프는 DOM30h-440-81/86에의 결합 시 용매에 접근불가능하게 되는 인간 TSLP 상의 잔기를 확인함으로써 보다 정확하게 규정될 수 있다. 따라서, Qt-PISA v2.0.1 (Protein Interfaces, Complexes and Assemblies; Krissinel and Henrick (2007)을 사용하여 항-TSLP dAb/인간 TSLP 공-결정 구조를 분석하고, 인간 TSLP의 각각의 잔기에 대해 매립된 표면적 (BSA)을 계산하였다. 도 8은 DOM30h-440-81/86에의 결합 시 매립되게 되는 TSLP의 각각의 잔기의 % 노출된 표면적을 제시한다. DOM30h-440-81/86에의 결합 시 매립되게 되는 인간 TSLP 상의 그러한 잔기는 에피토프를 나타낸다. 이에 기초하여, 인간 TSLP 상의 DOM30h-440-81/86에 대한 에피토프는 하기 잔기: Tyr15, Ser20, Ile24, Lys31, Ser32, Thr33, Glu34, Phe35, Asn36, Asn37, Thr38, Val39, Ser40, Cys41, Ser42, Asn43, His46, Ser114, Gln115, Gln117, Gly118, Arg121, Arg122, Asn124, Arg125, Pro126, Leu127, Leu128 및 Lys129를 포함한다.
- [0377] 에피토프에 결합하는 항체의 부분 또는 그의 단편을 파라토프라 명명한다. CDR은 파라토프의 주요 영역인 것으로 널리 받아들여지지만, 다른 잔기가 또한 중요할 수 있다. 따라서, 인간 TSLP에의 결합 시 용매에 접근불가능하게 되는 DOM30h-440-81/86 상의 잔기를 확인함으로써 (DOM30h-440-81/86의 에피토프를 확인하는데 사용된 동일한 기술을 사용함) DOM30h-440-81/86의 파라토프를 확인하였다. 도 9는 인간 전장 TSLP에의 결합 시 매립되게 되는 DOM30h-440-81/86의 각각의 잔기의 % 노출된 표면적을 제시한다. 이에 기초하여, DOM30h-440-81/86의 파라토프는 하기 잔기: Arg27, Pro28, Ile29, Arg30, Asn31, Trp32, Asp34, Tyr36, Gln38, Pro44, Leu46, Trp49, Gly50, His53, Gln55, Tyr87, Val89, Ile91, Gly92, Glu93, Asp94, Val96, Phe98 및 Gln100을 포함한다. 놀랍지않게도, 이들 잔기의 3분의 2는 CDR 영역 (카바트 넘버링 스킴에 따라 정의됨), 즉 CDRL1의 Arg27, Pro28, Ile29, Arg30, Asn31, Trp32 및 Asp34, CDRL2의 Gly50, His53 및 Gln55, 및 CDRL3의 Val89, Ile91, Gly92, Glu93, Asp94 및 Val96에 속하였다. 또한, CDRL2가 접촉 넘버링 시스템에 따라 정의된다면, Leu 46 및 Trp49가 또한 CDR 잔기인 것으로 간주될 것임에 주목한다.
- [0378] Vk/Jk 배선에 대한 DOM30h-440-81/86의 단백질 다중 서열 정렬을 수행하였다. 프레임워크 잔기 Tyr36, Gln38, Pro44, Leu46 (접촉 넘버링 시스템을 사용할 경우 CDR 잔기로 간주됨), Tyr87, Phe98 및 Gln100은 기능적 인간 Vk 및 Jk 유전자에 걸쳐 60% 이상의 동일성으로 보존되었다. 이러한 보존 수준은 이들 잔기가 구조적 역할을 갖는다는 것을 시사한다. 그러나, 기능적 인간 Vk 및 Jk 유전자에서 다른 잔기가 관찰된다는 사실은 변이가 용인될 수 있다는 것을 시사한다. 대조적으로, Trp49 (접촉 넘버링 시스템을 사용할 경우 CDR 잔기로 간주됨)는 비교된 유전자들 사이에서 고유하였고, 이는 이것이 보존될 필요가 있을 수 있다는 것을 시사한다.
- [0379] 에피토프와 파라토프 사이의 상호작용을 CCG (케미칼 컴퓨팅 그룹(Chemical Computing Group)) MOE v2014.09 (몰레큘라 오퍼레이팅 인바이런먼트(Molecular Operating Environment))를 사용하여 규정하였다. dAb 또는 TSLP의 7Å 내의 단백질 잔기를 선택하고, 이어서 디폴트 파라미터를 갖는 "리간드 상호작용" 도구를 사용하여 이들 잔기와 상호작용하는 것으로 여겨지는 상호작용 분자로부터 물 분자 또는 잔기를 확인하였다. 단백질 잔기보다는 소분자 리간드 상호작용을 규정하기 위해 설계된 이러한 도구로 인해 각각의 선택된 잔기의 "리간드

상호작용"은 개별적으로 계산된다는 것을 주목한다. 임의의 쇠내 상호작용을 삭제하고, 2개의 쇠 사이에서 가교를 형성하는 것 이외의 모든 물 상호작용을 삭제하기 위해 MOE에 의해 규정된 상호작용을 편집하였다. 남은 상호작용 잔기를 하기 제시한다:

- [0380] 에피토프
- [0381] 항-TSLP dAb 잔기와 직접 상호작용만: Lys31, Phe35, Arg121, Arg122
- [0382] 항-TSLP dAb 잔기와 직접 상호작용, 및 물을 통한 간접 상호작용: Ser32, Thr33, Asn37
- [0383] 물을 통한 간접 상호작용만: Tyr15, Asn36, Ser40, Cys41, Ser42, Leu128
- [0384] 파라토프
- [0385] TSLP 잔기와 직접 상호작용만: Trp32, Ile91
- [0386] TSLP 잔기와 직접 상호작용, 및 물을 통한 간접 상호작용: Arg30, Asn31, Asp34, Glu93, Asp94
- [0387] 물을 통한 간접 상호작용만: Pro28, Tyr36, Gln38, Pro44, Leu46, Gly50, His53, Gln55, Ser67, Gly92
- [0388] 에피토프 내의 상호작용 잔기는 DOM-30h-440-81/86에의 결합 시 용매에 보다 더 접근불가능하게 되는 모든 잔기이다. Ser67은 TSLP에의 결합 시 용매에 보다 더 접근불가능하게 되는 것은 아닌 DOM-30h-440-81/86 상의 잔기이지만, 그러나 물을 통해 TSLP와 상호작용한다. Ser67은, 수많은 다른 프레임워크 잔기와 유사하게, 기능적 인간 Vk 및 Jk 유전자에 걸쳐 60% 초과와 동일성으로 보존되고, 이는 이러한 잔기가 구조적 역할을 가질 수 있다는 것을 시사한다.

[0389]

서열 목록

SEQ ID NO:1

Dom30h-440-81/86, Dom30h-440-53, Dom30h-440-54, Dom30h-440-55, Dom30h-440-56, Dom30h-440-57, Dom30h-440-58, Dom30h-440-60, Dom30h-440-63, Dom30h-440-64 및 Dom30h-440-65 의 CDRL1 (카바트, 코티아 및 AbM CDR 정의)
RASRPINWLD

SEQ ID NO:2

Dom30h-440-81/86 의 CDRL1 (접촉 CDR 정의)
RNWLDWY

SEQ ID NO:3

Dom30h-440-81/86 의 CDRL1 (최소 결합 단위)
RNWLD

SEQ ID NO:4

Dom30h-440-81/86, Dom30h-440-53, Dom30h-440-54, Dom30h-440-55, Dom30h-440-56, Dom30h-440-57, Dom30h-440-58, Dom30h-440-60, Dom30h-440-63, Dom30h-440-64 및 Dom30h-440-65 의 CDRL2 (카바트, 코티아, AbM CDR 정의)
GASHLQS

SEQ ID NO:5

Dom30h-440-81/86 의 CDRL2 (접촉 CDR 정의)
LLIWGASHLQ

SEQ ID NO:6

Dom30h-440-81/86 의 CDRL2 (최소 결합 단위)
GASHLQ

SEQ ID NO:7

Dom30h-440-81/86 및 Dom30h-440-55 의 CDRL3 (카바트, 코티아, AbM CDR 정의)
VQIGEDPVT

SEQ ID NO:8

Dom30h-440-81/86 의 CDRL3 (접촉 CDR 및 최소 결합 단위 정의)
VQIGEDPV

SEQ ID NO:9

Dom30h-440-81/86 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCVQIGEDPVTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:10

비-코돈 최적화된 DNA 서열 (Dom30h-440-81)
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTG
CCGGGCAAGTCGGCCATTCGGAATTGGTTAGATTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCCTAAG
CTCCTGATCTGGGGGGCGTCCCCTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTG
GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTGTGCAG
ATTGGGGAGGATCCTGTGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA

[0390]

SEQ ID NO:11

코돈-최적화된 DNA 서열 (Dom30h-440-86)

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCGTCTCCCTGTCTGCGTCCGTTGGTGACCGTGTAAACCATCACTTG
TCGTGCAAGCCGTCGGATCCGTAAGTGGCTGGATTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCGAAA
CTGCTGATCTGGGGTCTTCTCACCTGCAGTCTGGTGTCCGTCCGTTTCTCTGGCTCTGGTAGCG
GTACCGACTTCACCTGACTATCTAGCCTGCAGCCGGAAGACTTCGCGACCTACTACTGCGTTCAG
ATCGGTGAAGACCCGTTACCTTCGGTCAGGGCACCAAAGTAGAAATCAAA

SEQ ID NO:12

Dom30h-440-87/93 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASRPINWLDWYQQKPKAPPELLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCVQIGEDPVTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:13

비-코돈 최적화된 DNA 서열 (Dom30h-440-87)

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCGTCTCCCTGTCTGCGTCCGTTGGTGACCGTGTAAACCATCACTTG
TCGTGCAAGCCGTCGGATCCGTAAGTGGCTGGATTGGTACCAGCAGAAACCGGGTAAAGCGCCGAA
CTGCTGATCTGGGGTCTTCTCACCTGCAGTCTGGTGTCCGTCCGTTTCTCTGGCTCTGGTAGCG
GTACCGACTTCACCTGACTATCTAGCCTGCAGCCGGAAGACTTCGCGACCTACTACTGCGTTCAG
ATCGGTGAAGACCCGTTACCTTCGGTCAGGGCACCAAAGTAGAAATCAAA

SEQ ID NO:14

코돈-최적화된 DNA 서열 (Dom30h-440-93)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACTTG
CCGGGCAAGTCGGCCATTCGGAATTGGTTAGATTGGTACCAGCAGAAACCGGGAAAGCCCCTGAG
CTCCTGATCTGGGGGCGTCCCACTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTG
GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGTACGTACTACTGTGTGCAG
ATTGGGGAGGATCCTGTGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

SEQ ID NO:15

Dom30h-440-53 의 CDRL3 (카바트 정의)

LQVGEDPVT

SEQ ID NO:16

Dom30h-440-54 의 CDRL3 (카바트 정의)

WQLAFDPTT

SEQ ID NO:17

Dom30h-440-56 및 Dom30h-440-65 의 CDRL3 (카바트 정의)

MQIGEDPVT

SEQ ID NO:18

Dom30h-440-57 의 CDRL3 (카바트 정의)

MQIGDDPVT

SEQ ID NO:19

Dom30h-440-58 의 CDRL3 (카바트 정의)

LQIADDPVT

[0391]

SEQ ID NO:20

Dom30h-440-60 의 CDRL3 (카바트 정의)
IQFGEDPVT

SEQ ID NO:21

Dom30h-440-63 의 CDRL3 (카바트 정의)
MQIGSDPVT

SEQ ID NO:22

Dom30h-440-64 의 CDRL3 (카바트 정의)
LQIGEDPVT

SEQ ID NO: 23

Dom30h-440-53 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCLQVGEDPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 24

Dom30h-440-54 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCWQLAFDPTTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 25

Dom30h-440-55 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCVQIGEDPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 26

Dom30h-440-56 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTVSSLQPEDFATYYCMQIGEDPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 27

Dom30h-440-57 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPPELLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCMQIGDDPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 28

Dom30h-440-58 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCLQIADDPVTFGQGTKVEIKR

[0392]

SEQ ID NO: 29
Dom30h-440-60 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCIQFGEDPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 30
Dom30h-440-63 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCMQIGSDPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 31
Dom30h-440-64 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCLQIGEDPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 32
Dom30h-440-65 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCMQIGEDPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 33
Dom30h-440-88/92 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPPELLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCMQIGDDPVTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 34
Dom30h-440-89/94 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPKLLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCVQIGEDPVTFGQGTKVEIKR

SEQ ID NO: 35
Dom30h-440-90/95 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPPELLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCVQIGEDPVTFGQGTKVEIKR

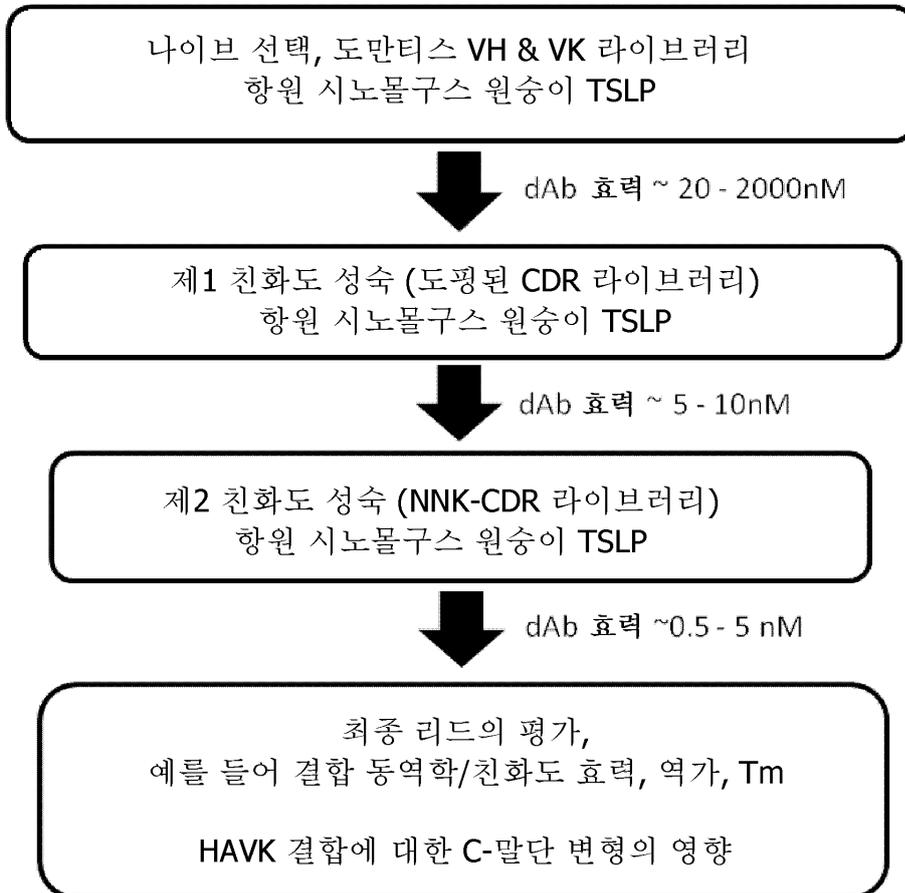
SEQ ID NO: 36
Dom30h-440-91/96 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRPINWLDWYQQKPGKAPPELLIWGASHLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCMQIGDDPVTFGQGTKVEIKR

[0393]

도면

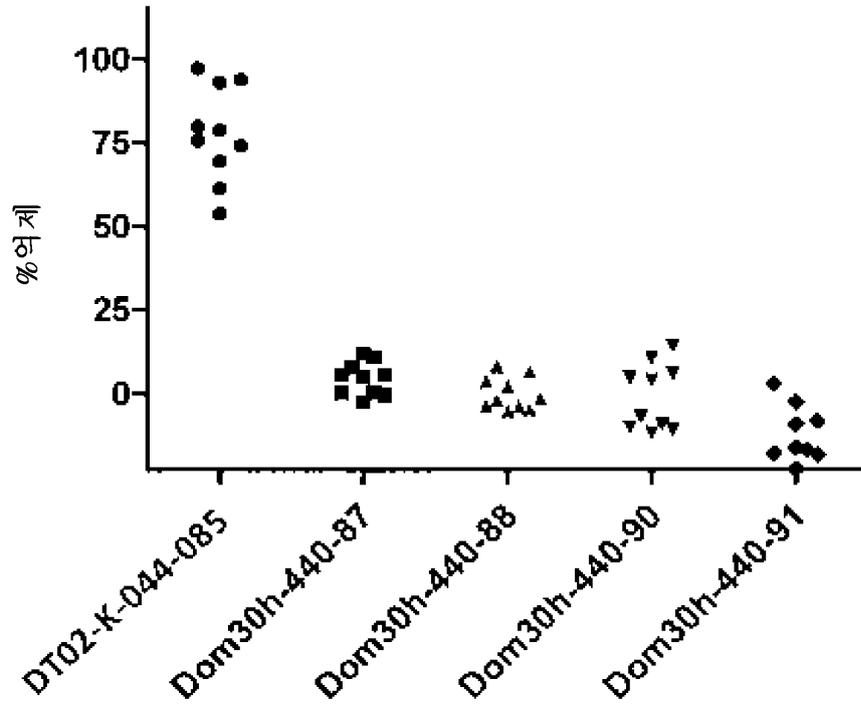
도면1

항-TSLP dAb의 생성, 최적화 및 특징화



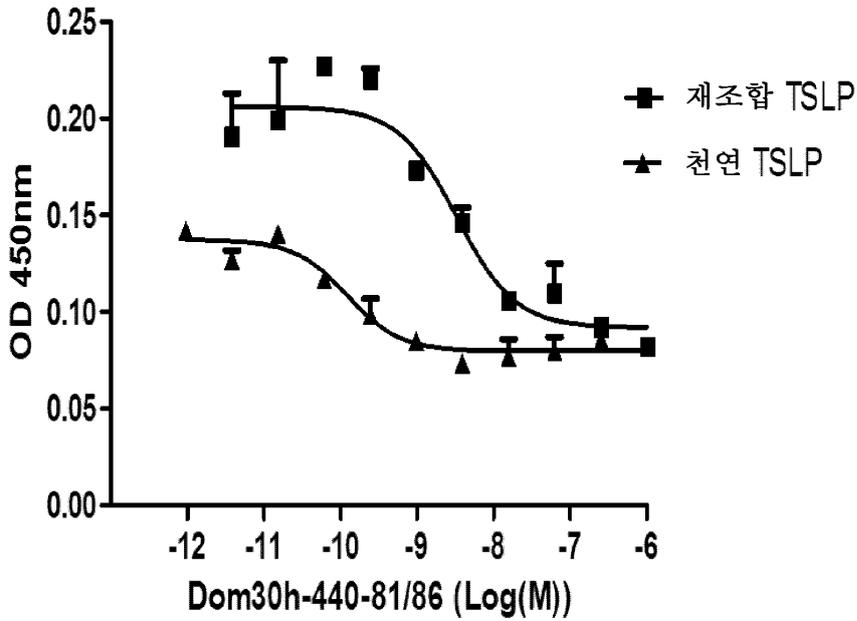
도면2

기존 인간 항-Vk (HAVK) 항체에 대한 dAb의 결합의 결정



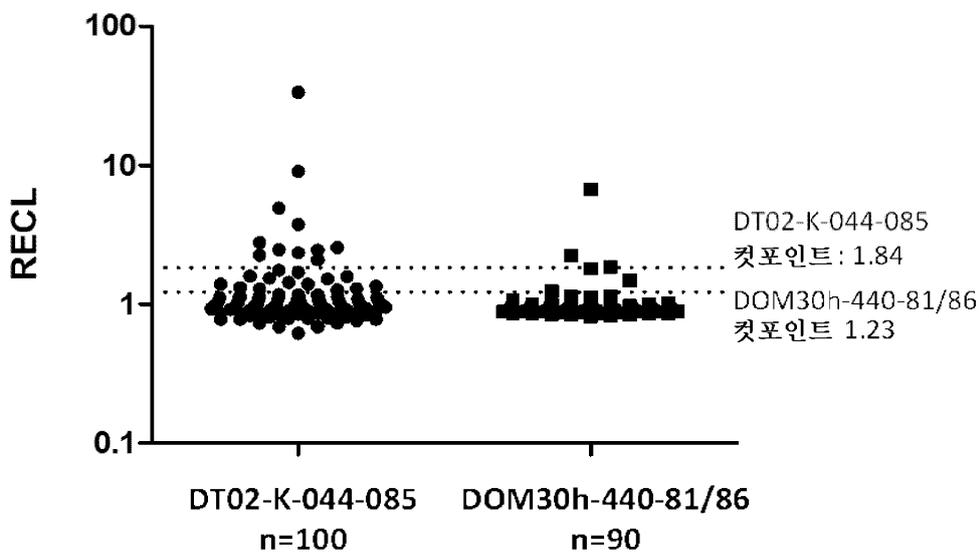
도면3

DOM-30h-440-81/86은 재조합 및 천연 인간 TSLP의 TSLP 수용체 복합체에 대한 결합을 억제한다 (TSLP 수용체 결합 검정 (RBA))

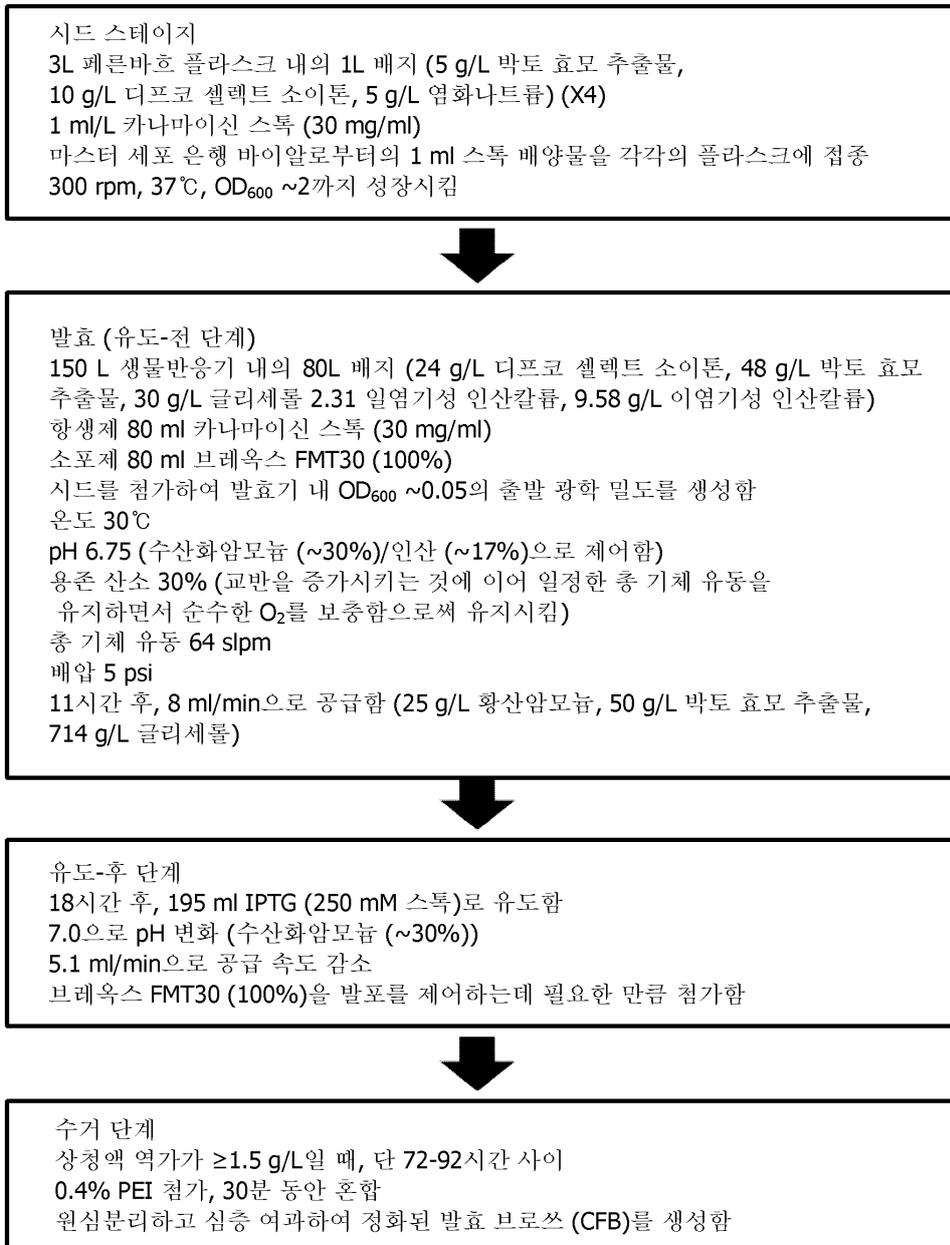


도면4

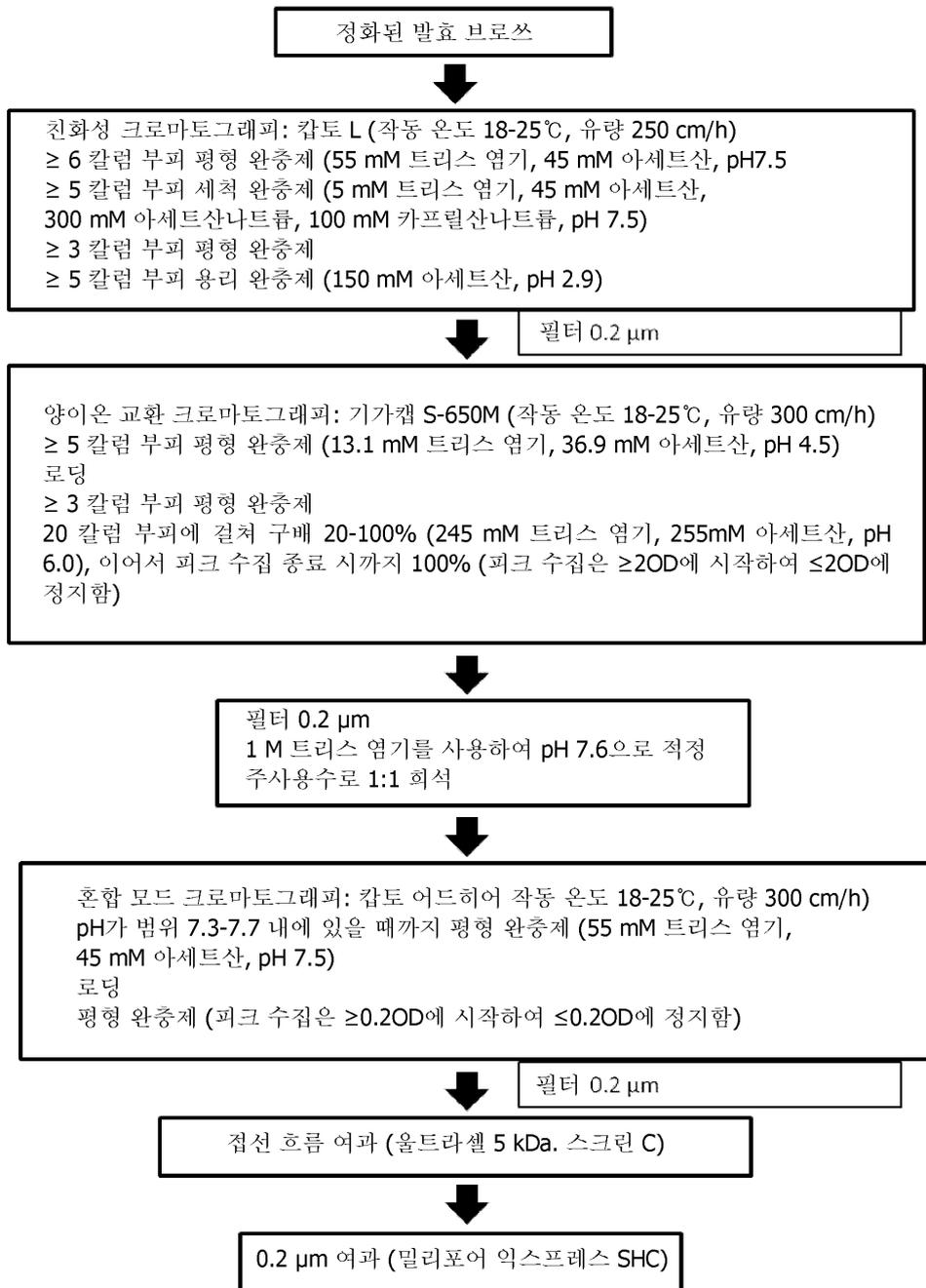
건강한 인간 혈청 샘플 패널에서의 DOM-30h-440-81/86에 대한 기존 항-약물 항체 (ADA)의 빈도



도면5

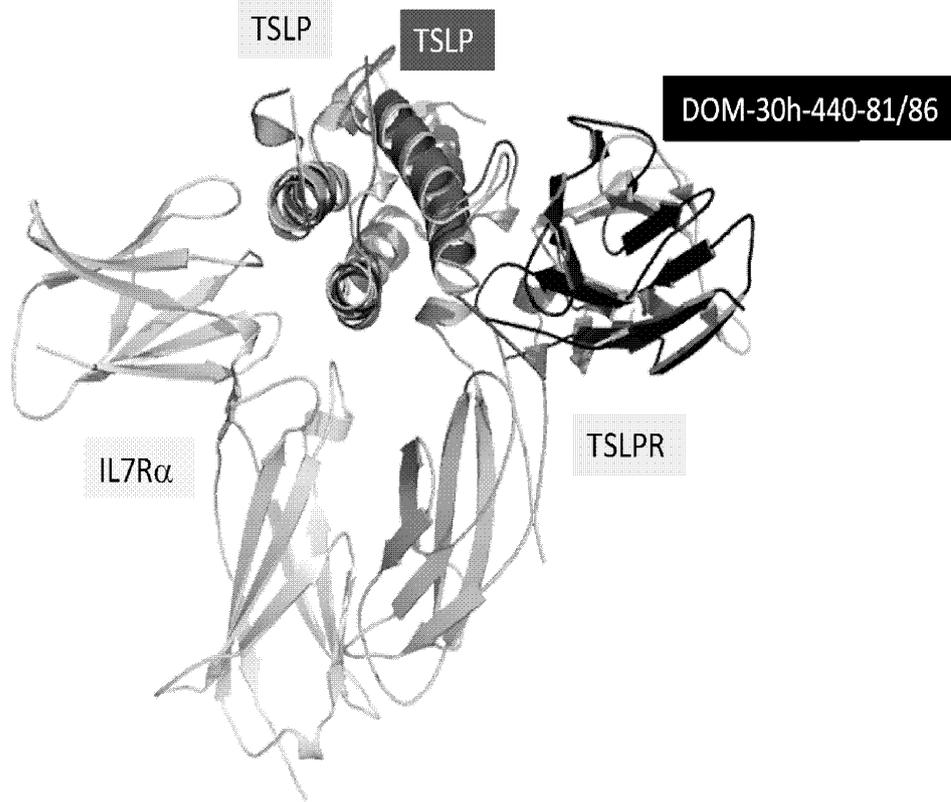


도면6

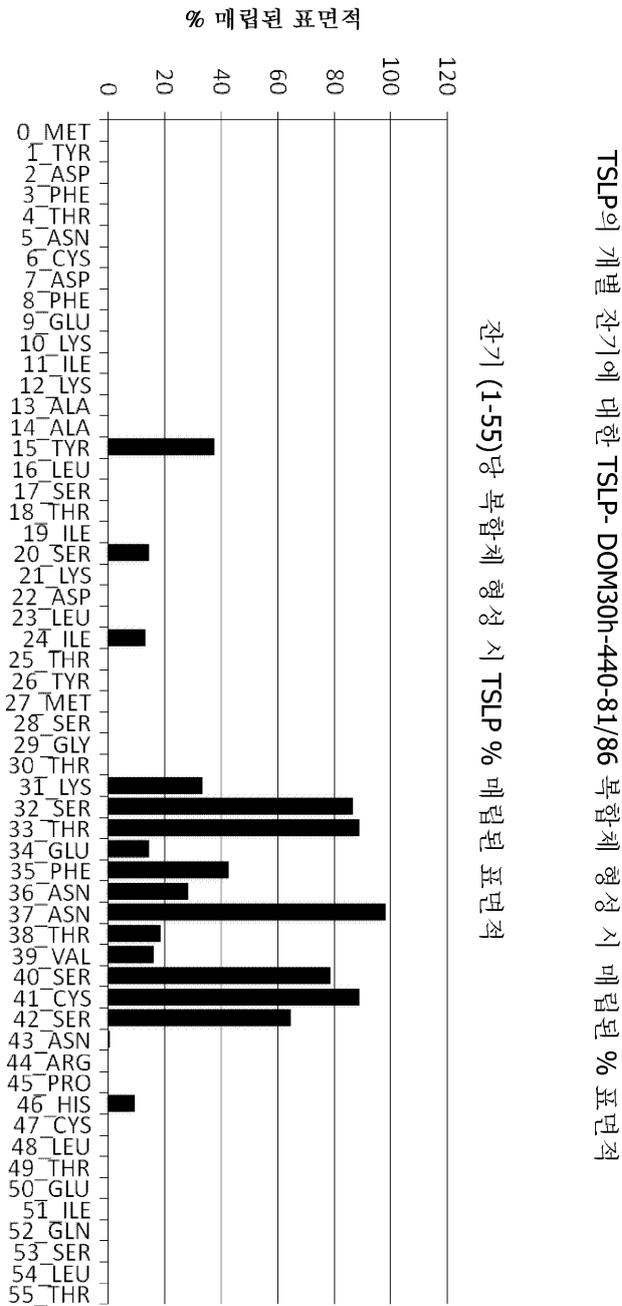


도면7

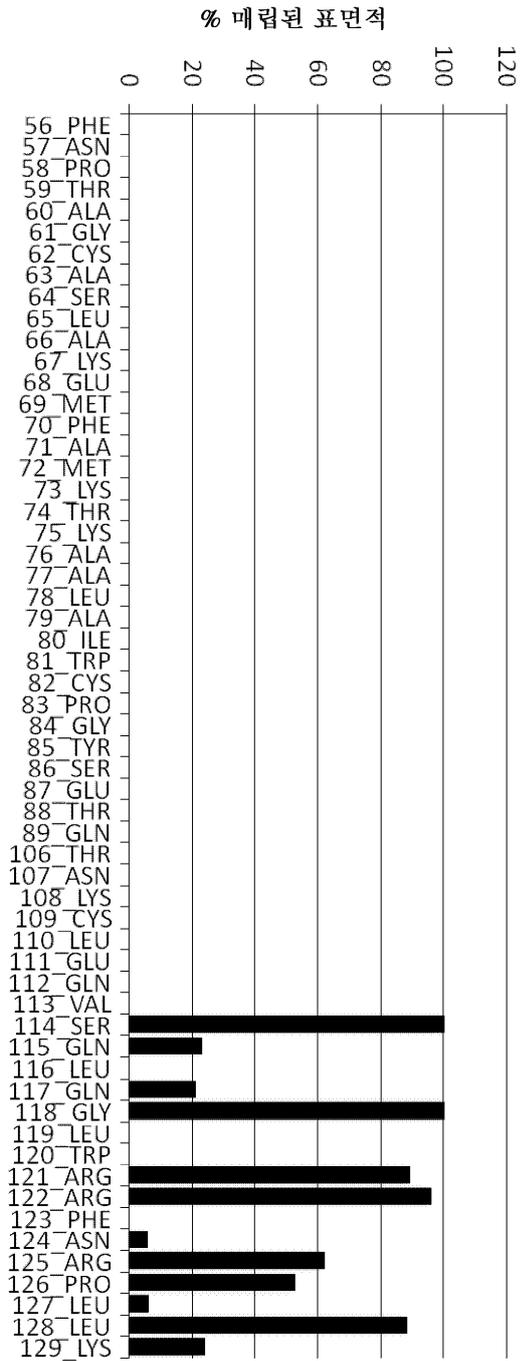
TSLP- DOM-30h-440-81/86 (흑색 리본)과 문헌 복합체
TSLP/IL7R α /TSLPR 복합체 (PDB: 4NN7, 보다 연한 회색 음영 내)의
X선 구조의 오버레이



도면8i

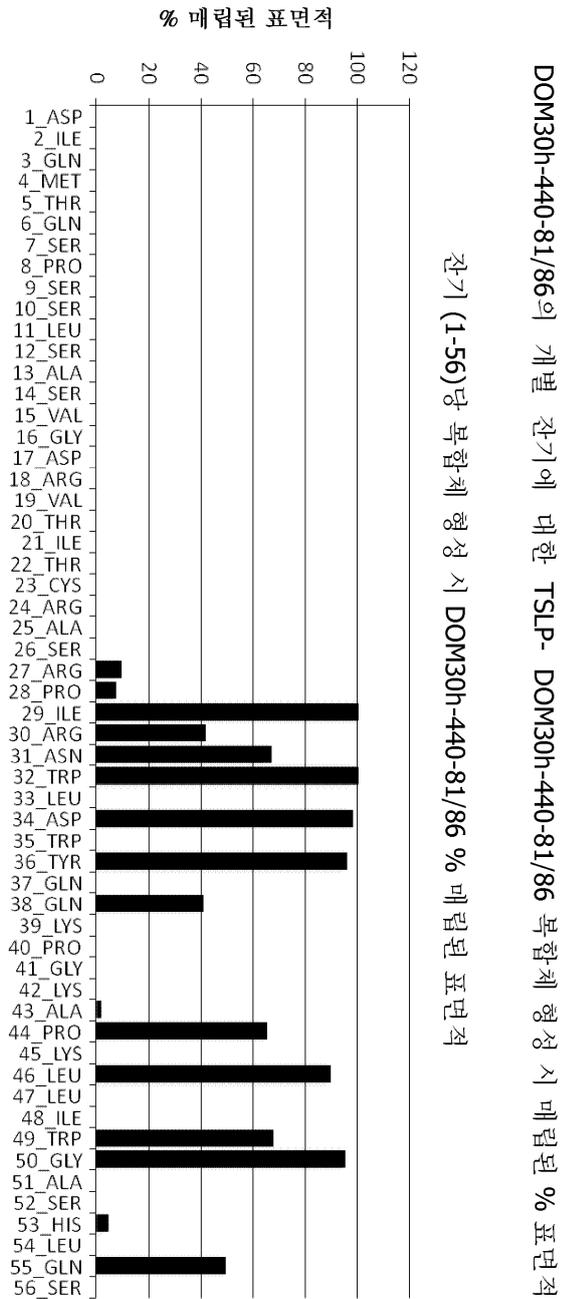


도면8i

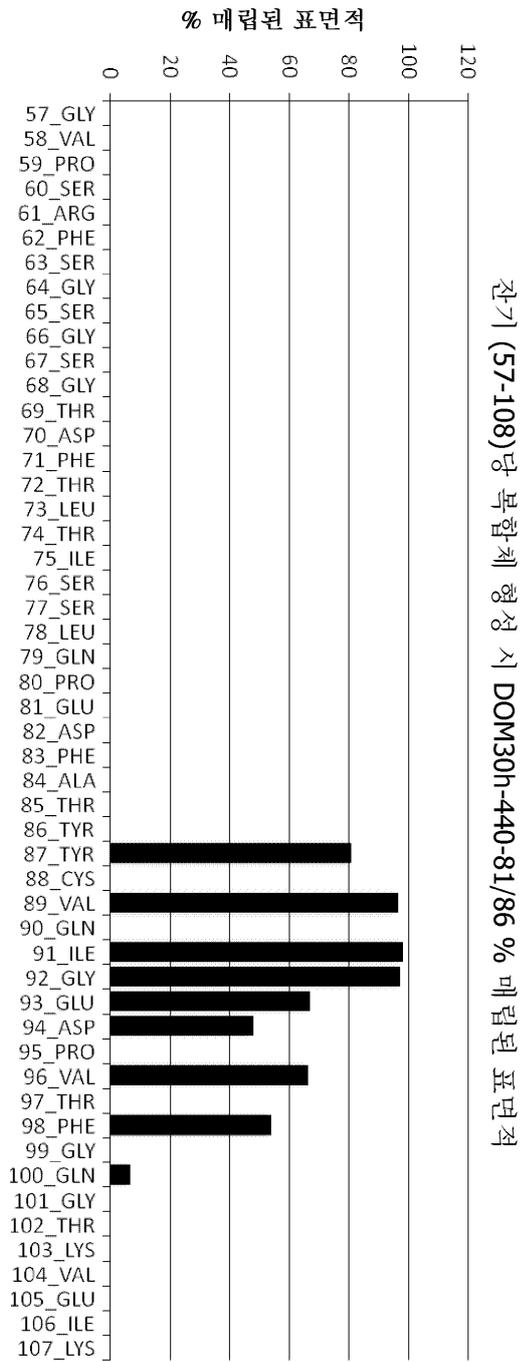


잔기 (56-129)당 복합체 형성 시 TSLP % 매립된 표면적

도면9i



도면9i



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GlaxoSmithKline Intellectual Property Development Limited

<120> TSLP Binding Proteins

<130> PB65727

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL1 of Dom30h-440-81/86, Dom30h-440-53, Dom30h-440-54,
 Dom30h-440-55, Dom30h-440-56, Dom30h-440-57, Dom30h-440-58,
 Dom30h-440-60, Dom30h-440-63, Dom30h-440-64 and Dom30h-440-65
 (Kabat, Chothia and AbM CDR definition)

<400> 1

Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp Leu Asp

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL1 of Dom30h-440-81/86 (Contact CDR definition)

<400> 2

Arg Asn Trp Leu Asp Trp Tyr

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL1 of Dom30h-440-81/86 (minimum binding unit)

<400> 3

Arg Asn Trp Leu Asp

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL2 of Dom30h-440-81/86, Dom30h-440-53, Dom30h-440-54,

Dom30h-440-55, Dom30h-440-56, Dom30h-440-57, Dom30h-440-58,
 Dom30h-440-60, Dom30h-440-63, Dom30h-440-64 and Dom30h-440-65
 (Kabat, Chothia, AbM CDR definition)

<400> 4

Gly Ala Ser His Leu Gln Ser

1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL2 of Dom30h-440-81/86 (Contact CDR definition)

<400> 5

Leu Leu Ile Trp Gly Ala Ser His Leu Gln

1 5 10

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL2 of Dom30h-440-81/86 (minimum binding unit)

<400> 6

Gly Ala Ser His Leu Gln

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL3 of Dom30h-440-81/86 and Dom30h-440-55 (Kabat, Chothia, AbM
 CDR definition)

<400> 7

Val Gln Ile Gly Glu Asp Pro Val Thr

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL3 of Dom30h-440-81/86 (Contact CDR and minimum binding unit

definition)

<400> 8

Val Gln Ile Gly Glu Asp Pro Val

1 5

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-81/86 amino acid sequence

<400> 9

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp

20 25 30

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

35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Ile Gly Glu Asp Pro Val

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Non-codon optimised DNA sequence (Dom30h-440-81)

<400> 10

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtcg gccattcgg aattggtag attggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctggggg gcgtcccact tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtgtgcag attggggagg atcctgtgac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 11

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Codon-optimised DNA sequence (Dom30h-440-86)

<400> 11

gatatccaga tgaccagtc tccgtcttcc ctgtctgcgt ccgttggta ccgtgtaacc 60
 atcacttgtc gtgcaagccg tccgatccgt aactggctgg attggtacca gcagaaaccg 120
 ggtaaagcgc cgaactgct gatctggggg gcttctcacc tgcagtctgg tgttccgtcc 180
 cgtttctctg gctctggtag cggtagccgac ttcaccctga ctatctctag cctgcagccg 240

gaagacttcg cgacctacta ctgcgttcag atcgggtgaag acccggttac cttcggtcag 300

ggcaccaaag tagaaatcaa a 321

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-87/93 amino acid sequence

<400> 12

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp

20 25 30

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

35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL3 of Dom30h-440-53 (Kabat definition)

<400> 15

Leu Gln Val Gly Glu Asp Pro Val Thr

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL3 of Dom30h-440-54 (Kabat definition)

<400> 16

Trp Gln Leu Ala Phe Asp Pro Thr Thr

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL3 of Dom30h-440-56 and Dom30h-440-65 (Kabat definition)

<400> 17

Met Gln Ile Gly Glu Asp Pro Val Thr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CDRL3 of Dom30h-440-57 (Kabat definition)

<400> 18

Met Gln Ile Gly Asp Asp Pro Val Thr

1 5

<210

> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial
 <220><223> CDRL3 of Dom30h-440-58 (Kabat definition)
 <400> 19
 Leu Gln Ile Ala Asp Asp Pro Val Thr
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> CDRL3 of Dom30h-440-60 (Kabat definition)
 <400> 20
 Ile Gln Phe Gly Glu Asp Pro Val Thr
 1 5
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> CDRL3 of Dom30h-440-63 (Kabat definition)
 <400>
 > 21
 Met Gln Ile Gly Ser Asp Pro Val Thr
 1 5
 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> CDRL3 of Dom30h-440-64 (Kabat definition)
 <400> 22
 Leu Gln Ile Gly Glu Asp Pro Val Thr
 1 5
 <210> 23
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Dom30h-440-53 amino acid sequence

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-54 amino acid sequence

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-55 amino acid sequence

<400> 25

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp

20 25 30

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

35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Ile Gly Glu Asp Pro Val

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-56 amino acid sequence

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Ile Gly Glu Asp Pro Val
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-57 amino acid sequence

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Ile Gly Asp Asp Pro Val
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 28

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-58 amino acid sequence

<400> 28

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp

 20 25 30

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

 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

 100 105

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-60 amino acid sequence

<400> 29

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp

 20 25 30

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

 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 30

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-63 amino acid sequence

<400> 30

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Ile Gly Ser Asp Pro Val
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-64 amino acid sequence

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-65 amino acid sequence

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp
 20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Ile Gly Glu Asp Pro Val

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-88/92 amino acid sequence

<400> 33

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp

20 25 30

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

35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Ile Gly Asp Asp Pro Val

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-89/94 amino acid sequence

<400> 34

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

1 5 10 15

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

100 105
 <210> 35
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Dom30h-440-90/95 amino acid sequence
 <400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp
 20 25 30
 Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Ile Gly Glu Asp Pro Val
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 36

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Dom30h-440-91/96 amino acid sequence

<400> 36

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Arg Asn Trp

 20 25 30

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

 35 40 45

Trp Gly Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Ile Gly Asp Asp Pro Val

 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

 100 105