



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월09일
(11) 등록번호 10-1690334
(24) 등록일자 2016년12월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2010-7007644 (분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년09월25일
심사청구일자 2014년09월23일
- (85) 번역문제출일자 2010년04월08일
- (65) 공개번호 10-2011-0046385
- (43) 공개일자 2011년05월04일
- (62) 원출원 특허 10-2010-7007620
원출원일자(국제) 2009년09월25일
심사청구일자 2010년04월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2009/066590
- (87) 국제공개번호 WO 2010/035769
국제공개일자 2010년04월01일
- (30) 우선권주장
JP-P-2008-248213 2008년09월26일 일본(JP)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2007143168 A1
JP2002163096 A
KR1020060010765 A
KR1020070035482 A

- (73) 특허권자
추가이 세이야쿠 가부시키키가이샤
일본국 도쿄도 기타쿠 우키마 5초메 5반 1고
- (72) 발명자
이가와 도모유키
일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1초메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내
이시이 신야
일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1초메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 **개량된 항체분자**

(57) 요약

본 발명은 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB의 가변영역 및 정상영역의 아미노산 서열을 개변함으로써, 항원 중화능을 증강시키면서, 약물동태를 향상시킴으로써 투여빈도를 적게 하여 지속적으로 치료효과를 발휘하고, 또한, 면역원성, 안전성, 물성(안정성 및 균일성)을 개선시켜, TOCILIZUMAB보다 우수한 제2세대 분자로 되는 의약 조성물, 및 그들 의약 조성물의 제조방법을 제공하는 것을 과제로 한다.

대표도 - 도1

CDR 분류	TOCILIZUMAB CDR 서열	변이개소 (Kabot No)	TOCILIZUMAB 의 아미노산	변이후의 아미노산	변이후 CDR 서열
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS	50	Y	F	FISYSGITTYNPSLKS (서열번호:82)
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS (서열번호:81)	58	T	N	YISYSGITTYNPSLKS (서열번호:83)
HCDR3	SLARTTAMDY	95	S	L	LLARTTAMDY (서열번호:85)
HCDR3	SLARTTAMDY (서열번호:84)	99	T	A	SLARATAMDY (서열번호:86)
LCDR1	RASQDISSYLN	27	Q	T	RASTDISSYLN (서열번호:88)
LCDR1	RASQDISSYLN (서열번호:87)	27	Q	R	RASRDISSYLN (서열번호:89)
LCDR3	QQGNTLPYT	89	Q	G	QQGNTLPYT (서열번호:91)
LCDR3	QQGNTLPYT (서열번호:90)	93	T	R	QQGNRLPYT (서열번호:92)

(72) 발명자

마에다 아츠히코

일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1쵸메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

사쿠라이 미카

일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1쵸메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

고지마 테츠오

일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1쵸메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

다치바나 다츠히코

일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1쵸메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

시라이와 히로타케

일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1쵸메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

츠노다 히로유키

일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1쵸메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

히구치 요시노부

일본국 시즈오카 고텐바시 고마카도 1쵸메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키키가이샤 내

(30) 우선권주장

JP-P-2009-060806 2009년03월13일 일본(JP)

JP-P-2009-067925 2009년03월19일 일본(JP)

명세서

청구범위

청구항 1

이하의 (a) 또는 (b)에 기재된 항체;

(a) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체,

(b) 서열번호:21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.

청구항 2

이하의 (a) 또는 (b)에 기재된 항체;

(a) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체,

(b) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 항체를 코딩하는 유전자.

청구항 4

제3항의 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 5

제4항의 벡터를 보유하는 숙주세포.

청구항 6

제5항의 숙주세포를 배양함으로써, 제1항 또는 제2항의 항체를 제조하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 항체, 또는 제6항의 방법에 의해 제조되는 항체를 포함하는, 하기 중에서 선택되는 질환의 치료 또는 예방을 위한 의약 조성물:

관절류머티즘, 약년성 특발성 관절염, 전신형 약년성 특발성 관절염, 캐슬만병, 전신성 에리테마토데스(SLE), 루프스 신염, 크론병, 림프종(lymphoma), 췌양성 대장염, 빈혈, 혈관염, 가와사키병, 스틸(Still)병, 아밀로이드증(amyloidosis), 다발성 경화증, 이식, 가령 황반 변성증, 강직성 척추염, 건선, 건선성 관절염, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), IgA 신증, 변형성 관절증, 천식, 당뇨병성 신증, GVHD, 자궁내막증, 간염(NASH), 심근경색, 동맥경화, 패혈증(sepsis), 골다공증, 당뇨병, 다발성 골수종, 전립선암, 신장암, B-cell non-Hodgkin's, 췌장암, 폐암, 식도암, 대장암, 암악액질(cancer cachexia), 암 신경 침윤, 심근경색, 근시성 맥락막 혈관 신생, 특발성 맥락막 혈관 신생, 포도막염, 만성 갑상선염, 지연성 과민증, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 중피종, 다발성 근염, 피부근염, 범포도막염, 전부 포도막염, 중간부 포도막염, 강막염, 각막염, 안와염증, 시신경염, 당뇨병 망막증, 증식 유리체 망막증, 안구 건조증(dry eye), 및 수술 후 염증.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항IL-6 수용체 항체를 유효성분으로서 함유하는 의약 조성물, 및 그의 제조법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항체는 혈장 중에서의 안정성이 높고, 부작용도 적은 것으로부터 의약품으로서 주목되고 있다. 그 중에서도 IgG 형 항체 의약은 다수 시판되고 있고, 현재도 수 많은 항체 의약이 개발되고 있다(비특허문헌 1, 비특허문헌 2). IL-6는 다양한 자기면역질환·염증성 질환·악성 종양 등에 관여하는 사이토카인으로(비특허문헌 3), 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB(토실리즈맵)은 IL-6 수용체에 특이적으로 결합한다. TOCILIZUMAB은 IL-6의 생물학적 작용을 중화함으로써, 관절류머티즘 등의 IL-6가 관련된 질환의 치료제로서 이용 가능할 것으로 생각되고 있고(특허문헌 1, 2, 3, 비특허문헌 4), 일본에 있어서는 캐슬맨병(Castleman's disease) 및 관절류머티즘의 치료제로서 승인되어 있다(비특허문헌 5).

[0003] TOCILIZUMAB과 같은 인간화 항체는 제1세대 항체 의약으로, 제1세대 항체 의약을 개량하여 약효·편리성·비용을 개선시킨 제2세대 항체 의약이 현재 개발되고 있다. 제2세대 항체 의약에 적용 가능한 기술로서 다양한 기술이 개발되고 있고, 이펙터 기능, 항원 결합능, 약물동태, 안정성을 향상시키거나, 또는, 면역원성 리스크를 저감시키는 기술 등이 보고되어 있다. 약효를 증강시키거나, 또는, 투여량을 저감시키는 방법으로서, IgG 항체의 Fc영역의 아미노산 치환에 의해 항체 의존성 세포장해활성(ADCC 활성)이나 보체 의존성 세포장해활성(CDC 활성)을 증강시키는 기술이 보고되어 있다(비특허문헌 6). 또한, 항원 결합능, 항원 중화능을 증강시키는 기술로서, 친화성 성숙(affinity maturation) 기술(비특허문헌 7)이 보고되어 있고, 가변영역의 상보성 결정영역(CDR; complementarity determining region) 등의 아미노산에 변이를 도입함으로써 항원으로서의 결합활성을 증강하는 것이 가능하다. 항원 결합능의 증강에 의해 인 비트로(in vitro)의 생물활성을 향상시키거나, 또는 투여량을 저감시키는 것이 가능하고, 추가적으로 인 비보(in vivo)에서의 약효를 향상시키는 것도 가능하다(비특허문헌 8). 현재, 항RSV 항체의 제1세대약인 Palivizumab보다 우수한 효과를 발휘하는 것으로 알려진 Motavizumab(친화성 성숙에 의해 제작)의 임상시험이 행해지고 있다(비특허문헌 9). 항IL-6 수용체 항체에 있어서는, TOCILIZUMAB보다 친화성이 강한 것으로 알려진 친화성이 약 0.05 nM인 항체가 보고되어 있으나(특허문헌 4), 0.05 nM보다 강한 친화성을 갖는 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 키메라 항체의 보고는 없다.

[0004] 현재의 항체 의약이 안고 있는 문제로서, 투여 단백질량이 매우 많은 것에 의한 높은 제조 비용을 들 수 있다. 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB에 있어서도 투여량은 8 mg/kg/month 정도의 정맥내 주사가 상정되어 있다(비특허문헌 4). 또한 투여형태에 대해서는, 만성적인 자기면역질환의 경우는 피하투여 제제가 바람직한 것으로 알려져 있다. 일반적으로 피하투여 제제는 고농도 제제인 것이 필요하여, IgG 타입의 항체 제제인 경우, 안정성 등의 측면에서 일반적으로는 100 mg/mL 정도의 제제가 한도일 것으로 생각된다(비특허문헌 10). 지속적

인 치료효과를 발휘할 수 있도록 항체의 혈장 중 반감기를 길게 함으로써 투여 단백량을 작게 하고, 높은 안정성을 부여함으로써, 긴 투여간격으로의 피하투여를 가능하게 하여, 저비용이며 편리성이 높은 제2세대 항체의 약을 제공하는 것이 가능하다.

[0005] 항체의 약물동태에는 FcRn이 크게 관여하고 있고, 항체의 아이소타입간 혈장 중 반감기의 차이에 관해서는, IgG1 및 IgG2가 가장 혈장 중 반감기가 우수하고, IgG3 및 IgG4가 그것보다 떨어지는 것이 알려져 있다(비특허 문헌 11). 혈장 중 반감기가 우수한 IgG1 및 IgG2 항체의 혈장 중 반감기를 추가적으로 향상시키는 방법으로서, FcRn으로의 결합을 증강하는 정상영역(constant region)의 아미노산 치환이 보고되어 있다(비특허문헌 12, 13). 또한, 면역원성의 관점에서는 정상영역보다도 가변영역의 아미노산 치환에 의해 혈장 중 반감기를 향상시키는 편이 바람직하나(특허문헌 5), 지금까지 가변영역을 개변함으로써 IL-6 수용체 항체의 혈장 중 반감기를 향상시킨 보고는 없다.

[0006] 바이오 의약품을 개발함에 있어서 다른 하나의 중요한 문제는 면역원성이다. 일반적으로 마우스 항체는 인간화 함으로써 면역원성이 저감된다. 인간화할 때의 템플레이트 프레임워크에 생식계열 서열(germline sequence)을 사용함으로써, 면역원성의 리스크는 더욱 경감할 수 있는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 14). 그러나, 완전 인간 항TNF 항체인 Adalimumab의 경우에도 13~17%로 고빈도로 면역원성이 출현하고, 면역원성이 출현한 환자에 있어서는 치료효과의 저감이 보이고 있다(비특허문헌 15, 16). 인간 항체의 경우에도 CDR에 T-cell 에피토프가 존재할 가능성이 있어, CDR 상의 T-cell 에피토프가 면역원성의 원인이 되고 있을 가능성이 있다. T-cell 에피토프를 인 실리코(in silico) 또는 인 비트로(in vitro)에서 예측하는 방법이 보고되어 있으나(비특허문헌 17, 18), 이들 방법을 사용하여 예측되는 T-cell 에피토프를 제거함으로써, 면역원성 리스크를 저감하는 것이 가능할 것으로 생각된다(비특허문헌 19).

[0007] 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB은, 마우스 PM1 항체를 인간화한 IgG1 항체이다. H사슬, L사슬 각각 NEW, REI의 인간 서열을 템플레이트 프레임워크로서 사용하여 CDR 그래프팅이 행해지고 있으나, 활성 유지에 중요한 아미노산으로서 5 아미노산이 마우스 서열로서 프레임워크에 잔존하고 있다(비특허문헌 20). 지금까지 인간화 항체인 TOCILIZUMAB의 프레임워크에 잔존하는 마우스 서열의 활성을 저하시키지 않고 완전 인간화한 보고는 없다. 또한, TOCILIZUMAB의 CDR서열은 마우스 서열로, Adalimumab과 마찬가지로, CDR에 T-cell 에피토프가 존재할 가능성이 있어, 면역원성의 리스크는 부정할 수 없다. TOCILIZUMAB의 임상시험에 있어서, 약효용량인 8 mg/kg에 있어서 항TOCILIZUMAB 항체의 출현은 확인되고 있지 않으나, 4 mg/kg 및 2 mg/kg에 있어서는 그 항체가 확인되고 있다(특허문헌 6). 이들 사실로부터, TOCILIZUMAB의 면역원성에 대해서는 개선의 여지가 있을 것으로 생각된다. 그러나, 지금까지 아미노산 치환에 의해 면역원성 리스크를 개선시킨 TOCILIZUMAB에 관한 보고는 없다.

[0008] TOCILIZUMAB의 아이소타입은 IgG1이나, 아이소타입의 차이는 즉 정상영역의 서열의 차이로, 정상영역의 서열은 이펙터 기능, 약물동태, 물성 등에 크게 영향을 미칠 것으로 생각되고 있는 것으로부터, 항체 의약의 개발에 있어서 정상영역의 서열의 선택은 매우 중요하다(비특허문헌 11). 최근, 항체 의약의 안전성이 매우 중요시되고 있어, TGN1412의 Phase I 임상시험에서 보인 중대한 부작용의 원인 중 하나로서, 항체의 Fc 부분과 Fc γ 수용체의 상호작용(이펙터 기능)이 생각되고 있다(비특허문헌 21). 항원의 생물학적 작용을 중화하는 것이 목적인 항체 의약에 있어서는, ADCC 등의 이펙터 기능에 중요한 Fc γ 수용체로의 결합은 불필요하여, 부작용의 측면에서 생각하면 Fc γ 수용체로의 결합은 오히려 바람직하지 않을 가능성도 생각할 수 있다. Fc γ 수용체로의 결합을 저하시키는 방법으로서, IgG 항체의 아이소타입을 IgG1에서 IgG2 또는 IgG4로 변경하는 방법이 있으나(비특허문헌 22), Fc γ 수용체 I으로의 결합 및 약물동태의 관점에서는 IgG4보다는 IgG2가 바람직한 것으로 생각된다(비특허문헌 11). TOCILIZUMAB의 아이소타입은 IgG1으로, IL-6 수용체 중화항체인 것으로부터, ADCC 등의 이펙터 기능은 필요로 하지 않아 부작용의 가능성을 고려한 경우, 아이소타입은 IgG2가 바람직할 가능성도 생각할 수 있다.

[0009] 한편, 항체를 의약품으로서 개발하는데 있어서, 그 단백질의 물성, 그 중에서도 균일성과 안정성은 매우 중요하여, IgG2 아이소타입은, 현지영역의 디설피드 결합에 유래하는 이질성(heterogeneity)이 매우 많은 것이 보고되어 있다(비특허문헌 23). 이것에 유래하는 목적 물질/관련 물질의 이질성의 제조간 차를 유지하면서 의약품으로서 대량으로 제조하는 것은 용이하지 않아 비용 증대로 이어져, 가능한 한 단일 물질인 것이 요망된다. 또한 항체의 H사슬 C 말단서열의 이질성으로서, C 말단 아미노산의 리신 잔기의 결손, 및 C 말단의 2 아미노산의 글리신, 리신의 결손에 의한 C 말단 카르복실기의 아미드화가 보고되어 있어(비특허문헌 24), IgG2 아이소타입의 항체를 의약품으로서 개발하는데 있어서는 높은 안정성을 유지하면서 이들 이질성이 저감되어 있는 것이 바람직하다. 편리성이 우수한 안정한 고농도의 피하투여 제제를 제작하기 위해서는, 안정성이 높을 뿐 아니라, 혈장 중

반감기에 관해서도 TOCILIZUMAB의 아이소타입인 IgG1보다도 우수한 것이 바람직하다. 그러나, 지금까지 IgG2 아이소타입의 정상영역의 항체에 관한 이질성이 저감되어, 높은 안정성을 가지며, IgG1 아이소타입의 정상영역의 항체보다도 우수한 혈장 중 반감기를 갖는 정상영역의 서열의 보고는 없다.

[0010] 또한, 본 발명의 선행기술문헌을 이하에 나타낸다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) WO 92/19759

(특허문헌 0002) WO 96/11020

(특허문헌 0003) WO 96/12503

(특허문헌 0004) WO 2007/143168

(특허문헌 0005) WO 2007/114319

(특허문헌 0006) WO 2004/096273

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic, Nature Biotechnology 23, 1073 - 1078 (2005)

(비특허문헌 0002) Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. 2005 Apr;59(3):389-96.

(비특허문헌 0003) Nishimoto N, Kishimoto T., Interleukin 6: from bench to bedside., Nat Clin Pract Rheumatol. 2006 Nov;2(11):619-26.

(비특허문헌 0004) Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Broll J, Balint G, Emery P, Raemen F, Petersen J, Smolen J, Thomson D, Kishimoto T; CHARISMA Study Group., Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, Tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate., Arthritis Rheum. 2006 Sep;54(9):2817-29

(비특허문헌 0005) Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. Blood. 2005 Oct 15;106(8):2627-32.

(비특허문헌 0006) Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 2005 Aug 31;20(1):17-29. Review.

(비특허문헌 0007) Rothe A, Hosse RJ, Power BE. Ribosome display for improved biotherapeutic molecules. Expert Opin Biol Ther. 2006 Feb;6(2):177-87.

(비특허문헌 0008) Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14;102(24):8466-71. Epub 2005 Jun 6.

(비특허문헌 0009) Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. J Mol Biol. 2007, 368, 652-665

(비특허문헌 0010) Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. J Pharm Sci. 2004 Jun;93(6):1390-402.

- (비특허문헌 0011) Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. *Nat Biotechnol.* 2007 Dec;25(12):1369-72.
- (비특허문헌 0012) Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):346-56
- (비특허문헌 0013) Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., *Nat Biotechnol.* 1997 Jul;15(7):637-40
- (비특허문헌 0014) Hwang WY, Almagro JC, Buss TN, Tan P, Foote J. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods.* 2005 May;36(1):35-42
- (비특허문헌 0015) Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BA, Tak P, Wolbink GJ. Clinical response to adalimumab: The relationship with anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007 Mar 9; [Epub ahead of print]
- (비특허문헌 0016) Bender NK, Heilig CE, Droll B, Wohlgenuth J, Armbruster FP, Heilig B. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int.* 2007 Jan;27(3):269-74.
- (비특허문헌 0017) Van Walle I, Gansemans Y, Parren PW, Stas P, Lasters I. Immunogenicity screening in protein drug development. *Expert Opin Biol Ther.* 2007 Mar;7(3):405-18.
- (비특허문헌 0018) Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP. Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2005 May;3(5):991-1000.
- (비특허문헌 0019) Chirino AJ, Ary ML, Marshall SA. Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov Today.* 2004 Jan 15;9(2):82-90.
- (비특허문헌 0020) Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, Bendig MM. Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.* 1993 Feb 15;53(4):851-6.
- (비특허문헌 0021) Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned future directions. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Jan;6(1):75-92.
- (비특허문헌 0022) Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol.* 1998 Jun;76(6):231-48.
- (비특허문헌 0023) Dillon TM, Ricci MS, Vezina C, Flynn GC, Liu YD, Rehder DS, Plant M, Henkle B, Li Y, Deechongkit S, Varnum B, Wypych J, Balland A, Bondarenko PV. Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *J Biol Chem.* 2008 Jun 6;283(23):16206-15.
- (비특허문헌 0024) Johnson KA, Paisley-Flango K, Tangarone BS, Porter TJ, Rouse JC. Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain. *Anal Biochem.* 2007 Jan 1;360(1):75-83.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 이러한 상황을 감안하여 이루어진 것으로, 그 목적은, 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB의 가변영역 및 정상영역의 아미노산 서열을 개변함으로써, 항원 중화능을 증강시키면서, 약물동태를 향상시킴으로써 투여빈도를 적게 하여 지속적으로 치료효과를 발휘하며, 또한, 면역원성, 안전성, 물성(안정

성 및 균일성)을 개선시켜, TOCILIZUMAB보다 우수한 제2세대 분자로 되는 의약 조성물(이하 본 명세서에서는 「약제」 또는 「제제」로 기재하는 경우도 있다), 및 그들 의약 조성물의 제조방법을 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명자 등은, 제1세대 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB의 가변영역 및 정상영역의 아미노산 서열을 개변함으로써, 약효를 증강시키면서, 약물동태를 향상시킴으로써 투여빈도를 적게 하여 지속적으로 치료 효과를 발휘하며, 또한, 면역원성, 안전성, 물성(안정성 및 균일성)을 개선시켜, TOCILIZUMAB보다 우수한 제2세대 분자의 창제를 위해, 예의 연구를 행하였다. 그 결과, 본 발명자 등은, TOCILIZUMAB의 가변영역에 있어서, 항원으로서의 결합능(친화성)을 향상시키는 CDR 변이를 복수 발견하고, 그 조합에 의해 친화성을 대폭 향상시키는 것에 성공하였다. 또한 본 발명자 등은, 가변영역 서열의 등전점을 저하시키는 개변을 도입함으로써 약물동태를 향상시키는 것에 성공하였다. 또한 본 발명자 등은, 항원인 IL-6 수용체로의 결합에 pH 의존성을 부여함으로써 1분자의 항체로 복수 회 항원을 중화하는 것을 가능하게 하여, 약물동태를 향상시키는 것에 성공하였다. 또한 본 발명자 등은, TOCILIZUMAB의 프레임워크에 잔존하는 마우스 유래의 서열을 완전 인간화하고, 가변영역에 있어서 인 실리코에서 예측된 T-cell 에피토프 펩티드의 수를 저감시킴으로써, 면역원성 리스크를 저감시키는 데 성공하였다. 또한 본 발명자 등은, TOCILIZUMAB의 정상영역에 있어서, 안전성을 높이기 위해 Fc γ 수용체로의 결합을 IgG1보다도 저하시켜, IgG1보다도 약물동태를 개선시키고, 추가적으로 안정성을 저하시키지 않고 IgG2의 힌지영역의 디설피드 결합에 유래하는 이질성 및 H사슬 C 말단에 유래하는 이질성을 저감시킨 신규한 정상영역 서열을 발견하는데 성공하였다. 이들 CDR영역 아미노산 서열의 개변, 가변영역 아미노산 서열의 개변, 정상영역 아미노산 서열의 개변을 적절히 조합시킴으로써 TOCILIZUMAB보다 우수한 제2세대 분자의 창제에 성공하였다.
- [0015] 본 발명은 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB의 가변영역 및 정상영역의 아미노산 서열의 개변에 의해, 보다 우수한 항원(IL-6 수용체)으로서의 결합능을 갖고, 보다 우수한 약물동태를 가지며, 보다 우수한 안전성·면역원성 리스크·물성(안정성, 균일성)을 갖는 인간화 항IL-6 수용체 IgG 항체로 되는 의약 조성물, 및 그들 의약 조성물의 제조방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 하기 [1]~[11]을 제공하는 것이다.
- [0016] [1] 이하의 (a)~(f) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드;
- [0017] (a) 서열번호:1(VH4-M73의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:2(VH4-M73의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:3(VH4-M73의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0018] (b) 서열번호:4(VH3-M73의 CDR1)의 서열을 갖는 CRD1, 서열번호:5(VH3-M73의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:6(VH3-M73의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0019] (c) 서열번호:7(VH5-M83의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:8(VH5-M83의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:9(VH5-M83의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0020] (d) 서열번호:10(VL1의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:11(VL1의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:12(VL1의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0021] (e) 서열번호:13(VL3의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:14(VL3의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:15(VL3의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0022] (f) 서열번호:16(VL5의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:17(VL5의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:18(VL5의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드.
- [0023] [2] 이하의 (a)~(c) 중 어느 하나에 기재된 항체;
- [0024] (a) 서열번호:1(VH4-M73의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:2(VH4-M73의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:3(VH4-M73의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및
- [0025] 서열번호:10(VL1의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:11(VL1의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:12(VL1의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체,
- [0026] (b) 서열번호:4(VH3-M73의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:5(VH3-M73의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:6(VH3-M73의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및
- [0027] 서열번호:13(VL3의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:14(VL3의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:15(VL3의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체,

- [0028] (c) 서열번호:7(VH5-M83의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:8(VH5-M83의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:9(VH5-M83의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및
- [0029] 서열번호:16(VL5의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:17(VL5의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:18(VL5의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.
- [0030] [3] 이하의 (a)-(f) 중 어느 하나에 기재된 가변영역;
- [0031] (a) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역,
- [0032] (b) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역,
- [0033] (c) 서열번호:21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역,
- [0034] (d) 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역,
- [0035] (e) 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역,
- [0036] (f) 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역.
- [0037] [4] 이하의 (a)-(c) 중 어느 하나에 기재된 항체;
- [0038] (a) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체,
- [0039] (b) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체,
- [0040] (c) 서열번호:21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.
- [0041] [5] 이하의 (a)-(f) 중 어느 하나에 기재된 중쇄 또는 경쇄;
- [0042] (a) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄,
- [0043] (b) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄,
- [0044] (c) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄,
- [0045] (d) 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄,
- [0046] (e) 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄,
- [0047] (f) 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄.
- [0048] [6] 이하의 (a)-(c) 중 어느 하나에 기재된 항체;
- [0049] (a) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체,
- [0050] (b) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체,
- [0051] (c) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체.
- [0052] [7] [1] 내지 [6] 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드를 코딩하는 유전자.
- [0053] [8] [7]에 기재된 유전자를 포함하는 벡터.
- [0054] [9] [8]에 기재된 벡터를 보유하는 숙주세포.
- [0055] [10] [9]에 기재된 숙주세포를 배양함으로써, [1] 내지 [6] 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0056] [11] [1] 내지 [6] 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드, 또는 [10]에 기재된 방법에 의해 제조되는 폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물.

발명의 효과

[0057] 본 발명에 의해 얻어진 인간화 항IL-6 수용체 IgG 항체는, 약효가 증강되고, 약물동태가 향상됨으로써 투여빈도

를 적게 할 수 있어, 지속적으로 치료효과를 발휘할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058]

도 1은 TOCILIZUMAB의 IL-6 수용체로의 친화성을 향상시키는 변이개소를 정리한 리스트를 나타내는 도면이다. HCDR2의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:81, HCDR2의 변이후 서열(상단)을 서열번호:82, HCDR2의 변이후 서열(하단)을 서열번호:83, HCDR3의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:84, HCDR3의 변이후 서열(상단)을 서열번호:85, HCDR3의 변이후 서열(하단)을 서열번호:86, LCDR1의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:87, LCDR1의 변이후 서열(상단)을 서열번호:88, LCDR1의 변이후 서열(하단)을 서열번호:89, LCDR3의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:90, LCDR3의 변이후 서열(상단)을 서열번호:91, LCDR3의 변이후 서열(하단)을 서열번호:92에 나타낸다.

도 2는 TOCILIZUMAB과 RDC-23의 BaF/gp130에 있어서의 중화활성을 나타내는 도면이다.

도 3은 TOCILIZUMAB의 IL-6 수용체로의 결합을 크게 저하시키지 않고 가변영역의 등전점을 저하시킬 수 있는 변이개소를 정리한 리스트를 나타내는 도면이다. 도면 중의 별표는 인간 서열로 하기 위해 등전점에는 영향을 미치지 않으나 변이된 개소이다. HFR1의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:93, HFR1의 변이후 서열을 서열번호:94, HCDR1의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:95, HCDR1의 변이후 서열을 서열번호:96, HFR2의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:97, HFR2의 변이후 서열을 서열번호:98, HCDR2의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:81, HCDR2의 변이후 서열을 서열번호:99, HFR4의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:100, HFR4의 변이후 서열을 서열번호:101, LFR1의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:102, LFR1의 변이후 서열을 서열번호:103, LCDR1의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:87, LCDR1의 변이후 서열을 서열번호:104, LFR2의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:105, LFR2의 변이후 서열을 서열번호:106, LCDR2의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:107, LCDR2의 변이후 서열을 서열번호:108, 109, LFR3의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:110, LFR3의 변이후 서열을 서열번호:111, LFR4의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:112, LFR4의 변이후 서열을 서열번호:113에 나타낸다.

도 4는 TOCILIZUMAB과 H53/L28의 BaF/gp130에 있어서의 중화활성을 나타내는 도면이다.

도 5는 TOCILIZUMAB과 H53/L28을 마우스에 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 나타낸 그래프이다.

도 6은 TOCILIZUMAB과 H53/L28을 마우스에 피하투여 후의 혈장 중 농도추이를 나타낸 그래프이다.

도 7은 IgG 분자가 엔도솜 내에서 막형 항원으로부터 해리됨으로써 다시 새로운 항원에 결합하는 것을 나타내는 모식도이다.

도 8은 TOCILIZUMAB의 IL-6 수용체로의 결합에 pH 의존성(pH 7.4에서 결합하고, pH 5.8에서 해리됨)을 부여할 수 있는 변이개소를 정리한 리스트를 나타내는 도면이다. HFR1의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:93, HFR1의 변이후 서열을 서열번호:114, HCDR1의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:95, HCDR1의 변이후 서열을 서열번호:115, LCDR1의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:87, LCDR1의 변이후 서열을 서열번호:116, LCDR2의 TOCILIZUMAB 서열을 서열번호:107, LCDR2의 변이후 서열을 서열번호:117에 나타낸다.

도 9는 TOCILIZUMAB과 H3pI/L73의 BaF/gp130에 있어서의 중화활성을 나타내는 도면이다.

도 10은 TOCILIZUMAB과 H3pI/L73을 게잡이원숭이에 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 나타낸 그래프이다.

도 11은 TOCILIZUMAB과 H3pI/L73을 인간 IL-6 수용체 형질전환 마우스에 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 나타낸 그래프이다.

도 12는 TOCILIZUMAB, TOCILIZUMAB Δ K, 및 TOCILIZUMAB Δ GK를 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 C 말단에 유래하는 이질성의 평가를 행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 13은 TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-IgG2, 및 TOCILIZUMAB-SKSC를 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 디설피드 결합에 유래하는 이질성의 평가를 행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 14는 TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-IgG2, 및 TOCILIZUMAB-SKSC를 시차 주사 열량 측정(DSC)에 의해 측정된 변성 곡선 및 각 Fab 도메인의 Tm값을 나타낸 도면이다.

도 15는 TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73을 인간 FcRn 형질전환 마우스에 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 나타낸 그래프이다.

도 16은 TOCILIZUMAB, 대조 및 Fv5-M83의 BaF/gp130에 있어서의 중화활성을 나타내는 도면이다.

도 17은 TOCILIZUMAB, Fv3-M73 및 Fv4-M73의 BaF/gp130에 있어서의 중화활성을 나타내는 도면이다.

도 18은 TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83을 계잡이원숭이에 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도 추이를 나타낸 그래프이다.

도 19는 TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83을 계잡이원숭이에 정맥내 투여 후의 CRP 농도추이를 나타낸 그래프이다.

도 20은 TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83을 계잡이원숭이에 정맥내 투여 후의 비결합형 가용형 IL-6 수용체용의 추이를 나타낸 그래프이다.

도 21은 TOCILIZUMAB과 Fv4-M73에 의한 인간 RA 환자 유래 활막세포(synovial cell)로부터의 MCP-1 생산억제작용을 나타내는 도면이다.

도 22는 TOCILIZUMAB과 Fv4-M73에 의한 인간 RA 환자 유래 활막세포로부터의 VEGF 생산억제작용을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 본 발명은 이하의 (a)~(f) 중 어느 하나에 기재된 폴리펩티드를 제공한다.
- [0060] (a) 서열번호:1(VH4-M73의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:2(VH4-M73의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:3(VH4-M73의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0061] (b) 서열번호:4(VH3-M73의 CDR1)의 서열을 갖는 CRD1, 서열번호:5(VH3-M73의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:6(VH3-M73의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0062] (c) 서열번호:7(VH5-M83의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:8(VH5-M83의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:9(VH5-M83의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0063] (d) 서열번호:10(VL1의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:11(VL1의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:12(VL1의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0064] (e) 서열번호:13(VL3의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:14(VL3의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:15(VL3의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드,
- [0065] (f) 서열번호:16(VL5의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:17(VL5의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:18(VL5의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 폴리펩티드.
- [0066] 본 발명에 있어서 폴리펩티드는 특별히 한정되지 않으나, 인간 IL-6 수용체로의 결합활성을 갖는 항원 결합물질인 것이 바람직하다. 항원 결합물질의 바람직한 예로서, 항체의 중쇄 가변영역(VH), 항체의 경쇄 가변영역(VL), 항체의 중쇄, 항체의 경쇄, 항체 등을 들 수 있다.
- [0067] 전술한 (a)~(f)의 폴리펩티드에 있어서, (a)~(c)의 폴리펩티드의 바람직한 예로서 항체의 중쇄 가변영역을 들 수 있고, (d)~(f)의 폴리펩티드의 바람직한 예로서 항체의 경쇄 가변영역을 들 수 있다.
- [0068] 이들 가변영역은 항인간 IL-6 수용체 항체의 일부로서 사용 가능하다. 이들 가변영역이 사용된 항인간 IL-6 수용체 항체는 우수한 결합활성, 우수한 약물동태, 우수한 안전성·면역원성, 및/또는 우수한 물성을 갖는다. 본 발명에 있어서, 우수한 약물동태, 또는 약물동태의 향상이란, 항체를 생체 내에 투여했을 때의 혈장 중 농도추이로부터 산출되는 약물동태 파라미터의 하나인 "클리어런스(Clearance, CL)"의 감소, "농도곡선하 면적(Area Under Curve, AUC)"의 증대, "평균 체류시간(Mean Residence Time)"의 증대, "혈장 중 반감기(t1/2)"의 증대 중 어느 하나를 의미한다. 본 발명에 있어서, 우수한 물성 또는 물성의 향상이란, 특별히 한정되지 않지만, 안정성의 향상, 이질성의 저감 등을 의미한다.
- [0069] CDR과 연결되는 인간 항체의 프레임워크영역(framework region; FR)은, CDR이 양호한 항원 결합부위를 형성하는 것이 선택된다. 본 발명의 가변영역에 사용되는 FR은 특별히 한정되지 않고, 어떠한 FR이 사용되고 있어도 되나, 인간 유래의 FR이 사용되는 것이 바람직하다. 인간 유래의 FR은 천연서열을 갖는 FR이 사용되어도 되고, 필요에 따라, CDR이 적절한 항원 결합부위를 형성하도록, 천연서열을 갖는 프레임워크영역의 1 또는 복수의 아미노산을 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등 해도 된다. 예를 들면, 아미노산을 치환한 FR을 사용한 항체의 항원으로서의 결합활성을 측정하여 평가함으로써 목적하는 성질을 갖는 변이 FR서열을 선택할 수 있다(Sato, K. et

al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

- [0070] 또한, 전술한 CDR서열에 있어서 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등 해도 된다. 1 또는 복수의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 후의 CDR서열은, 결합활성, 중화활성, 안정성, 면역원성 및/또는 약물동태에 있어서 개변 전의 CDR서열과 동등한 활성을 가지고 있는 것이 바람직하다. 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 하나의 CDR에 대해 3 아미노산 이내, 더욱 바람직하게는 2 아미노산 이내, 보다 바람직하게는 1 아미노산이다.
- [0071] 1 또는 복수의 아미노산 잔기를 목적의 다른 아미노산으로 치환하는 방법으로서, 예를 들면, 부위 특이적 변이 유발법(Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer,W, Drutsa,V, Jansen,HW, Kramer,B, Pflugfelder,M, and Fritz,HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel,TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492)을 들 수 있다. 그 방법을 사용하여, 항체의 목적하는 아미노산을 목적의 다른 아미노산으로 치환할 수 있다. 또한, 프레임워크 서플링(Mol Immunol. 2007 Apr;44(11):3049-60) 및 CDR repair(US2006/0122377) 등의 라이브러리 기술을 사용함으로써, 프레임워크 및 CDR에 있어서의 아미노산을 적절한 다른 아미노산으로 치환하는 것도 가능하다.
- [0072] 또한, 본 발명은 이하의 (a)~(c) 중 어느 하나에 기재된 항체를 제공한다.
- [0073] (a) 서열번호:1(VH4-M73의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:2(VH4-M73의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:3(VH4-M73의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:10(VL1의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:11(VL1의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:12(VL1의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체,
- [0074] (b) 서열번호:4(VH3-M73의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:5(VH3-M73의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:6(VH3-M73의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:13(VL3의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:14(VL3의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:15(VL3의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체,
- [0075] (c) 서열번호:7(VH5-M83의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:8(VH5-M83의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:9(VH5-M83의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:16(VL5의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:17(VL5의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서열번호:18(VL5의 CDR3)의 서열을 갖는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.
- [0076] 전술한 항체는 우수한 결합활성, 우수한 약물동태, 우수한 안전성·면역원성, 및/또는 우수한 물성을 갖는 항인간 IL-6 수용체 항체로서 사용 가능하다.
- [0077] 본 발명의 CDR과 연결되는 인간 항체의 프레임워크영역은, CDR이 양호한 항원 결합부위를 형성하는 것이 선택된다. 본 발명의 가변영역에 사용되는 FR은 특별히 한정되지 않고, 어떠한 FR이 사용되고 있어도 되나, 인간 유래의 FR이 사용되는 것이 바람직하다. 인간 유래의 FR은 천연서열을 갖는 FR이 사용되어도 되고, 필요에 따라, CDR이 적절한 항원 결합부위를 형성하도록, 천연서열을 갖는 프레임워크영역의 1 또는 복수의 아미노산을 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등 해도 된다. 예를 들면, 아미노산을 치환한 FR을 사용한 항체의 항원으로서의 결합활성을 측정하여 평가함으로써 목적하는 성질을 갖는 변이 FR서열을 선택할 수 있다(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).
- [0078] 또한, 본 발명의 항체에서 사용되는 정상영역은 특별히 한정되지 않고, 어떠한 정상영역이 사용되어도 된다. 본 발명의 항체에서 사용되는 정상영역의 바람직한 예로서는, 인간 유래의 정상영역(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, C κ , C λ 유래의 정상영역 등)을 들 수 있다. 인간 유래의 정상영역은 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 예를 들면, 인간 유래의 정상영역의 바람직한 예로서, 중쇄 정상영역의 경우에는 서열번호:31(VH4-M73의 정상영역)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:32(VH3-M73의 정상영역)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:33(VH5-M83의 정상영역)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역을 들 수 있

고, 경쇄 정상영역의 경우에는 서열번호:34(VL1)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:35(VL3)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:36(VL5)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역을 들 수 있다.

- [0079] 또한, 전술한 CDR서열에 있어서 1 또는 복수의 아미노산을 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등 해도 된다. 1 또는 복수의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 후의 CDR서열은, 결합활성, 중화활성, 안정성, 면역원성 및/또는 약물동태에 있어서 개변 전의 CDR서열과 동등한 활성을 가지고 있는 것이 바람직하다. 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되는 아미노산의 수는 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 하나의 CDR에 대해 3 아미노산 이내, 더욱 바람직하게는 2 아미노산 이내, 보다 바람직하게는 1 아미노산이다.
- [0080] 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등은 전술한 방법에 의해 행하는 것도 가능하다.
- [0081] 또한 본 발명은 이하의 (a)~(f) 중 어느 하나에 기재된 가변영역을 제공한다.
- [0082] (a) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역,
- [0083] (b) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역,
- [0084] (c) 서열번호:21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역,
- [0085] (d) 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역,
- [0086] (e) 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역,
- [0087] (f) 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역.
- [0088] 전술한 가변영역은 항인간 IL-6 수용체 항체의 일부로서 사용 가능하다. 이들 가변영역이 사용된 항인간 IL-6 수용체 항체는 우수한 결합활성, 우수한 약물동태, 우수한 안전성·면역원성, 및/또는 우수한 물성을 갖는다.
- [0089] 전술한 가변영역은 1 또는 복수(예를 들면 5 아미노산 이내, 바람직하게는 3 아미노산 이내)의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 1 또는 복수의 아미노산 잔기를 목적의 다른 아미노산으로 치환하는 방법으로서, 예를 들면, 전술한 방법을 들 수 있다.
- [0090] 또한 본 발명은, 전술한 가변영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다.
- [0091] 또한 본 발명은 이하의 (a)~(c) 중 어느 하나에 기재된 항체를 제공한다.
- [0092] (a) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체,
- [0093] (b) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체,
- [0094] (c) 서열번호:21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.
- [0095] 전술한 가변영역은 항인간 IL-6 수용체 항체의 일부로서 사용 가능하다. 이들 가변영역이 사용된 항인간 IL-6 수용체 항체는 우수한 결합활성, 우수한 약물동태, 우수한 안전성·면역원성, 및/또는 우수한 물성을 갖는다.
- [0096] 전술한 가변영역은 1 또는 복수(예를 들면 5 아미노산 이내, 바람직하게는 3 아미노산 이내)의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 1 또는 복수의 아미노산 잔기를 목적의 다른 아미노산으로 치환하는 방법으로서, 예를 들면, 전술한 방법을 들 수 있다.
- [0097] 또한, 본 발명의 항체에서 사용되는 정상영역은 특별히 한정되지 않고, 어떠한 정상영역이 사용되어도 된다. 본 발명의 항체에서 사용되는 정상영역의 바람직한 예로서는, 인간 유래의 정상영역(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, κ 사슬, λ 사슬 유래의 정상영역 등)을 들 수 있다. 인간 유래의 정상영역은 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 예를 들면, 인간 유래의 정상영역의 바람직한 예로서, 중쇄 정상영역의 경우에는 서열번호:31(VH4-M73의 정상영역)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:32(VH3-M73의 정상영역)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:33(VH5-M83의 정상영역)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역을 들 수 있고, 경쇄 정상영역의 경우에는 서열번호:34(VL1)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:35(VL3)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:36(VL5)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역을 들 수 있다.
- [0098] 또한 본 발명은 이하의 (a)~(f) 중 어느 하나에 기재된 중쇄 또는 경쇄를 제공한다.

- [0099] (a) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄,
- [0100] (b) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄,
- [0101] (c) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄,
- [0102] (d) 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄,
- [0103] (e) 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄,
- [0104] (f) 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄.
- [0105] 전술한 중쇄 또는 경쇄는 항인간 IL-6 수용체 항체의 일부로서 사용 가능하다. 이들 중쇄 또는 경쇄가 사용된 항인간 IL-6 수용체 항체는, 우수한 결합활성, 우수한 약물동태, 우수한 안전성·면역원성, 및/또는 우수한 물성을 갖는다.
- [0106] 전술한 중쇄 또는 경쇄는, 1 또는 복수(예를 들면 10 아미노산 이내, 바람직하게는 5 아미노산 이내, 더욱 바람직하게는 3 아미노산 이내)의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 1 또는 복수의 아미노산 잔기를 목적의 다른 아미노산으로 치환하는 방법으로서, 예를 들면, 전술한 방법을 사용하는 것이 가능하다.
- [0107] 1 또는 복수의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입은 가변영역에 있어서 행해져도 되고, 정상영역에 있어서 행해져도 되며, 또는 가변영역과 정상영역 양쪽에 있어서 행해져도 된다.
- [0108] 또한 본 발명은 이하의 (a)-(c) 중 어느 하나에 기재된 항체를 제공한다.
- [0109] (a) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체,
- [0110] (b) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체,
- [0111] (c) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체.
- [0112] 전술한 항체는 우수한 결합활성, 우수한 약물동태, 우수한 안전성·면역원성, 및/또는 우수한 물성을 갖는 항인간 IL-6 수용체 항체이다.
- [0113] 전술한 항체는, 1 또는 복수(예를 들면 20 아미노산 이내, 바람직하게는 10 아미노산 이내, 더욱 바람직하게는 5 아미노산 이내)의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 1 또는 복수의 아미노산 잔기를 목적의 다른 아미노산으로 치환하는 방법으로서, 예를 들면, 전술한 방법을 들 수 있다.
- [0114] 1 또는 복수의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입은 가변영역에 있어서 행해져도 되고, 정상영역에 있어서 행해져도 되며, 또는 가변영역과 정상영역의 양쪽에 있어서 행해져도 된다.
- [0115] 본 발명의 항체는, 인간화(humanized) 항체인 것이 바람직하다.
- [0116] 인간화 항체는 재구성(reshaped) 인간 항체로도 불리고, 이는 인간 이외의 포유동물 유래의 CDR을 인간 항체의 CDR로 이식한 것으로, 그 일반적인 유전자 재조합 수법도 알려져 있다(유럽특허출원 공개번호 EP 125023호 공보, WO 96/02576호 공보 참조).
- [0117] 구체적으로는, 예를 들면 목적의 CDR과 목적의 프레임워크영역(FR)을 연결하도록 설계한 DNA 서열을, CDR 및 FR 양쪽의 말단영역에 오버랩되는 부분을 갖도록 제작한 수개의 올리고 뉴클레오티드를 프라이머로서 사용하여 PCR 법에 의해 합성한다(WO98/13388호 공보에 기재된 방법을 참조). 얻어진 DNA를 인간 항체 정상영역 또는 인간 항체 정상영역 개변체를 코딩하는 DNA와 연결하고, 이어서 발현 벡터에 삽입하고, 이것을 숙주에 도입하여 생산시킴으로써 얻어진다(유럽특허출원 공개번호 EP 239400, 국제특허출원 공개번호 WO 96/02576 참조).
- [0118] CDR과 연결되는 인간 항체의 프레임워크영역은, CDR이 양호한 항원 결합부위를 형성하는 것이 선택된다. 필요에 따라, 항체의 가변영역에 있어서의 프레임워크영역의 아미노산을 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등 해도 된다.
- [0119] 인간화 항체의 정상영역에는, 인간 항체 정상영역 또는 인간 항체 정상영역에 있어서 1 또는 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 인간 항체 정상영역 개변체를 사용할 수 있다.
- [0120] 예를 들면 H사슬의 경우는, C_γ1, C_γ2, C_γ3, C_γ4, C_μ, C_δ, C_α1, C_α2, C_ε를, L사슬의 경우는 C_κ, C_λ를 사용할 수 있다. C_κ의 아미노산 서열을 서열번호:38에, 당해 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 서열번호:37에 나타낸다. C_γ1의 아미노산 서열을 서열번호:40에, 당해 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 서열번호:39에 나타낸다.

호:39에 나타낸다. C_γ2의 아미노산 서열을 서열번호:42에, 당해 아미노산 서열을 코드하는 염기서열을 서열번호:41에 나타낸다. C_γ4의 아미노산 서열을 서열번호:44에, 당해 아미노산 서열을 코드하는 염기서열을 서열번호:43에 나타낸다.

- [0121] 또한, 항체 또는 그의 생산 안정성을 개선하기 위해, 인간 항체 C영역을 수식해도 된다. 인간화시에 사용되는 인간 항체는, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD 등 어떠한 아이소타입의 인간 항체여도 되나, 본 발명에 있어서는 IgG를 사용하는 것이 바람직하다. IgG로서는, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등을 사용하는 것이 가능하다.
- [0122] 또한, 인간화 항체를 제작한 후에, 가변영역(예를 들면, CDR, FR)이나 정상영역 중의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등 해도 되고, 본 발명의 인간화 항체에는, 그러한 아미노산 치환 등 된 인간화 항체도 포함된다.
- [0123] 본 발명의 항체에는, IL-6 수용체로의 결합활성 및/또는 중화활성을 갖는 한, IgG로 대표되는 2가 항체 뿐 아니라, 1가 항체, 또는 IgM으로 대표되는 다가 항체도 포함된다. 본 발명의 다가 항체에는, 모두 동일한 항원 결합 부위를 갖는 다가 항체, 또는, 일부 또는 모두 상이한 항원 결합부위를 갖는 다가 항체가 포함된다. 본 발명의 항체는, 항체의 전장분자에 한정되지 않고, IL-6 수용체 단백질에 결합하는 한, 저분자화 항체 또는 그의 수식물이어도 된다.
- [0124] 저분자화 항체는, 전장항체(whole antibody, 예를 들면 whole IgG 등)의 일부분이 결손되어 있는 항체 단편을 포함하는 항체로, IL-6 수용체로의 결합활성 및/또는 중화활성을 갖는 한 특별히 한정되지 않는다. 본 발명에 있어서 저분자화 항체는, 전장항체의 일부분을 포함하는 한 특별히 한정되지 않으나, VH 또는 VL을 포함하고 있는 것이 바람직하고, 특히 바람직하게는 VH와 VL의 양쪽을 포함하는 저분자화 항체이다. 또한, 본 발명의 저분자화 항체의 다른 바람직한 예로서, 항체의 CDR을 포함하는 저분자화 항체를 들 수 있다. 저분자화 항체에 포함되는 CDR은 항체의 6개의 CDR 전부가 포함되어 있어도 되고, 일부의 CDR이 포함되어 있어도 된다.
- [0125] 본 발명에 있어서의 저분자화 항체는, 전장항체보다도 분자량이 작아지는 것이 바람직하나, 예를 들면, 다이머, 트리머, 테트라머 등의 다량체를 형성하는 경우 등도 있어, 전장항체보다도 분자량이 커지는 경우도 있다.
- [0126] 항체 단편의 구체예로서는, 예를 들면, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 등을 들 수 있다. 또한, 저분자화 항체의 구체예로서는, 예를 들면, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv(single chain Fv), Diabody, sc(Fv)₂(single chain(Fv)₂) 등을 들 수 있다. 이들 항체의 다량체(예를 들면, 다이머, 트리머, 테트라머, 폴리머)도, 본 발명의 저분자화 항체에 포함된다.
- [0127] 항체 단편은, 예를 들면, 항체를 효소로 처리하여 항체 단편을 생성시킴으로써 얻을 수 있다. 항체 단편을 생성하는 효소로서, 예를 들면 파파인, 펩신, 또는 플라스민 등이 공지이다. 또는, 이들 항체 단편을 코드하는 유전자를 구축하고, 이를 발현 벡터에 도입한 후, 적당한 숙주세포에서 발현시킬 수 있다(예를 들면, Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Pluckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991)9, 132-137 참조).
- [0128] 소화효소는, 항체 단편의 특정 위치를 절단하여, 다음과 같은 특정 구조의 항체 단편을 부여한다. 이러한 효소적으로 얻어진 항체 단편에 대해, 유전자공학적 수법을 이용하면, 항체의 임의의 부분을 결실시킬 수 있다.
- [0129] 진술한 소화효소를 사용한 경우에 얻어지는 항체 단편은 이하와 같다.
- [0130] 파파인 소화 : F(ab)₂ 또는 Fab
- [0131] 펩신 소화 : F(ab')₂ 또는 Fab'
- [0132] 플라스민 소화 : Facb
- [0133] 본 발명에 있어서의 저분자화 항체는, IL-6 수용체로의 결합활성 및/또는 중화활성을 갖는 한, 임의의 영역을 결실한 항체 단편을 포함할 수 있다.
- [0134] 다이아바디는, 유전자 융합에 의해 구축된 2가(bivalent)의 항체 단편을 가리킨다(Holliger P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), EP404,097호, W093/11161호 등). 다이아바디는, 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성되는 다이머이다. 통상, 다이머를 구성하는 폴리펩티드 사슬은, 각각 동일한 사슬 중에서 VL 및 VH가 링커에 의해 결합되어 있다. 다이아바디에 있어서의 링커는, 일반적으로, VL과 VH가 서로 결합 불가능한

정도로 짧다. 구체적으로는, 링커를 구성하는 아미노산 잔기는, 예를 들면, 5 잔기 정도이다. 그 때문에, 동일 폴리펩티드 사슬 상에 코딩되는 VL과 VH는, 단일 사슬 가변영역 프래그먼트를 형성할 수 없어, 별도의 단일 사슬 가변영역 프래그먼트와 이량체를 형성한다. 그 결과, 다이아바디는 2개의 항원 결합부위를 갖게 된다.

- [0135] scFv 항체는, VH 및 VL을 링커 등으로 결합하여 단일 사슬 폴리펩티드로 한 항체이다(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883, Pluckthun 「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」 Vol.113, Resenbug 및 Moore편, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994)). scFv에 있어서의 H사슬 V영역 및 L사슬 V영역은, 본 명세서에 기재된 어느 항체 유래여도 된다. V영역을 연결하는 펩티드 링커에는, 특별히 제한은 없다. 예를 들면 3~25 잔기 정도로 되는 임의의 단일 사슬 펩티드를 링커로서 사용할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들면 후술하는 펩티드 링커 등을 사용할 수 있다.
- [0136] 양 사슬의 V영역은, 예를 들면 상기한 바와 같은 PCR법에 의해 연결할 수 있다. PCR법에 의한 V영역의 연결을 위해, 먼저 다음의 DNA 중, 전부 또는 목적하는 부분 아미노산 서열을 코딩하는 DNA가 주형으로서 이용된다.
- [0137] 항체의 H사슬 또는 H사슬 V영역을 코딩하는 DNA서열, 및
- [0138] 항체의 L사슬 또는 L사슬 V영역을 코딩하는 DNA서열
- [0139] 증폭해야 하는 DNA의 양쪽 말단의 서열에 대응하는 서열을 갖는 프라이머의 한쌍을 사용한 PCR법에 의해, H사슬과 L사슬의 V영역을 코딩하는 DNA가 각각 증폭된다. 이어서, 펩티드 링커부분을 코딩하는 DNA를 준비한다. 펩티드 링커를 코딩하는 DNA도 PCR을 이용하여 합성할 수 있다. 이때 이용하는 프라이머의 5'측에, 별도로 합성된 각 V영역의 증폭산물과 연결할 수 있는 염기서열을 부가해 둔다. 이어서, [H사슬 V영역 DNA]-[펩티드 링커 DNA]-[L사슬 V영역 DNA]의 각 DNA와, 어셈블리 PCR용 프라이머를 이용해서 PCR 반응을 행한다.
- [0140] 어셈블리 PCR용 프라이머는, [H사슬 V영역 DNA]의 5'측에 어닐링하는 프라이머와, [L사슬 V영역 DNA]의 3'측에 어닐링하는 프라이머의 조합으로 된다. 즉 어셈블리 PCR용 프라이머란, 합성해야 하는 scFv의 전장서열을 코딩하는 DNA를 증폭할 수 있는 프라이머 세트이다. 한편 [펩티드 링커 DNA]에는 각 V영역 DNA와 연결할 수 있는 염기서열이 부가되어 있다. 그 결과, 이들 DNA가 연결되고, 추가적으로 어셈블리 PCR용 프라이머에 의해, 최종적으로 scFv의 전장이 증폭산물로서 생성된다. 일단 scFv를 코딩하는 DNA가 제작되면, 그들을 함유하는 발현 벡터, 및 그 발현 벡터에 의해 형질전환된 재조합 세포를 통상의 방법에 따라 취득할 수 있다. 또한, 그 결과 얻어지는 재조합 세포를 배양하여 그 scFv를 코딩하는 DNA를 발현시킴으로써, 그 scFv를 취득할 수 있다.
- [0141] 결합되는 VH와 VL의 순서는 특별히 한정되지 않으며, 어떤 순서로 나열되어 있어도 되고, 예를 들면, 이하와 같은 배치를 들 수 있다.
- [0142] [VH] 링커 [VL]
- [0143] [VL] 링커 [VH]
- [0144] sc(Fv)₂는, 2개의 VH 및 2개의 VL을 링커 등으로 결합하여 단일 사슬로 한 저분자화 항체이다(Hudson et al, J Immunol. Methods 1999; 231: 177-189). sc(Fv)₂는, 예를 들면, scFv를 링커로 연결함으로써 제작할 수 있다.
- [0145] 또한 2개의 VH 및 2개의 VL이, 단일 사슬 폴리펩티드의 N 말단측을 기점으로 하여 VH, VL, VH, VL([VH] 링커 [VL] 링커 [VH] 링커 [VL])의 순으로 나열되어 있는 것을 특징으로 하는 항체가 바람직하나, 2개의 VH와 2개의 VL의 순서는 특별히 상기 배치에 한정되지 않고, 어떤 순서로 나열되어 있어도 된다. 예를 들면 이하와 같은 배치도 들 수 있다.
- [0146] [VL] 링커 [VH] 링커 [VH] 링커 [VL]
- [0147] [VH] 링커 [VL] 링커 [VL] 링커 [VH]
- [0148] [VH] 링커 [VH] 링커 [VL] 링커 [VL]
- [0149] [VL] 링커 [VL] 링커 [VH] 링커 [VH]
- [0150] [VL] 링커 [VH] 링커 [VL] 링커 [VH]
- [0151] 저분자 항체 중의 VH 또는 VL의 아미노산 서열은, 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 또한, VH와 VL을 회합시킨 경우에, 항원 결합활성을 갖는 한, 일부를 결손시켜도 되고, 다른 폴리펩티드를 첨가해도 된다. 또한, 가변영역은 키메라화나 인간화되어 있어도 된다.

- [0152] 본 발명에 있어서, 항체의 가변영역을 결합하는 링커는, 유전자공학에 의해 도입 가능한 임의의 펩티드 링커, 또는 합성화합물 링커, 예를 들면 Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996에 개시되는 링커를 사용할 수 있다.
- [0153] 본 발명에 있어서 바람직한 링커는 펩티드 링커이다. 펩티드 링커의 길이는 특별히 한정되지 않고, 목적에 따라 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하나, 통상, 1~100 아미노산, 바람직하게는 3~50 아미노산, 더욱 바람직하게는 5~30 아미노산, 특히 바람직하게는 12~18 아미노산(예를 들면, 15 아미노산)이다.
- [0154] 펩티드 링커의 아미노산 서열로서는, 예를 들면, 이하와 같은 서열을 들 수 있다.
- [0155] Ser
- [0156] Gly · Ser
- [0157] Gly · Gly · Ser
- [0158] Ser · Gly · Gly
- [0159] Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:45)
- [0160] Ser · Gly · Gly · Gly(서열번호:46)
- [0161] Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:47)
- [0162] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호:48)
- [0163] Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:49)
- [0164] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호:50)
- [0165] Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:51)
- [0166] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호:52)
- [0167] (Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:47))_n
- [0168] (Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호:48))_n
- [0169] [n은 1 이상의 정수이다] 등을 들 수 있다.
- [0170] 펩티드 링커의 아미노산 서열은, 목적에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다. 예를 들면 상기의 펩티드 링커의 길이를 결정하는 n은, 통상 1~5, 바람직하게는 1~3, 보다 바람직하게는 1 또는 2이다.
- [0171] 합성화합물 링커(화학교제)는, 펩티드의 가교에 통상 사용되고 있는 가교제, 예를 들면, N-히드록시숙신이미드(NHS), 디숙신이미딜 스베레이트(DSS), 비스(설포숙신이미딜)스베레이트(BS3), 디티오비스(숙신이미딜 프로피오네이트)(DSP), 디티오비스(설포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP), 에틸렌글리콜 비스(숙신이미딜 숙시네이트)(EGS), 에틸렌글리콜 비스(설포숙신이미딜 숙시네이트)(설포-EGS), 디숙신이미딜 타르타르산염(DST), 디설포숙신이미딜 타르타르산염(설포-DST), 비스[2-(숙신이미도옥시카르보닐옥시)에틸]설포(BSOCOES), 비스[2-(설포숙신이미도옥시카르보닐옥시)에틸]설포(설포-BSOCOES) 등이며, 이들 가교제는 시판되고 있다.
- [0172] 4개의 항체 가변영역을 결합하는 경우에는, 통상, 3개의 링커가 필요해진다. 복수의 링커는 동일해도 되고, 상이한 링커를 사용하는 것도 가능하다.
- [0173] 본 발명의 항체에는, 본 발명의 항체의 아미노산 서열에 1 또는 복수 개의 아미노산 잔기가 부가된 항체도 포함된다. 또한, 이들 항체와 다른 펩티드 또는 단백질이 융합된 융합 단백질도 포함된다. 융합 단백질을 제작하는 방법은, 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 다른 펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 프레임이 일치하도록 연결하여 이것을 발현 벡터에 도입하고, 숙주에서 발현시키면 되고, 당업자 공지 수법을 사용할 수 있다. 본 발명의 항체와의 융합에 제공되는 다른 펩티드 또는 폴리펩티드로서는, 예를 들면, FLAG(Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210), 6개의 His(히스티딘) 잔기로 되는 6×His, 10×His, 인플루엔자 응집소(HA), 인간 c-myc의 단편, VSV-GP의 단편, p18HIV의 단편, T7-tag, HSV-tag, E-tag, SV40T 항원의 단편, lck tag, α-tubulin의 단편, B-tag, Protein C의 단편 등의 공지의 펩티드를 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체와의 융합에 제공되는 다른 폴리펩티드로서는, 예를 들면, GST(글루타티온-S-트랜스페라아제), HA(인플루엔자 응집소), 면역글로불린 정상영역, β-갈락토시다아제, MBP(말토오스 결합 단백질) 등

을 들 수 있다. 시판되고 있는 이들 펩티드 또는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드를, 본 발명의 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드와 융합시키고, 이것에 의해 조제된 융합 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써, 융합 폴리펩티드를 조제할 수 있다.

[0174] 또한 본 발명의 항체는, 폴리에틸렌글리콜(PEG)이나 히알루론산 등의 고분자물질, 방사성물질, 형광물질, 발광물질, 효소, 독신 등의 각종 분자와 결합한 콘주게이트 항체여도 된다. 이러한 콘주게이트 항체는, 언어진 항체에 화학적인 수식을 행함으로써 얻을 수 있다. 또한, 항체의 수식방법은 이 분야에 있어서 이미 확립되어 있다(예를 들면, US5057313, US5156840). 본 발명에 있어서의 「항체」에는 이들 콘주게이트 항체도 포함된다.

[0175] 또한 본 발명의 항체에는, 당사슬이 개변된 항체도 포함된다.

[0176] 또한, 본 발명에서 사용되는 항체는 이중 특이성 항체(bispecific antibody)여도 된다. 이중 특이성 항체란, 상이한 에피토프를 인식하는 가변영역을 동일 항체 분자 내에 갖는 항체를 말한다. 본 발명에 있어서, 이중 특이성 항체는 IL-6 수용체 분자 상의 상이한 에피토프를 인식하는 이중 특이성 항체여도 되고, 한쪽의 항원 결합부위가 IL-6 수용체를 인식하고, 다른 한쪽의 항원 결합부위가 다른 물질을 인식하는 이중 특이성 항체로 하는 것도 가능하다. IL-6 수용체를 인식하는 본 발명의 항체로 되는 이중 특이성 항체의 다른 쪽의 항원 결합부위가 결합하는 항원으로서, 예를 들면, IL-6, TNF α , TNFR1, TNFR2, CD80, CD86, CD28, CD20, CD19, IL-1 α , IL- β , IL-1R, RANKL, RANK, IL-17, IL-17R, IL-23, IL-23R, IL-15, IL-15R, BlyS, lymphotoxin α , lymphotoxin β , LIGHT ligand, LIGHT, VLA-4, CD25, IL-12, IL-12R, CD40, CD40L, BAFF, CD52, CD22, IL-32, IL-21, IL-21R, GM-CSF, GM-CSFR, M-CSF, M-CSFR, IFN-alpha, VEGF, VEGFR, EGF, EGFR, CCR5, APRIL, APRILR 등을 들 수 있다.

[0177] 이중 특이성 항체를 제조하기 위한 방법은 공지이다. 예를 들면, 인식 항원이 상이한 2종류의 항체를 결합시켜서, 이중 특이성 항체를 제작할 수 있다. 결합시키는 항체는, 각각이 H사슬과 L사슬을 갖는 1/2 분자여도 되고, H사슬로만 되는 1/4 분자여도 된다. 또는, 상이한 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마를 융합시켜서, 이중 특이성 항체생산 융합세포를 제작하는 것도 가능하다. 또한, 유전자공학적인 수법에 의해 이중 특이성 항체를 제작할 수 있다.

[0178] 본 발명의 항체는, 후술하는 항체를 생산하는 세포나 숙주 또는 정제방법에 의해, 아미노산 서열, 분자량, 등전점 또는 당사슬의 유무나 형태 등이 상이할 수 있다. 그러나, 언어진 항체가, 본 발명의 항체와 동등한 기능을 가지고 있는 한, 본 발명에 포함된다. 예를 들면, 본 발명의 항체를 원핵세포, 예를 들면 대장균으로 발현시킨 경우, 본래의 항체의 아미노산 서열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 부가된다. 본 발명의 항체는 이러한 항체도 포함한다.

[0179] 본 발명의 항IL-6 수용체 항체 등의 폴리펩티드는 당업자 공지의 방법에 의해 제조하는 것이 가능하다.

[0180] 예를 들면, 언어진 항IL-6 수용체 항체의 서열을 토대로, 당업자 공지의 유전자 재조합기술을 사용하여 항IL-6 수용체 항체를 제작하는 것이 가능하다. 구체적으로는, IL-6 수용체를 인식하는 항체의 서열을 토대로 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 구축하고, 이것을 발현 벡터에 도입한 후, 적당한 숙주세포에서 발현시키면 된다(예를 들면, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 참조).

[0181] 따라서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 공정을 포함하는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 유전자에 의해 코드되는 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다.

[0182] 보다 구체적으로는, 이하의 공정을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드의 제조방법을 제공한다.

[0183] (a) 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 유전자가 도입된 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 공정,

[0184] (b) 당해 유전자에 의해 코드되는 폴리펩티드를 취득하는 공정.

[0185] 벡터의 예로서는, M13계 벡터, pUC계 벡터, pBR322, pBluescript, pCR-Script 등을 들 수 있다. 또한, cDNA의 서브클로닝, 잘라내기를 목적으로 한 경우, 상기 벡터 외에, 예를 들면, pGEM-T, pDIRECT, pT7 등을 들 수 있다. 본 발명의 항체를 생산하는 목적에 있어서 벡터를 사용하는 경우에는, 특히, 발현 벡터가 유용하다. 발현 벡터로서는, 예를 들면, 대장균에서의 발현을 목적으로 한 경우는, 벡터가 대장균에서 증폭되는 특징을 갖는 것

외에, 숙주를 JM109, DH5 α , HB101, XL1-Blue 등의 대장균으로 한 경우에 있어서는, 대장균에서 효율적으로 발현할 수 있는 프로모터, 예를 들면, lacZ 프로모터(Ward 등, Nature (1989) 341, 544-546; FASEBJ. (1992) 6, 2422-2427), araB 프로모터(Better 등, Science (1988) 240, 1041-1043), 또는 T7 프로모터 등을 가지고 있는 것이 불가결하다. 이러한 벡터로서는, 상기 벡터 외에 pGEX-5X-1(파마시아제), 「QIAexpress system」(퀴아젠제), pEGFP, 또는 pET(이 경우, 숙주는 T7 RNA 폴리머라아제를 발현하고 있는 BL21이 바람직하다) 등을 들 수 있다.

[0186] 또한, 발현 플라스미드의 벡터에는, 항체 분비를 위한 시그널 서열이 포함되어 있어도 된다. 항체 분비를 위한 시그널 서열로서는, 대장균의 페리플라즈름으로 생산시키는 경우, pelB 시그널 서열(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)을 사용하면 된다. 숙주세포로의 벡터의 도입은, 예를 들면 염화칼슘법, 전기천공법(electroporation)을 사용해서 행할 수 있다.

[0187] 대장균 이외에도, 예를 들면, 본 발명의 항체를 제조하기 위한 벡터로서는, 포유동물 유래의 발현 벡터(예를 들면, pcDNA3(인비트로젠사제)나, pEF-BOS(Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322), pEF, pCDM8), 곤충세포 유래의 발현 벡터(예를 들면 「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(기브코 BRL제), pBacPAK8), 식물 유래의 발현 벡터(예를 들면 pMH1, pMH2), 동물 바이러스 유래의 발현 벡터(예를 들면, pHSV, pMV, pAdexLcw), 레트로바이러스 유래의 발현 벡터(예를 들면, pZIPneo), 효모 유래의 발현 벡터(예를 들면, 「Pichia Expression Kit」(인비트로젠제), pNV11, SP-Q01), 길쭉균 유래의 발현 벡터(예를 들면, pPL608, pKTH50)를 들 수 있다.

[0188] CHO세포, COS세포, NIH3T3세포 등의 동물세포에서의 발현을 목적으로 한 경우에는, 발현 플라스미드의 벡터가 세포 내에서 발현시키기 위해 필요한 프로모터, 예를 들면 SV40 프로모터(Mulligan 등, Nature (1979) 277, 108), MMLV-LTR 프로모터, EF1 α 프로모터(Mizushima 등, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), CMV 프로모터 등을 가지고 있는 것이 불가결하고, 세포로의 형질전환을 선발하기 위한 유전자(예를 들면, 약제(네오마이신, G418 등)에 의해 판별할 수 있는 약제내성 유전자)를 가지면 더욱 바람직하다. 이러한 특성을 갖는 벡터로서는, 예를 들면 pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13 등을 들 수 있다.

[0189] 또한, 유전자를 안정적으로 발현시키고, 또한, 세포 내에서의 유전자의 카피 수의 증폭을 목적으로 하는 경우에는, 핵산 합성경로를 결손한 CHO세포에 그것을 상보하는 DHFR 유전자를 갖는 벡터(예를 들면, pSV2-dhfr(「Molecular Cloning 2nd edition」 Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) 등)를 도입하고, 메토타렉세이트(MTX)에 의해 증폭시키는 방법을 들 수 있으며, 또한, 유전자의 일과성 발현을 목적으로 하는 경우에는, SV40 T항원을 발현하는 유전자를 염색체 상에 갖는 COS세포를 사용하여 SV40의 복제 기점을 갖는 벡터(pcD 등)로 형질전환하는 방법을 들 수 있다. 복제 개시점으로서, 또한, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 소 유두종 바이러스(BPV) 등의 유래의 것을 사용하는 것도 가능하다. 또한, 숙주세포계에서 유전자 카피 수 증폭을 위해, 발현 벡터는 선택 마커로서, 아미노글리코사이드 트랜스페라아제(APH) 유전자, 티미딘 키나아제(TK) 유전자, 대장균 크산틴구아닌 포스포리보실 트랜스페라아제(Ecogpt) 유전자, 디히드로엽산 환원효소(dhfr) 유전자 등을 포함할 수 있다.

[0190] 이것에 의해 얻어진 본 발명의 항체는, 숙주세포 내 또는 세포 외(배지 등)로부터 단리하여, 실질적으로 순수하고 균일한 항체로서 정제할 수 있다. 항체의 분리, 정제는, 통상의 항체의 정제에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법을 사용하면 되고, 조금도 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 크로마토그래피 칼럼, 필터, 한외여과, 염석, 용매침전, 용매추출, 증류, 면역침강, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 등전점 전기영동법, 투석, 재결정 등을 적절히 선택해서 조합하면 항체를 분리, 정제할 수 있다.

[0191] 크로마토그래피로서는, 예를 들면 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 겔 여과, 역상 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 등을 들 수 있다(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). 이들 크로마토그래피는, 액상 크로마토그래피, 예를 들면 HPLC, FPLC 등의 액상 크로마토그래피를 사용해서 행할 수 있다. 친화성 크로마토그래피에 사용하는 칼럼으로서, 단백질 A 칼럼, 단백질 G 칼럼을 들 수 있다. 예를 들면, 단백질 A를 사용한 칼럼으로서, Hyper D, POROS, Sepharose FF(GE Amersham Biosciences) 등을 들 수 있다. 본 발명은 이들 정제방법을 사용하여, 고도로 정제된 항체도 포함한다.

[0192] 얻어진 항체의 IL-6 수용체에 대한 결합활성의 측정, 당업자 공지 방법에 의해 행하는 것이 가능하다. 예를 들면, 항체의 항원 결합활성을 측정하는 방법으로서, ELISA(효소 결합 면역 흡착 측정법), EIA(효소 면역 측정

법), RIA(방사 면역 측정법) 또는 형광 항체법을 사용할 수 있다. 예를 들면, 효소 면역 측정법을 사용하는 경우, 항원을 코팅한 플레이트에, 항체를 포함하는 시료, 예를 들면, 항체생산세포의 배양상청이나 정제항체를 첨가한다. 알칼리 포스파타아제 등의 효소로 표지한 2차 항체를 첨가하고, 플레이트를 인큐베이트하여, 세정 한 후, p-니트로페닐인산 등의 효소 기질을 첨가하여 흡광도를 측정함으로써 항원 결합활성을 평가할 수 있다.

[0193] 의약 조성물

[0194] 또한 본 발명은, 전술한 폴리펩티드를 유효성분으로서 함유하는 의약 조성물을 제공한다. 본 발명의 의약 조성물은 IL-6가 관련된 관절류머티즘 등의 질환에 사용하는 것이 가능하다. 즉 본 발명은, 전술한 항체를 유효성분으로 하는 관절류머티즘 등의 질환의 치료제도 제공한다. 본 발명의 대상이 되는 질환의 바람직한 예로서, 관절류머티즘, 약년성 특발성 관절염, 전신형 약년성 특발성 관절염, 캐슬먼병, 전신성 에리테마토데스(SLE), 루프스 신염, 크론병, 림프종(lymphoma), 궤양성 대장염, 빈혈, 혈관염, 가와사키병, 스틸(Still)병, 아밀로이드증(amyloidosis), 다발성 경화증, 이식, 가령 황반 변성증, 강직성 척추염, 건선, 건선성 관절염, 만성 폐색성 폐질환(COPD), IgA 신증, 변형성 관절증, 천식, 당뇨병성 신증, GVHD, 자궁내막증, 간염(NASH), 심근경색, 동맥경화, 패혈증(sepsis), 골다공증, 당뇨병, 다발성 골수종, 전립선암, 신장암, B-cell non-Hodgkin's, 췌장암, 폐암, 식도암, 대장암, 암약액질(cancer cachexia), 암 신경 침윤, 심근경색, 근시성 맥락막 혈관 신생, 특발성 맥락막 혈관 신생, 포도막염, 만성 갑상선염, 지연성 과민증, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 중피종, 다발성 근염, 피부근염, 범포도막염, 전부 포도막염, 중간부 포도막염, 강막염, 각막염, 안와염증, 시신경염, 당뇨병 망막증, 증식 유리체 망막증, 안구 건조증(dry eye), 수술 후 염증 등을 들 수 있는데, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0195] 항IL-6 수용체 항체를 「유효성분으로서 함유하는」이란, 항IL-6 수용체 항체를 활성 성분의 적어도 하나로서 포함한다는 의미로, 그 함유율을 제한하는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 의약 조성물은, 전술한 폴리펩티드와 함께 다른 유효성분을 함유하고 있어도 된다.

[0196] 또한, 본 발명의 의약 조성물은 치료 목적 뿐 아니라, 예방 목적으로 사용되어도 된다.

[0197] 본 발명의 폴리펩티드는, 통상의 방법에 따라 제제화할 수 있다(예를 들면, Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A). 추가적으로, 필요에 따라, 의약적으로 허용되는 담체 및/또는 첨가물을 함께 포함해도 된다. 예를 들면, 계면활성제(PEG, Tween 등), 부형제, 산화방지제(아스코르브산 등), 착색료, 착향료, 보존료, 안정제, 완충제(인산, 구연산, 다른 유기산 등), 킬레이트제(EDTA 등), 현탁제, 등장화제, 결합제, 붕괴제, 활택제, 유동성 촉진제, 교미제 등을 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 치료제는, 이들에 제한되지 않고, 기타 상용 담체를 적절히 포함하고 있어도 된다. 구체적으로는, 연질 무수 규산, 젤라틴, 결정 셀룰로오스, 만니톨, 전분, 카르멜로오스 칼슘, 카르멜로오스 나트륨, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스, 폴리비닐 아세탈 디에틸아미노아세테이트, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 중쇄 지방산 트리글리세라이드, 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유 60, 백당, 카르복시메틸셀룰로오스, 콘스타치, 무기 염류 등을 들 수 있다. 또한, 기타 저분자량의 폴리펩티드, 혈청 알부민, 젤라틴 및 면역글로불린 등의 단백질, 및 아미노산을 포함하고 있어도 된다. 주사용 수용액으로 하는 경우에는, 항IL-6 수용체 항체를, 예를 들면, 생리식염수, 포도당 또는 기타 보조제를 포함하는 등장액에 용해한다. 보조제로서는, 예를 들면, D-소르비톨, D-만노오스, D-만니톨, 염화나트륨을 들 수 있고, 추가적으로, 적당한 용해 보조제, 예를 들면 알코올(에탄올 등), 폴리알코올(프로필렌글리콜, PEG 등), 비이온성 계면활성제(폴리소르베이트 80, HCO-50) 등과 병용해도 된다.

[0198] 또한, 필요에 따라 폴리펩티드를 마이크로캡슐(히드록시메틸셀룰로오스, 젤라틴, 폴리[메틸메타크릴산] 등의 마이크로캡슐)에 봉입하거나, 콜로이드 드러그 딜리버리 시스템(리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐 등)으로 하는 것도 가능하다(Remington's Pharmaceutical Science 16th edition & Oslo Ed. (1980) 등 참조). 추가적으로, 약제를 서방성 약제로 하는 방법도 공지로, 폴리펩티드에 적용할 수 있다(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12: 98-105; 미국 특허 제3,773,919호; 유럽특허출원 공개(EP) 제58,481호; Sidman et al., Biopolymers(1983) 22:547-56;EP 제133,988호). 또한, 본 제(agent)에 히알루로니다아제를 첨가 또는 혼합함으로써 피하에 투여하는 액량을 증가시키는 것도 가능하다(예를 들면, W02004/078140 등).

[0199] 본 발명의 의약 조성물은, 경구 또는 비경구 중 어느 것으로도 투여 가능하나, 바람직하게는 비경구 투여된다. 구체적으로는, 주사 및 경피투여에 의해 환자에게 투여된다. 주사제형의 예로서는, 예를 들면, 정맥내 주사, 근육내 주사 또는 피하 주사 등에 의해 전신 또는 국소적으로 투여할 수 있다. 치료 부위 또는 그 주변에 국소 주

입, 특히 근육내 주사해도 된다. 경피투여 제형의 예로서는, 예를 들면, 연고제, 겔제, 크림제, 스펀지제, 및 첩부제 등을 들 수 있고, 전신 또는 국소적으로 투여할 수 있다. 또한, 환자의 연령, 증상에 따라 적절히 투여방법을 선택할 수 있다. 투여량으로서는, 예를 들면, 1회에 대해 체중 1 kg당 활성성분이 0.0001 mg~100 mg인 범위에서 선택하는 것이 가능하다. 또는, 예를 들면, 인간 환자에 투여하는 경우, 환자당 활성성분이 0.001~1000 mg/kg·body·weight인 범위를 선택할 수 있고, 1회당 투여량으로서는, 예를 들면, 본 발명의 항체가 0.01~50 mg/kg·body·weight 정도의 양이 포함되는 것이 바람직하다. 그러나, 본 발명의 의약 조성물은, 이들 투여량에 제한되는 것은 아니다.

[0200] 또한, 본 발명에서 기재되어 있는 아미노산 서열에 포함되는 아미노산은 번역후에 수식(예를 들면, N 말단의 글루타민의 피로글루타미화에 의한 피로글루타민산으로의 수식은 당업자에게 잘 알려진 수식이다)을 받는 경우도 있으나, 그와 같이 아미노산이 번역후 수식된 경우도 당연히 본 발명에서 기재되어 있는 아미노산 서열에 포함된다.

[0201] 또한 결합하는 당사슬의 구조는 어떤 구조여도 된다. EU 넘버링의 297번째 당사슬은 어떤 당사슬구조여도 되고(바람직하게는 푸코실화된 당사슬), 또한 당사슬이 결합되어 있지 않아도 된다(예를 들면 대장균에서 생산하거나, 또는 EU 넘버링의 297번째에 당사슬이 결합하지 않도록 개변함으로써 가능).

[0202] 또한 본 명세서에 있어서 인용된 모든 선행기술문헌은, 참조로써 본 명세서에 포함된다.

[0203] **실시예**

[0204] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명하나, 본 발명은 이들 실시예에 제한되는 것은 아니다.

[0205] [실시예 1] TOCILIZUMAB의 IL-6 수용체로의 친화성을 향상시키는 가변영역 변이개소의 동정

[0206] TOCILIZUMAB(H사슬 WT-IgG1/서열번호:53, L사슬 WT-kappa/서열번호:54)의 IL-6 수용체로의 친화성을 향상시키기 위해, CDR서열에 변이를 도입한 라이브러리를 제작하여 검토하였다. CDR에 변이를 도입한 라이브러리를 스크리닝한 결과, IL-6 수용체로의 친화성을 향상시키는 변이를 발견하고, 그들을 도 1에 정리하였다. 이들 변이를 조합시킨 고친화성 TOCILIZUMAB의 예로서, RDC-23(H사슬 RDC23H-IgG1/서열번호:55, L사슬 RDC-23L-kappa/서열번호:56)을 들 수 있다. RDC-23의 가용형 IL-6 수용체로의 친화성 및 BaF/gp130에 의한 생물활성을 TOCILIZUMAB과 비교하였다(방법은 참고예 참조).

[0207] 친화성을 측정된 결과를 표 1에 나타내었다. BaF/gp130에 의한 생물활성(IL-6 농도 30 ng/mL)을 측정한 결과를 도 2에 나타내었다. RDC-23은 TOCILIZUMAB과 비교하여 약 60배 친화성이 향상되어 있어, BaF/gp130의 100% 저해농도로써 약 100배 활성이 향상되어 있는 것이 발견되었다.

표 1

	$k_a(1/MS)$	$k_d(1/s)$	KD(M)
TOCILIZUMAB	4.9E+05	2.0E-03	4.0E-09
RDC-23	6.4E+05	4.3E-05	6.7E-11

[0208]

[0209] [실시예 2] TOCILIZUMAB의 등전점 저하에 의한 약물동태를 향상시키는 개변의 동정

[0210] TOCILIZUMAB의 약물동태를 향상시키기 위해, IL-6 수용체로의 결합을 크게 저하시키지 않고 가변영역의 등전점을 저하시킬 수 있는 변이개소의 검토를 행하였다. TOCILIZUMAB의 입체 구조 모델로부터 추찰된 가변영역 변이개소를 스크리닝한 결과, IL-6 수용체로의 결합을 크게 저하시키지 않고 가변영역의 등전점을 저하시킬 수 있는 변이개소를 발견하고, 그들을 도 3에 정리하였다. 이들 변이를 조합한 등전점 저하 TOCILIZUMAB의 예로서, H53/L28(H사슬 H53-IgG1/서열번호:57, L사슬 L28-kappa/서열번호:58)을 들 수 있다. H53/L28의 가용형 IL-6 수용체로의 친화성, BaF/gp130에 의한 생물활성, 등전점, 및 마우스에 있어서의 약물동태를 TOCILIZUMAB과 비교하였다(방법은 참고예 참조).

[0211] 친화성을 측정된 결과를 표 2에 나타내었다. BaF/gp130에 의한 생물활성(IL-6 농도 30 ng/mL)을 측정한 결과를 도 4에 나타내었다. H53/L28은, TOCILIZUMAB과 비교하여 약 6배 친화성이 향상되어 있어, BaF/gp130의 100%

저해농도로써 수배 정도 활성이 향상되어 있는 것이 나타내어졌다.

표 2

	$k_a(1/MS)$	$k_d(1/s)$	KD(M)
TOCILIZUMAB	4.9E+05	2.0E-03	4.0E-09
H53/L28	7.6E+05	5.2E-04	6.8E-10

[0212]

[0213]

당업자 공지의 등전점 전기영동에 의해 등전점을 측정된 결과, TOCILIZUMAB의 등전점은 약 9.3이고, H53/L28의 등전점은 약 6.5~6.7로, H53/L28은 TOCILIZUMAB과 비교하여 등전점이 약 2.7 저하되었다. 또한, 가변영역 VH/VL의 이론 등전점을 GENETYX(GENETYX CORPORATION)에 의해 계산한 바, TOCILIZUMAB의 이론 등전점은 9.20이고, H53/L28의 이론 등전점은 4.52로, H53/L28은 TOCILIZUMAB과 비교하여 등전점이 약 4.7 저하되었다.

[0214]

등전점을 저하시킨 개변 항체 H53/L28의 약물동태를 평가하기 위해, TOCILIZUMAB과 H53/L28의 정상 마우스에 있어서의 약물동태의 비교를 행하였다. TOCILIZUMAB 및 H53/L28을 마우스(C57BL/6J, 일본 찰스 리버)에 1 mg/kg으로 정맥내(IV) 및 피하(SC)에 단회 투여하고 혈장 중 농도추이를 평가하였다. TOCILIZUMAB 및 H53/L28의 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 도 5에, 피하투여 후의 혈장 중 농도추이를 도 6에 나타내고, WinNonlin(Pharsight사제)에 의해 얻어진 약물동태학적 파라미터(클리어런스(CL), 반감기(T1/2))를 표 3에 나타내었다. H53/L28의 정맥내 투여 후의 혈장 중 반감기(T1/2)는 TOCILIZUMAB의 약 1.3배로 연장되고, 클리어런스가 약 1.7배 저하되었다. H53/L28의 피하투여 후의 T1/2은 TOCILIZUMAB의 약 2배로 연장되고, 클리어런스가 약 2.1배 저하되었다. 이와 같이 아미노산 치환에 의해 TOCILIZUMAB의 등전점을 저하시킴으로써 약물동태를 대폭 향상시키는 것이 가능한 것이 발견되었다.

표 3

	IV		SC	
	CL	T1/2	CL/F	T1/2
	mL/h/kg	day	mL/h/kg	day
TOCILIZUMAB	0.177	18.5	0.18	14.7
H53/L28	0.102	23.5	0.086	29.7

[0215]

[실시예 3] TOCILIZUMAB의 면역원성을 저하시키는 변이개소의 동정

[0216]

가변영역에 존재하는 T-ce11 에피토프에 의한 면역원성 리스크를 저감시키는 변이개소의 동정

[0217]

TOCILIZUMAB의 가변영역 서열에 존재하는 T-ce11 에피토프를 TEPITOPE(Methods. 2004 Dec;34(4):468-75)를 사용해서 해석을 행하였다. 그 결과, L사슬 CDR2에 많은 HLA에 결합하는 T-ce11 에피토프가 존재할(면역원성 리스크가 높은 서열이 존재할) 것이 예측되었다. 이에, TEPITOPE 해석에 있어서 L사슬 CDR2의 면역원성 리스크를 저감시키면서, 안정성, 결합활성, 중화활성을 저하시키지 않는 아미노산 치환을 검토하였다.

[0218]

스크리닝의 결과, 이와와 같이 TOCILIZUMAB의 L사슬 CDR2(서열번호:59)의 L51(Kabat 넘버링, Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)의 트레오닌을 글리신으로, L53의 아르기닌을 글루타민산으로 치환(서열번호:60)함으로써, 안정성, 결합활성, 중화활성을 저하시키지 않고 면역원성 리스크를 저감시킬 수 있는 것을 발견하였다.

[0219]

TOCILIZUMAB L사슬 CDR2(서열번호:59)

[0220]

T-ce11 에피토프 제거 TOCILIZUMAB L사슬 CDR2(서열번호:60)

[0221]

[실시예 4] TOCILIZUMAB의 가변영역 프레임워크서열의 완전 인간화에 의한 면역원성 리스크의 저감

[0222]

- [0223] TOCILIZUMAB의 가변영역 서열에 있어서, H사슬 FR1의 H27, H28, H29, H30 및 H사슬 FR3의 H71(Kabat 넘버링, Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)은, 인간화의 과정에 있어서 결합활성을 유지하기 위해 프레임워크 서열에 마우스 서열이 잔존하고 있다(Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6). 잔존하는 마우스 서열은 면역원성 리스크를 높이는 원인이 될 수 있기 때문에, TOCILIZUMAB의 면역원성 리스크를 보다 저하시키기 위해 프레임워크 서열을 완전 인간화하는 검토를 행하였다.
- [0224] 그 결과, TOCILIZUMAB의 H사슬 FR1(서열번호:61)을 이하의 인간화 H사슬 FR1-A(서열번호:62)로 치환함으로써, 또한, TOCILIZUMAB의 H사슬 FR3(서열번호:63)를 이하의 인간화 H사슬 FR3(서열번호:64)로 치환함으로써, 안정성, 결합활성, 중화활성을 저하시키지 않고 TOCILIZUMAB의 전체 프레임워크를 완전 인간화할 수 있는 것을 발견하였다.
- [0225] TOCILIZUMAB H사슬 FR1(서열번호:61)
- [0226] 인간화 H사슬 FR1-A(서열번호:62)(Germline IMGT hVH_4_유래)
- [0227] TOCILIZUMAB H사슬 FR3(서열번호:63)
- [0228] 인간화 H사슬 FR3(서열번호:64)(Mol. Immunol. 2007, 44(4):412-422 유래)
- [0229] [실시에 5] TOCILIZUMAB의 IL-6 수용체로의 pH 의존적 결합에 의한 약물동태 향상을 위한 변이개소의 동정
- [0230] TOCILIZUMAB의 약물동태를 향상시키는 방법 중 하나로서, 1분자의 TOCILIZUMAB이 복수 개의 IL-6 수용체를 반복해서 결합·중화시키도록 분자를 개량하는 방법이 생각되었다. TOCILIZUMAB은 막형 IL-6 수용체에 결합 후, 막형 IL-6 수용체에 결합한 채로 인터날리제이션(internalization)에 의해 세포 내의 엔도솜에 삽입되고, 그 후, TOCILIZUMAB은 막형 IL-6 수용체에 결합한 채로 리소솜으로 이행하는 동시에 리소솜에 의해 분해되는 것으로 생각되고 있다. 즉, 통상 1분자의 TOCILIZUMAB은 1분자 내지는 2분자의 막형 IL-6 수용체에(1가 내지는 2가로) 결합하고, 인터날라이즈 후, 리소솜으로 분해되는 것으로 생각되기 때문에, 1분자의 TOCILIZUMAB은 1분자 내지는 2분자의 막형 IL-6 수용체만 결합·중화할 수 있다.
- [0231] 이에, TOCILIZUMAB의 중성 조건하에서의 결합을 유지하면서 산성 조건하에서의 결합만을 크게 저하시키는 pH 의존적 결합 TOCILIZUMAB을 제작하는 것이 가능하다면, 도 7에 나타내는 바와 같이, pH 의존적 결합 TOCILIZUMAB은 엔도솜 내에서 항원인 막형 IL-6 수용체로부터 해리되어, 엔도솜 내에 존재하는 FcRn에 결합함으로써 혈장 중으로 돌아갈 수 있고, 혈장 중으로 돌아간 pH 의존적 결합 TOCILIZUMAB은 다시 막형 IL-6 수용체에 결합하는 것이 가능할 것으로 생각되었다. 이 혈장 중에서의 결합과 엔도솜 내에서의 해리를 반복함으로써, 1분자의 TOCILIZUMAB이 복수 분자의 IL-6 수용체를 반복해서 결합·중화할 수 있는 것으로 생각되고, 이것에 의해 TOCILIZUMAB과 비교하여 pH 의존적 결합 TOCILIZUMAB은 약물동태가 향상되는 것으로 생각되었다.
- [0232] 엔도솜 내의 산성 조건하에 있어서 TOCILIZUMAB이 IL-6 수용체로부터 해리되기 위해서는, 산성 조건하에 있어서의 결합이 중성 조건하와 비교하여 대폭 약해질 필요가 있다. 세포 표면에서는 IL-6 수용체에 강하게 결합하여 중화할 필요가 있기 때문에, 세포 표면의 pH인 pH 7.4에 있어서는 TOCILIZUMAB과 동등 이상으로 IL-6 수용체에 결합할 필요가 있다. 엔도솜 내의 pH는 일반적으로 pH 5.5~pH 6.0인 것이 보고되어 있는(Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Feb;5(2):121-32.) 것으로부터, pH 5.5~pH 6.0에 있어서 IL-6 수용체에 약하게 결합하도록 개량된 pH 의존적 결합 TOCILIZUMAB이면, 엔도솜 내의 산성 조건하에 있어서 IL-6 수용체로부터 해리될 것으로 생각된다. 즉, 세포 표면의 pH인 pH 7.4에 있어서는 IL-6 수용체에 강하게 결합하여, 엔도솜 내의 pH인 pH 5.5~pH 6.0에 있어서 IL-6 수용체에 약하게 결합하도록 개량된 pH 의존적 결합 TOCILIZUMAB이면, 1분자에서 복수 개의 IL-6 수용체에 결합·중화하여, 약물동태를 향상시키는 것이 가능할 것으로 생각되었다.
- [0233] TOCILIZUMAB의 IL-6 수용체로의 결합에 pH 의존성을 부여하기 위해서는, pKa가 6.0~6.5 부근에 존재하여, 중성 조건하(pH 7.4)와 산성 조건하(pH 5.5~pH 6.0) 사이에서 프로톤의 해리상태가 변화되는 히스티딘 잔기를 TOCILIZUMAB의 가변영역에 도입하는 방법이 생각되었다. 이에, TOCILIZUMAB의 입체 구조 모델로부터 추출된 가변영역의 히스티딘 도입개소의 스크리닝을 실시하였다. 또한, TOCILIZUMAB의 선택된 가변영역 서열이 히스티딘에 랜덤으로 치환되도록 설계된 라이브러리를 제작하여 스크리닝을 실시하였다. 스크리닝은 pH 7.4에 있어서 IL-6 수용체에 결합하고, pH 5.5 내지는 pH 5.8에서 IL-6 수용체로부터 해리되거나, 또는 친화성이 저하되는 것을 지표로 실시하였다.
- [0234] 그 결과, TOCILIZUMAB의 IL-6 수용체로의 결합에 pH 의존성(pH 7.4에서 결합하고, pH 5.8에서 해리되는 성질)을 부여할 수 있는 변이개소를 발견하고, 그들을 도 8에 정리하였다. 도 8의 H27의 티로신으로부터 히스티딘으로의

치환은 CDR이 아니라 H사슬 FR1의 변이이나, H27이 히스티딘인 서열은 Eur. J. Immunol. 1992. 22: 1719-1728에 기재되어 있는 바와 같이, 인간 서열(서열번호:65)로서 존재하기 때문에, 이하의 프레임워크를 사용함으로써 실시예 4와 함께 완전 인간화하는 것이 가능하다.

[0235] 인간화 H 사슬 FR1-8(서열번호:65)

[0236] 이들 변이를 조합한 pH 의존적 결합 TOCILIZUMAB의 예로서, H3pI/L73(H사슬 H3pI-IgG1/서열번호:66, L사슬 L73-kappa/서열번호:67)을 들 수 있다. H3pI/L73의 pH 7.4에 있어서의 가용형 IL-6 수용체로의 친화성, pH 7.4와 pH 5.8에 있어서의 막형 IL-6 수용체로부터의 해리속도, BaF/gp130에 의한 생물활성, 및 게잡이원숭이 및 인간 IL-6 수용체 형질전환 마우스에 있어서의 약물동태를 TOCILIZUMAB과 비교하였다(방법은 참고예 참조).

[0237] pH 7.4에 있어서의 가용형 IL-6 수용체로의 친화성을 측정한 결과를 표 4에 나타내었다. BaF/gp130에 의한 생물활성(IL-6 농도 30 ng/mL)을 측정한 결과를 도 9에 나타내었다. H3pI/L73은 TOCILIZUMAB과 비교하여 거의 동등한 pH 7.4에 있어서의 가용형 IL-6 수용체로의 친화성 및 BaF/gp130의 활성을 가지고 있는 것이 나타내어졌다.

표 4

	$k_a(1/MS)$	$k_d(1/s)$	KD(M)
TOCILIZUMAB	5.1E+05	1.0E-03	2.1E-09
H3pI/L73	5.4E+05	7.4E-04	1.4E-09

[0238]

[0239] TOCILIZUMAB 및 H3pI/L73의 pH 7.4와 pH 5.8에 있어서의 막형 IL-6 수용체로 해리속도를 측정한 결과를 표 5에 나타내었다. H3pI/L73은, pH 5.8에 있어서의 해리속도가 빨라져, TOCILIZUMAB과 비교하여 막형 IL-6 수용체로부터의 해리속도의 pH 의존성이 약 2.6배 향상되어 있는 것이 나타내어졌다.

표 5

	pH7.4 $k_d(1/s)$	pH5.8 $k_d(1/s)$	$k_{d(pH5.8)}/k_{d(pH7.4)}$ pH 의존성
TOCILIZUMAB	2.5E-04	2.5E-04	1.00
H3pI/L73	2.6E-04	6.7E-04	2.59

[0240]

[0241] TOCILIZUMAB 및 H3pI/L73을 게잡이원숭이에 1 mg/kg으로 정맥내에 단회 투여하고 혈장 중 농도추이를 평가하였다. TOCILIZUMAB 및 H3pI/L73의 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 도 10에 나타내었다. 그 결과, H3pI/L73은 TOCILIZUMAB과 비교하여 게잡이원숭이에 있어서 약물동태가 대폭 개선되었다.

[0242] TOCILIZUMAB 및 H3pI/L73을 인간 IL-6 수용체 형질전환 마우스(hIL-6R tg 마우스, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 23;92(11):4862-6)에 25 mg/kg으로 정맥내에 단회 투여하고 혈장 중 농도추이를 평가하였다. TOCILIZUMAB 및 H3pI/L73의 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 도 11에 나타내었다. 그 결과, H3pI/L73은 TOCILIZUMAB과 비교하여 인간 IL-6 수용체 형질전환 마우스에 있어서 약물동태가 대폭 개선되었다.

[0243] pH 의존적 결합 TOCILIZUMAB인 H3pI/L73은, 게잡이원숭이 및 인간 IL-6 수용체 형질전환 마우스에 있어서 TOCILIZUMAB과 비교하여 약물동태가 대폭 개선된 것으로부터, pH 7.4에서 항원에 결합하고, pH 5.8에서 항원으로부터 해리되는 성질을 부여함으로써, 1분자에서 복수의 IL-6 수용체에 결합·중화하는 것이 가능한 것으로 생각되었다. 또한, IL-6 수용체로의 결합에 H3pI/L73보다도 더욱 강한 pH 의존성을 부여함으로써 약물동태가 더욱 개선되는 것이 가능한 것으로 생각되었다.

[0244] [실시예 6] TOCILIZUMAB의 정상영역의 최적화

- [0245] TOCILIZUMAB의 H사슬 C 말단의 이질성의 저감
- [0246] IgG 항체의 H사슬 C 말단서열의 이질성으로서, C 말단 아미노산의 리신 잔기의 결손, 및 C 말단의 2 아미노산의 글리신, 리신 양쪽의 결손에 의한 C 말단 카르복실기의 아미드화가 보고되어 있다(Anal Biochem. 2007 Jan 1;360(1):75-83.). TOCILIZUMAB에 있어서도, 그 주성분은 염기서열 상 존재하는 C 말단 아미노산의 리신이 번역 후 수식에 의해 결손된 서열이나, 리신이 잔존되어 있는 부성분 및 글리신, 리신 양쪽의 결손에 의한 C 말단 카르복실기의 아미드화된 부성분도 이질성으로서 존재한다. 목적 물질/관련 물질의 이질성의 제조간 차를 유지하면서 의약품으로서 대량으로 제조하는 것은 용이하지 않아 비용 증대로 이어져, 가능한 단일 물질인 것이 요망되고, 항체를 의약품으로서 개발하는데 있어서는 이들 이질성이 저감되어 있는 것이 바람직하다. 따라서 의약품으로서 개발하는데 있어서는 H사슬 C 말단의 이질성은 존재하지 않는 것이 바람직하다.
- [0247] C 말단 아미노산의 이질성을 저감시키는 것을 목적으로 C 말단 아미노산의 개변을 행하였다. 그 결과, TOCILIZUMAB의 H사슬 정상영역의 C 말단의 리신 및 글리신을 염기서열 상 사전에 결손시킴으로써, C 말단에 유래하는 이질성을 회피하는 것이 가능한 것이 발견되었다. TOCILIZUMAB, C 말단의 리신 결손 TOCILIZUMAB(TOCILIZUMAB Δ K, H사슬 WT-IgG1 Δ K/서열번호:68, L사슬 WT-kappa/서열번호:54), 및 C 말단의 리신 및 글리신 결손 TOCILIZUMAB(TOCILIZUMAB Δ GK, H사슬 WT-IgG1 Δ GK/서열번호:69, L사슬 WT-kappa/서열번호:54)의 이질성의 평가를 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 실시하였다. 칼럼으로는 ProPacWCX-10, 4×250 mm (Dionex)를 사용하고, 이동상 A는 25 mmol/L MES/NaOH, pH 6.1, 이동상 B는 25 mmol/L MES/NaOH, 250 mmol/L NaCl, pH 6.1을 사용하여, 적절한 유량 및 그라디언트를 이용해서 실시하였다. 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 평가를 행한 결과를 도 12에 나타내었다. 그 결과, H사슬 정상영역의 C 말단의 리신 뿐 아니라, H사슬 정상영역의 C 말단의 리신 및 글리신의 양쪽을 염기서열 상 사전에 결손시킴으로써 비로소 C 말단 아미노산의 이질성을 저감 가능한 것이 발견되었다. 인간 항체 정상영역 IgG1, IgG2, IgG4에 있어서, C 말단서열은 모두 EU 넘버링(Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242를 참조) 447번째가 리신, 446번째가 글리신으로 되어 있는 것으로부터, 본 검토에서 발견된 C 말단 아미노산의 이질성을 저감시키는 방법은 IgG2 정상영역과 IgG4 정상영역, 또는 그들의 개변체에도 적용 가능한 것으로 생각되었다.
- [0248] TOCILIZUMAB의 IgG2 아이소타입의 디설피드 결합 유래의 이질성의 저감
- [0249] TOCILIZUMAB의 아이소타입은 IgG1이나, TOCILIZUMAB은 중화 항체인 것으로부터, 면역원성이나 부작용을 고려한 경우, Fc γ 수용체로의 결합은 바람직하지 않을 가능성이 생각된다. Fc γ 수용체로의 결합을 저하시키는 방법으로서, IgG 항체의 아이소타입을 IgG1에서 IgG2 또는 IgG4로 바꾸는 방법이 생각되고(Ann Hematol. 1998 Jun;76(6):231-48), Fc γ 수용체 I으로의 결합 및 약물동태의 관점에서는 IgG4보다는 IgG2가 바람직한 것으로 생각되었다(Nat Biotechnol. 2007 Dec;25(12):1369-72). 한편, 항체를 의약품으로서 개발하는데 있어서, 그 단백질의 물성, 그 중에서도 균일성과 안정성은 매우 중요하여, IgG2 아이소타입은 힌지영역의 디설피드 결합에 유래하는 이질성이 매우 많은 것이 보고되어 있다(J Biol Chem. 2008 Jun 6;283(23):16206-15.). 이것에 유래하는 목적 물질/관련 물질의 이질성의 제조간 차를 유지하면서 의약품으로서 대량으로 제조하는 것은 용이하지 않아 비용 증대로 이어져, 가능한 한 단일 물질인 것이 요망된다. 따라서 IgG2 아이소타입의 항체를 의약품으로서 개발하는데 있어서는 안정성을 저하시키지 않고 디설피드 결합 유래의 이질성이 저감되어 있는 것이 바람직하다.
- [0250] IgG2 아이소타입의 이질성을 저감시키는 것을 목적으로 각종 개변체를 검토한 결과, IgG2 정상영역 서열 중, H사슬의 CH1 도메인에 존재하는 EU 넘버링 131번째의 시스테인과 133번째의 아르기닌을 각각 세린과 리신으로 치환하고, 추가적으로 H사슬의 upper hinge에 존재하는 EU 넘버링 219번째의 시스테인을 세린으로 치환한 정상영역인 WT-SKSC(서열번호:70)에 의해, 안정성을 저하시키지 않고 이질성을 저감시킬 수 있는 것이 발견되었다. TOCILIZUMAB-IgG1(H사슬 WT-IgG1/서열번호:53, L사슬 WT-kappa/서열번호:54), TOCILIZUMAB-IgG2(H사슬 WT-IgG2/서열번호:71, L사슬 WT-kappa/서열번호:54), 및 TOCILIZUMAB-SKSC(H사슬 WT-SKSC/서열번호:70, L사슬 WT-kappa/서열번호:54)를 조제하고, 이질성 및 안정성의 평가를 행하였다. 이질성의 평가는 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 실시하였다. 칼럼으로서 ProPac WCX-10(Dionex)을 사용하고, 이동상 A로서 20 mM Sodium Acetate, pH 5.0, 이동상 B로서 20 mM Sodium Acetate, 1 M NaCl, pH 5.0을 사용하여, 적절한 유량 및 그라디언트를 이용해서 실시하였다. 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 평가를 행한 결과를 도 13에 나타내었다. 안정성의 평가는, 시차 주사형 열량 측정(DSC)(VP-DSC, Microcal사제)에 의한 열변성 중간온도(Tm값)의 평가에 의해 실시하였다. 20 mM sodium acetate, 150 mM NaCl, pH 6.0에 있어서의 DSC 측정결과와 Fab 도메인의 Tm값을 도 14에 나타내었다.

[0251] 그 결과, TOCILIZUMAB-IgG1과 비교하여 TOCILIZUMAB-IgG2는 현저히 이질성이 증대되나, TOCILIZUMAB-SKSC로 함으로써 이질성은 대폭 저감시킬 수 있는 것이 발견되었다. 또한, TOCILIZUMAB-IgG1과 비교하여 TOCILIZUMAB-IgG2는 DSC에 있어서의 Fab 도메인의 열변성 피크에 있어서 헤테로성분에 의한 것으로 생각되는 안정성이 낮은, 즉 Tm이 낮은 솔더 피크(Fab*)의 성분이 확인되나, TOCILIZUMAB-SKSC로 함으로써 헤테로성분에 의한 것으로 생각되는 Tm값이 낮은 솔더 피크는 소실되고, TOCILIZUMAB-IgG1 및 TOCILIZUMAB-IgG2의 Fab 도메인과 동등한 약 94°C의 Tm값을 나타낸 것으로부터, TOCILIZUMAB-SKSC는 높은 안정성을 가지고 있는 것이 발견되었다.

[0252] TOCILIZUMAB의 약물동태를 향상시키는 정상영역 변이개소의 동정

[0253] 전술한 바와 같이, TOCILIZUMAB의 아이소타입인 IgG1으로부터, C 말단의 이질성을 저감시키고, Fc γ 수용체로의 결합성을 저감시켜서, 높은 안정성을 유지한 채로 IgG2 아이소타입의 정상영역의 항체의 이질성을 저감시키는 것이 가능한 것이 발견되었으나, 약물동태에 관해서도 TOCILIZUMAB의 아이소타입인 IgG1보다도 우수한 정상영역인 것이 바람직하다.

[0254] IgG1 아이소타입의 정상영역의 항체보다도 우수한 혈장 중 반감기를 갖는 정상영역을 발견하기 위해, 높은 안정성을 갖고 IgG2 아이소타입의 정상영역의 항체에 관한 전술한 이질성이 저감된 TOCILIZUMAB-SKSC에 대해서, 약물동태를 향상시키는 것을 목적으로 변이개소를 스크리닝한 결과, WT-SKSC에 대해서, EU 넘버링 137번째의 글루타민산을 글리신으로 138번째의 세린을 글리신으로, 268번 히스티딘을 글루타민으로, 355번 아르기닌을 글루타민으로, 419번 글루타민을 글루타민산으로 치환하고, 이에 더하여 H사슬 C 말단의 이질성을 저감시키기 위해 446번째의 글리신 및 447번째의 리신을 결손시킨 WT-M58(서열번호:72(아미노산 서열))을 발견하였다. 또한, 한편으로 IgG1에 대해, 434번째의 아스파라긴을 알라닌으로 치환한 WT-M44(서열번호:73(아미노산 서열))를 제작하였다. 추가적으로 M44에 대해 H사슬 C 말단의 이질성을 저감시키기 위해 446번째의 글리신 및 447번째의 리신을 결손시킨 WT-M83(서열번호:74(아미노산 서열))을 제작하였다. 또한, WT-M58에 대해, 434번째의 아스파라긴을 알라닌으로 치환한 WT-M73(서열번호:75(아미노산 서열))을 제작하였다.

[0255] TOCILIZUMAB-M44(H사슬 WT-M44/서열번호:73, L사슬 WT-kappa/서열번호:54), TOCILIZUMAB-M58(H사슬 WT-M58/서열번호:72, L사슬 WT-kappa/서열번호:54) 및 TOCILIZUMAB-M73(H사슬 WT-M73/서열번호:75, L사슬 WT-kappa/서열번호:54)을 조제하고, 인간 FcRn으로의 친화성 및 인간 FcRn 형질전환 마우스에 의한 약물동태의 평가를 행하였다(방법은 참고에 참조).

[0256] TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73의 인간 FcRn으로의 결합성의 평가를 Biacore에 의해 행한 결과, 표 6에 나타내는 바와 같이, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73의 결합성은 TOCILIZUMAB-IgG1보다도 각각 약 2.7배, 약 1.4배 및 약 3.8배 정도 우수하였다.

표 6

	KD(μ M)
TOCILIZUMAB-IgG1	1.62
TOCILIZUMAB-M44	0.59
TOCILIZUMAB-M58	1.17
TOCILIZUMAB-M73	0.42

[0257]

[0258] TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73의 인간 FcRn 형질전환 마우스에 있어서의 약물동태의 평가를 행한 결과를 도 15에 나타내었다. 도 15에 나타내는 바와 같이, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73은 모두 TOCILIZUMAB-IgG1과 비교하여 약물동태가 향상되는 것이 발견되었다. 그 약물동태의 향상효과는 인간 FcRn으로의 결합능과 상관되었다. 그 중에서도 TOCILIZUMAB-M73에 관해서는, TOCILIZUMAB-IgG1과 비교하여 28일 후의 혈장 중 농도가 약 16배 개선되어 있던 것으로부터, 인간에 있어서도 M73의 정상영역을 갖는 항체는 IgG1의 정상영역을 갖는 항체와 비교하여 약물동태가 대폭 향상되는 것으로 생각되었다.

[0259] [실시에 7] PK/PD가 개선된 완전 인간화 IL-6 수용체 항체의 제작

[0260] 상기 실시예에서 발견된 TOCILIZUMAB의 가변영역 및 정상영역의 변이를 복수 조합한 TOCILIZUMAB 개변체를 제작하고, 각종 스크리닝을 실시한 결과, 완전 인간화 IL-6 수용체 항체로서, Fv3-M73(H사슬 VH4-M73/서열번호:25, L사슬 VL1-kappa/서열번호:28), Fv4-M73(H사슬 VH3-M73/서열번호:26, L사슬 VL3-kappa/서열번호:29), Fv5-M83(H사슬 VH5-M83/서열번호:27, L사슬 VL5-kappa/서열번호:30)을 발견하였다.

[0261] 제작한 Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83의 IL-6 수용체로의 친화성을 TOCILIZUMAB과 비교하였다(방법은 참고예 참조). 이들 항체의 pH 7.4에 있어서의 가용형 IL-6 수용체로의 친화성을 측정된 결과를 표 7에 나타내었다. 또한, BaF/gp130의 중화활성을 TOCILIZUMAB 및 대조(참고예의 공지 고친화성 고IL-6 수용체 항체, US 2007/0280945에 있어서의 VQ8F11-21 hIgG1)와 비교하였다(방법은 참고예 참조). 이들 항체의 BaF/gp130에 의한 생물활성을 측정된 결과를 도 16(IL-6 총농도 300 ng/mL:TOCILIZUMAB, 대조, Fv5-M83) 및 도 17(IL-6 총농도 30 ng/mL:TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73)에 나타내었다. 표 7에 나타내는 바와 같이, Fv3-M73, Fv4-M73은, TOCILIZUMAB과 비교하여 2~3배 정도 강한 친화성을 갖고, Fv5-M83은 TOCILIZUMAB과 비교하여 100배 정도 강한 친화성을 나타내었다(Fv5-M83에서는 친화성의 측정이 곤란하였기 때문에, 정상영역을 IgG1으로 한 Fv5-IgG1(H사슬 VH5-IgG1/서열번호:76, L사슬 VL5-kappa/서열번호:30)을 사용하여 친화성을 측정하였다. 정상영역은 일반적으로 친화성에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다). 또한, 도 17에 나타내는 바와 같이 Fv3-M73, Fv4-M73은, TOCILIZUMAB과 비교하여 다소 강한 활성을 나타내고, 도 16에 나타내는 바와 같이 Fv5-M83은 TOCILIZUMAB과 비교하여 50% 저해농도로서 100배 이상의 매우 강한 활성을 가지며, 또한 공지의 고친화성 고IL-6 수용체 항체인 대조와 비교해도 50% 저해농도로서 약 10배 정도 높은 중화활성을 나타내었다.

표 7

	$k_a(1/MS)$	$k_d(1/s)$	KD(M)
TOCILIZUMAB	4.0E+05	1.1E-03	2.7E-09
Fv3-M73	8.5E+05	8.7E-04	1.0E-09
Fv4-M73	7.5E+05	1.0E-03	1.4E-09
Fv5-M83	1.1E+06	2.8E-05	2.5E-11

[0262]

[0263] TOCILIZUMAB, Fv3-M73, 및 Fv4-M73의 pH 7.4와 pH 5.8에 있어서의 막형 IL-6 수용체로부터의 해리속도를 측정된 결과를 표 8에 나타내었다(방법은 참고예 참조). Fv3-M73 및 Fv4-M73은, TOCILIZUMAB과 비교하여 막형 IL-6 수용체로부터의 해리속도의 pH 의존성이 각각 11배 및 10배 향상되어 있는 것이 나타내어졌다. 실시예 5에 있어서의 H3pI/L73과 비교하여, 해리속도의 pH 의존성이 대폭 향상되어 있는 것으로부터, Fv3-M73과 Fv4-M73의 약물 동태는 H3pI/L73과 비교하여 대폭 향상되어 있는 것으로 생각되었다.

표 8

	pH7.4 $k_d(1/s)$	pH5.8 $k_d(1/s)$	$k_d(pH5.8) / k_d(pH7.4)$ pH 의존성
TOCILIZUMAB	2.5E-04	2.5E-04	1.00
Fv3-M73	4.9E-04	5.3E-03	10.88
Fv4-M73	5.1E-04	5.1E-03	10.06

[0264]

[0265] TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83의 등전점을 당업자 공지의 방법에 의해 등전점 전기영동에 의해 측정된 결과, TOCILIZUMAB의 등전점은 약 9.3, 대조는 약 8.4~8.5, Fv3-M73은 약 5.7~5.8, Fv4-M73은 약 5.6~5.7, Fv5-M83은 5.4~5.5로, 어느 항체도 TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여 등전점이 대폭 저하되었다. 또한, 가변영역 VH/VL의 이론 등전점을 GENETYX(GENETYX CORPORATION)에 의해 계산한 바, TOCILIZUMAB의 이론 등전점은 9.20, 대조는 7.79, Fv3-M73은 5.49, Fv4-M73은 5.01, Fv5-M83은 4.27로, 어느 항체도 TOCILIZUMAB

및 대조와 비교하여 등전점이 대폭 저하되었다. 실시예 2에 있어서 등전점의 저하에 의해 약물동태가 개선되는 것이 나타내어져 있는 것으로부터, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여 약물동태가 향상되어 있는 것으로 생각되었다.

[0266] TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83의 가변영역 서열에 존재하는 T-cell 에피토프를 TEPITOPE(Methods. 2004 Dec;34(4):468-75)를 사용하여 해석을 행하였다. 그 결과, 실시예 3에 나타난 바와 같이, TOCILIZUMAB은 대부분의 서열이 HLA에 결합하는 T-cell 에피토프가 존재할 것으로 예측되었으나, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 T-cell 에피토프에 결합할 것으로 예측된 서열이 대폭 감소되었다. 또한, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 프레일워크에 마우스 서열이 잔존하지 않고 완전 인간화되어 있다. 이들 사실로부터, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 TOCILIZUMAB과 비교하여 면역원성 리스크가 대폭 저감되어 있을 가능성이 시사되었다.

[0267] [실시예 8] 완전 인간화 IL-6 수용체 항체의 원숭이 PK/PD 시험

[0268] TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83을 게잡이원숭이에 1 mg/kg으로 정맥내 단회 투여하고 혈장 중 농도추이를 평가하였다(방법은 참고예 참조). TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83의 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 도 18에 나타내었다. 그 결과, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 모두 TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여 게잡이원숭이에 있어서 약물동태가 대폭 개선되었다. 그 중에서도, Fv3-M73과 Fv4-M73의 약물동태는 TOCILIZUMAB과 비교하여 대폭 개선되었다.

[0269] 게잡이원숭이 막형 IL-6 수용체가 어느 정도 중화되어 있는지의 약효를 평가하기 위해, 항체 투여 6일째부터 18 일째(TOCILIZUMAB에 관해서는 3일째부터 10일째)까지 게잡이원숭이 IL-6 5 µg/kg을 요배부(腰背部)에 연일 피하 투여하고, 24시간 후의 각 개체의 CRP 농도를 측정하였다(방법은 참고예 참조). 각 항체 투여시의 CRP 농도추이를 도 19에 나타내었다. 게잡이원숭이 가용형 IL-6 수용체가 어느 정도 중화되어 있는지의 약효를 평가하기 위해, 게잡이원숭이 혈장 중의 비결합형 게잡이원숭이 가용형 IL-6 수용체 농도를 측정하여, 비결합형 가용형 IL-6 수용체율을 계산하였다(방법은 참고예 참조). 각 항체 투여시의 비결합형 가용형 IL-6 수용체율의 추이를 도 20에 나타내었다.

[0270] Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 모두 TOCILIZUMAB 및 공지의 고친화성 항IL-6 수용체 항체인 대조와 비교하여 게잡이원숭이 막형 IL-6 수용체를 보다 지속적으로 중화하여, CRP의 증가를 장기간 억제하였다. 또한, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 모두 TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여 게잡이원숭이 가용형 IL-6 수용체를 보다 지속적으로 중화하여, 비결합형 게잡이원숭이 가용형 IL-6 수용체의 증가를 장기간 억제하였다. 이로부터 막형 IL-6 수용체 및 가용형 IL-6 수용체의 중화 지속성에 관해서는, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 모두 TOCILIZUMAB 및 대조보다도 우수한 것이 발견되었다. 그 중에서도 Fv3-M73과 Fv4-M73의 중화 지속성은 매우 우수하였다. 한편, Fv5-M83 쪽이 Fv3-M73과 Fv4-M73보다 CRP 및 비결합형 게잡이원숭이 가용형 IL-6 수용체를 낮게 억제하고 있는 것으로부터, Fv5-M83은 막형 IL-6 수용체 및 가용형 IL-6 수용체를 Fv3-M73과 Fv4-M73 및 공지의 고친화성 IL-6 수용체 항체인 대조보다도 강력하게 중화하고 있는 것으로 생각되었다. 이는 Fv5-M83이 대조보다도 IL-6 수용체로의 친화성이 강하며, 또한 BaF/gp130에 있어서의 생물활성이 강한 것이 게잡이원숭이의 인 비보(in vivo)에 있어서 반영된 결과라고 생각된다.

[0271] 이들 사실로부터, TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여, Fv3-M73과 Fv4-M73은 항IL-6 수용체 중화 항체로서 작용 지속성이 매우 우수하여, 투여빈도 및 투여량을 대폭 저감시키는 것이 가능하고, 또한, Fv5-M83은 항IL-6 수용체 중화 항체로서 작용 강도가 매우 우수하며, 또한, 작용 지속성도 우수한 것이 발견되었다. 따라서 Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 IL-6 안타고니스트로서의 의약품으로서 유용할 것으로 생각된다.

[0272] [실시예 9]

[0273] Monocyte chemoattractant protein(MCP)-1은 단구·T세포·NK세포·basophil의 세포 침윤에 관여하는 것이 알려져 있다. MCP-1은 RA 환자의 활막조직·활액 중에서 고발현하고 있는 것이 보고되어 있어(J Clin Invest. 1992 Sep;90(3):772-9), RA의 병태에 관여하고 있는 것으로 생각되고 있다(Inflamm Allergy Drug Targets. 2008 Mar;7(1):53-66.).

[0274] 또한, VEGF는 강력한 혈관신생인자로, RA 환자의 활막 중의 마크로파지·섬유아세포·활막세포 등으로부터 생산되는 것이 알려져 있다(J Rheumatol. 1995 Sep;22(9):1624-30.). 또한, RA 환자 혈청 중의 VEGF 레벨과 질환 활동성이나 radiographic progression이 상관하여(Arthritis Rheum. 2003 Jun;48(6):1521-9., Arthritis Rheum. 2001 Sep;44(9):2055-64.), RA 환자를 항IL-6R 항체 TOCILIZUMAB으로 치료함으로써, 혈청 중의 VEGF 레

벨이 저하되는 것으로부터, VEGF도 RA의 병태에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 생각되고 있다(Mod Rheumatol. 2009;19(1):12-9., Mediators Inflamm. 2008;2008:129873).

- [0275] 이에, TOCILIZUMAB 및 Fv4-M73은 sIL-6R 및 IL-6 자극에 의한 인간 RA 환자 유래 활막세포로부터의 MCP-1 및 VEGF 생산을 억제할 수 있는지 여부를 이하의 방법으로 검토하였다.
- [0276] 인간 RA 환자 유래 활막세포(TOYOBO)를 5% FCS 함유 IMDM 배지에서 96웰 플레이트에 $2 \times 10^4 / 0.05 \text{ mL/well}$ 로 파종하고, CO₂ 인큐베이터(37°C, 5% CO₂) 중에서 90분 정치하였다. 적절히 희석한 농도의 TOCILIZUMAB 및 Fv4-M73을 0.05 mL 첨가하고, 15분 정치 후에 가용형 IL-6 수용체(SR344:참고예의 방법에 따라 조제)를 0.05 mL 첨가하여 추가적으로 30분 정치하고, 추가적으로 IL-6(TORAY)를 0.05 mL 첨가하였다(가용형 IL-6 수용체 및 IL-6의 농도는 각 50 ng/mL). 2일 배양 후, 배양상청을 회수하고, 배양상청 중의 MCP-1 및 VEGF 농도를 ELISA kit(Biosource 및 Pierce Biotechnology)를 사용해서 측정하였다. 결과를 도 21과 도 22에 나타낸다. TOCILIZUMAB 및 Fv4-M73은, 가용형 IL-6 수용체 및 IL-6 자극에 의한 인간 RA 환자 유래 활막세포로부터의 MCP-1 및 VEGF 생산을 농도 의존적으로 억제하였다.
- [0277] 이들 사실로부터, Fv4-M73은 항IL-6 수용체 중화 항체로서 작용(IL-6 수용체에 결합하여 막형 IL-6 수용체 및 가용형 IL-6 수용체의 시그널을 차단)의 지속성이 TOCILIZUMAB과 비교하여 매우 우수하여, TOCILIZUMAB과 비교하여 투여빈도 및 투여량을 대폭 저감시키는 것이 가능하고, 또한 Fv4-M73은 인간 RA 환자 유래 활막세포로부터의 MCP-1 및 VEGF 생산을 억제하는 것으로부터, Fv4-M73은 RA에 매우 유용한 치료제인 것이 나타내어졌다.
- [0278] [참고예]
- [0279] 제조합 가용형 인간 IL-6 수용체의 조제
- [0280] 항원인 인간 IL-6 수용체의 제조합 가용형 인간 IL-6 수용체는 이하와 같이 조제하였다. J.Biochem. 108, 673-676 (1990)에서 보고되어 있는 N 말단측 1번째에서 344번째의 아미노산 서열로 되는 가용형 인간 IL-6 수용체(Yamasaki 등, Science 1988; 241: 825-828 (GenBank # X12830))의 CHO세포 정상(定常) 발현주를 제작하였다. SR344 발현 CHO세포로부터 얻어진 배양상청으로부터, Blue Sepharose 6 FF 칼럼 크로마토그래피, SR344에 대한 특이 항체를 고정한 칼럼에 의한 친화성 크로마토그래피, 겔 여과 칼럼 크로마토그래피의 3개의 칼럼 크로마토그래피에 의해, 가용형 인간 IL-6 수용체를 정제하였다. 메인 피크로서 용출된 분획을 최종 정제품으로 하였다.
- [0281] 제조합 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체(cIL-6R)의 조제
- [0282] 공개되어 있는 붉은털 원숭이(Rhesus monkey) IL-6 수용체 유전자서열(Birney et al, Ensembl 2006, Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34(Database issue):D556-61.)을 토대로 올리고 DNA 프라이머를 제작하고, 게잡이원숭이 채장으로부터 조제된 cDNA를 주형으로 하여, 프라이머를 사용해, PCR법에 의해 게잡이원숭이 IL-6 수용체 유전자 전장을 코딩하는 DNA 단편을 조제하였다. 얻어진 DNA 단편을 포유동물세포 발현 벡터로 삽입하고, 이를 사용하여 CHO 정상 발현주(cyno. sIL-6R 생산 CHO세포)를 제작하였다. cyno. sIL-6R 생산 CHO세포의 배양액을 HisTrap 칼럼(GE 헬스케어 바이오사이언스)으로 정제 후, Amicon Ultra-15 Ultracel-10k(Millipore)를 사용하여 농축하고, Superdex200pg16/60 겔 여과 칼럼(GE 헬스케어 바이오사이언스)으로 추가적으로 정제를 행하여, 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체(이하, cIL-6R)의 최종 정제품으로 하였다.
- [0283] 제조합 게잡이원숭이 IL-6(cIL-6)의 조제
- [0284] 게잡이원숭이 IL-6는 이하와 같이 조제하였다. SWISSPROT Accession No.P79341에 등록되어 있는 212 아미노산을 코딩하는 염기서열을 제작하고, 포유동물세포 발현 벡터로 클로닝하여, CHO세포에 도입함으로써 정상 발현 세포주를 제작하였다(cyno. IL-6 생산 CHO세포). cyno. IL-6 생산 CHO세포의 배양액을 SP-Sepharose/FF 칼럼(GE 헬스케어 바이오사이언스)으로 정제 후, Amicon Ultra-15 Ultracel-5k(Millipore)를 사용하여 농축하고, Superdex75pg26/60 겔 여과 칼럼(GE 헬스케어 바이오사이언스)으로 추가적으로 정제를 행하여, Amicon Ultra-15 Ultracel-5k(Millipore)를 사용해서 농축하여, 게잡이원숭이 IL-6(이하, cIL-6)의 최종 정제품으로 하였다.
- [0285] 공지 고친화성 항IL-6 수용체 항체의 제작
- [0286] 공지의 고친화성 항IL-6 수용체 항체로서, US 2007/0280945 A1에 기재되어 있는 고친화성 항IL-6 수용체 항체인 VQ8F11-21 hIgG1(US 2007/0280945 A1, H사슬 아미노산 서열:서열번호:77, L사슬 아미노산 서열:서열번호:78)을 발현시키기 위해, 포유동물세포 발현용 벡터를 구축하였다. 항체 가변영역에 대해서는, 합성 올리고 DNA를 조합한 PCR법(assembly PCR)에 의해 제작하고, 정상영역에 대해서는 IgG1을 사용하였다. Assembly PCR법에 의해 항

체 가변영역과 정상영역을 결합시키고, 포유동물 발현용 벡터로 삽입하여, 목적의 H사슬 발현 벡터 및 L사슬 발현 벡터를 제작하였다. 얻어진 발현 벡터의 염기서열은 당업자 공지 방법으로 결정하였다. 제작한 발현 벡터를 사용하여, 발현·정제를 행하였다. 발현·정제는 실시예 1에 기재한 방법으로 행하여, 고친화성 항IL-6 수용체 항체(이후, 대조로 기재한다)를 얻었다.

[0287] TOCILIZUMAB의 변이체의 제작·발현·정제

[0288] TOCILIZUMAB의 변이체는 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)를 사용하여, 첨부하는 설명서에 기재된 방법으로 변이체를 제작하고, 얻어진 플라스미드 단편을 포유동물세포 발현 벡터에 삽입하여, 목적의 H사슬 발현 벡터 및 L사슬 발현 벡터를 제작하였다. 얻어진 발현 벡터의 염기서열은 당업자 공지 방법으로 결정하였다. 항체의 발현은 이하의 방법을 사용해서 행하였다. 인간 태아 신장암 세포 유래 HEK293H주(Invitrogen)를 10% Fetal Bovine Serum(Invitrogen)을 포함하는 DMEM 배지(Invitrogen)로 현탁하고, $5\sim6 \times 10^5$ 개/mL의 세포밀도로 접착세포용 디쉬(직경 10 cm, CORNING)의 각 디쉬로 10 mL씩 파종하고 CO₂ 인큐베이터(37°C, 5% CO₂) 내에서 하루 배양한 후에, 배지를 흡인 제거하고, CHO-S-SFM-II(Invitrogen) 배지 6.9 mL를 첨가하였다. 조제한 플라스미드를 lipofection법에 의해 세포로 도입하였다. 얻어진 배양상청을 회수한 후, 원심분리(약 2000 g, 5분간, 실온)하여 세포를 제거하고, 추가적으로 0.22 μm 필터 MILLEX(R)-GV(Millipore)를 통과시켜 멸균하여 배양상청을 얻었다. 얻어진 배양상청으로부터 rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)를 사용하여 당업자 공지 방법으로 항체를 정제하였다. 정제항체농도는, 분광광도계를 사용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 얻어진 값으로부터 PACE법에 의해 산출된 흡광계수를 사용하여 항체농도를 산출하였다(Protein Science 1995 ; 4 : 2411-2423).

[0289] 인간 gp130 발현 BaF3 세포주의 수립

[0290] IL-6 의존 증식성을 나타내는 세포주를 얻기 위해, 이하에 나타내는 바와 같이, 인간 gp130을 발현한 BaF3 세포주의 수립을 행하였다.

[0291] 전장 인간 gp130 cDNA(Hibi 등, Cell 1990 ; 63 : 1149-1157(GenBank # NM_002184))를 PCR에 의해 증폭하여, pCHOI(Hirata 등, FEBS Letter 1994 ; 356 : 244-248)의 DHFR 유전자 발현부위를 제거하고, Zeocin 내성 유전자 발현부위를 삽입한 발현 벡터 pCOS2Zeo로 클로닝하여, pCOS2Zeo/gp130을 구축하였다. 전장 인간 IL-6R cDNA를 PCR에 의해 증폭하고, pcDNA3.1(+)(Invitrogen)로 클로닝하여, hIL-6R/pcDNA3.1(+)를 구축하였다.

[0292] 10 μg의 pCOS2Zeo/gp130을 PBS에 현탁한 BaF3세포(0.8×10^7 cells)에 혼합하고, Gene Pulser(Bio-Rad)를 사용하여 0.33 kV, 950 μFD의 용량으로 펄스를 가하였다. 전기천공처리에 의해 유전자 도입한 BaF3세포를 0.2 ng/mL의 mouse interleukin-3(Peprotech), 10% Fetal Bovine Serum(이하 FBS, HyClone)을 포함하는 RPMI1640 배지(Invitrogen)에서 하루 배양하고, 100 ng/mL의 human interleukin-6(R&D systems), 100 ng/mL의 human interleukin-6 soluble receptor(R&D systems) 및 10% FBS를 포함하는 RPMI1640배지를 가하여 선발하고, 인간 gp130 발현 BaF3세포주(이하, BaF3/gp130)를 수립하였다. 이 BaF/gp130은, human interleukin-6(R&D systems) 및 가용형 인간 IL-6 수용체 존재하에서 증식되는 것으로부터, 항IL-6 수용체 항체의 증식 저해활성(즉 IL-6 수용체 중화활성)의 평가에 사용하는 것이 가능하다.

[0293] 인간 gp130 발현 BaF3세포(BaF/gp130)에 의한 생물활성 평가

[0294] IL-6/IL-6 수용체 의존성 증식을 나타내는 BaF3/gp130을 사용하여 IL-6 수용체 중화활성을 평가하였다. BaF3/gp130을 10% FBS를 포함하는 RPMI1640배지에서 3회 세정한 후에, 5×10^4 cells/mL가 되도록 600 ng/mL 내지는 60 ng/mL의 human interleukin-6(TORAY)(중농도는 300 ng/mL 내지는 30 ng/mL), 적당량의 가용형 인간 IL-6 수용체 및 10% FBS를 포함하는 RPMI1640배지에 현탁하고, 96웰 플레이트(CORNING)의 각 웰에 50 μL씩 분주하였다. 다음으로, 정제한 항체를 10% FBS를 포함하는 RPMI1640에 희석하고, 각 웰에 50 μL씩 혼합하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건하에서, 3일간 배양하고, PBS로 2배로 희석한 WST-8 시약(Cell Counting Kit-8, 주식회사 도진 화학연구소)을 20 μL/well로 첨가하고, 직후에 SUNRISE CLASSIC(TECAN)을 사용하여 450 nm의 흡광도(참조 파장 620 nm)를 측정하였다. 2시간 배양한 후에, 재차 450 nm의 흡광도(참조파장 620 nm)를 측정하여, 2시간의 흡광도 변화를 지표로 IL-6 수용체 중화활성을 평가하였다.

[0295] Biacore에 의한 가용형 인간 IL-6 수용체로의 결합 평가

- [0296] Biacore T100(GE Healthcare)을 사용하여, 항원 항체반응의 속도론적 해석을 행하였다. 센서 칩 상에 아민 커플링법으로 protein A 또는 protein A/G 또는 anti-IgG(γ -chain specific)F(ab')₂를 적당량 고정화하여, 다음으로 pH 7.4에 있어서 목적의 항체를 결합시키고, 추가적으로 pH 7.4에 있어서 각종 농도로 조제한 가용형 IL-6 수용체를 분석물(analyte)로서 흘려, 항체와 가용형 인간 IL-6 수용체의 상호작용을 측정하였다. 측정은 모두 37℃에서 실시하였다. 측정으로 얻어진 센서그램으로부터, 키네틱 파라미터(kinetic parameter)인 결합속도상수 K_a(1/Ms), 및 해리속도상수 K_d(1/s)를 산출하여, 그 값을 토대로 K_D(M)를 산출하였다. 각 파라미터의 산출에는 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)를 사용하였다.
- [0297] Biacore에 의한 막형 IL-6 수용체로의 pH 의존적 해리 평가
- [0298] Biacore T100(GE Healthcare)을 사용하여 pH 5.8, pH 7.4에 있어서의 막형 IL-6 수용체로의 항원 항체반응을 관측하였다. 센서 칩 상에 고정화한 가용형 인간 IL-6 수용체로의 결합을 평가함으로써, 막형 IL-6 수용체로의 결합을 평가하였다. SR344를 당업자 공지방법에 따라 비오틴화하고, 스트렙토아비딘과 비오틴의 친화성을 이용하여, 스트렙토아비딘을 매개로 비오틴화 가용형 인간 IL-6 수용체를 센서 칩 상에 고정화하였다. 측정은 모두 37℃에서 실시하고, 이동상의 버퍼는 10 mM MES pH 5.8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20으로 하여, 거기에 pH 의존적 결합 클론을 pH 7.4의 조건하에서 주입하여 가용형 인간 IL-6 수용체와 결합시킨 후(주입 샘플의 버퍼는 10 mM MES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20), 이동상의 pH인 5.8에서 각 클론의 pH 의존적인 해리를 관측하였다. 샘플 농도를 0.25 μ g/mL로 하여, 10 mM MES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20으로 결합시키고, 10 mM MES pH 5.8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20으로 해리시켰을 때의 pH 5.8에 있어서의 해리상만 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)를 사용하여 피팅함으로써, pH 5.8에 있어서의 해리속도상수(K_d(1/s))를 산출하였다. 마찬가지로 또한, 샘플 농도를 0.5 μ g/mL로 하여, 10 mM MES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20으로 결합시키고, 10 mM MES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20으로 해리시켰을 때의 pH 7.4에 있어서의 해리상만 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)를 사용하여 피팅함으로써, pH 7.4에 있어서의 해리속도상수(K_d(1/s))를 산출하였다.
- [0299] 인간 FcRn으로의 결합 평가
- [0300] FcRn은 FcRn과 β 2-microglobulin의 복합체이다. 공개되어 있는 인간 FcRn 유전자서열(J. Exp. Med. 180 (6), 2377-2381 (1994))을 토대로, 올리고 DNA 프라이머를 제작하였다. 인간 cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech)를 주형으로 하고, 제작한 프라이머를 사용하여 PCR법에 의해 유전자 전장을 코딩하는 DNA 단편을 조제하였다. 얻어진 DNA 단편을 주형으로, PCR법에 의해 시그널영역을 포함하는 세포외영역(Met1-Leu290)을 코딩하는 DNA 단편을 증폭하고, 포유동물세포 발현 벡터로 삽입하였다(인간 FcRn 아미노산서열/서열번호:79). 마찬가지로, 공개되어 있는 인간 β 2-microglobulin 유전자서열(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002))을 토대로, 올리고 DNA 프라이머를 제작하였다. 인간 cDNA(Hu-Placenta Marathon-Ready cDNA, CLONTECH)를 주형으로 하고, 제작한 프라이머를 사용하여 PCR법에 의해 유전자 전장을 코딩하는 DNA 단편을 조제하였다. 얻어진 DNA 단편을 주형으로, PCR법에 의해 시그널영역을 포함하는 β 2-microglobulin 전장(Met1-Met119)을 코딩하는 DNA 단편을 증폭하고, 포유동물세포 발현 벡터로 삽입하였다(인간 β 2-microglobulin 아미노산 서열/서열번호:80).
- [0301] 가용형 인간 FcRn의 발현은 이하의 순서로 행하였다. 조제한 인간 FcRn 및 인간 β 2-microglobulin의 플라스미드를, 10% Fetal Bovine Serum(Invitrogen)을 사용한 lipofection법에 의해, 인간 태아 신장암 세포 유래 HEK293H주(Invitrogen)의 세포로 도입하였다. 얻어진 배양상청을 회수한 후, IgG Sepharose 6 Fast Flow(Amersham Bioscience)를 사용하여, (J Immunol. 2002 Nov 1;169(9):5171-80.)의 방법에 따라 정제를 행하였다. 그 후, HiTrap Q HP(GE Healthcare)에 의해 정제를 행하였다.
- [0302] 마우스에 있어서의 항체 혈장 중 농도의 측정
- [0303] 마우스 혈장 중 항체농도 측정은 ELISA법으로 당업자 공지방법으로 측정하였다.
- [0304] 원숭이 PK/PD 시험에 의한 항체 혈장 중 농도, CRP 농도, 비결합형 가용형 IL-6 수용체의 측정
- [0305] 계잡이원숭이 혈장 중 농도측정은 ELISA법으로 당업자 공지방법으로 측정하였다.
- [0306] CRP 농도는 사이어스 R CRP(간토 화학 주식회사)로, 자동분석장치(TBA-120FR, 도시바 메디컬시스템즈 주식회사)를 사용하여 측정하였다.

[0307] 게잡이원숭이 혈장 중의 비결합형 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체 농도를 이하와 같이 측정하였다. 게잡이원숭이의 혈장 30 μ L를 0.22 μ m의 필터컵(Millipore)에 있어서 건조시킨 적량의 rProtein A Sepharose Fast Flow(GE Healthcare) 수지에 첨가함으로써 혈장 중에 존재하는 모든 IgG형 항체(게잡이원숭이 IgG, 항인간 IL-6 수용체 항체 및 항인간 IL-6 수용체 항체-가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체 복합체)를 Protein A에 흡착시켰다. 그 후, 고속원심기로 스피ندا운하고, 패스용액을 회수하였다. 패스용액에는 protein A에 결합한 항인간 IL-6 수용체 항체-가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체 복합체는 포함되지 않기 때문에, protein A 패스용액 중의 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체 농도를 측정함으로써, 비결합형 가용형 IL-6 수용체 농도를 측정 가능하다. 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체 농도는, 상기에서 제작한 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체(cIL-6R)를 스탠다드로 사용하여, 인간 IL-6 수용체 농도를 측정하는 당업자 공지의 방법으로 측정하였다. 비결합형 가용형 IL-6 수용체 율은 이하의 계산식에 의해 계산하였다.

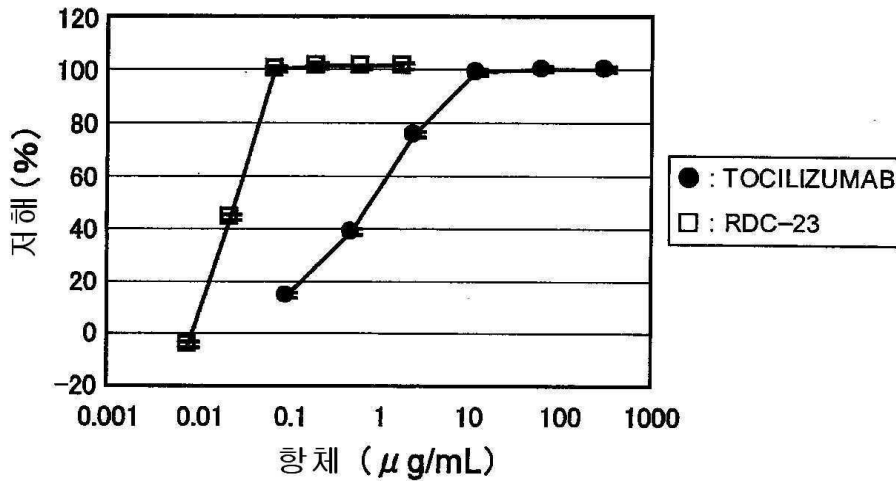
[0308] (항체 투여 후의 비결합형 가용형 IL-6 수용체 농도 \div 항체 투여전의 가용성 IL-6 수용체 농도) \times 100

도면

도면1

CDR 분류	TOCILIZUMAB CDR 서열	변이개소 (Kabat No)	TOCILIZUMAB 의 아미노산	변이후의 아미노산	변이후 CDR 서열
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS	50	Y	F	FISYSGITTYNPSLKS (서열번호:82)
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS (서열번호:81)	58	T	N	YISYSGITNYNPSLKS (서열번호:83)
HCDR3	SLARTTAMDY	95	S	L	LLARTTAMDY (서열번호:85)
HCDR3	SLARTTAMDY (서열번호:84)	99	T	A	SLARATAMDY (서열번호:86)
LCDR1	RASQDISSYLN	27	Q	T	RASTDISSYLN (서열번호:88)
LCDR1	RASQDISSYLN (서열번호:87)	27	Q	R	RASRDISSYLN (서열번호:89)
LCDR3	QQGNTLPYT	89	Q	G	QQGNTLPYT (서열번호:91)
LCDR3	QQGNTLPYT (서열번호:90)	93	T	R	QQGNRLPYT (서열번호:92)

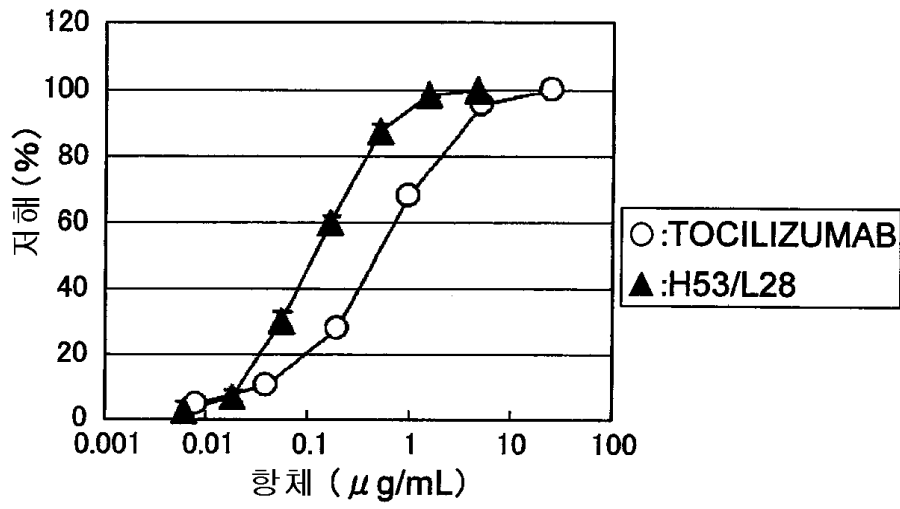
도면2



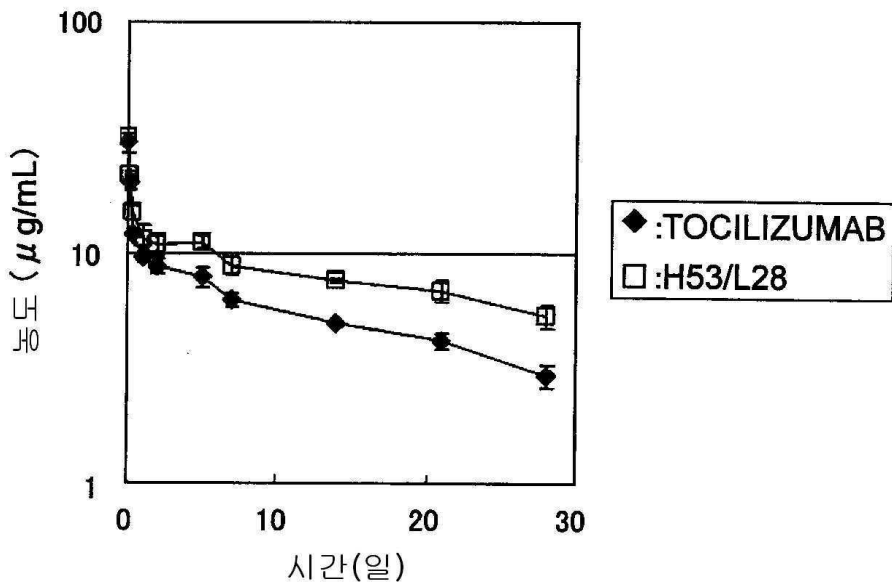
도면3

분류	TOCILIZUMAB 서열	변이개소 (Kabat No)	TOCILIZUMAB 변이후의 의아미노산	변이후의 아미노산	변이후 서열
HFR1	QVQLQESGPGGLVLRPSQTL ₁₃ SLTC TVSGYSIT (서열번호:93)	13	R	K	QVQLQESGPGGLVLRPSQTL ₁₃ SLTC AVSGYSIS (서열번호:94)
		16	Q	E	
		23*	T	A	
		30*	T	S	
HCDR1	SDHAWS (서열번호:95)	31	S	D	DDHAWS (서열번호:96)
HFR2	WVRQPPGEGLEWIG (서열번호:97)	43	R	E	WVRQPPGEGLEWIG (서열번호:98)
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS (서열번호:81)	64	K	Q	YISYSGITTYNPSLQD (서열번호:99)
		65	S	D	
HFR4	WGQGS ₁₀₅ LVTVSS (서열번호:100)	105	Q	E	WGEGTLVTVSS (서열번호:101)
		107*	S	T	
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGD ₁₈ RVTTTC (서열번호:102)	18	R	S	DIQMTQSPSSLSASVGD ₁₈ SVTTTC (서열번호:103)
LCDR1	RASQDISSYLN (서열번호:87)	24	R	Q	QASQDISSYLN (서열번호:104)
LFR2	WYQQKPKGKAP ₄₅ KLLIY (서열번호:105)	45	K	E	WYQQKPKGKAP ₄₅ PELLIY (서열번호:106)
LCDR2	Y ₅₃ TRLHS (서열번호:107)	53	R	E	Y ₅₃ TSELES (서열번호:108)
		55	H	E	
		55	H	L	
LFR3	GVPSRFGSGSGGTDFTFTI ₈₀ SSLQPE DAITYC (서열번호:110)	80	Q	E	GVPSRFGSGSGGTDFTFTI ₈₀ SSLEAE DAITYC (서열번호:111)
		81*	P	A	
		83*	I	A	
LFR4	FGQGTKVEIK (서열번호:112)	107	K	E	FGQGTKVEIE (서열번호:113)

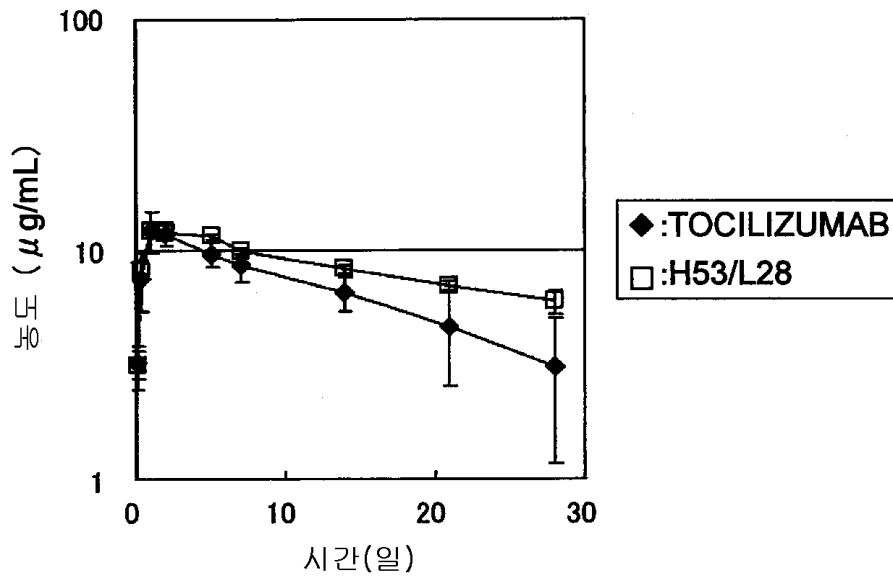
도면4



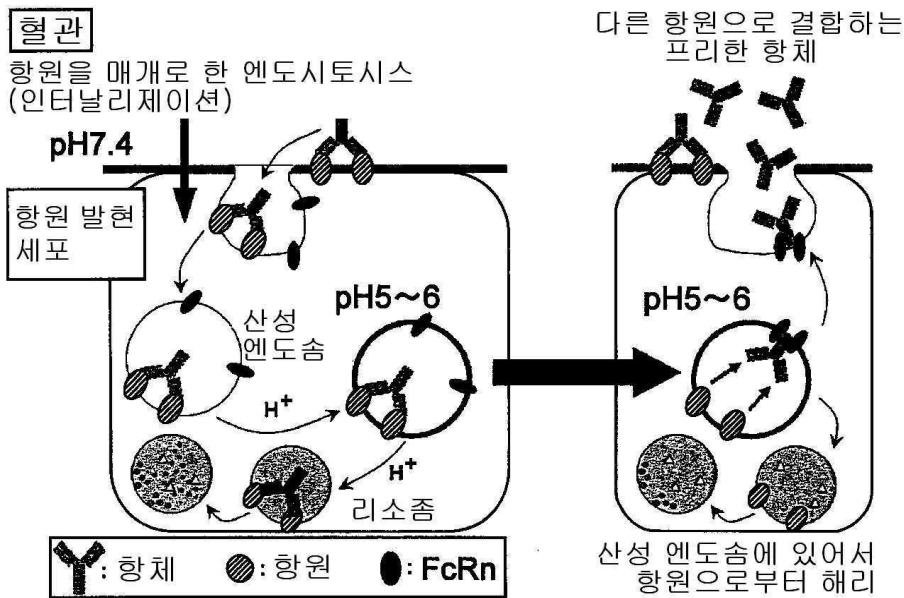
도면5



도면6



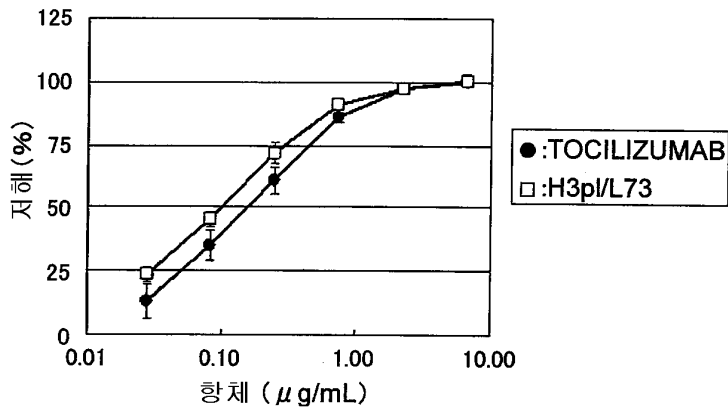
도면7



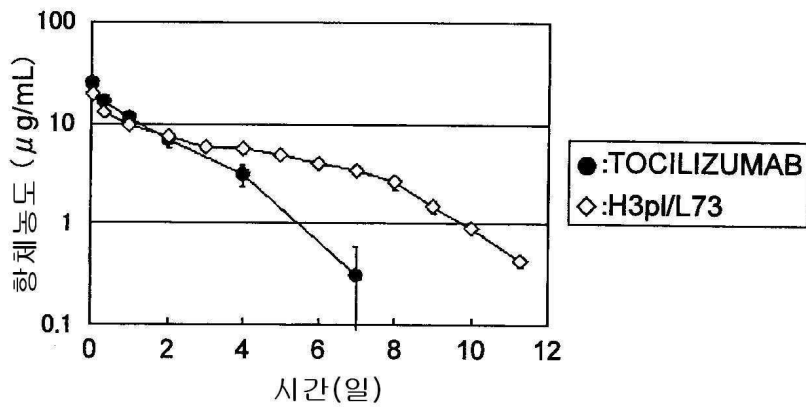
도면8

분류	TOCILIZUMAB 서열	변이개소 (Kabat No.)	TOCILIZUMAB 변이 후의 의미도산아미노산	변이 후의 의미도산아미노산	변이 후 서열
HFR1	QVQLQESGPGGLVRPSQTL LTCTVSGYSIT (서열번호:93)	27	Y	H	QVQLQESGPGGLVRPSQTL LTCTVSGHSIT (서열번호:114)
HCDR1	SDHAW (서열번호:95)	31	S	H	HDHAW (서열번호:115)
LCDR1	RASQDISSYL (서열번호:87)	32	Y	H	RASQDISSHL (서열번호:116)
LCDR2	YTSRLHS (서열번호:107)	53	R	H	YTSHLHS (서열번호:117)

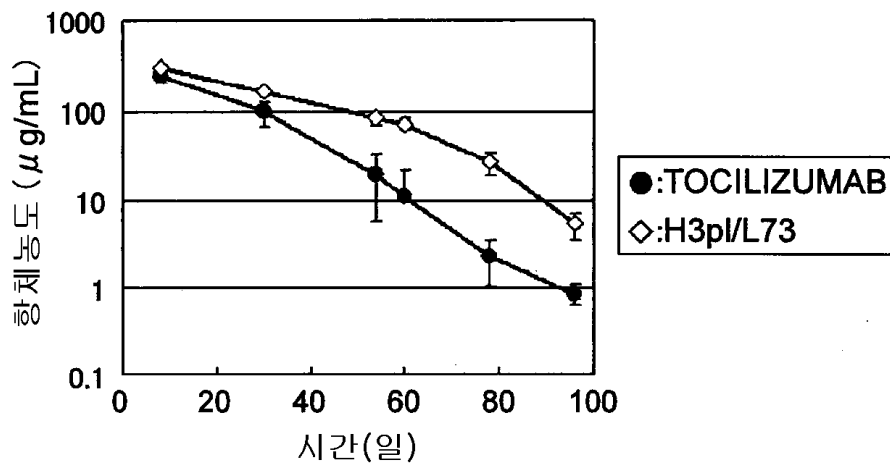
도면9



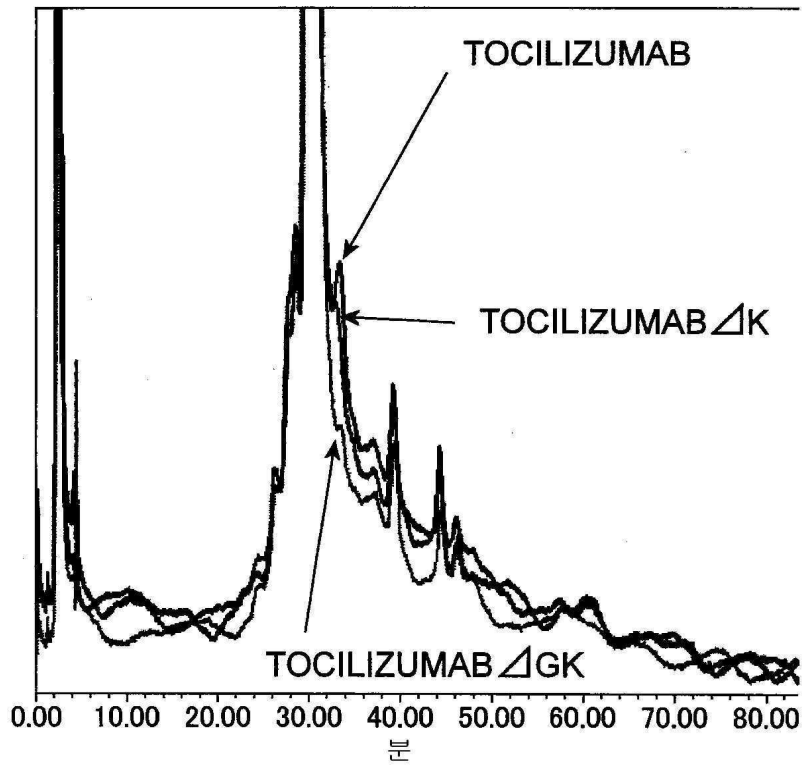
도면10



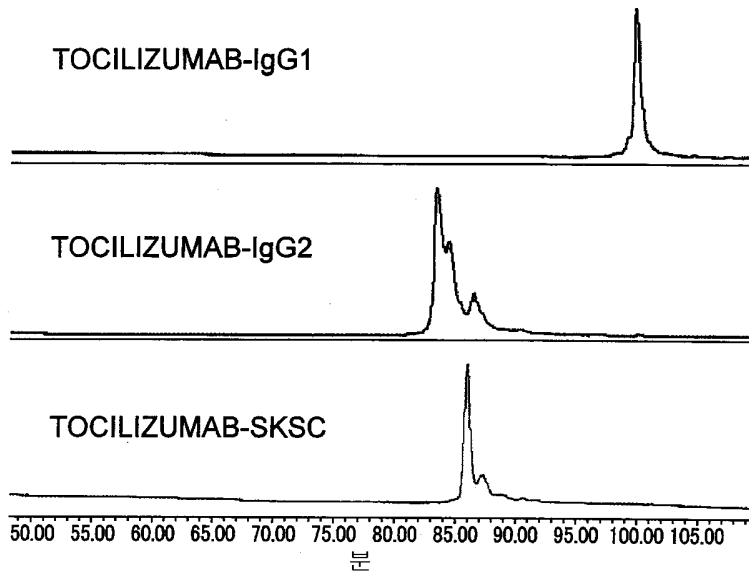
도면11



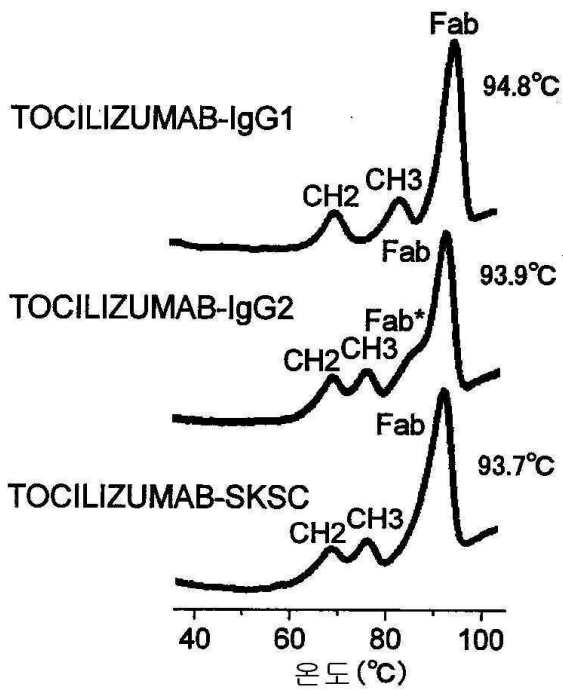
도면12



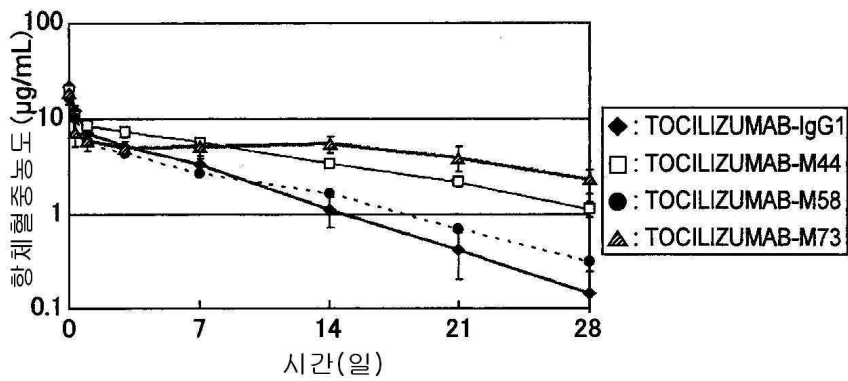
도면13



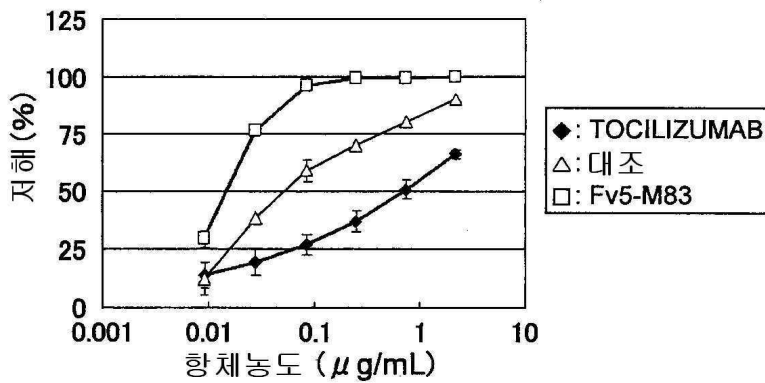
도면14



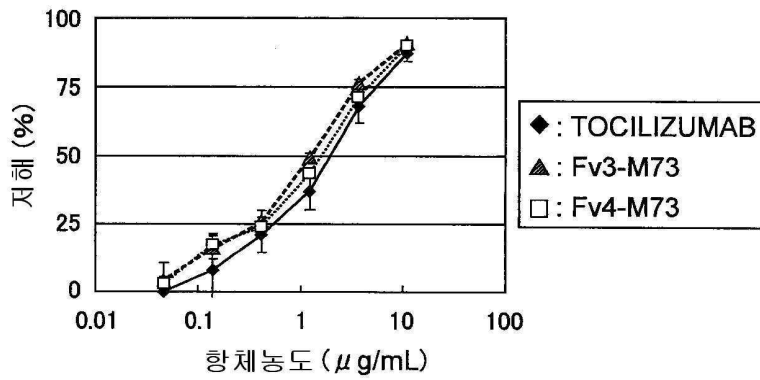
도면15



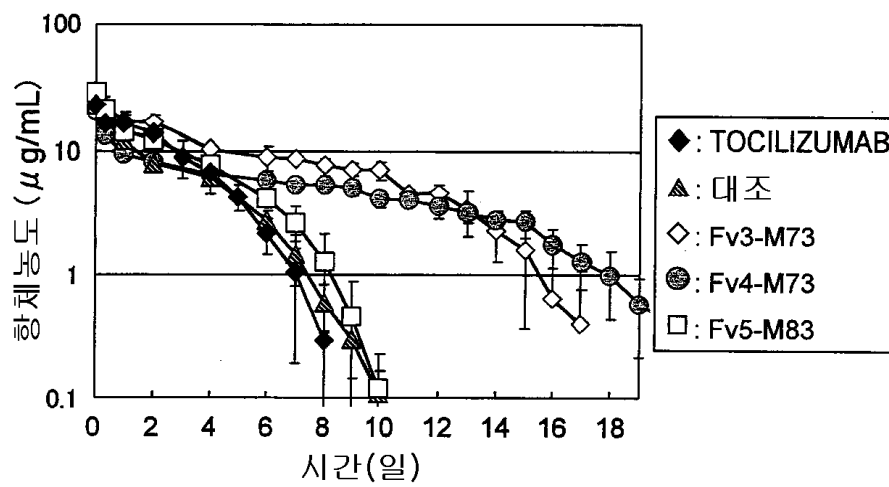
도면16



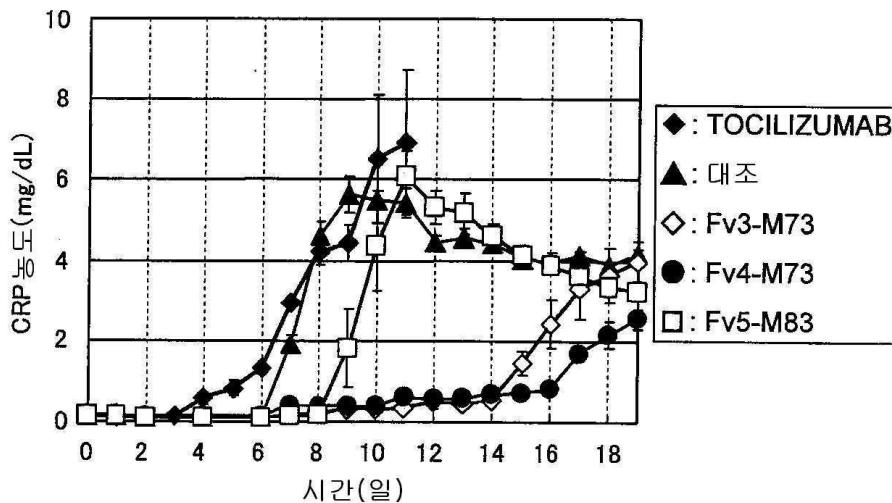
도면17



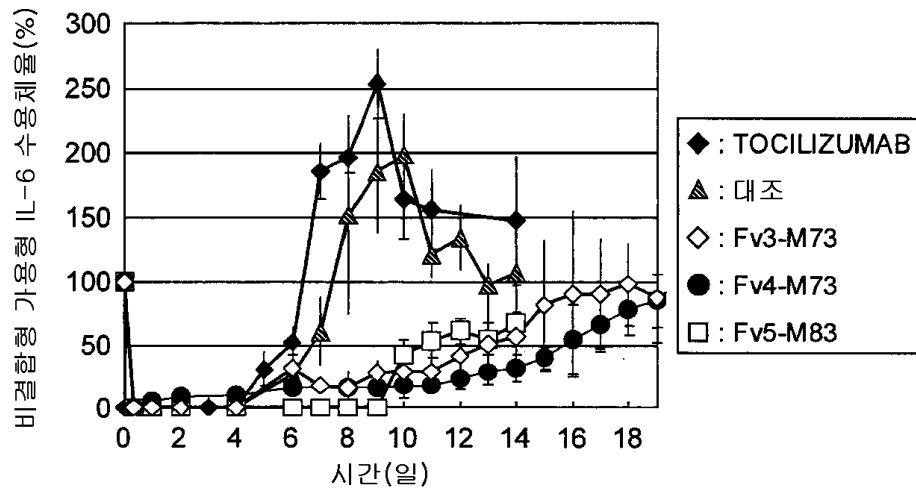
도면18



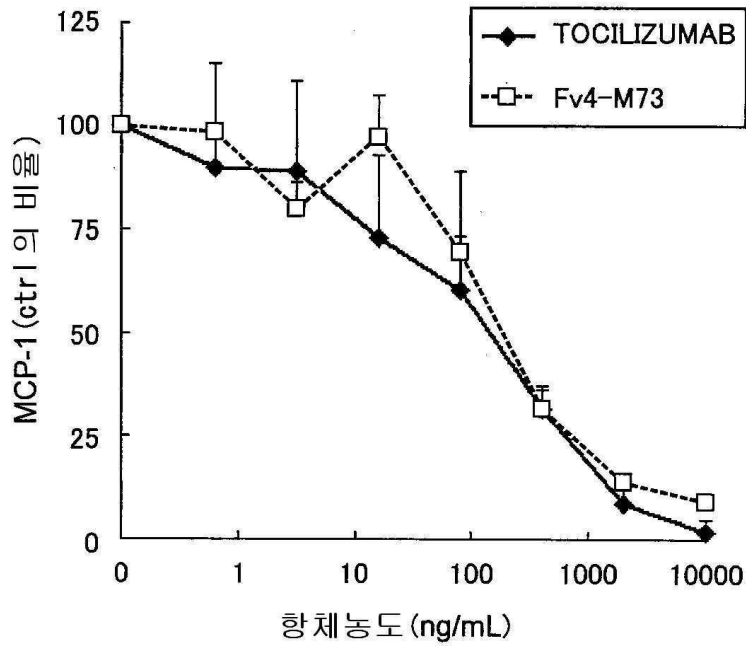
도면19



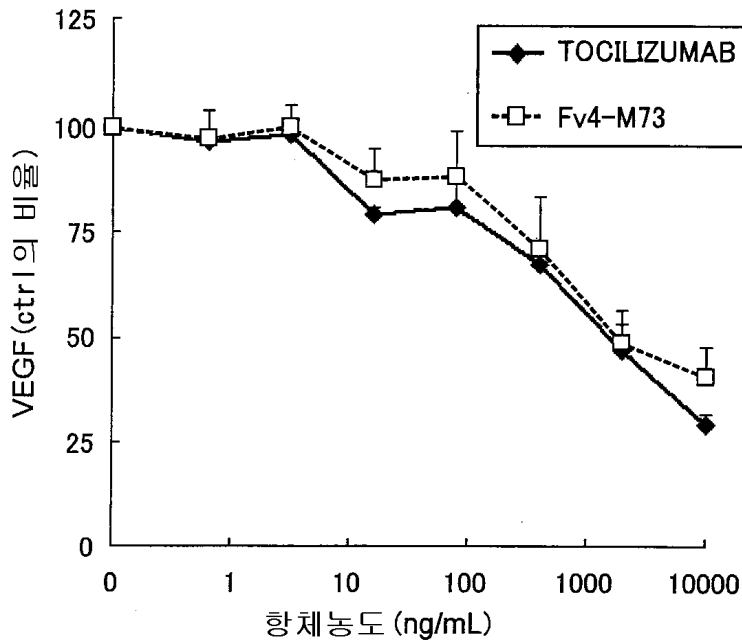
도면20



도면21



도면22



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
 - <120> Improved antibody molecules
 - <130> C1-A0805Y2P
 - <150> JP 2008-248213
 - <151> 2008-09-26
 - <150> JP 2009-60806
 - <151> 2009-03-13
 - <150> JP 2009-67925
 - <151> 2009-03-19
 - <160> 117
 - <170> PatentIn version 3.4
 - <210> 1
 - <211> 6
 - <212> PRT
 - <213> Artificial
 - <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 - <400> 1
- His Asp His Ala Trp Ser

1 5
 <210> 2

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 2
 Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 3
 Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 4
 His Asp His Ala Trp Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 5
 Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400>

> 6
 Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 7

Asp Asp His Ala Val Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 8

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Asp
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 9

Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val
 1 5 10

<210> 10

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 10

Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
 1 5 10

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 11
 Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 12
 Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 13
 Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
 1 5 10

<210> 14
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 14
 Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser
 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 15
 Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400>
 16
 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 17
 Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 18

Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 19

<

211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 19

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly

 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 20

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

 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115
 <210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 21

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 22

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His

20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr

85 90 95

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

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 23

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 24

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu

100

105

<210> 25

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly

100 105 110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

<210> 26

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35

40

45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly

100

105

110

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

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165

170

175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

<210> 28

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 28

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 30
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 30

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

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 31
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 31
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

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

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

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys

290 295 300

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

305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 32

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 32

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

1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

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

 130 135 140
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro

<210> 33

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

<400> 34

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 35

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85

90

95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 36

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20

25

30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35

40

45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50

55

60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65

70

75

80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85

90

95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 37

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgetgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg ttgataa 327

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

<210> 39

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

gctagcacca agggcccatc ggtcttccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg 60

 ggcacagcgg cctgggctg cctggtaag gactactcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca cegtgccag cacctgaact cctgggggga 360

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccct 420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcceccatc cgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 40

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgcctt cctccaagag cacctccgag 60
 agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120
 tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgtcct acagtctca 180

 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
 aaatcttgtg tegagtgcc accgtgceca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
 ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtgggtgggg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggagggtgc ataatgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcacctg cgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600

 aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaagg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgct ggtcaaagc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 960
 tcctgtctc cgggtaaatg ataa 984

<210> 42

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 43

<211> 995

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

gctagacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagccg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtec 300

aaatatggtc ccccatgccc accatgcca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacct ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtggtca gcttctcac cgtcttgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 720

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
 ctctcctgt ctctgggtta atgataagcg gccgc 995

<210> 44

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

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

<210> 45
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 45

Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 46
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 46

Ser Gly Gly Gly
 1
 <210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 47

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <
 210> 48

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
<400> 48

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 49

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 50

Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 51

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 52

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 53

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 53

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110

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

 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 54

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 54

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 Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 55

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 55

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

Lys

<210> 56

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 56

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 Gln Asp Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

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

 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

 <210> 58
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

 <400> 58
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 59
 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5
 <210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 60
 Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser
 1 5

<210> 61

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 61

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr

 20 25 30

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 62

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser

 20 25 30

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 63

Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

 20 25 30

<210> 64

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 64

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 65

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 65

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser

 20 25 30

<210> 66

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 66

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 67
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 67

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln His Ile Ser Ser His
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 <210> 69
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 69

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445
 <210> 70

<211> 445
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 70
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

 <210> 72
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 72

 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

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

 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

 <210> 73
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 73

 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 74

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 74

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 75

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 75

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

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

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 76

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 76

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

305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

 355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

 420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
Lys

<210> 77

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 77

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

 20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 78
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 78
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
 50 55 60
 Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
 65 70 75 80
 Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
 85 90 95
 Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu
 100 105 110
 Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
 115 120 125
 Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
 130 135 140
 Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
 145 150 155 160
 His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
 165 170 175
 Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
 180 185 190
 Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
 195 200 205
 Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
 210 215 220
 Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
 245 250 255
 Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu
 260 265

<210> 80

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu

1 5 10 15

Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro

20 25 30

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys

35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp

85 90 95

Arg Asp Met

<210> 81

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 81

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

1 5 10 15

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 82

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

1 5 10 15

<210> 83

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 83
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 84
 Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 85
 Leu Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 86
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 86
 Ser Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 87
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 87

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 88

Arg Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 89

Arg Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 90

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 91

Gly Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 92

Gln Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 93

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 93

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr

 20 25 30

<210> 94

<211> 30

<212> PRT

<213>

Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 94

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser

 20 25 30

<210> 95

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 95
 Ser Asp His Ala Trp Ser
 1 5

<210> 96
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 96
 Asp Asp His Ala Trp Ser
 1 5

<210> 97
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 97
 Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 98
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 98
 Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 99
 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 99

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

1 5 10 15

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 100

Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 101

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 101

Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 102

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 102

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

20

<210> 103

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 103

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

1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 104

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 105

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

1 5 10 15

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 106

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

1 5 10 15

<210> 107
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 107

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 108
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 108

Tyr Thr Ser Glu Leu Glu Ser
 1 5

<210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 109

Tyr Thr Ser Arg Leu Leu Ser
 1 5

<210> 110
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence
 <400> 110

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 111

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 111

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 112

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 113

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu

1 5 10

<210> 114

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 114

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly His Ser Ile Thr

 20 25 30

<210> 115

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 115

His Asp His Ala Trp Ser

1 5

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 116

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser His Leu Asn

1 5 10

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 117

Tyr Thr Ser His Leu His Ser

1 5

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 명세서

【보정세부항목】 식별번호 [0194]

【변경전】

술후 염증

【변경후】

수술 후 염증

【식권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 제7항

【변경전】

술후 염증

【변경후】

수술 후 염증