



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년12월03일  
 (11) 등록번호 10-1468271  
 (24) 등록일자 2014년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A61K 39/395 (2006.01) A61K 9/50 (2006.01)  
 A61K 9/16 (2006.01) A61K 47/18 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-7024548  
 (22) 출원일자(국제) 2010년03월19일  
 심사청구일자 2012년06월20일  
 (85) 번역문제출일자 2011년10월18일  
 (65) 공개번호 10-2011-0139745  
 (43) 공개일자 2011년12월29일  
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2010/001977  
 (87) 국제공개번호 WO 2010/106812  
 국제공개일자 2010년09월23일  
 (30) 우선권주장  
 JP-P-2009-069095 2009년03월19일 일본(JP)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020070068385 A\*  
 KR1020080098504 A\*  
 US20080145367 A1\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(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  
 서종완

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 **개량된 항체분자를 함유하는 의약 제제**

**(57) 요약**

본 발명의 목적은 개선된 항체분자를 함유하는 의약 제제를 제공하는 것이다. 본 발명은 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB의 가변영역 및 정상영역의 아미노산 서열을 개변함으로써, 항원 중화능을 증가시키면서, 약물동태를 향상시킴으로써, 투여빈도를 적게 하여 지속적으로 치료효과를 발휘하고, 또한, 면역원성, 안전성, 물성(안정성 및 균일성)을 개선시켜, TOCILIZUMAB보다 우수한 제2세대 분자를 포함하는 의약 제제를 제공한다. 본 제제는 안정화제로서 바람직하게는 아르기닌을 함유하고, 액체 또는 고체 형태로 제공된다.

(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

**모리야마 치후미**

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

**하야사카 아키라**

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

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

이하의 (iv)~(ix)로부터 선택되는 하나 이상의 항체를 포함하는, 관절류머티즘, 약년성 특발성 관절염, 전신형 약년성 특발성 관절염, 캐슬만병, 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, 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 수술후 염증으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료용 의약 제제.

(iv) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;

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

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

(vii) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체;

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

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

**청구항 2**

제1항에 있어서, 히스티딘 및 구연산염 완충제로부터 선택된 하나 이상의 완충제를 포함하는, 안정한 의약 제제.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 양이온성 아미노산을 포함하는, 안정한 의약 제제.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 히스티딘 및 구연산염 완충제로부터 선택된 하나 이상의 완충제 1-500 mM, 하나 이상의 양이온성 아미노산 1-1500 mM, 항체 1-200 mg/mL, 및 탄수화물 1-400 mM을 포함하는, 안정한 의약 제제.

**청구항 5**

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 양이온성 아미노산이 아르기닌인, 제제.

**청구항 6**

제4항에 있어서, 상기 탄수화물이 수크로오스 또는 트레할로오스인, 제제.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 계면활성제를 추가로 포함하는, 제제.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드 및 항체로부터 선택된 하나 이상을 10 mg/ml 이상의 함

량으로 함유하는, 제제.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드 및 항체로부터 선택된 하나 이상을 50 mg/ml 이상의 함량으로 함유하는, 제제.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드 및 항체로부터 선택된 하나 이상을 80 mg/ml 이상의 함량으로 함유하는, 제제.

**청구항 11**

제1항 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드 및 항체로부터 선택된 하나 이상을 240 mg/ml 이하의 함량으로 함유하는, 제제.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 4.5 내지 7.0 범위의 pH를 갖는, 제제.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 5.5 내지 6.6 범위의 pH를 갖는, 제제.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 액상인 제제.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 제제의 제작 동안 동결건조에 적용되지 않았던, 제제.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드 및 항체분자로부터 선택된 하나 이상의 이합체화가 저감되는, 제제.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드 및 항체분자로부터 선택된 하나 이상의 이합체화가 저감되는, 제제.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 피하 투여를 위한, 제제.

**청구항 19**

하나 이상의 양이온성 아미노산을 첨가하는 것을 포함하는, 이하의 (iv)-(ix)로부터 하나 이상 선택되는 항체를 함유하는 용액의 안정화 방법.

(iv) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;

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

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

(vii) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체;

- (viii) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체; 및
- (ix) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체.

**청구항 20**

하나 이상의 양이온성 아미노산을 첨가하는 것을 포함하는, 이하의 (iv)~(ix)로부터 하나 이상 선택되는 항체를 함유하는 용액의 냉각/해동 순환 동안 항체의 안정화 방법.

- (iv) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- (v) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- (vi) 서열번호 21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- (vii) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체;
- (viii) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체; 및
- (ix) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체.

**청구항 21**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 폴리펩티드 및/또는 항체-함유 제제, 특히, 개질된 항IL-6 수용체 항체의 고 농축물을 함유하는 안정한 액상 제제에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 최근, 다양한 항체 제제가 개발되고 실제로 사용되어 왔다. 이러한 제제 중 다수는 정맥 주사용으로 사용된다. 피하 주사용 항체-함유 제제의 설계는, 투여량 당 항체 함량이 크고 (약 100 mg 내지 200 mg) 피하 주사를 위한 용량이 일반적으로 제한되기 때문에, 액체 내에서의 항체 농도를 증가시키는 것이 필수적이다.

[0003] 항체의 고 농축물을 함유하는 용액에서, 원하지 않는 저하가 일어나고, 이는 불용성 및/또는 용해성 응집물의 형성을 포함한다. 이러한 불용성 및 용해성 응집물은 항체분자의 회합에 의해 액체 상태에서 형성될 것이다. 액상 제제가 장기간 보관되는 경우에, 항체분자의 대생물 작용이 아스파라긴 잔기의 탈아미노화에 의해 상실되거나 저감될 수 있다. 냉동과 해동의 순환은 또한 저하되고 응집된 항체분자의 형성을 유도한다.

[0004] 심지어 제제가 더욱 장기간의 시간 동안 보관된 후에도 활성 성분의 상실이 저감되는 안정화된 제제를 제공하기 위한 다양한 아이디어가 제안되어 왔다. 이러한 제제는 완충 용액에서 활성 성분 및 다양한 첨가제를 용해함으로써 취득된다. 장기간 보관 동안 이합체화 및 탈아미노화가 억제되고, 안정하고 피하 투여에 사용하기에도 적합한 고 농축된 항체-함유 제제를 제공하는 것이 필요하다.

[0005] 항체는 혈장에서 매우 안정하고 부작용도 거의 없는 의약품으로서 주목되고 있다. 그 중에서도 다수의 IgG 타입 항체 의약이 시판되고 있고, 현재도 수 많은 항체 의약이 개발되고 있다(비특허문헌 1 및 2). IL-6는 다양한 자기면역질환, 염증성 질환, 악성 종양 등에 관여하는 사이토카인(비특허문헌 3)이다. 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB(토실리주맙)은 IL-6 수용체에 특이적으로 결합한다. TOCILIZUMAB은, IL-6의 생물학적 작용을 중화하기 때문에, 관절류머티즘 같은 IL-6 관련 질환의 치료제로서 이용될 수 있다(특허문헌 1 내지 3 및 비특허문헌 4). TOCILIZUMAB은 일본에서 캐슬맨병(Castleman's disease) 및 관절류머티즘의 치료제로서 승인되어 있다(비특허문헌 5).

[0006] TOCILIZUMAB과 같은 인간화 항체는 제1세대 항체 의약이다. 제2세대 항체 의약은 현재 제1세대 항체 의약의 약효, 편의성 및 비용을 개선시킴으로써 개발되고 있다. 제2세대 항체 의약에 적용 가능한 다양한 기술이 개발되

고 있다. 면역원성 리스크를 저감시키는 기술뿐만 아니라 이펙터 기능, 항원 결합능, 약물동태 및 안정성을 향상시키는 기술이 보고되어 있다. 약효를 증강시키거나 투여량을 저감시키는 방법으로서, IgG 항체의 Fc 영역에서의 아미노산 치환을 통해 항체 의존성 세포장해활성(ADCC 활성) 또는 보체 의존성 세포장해활성(CDC 활성)을 증강시키는 기술이 보고되어 있다(비특허문헌 6). 또한, 항원 결합능 또는 항원 중화능을 증강시키는 기술로서 친화성 성숙(affinity maturation)이 보고되어 있다(비특허문헌 7). 이러한 기술은 가변영역의 상보성 결정영역(CDR; complementarity determining region) 등에 아미노산 변이를 도입함으로써 항원 결합 활성을 증강시킬 수 있다. 항원 결합능의 증강은 인 비트로(in vitro)의 생물활성을 향상시키거나, 투여량을 저감시키고, 따라서 인 비보(in vivo)에서의 약효를 향상시킨다(비특허문헌 8). 현재, 제1세대 항RSV 항체 의약인 Palivizumab(팔리비주맵)보다 우수한 효과를 가질 것으로 기대되는 Motavizumab(포타비주맵)(친화성 성숙에 의해 제작)을 평가하기 위해 임상시험이 행해지고 있다(비특허문헌 9). 친화성이 약 0.05 nM(즉, TOCILIZUMAB보다 친화성이 강한)인 항IL-6 수용체 항체 보고되어 있다(특허문헌 4). 그러나, 0.05 nM보다 강한 친화성을 갖는 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체를 기술하는 보고는 없다.

[0007] 현재의 항체 의약이 안고 있는 문제는 극도로 큰 함량의 단백질 투여와 관련된 높은 제작 비용이다. 예를 들어, 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB의 투여량은 정맥내 주사에 의해 약 8 mg/kg/month로 상정되어 있다(비특허문헌 4). 이의 바람직한 투여형태는 만성적인 자기면역질환에서 피하투여 제제이다. 일반적으로, 피하투여 제제는 고농도 제제인 것이 필요하다. 안정성 등의 관점에서, IgG 타입의 항체 제제에 대한 한도는 일반적으로 약 100 mg/mL이다(비특허문헌 10). 더욱 긴 투여간격으로 피하투여될 수 있는 저가의 편리한 제2세대 항체 의약은 이의 치료효과를 연장하고 이로써 투여되는 단백질 함량을 저감시키기 위해 혈장 중 반감기를 증가시킴으로써, 그리고 높은 안정성을 갖는 항체를 부여함으로써 제공할 수 있다.

[0008] FcRn은 항체의 약물동태에 밀접하게 관여한다. 항체 아이소타입의 혈장 중 반감기의 차이에 관해, IgG1 및 IgG2가 IgG3 및 IgG4에 비해 우수한 혈장 중 반감기를 갖는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 11). 우수한 혈장 중 반감기를 갖는 IgG1 및 IgG2 항체의 혈장 중 반감기를 추가적으로 향상시키는 방법으로서, FcRn으로의 결합을 증강하는 정상영역(constant region)에서의 아미노산 치환이 보고되어 있다(비특허문헌 12 및 13). 면역원성의 관점으로부터, 혈장 중 반감기는 바람직하게는 정상영역보다 가변영역에서 아미노산을 치환함으로써 추가로 개선된다(특허문헌 5). 그러나, 지금까지 가변영역의 개선을 통한 IL-6 수용체 항체의 혈장 중 반감기의 향상에 대한 보고는 없다.

[0009] 바이오 의약품을 개발함에 있어서 또 다른 중요한 문제는 면역원성이다. 일반적으로, 마우스 항체의 면역원성은 항체 인간화에 의해 함으로써 저감된다. 면역원성 리스크는 항체 인간화에서 템플레이트로서 프레임워크 생식계열 서열(germline sequence)을 사용함으로써 추가로 경감될 수 있음이 추정된다(비특허문헌 14). 그러나, 완전 인간 항TNF 항체인 Adalimumab(아달리무맵)도 고빈도(13% 내지 17%) 면역원성을 나타냈고, 치료 효과는 면역원성을 나타낸 환자에서 경감된 것으로 밝혀졌다(비특허문헌 15 및 16). T-cell 에피토프는 인간 항체의 CDR에서 조차 존재할 수 있고, CDR에서의 이러한 T-cell 에피토프는 면역원성의 가능한 원인이다. 인 실리코(in silico) 및 인 비보(in vivo)에서 T-cell 에피토프를 예측하는 방법이 보고되어 있다(비특허문헌 17 및 18). 면역원성 리스크가 상기 방법을 이용하여 T-cell 에피토프를 제거함으로써 경감될 수 있음이 추정된다(비특허문헌 19).

[0010] 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB은 마우스 PM1 항체를 인간화함으로써 취득되는 IgG1 항체이다. CDR 그래프팅은 H 및 L 사슬 각각에 대한 템플레이트 프레임워크로서 NEW 및 REI 인간 서열을 사용하여 행해지고 있으나, 5 마우스 서열 아미노산은 활성 유지를 위한 필수 아미노산으로서 프레임워크에 잔존하고 있다(비특허문헌 20). 지금까지 활성을 저하시키지 않고 인간화 항체 TOCILIZUMAB의 프레임워크에서 잔존하는 마우스 서열을 완전 인간화한 보고는 없다. 또한, TOCILIZUMAB의 CDR서열은 마우스 서열이고, 따라서 Adalimumab과 마찬가지로, CDR에 T-cell 에피토프를 가질 수 있어, 잠재적인 면역원성 리스크를 가질 수 있다. TOCILIZUMAB의 임상시험에서, 항TOCILIZUMAB 항체는 약효용량인 8 mg/kg에서 검출되지 않았지만, 이는 2 mg/kg 및 4 mg/kg의 함량에서 관찰되었다(특허문헌 6). 이는 TOCILIZUMAB의 면역원성에 관한 개선의 여지가 여전히 있음을 제시한다. 그러나, 지금까지 아미노산 치환에 의해 TOCILIZUMAB의 면역원성 리스크를 경감시키는 것에 대한 보고는 없었다.

[0011] TOCILIZUMAB의 아이소타입은 IgG1이다. 아이소타입 차이는 즉 정상영역 서열에서의 차이이다. 정상영역 서열은 이펙터 기능, 약물동태, 물성 등에 대한 강한 영향력을 갖는 것으로 추정되고, 정상영역 서열의 선택은 항체 의약 개발에 있어서 매우 중요하다(비특허문헌 11). 최근, 항체 의약의 안전성이 매우 중요시되고 있다. 항체 Fc 부분과 Fc 감마 수용체 사이의 상호작용(이펙터 기능)은 TGN1412의 Phase I 임상시험에서 증대한 부작용을 유발할

수 있었다(비특허문헌 21). 항원의 생물학적 작용을 증화하기 위해 설계된 항체 의약에 있어서는, ADCC 같은 이펙터 기능에 중요한 Fc 감마 수용체로의 결합은 불필요하다. Fc 감마 수용체로의 결합은 부작용의 측면에서 오히려 바람직하지 않을 수 있다. Fc 감마 수용체로의 결합을 저하시키는 방법은 IgG 항체의 아이소타입을 IgG1에서 IgG2 또는 IgG4로 변경하는 것이다(비특허문헌 22). IgG2는 약물동태 및 Fc 감마 수용체 I으로의 결합의 관점에서 IgG4보다 바람직하다(비특허문헌 11). TOCILIZUMAB은 IL-6 수용체 중화항체이고, 이의 아이소타입은 IgG1이다. 따라서, 잠재적인 부작용의 관점에서, ADCC 같은 이펙터 기능은 필요로 되지 않기 때문에 IgG2는 바람직한 아이소타입일 수 있다.

[0012] 한편, 항체 의약품을 개발하는 경우, 그 단백질의 물성, 특히 균일성과 안정성은 매우 중요하다. IgG2 아이소타입의 경우, 현지영역에서의 디설피드 결합에 유래하는 현저한 이질성(heterogeneity)이 있음이 보고되어 왔다(비특허문헌 23). 제작간 디설피드 결합으로부터 유래하는 목적 물질/관련 물질에 관련된 이질성을 유지하면서 의약품으로서 이들을 제작하는 것은 용이하지 않고 더욱 고비용이다. 따라서, 가능한 한 단일 물질인 것이 요망된다. 또한, 항체의 H 사슬 C 말단 서열의 이질성에 대하여, C 말단 아미노산의 리신 잔기의 결손, 및 C 말단의 2 아미노산의 글리신 및 리신의 결손에 의한 C 말단 카르복실기의 아미드화가 보고되어 있다(비특허문헌 24). IgG2 아이소타입 항체를 의약품으로서 개발하는데 있어서는 상기 이질성을 저감시키고 높은 안정성을 유지하는 것이 바람직하다. 편리하고 안정한 고농축 피하투여 제제를 제작하기 위해, 안정성이 높을 뿐 아니라, 혈장 중 반감기도 TOCILIZUMAB의 아이소타입인 IgG1보다 우수한 것이 바람직하다. 그러나, 지금까지 저감된 이질성, 높은 안정성, 및 IgG1 아이소타입 정상영역을 갖는 항체보다 우수한 혈장 중 반감기를 갖는 IgG2-아이소타입 정상영역을 갖는 항체에 대한 정상영역 서열에 대한 보고는 없다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

- [0013] (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

- [0014] (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, Wohlgemuth 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**

- [0015] [발명의 요약]
- [0016] 본 발명의 목적은 TOCILIZUMAB의 가변영역 및 정상영역의 아미노산 서열을 개변함으로써, 항원 중화능을 증강시키고 약물동태를 향상시킴으로써 투여빈도를 적게 하여 지속적으로 치료효과를 발휘하며, 면역원성, 안전성, 물성(안정성 및 균일성)을 개선시켜, 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB보다 우수한 제2세대 분자를 포함하는 의약 제제(이하 본 명세서에서는 "약제" 또는 "의약 조성물"로 또한 기재할 수 있다)를 제공하는 것이다.
- [0017] 추가로, 본 발명의 제제는 장기간 보관 또는 수차례의 냉동/해동 순환 동안 이합체화 및 탈아미노화가 억제되고 안정하며 바람직하게는 피하 투여에 사용하기에 적합한 고 농축된 폴리펩티드 및/또는 항체-함유 제제를 제공한다.
- [0018] 상기 언급한 문제를 해결하기 위해 집중적인 연구를 수행해 왔고, 아미노산 아르기닌 또는 그의 염을 안정화제로서 용액에 첨가함으로써 안정한 고 농축 폴리펩티드 및/또는 항체-함유 제제가 취득될 수 있음을 발견했다.
- [0019] 본 발명은 이제 자세히 기술될 것이다. 본 연구는 제1세대 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB보다 우수한 제2세대 분자의 관점에서 안정한 의약 제제를 취득하는 것에 집중되었다. 결과적으로, 논의되는 상기 항체에 관하여, 본 발명자들은, TOCILIZUMAB의 가변영역에 있어서, 항원과의 결합능(친화성)을 향상시키는 복수의 CDR 변이를 발견했다. 따라서, 본 발명자들은 상기 변이의 조합을 사용하여 성공적으로 친화성을 현저히 향상시켰다. 본 발명자들은 또한 가변영역 서열의 등전점을 저하시키는 개변을 도입함으로써 약물동태를 향상시키는 것에 성공했다. 본 발명자들은 또한 IL-6 수용체 항원과의 결합에 pH 의존성을 부여함으로써 단일 항체 분자가 항원을 복수 회 중화할 수 있도록 하여, 약물동태를 향상시키는 것에 성공했다. 또한, 그들은 TOCILIZUMAB의 프레임워크에 잔존하는 마우스 유래의 서열을 완전 인간화하고, 가변영역에 있어서 인 실리코에서 예측된 T-cell 에피토프 펩티드의 수를 저감시킴으로써, 면역원성 리스크를 성공적으로 저감시켰다. 본 발명자들은 또한 안전성을 높이기 위해 IgG1보다도 Fc 감마 수용체로의 결합을 저하시키고, IgG1보다도 약물동태를 개선시키고, 안정성을 저하시키지 않고 IgG2의 힌지영역의 디설피드 결합에 의한 이질성 및 H 사슬 C 말단에 의한 이질성을 저감시키는, TOCILIZUMAB의 정상영역에 있어서의 신규한 정상영역 서열을 성공적으로 발견하였다. 본 발명자들은 CDR, 기반영역 및 정상영역에서의 상기 아미노산 서열의 개변을 적절히 조합함으로써 TOCILIZUMAB보다 우수한 제2세대 분자를 성공적으로 제작했다.
- [0020] 본 발명은 인간화 항IL-6 수용체 IgG1 항체인 TOCILIZUMAB의 가변영역 및 정상영역의 아미노산 서열의 개변에 의해, 우수한 항원(IL-6 수용체)으로의 결합능, 우수한 약물동태, 우수한 안전성 및 물성(안정성 및 균일성), 및 더욱 저감된 면역원성 리스크를 갖는 인간화 항IL-6 수용체 IgG 항체를 포함하는 의약 제제, 및 상기 의약 조성물의 제작방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 하기 (1)~(21)을 제공한다.
- [0021] (1) 이하의 (a)~(f)로부터 선택되는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는, 의약 제제.
- [0022] (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;
- [0023] (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;
- [0024] (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;
- [0025] (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;

- [0026] (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; 및
- [0027] (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.
- [0028] (2) 이하의 (a)-(i)로부터 선택되는 하나 이상의 항체를 포함하는, 의약 제제.
- [0029] (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;
- [0030] (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;
- [0031] (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;
- [0032] (d) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0033] (e) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0034] (f) 서열번호 21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0035] (g) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체;
- [0036] (h) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체; 및
- [0037] (i) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체.
- [0038] (3) 히스티딘 및/또는 구연산염 완충제를 포함하는, (1) 또는 (2)에 따르는 안정적인 의약 제제.
- [0039] (4) 하나 이상의 양이온성 아미노산을 포함하는, (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따르는 안정적인 의약 제제.
- [0040] (5) 히스티딘 및/또는 구연산염 1-500 mM, 하나 이상의 양이온성 아미노산 1-1500 mM, 항체 1-200 mg/mL 및 탄수화물 1-400 mM을 포함하는, (1) 내지 (4)의 어느 하나에 따르는 안정적인 의약 제제.
- [0041] (6) 상기 양이온성 아미노산이 아르기닌인, (4) 또는 (5)에 따르는 제제.
- [0042] (7) 상기 탄수화물이 수크로오스 또는 트리할로오스인, (5) 또는 (6)에 따르는 제제.
- [0043] (8) 계면활성제를 추가로 포함하는, (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 따르는 제제.
- [0044] (9) 10 mg/ml 이상의 함량으로 폴리펩티드 및/또는 항체를 함유하는, (1) 내지 (8) 중 어느 하나에 따르는 제제.
- [0045] (10) 50 mg/ml 이상의 함량으로 폴리펩티드 및/또는 항체를 함유하는, (1) 내지 (9) 중 어느 하나에 따르는 제제.
- [0046] (11) 80 mg/ml 이상의 함량으로 폴리펩티드 및/또는 항체를 함유하는, (1) 내지 (10) 중 어느 하나에 따르는 제제.
- [0047] (12) 240 mg/ml 이하의 함량으로 폴리펩티드 및/또는 항체를 함유하는, (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 따르는 제제.

제제.

- [0048] (13) 4.5 내지 7.0 범위의 pH를 갖는, (1) 내지 (12) 중 어느 하나에 따르는 제제.
- [0049] (14) 5.5 내지 6.6 범위의 pH를 갖는, (13)에 따르는 제제.
- [0050] (15) 액상인, (1) 내지 (14) 중 어느 하나에 따르는 제제.
- [0051] (16) 제제의 제작 동안 동결건조에 적용되지 않았던, (15)에 따르는 제제.
- [0052] (17) 폴리펩티드 및/또는 항체분자의 이합체화가 저감되는, (1) 내지 (16) 중 어느 하나에 따르는 제제.
- [0053] (18) 폴리펩티드 및/또는 항체분자의 이합체화가 저해되는, (1) 내지 (17) 중 어느 하나에 따르는 제제.
- [0054] (19) 피하 투여를 위한, (1) 내지 (18) 중 어느 하나에 따르는 제제.
- [0055] (20) 하나 이상의 양이온성 아미노산을 첨가하는 것을 포함하는, 이하의 (a)~(i)로부터 선택되는 항체를 함유하는 용액의 안정화 방법.
- [0056] (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;
- [0057] (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;
- [0058] (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;
- [0059] (d) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0060] (e) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0061] (f) 서열번호 21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0062] (g) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체;
- [0063] (h) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체; 및
- [0064] (i) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체.
- [0065] (21) 하나 이상의 양이온성 아미노산을 첨가하는 것을 포함하는, 이하의 (a)~(i)로부터 선택되는 항체를 함유하는 용액의 냉각/해동 순환 동안 항체의 안정화 방법.
- [0066] (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;
- [0067] (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;
- [0068] (c) 서열번호:7(VH5-M83의 CDR1)의 서열을 갖는 CDR1, 서열번호:8(VH5-M83의 CDR2)의 서열을 갖는 CDR2, 및 서

열번호: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;

- [0069] (d) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0070] (e) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0071] (f) 서열번호 21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역, 및 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0072] (g) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체;
- [0073] (h) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체; 및
- [0074] (i) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체.
- [0075] 상기 기술된 인간화 항IL-6 수용체 IgG 항체는 증가된 약효 및 향상된 약물동태를 갖고, 따라서 투여빈도를 적게 하면서 지속적으로 치료효과를 발휘할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0076] [도 1]  
 도 1은 IL-6 수용체에 대한 TOCILIZUMAB의 친화성을 향상시키는 변이개소의 리스트를 나타낸다. TOCILIZUMAB의 HCDR2의 서열을 서열번호:81, HCDR2의 변이후 서열(상단)을 서열번호:82, HCDR2의 변이후 서열(하단)을 서열번호:83, TOCILIZUMAB의 HCDR3 서열을 서열번호:84, HCDR3의 변이후 서열(상단)을 서열번호:85, HCDR3의 변이후 서열(하단)을 서열번호:86, TOCILIZUMAB의 LCDR1 서열을 서열번호:87, LCDR1의 변이후 서열(상단)을 서열번호:88, LCDR1의 변이후 서열(하단)을 서열번호:89, TOCILIZUMAB의 LCDR3 서열을 서열번호:90, LCDR3의 변이후 서열(상단)을 서열번호:91, LCDR3의 변이후 서열(하단)을 서열번호:92에 나타낸다.
- [도 2]  
 도 2는 BaF/gp130에 있어서의 TOCILIZUMAB 및 RDC-23의 중화활성을 나타낸다.
- [도 3]  
 도 3은 IL-6 수용체로의 TOCILIZUMAB의 결합을 크게 저하시키지 않고 가변영역의 등전점을 저하시킬 수 있는 변이개소를 리스트를 나타낸다. 도면 중의 별표는 등전점에는 영향을 미치지 않으나 인간 서열로의 변환을 위해 변이되었던 개소이다. TOCILIZUMAB의 HFR1 서열을 서열번호:93, HFR1의 변이후 서열을 서열번호:94, TOCILIZUMAB의 HCDR1 서열을 서열번호:95, HCDR1의 변이후 서열을 서열번호:96, TOCILIZUMAB의 HFR2의 서열을 서열번호:97, HFR2의 변이후 서열을 서열번호:98, TOCILIZUMAB의 HCDR2 서열을 서열번호:81, HCDR2의 변이후 서열을 서열번호:99, TOCILIZUMAB의 HFR4 서열을 서열번호:100, HFR4의 변이후 서열을 서열번호:101, TOCILIZUMAB의 LFR1 서열을 서열번호:102, LFR1의 변이후 서열을 서열번호:103, TOCILIZUMAB의 LCDR1 서열을 서열번호:87, LCDR1의 변이후 서열을 서열번호:104, TOCILIZUMAB의 LFR2 서열을 서열번호:105, LFR2의 변이후 서열을 서열번호:106, TOCILIZUMAB의 LCDR2 서열을 서열번호:107, LCDR2의 변이후 서열을 서열번호:108, 109, TOCILIZUMAB의 LFR3 서열을 서열번호:110, LFR3의 변이후 서열을 서열번호:111, TOCILIZUMAB의 LFR4 서열을 서열번호:112, LFR4의 변이후 서열을 서열번호:113에 나타낸다.
- [도 4]  
 도 4는 BaF/gp130에서의 TOCILIZUMAB 및 H53/L28의 중화활성을 나타낸다.
- [도 5]  
 도 5는 마우스에서 정맥내 투여 후 TOCILIZUMAB 및 H53/L28의 혈장 중 농도추이를 나타낸다.
- [도 6]  
 도 6은 마우스에서 피하투여 후 TOCILIZUMAB 및 H53/L28의 혈장 중 농도추이를 나타낸다.

[도 7]

도 7은 IgG 분자가 엔도솜 내에서 막형 항원으로부터 해리됨으로써 또 다른 항원에 다시 결합할 수 있음을 나타내는 모식도이다.

[도 8]

도 8은 IL-6 수용체로의 TOCILIZUMAB의 결합에 pH 의존성(pH 7.4에서 결합하고, pH 5.8에서 해리됨)을 부여할 수 있는 변이개소의 리스트를 나타낸다. TOCILIZUMAB의 HFR1 서열을 서열번호:93, HFR1의 변이후 서열을 서열번호:114, TOCILIZUMAB의 HCDR1 서열을 서열번호:95, HCDR1의 변이후 서열을 서열번호:115, TOCILIZUMAB의 LCDR1 서열을 서열번호:87, LCDR1의 변이후 서열을 서열번호:116, TOCILIZUMAB의 LCDR2 서열을 서열번호:107, LCDR2의 변이후 서열을 서열번호:117에 나타낸다.

[도 9]

도 9는 BaF/gp130에서의 TOCILIZUMAB 및 H3pI/L73의 중화활성을 나타내는 그래프이다.

[도 10]

도 10은 게잡이원숭이에서 정맥내 투여 후 TOCILIZUMAB 및 H3pI/L73의 혈장 중 농도추이를 나타낸 그래프이다.

[도 11]

도 11은 인간 IL-6 수용체 형질전환 마우스에서 정맥내 투여 후 TOCILIZUMAB 및 H3pI/L73의 혈장 중 농도추이를 나타낸 그래프이다.

[도 12]

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

[도 13]

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

[도 14]

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 15]

도 15는 인간 FcRn 형질전환 마우스에서 정맥내 투여 후 TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73의 혈장 중 농도추이를 나타낸 그래프이다.

[도 16]

도 16은 BaF/gp130에서의 TOCILIZUMAB, 대조 및 Fv5-M83의 중화활성을 나타내는 그래프이다.

[도 17]

도 17은 BaF/gp130에서의 TOCILIZUMAB, Fv3-M73 및 Fv4-M73의 중화활성을 나타내는 그래프이다.

[도 18]

도 18은 게잡이원숭이에서 정맥내 투여 후 TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83의 혈장 중 농도추이를 나타낸 그래프이다.

[도 19]

도 19는 게잡이원숭이에서 정맥내 투여 후 TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83의 CRP 농도추이를 나타낸 그래프이다.

[도 20]

도 20은 계잡이원숭이에서 정맥내 투여 후 TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83의 비결합형 가용형 IL-6 수용체율의 추이를 나타낸 그래프이다.

[도 21]

도 21은 상이한 제제(A-D)에 대하여 시간에 따른 항체 Fv4-M73의 고분자량 중(HMW)의 형성에서의 차이를 나타낸 그래프이다.

[도 22]

도 22는 상이한 pH 수치, 완충제 종류, NaCl 농도, 및 아르기닌의 존재 및 부존재에 따른 (섭씨 25도에서) 시간상 2개의 지점에서의 항체 Fv4-M73의 고분자량 중의 형성에서의 차이(델타 HMW: 초기로부터의 증가량)를 나타낸 그래프이다.

[도 23]

도 23은 상이한 pH 수치, 완충제 종류, NaCl 농도, 및 아르기닌의 존재 및 부존재에 따른 (섭씨 25도에서) 시간상 하나의 지점에서의 항체 Fv4-M73의 고분자량 중(HMW)의 형성에서의 차이를 나타낸 그래프이다.

[도 24]

도 24는 상이한 pH 수치, 완충제 종류, NaCl 농도, 및 아르기닌의 존재 및 부존재에 따른 (섭씨 40도에서) 시간상 3개의 지점에서의 항체 Fv4-M73의 고분자량 중의 형성에서의 차이(델타 HMW: 초기로부터의 증가량)를 나타낸 그래프이다.

[도 25]

도 25는 상이한 pH 수치, 완충제 종류, NaCl 농도, 및 아르기닌의 존재 및 부존재에 따른 (섭씨 40도에서) 시간상 하나의 지점에서의 항체 Fv4-M73의 고분자량 중(HMW)의 형성에서의 차이를 나타낸 그래프이다.

[도 26]

도 26은 상이한 pH 수치, 완충제 종류, NaCl 농도 및 아르기닌의 존재 및 부존재에 따른 (섭씨 40도에서) 시간상 3개의 지점에서의 항체 Fv4-M73의 저분자량 중의 형성에서의 차이(델타 LMW: 초기로부터의 증가량)를 나타낸 그래프이다.

[도 27]

도 27은 상이한 pH 수치 하에서 저장된 항체 Fv4-M73의 용액으로 수행된 음이온 교환 크로마토그래피의 결과를 나타낸 다이어그램이다.

[도 28]

도 28은 3개의 상이한 pH 수치, NaCl의 상이한 농도, 아르기닌 및 상이한 2종의 완충제 하에서 저장된 항체 Fv4-M73의 용액으로 수행한 음이온 교환 크로마토그래피의 결과를 나타낸 다이어그램이다.

[도 29]

도 29는 상이한 2개의 냉동/해동 순환수, NaCl의 상이한 농도, 아르기닌 및 상이한 2종의 완충제에 대한 항체 Fv4-M73의 고분자량 중의 형성에서의 차이(델타 HMW: 초기로부터의 증가량)를 나타낸 그래프이다.

[도 30]

도 30은 (섭씨 40도 및 섭씨 25도에서) 시간상 상이한 3개의 지점 및 상이한 4종의 제제(E-H)에서 항체 Fv4-M73의 고분자량 중의 형성에서의 차이(델타 HMW: 초기로부터의 증가량)를 나타낸 그래프이다.

[도 31]

도 31은 상이한 2개의 냉동/해동 순환수 및 상이한 4종의 제제(E-H)에 대한 항체 Fv4-M73의 고분자량 중의 형성에서의 차이(델타 HMW: 초기로부터의 증가량)를 나타낸 그래프이다.

[도 32]

도 32는 섭씨 5도에서 3개월 및 6개월 후의 상이한 6종의 제제에 대한 항체 Fv4-M73의 고분자량 중의 형성에서

의 차이(델타 HMW: 초기로부터의 증가량)를 나타낸 그래프이다.

[도 33]

도 33은 섭씨 -20도에서 3개월 및 6개월 후 상이한 6종의 제제에 대한 항체 Fv4-M73의 고분자량 종의 형성에서의 차이(델타 HMW: 초기로부터의 증가량)를 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0077] 본 발명은 이하의 (a)~(f)로부터 선택되는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는, 의약 제제를 제공한다.
- [0078] (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,
- [0079] (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,
- [0080] (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,
- [0081] (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,
- [0082] (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,
- [0083] (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.
- [0084] 본 발명의 폴리펩티드 및 항체는 통상의 방법(참조, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, USA)에 따라 제제화될 수 있다.
- [0085] 본 발명에서 사용되는 바와 같은 "의약 제제", "약제" 및 "의약 조성물"은 인간 같은 동물에 바로 또는 재구성 후 투여하기에 적합하도록 제작된, 유효 성분(들)으로서 폴리펩티드 및/또는 항체를 함유하는 액상 또는 고체상 제제를 의미한다. 필요하다면, 상기 제제는 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 첨가제를 함유할 수 있다. 예를 들어, 세제(예를 들어, PEG, Tween, Pluronic), 부형제, 항산화제(예를 들어, 아스코르브산, 메티오닌), 착색제, 방향제, 방부제, 안정화제, 완충제, 킬레이트제(예를 들어, EDTA), 서스펜션화제, 등장화제, 결합제, 붕해제, 윤활제, 유동촉진제, 및 교취제.
- [0086] 본 발명에 따르는 폴리펩티드 및/또는 항체-함유 제제는 바람직하게는 안정화제로서 HSA(인간 혈청 알부민), 젤라틴, 및 그러한 단백질을 함유하지 않는다.
- [0087] 본 발명에 따르는 폴리펩티드 및/또는 항체-함유 제제는 바람직하게는 10 mg/ml 이상, 바람직하게는 50 mg/ml 이상, 더욱 바람직하게는 80 mg/ml 이상의 고농도로 폴리펩티드 및/또는 항체를 함유하는 액상 의약 제제이다. 상기 농도는 10 내지 240 mg/ml이고, 10 mg/ml일 수 있고, 더욱 바람직하게는 50 mg/ml, 더 더욱 바람직하게는 100 내지 200 mg/ml일 수 있다.
- [0088] 본 발명에 따르는 액상 의약 제제는 바람직하게는 동결건조 단계(들)를 수행하지 않음으로써 제작된다.
- [0089] 본 발명에서 사용될 수 있는 완충제는 목적인 범위에서 pH를 조절할 수 있고 약제학적으로 허용가능한 것이다. 본 발명에 따르는 고농도 폴리펩티드 및/또는 항체-함유 제제에서, 제제의 pH는 바람직하게는 4.5 내지 7, 더욱 바람직하게는 5.5 내지 6.6이다. 상기 완충제는 당해 기술분야에서 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 이들의 예는 인산 염(나트륨 또는 칼륨) 및 탄산수소나트륨 같은 무기염; 구연산 염(나트륨 또는 칼륨), 아세트산나트륨 및 숙신산나트륨 같은 유기산 염; 및 인산, 탄산, 구연산, 숙신산, 말산 및 글루콘산 같은 산을 포함한다. 또한, 트리스 완충제, MES 및 MOPS 같은 균 완충제(Good's buffer), 히스티딘(예를 들어, 히스티딘 염산염) 및 글리신 또한 사용될 수 있다. 본 발명에 따르는 고농도 폴리펩티드 및/또는 항체-함유 제제에서, 완충제는 바람직하게는 히스티딘 또는 구연산염 완충제이고, 여기서 히스티딘 완충제가 특히 바람직하다. 완충제 용액의 농도는 일반적으로 1 내지 500 mM, 바람직하게는 5 내지 100 mM, 더욱 바람직하게는 10 내지 20 mM이다. 히스티딘 완충제가 사용되는 경우, 완충제 용액은 히스티딘을 바람직하게는 5 내지 25 mM, 더욱 바람직하게는 10 내지 20

mM의 농도로 함유한다.

- [0090] 본 발명에 따르는 제제는 추가로 계면활성제를 함유한다. 계면활성제의 전형적인 예는 무기 계면활성제, 예를 들어, 소르비탄 모노카프릴레이트, 소르비탄 모노라우레이트 및 소르비탄 모노팔미테이트 같은 소르비탄 지방산 에스테르; 글리세롤 모노카프릴레이트, 글리세롤 모노미리스테이트 및 글리세롤 모노스테아레이트 같은 글리세롤 지방산 에스테르; 데카글리세틸 모노스테아레이트, 데카슬리세틸 디스테아레이트 및 데카글리세틸 모노리놀리에이트 같은 폴리글리세롤 지방산 에스테르; 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트 같은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르; 폴리옥시에틸렌 소르비톨 테트라스테아레이트 및 폴리옥시세틸렌 소르비톨 테트라올레이트 같은 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르; 폴리옥시에틸렌 글리세릴 모노스테아레이트 같은 폴리옥시에틸렌 글리세롤 지방산 에스테르; 폴리옥시에틸렌 글리콜 디스테아레이트 같은 폴리옥시에틸렌 글리콜 지방산 에스테르; 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르 같은 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르; 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 글리콜 에테르, 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 프로필 에테르 및 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 세틸 에테르 같은 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 알킬 에테르; 폴리옥시에틸렌 노닐페닐 에테르 같은 폴리옥시에틸렌 알킬 페닐 에테르; 폴리옥시에틸렌 피마자유 및 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유(폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유) 같은 폴리옥시에틸렌 경화 피마자유; 폴리옥시에틸렌 소르비톨 밀랍 같은 폴리옥시에틸렌 밀랍 유도체; 폴리옥시에틸렌 라놀린 같은 폴리옥시에틸렌 라놀린 유도체; 폴리옥시에틸렌 지방산 아마이드, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 옥타데칸아미드 같이 6 내지 18의 HLB를 갖는 계면활성제; 음이온성 계면활성제, 예를 들어, 세틸 황산나트륨, 라우릴 황산나트륨 및 올레일 황산나트륨 같이 C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> 알킬 그룹을 갖는 알킬 황산염; 폴리옥시에틸렌 라우릴 황산나트륨 같이 첨가된 에틸렌 옥사이드 단위의 평균 몰수가 2 내지 4이고, 알킬 그룹의 탄소 원자수가 10 내지 18인 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 황산염; 라우릴 설포숙신산나트륨 같이 C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub> 알킬 그룹을 갖는 알킬 설포숙신산염; 레시틴 및 글리세로인지질 같은 자연 계면활성제; 스펅고마이엘린 같은 스펅고인지질; 및 C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> 지방산의 수크로스 에스테르를 포함한다.
- [0091] 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 알킬 에테르이고, 특히 바람직하게는 폴리소르베이트 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81 및 85 및 플로닉(pluronic) 타입 계면활성제이며, 가장 바람직하게는 폴리소르베이트 20 및 80, 및 플로닉 F-68 (플록사머 188)이다.
- [0092] 본 발명에 따르는 항체 제제에 첨가되는 계면활성제(들)의 함량은 일반적으로 0.0001 내지 10% (w/v), 바람직하게는 0.001 내지 5%, 더욱 바람직하게는 0.005 내지 3%이다.
- [0093] 본 발명에 따른 제제는 안정화제로서 메티오닌, 글리신, 알라닌, 페닐알라닌, 트립토판, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민 및 그러한 아미노산뿐만 아니라 아르기닌 같은 산성 아미노산을 추가로 함유할 수 있다.
- [0094] 본 발명에 따르는 항체-함유 제제 또는 항체-함유 용액 제제에서, 탄수화물(들)(예를 들어, 당(들))을 첨가함으로써 냉동/해동 순환 동안 다이머(dimer)의 형성을 저해할 수 있다. 사용될 수 있는 당은 비환원성 올리고당, 예를 들어, 수크로오스 및 트레할로오스 같은 비환원성 이당류 또는 라피노오스 같은 비환원성 삼당류를 포함하고, 특히 바람직하게는 비환원성 올리고당이다. 바람직한 비환원성 올리고당은 비환원성 이당류, 더욱 바람직하게는 수크로오스 및 트레할로오스이다.
- [0095] 본 발명에 따르는 항체-함유 제제 또는 항체-함유 용액 제제에서, 장기간 보관 동안 다합체 및 저감 제품의 형성은 탄수화물(들)(예를 들어, 당(들))을 첨가함으로써 저해될 수 있다. 사용될 수 있는 당은 마니톨 및 소르비톨 같은 당 알코올; 비환원성 올리고당, 예를 들어, 비환원성 올리고당 중에서 특히 바람직한, 수크로오스 및 트레할로오스 같은 비환원성 이당류 또는 라피노오스 같은 비환원성 삼당류를 포함한다. 바람직한 비환원성 올리고당은 비환원성 이당류, 더욱 바람직하게는 수크로오스 및 트레할로오스이다.
- [0096] 상기 당은 0.1 내지 500 mg/ml, 바람직하게는 10 내지 300 mg/ml, 더욱 바람직하게는 25 내지 100 mg/ml로 첨가되어야 한다.
- [0097] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따르는 제제는 바람직하게는 실질적으로 이하의 성분들로 구성된다
- [0098] A) 개질된 항IL-6 수용체 항체;
- [0099] B) 양이온성 아미노산(예를 들어, 아르기닌, 히스티딘, 및/또는 라이신);
- [0100] C) 완충제(들)(예를 들어, 히스티딘 또는 구연산염).

- [0101] 탄수화물(들)(예를 들어, 당) 및/또는 계면활성제(들)는 또한 목적에 따라 제제에 포함될 수 있다.
- [0102] 안정화제로서, 메티오닌, 글리신, 알라닌, 페닐알라닌, 트립토판, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 및 그러한 아미노산이 포함될 수 있다.
- [0103] "실질적으로 구성되는"이란 용어는 본원에서 제제에 통상 첨가되는 그 성분들 이외의 성분은 함유되지 않음을 의미하고, 제제에 통상 첨가되는 그 성분들은 아래 기술되는 서스펜션화제, 용해제, 등장화제, 방부제, 흡착제해제, 희석제, 전색제, pH-조절제, 연화제, 황-함유 황원제 및 항산화제 같은 아래 기술되는 추가의 첨가 성분이다.
- [0104] 상기 서스펜션화제의 예는 메틸 셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 래빅(rabic) 고무, 제분된 트래거칸스(tragacanth), 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 및 폴리에틸렌 소르비탄 모노라우레이트를 포함한다.
- [0105] 상기 용해제의 예는 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유, 폴리소르베이트 80, 니코틴아미드, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트, 매크로골 및 피마자유 지방산 에틸 에스테르를 포함한다.
- [0106] 상기 등장화제의 예는 염화나트륨, 염화칼륨 및 염화칼슘을 포함한다.
- [0107] 상기 방부제의 예는 메틸 p-하이드록시벤조에이트, 에틸 p-하이드록시벤조에이트, 소르빈산, 페놀, 크레솔 및 클로로크레솔을 포함한다.
- [0108] 상기 흡착제해제의 예는 인간 혈청 알부민, 레시틴, 텍스트란, 에틸렌옥사이드-프로필렌 옥사이드 공중합체, 하이드록시프로필셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0109] 상기 황-함유 황원제의 예는 N-아세틸시스테인, N-아세틸호모시스테인, 티옥트산, 티오디글리콜, 티오에탄올아민, 티오글리세롤, 티오소르비톨, 티오글리콜산 및 이들의 염, 티오황산나트륨, 글루타티온 및 C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 티오알칸 같이 설프하이드릴기를 갖는 화합물을 포함한다.
- [0110] 상기 항산화제의 예는 에리소르빈산, 디부틸하이드록시톨루엔, 부틸화 하이드록시아니솔, 알파-토코페롤, 토코페롤 아세테이트, L-아스코르브산 및 이들의 염, L-아스코빌 팔미테이트, L-아스코빌 스테아레이트, 아황산수소나트륨, 아황산나트륨, 트리아밀 몰식자산염, 프로필 몰식자산염, 및 에틸렌디아민사초산나트륨 (EDTA), 피로인산나트륨 및 메타인산나트륨 같은 킬레이트제를 포함한다.
- [0111] 그러나, 염증성 질환을 포함하는 IL-6-관련 질병을 예방하거나 치료하기 위해 사용될 수 있는 본 발명에 따르는 제제(약제, 의약 조성물)는 상기에 제한되지 않으며, 다른 통상의 담체를 적절히 함유할 수 있다. 특히, 예로서 경질 무수 규산, 락토오스, 결정화 셀룰로오스, 마니톨, 녹말, 카르멜로스 갈슘, 카르멜로스 나트륨, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스, 폴리비닐 아세탈 디에틸아미노아세테이트, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 중쇄 지방산 트리글리세리드, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유 60, 자당, 카르복시메틸셀룰로오스, 옥수수녹말, 및 무기염을 포함한다. 주사용 액상 용액의 제작시, 항-IL-6 수용체 항체는, 예를 들어, 생리식염수, 글루코오스 또는 다른 보조제를 함유하는 등장액에 용해된다. 보조제는, 예를 들어, D-소르비톨, D-마노스, D-마니톨 및 염화나트륨을 포함한다. 또한, 적절한 용해제는, 예를 들어, 알코올(에탄올 등), 폴리알코올(프로필렌 글리콜, PEG 등), 및 비이온성 계면활성제(폴리소르베이트 80 및 HCO-50)가 조합될 수 있다.
- [0112] 필요하다면, 상기 폴리펩티드는 마이크로캡슐(하이드록시셀룰로오스, 젤라틴, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 등으로 만들어진 마이크로캡슐)에 넣어지거나, 콜로이드성 약물 전달 시스템(리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노입자, 나노캡슐 등)으로 제작된다(참조, 예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)). 나아가, 지연-방출제로서 약제를 제작하는 방법은 공지되어 있고, 이들은 폴리펩티드에 적용될 수 있다(Larger et al., J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12:98-105; US Patent No. 3,773,919; European Patent Application (EP) No. 58,481; Sidman et al., Biopolymers (1983) 22:547-56; EP No. 133,988). 또한, 피하 주입용 액상 용액은 히알루로니다아제를 약제에 첨가하거나 혼합함으로써 증가될 수 있다(예를 들어, WO 2004/078140 참조).
- [0113] 본 발명의 의약 조성물은 경구 및 비경구 모두로 투여될 수 있지만, 바람직하게는 비경구로 투여된다. 특히, 상기 조성물은 주사 또는 경피 투여에 의해 환자에게 투여된다. 주사는, 예를 들어, 정맥 주사, 근육 주사, 또는 피하 주사에 의한 전체 또는 국소 투여를 포함한다. 상기 조성물은 치료 지점, 특히 근육 주사에 의해 상기 지

점의 주변에 국소적으로 주사될 수 있다. 경피 투여 형태는, 예를 들어, 국소적으로 또는 전체적으로 투여될 수 있는 연고, 겔, 크림, 찜질제 및 패치를 포함한다. 또한, 투여 방법은 환자의 나이 및 증상에 따라 적절히 선택될 수 있다. 투여량은, 예를 들어, 각 투여에 있어서 체중 kg 당 활성 성분 0.0001 mg 내지 100 mg의 범위로부터 선택될 수 있다. 또는, 상기 조성물이 인간 환자에게 투여되는 경우, 예를 들어, 상기 활성 성분이 각 환자에 있어서 체중 kg 당 0.001 내지 1000 mg의 범위로부터 선택될 수 있다. 단일 투여 함량은 바람직하게는, 예를 들어, 본 발명의 항체를 약 0.01 내지 50 mg/kg(체중)으로 함유한다. 그러나, 본 발명의 항체는 상기 함량에 제한되지 않는다.

- [0114] 아래 기술되는 실시예의 결과로부터 나타날 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따라서, 하나 이상의 양이온성 아미노산(아르기닌, 히스티딘, 및/또는 라이신, 바람직하게는 아르기닌) 또는 다른 아미노산과 배합된 양이온성 아미노산을 제제에 첨가함으로써 장기간 보관 또는 냉동/해동 동안 항체의 이합체화 및 탈아미노화가 저감되는 안정한 제제가 제작될 수 있다.
- [0115] 고농도 항체-함유 제제의 저장 수명 안정성을 측정하기 위해, 본 발명자들은 사이즈 배제 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피 실험을 수행함으로써 다양한 첨가제의 효과를 연구했다. 결과적으로, 아미노산 아르기닌을 함유하는 완충 용액에 용해된 고농도 항체의 용액에서, 추가의 아르기닌을 갖지 않는 용액에서 보다 이합체의 함량이 낮았음을 발견했다. 이러한 결과는 아르기닌이 항체 이합체화를 저해하는 안정화제로서 효과적임을 나타낸다.
- [0116] 따라서, 안정화제로서 아르기닌을 첨가함으로써, 항체의 이합체화가 저감된 안정한 항체 제제를 제공할 수 있다.
- [0117] 본 발명의 하나의 양태는 완충 용액에 항체 및 아르기닌을 함유하는 것을 특징으로 하는, 안정한 항체-함유 제제이다.
- [0118] 본 발명에서 사용되는 아르기닌으로서, 아르기닌 화합물 자체, 이들의 유도체 및 이들의 염이 사용될 수 있다. L-아르기닌 및 이들의 염이 바람직하다.
- [0119] 본 발명에 따르는 제제가 아르기닌을 함유하는 경우, 아르기닌의 농도는 바람직하게는 1 내지 1500 mM, 더욱 바람직하게는 50 내지 1000 mM, 더욱 바람직하게는 50 내지 200 mM이다.
- [0120] 본 발명의 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.
- [0121] 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.
- [0122] 이들 가변영역은 항인간 IL-6 수용체 항체의 일부로서 사용 가능하다. 이들 가변영역이 사용된 항인간 IL-6 수용체 항체는 우수한 결합활성, 우수한 약물동태, 우수한 안전성, 저감된 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.
- [0123] CDR과 연결되는 인간 항체의 프레임워크 영역(framework region; FR)은, CDR이 양호한 항원 결합부위를 형성하도록 선택된다. 본 발명의 가변영역에 사용되는 FR은 특별히 한정되지 않고, 어떠한 FR이 사용되고 있어도 되나, 인간 유래의 FR이 바람직하게 사용된다. 천연서열을 갖는 인간 유래의 FR을 사용하는 것이 가능하다. 또는, 필요한 경우, CDR이 적절한 항원 결합부위를 형성하도록, 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등을 천연서열을 갖는 프레임워크 영역에 도입할 수 있다. 예를 들면, 아미노산을 치환한 FR을 갖는 항체의 항원으로의 결합활성을 측정하고 평가함으로써 목적하는 성질을 갖는 변이 FR서열을 선택할 수 있다(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).
- [0124] 또한, 전술한 CDR서열에 있어서 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등이 될 수 있다. 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 후의 CDR서열은, 결합활성, 중화활성, 안정성, 면역원성 및/또는 약물동태에 관한 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 이하, 더욱 바람직하게는 2 아미노산 이하, 보다 바람직하게는 1 아미노산이다.

- [0125] 하나 이상의 아미노산 잔기를 목적의 다른 아미노산으로 치환하는 방법은, 예를 들어, 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 포함한다. 상기 방법은 항체에서 목적의 다른 아미노산으로 목적하는 아미노산을 치환하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 아미노산 치환 방법으로서, 아미노산은 프레임워크 서플링(Mol Immunol. 2007 Apr;44(11):3049-60) 및 CDR repair(US2006/0122377) 같은 라이브러리 기술을 이용하는 적절한 프레임워크 및 CDR을 취득하기 위해 치환될 수 있다.
- [0126] 본 발명은 또한 이하의 (a)-(i)로부터 선택되는 하나 이상의 항체를 포함하는 의약 제제를 제공한다.
- [0127] (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;
- [0128] (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;
- [0129] (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;
- [0130] (d) 서열번호:19(VH4-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:22(VL1의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0131] (e) 서열번호:20(VH3-M73의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:23(VL3의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0132] (f) 서열번호:21(VH5-M83의 가변영역)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:24(VL5의 가변영역)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0133] (g) 서열번호:25(VH4-M73)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:28(VL1)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체;
- [0134] (h) 서열번호:26(VH3-M73)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:29(VL3)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체; 및
- [0135] (i) 서열번호:27(VH5-M83)의 서열을 갖는 중쇄 가변영역 및 서열번호:30(VL5)의 서열을 갖는 경쇄 가변영역을 포함하는 항체.
- [0136] 진술한 항체는 우수한 결합활성, 우수한 약물동태, 우수한 안전성, 저감된 면역원성, 및/또는 우수한 물성을 갖는 항인간 IL-6 수용체 항체로서 사용될 수 있다.
- [0137] 본 발명의 CDR과 연결되는 인간 항체의 프레임워크 영역은, CDR이 양호한 항원 결합부위를 형성하도록 선택된다. 본 발명의 가변영역에 사용되는 FR은 특별히 한정되지 않고, 어떠한 FR이 사용되고 있어도 되나, 인간 유래의 FR이 바람직하게 사용된다. 천연서열을 갖는 인간 유래의 FR이 사용되는 것도 가능하다. 또는, 필요

에 따라, CDR이 적절한 항원 결합부위를 형성하도록, 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등을 천연서열을 갖는 프레임워크 영역에 도입할 수 있다. 예를 들면, 아미노산을 치환한 FR을 갖는 항체의 항원으로서의 결합활성을 측정하고 평가함으로써 목적하는 성질을 갖는 변이 FR서열을 선택할 수 있다(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

[0138] 한편, 본 발명에서 항체에 사용되는 정상영역은 특별히 한정되지 않고, 어떠한 정상영역이 사용되어도 된다. 본 발명에서 항체에 사용되는 바람직한 정상영역은, 예를 들어, 인간 유래의 정상영역(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, C 카파, C 람다 유래의 정상영역 등)을 포함한다. 하나 이상의 아미노산이 인간 유래의 정상영역에서 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 인간 유래의 중쇄 정상영역은, 예를 들어, 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 포함하는 반면, 바람직한 인간 유래의 경쇄 정상영역은, 예를 들어, 서열번호:34(VL1)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:35(VL3)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역, 서열번호:36(VL5)의 아미노산 서열을 갖는 정상영역을 포함한다.

[0139] 또한, 하나 이상의 아미노산은 전술한 CDR서열에서 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등이 될 수 있다. 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 후의 CDR서열은, 결합활성, 중화활성, 안정성, 면역원성 및/또는 약물동태에 관한 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 이하, 더욱 바람직하게는 2 아미노산 이하, 보다 바람직하게는 1 아미노산이다.

[0140] 상기 항체의 각각의 가변영역은 항인간 IL-6 수용체와 반응하는 분자의 일부로서 사용될 수 있다. 상기 가변영역은 또한 하나 이상(예를 들면, 5 아미노산 이하, 바람직하게는 3 아미노산 이하)의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 하나 이상의 아미노산 잔기를 목적의 다른 아미노산으로 치환하는 방법은, 예를 들면, 전술한 방법을 포함한다.

[0141] 또한 본 발명은, 전술한 가변영역을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0142] 상기 항체의 각각의 중쇄 및 경쇄는 항인간 IL-6 수용체와 반응하는 분자의 일부로서 사용될 수 있다. 이들 중쇄 및 경쇄가 사용된 항인간 IL-6 수용체 항체는, 우수한 결합활성, 우수한 약물동태, 우수한 안전성, 저감된 면역원성, 및/또는 우수한 물성을 갖는다.

[0143] 이러한 중쇄 및 경쇄는 하나 이상(예를 들면 10 아미노산 이하, 바람직하게는 5 아미노산 이하, 더욱 바람직하게는 3 아미노산 이하)의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입을 포함할 수 있다. 하나 이상의 아미노산 잔기를 목적의 다른 아미노산으로 치환하는 방법은, 예를 들면, 전술한 방법을 포함한다.

[0144] 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입은 가변영역, 정상영역, 또는 모두에 대해 행해질 수 있다.

[0145] 또한 본 발명은 전술한 중쇄 및 경쇄를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0146] 본 발명에서 항체는 바람직하게는 인간화(humanized) 항체이다.

[0147] 인간화 항체는 재구성(reshaped) 인간 항체로도 칭명된다. 이러한 인간 항체는 인간 이외의 포유동물 유래의 상보적-결정 부위(CDR)를 인간 항체의 CDR로 그래프팅함으로써 취득된다. 상기 항체의 제조를 위한 일반적인 유전자 재조합 기술은 또한 공지되어 있다(유럽특허출원 공개번호 EP 125023호 공보, WO 96/02576호 공보 참조).

[0148] 구체적으로는, 예를 들면, 목적의 CDR과 목적의 프레임워크 영역(FR)을 연결하도록 설계한 DNA 서열은, CDR 및 FR 양쪽의 말단영역에 오버랩되는 부분을 갖도록 제작한 수개의 올리고 뉴클레오티드를 프라이머로서 사용하여, PCR법에 의해 합성한다(WO98/13388호 공보에 기재된 방법을 참조). 인간화 항체는 얻어진 DNA를 인간 항체 정상영역 또는 인간 항체 정상영역 개변체를 코딩하는 DNA와 연결하고, 이를 발현 벡터에 삽입하고, 상기 벡터를 숙주에 도입하여 상기 항체를 생산함으로써 얻어진다(유럽특허출원 공개번호 EP 239400, 국제특허출원 공개번호 WO 96/02576 참조).

[0149] CDR과 연결되는 인간 항체의 프레임워크 영역은, CDR이 양호한 항원 결합부위를 형성하도록 선택된다. 필요에 따라, 아미노산 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입 등을 항체 가변영역의 프레임워크 영역에 도입할 수 있다.

[0150] 인간 항체 정상영역 또는 인간 항체 정상영역에서 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 인간 항체 정상영역 개변체를 인간화 항체의 정상영역으로 사용할 수 있다.

- [0151] 예를 들면 H 사슬의 경우는, C 감마 1, C 감마 2, C 감마 3, C 감마 4, C 뮤, C 델타, C 알파 1, C 알파 2, C 엡실론을, L 사슬의 경우는 C 카파, C 람다를 사용할 수 있다. C 카파의 아미노산 서열을 서열번호:38에, 당해 아미노산 서열을 코드하는 염기서열을 서열번호:37에 나타낸다. C 감마 1의 아미노산 서열을 서열번호:40에, 당해 아미노산 서열을 코드하는 염기서열을 서열번호:39에 나타낸다. C 감마 2의 아미노산 서열을 서열번호:42에, 당해 아미노산 서열을 코드하는 염기서열을 서열번호:41에 나타낸다. C 감마 4의 아미노산 서열을 서열번호:44에, 당해 아미노산 서열을 코드하는 염기서열을 서열번호:43에 나타낸다.
- [0152] 또한, 항체 안정성 또는 항체 생산 안정성을 개선하기 위해, 인간 항체 C영역을 수식할 수 있다. IgG, IgM, IgA, IgE 또는 IgD 같은 어떠한 아이소타입의 인간 항체는 항체 인간화에서 사용될 수 있으나, 본 발명에 IgG가 본 발명에서 바람직하게 사용된다. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등은 IgG로서 사용될 수 있다.
- [0153] 또한, 인간화 항체의 가변영역(예를 들면, CDR, FR) 및 정상영역 중의 아미노산을 제작 후 결실, 부가, 삽입하고/하거나 다른 아미노산으로 치환할 수 있다. 본 발명에서 상기 항체는 또한 아미노산 치환 등을 포함하는 인간화 항체도 포함한다.
- [0154] 본 발명에서 항체는, IL-6 수용체로의 결합활성 및/또는 중화활성을 갖는 한, IgG로 대표되는 2가 항체뿐 아니라, 1가 항체 또는 IgM으로 대표되는 다가 항체도 포함한다. 본 발명의 다가 항체는 항원 결합부위가 모두 동일한 다가 항체, 및 항원 결합부위의 모두 또는 일부가 상이한 다가 항체를 포함한다. 본 발명에서 상기 항체는, IL-6 수용체 단백질에 결합하는 한, 항체의 전장분자에 한정되지 않을 뿐만 아니라, 저분자화 항체 및 그의 수식물을 포함한다.
- [0155] 저분자화 항체는 전장항체(whole antibody, 예를 들면 whole IgG 등)의 일부분이 결손되어 있는 항체 단편을 포함하는 항체이고, 그들이 IL-6 수용체로의 결합활성 및/또는 중화활성을 갖고 전장항체(예를 들면, whole IgG 등)의 일부분이 결손되어 있는 항체 단편을 포함하는 한, 특별히 한정되지 않는다. 본 발명에서 저분자화 항체는, 그들이 전장항체의 일부분을 포함하는 한, 특별히 한정되지 않는다. 그러나, 저분자화 항체는 바람직하게는 VH 또는 VL을 포함하고, 특히 바람직하게는 VH 및 VL 모두를 포함한다. 본 발명에서 다른 바람직한 저분자화 항체는, 예를 들어, 항체 CDR을 포함하는 저분자화 항체를 포함한다. 저분자화 항체는 항체의 6개의 CDR 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.
- [0156] 본 발명에서 저분자화 항체는 바람직하게는 전장항체보다도 작은 분자량을 갖는다. 그러나, 저분자화 항체는 다량체, 예를 들면, 다이머, 트리머, 또는 테트라머를 형성할 수 있고, 따라서 이들의 분자량은 때때로 전장항체의 분자량보다 크다.
- [0157] 특히, 항체 단편은, 예를 들면, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv를 포함한다. 한편, 저분자화 항체는, 예를 들면, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv(single chain Fv), Diabody 및 sc(Fv)<sub>2</sub>(single chain(Fv)<sub>2</sub>)를 포함한다. 이들 항체의 다량체(예를 들면, 다이머, 트리머, 테트라머 및 폴리머)도 본 발명에서의 저분자화 항체에 포함된다.
- [0158] 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).
- [0159] 소화효소는, 항체 단편의 특정 위치를 절단하여, 아래 나타낸 특정 구조의 항체 단편을 부여한다. 유전자 공학 기술은 항체의 임의의 부분을 결실시키기 위해 상기 효소적으로 얻어진 항체 단편에 대해 적용될 수 있다.
- [0160] 상기 소화효소를 사용함으로써 취득된 항체 단편은 다음과 같다.
- [0161] 파파인 소화 : F(ab)<sub>2</sub> 또는 Fab
- [0162] 펩신 소화 : F(ab')<sub>2</sub> 또는 Fab'
- [0163] 플라스민 소화 : Facb
- [0164] 본 발명에서의 저분자화 항체는, 그들이 IL-6 수용체로의 결합활성 및/또는 중화활성을 갖는 한, 임의의 영역을 결실한 항체 단편을 포함한다.

- [0165] "다이아바디(diabody)"는, 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. 다이머를 구성하는 각각의 폴리펩티드 사슬에서, VL 및 VH는 일반적으로 동일한 사슬에서 링커에 의해 결합되어 있다. 일반적으로, 다이아바디에서의 링커는 VL 및 VH가 서로 결합할 수 없을 정도로 충분히 짧다. 구체적으로, 링커를 구성하는 아미노산 잔기의 수는, 예를 들면, 약 5 잔기이다. 따라서, 동일 폴리펩티드 사슬 상에 코딩되는 VL 및 VH는 단일 사슬 가변영역 단편(fragment)을 형성할 수 없고, 또 다른 단일 사슬 가변영역 단편과 다이머를 형성할 것이다. 그 결과, 다이아바디는 2개의 항원 결합부위를 갖는다.
- [0166] ScFv 항체는 VH 및 VL을 링커 등으로 결합함으로써 생산되는 단일 사슬 폴리펩티드이다(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883, Plueckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol.113, Resenbourg 및 Moore편, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994)). scFv의 H 사슬 V 영역 및 L 사슬 V 영역은 본 명세서에 기재된 어떤 항체로부터 유래될 수 있다. 상기 V 영역들을 연결하기 위한 펩티드 링커는 특별히 제한은 없다. 예를 들면, 약 3-25 잔기를 함유하는 임의의 단일 사슬 펩티드가 링커로서 사용될 수 있다. 구체적으로는, 후술하는 펩티드 링커 등을 사용하는 것이 가능하다.
- [0167] 상기 양 사슬의 V 영역들은, 예를 들면 상기한 바와 같은 PCR법에 의해 연결될 수 있다. 첫째, 전체 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 또는 아래 나타낸 DNA의 하나의 목적인 부분 아미노산 서열이 PCR법에 의해 V 영역들을 연결하는 주형으로서 사용된다.
- [0168] 항체의 H 사슬 또는 H 사슬 V 영역을 코딩하는 DNA 서열, 및
- [0169] 항체의 L 사슬 또는 L 사슬 V 영역을 코딩하는 DNA 서열.
- [0170] H 사슬과 L 사슬의 V 영역을 코딩하는 DNA는 증폭해야 하는 DNA의 양쪽 말단의 서열에 대응하는 서열을 갖는 한 쌍의 프라이머를 사용한 PCR법에 증폭된다. 이어서, 펩티드 링커부분을 코딩하는 DNA를 준비한다. 펩티드 링커를 코딩하는 DNA도 PCR에 의해 합성될 수 있다. 각각 합성된 V 영역의 증폭산물들을 연결하기 위해 사용될 수 있는 염기서열을 사용될 프라이머의 5' 말단측에 부가한다. 이어서, [H 사슬 V 영역 DNA]-[펩티드 링커 DNA]-[L 사슬 V 영역 DNA]에서의 각각의 DNA 및 어셈블리 PCR용 프라이머를 이용해서 PCR을 행한다.
- [0171] 어셈블리 PCR용 프라이머는, [H 사슬 V 영역 DNA]의 5' 말단측에 어닐링하는 프라이머 및 [L 사슬 V 영역 DNA]의 3' 말단측에 어닐링하는 프라이머의 조합을 함유한다. 즉, 어셈블리 PCR용 프라이머는 합성될 scFv의 전장서열을 코딩하는 DNA를 증폭하기 위해 사용될 수 있는 프라이머 세트이다. 한편, 각각의 V 영역 DNA들을 연결하기 위해 사용될 수 있는 염기서열을 상기 [펩티드 링커 DNA]에 부가한다. 이어서, 이들 DNA를 연결하고, 다음으로 어셈블리 PCR용 프라이머를 이용하여 결과적으로 scFv의 전장이 증폭산물로서 생성된다. 일단 scFv를 코딩하는 DNA가 제작되면, 이들 DNA를 함유하는 발현 벡터 및 그 발현 벡터에 의해 형질전환된 재조합 세포를 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다. 또한, scFv는 생성되는 재조합 세포를 배양함으로써 상기 scFv를 코딩하는 DNA의 발현을 통해 취득할 수 있다.
- [0172] 결합되는 VH 및 VL의 순서는 특별히 한정되지 않으며, 그들은 임의의 순서로 나열될 수 있다. 나열의 예는 아래 열거되어 있다.
- [0173] [VH] 링커 [VL]
- [0174] [VL] 링커 [VH]
- [0175] sc(Fv)<sub>2</sub>는, 링커 등을 이용하여 2개의 VH 및 2개의 VL을 결합함으로써 제작한 단일 사슬 저분자화 항체이다(Hudson et al, J Immunol. Methods 1999; 231: 177-189). Sc(Fv)<sub>2</sub>는, 예를 들면, 링커를 이용하여 scFv를 연결함으로써 제작할 수 있다.
- [0176] 바람직하게는, 항체의 2개의 VH 및 2개의 VL을 단일 사슬 폴리펩티드의 N 말단측으로부터 VH, VL, VH 및 VL([VH] 링커 [VL] 링커 [VH] 링커 [VL])의 순으로 나열하나, 2개의 VH와 2개의 VL의 순서는 상기 배치에 한정되지 않고, 이들을 임의의 순서로 나열해도 된다. 나열의 예는 아래 열거되어 있다.
- [0177] [VL] 링커 [VH] 링커 [VH] 링커 [VL]
- [0178] [VH] 링커 [VL] 링커 [VL] 링커 [VH]

- [0179] [VH] 링커 [VH] 링커 [VL] 링커 [VL]
- [0180] [VL] 링커 [VL] 링커 [VH] 링커 [VH]
- [0181] [VL] 링커 [VH] 링커 [VL] 링커 [VH]
- [0182] 저분자 항체 VH 또는 VL의 아미노산 서열은 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입을 함유할 수 있다. 또한, VH 및 VL이 회합되는 경우 항원 결합활성을 갖는 한, 일부를 결손시키거나, 다른 폴리펩티드를 첨가해도 된다. 또한, 가변영역은 키메라화 또는 인간화될 수 있다.
- [0183] 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.
- [0184] 본 발명에 있어서 바람직한 링커는 펩티드 링커이다. 펩티드 링커의 길이는 특별히 한정되지 않고, 목적에 따라 당업자가 적절히 그 길이를 선택할 수 있다. 통상의 길이는 1~100 아미노산, 바람직하게는 3~50 아미노산, 더욱 바람직하게는 5~30 아미노산, 특히 바람직하게는 12~18 아미노산(예를 들면, 15 아미노산)이다.
- [0185] 펩티드 링커의 아미노산 서열은 다음 서열을 포함한다.
- [0186] Ser
- [0187] Gly · Ser
- [0188] Gly · Gly · Ser
- [0189] Ser · Gly · Gly
- [0190] Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:45)
- [0191] Ser · Gly · Gly · Gly(서열번호:46)
- [0192] Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:47)
- [0193] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호:48)
- [0194] Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:49)
- [0195] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호:50)
- [0196] Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:51)
- [0197] Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호:52)
- [0198] (Gly · Gly · Gly · Gly · Ser(서열번호:47))<sub>n</sub>
- [0199] (Ser · Gly · Gly · Gly · Gly(서열번호:48))<sub>n</sub>
- [0200] 여기서, n은 1 이상의 정수이다.
- [0201] 펩티드 링커의 아미노산 서열은 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기의 펩티드 링커의 길이를 결정하는 n은 통상 1~5, 바람직하게는 1~3, 보다 바람직하게는 1 또는 2이다.
- [0202] 합성화합물 링커(화학가교제)는 펩티드를 가교하는데 통상 사용되는 가교제, 예를 들면, N-히드록시숙신이미드(NHS), 디숙신이미딜 스베레이트(DSS), 비스(설포숙신이미딜)스베레이트(BS3), 디티오비스(숙신이미딜 프로피오네이트)(DSP), 디티오비스(설포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSP), 에틸렌글리콜 비스(숙신이미딜 숙시네이트)(EGS), 에틸렌글리콜 비스(설포숙신이미딜 숙시네이트)(설포-EGS), 디숙신이미딜 타르타르산염(DST), 디설포숙신이미딜 타르타르산염(설포-DST), 비스[2-(숙신이미도옥시카르보닐옥시)에틸]설포(BSOCOES) 및 비스[2-(설포숙신이미도옥시카르보닐옥시)에틸]설포(설포-BSOCOES)을 포함한다. 이들 가교제는 시판되고 있다.
- [0203] 일반적으로, 3개의 링커가 4개의 항체 가변영역을 결합하기 위해 요구된다. 상기 복수의 링커는 동일 또는 상이한 링커일 수 있다.
- [0204] 본 발명에서 항체는 항체의 아미노산 서열에 하나 이상의 아미노산 잔기가 부가된 항체도 포함한다. 또한, 본 발명에서 상체는 상기한 항체가 또 다른 펩티드 또는 단백질과 융합된 융합 단백질도 포함한다. 상기 융합 단백

질은 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 다른 펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 프레임에서 연결하여, 이러한 DNA를 발현 벡터에 도입하고, 이러한 벡터를 숙주에서 발현시킴으로써 제작할 수 있다. 당업자 공지 기술을 사용할 수 있다. 본 발명의 항체와 융합되는 상기 펩티드 또는 폴리펩티드는 공지된 펩티드, 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, 알파-tubulin의 단편, B-tag, 및 Protein C의 단편일 수 있다. 본 발명의 항체와 융합되는 폴리펩티드는, 예를 들면, GST(글루타티온-S-트랜스페라아제), HA(인플루엔자 응집소), 면역글로불린 정상영역, 베타-갈락토시다아제, 및 MBP(말토오스 결합 단백질)를 포함한다. 시판되고 있는 이들 펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 본 발명에서 기술된 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 융합될 수 있다. 융합 폴리펩티드는 이렇게 조제된 융합 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 조제할 수 있다.

[0205] 또한, 본 발명에서 기술된 항체는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 히알루론산을 포함하는 고분자물질, 방사성물질, 형광물질, 발광물질, 효소, 및 독신 같은 다양한 분자와 결합한 콘주게이트 항체일 수도 있다. 상기 콘주게이트 항체는 얻어진 항체를 화학적인 수식함으로써 얻을 수 있다. 항체의 수식방법은 이 분야에서 이미 확립되어 있다(예를 들면, US5057313 및 US5156840). 본 발명에서의 "항체"는 상기 콘주게이트 항체도 포함한다.

[0206] 또한, 본 발명에서의 항체는 개변된 당사슬을 갖는 항체도 포함한다.

[0207] 또한, 본 발명에서 사용되는 항체는 이중 특이성 항체(bispecific antibody)일 수 있다. 이중 특이성 항체란 동일한 항체 분자에서 상이한 에피토프를 인식하는 가변영역을 갖는 항체를 말한다. 본 발명에서 이중 특이성 항체는 IL-6 수용체 분자 상의 상이한 에피토프를 인식하는 이중 특이성 항체 또는 한쪽의 항원 결합부위가 IL-6 수용체를 인식하고 다른 한쪽의 항원 결합부위가 또 다른 물질을 인식하는 이중 특이성 항체일 수 있다. IL-6 수용체를 인식하는 본 발명의 항체를 포함하는 이중 특이성 항체의 다른 쪽의 항원 결합부위가 결합하는 항원의 예는 IL-6, TNF 알파, TNFR1, TNFR2, CD80, CD86, CD28, CD20, CD19, IL-1알파, IL-베타, IL-1R, RANKL, RANK, IL-17, IL-17R, IL-23, IL-23R, IL-15, IL-15R, BlyS, lymphotoxin 알파, lymphotoxin 베타, 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-알파, VEGF, VEGFR, EGF, EGFR, CCR5, APRIL, 및 APRILR을 포함한다.

[0208] 이중 특이성 항체를 제작하기 위한 방법은 공지되어 있다. 이중 특이성 항체는, 예를 들면, 상이한 항원을 인식하는 2종류의 항체를 결합시킴으로써 제작할 수 있다. 결합되는 항체는 각각이 H 사슬 및 L 사슬을 갖는 1/2 분자 또는 H 사슬만을 함유하는 1/4 분자일 수 있다. 또는, 이중 특이성 항체를 생산하는 융합세포는 상이한 단일 클론항체를 생산하는 하이브리도마를 융합시킴으로써 제작할 수 있다. 또한, 이중 특이성 항체는 유전자공학적 기술에 의해 제작할 수 있다.

[0209] 아래 기술된 바와 같이, 본 발명에서 사용되는 항체는, 항체를 생성하기 위해 사용되는 세포 또는 숙주, 또는 정제방법에 따라, 아미노산 서열, 분자량, 등전점, 당사슬의 유무 및 형태가 상이할 수 있다. 그러나, 얻어진 항체가 본 발명에서 기술된 항체와 기능적으로 동등한 한, 이는 본 발명에 포함되는 것으로 고려되어야 한다. 예를 들면, 항체가 원핵세포, 예를 들면, 대장균에서 발현되는 경우, 메티오닌 잔기가 본래 항체의 아미노산 서열의 N 말단에 추가된다. 상기 항체는 또한 본 발명에서 기술되는 항체에도 포함한다.

[0210] 본 발명에서 항IL-6 수용체 항체 등의 폴리펩티드는 당업자에게 공지된 방법에 의해 제작될 수 있다.

[0211] 항IL-6 수용체 항체는, 예를 들면, 얻어진 항IL-6 수용체 항체의 서열을 토대로 당업자에게 공지된 유전자 재조합 기술에 의해 제작될 수 있다. 구체적으로, 항IL-6 수용체 항체는, IL-6 수용체를 인식하는 항체의 서열을 토대로 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 구축하고, 상기 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터에 도입한 후, 이를 적당한 숙주세포에서 발현시킴으로써 제작될 수 있다(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).

[0212] 따라서, 본 발명은 (i) 본 발명의 폴리펩티드, 또는 (ii) 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 제조방법을 제공하고, 여기서, 상기 방법은 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계를 포함한다.

- [0213] 보다 구체적으로, 본 발명은 아래 단계들을 포함하는, 본 발명의 폴리펩티드의 제조방법을 제공한다.
- [0214] (a) 본 발명의 폴리펩티드를 코드하는 유전자가 도입된 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하고,
- [0215] (b) 상기 유전자에 의해 코드되는 폴리펩티드를 취득한다.
- [0216] 상기 벡터의 예는 M13계 벡터, pUC계 벡터, pBR322, pBluescript, 및 pCR-Script를 포함한다. 또한, 목적 cDNA의 서브클로닝 및 잘라내기인 경우, 상기한 벡터 이외의 벡터의 예는 pGEM-T, pDIRECT, 및 pT7을 포함한다. 발현 벡터는 본 발명에서 기술된 항체를 생산하는데 특히 유용하다. 예를 들면, 발현 벡터가 대장균에서의 발현을 위한 경우, 상기 벡터는 대장균에서 그의 증폭을 허용하는 특징을 가져야 한다. 이외에, 숙주가 JM109, DH5 알파, HB101 또는 XL1-Blue 같은 대장균인 경우, 상기 벡터가 대장균에서의 그의 효율적인 발현을 허용하는 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), T7 프로모터 등을 가지는 것이 필수적이다. 이러한 벡터는 상기한 벡터 이외에 pGEX-5X-1(파마시아제), "QIAexpress system(퀴아젠제)", pEGFP, 및 pET(이 경우, 숙주는 T7 RNA 폴리머라아제를 발현하고 있는 BL21이 바람직하다)를 포함한다.
- [0217] 또한, 발현 플라스미드 벡터는 항체 분비를 위한 시그널 서열을 함유할 수 있다. 항체 분비를 위한 시그널 서열로서, pelB 시그널 서열(Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)은 대장균의 페리플라즈름으로 생산 시키기 위해 사용될 수 있다. 상기 벡터는, 예를 들면, 염화갈슘법 또는 전기천공법(electroporation)에 의해 숙주세포로 도입될 수 있다.
- [0218] 대장균용 벡터 이외에, 본 발명에서 기술한 항체를 제작하기 위한 벡터는, 예를 들면, 포유동물 유래의 발현 벡터(예를 들면, pcDNA3(인비트로젠사제), 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), 및 길초균 유래의 발현 벡터(예를 들면, pPL608, pKTH50)를 포함한다.
- [0219] 발현 플라스미드 벡터가 CHO세포, COS세포, NIH3T3세포 같은 동물세포에서의 발현을 위해 사용되는 경우, 이는 상기 세포에서의 발현을 위해 필수적인 프로모터, 예를 들면, SV40 프로모터(Mulligan 등, Nature (1979) 277, 108), MMLV-LTR 프로모터, EF1 알파 프로모터(Mizushima 등, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), 또는 CMV 프로모터를 가져야 한다. 상기 벡터가 형질전환된 세포의 선택을 위한 유전자(예를 들면, 약제(네오마이신, G418 등)에 의해 관별할 수 있는 약제내성 유전자)를 갖는다면 더욱 바람직하다. 이러한 특성을 갖는 벡터는, 예를 들면, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, 및 pOP13을 포함한다.
- [0220] 또한, 목적이 유전자를 안정적으로 발현시키고 세포 내에서의 유전자의 카피 수를 증폭하는 것인 경우, 핵산 합성경로에서의 CHO 세포 결손은 이러한 결손을 상보하는 DHFR 유전자를 갖는 벡터(예를 들면, pSV2-dhfr("Molecular Cloning 2nd edition" Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)) 등)를 도입하고 메토타렉세이트(MTX)를 이용하여 벡터를 증폭하는 방법이 사용될 수 있다. 또한, 목적이 유전자의 일과성 발현인 경우, 염색체 상에서 SV40 T 항원을 발현하는 유전자를 갖는 COS 세포를 사용하여 SV40의 복제 기점을 갖는 벡터(pcD 등)로 형질전환하는 방법을 사용할 수 있다. 또한, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 소 유두종 바이러스(BPV) 등으로부터 유래된 복제 개시점을 사용하는 것이 가능하다. 또한, 숙주세포계에서 유전자 카피 수 증폭을 위해, 발현 벡터는 선택 마커로서 아미노글리코시드 트랜스페라아제(APH) 유전자, 티미딘 키나아제(TK) 유전자, 대장균 크산틴구아닌 포스포리보실 트랜스페라아제(Ecogpt) 유전자, 디히드로엽산 환원효소(dhfr) 유전자 등을 포함할 수 있다.
- [0221] 본 발명에 기술된 생성 항체는 숙주세포 내 또는 세포 외(배지 등)로부터 단리되고, 실질적으로 순수하고 균일한 항체로서 정제될 수 있다. 항체는 항체 정제를 위한 통상의 분리 및 정제 방법을 이용하여 분리 또는 정제될 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 항체는 칼럼 크로마토그래피, 여과, 한외여과, 염석, 용매침전, 용매추출, 증류, 면역침강, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 등전점 전기영동법, 투석, 재결정 등을 적절히 선택하고 조합함으로써 분리 및 정제될 수 있다.
- [0222] 크로마토그래피로는, 예를 들면, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 겔 여과, 역상 크로마토그래피, 및 흡착 크로마토그래피를 포함한다(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1996). 이들 크로마토그래피는 역상 크로마토그래피, 예를 들면, HPLC 및 FPLC를 이용하여 행할 수 있다. 친화성 크로마토그래피에 사용되는 칼럼은 프로테인 A 칼럼 및 프로테인 G 칼럼을 포함한다. 프로테인 A를 이용한 칼럼의 예는 Hyper D, POROS, 및 Sepharose FF(GE Amersham Biosciences)를 포함한다. 본 발명은 또한 상기 정제방법을 사용하여 고도로 정제된 항체를 포함한다.

[0223] 언어진 항체의 IL-6 수용체 결합활성은 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 항체의 항원 결합활성을 측정하는 방법은, 예를 들면, ELISA(효소 결합 면역 흡착 측정법), EIA(효소 면역 측정법), RIA(방사 면역 측정법) 및 형광 항체법을 포함한다. 예를 들면, 효소 면역 측정법을 사용하는 경우, 항원을 코팅한 플레이트에 항체생산세포의 배양상청 및 정제항체 같은 항체 함유 시료를 첨가한다. 알칼리 포스파타아제 같은 효소로 표지한 2차 항체를 첨가하고, 플레이트를 인큐베이트한다. 세정한 후, p-니트로페닐인산 같은 효소 기질을 첨가하여 흡광도를 측정함으로써 항원 결합활성을 평가할 수 있다.

[0224] 의약 조성물

[0225] 본 발명은 유효성분으로서 전술한 폴리펩티드를 포함하는 의약 조성물을 제공한다. 본 발명의 의약 조성물은 관절류머티즘 같은 IL-6 관련 질환에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 유효성분으로서 상기한 항체를 포함하는, 관절류머티즘 같은 질환의 치료제도 제공한다. 대상이 되는 질환의 바람직한 예는, 이하에 한정되지는 않지만, 관절류머티즘, 약년성 특발성 관절염, 전신형 약년성 특발성 관절염, 케슬만병, 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, 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 술후 염증을 포함한다.

[0226] "항IL-6 수용체 항체를 유효성분으로서 함유하는"이란, 항IL-6 수용체 항체를 유효성분의 적어도 하나로서 포함한다는 의미로, 그 함유율을 제한하는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 의약 조성물은, 전술한 폴리펩티드와 함께 다른 유효성분을 함유하고 있어도 된다.

[0227] 본 발명의 의약 조성물은 치료 목적뿐 아니라, 예방 목적으로 사용되어도 된다.

[0228] 본 발명에서 기재되어 있는 아미노산 서열에 포함되는 아미노산은 번역후에 수식될 수 있고, 예를 들면, N 말단의 글루타민(Gln) 잔기의 피로글루타미화에 의한 피로글루타민산(pGlu) 잔기로의 수식은 당업자에게 잘 알려진 수식이다. 그와 같이 아미노산이 번역후 수식된 경우도 당연히 본 발명에서 기재되어 있는 아미노산 서열에 포함된다.

[0229] 본 발명에 따라 항체에 결합하는 당사슬은 어떠한 구조여도 된다. 297번재(EU 넘버링) 당사슬은 어떤 당사슬구조(바람직하게는 푸코실화된 당사슬)일 수 있거나, 당사슬이 그 위치에 존재하지 않아도 된다(예를 들면, 이는 대장균에서 항체를 생산하거나 어떠한 당사슬도 297번재(EU 넘버링)에 결합하지 않도록 개변함으로써 달성될 수 있다).

[0230] 본 명세서에서 인용된 모든 선행기술문헌은 참조로써 본 명세서에 포함된다.

[0231] [실시예]

[0232] 이하 본 발명을 실시예의 도움에 의해 설명하나, 본 발명은 이들 실시예에 제한되는 것은 아니라고 이해될 것이다.

[0233] [실시예 1]

[0234] TOCILIZUMAB의 IL-6 수용체로의 친화성을 향상시키는 가변영역 변이개소의 동정

[0235] IL-6 수용체에 대한 TOCILIZUMAB(H 사슬 WT-IgG1/서열번호:53, L 사슬 WT-kappa/서열번호:54)의 친화성을 향상시키기 위해, 변이가 도입된 CDR서열의 라이브러리를 제작하고 검토하였다. CDR 변이의 라이브러리를 스크리닝하는 것은 IL-6 수용체에 대한 친화성을 향상시키는 변이를 발견하였다. 상기 변이를 도 1에 나타냈다. 이들 변이의 조합은 RDC-23(H 사슬 RDC23H-IgG1/서열번호:55, L 사슬 RDC-23L-kappa/서열번호:56) 같은 고친화성

TOCILIZUMAB를 제공했다. 가용형 IL-6 수용체에 대한 친화성 및 BaF/gp130을 이용하여 측정된 생물활성을 RDC-23 및 TOCILIZUMAB 사이에서 비교하였다(방법은 참고예 참조).

[0236] 친화성 측정 결과를 표 1에 나타내었다. BaF/gp130을 이용한 생물활성(IL-6 최종 농도는 30 ng/mL이었다) 측정 결과는 도 2에 나타내었다. 상기 결과는 RDC-23의 친화성이 TOCILIZUMAB과 비교하여 약 60배 더욱 높고, BaF/gp130의 100% 저해농도로서 표현된 활성이 약 100배 높음을 나타냈다.

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

[0237]

[실시예 2]

[0239] TOCILIZUMAB의 등전점 이하에 의한 약물동태를 향상시키는 개변의 동정

[0240] TOCILIZUMAB의 약물동태를 향상시키기 위해, IL-6 수용체로의 결합을 크게 저하시키지 않고 가변영역의 등전점을 저하시킬 변이개소를 식별하기 위해 검토를 행하였다. TOCILIZUMAB의 입체 구조 모델에 기초하여 추찰된 가변영역 변이개소의 스크리닝은 IL-6 수용체로의 결합을 크게 저하시키지 않고 가변영역의 등전점을 저하시킬 변이개소를 발견하였다. 이들을 도 3에 나타내었다. 이들 변이의 조합은, 예를 들어, H53/L28(H 사슬 H53-IgG1/서열번호:57, L 사슬 L28-kappa/서열번호:58)을 포함하는, 저감된 등전점을 갖는 TOCILIZUMAB을 제공했다. 가용형 IL-6 수용체에 대한 친화성, 등전점, 마우스에서의 약물동태, 및 BaF/gp130을 이용하여 측정된 생물활성을 H53/L28 및 TOCILIZUMAB 사이에서 비교하였다(방법은 참고예 참조).

[0241] 친화성 측정 결과는 표 2에 나타내었다. BaF/gp130을 이용하여 측정된 생물활성(IL-6 최종농도는 30 ng/mL이었다)의 측정 결과는 도 4에 나타내었다. 상기 결과는 H53/L28의 친화성이 TOCILIZUMAB과 비교하여 약 6배 더욱 높았고, BaF/gp130의 100% 저해농도로서 표현되는 활성이 수배 정도 향상되었음을 나타냈다.

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

[0242]

[0243] 당업자에게 공지된 등전점 전기영동에 의한 등전점 측정 결과는 TOCILIZUMAB 및 H53/L28의 등전점은 각각 약 9.3 및 약 6.5~6.7임을 나타냈다. 따라서, H53/L28의 등전점은 TOCILIZUMAB과 비교하여 약 2.7 저하되었다. 또한, VH/VL 가변영역의 이론 등전점을 GENETYX(GENETYX CORPORATION)를 이용하여 계산했다. 결과는 TOCILIZUMAB 및 H53/L28의 이론 등전점은 각각 9.20 및 4.52임을 나타냈다. 따라서, H53/L28의 이론 등전점은 TOCILIZUMAB과 비교하여 약 4.7 저하되었다.

[0244] 저하된 등전점을 갖는 개변 항체 H53/L28의 약물동태를 평가하기 위해, 정상 마우스에서의 TOCILIZUMAB 및 H53/L28의 약물동태를 비교했다. TOCILIZUMAB 또는 H53/L28의 단위 투여량을 마우스(C57BL/6J, 일본 찰스 리버)에 대해 1 mg/kg으로 정맥내(IV) 및 피하(SC)에 투여하여 혈장 중 농도추이를 평가하였다. 정맥 투여 또는 피하 투여 후 TOCILIZUMAB 및 H53/L28의 혈장 중 농도추이를 각각 도 5 및 6에 나타냈다. WinNonlin(Pharsight 사제)을 이용하여 얻어진 약물동태학적 파라미터(클리어런스(CL), 반감기(T1/2))를 표 3에 나타내었다. 정맥내 투여 후 H53/L28의 혈장 중 반감기(T1/2)는 TOCILIZUMAB의 약 1.3배로 연장된 반면, 클리어런스가 약 1.7배 저하되었다. 피하투여 후 H53/L28의 T1/2은 TOCILIZUMAB의 약 2배로 연장된 반면, 클리어런스는 약 2.1배 저하되었다. 따라서, 약물동태는 아미노산 치환에 의해 TOCILIZUMAB의 등전점을 저하시킴으로써 대폭 향상될 수 있음이 발견되었다.

표 3

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

[0245]

[0246]

[실시예 3]

[0247]

TOCILIZUMAB의 면역원성을 저하시키는 변이개소의 동정

[0248]

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

[0249]

TOCILIZUMAB의 가변영역 서열에 존재하는 T-cell 에피토프를 TEPITOPE(Methods, 2004 Dec;34(4):468-75)를 사용하여 해석하였다. 그 결과, L 사슬 CDR2는 HLA에 결합하는 T-cell 에피토프를 가진(즉, 높은 면역원성 리스크를 갖는 서열을 가진) 것이 예측되었다. 따라서, 안정성, 결합활성, 또는 중화활성을 저하시키지 않으면서 L 사슬 CDR2의 면역원성 리스크를 저감시킬 아미노산 치환을 검토하기 위해 TEPITOPE 해석을 수행했다.

[0250]

아래 기술된 바와 같이, 스크리닝 결과는 TOCILIZUMAB의 L 사슬 CDR2(서열번호:59)의 L51(Kabat 넘버링, Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)에서의 트레오닌을 글리신으로, L53에서의 아르기닌을 글루탐산(서열번호:60)으로 치환함으로써, 안정성, 결합활성, 또는 중화활성을 저하시키지 않으면서, 면역원성 리스크를 저감시킬 수 있음을 나타냈다.

[0251]

TOCILIZUMAB L 사슬 CDR2(서열번호:59)

[0252]

T-cell 에피토프 제거 TOCILIZUMAB L 사슬 CDR2(서열번호:60)

[0253]

[실시예 4]

[0254]

TOCILIZUMAB의 가변영역 프레임워크서열의 완전 인간화에 의한 면역원성 리스크의 저감

[0255]

TOCILIZUMAB의 인간화의 과정에서, 몇몇 마우스 서열이 프레임워크 서열에 잔존하여 결합활성을 유지한다(Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):851-6). 이러한 서열은 TOCILIZUMAB의 가변영역 서열의 H 사슬 FR1에서 H27, H28, H29 및 H30, 및 H 사슬 FR3에서 H71(Kabat 넘버링, Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH)이다. 잔존한 마우스 서열은 증가된 면역원성 리스크의 잠재적 원인이다. 따라서, 프레임워크 서열이 완전히 인간화되어 TOCILIZUMAB의 면역원성 리스크를 추가로 저하시킬 수 있는지를 검토하였다.

[0256]

상기 결과는 TOCILIZUMAB의 H 사슬 FR1(서열번호:61)을 아래 나타낸 인간화 H 사슬 FR1-A(서열번호:62)로 치환하고, TOCILIZUMAB의 H 사슬 FR3(서열번호:63)을 아래 나타낸 인간화 H 사슬 FR3(서열번호:64)로 치환함으로써, 안정성, 결합활성, 및 중화활성을 저하시키지 않으면서 TOCILIZUMAB의 전체 프레임워크를 완전히 인간화할 수 있음을 나타냈다.

[0257]

TOCILIZUMAB H 사슬 FR1(서열번호:61)

[0258]

인간화 H 사슬 FR1-A(서열번호:62)(Germline IMGT hVH\_4\_유래)

[0259]

TOCILIZUMAB H 사슬 FR3(서열번호:63)

[0260]

인간화 H 사슬 FR3(서열번호:64)(Mol. Immunol. 2007, 44(4):412-422 유래)

[0261]

[실시예 5]

[0262]

TOCILIZUMAB의 IL-6 수용체로의 pH 의존적 결합에 의한 약물동태 향상을 위한 변이개소의 동정

[0263]

TOCILIZUMAB의 약물동태를 향상시키는 방법 중 하나는 1분자의 TOCILIZUMAB이 복수 개의 IL-6 수용체를 반복해

서 결합 및 중화시키도록 분자를 개량하는 방법이다. TOCILIZUMAB은 막형 IL-6 수용체에 결합 후, 막형 IL-6 수용체에 결합한 채로 인터날리제이션(internalization)을 통해 세포 내의 엔도솜에 삽입되고, 그 후, 막형 IL-6 수용체에 결합한 채로 리소솜으로 이행하는 동시에 리소솜에 의해 분해되는 것으로 추정되고 있다. 구체적으로, 1분자의 TOCILIZUMAB은 통상적으로 1분자 또는 2분자의 막형 IL-6 수용체에(1가 내지는 2가로) 결합하고, 인터날리제이션 후, 리소솜으로 분해된다. 그러므로, 1분자의 TOCILIZUMAB은 1분자 또는 2분자의 막형 IL-6 수용체만 결합 및 중화할 수 있다.

[0264] 따라서, 본 발명자들은, TOCILIZUMAB의 결합이 중성 조건하에서는 유지되지만 산성 조건하에서는 크게 저하되는, pH 의존적 방식으로 결합하는 TOCILIZUMAB을 제작하는 것이 가능하다면, 도 7에 나타내는 바와 같이, pH 의존적 방식으로 결합하는 TOCILIZUMAB은 엔도솜 내에서 막형 IL-6 수용체(항원)로부터 해리되고, 엔도솜 내에 존재하는 FcRn에 결합시킴으로써 혈장 중으로 돌아갈 수 있을 것이라 생각했다. 일단 혈장 중으로 돌아가면, pH 의존적 방식으로 결합하는 TOCILIZUMAB은 다시 막형 IL-6 수용체에 결합할 수 있을 것이다. 혈장 중에서의 이러한 결합 및 엔도솜 내에서의 해리를 반복함으로써, 1분자의 TOCILIZUMAB이 복수 분자의 IL-6 수용체를 반복해서 결합 및 중화할 수 있는 것으로 생각되었다. 따라서, TOCILIZUMAB과 비교하여, pH 의존적 방식으로 결합하는 TOCILIZUMAB은 향상된 약물동태를 갖는 것으로 추정된다.

[0265] 엔도솜 내의 산성 조건하에서 TOCILIZUMAB을 IL-6 수용체로부터 해리시키기 위해, 그 결합은 중성 조건하에 비해 대폭 약화되어야 한다. 세포 표면에서는 강한 IL-6 수용체 결합이 중화를 위해 요구되므로, 세포 표면 pH인 pH 7.4에서, 항체는 TOCILIZUMAB과 동등하거나 더욱 강하게 IL-6 수용체에 결합해야 한다. 엔도솜 pH는 일반적으로 5.5~6.0인 것이 보고되어 있다(Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Feb;5(2):121-32.). 따라서, pH 의존적 방식으로 결합하는 TOCILIZUMAB이 pH 5.5~6.0에서 IL-6 수용체에 약하게 결합하도록 개량된다면, 이는 엔도솜 내의 산성 조건하에 있어서 IL-6 수용체로부터 해리될 것으로 예측된다. 구체적으로, pH 의존적 방식으로 결합하는 TOCILIZUMAB이 세포 표면의 pH인 pH 7.4에서 IL-6 수용체에 강하게 결합하도록 향상된다면, 1분자의 TOCILIZUMAB은 복수 분자의 IL-6 수용체를 결합 및 중화할 수 있고, 그러므로, 약물동태는 향상될 수 있다.

[0266] IL-6 수용체로의 TOCILIZUMAB의 결합에 pH 의존성을 부여하기 위해 가능한 방법은, 히스티딘 잔기의 pKa가 약 6.0~6.5이고 이의 프로톤의 해리의 상태가 중성(pH 7.4) 및 산성(pH 5.5~pH 6.0) 조건 사이에서 변화하기 때문에, 히스티딘 잔기를 TOCILIZUMAB의 가변영역으로 도입하는 것이다. 따라서, 스크리닝을 수행하여 TOCILIZUMAB의 입체 구조 모델에 기초하여 가변영역에서의 히스티딘 도입개소를 식별했다. 또한, TOCILIZUMAB의 선택된 가변영역 서열을 히스티딘으로 램덤하게 치환하여 스크리닝을 위한 라이브러리를 설계하였다. 상기 스크리닝은 pH 7.4에서의 IL-6 수용체에 대한 결합 및 IL-6 수용체로부터의 해리, 또는 pH 5.5 내지 5.8에서의 친화성의 저하를 지표로 이용하여 실시하였다.

[0267] 그 결과, 본 발명자들은 pH 의존성(pH 7.4에서 결합하고, pH 5.8에서 해리되는 성질)을 갖는 IL-6 수용체에 대한 TOCILIZUMAB의 결합을 부여하는 변이개소를 발견했다. 이를 도 8에 나타내었다. 도 8에서, H27에서의 티로신의 히스티딘으로의 치환은 CDR이 아니라 H 사슬 FR1에서의 변이이다. 그러나, Eur. J. Immunol. 1992. 22: 1719-1728에 기재되어 있는 바와 같이, H27에서의 히스티딘을 갖는 서열은 인간 서열(서열번호:65)이다. 따라서, 항체는 실시예 4와의 조합에서 다음 프레임워크를 이용함으로써 완전히 인간화될 수 있다.

[0268] 인간화 H 사슬 FR1-B(서열번호:65)

[0269] 예를 들어, H3pI/L73(H 사슬 H3pI-IgG1/서열번호:66, L 사슬 L73-kappa/서열번호:67)을 포함하는 변이의 조합은 pH 의존적 결합 특성을 갖는 TOCILIZUMAB을 제공할 수 있다. H3pI/L73 및 TOCILIZUMAB은 pH 7.4에서의 가용형 IL-6 수용체에 대한 친화성, pH 7.4 및 pH 5.8에서의 막형 IL-6 수용체로부터의 해리속도, BaF/gp130을 이용한 생물활성, 및 게잡이원숭이 및 인간 IL-6 수용체 형질전환 마우스에서의 약물동태를 비교하였다(방법은 참조에 참조).

[0270] pH 7.4에서의 가용형 IL-6 수용체에 대한 친화성 측정 결과를 표 4에 나타내었다. BaF/gp130을 이용하여 얻은 생물활성(IL-6 최종농도 30 ng/mL)에 대한 측정 결과를 도 9에 나타내었다. 이러한 결과는 H3pI/L73이 pH 7.4에서의 가용형 IL-6 수용체에 대한 친화성 및 BaF/gp130에 대한 활성의 관점에서 TOCILIZUMAB과 상응함을 나타냈다.

표 4

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

[0271]

[0272]

pH 7.4 및 pH 5.8에서의 막형 IL-6 수용체로부터의 TOCILIZUMAB 또는 H3pI/L73의 해리속도에 대한 측정 결과를 표 5에 나타내었다. TOCILIZUMAB과 비교하여, pH 5.8에서의 H3pI/L73의 해리속도는 더 빨라졌고, 막형 IL-6 수용체로부터의 해리속도의 pH 의존성이 약 2.6배 향상되었다.

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

[0273]

[0274]

TOCILIZUMAB 또는 H3pI/L73의 단위 투여량을 게잡이원숭이에 1 mg/kg으로 정맥내에 투여하고 혈장 중 농도추이를 평가하였다. TOCILIZUMAB 또는 H3pI/L73의 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 도 10에 나타내었다. 결과는 게잡이원숭이에서의 H3pI/L73의 약물동태가 TOCILIZUMAB과 비교하여 대폭 개선되었음을 나타냈다.

[0275]

TOCILIZUMAB 또는 H3pI/L73의 단위 투여량을 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 투여하고 혈장 중 농도추이를 평가하였다. TOCILIZUMAB 또는 H3pI/L73의 정맥내 투여 후의 혈장 중 농도추이를 도 11에 나타내었다. 결과는 인간 IL-6 수용체 형질전환 마우스에서의 H3pI/L73의 약물동태가 TOCILIZUMAB과 비교하여 대폭 개선되었음을 나타냈다.

[0276]

pH 의존적 결합 특성을 갖는 TOCILIZUMAB인 H3pI/L73은 TOCILIZUMAB과 비교하여 게잡이원숭이 및 인간 IL-6 수용체 형질전환 마우스에서의 약물동태가 대폭 개선된 것으로 나타났다. 이는, pH 7.4에서 항원과 결합하고 pH 5.8에서 항원으로부터 해리되는 성질을 부여함으로써, 하나의 단일 분자로 복수의 IL-6 수용체를 결합 및 중화하는 것이 가능함을 시사한다. H3pI/L73보다도 더욱 강한 pH 의존성을 갖는 IL-6 수용체 결합을 부여함으로써 약물동태가 추가로 개선될 수 있을 것이라고 또한 생각되었다.

[0277]

[실시예 6]

[0278]

TOCILIZUMAB의 정상영역의 최적화

[0279]

TOCILIZUMAB의 H 사슬 C 말단의 이질성의 저감

[0280]

IgG 항체의 H 사슬 C 말단서열의 이질성의 경우, C 말단 아미노산의 리신 잔기의 결손, 및 C 말단의 2 아미노산의 글리신 및 리신 양쪽의 결손에 의한 C 말단 카르복실기의 아미드화가 보고되어 있다(Anal Biochem. 2007 Jan 1;360(1):75-83.). TOCILIZUMAB에서도, 주성분은 염기서열에 존재하는 C 말단 아미노산의 리신이 번역후 수식에 의해 결손되는 서열이나, 리신이 잔존하는 부성분 및 글리신 및 리신 양쪽의 결손에 의한 C 말단 카르복실기가 아미드화되는 부성분도 또한 이질성에 공헌한다. 제작간 이질성과 관련된 목적 물질/관련 물질을 유지하면서 의약품으로서 대량으로 이들을 제작하는 것이 용이하지 않고 더욱 많은 비용이 들 것이다. 가능하다면, 단일 물질인 것이 요망되고, 의약품으로서 항체를 개발할 때 저감된 이질성을 갖는 것이 바람직하다. 따라서, 의약품으로서 항체를 개발할 때 H 사슬 C 말단의 이질성은 부존재하는 것이 바람직하다.

[0281]

C 말단 아미노산은 C 말단 아미노산 이질성이 저감되도록 개변되었다. 결과는 TOCILIZUMAB의 H 사슬 정상영역의 C 말단에서의 리신 및 글리신 잔기를 염기서열로부터 사전에 결손시킴으로써 C 말단 아미노산 이질성을 회피할 수 있음을 나타냈다. TOCILIZUMAB, C 말단의 리신 잔기가 결손된 TOCILIZUMAB(TOCILIZUMAB 델타K, H 사슬 WT-IgG1 델타K/서열번호:68, L 사슬 WT-카파/서열번호:54), 및 C 말단의 리신 및 글리신 잔기가 결손된

TOCILIZUMAB(TOCILIZUMAB 델타GK, H 사슬 WT-IgG1 델타GK/서열번호:69, L 사슬 WT-카파/서열번호:54)은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 이질성에 대해 평가하였다. ProPacWCX-10, 4×250 mm(Dionex) 칼럼을 사용했고, 이동상 A는 25 mmol/L MES/NaOH(pH 6.1)였고, 이동상 B는 25 mmol/L MES/NaOH, 250 mmol/L NaCl(pH 6.1)이었다. 적절한 유량 및 그라디언트(gradient)를 이용했다. 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 평가 결과를 도 12에 나타내었다. 결과는 H 사슬 정상영역의 C 말단에서의 리신 및 글리신 잔기 양쪽을 염기서열로부터 사전에 결손시킴으로써 C 말단 아미노산 이질성이 저감될 수 있음을 나타냈다. 인간 항체 정상영역 IgG1, IgG2 및 IgG4의 모든 C 말단서열은 EU 넘버링(참조: Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242) 447 및 446번째의 각각의 리신 및 글리신을 함유한다. 그러므로, 본 검토에서 발견된 C 말단 아미노산 이질성을 저감시키는 방법은 IgG2 및 IgG4 정상영역, 및 그들의 개변체에 적용 가능한 것으로 예측된다.

[0282] TOCILIZUMAB의 IgG2 아이소타입의 디설피드 결합 유래의 이질성의 저감

[0283] TOCILIZUMAB의 아이소타입은 IgG1이다. TOCILIZUMAB은 중화 항체이기 때문에, 면역원성 및 부작용의 관점에서, Fc 감마 수용체로의 결합은 바람직하지 않을 수 있다. Fc 감마 수용체 결합을 저하시키기 위한 가능한 방법은 IgG1 내지 IgG2 또는 IgG4로부터 IgG 항체의 아이소타입을 바꾸는 것이다(Ann Hematol. 1998 Jun;76(6):231-48). Fc 감마 수용체 I으로의 결합 및 약물동태의 관점으로부터, IgG2가 IgG4보다 더욱 바람직한 것으로 생각되었다(Nat Biotechnol. 2007 Dec;25(12):1369-72). 한편, 항체를 의약품으로서 개발할 때, 단백질의 물성, 특히, 균일성 및 안정성은 매우 중요하다. IgG2 아이소타입은 힌지영역의 디설피드 결합에 의해 매우 높은 이질성을 갖는 것으로 보고되어 있다(J Biol Chem. 2008 Jun 6;283(23):16206-15.). 제작간 디설피드 결합으로부터 유래되는 이질성과 관련된 목적 물질/관련 물질을 유지하면서 이들을 의약품으로서 대량으로 제작하는 것은 용이하지 않고 더욱 비용이 많이 들 것이다. 따라서, 단일 물질이 가능한 요망된다. 따라서, IgG2 아이소타입의 항체를 의약품으로서 개발할 때, 안정성을 저하시키지 않으면서 디설피드 결합으로부터 유래되는 이질성을 저감하는 것이 바람직하다.

[0284] IgG2 아이소타입의 이질성을 저감시키는 목적을 위해, 각종 개변체를 검토했다. 그 결과, IgG2 정상영역 서열 중, H 사슬의 CH1 도메인에서 131번째(EU 넘버링)의 시스테인 잔기 및 133번째(EU 넘버링)의 아르기닌 잔기를 각각 세린과 리신으로 치환하고, H 사슬의 upper hinge에서 219번째(EU 넘버링)의 시스테인을 세린으로 치환한 WT-SKSC 정상영역(서열번호:70)을 이용하여 안정성을 저하시키지 않으면서 이질성을 저감시킬 수 있을 것임을 발견했다. TOCILIZUMAB-IgG1(H 사슬 WT-IgG1/서열번호:53, L 사슬 WT-카파/서열번호:54), TOCILIZUMAB-IgG2(H 사슬 WT-IgG2/서열번호:71, L 사슬 WT-카파/서열번호:54), 및 TOCILIZUMAB-SKSC(H 사슬 WT-SKSC/서열번호:70, L 사슬 WT-카파/서열번호:54)를 조제하고, 이질성 및 안정성을 평가했다. 이질성은 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 평가했다. ProPac WCX-10(Dionex) 칼럼을 사용했고, 이동상 A는 20 mM Sodium Acetate(pH 5.0)였고, 이동상 B는 20 mM Sodium Acetate, 1 M NaCl(pH 5.0)였다. 적절한 유량 및 그라디언트를 이용하였다. 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 평가 결과를 도 13에 나타내었다. 안정성은 시차 주사형 열량 측정(DSC)(VP-DSC, Microcal사제)에 의해 측정된 열변성 중간온도(Tm값)에 기초하여 평가했다. 20 mM sodium acetate, 150 mM NaCl, pH 6.0 및 Fab 도메인의 Tm값에서의 DSC 측정 결과는 도 14에 나타내었다.

[0285] 상기 결과는 TOCILIZUMAB-IgG1과 비교하여 TOCILIZUMAB-IgG2에서 이질성이 현저히 증대되나, 이질성은 TOCILIZUMAB-SKSC로 함으로써 대폭 저감시킬 수 있을 것임을 나타냈다. 또한, TOCILIZUMAB-IgG1과 비교하여 TOCILIZUMAB-IgG2의 DSC는 낮은 안정성, 즉 Fab 도메인의 열변성 피크에서의 낮은 Tm을 갖는 솔더 피크(Fab\*) 성분을 부여했고, 이는 헤테로성분에 의한 것으로 추정된다. 그러나, TOCILIZUMAB-SKSC로 하는 경우, 헤테로성분에 의한 것으로 생각되는 상기 솔더 피크(낮은 Tm)는 소실됐고, Tm 값은 약 94℃였고, 이는 TOCILIZUMAB-IgG1 및 TOCILIZUMAB-IgG2의 Fab 도메인과 동등한 것이었다. 따라서, TOCILIZUMAB-SKSC는 높은 안정성을 갖는 것으로 발견되었다.

[0286] TOCILIZUMAB의 약물동태를 향상시키는 정상영역 변이개소의 동정

[0287] 전술한 바와 같이, TOCILIZUMAB의 아이소타입인 IgG1으로부터, C 말단의 이질성을 저감시키고, Fc 감마 수용체로의 결합성을 저감시키고 높은 안정성을 유지하면서 IgG2 아이소타입 정상영역을 갖는 항체의 이질성을 저감시키는 것을 달성할 수 있다. 나아가, 상기 정상영역은 또한 TOCILIZUMAB의 아이소타입인 IgG1보다도 우수한 약물동태를 갖는 것이 바람직하다.

[0288] IgG1 아이소타입 정상영역을 갖는 항체보다도 우수한 혈장 중 반감기를 갖는 정상영역을 발견하기 위해, 스크리닝을 수행하여 높은 안정성을 갖고 전술한 IgG2 아이소타입 정상영역을 갖는 항체에 관한 저감된 이질성을 갖는 TOCILIZUMAB-SKSC의 약물동태를 향상시키기 위한 변이개소를 식별했다. 그 결과, WT-M58(서열번호:72(아미노산

서열))을 발견했고, 여기서, WT-SKSC에 비교하여, 137번째(EU 넘버링)의 글루타민산을 글리신으로 치환하고, 138번째의 세린을 글리신으로 치환하고, 268번째의 히스티딘을 글루타민으로 치환하고, 355번째의 아르기닌을 글루타민으로 치환하고, 419번째의 글루타민을 글루타민산으로 치환하고, H 사슬 C 말단의 이질성을 저감시키기 위해 446번째의 글리신 및 447번째의 리신을 결손시킨다. 또한, IgG1에 대해, 434번째의 아스파라긴을 알라닌으로 치환한 WT-M44(서열번호:73(아미노산 서열))를 제작하였다. 추가적으로, H 사슬 C 말단의 이질성을 저감시키기 위해, M44로부터 446번째의 글리신 및 447번째의 리신을 결손시킴으로써 WT-M83(서열번호:74(아미노산 서열))을 제작하였다. 또한, WT-M58에서, 434번째의 아스파라긴을 알라닌으로 치환함으로써 WT-M73(서열번호:75(아미노산 서열))을 제작하였다.

[0289] TOCILIZUMAB-M44(H 사슬 WT-M44/서열번호:73, L 사슬 WT-kappa/서열번호:54), TOCILIZUMAB-M58(H 사슬 WT-M58/서열번호:72, L 사슬 WT-kappa/서열번호:54) 및 TOCILIZUMAB-M73(H 사슬 WT-M73/서열번호:75, L 사슬 WT-kappa/서열번호:54)을 조제하고, 인간 FcRn으로의 친화성 및 인간 FcRn 형질전환 마우스에 의한 약물동태의 평가를 행하였다(방법은 참고에 참조).

[0290] TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73의 인간 FcRn으로의 결합을 Biacore를 이용하여 평가했다. 표 6에 나타내는 바와 같이, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73의 결합은 TOCILIZUMAB-IgG1보다도 각각 약 2.7배, 약 1.4배 및 약 3.8배 정도 우수하였다.

표 6

	KD ( $\mu$ M)
TOCILIZUMAB-IgG1	1.62
TOCILIZUMAB-M44	0.59
TOCILIZUMAB-M58	1.17
TOCILIZUMAB-M73	0.42

[0291]

[0292] TOCILIZUMAB-IgG1, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73은 인간 FcRn 형질전환 마우스에서의 그들의 약물동태에 대해 평가했다. 그 결과는 도 15에 나타내었다. 도 15에 나타내는 바와 같이, TOCILIZUMAB-M44, TOCILIZUMAB-M58 및 TOCILIZUMAB-M73은 모두 TOCILIZUMAB-IgG1과 비교하여 향상된 약물동태를 보이는 것으로 발견되었다. 약물동태를 향상시키는 효과는 인간 FcRn으로의 결합능과 상관되었다. 특히, 28일 후 혈장 중 TOCILIZUMAB-M73의 농도는 TOCILIZUMAB-IgG1과 비교하여 약 16배였다. 따라서, 개선되어 있던 것으로부터, M73의 정상영역을 갖는 항체는 IgG1의 정상영역을 갖는 항체와 비교하여 대폭 향상된 약물동태를 갖는 것으로 또한 추정되었다.

[0293] [실시에 7]

[0294] PK/PD가 개선된 완전 인간화 IL-6 수용체 항체의 제작

[0295] 상기 실시예에서 발견된 TOCILIZUMAB의 가변영역 및 정상영역에서 복수의 변이를 조합함으로써 TOCILIZUMAB 개변체를 제작했다. 각종 스크리닝으로부터 발견된 완전 인간화 IL-6 수용체 항체는 Fv3-M73(H 사슬 VH4-M73/서열번호:25, L 사슬 VL1-kappa/서열번호:28), Fv4-M73(H 사슬 VH3-M73/서열번호:26, L 사슬 VL3-kappa/서열번호:29), 및 Fv5-M83(H 사슬 VH5-M83/서열번호:27, L 사슬 VL5-kappa/서열번호:30)이었다.

[0296] 제작한 Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83의 IL-6 수용체로의 친화성을 TOCILIZUMAB과 비교하였다(방법은 참고에 참조). 이들 항체의 pH 7.4에서의 가용형 IL-6 수용체에 대한 친화성은 표 7에 나타내었다. 또한, 이들의 BaF/gp130 중화활성을 TOCILIZUMAB 및 대조(참고예에 기술된 공지된 공지의 고친화성 항IL-6 수용체 항체, US 2007/0280945에 기술된 VQ8F11-21 hIgG1)과 비교하였다(방법은 참고에 참조). BaF/gp130을 이용하여 이들 항체의 생물활성을 측정함으로써 얻은 결과를 도 16(IL-6 최종농도가 300 ng/mL인 TOCILIZUMAB, 대조 및 Fv5-M83) 및 도 17(IL-6 최종농도가 30 ng/mL인 TOCILIZUMAB, Fv3-M73 및 Fv4-M73)에 나타내었다. 표 7에 나타난 바와 같이, Fv3-M73 및 Fv4-M73은 TOCILIZUMAB과 비교하여 약 2~3배 높은 친화성을 갖는 반면, Fv5-M83은 TOCILIZUMAB과 비교하여 약 100배 높은 친화성을 나타내었다(Fv5-M83의 친화성을 측정하는 것이 곤란하였기 때문에, 대신 IgG1 타입 정상영역을 갖는 Fv5-IgG1(H 사슬 VH5-IgG1/서열번호:76, L 사슬 VL5-kappa/서열번호:30)을 사용하여 친화성을 측정하였고, 정상영역은 일반적으로 친화성에 영향을 미치지 않는 것으로

생각된다). 또한, 도 17에 나타난 바와 같이, Fv3-M73 및 Fv4-M73은 TOCILIZUMAB과 비교하여 약간 더 강한 활성을 나타낸다. 도 16에 나타난 바와 같이, Fv5-M83은 50% 저해농도 측면에서 TOCILIZUMAB과 비교하여 100배 이상의 매우 강한 활성을 가진다. Fv5-M83은 또한 50% 저해농도 측면에서 대조(공지의 고친화성 항IL-6 수용체 항체)보다 약 10배 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

[0297]

[0298]

pH 7.4 및 pH 5.8에서 막형 IL-6 수용체로부터의 TOCILIZUMAB, Fv3-M73, 및 Fv4-M73의 해리속도를 측정했다. 표 8(방법은 참고예 참조)에 나타난 결과에 의해 보여지는 바와 같이, 막형 IL-6 수용체로부터의 Fv3-M73 및 Fv4-M73의 해리속도의 pH 의존성은 TOCILIZUMAB과 비교하여 각각 11배 및 10배 향상되었다. 실시예 5에 기술된 H3pI/L73과 비교하여 해리속도의 pH 의존성의 대폭 향상은 Fv3-M73 및 Fv4-M73의 약물동태가 H3pI/L73과 비교하여 대폭 향상될 것임을 시사했다.

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

[0299]

[0300]

당업자에게 공지된 방법을 이용하여 등전점 전기영동에 의해 TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83의 등전점을 측정했다. 결과는 등전점이 TOCILIZUMAB의 경우 약 9.3, 대조의 경우 약 8.4~8.5, Fv3-M73의 경우 약 5.7~5.8, Fv4-M73의 경우 약 5.6~5.7, 그리고 Fv5-M83의 경우 5.4~5.5였다. 따라서, 각 항체는 TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여 대폭 저하된 등전점을 가졌다. 또한, 가변영역 VH/VL의 이론 등전점을 GENETYX(GENETYX CORPORATION)에 의해 계산했다. 결과는 이론 등전점이 TOCILIZUMAB의 경우 9.20, 대조의 경우 7.79, Fv3-M73의 경우 5.49, Fv4-M73의 경우 5.01, Fv5-M83의 경우 4.27이었다. 각 항체는 TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여 대폭 저하된 등전점을 가졌다. 등전점을 저하시킴으로써 약물동태가 개선되는 것이 실시예 2에 나타내어져 있기 때문에, Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83의 약물동태는 TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여 향상되는 것으로 생각되었다.

[0301]

TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83의 가변영역 서열에서의 T-cell 에피토프를 TEPITOPE(Methods. 2004 Dec;34(4):468-75)를 사용하여 해석했다. 그 결과, 실시예 3에 나타난 바와 같이, TOCILIZUMAB은 대수가 HLA에 결합할 수 있는 T-cell 에피토프를 갖는 것으로 예측되었다. 반대로, Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83에서 T-cell 에피토프에 결합할 것으로 예측되는 서열의 수는 대폭 감소되었다. 또한, Fv3-M73, Fv4-M73 또는 Fv5-M83의 프레임워크는 어떠한 마우스 서열도 갖지 않고, 따라서 완전 인간화된다. 이는 면역원성 리스크가 TOCILIZUMAB과 비교하여 Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83에서 대폭 저감될 가능성을 시사되었다.

[0302]

[실시예 8]

[0303]

완전 인간화 IL-6 수용체 항체의 원숭이 PK/PD 시험

[0304]

TOCILIZUMAB, 대조, Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83 각각을 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. 결과는 Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83 각각이 TOCILIZUMAB

및 대조와 비교하여 게잡이원숭이에 있어서 현저히 개선된 약물동태를 보임을 나타냈다. 그 중에서도, Fv3-M73 및 Fv4-M73은 TOCILIZUMAB과 비교하여 대폭 개선된 약물동태를 나타냈다.

[0305] 막형 게잡이원숭이 IL-6 수용체를 중화시키는 각 항체의 약효를 평가했다. 게잡이원숭이 IL-6를 항체 투여 6일째부터 18일째(TOCILIZUMAB에 관해서는 3일째부터 10일째)까지 5 마이크로그램/kg을 요배부(腰背部)에 연일 피하투여했고, 24시간 후의 각 동물에서의 CRP 농도를 측정하였다(방법은 참고예 참조). 각 항체의 투여 후 CRP 농도추이를 도 19에 나타내었다. 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체를 중화시키는 각 항체의 약효를 평가하기 위해, 게잡이원숭이에서 비결합형이고 가용형인 게잡이원숭이 IL-6 수용체의 혈장 중 농도를 측정하였고, 비결합형이고 가용형인 IL-6 수용체율을 계산하였다(방법은 참고예 참조). 각 항체의 투여 후 비결합형이고 가용형인 IL-6 수용체율의 추이를 도 20에 나타내었다.

[0306] Fv3-M73, Fv4-M73, 및 Fv5-M83은 각각 TOCILIZUMAB 및 대조(공지의 고친화성 항IL-6 수용체 항체)과 비교하여 막형 게잡이원숭이 IL-6 수용체를 보다 지속적인 방식으로 중화했고, CRP의 증가를 장기간에 걸쳐 억제하였다. 또한, Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83은 각각 TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체를 보다 지속적인 방식으로 중화했고, 비결합형이고 가용형인 게잡이원숭이 IL-6 수용체의 증가를 장기간에 걸쳐 억제하였다. 이러한 발견은, 막형 및 가용형 IL-6 수용체의 중화를 지속하는 것에 있어서, Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83 모두가 TOCILIZUMAB 및 대조보다 우수함을 보여준다. 이들 중에서, Fv3-M73 및 Fv4-M73은 중화를 지속하는데 매우 우수하였다. 한편, Fv5-M83은 Fv3-M73 및 Fv4-M73보다 CRP 및 비결합형이고 가용형인 게잡이원숭이 IL-6 수용체를 더욱 강하게 억제했다. 따라서, Fv5-M83은 막형 및 가용형 IL-6 수용체를 중화하는데 Fv3-M73, Fv4-M73 및 대조(공지의 고친화성 항IL-6 수용체 항체)보다 더욱 강력한 것으로 생각되었다. 따라서, 게잡이원숭이의 인 비보(in vivo)에서의 결과는, 대조에 비해, IL-6 수용체에 대한 Fv5-M83의 더욱 강한 친화성 및 BaF/gp130 분석 시스템에서의 Fv5-M83의 더욱 강한 생물활성을 반영한다.

[0307] 이러한 발견은, TOCILIZUMAB 및 대조와 비교하여, Fv3-M73 및 Fv4-M73이 항IL-6 수용체 중화 항체로서의 그들의 작용을 지속하는데 매우 우수하고, 따라서 투여량 및 투여빈도를 대폭 저감시키는 것이 가능함을 시사한다. 또한, Fv5-M83은 그의 활성을 유지하는 것뿐만 아니라 항IL-6 수용체 중화 항체로서의 작용 강도의 관점에서 매우 우수한 것으로 나타났다. 따라서, Fv3-M73, Fv4-M73 및 Fv5-M83은 IL-6 안타고니스트 의약품으로서 유용할 것으로 예측된다.

[0308] [실시예 9]

[0309] Fv4-M73을 위한 안정한 완충제 종류의 선택

[0310] Fv4-M73은 전술한 바와 같이 제작한다. Fv4-M73은 실시예 6-7에 기술된 바와 같이 개선된 이질성, 안정성, 안전성 및 약물동태를 위해 인공적 정상영역 M73으로 구성되고, Fv4-M73의 (가장 안정한 완충제 종류 같은) 안정성 프로파일은 IgG1 같은 천연 정상영역으로 이루어진 항체와 상이할 수 있다. 천연 IgG1 정상영역으로 이루어진 항체는 일반적으로 히스티딘-아세테이트 완충제하에서 가장 안정적임이 보고되어 있습니다(WO/2006/0044908). 따라서, Fv4-M73에 대한 완충제 종류의 효과를 실험했다.

[0311] Fv4-M73을 (표 9에 기술된 바와 같이) pH 6.0을 갖는 상이한 4종의 완충 제제에서 37 mg/mL의 최종 농도로 제제화했다. 샘플을 40°C에서의 보관 조건하에서 2개월에 걸쳐 UV 검출로 사이즈 배제 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 분석했다. 상기 제제에서 형성된 응집물의 퍼센티지를 시간에 따라 표시하고 도 21에 나타낸다. 응집물의 퍼센티지 증가는 항체의 저장된 안정성에 대한 표시이다. 그러므로, 퍼센티지 증가는 상이한 완충제의 안정화 효과를 비교하기 위한 지표로서 사용되어 왔다.

[0312] 도 21에 나타난 바와 같이, 히스티딘-HCl 완충제(제제 A) 및 구연산염 완충제(제제 D)를 갖는 제제가 가장 안정했고, 아세테이트 완충제를 갖는 제제(제제 C)가 가장 불안정했다. 히스티딘-아세테이트 완충제(제제 B)는 히스티딘-HCl 완충제보다 약간 더 불안정했고, 이는 아세테이트 완충제의 불안정화 효과로 인한 것으로 추정된다.

[0313] 따라서, 인공적 정상영역을 갖는 Fv4-M73은 천연 IgG1 항체에 대해 가장 안정적인 완충제인 것으로 보고된 히스티딘-아세테이트 완충제하에서가 아니라 히스티딘-HCl 완충제 및 구연산염 완충제하에서 가장 안정하다고 밝혀졌다.

표 9

실시예 9에서 사용된 제제

mAb	농도 mg/mL	제제	완충제	NaCl	pH
Fv4-M73	37	A	20 mM 히스티딘-HCl	150 mM	6.0
		B	20 mM 히스티딘-아세트레이트		
		C	20 mM 아세트레이트		
		D	20 mM 구연산염		

[0314]

[0315] 방법

[0316] 사이즈 배제 크로마토그래피(SEC): 사이즈 배제 크로마토그래피를 수행하여 항체 응집물 및 단편의 존재에 대해 항체 제제를 스크리닝하였다. 샘플을 사이즈 배제 G3000 SWXL 칼럼 (TOSOH)에 주입했다. 이동상은 유속 0.5 mL/분으로 등용적으로 이동하는 50 mM 인산나트륨, 300 mM 염화나트륨(pH 7.0)이었다. 용출된 단백질을 200 nM에서 UV 흡광에 의해 검출했다. 검출되는 모든 단백질 종의 상대 함량은 모든 다른 검출 피이크의 총 면적에 대한 생성물 피이크의 면적 퍼센트로서 기록했다. 항체 모노머 피이크보다 나중이지만 완충제 피이크보다 먼저 용출하는 피이크를 단편 퍼센타일에서 기록하는 반면 항체 모노머 피이크보다 먼저 용출하는 피이크는 응집물 퍼센타일에서 기록했다.

[0317] 샘플 조제: 샘플을 이동상으로 0.3 내지 2 mg/mL로 희석했고, 15 마이크로리터를 칼럼에 주입했다.

[0318] 음이온 교환 크로마토그래피: 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하여 이질성의 존재, 특히 탈아미노화의 존재 (탈아미드화로 메인 피이크 후 산성 종으로 용출하는 물질)에 대하여 항체 제제를 분석했다. 샘플을 40°C에서 DEAE-NPR 칼럼(TOSOH) 위로 주입했다. 이동상은 A) 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), B) 10 mM Tris-HCl, 500 mM 염화나트륨 (pH 7.5)이었고, 100% 이동상 A의 그라디언트로 이동하고, 30분 후에 70% 이동상 A 및 30% 이동상 B로, 1분 후 100% 이동상 B로 이동하였고, 이는 4분 동안 유지했고, 1.0 mL/분의 유속으로 칼럼을 세척했다. 용출된 단백질을 280 nM에서 UV 흡광에 의해 검출했다.

[0319] 샘플 조제: 샘플을 이동상으로 0.05 내지 0.33 mg/mL로 희석했고, 100 마이크로리터의 체적으로 칼럼에 주입했다.

[0320] [실시예 10]

[0321] 100 mg/mL에서 Fv4-M73의 안정성에 대한 pH, NaCl, 및 아르기닌-HCl의 효과

[0322] Fv4-M73을 (표 10에 기술된 바와 같이) 상이한 완충제 제제에서 100 mg/mL의 최종 shde도로 제제화했고, 샘플을 25°C 및 40°C에서 보관시, 또한 냉동-해동(-20°C에서 0.5일 동안 냉동 및 실온에서 30분 동안 해동)된 샘플에 대해 2개월에 걸쳐 UV 검출로 사이즈 배제 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 분석했다. 제제에 존재하는 응집물의 퍼센티지 및 25°C 및 40°C에서 2//4/8주-보관 후 초기값으로부터 증가된 응집물의 퍼센티지를 도 22 내지 25에 나타낸다. 응집물의 함량의 증가는 저감된 안정성에 대한 표시이다.

표 10

실시예 10에서 사용된 제제

완충제		20mM 히스티딘 -HCl			20mM 구연산염		
NaCl		50mM	150mM	50mM	50mM	150mM	50mM
아르기닌 -HCl		-	-	100mM	-	-	100mM
대상 pH	4.5	4.3	4.3	4.0	4.3	4.3	4.5
	5.0	4.9	4.9	5.0	4.8	4.9	4.8
	5.5	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
	6.0	6.0	5.8	5.8	6.0	5.9	5.7
	6.5	6.4	6.3	6.3	6.2	6.2	6.2
	7.0	6.6	6.7	6.6	6.5	-	6.8

실제 수치 (pH)

[0323]

[0324] 도 26에 기술된 저분자량 종(LMW)을 산성 또는 염기성 조건하에서 경첩 영역 같이 약한 지점에서의 펩티드 결합의 직접 가수분해의 결과인 것으로 추정한다. 이는 특히 고온에서의 액상 제제에서 단일클론 항체에 대해 공통적이다. 염기성 조건하에서 증가되고 도 27에 기술되는, 약 22.5 내지 26분 사이에 용출되는 산성 종을 승온 및 염기성 pH 하에서 항체를 배양한 후 더욱 산성인 종을 관찰함으로써 단일클론 항체의 전하 이질성과 관련된 것으로 보고되어 왔던, 아스파라긴 잔기의 비효소 탈아미드화(항체의 일반적인 수식)의 결과로서 추정한다. 도 22-26의 결과를 고려할 때, Fv4-M73은 약 5.5 내지 6.3의 pH에서 응집 및 저감과 관련하여 요액 내에서 안정한 것으로 발견됐다. 최적의 안정성은 총 피이크 면적에 대한 메인 피이크 비와 관련하여 약 5.5 내지 6.3의 pH에서 관찰됐다.

[0325] 본 연구의 범위 내에서, 20 mM 완충제 및 50 mM NaCl을 함유하는 완충액에 100 mM NaCl을 첨가하는 것(20 mM 완충제, 150 mM NaCl)은 20 mM 완충제 및 50 mM NaCl(20 mM 완충제, 50 mM NaCl)을 함유하는 완충액으로서 동등하게 안정한 항체 용액을 유도했고, 이는 NaCl이 어떠한 안정화 효과도 갖지 않음을 제시한다. 반면, 20 mM 완충제 및 50 mM NaCl을 함유하는 완충액에 100 mM 아르기닌을 첨가하는 것이 응집물과 관련하여 항체 용액의 현저한 안정화 효과를 나타냈고, 이는 아르기닌-HCl이 현저한 안정화 효과를 가짐을 제시한다. 완충제와 관련하여, 용액 안정성은 구연산염 완충제보다 히스티딘-HCl 완충제를 사용하는 것이 약간 더 좋았다.

[0326] 도 29에 나타난 바와 같은 냉동-해동 연구("FT"는 냉동/해동 순환 수를 나타낸다)와 관련하여, 응집물의 현저한 함량은 제제에서 더욱 낮은 pH 또는 더욱 낮은 염 농도에서 관찰됐다. 20 mM 완충제 및 50 mM NaCl을 함유하는 완충액에 100 mM 아르기닌을 첨가하는 것(20 mM 완충제, 50 mM NaCl, 100 mM 아르기닌-HCl)은 100 mM NaCl을 첨가하는 것(20 mM 완충제, 150 mM NaCl)보다 응집물의 형성과 관련하여 더욱 효과적인 것으로 나타났고, 이는 아르기닌-HCl이 냉동-해동에 대한 현저한 안정화 효과를 가짐을 제시한다. 최적의 안정성은 100 mM 아르기닌-HCl을 함유하고 약 5.0 내지 6.6의 pH 범위에서 관찰됐다.

[0327] [실시에 11]

[0328] 100 mg/mL에서 Fv4-M73의 안정성에 대한 당 및 아르기닌-HCl의 효과

[0329] Fv4-M73을 (표 11에 기술된 바와 같이) 상이한 완충 제제에서 100 mg/mL의 최종 농도로 제제화했고, 샘플을 25 °C 및 40 °C에서 보관하고, 또한 특정 수의 냉동-해동 순환에 적용시켜 2개월에 걸쳐 UV 검출로 사이즈 배제 크로마토그래피 및 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 분석했다. 초기값으로부터 증가된 제제에 함유된 응집물의 퍼센티지가 시간에 따라 플롯되고 도 30 및 31에 나타난다. 퍼센트로 증가된 응집물의 함량은 저감된 안정성에 대한 표시이다.

[0330] 도 30 및 31에 나타난 바와 같이, 제제 F 및 G가 제제 H보다 낮은 안정성을 제공했고, 이는 수크로오스 및 트레할로오스가 25 °C 및 40 °C에서 보관된 액상 상태에서 아르기닌-HCl보다 낮은 안정성을 가짐을 제시하고, 냉동-해동에서는, 제제 F 및 G가 제제 H와 비교할만한 또는 더 높은 안정성을 제공했고, 이는 수크로오스 및 트레할로오스가 냉동-해동에서 현저한 안정성 효과를 나타냄을 제시한다.

**표 11**

실시에 11에서 사용된 제제

mAb	농도 mg/mL	제제	부형제	완충제	pH
Fv4-M73	100	E	없음	20 mM 히스티딘-HCl, 50 mM NaCl	6.5
		F	100 mM 수크로오스		
		G	100 mM 트레할로오스		
		H	100 mM 아르기닌-HCl		

[0331]

[0332] [실시에 12]

[0333] 200 mg/mL에서 Fv4-M73의 안정성; pH, 아르기닌-HCl 및 트레할로오스의 효과

[0334] Fv4-M73을 표 12에 기술된 바와 같은 6종의 상이한 제제에서 200 mg/mL의 최종농도로 제제화했다.

표 12

실시에 12에서 사용된 제제

mAb	농도 mg/mL	제제	완충제	Arg-HCl (mM)	부형제	pH
Fv4-M73	200	1	20 mM 히스티딘	100	-	5.5
		2				6.0
		3				6.5
		4		50		6.0
		5		150		
		6		100		

[0335]

[0336]

샘플을 각각 3개월 및 6개월 동안 5°C 및 -20°C에서 배양했다. 초기 샘플, 3개월 샘플 및 6개월 샘플을 실시예 9에 기술된 바와 같이 UV 검출로 사이즈 배제 크로마토그래피에 의해 분석했다. 3개월 및 6개월 후 상기 제제에 있어서 5°C에서 초기값으로부터 증가된 응집물의 퍼센티지는 도 32에 나타난다. 3개월 및 6개월 후 상기 제제에 있어서 -20°C에서 초기값으로부터 증가된 응집물의 퍼센티지는 도 33에 나타난다.

[0337]

도 32에 나타난 바와 같이, 5°C에서 보관된 액상 상태에서, Fv4-M73은 더욱 낮은 pH에서 명백히 더욱 안정했고 (pH 5.5에서 가장 안정했고 pH 6.5에서 가장 덜 안정했다), 더욱 높은 아르기닌 농도에서 더욱 안정했다(150 mM 아르기닌-HCl에서 가장 안정했고 50 mM 아르기닌-HCl에서 가장 덜 안정했다). 50 mM 트레할로오스의 첨가는 5°C에서 보관된 액상 상태에서 Fv4-M73에 대해 어느 정도의 안정화 효과를 나타냈다. 항체의 의약 액상 제제는 종종 5°C에서 보관되기 때문에, Fv4-M73을 위한 바람직한 액상 제제는 pH 5.5 내지 6.0의 히스티딘 완충제와 함께 적어도 100 mM 아르기닌-HCl을 함유해야 하고, 필요한 경우 추가의 안정화제를 함유한다.

[0338]

도 33에 나타난 바와 같이, -20°C에서 보관되는 냉동 상태에서, Fv4-M73은 더욱 높은 pH에서 더욱 안정한 경향을 보이고, 더욱 높은 아르기닌 농도에서 명백히 더욱 안정하다(150 mM 아르기닌-HCl에서 가장 안정하고 50 mM 아르기닌-HCl에서 가장 덜 안정하다). 50 mM 트레할로오스의 첨가는 -20°C에서 보관되는 냉동 상태에서 Fv4-M73에 대하여 현저한 안정화 효과를 나타냈다. 항체의 벌크 물질은 종종 -20°C 내지 -70°C에서의 냉동 상태에서 저장된다. 냉동 상태에서의 보관 및 이송의 비용을 고려할 때, -20°C 보관이 바람직하다. Fv4-M73의 -20°C에서의 보관을 위해 바람직한 벌크 물질 제제는 pH 5.5 내지 6.5의 히스티딘 완충제 및 (트레할로오스 같은) 당과 함께 적어도 100 mM 아르기닌-HCl을 함유해야 한다.

[0339]

[참고예]

[0340]

재조합 가용형 인간 IL-6 수용체의 조제

[0341]

항원인 인간 IL-6 수용체의 가용형 재조합 인간 IL-6 수용체는 이하와 같이 조제하였다. J.Biochem. 108, 673-676 (1990)에서 보고되어 있는 N 말단측 1번째에서 344번째의 아미노산 서열을 함유하는 가용형 인간 IL-6 수용체(Yamasaki 등, Science 1988 ; 241 : 825-828 (GenBank # X12830))를 정상(定常)적으로 발현하는 CHO 세포주를 제작하였다. 가용형 인간 IL-6 수용체를, 3개의 칼럼 크로마토그래피: Blue Sepharose 6 FF 칼럼 크로마토그래피, SR344에 대한 특이 항체를 고정된 칼럼을 이용하는 친화성 크로마토그래피 및 겔 여과 칼럼 크로마토그래피에 의해, SR344를 발현하는 CHO세포의 배양상청으로부터 정제하였다. 메인 피크로서 용출된 분획을 최종 정제 샘플로 사용하였다.

[0342]

재조합 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체(cIL-6R)의 조제

[0343]

올리고-DNA 프라이머를 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 제작하였다. 프라이머를 이용하는 PCR법 및 게잡이원숭이 췌장으로부터 조제된 cDNA를 주형으로 하여, 게잡이원숭이 IL-6 수용체 유전자 전장을 코딩하는 DNA 단편을 조제하였다. 얻어진 DNA 단편을 포유동물세포 발현 벡터로 삽입하고, 이러한 벡터를 사용하여 안정한 CHO 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 농축했다. Superdex200pg16/60 겔 여과 칼럼(GE 헬스케어 바이오사이언스) 상의 추가 정제를 통해, 가용형 게잡이원승이 IL-6 수용체(이하, cIL-6R)의 최종 정제 샘플을 획득하였다.

- [0344] 제조합 게잡이원승이 IL-6(cIL-6)의 조제
- [0345] 게잡이원승이 IL-6는 이하와 같은 과정에 의해 조제하였다. SWISSPROT Accession No.P79341 하에 등록되어 있는 212 아미노산을 코딩하는 염기서열을 제작하고, 포유동물세포 발현 벡터로 클로닝하였다. 생성된 벡터를 CHO세포에 도입함으로써 안정한 발현 세포주를 제작하였다(cyno. IL-6 생산 CHO세포). cyno. IL-6 생산 CHO세포의 배양액을 SP-Sepharose/FF 칼럼(GE 헬스케어 바이오사이언스)을 이용하여 정제 후, Amicon Ultra-15 Ultracel-5k(Millipore)로 농축했다. Superdex75pg26/60 겔 여과 칼럼(GE 헬스케어 바이오사이언스) 상의 추가 정제, 및 Amicon Ultra-15 Ultracel-5k(Millipore)에 의한 농축을 통해, 게잡이원승이 IL-6(이하, cIL-6)의 최종 정제 샘플을 획득하였다.
- [0346] 공지 고친화성 항IL-6 수용체 항체의 제작
- [0347] 공지의 고친화성 항IL-6 수용체 항체인 VQ8F11-21 hIgG1을 발현시키기 위해, 포유동물세포 발현용 벡터를 구축하였다. VQ8F11-21 hIgG1은 US 2007/0280945 A1(US 2007/0280945 A1, H 사슬 아미노산 서열:서열번호:77, L 사슬 아미노산 서열:서열번호:78)에 기술되어 있다. 항체 가변영역은 합성 올리고 DNA의 조합을 이용하는 PCR법(assembly PCR)에 의해 제작했고, 정상영역에 대해서는 IgG1을 사용하였다. Assembly PCR법에 의해 항체 가변영역 및 정상영역을 결합시킨 후, 이를 포유동물 발현용 벡터로 삽입하여, 목적의 H 사슬 및 L 사슬의 발현 벡터들을 제작하였다. 얻어진 발현 벡터의 염기서열은 당업자에게 공지된 방법에 의해 결정되었다. 실시예 1에 기술된 방법에 의해 상기 제작한 발현 벡터를 사용하여 고친화성 항IL-6 수용체 항체(이하, "대조"로 기재한다)를 발현 및 정제하였다.
- [0348] TOCILIZUMAB의 변이체의 제작, 발현 및 정제
- [0349] TOCILIZUMAB의 변이체는 첨부하는 설명서에 기재된 방법에 따라 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)를 사용하여 제작했다. 얻어진 플라스미드 단편을 포유동물세포 발현 벡터에 삽입하여, 목적의 H 사슬 및 L 사슬 발현 벡터들을 제작하였다. 얻어진 발현 벡터의 염기서열은 당업자에게 공지된 방법에 의해 결정하였다. 항체는 이하의 방법에 의해 발현시켰다. 인간 태아 신장암 유래 HEK293H 세포주(Invitrogen)를 10% Fetal Bovine Serum(Invitrogen)이 포함된 DMEM 배지(Invitrogen)에 현탁시켰다.  $5\sim 6 \times 10^5$  개/mL의 세포밀도로 접착세포용 디쉬(직경 10 cm, CORNING)의 각 디쉬 당 10 mL로 상기 세포를 파종하고, CO<sub>2</sub> 인큐베이터(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 하루 전체 낮밤 동안 배양했다. 배지를 흡인 제거하고, CHO-S-SFM-II(Invitrogen) 배지 6.9 mL를 첨가하였다. 조제한 플라스미드를 lipofection법에 의해 세포로 도입하였다. 얻어진 배양상청을 회수하고, 원심분리(약 2000 g, 5분간, 실온)하여 세포를 제거하고, 0.22 마이크로미터 필터 MILLEX(R)-GV(Millipore)를 통한 여과에 의해 멸균하여 배양상청을 얻었다. rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)를 사용하여 당업자에게 공지된 방법에 의해 얻어진 배양상청으로부터 항체를 정제하였다. 정제항체농도를 측정하기 위해, 분광광도계를 사용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다. PACE법에 의해 산출된 흡광계수를 사용하여 얻어진 값으로부터 항체농도를 산출하였다(Protein Science 1995 ; 4 : 2411-2423).
- [0350] 인간 gp130 발현 BaF3 세포주의 수립
- [0351] IL-6 의존 방식으로 증식하는 세포주를 얻기 위해, 이하에 기술한 과정에 의해, 인간 gp130을 발현한 BaF3 세포주를 수립하였다.
- [0352] 전장 인간 gp130 cDNA(Hibi 등, Cell 1990 ; 63 : 1149-1157(GenBank # NM\_002184))를 PCR에 의해 증폭하였고, 발현 벡터 pCOS2Zeo로 클로닝하여, pCOS2Zeo/gp130을 구축하였다. pCOS2Zeo는 pCHOI(Hirata 등, FEBS Letter 1994 ; 356 : 244-248)으로부터 DHFR 유전자 발현부위를 제거하고 Zeocin 내성 유전자를 삽입함으로써 구축되는 발현 벡터이다. 전장 인간 IL-6R cDNA를 PCR에 의해 증폭하고, pcDNA3.1(+)(Invitrogen)로 클로닝하여, hIL-6R/pcDNA3.1(+))를 구축하였다.
- [0353] pCOS2Zeo/gp130 10 마이크로그램을 PBS에 현탁한 BaF3세포( $0.8 \times 10^7$  cells)에 혼합한 후, Gene Pulser(Bio-Rad)를 사용하여 0.33 kV 및 950 마이크로 FD로 펄스를 가하였다. 전기천공처리에 의해 도입한 유전자를 갖는 BaF3세포를 0.2 ng/mL의 mouse interleukin-3(Peprotech) 및 10% Fetal Bovine Serum(이하 FBS, HyClone)이 포함된 RPMI1640 배지(Invitrogen)에서 하루 전체 낮밤 동안 배양하고, 100 ng/mL의 human interleukin-6(R&D

systems), 100 ng/mL의 human interleukin-6 soluble receptor(R&D systems) 및 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지를 가하여 선발하여, 인간 gp130 발현 BaF3 세포주(이하, BaF3/gp130)를 수립하였다. 이러한 BaF/gp130은 human interleukin-6(R&D systems) 및 가용형 인간 IL-6 수용체 존재하에서 증식하고, 따라서 항IL-6 수용체 항체의 증식 저해활성(또는, IL-6 수용체 중화활성)을 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0354] 인간 gp130 발현 BaF3세포(BaF/gp130)에 의한 생물활성 평가

[0355] IL-6/IL-6 수용체 의존 방식으로 증식하는 BaF3/gp130을 사용하여 IL-6 수용체 중화활성을 평가하였다. 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에서 3회 세정한 후, BaF3/gp130 세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL로 600 ng/mL 내지 60 ng/mL의 human interleukin-6(TORAY)(최종농도는 300 ng/mL 내지 30 ng/mL), 적당량의 가용형 인간 IL-6 수용체 및 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에 현탁시켰다. 세포 현탁액을 96웰 플레이트(CORNING)로 분주하였다(각 웰 당 50 마이크로리터). 다음으로, 정제한 항체를 10% FBS를 함유하는 RPMI1640로 희석했고, 각 웰에 첨가하였다(50 마이크로리터/웰). 상기 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 3일간 배양했다. WST-8 시약(Cell Counting Kit-8, 주식회사 도진 화학연구소)을 PBS로 2배로 희석했다. 상기 시약 20 마이크로리터를 각 웰에 첨가한 직후, SUNRISE CLASSIC(TECAN)을 사용하여 450 nm에서의 흡광도(참조파장 620 nm)를 측정하였다. 2시간 동안 배양한 후에, 재차 450 nm에서의 흡광도(참조파장 620 nm)를 측정하였다. 지표로서 2시간 동안의 흡광도 변화를 이용하여 IL-6 수용체 중화활성을 평가하였다.

[0356] Biacore에 의한 가용형 인간 IL-6 수용체로의 결합 평가

[0357] Biacore T100(GE Healthcare)을 사용하여, 항원 항체반응의 속도론적 해석을 행하였다. 아민 커플링법으로 센서 칩 상에 protein A 또는 protein A/G 또는 anti-IgG(감마-chain specific)F(ab')<sub>2</sub>를 적당량 고정화하고, pH 7.4에서 상기 칩 상에 목적의 항체를 결합시킨 후, pH 7.4에서 각종 농도로 조제한 가용형 IL-6 수용체를 분석물(analyte)로서 칩 상에 흘려보냄으로써, 가용형 인간 IL-6 수용체의 상호작용을 측정하였다. 모든 측정은 37°C에서 실시하였다. 키네틱 파라미터(kinetic parameter)인 결합속도상수 K<sub>a</sub>(1/Ms) 및 해리속도상수 K<sub>d</sub>(1/s)를 측정으로 얻어진 센서그램으로부터 산출하였다. 다음으로, 상기 속도 상수를 토대로 K<sub>D</sub>(M)를 산출하였다. 각 파라미터는 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)를 이용하여 산출하였다.

[0358] Biacore에 의한 막형 IL-6 수용체로의 pH 의존적 해리 평가

[0359] Biacore T100(GE Healthcare)을 사용하여 pH 5.8 및 pH 7.4에서의 막형 IL-6 수용체와의 항원항체반응을 관측하였다. 센서 칩 상에 고정화한 가용형 인간 IL-6 수용체로의 결합을 평가함으로써, 막형 IL-6 수용체로의 결합을 평가하였다. SR344를 당업자에게 공지된 방법에 의해 비오틴화하였다. 스트렙토아비딘 및 비오틴의 친화성을 토대로, 스트렙토아비딘을 매개로 비오틴화 가용형 인간 IL-6 수용체를 센서 칩 상에 고정화하였다. 모든 측정은 37°C에서 실시했다. 이동상의 버퍼는 10 mM MES(pH 5.8), 150 mM NaCl, 및 0.05% Tween20이었다. pH 의존적 결합을 나타내는 클론을 pH 7.4의 조건하에서 주입하여 가용형 인간 IL-6 수용체와 결합시켰다(주입 샘플의 버퍼는 10 mM MES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 및 0.05% Tween20). 다음으로, 이동상의 pH인 pH 5.8에서 각 클론의 pH 의존적 해리를 관측하였다. pH 5.8에서의 해리속도상수(K<sub>d</sub>(1/s))는 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)를 이용하여 pH 5.8에서 해리상만 피팅함으로써 산출했다. 상기 샘플 농도는 0.25 마이크로그램/mL였다. 결합은 10 mM MES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 및 0.05% Tween20에서 수행했고, 해리는 10 mM MES(pH 5.8), 150 mM NaCl, 및 0.05% Tween20에서 수행했다. 마찬가지로, pH 7.4에서의 해리속도상수(K<sub>d</sub>(1/s))는 Biacore T100 Evaluation Software(GE Healthcare)를 이용하여 pH 7.4에서 해리상만 피팅함으로써 산출했다. 샘플 농도는 0.5 마이크로그램/mL였다. 결합은 10 mM MES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 및 0.05% Tween20에서 수행했고, 해리는 10 mM MES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 및 0.05% Tween20에서 수행했다.

[0360] 인간 FcRn으로의 결합 평가

[0361] FcRn은 FcRn과 베타 2-microglobulin의 복합체이다. 공개되어 있는 인간 FcRn 유전자서열(J. Exp. Med. 180 (6), 2377-2381 (1994))을 토대로 올리고 DNA 프라이머를 제작하였다. 주형으로서 인간 cDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) 및 제작한 프라이머를 사용하여 PCR법에 의해 유전자 전장을 코드하는 DNA 단편을 조제하였다. 얻어진 DNA 단편을 주형으로 이용하여, PCR법에 의해 시그널영역을 함유하는 세포외영역(Met1-Leu290)을 코드하는 DNA 단편을 증폭했고, 동물세포 발현 벡터로 삽입하였다(인간 FcRn 아미노산서열/서열번호:79). 마찬가지로, 공개되어 있는 인간 베타 2-microglobulin 유전자서열(Proc. Natl. Acad. Sci.

U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002))을 토대로, 올리고 DNA 프라이머를 제작하였다. 주형으로서 인간 cDNA(Hu-Placenta Marathon-Ready cDNA, CLONTECH) 및 제작한 프라이머를 사용하여 PCR법에 의해 유전자 전장을 코딩하는 DNA 단편을 조제하였다. 주형으로서 얻어진 DNA 단편을 사용하여, PCR법에 의해 시그널영역을 포함하는 베타 2-microglobulin 전장(Met1-Met119)을 코딩하는 DNA 단편을 증폭했고, 포유동물세포 발현 벡터로 삽입하였다(인간 베타2-microglobulin 아미노산 서열/서열번호:80).

[0362] 가용형 인간 FcRn은 다음 과정에 의해 발현하였다. 인간 FcRn 및 베타 2-microglobulin을 위해 제작한 플라스미드를, lipofection법에 의해 10% FBS(Invitrogen)을 사용하여 인간 태아 신장암 세포 유래 HEK293H주(Invitrogen)에 도입하였다. 얻어진 배양상청을 회수하고, IgG Sepharose 6 Fast Flow(Amersham Bioscience)를 사용하여, (J Immunol. 2002 Nov 1;169(9):5171-80.)에 기술된 방법에 의해 정제한 후, HiTrap Q HP(GE Healthcare)에 의해 추가로 정제하였다.

[0363] 마우스에 있어서의 항체 혈장 중 농도의 측정

[0364] 마우스 혈장 중 항체농도는 당업자에게 공지된 방법에 따라 ELISA법에 의해 측정하였다.

[0365] 원숭이에서 혈장 중 항체 농도, CRP 농도, 비결합형이고 가용형인 IL-6 수용체를 측정하는 PK/PD 시험

[0366] 게잡이원숭이 혈장 중 농도는 당업자에게 공지된 방법에 따라 ELISA법에 의해 측정하였다.

[0367] CRP 농도는 사이어스 R CRP(간토 화학 주식회사)를 이용하여 자동분석장치(TBA-120FR, 도시바 메디컬시스템즈 주식회사)로 측정하였다.

[0368] 게잡이원숭이 혈장 중의 비결합형이고 가용형인 게잡이원숭이 IL-6 수용체 농도를 아래 기술한 과정에 의해 측정하였다. 게잡이원숭이의 혈장 30 마이크로리터를 0.22 마이크로미터의 필터컵(Millipore)에서 건조시킨 적량의 rProtein A Sepharose Fast Flow(GE Healthcare) 수지에 첨가함으로써 혈장 중의 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, 컵의 용액을 고속원심기로 스피ندا운하고 패스용액을 회수하였다. 패스용액은 protein A에 결합한 항인간 IL-6 수용체 항체-가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체 복합체를 함유하지 않는다. 그러므로, protein A 패스용액 중의 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체 농도를 측정함으로써, 비결합형이고 가용형인 IL-6 수용체 농도를 측정할 수 있다. 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체 농도는 가용형 인간 IL-6 수용체의 농도를 측정하기 위한 것으로서 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 측정했다. 전술한 바와 같이 제작한 가용형 게잡이원숭이 IL-6 수용체(cIL-6R)를 스탠다드로 사용했다. 비결합형이고 가용형인 IL-6 수용체율은 이하의 계산식에 의해 계산하였다.

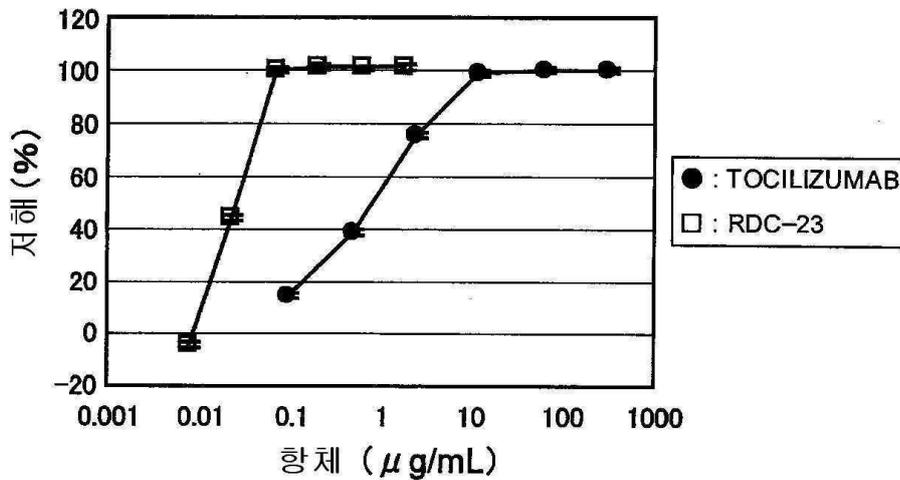
$$[0369] \frac{\text{항체 투여 후의 비결합형 가용성 IL-6 수용체 농도}}{\text{항체 투여 전의 가용성 IL-6 수용체 농도}} \times 100$$

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	GQGNTLPYT (서열번호:91)
LCDR3	QQGNTLPYT (서열번호:90)	93	T	R	QQGNRLPYT (서열번호:92)

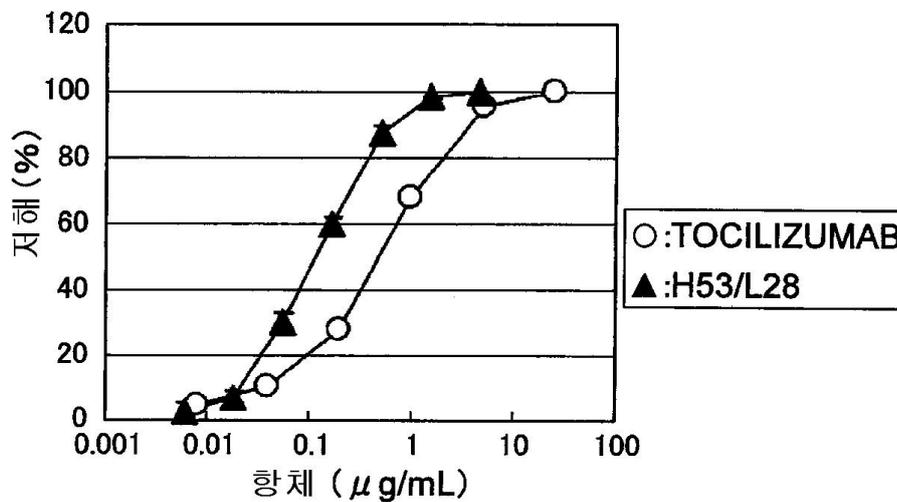
도면2



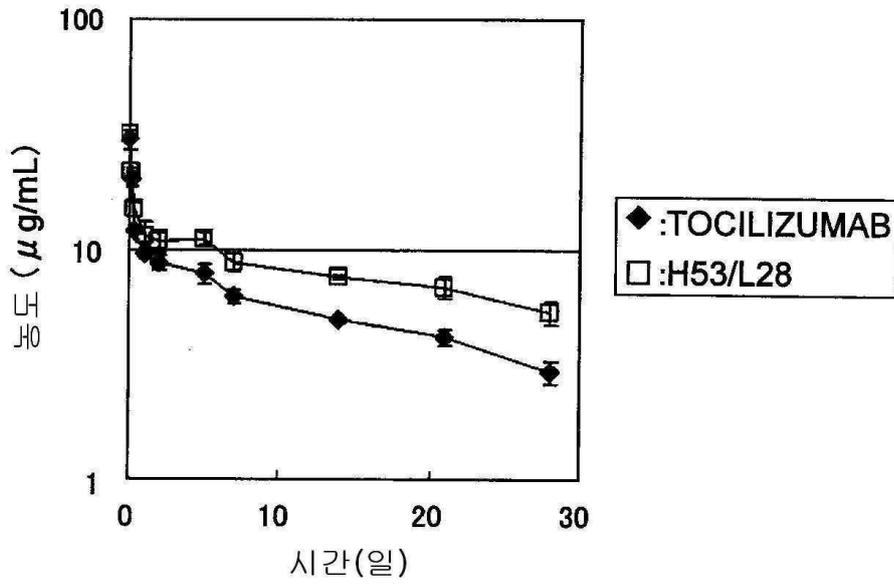
도면3

분류	TOCILIZUMAB 서열	변이개소 (Kabat No)	TOCILIZUMAB 의아미노산	변이후의 아미노산	변이후 서열
HFR1	QVQLQESGPGGLVRSQTLSTLC TVSGYSIT (서열번호:93)	13	R	K	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTC AVSGYSIS (서열번호:94)
		16	Q	E	
		23*	T	A	
		30*	T	S	
HCDR1	SDHAWS (서열번호:95)	31	S	D	DDHAWS (서열번호:96)
HFR2	WVRQPPGRGLEWIG (서열번호:97)	43	R	E	WVRQPPGEGLEWIG (서열번호:98)
HCDR2	YISYSGITTYNPSLKS (서열번호:81)	64	K	Q	YISYSGITTYNPSLQD (서열번호:99)
		65	S	D	
HFR4	WGQGLVTVSS (서열번호:100)	105	Q	E	WGEGTLVTVSS (서열번호:101)
		107*	S	T	
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (서열번호:102)	18	R	S	DIQMTQSPSSLSASVGDSTTTC (서열번호:103)
LCDR1	RASQDISSYLN (서열번호:87)	24	R	Q	QASQDISSYLN (서열번호:104)
LFR2	WYQQKPKGKAPLLIY (서열번호:105)	45	K	E	WYQQKPKGKAPPELLIY (서열번호:106)
LCDR2	YTSRLHS (서열번호:107)	53	R	E	YTSELES (서열번호:108)
		55	H	E	
		55	H	L	
LFR3	GVPSRFSGSGGTDFITISLQPE DAITYC (서열번호:110)	80	Q	E	GVPSRFSGSGGTDFITISLEAE DAITYC (서열번호:111)
		81*	P	A	
		83*	I	A	
LFR4	FGQGTKVEIK (서열번호:112)	107	K	E	FGQGTKVEIE (서열번호:113)

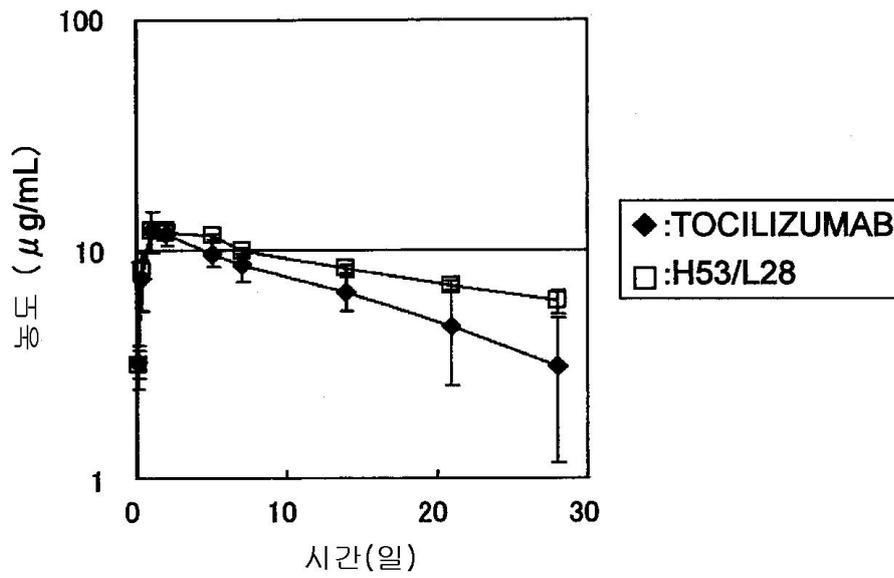
도면4



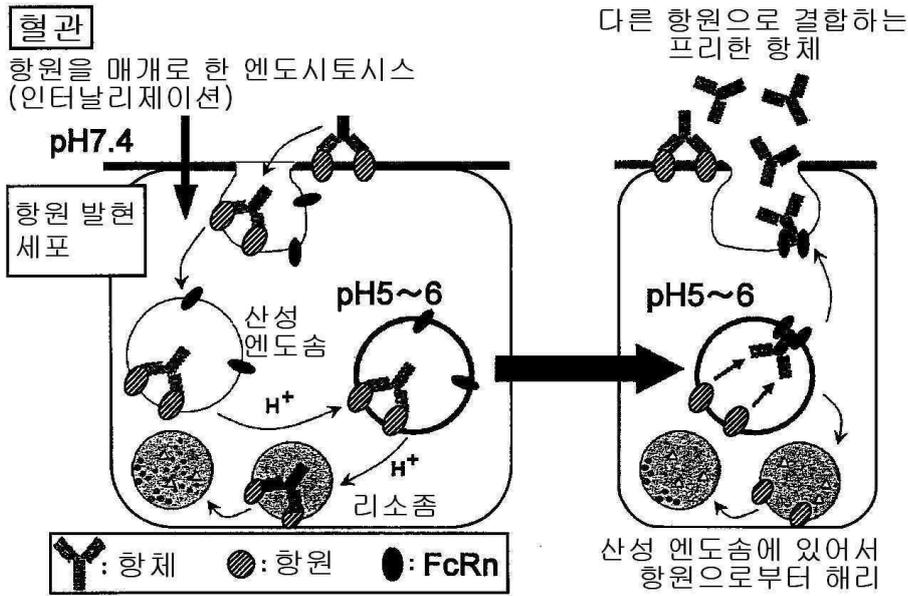
도면5



도면6



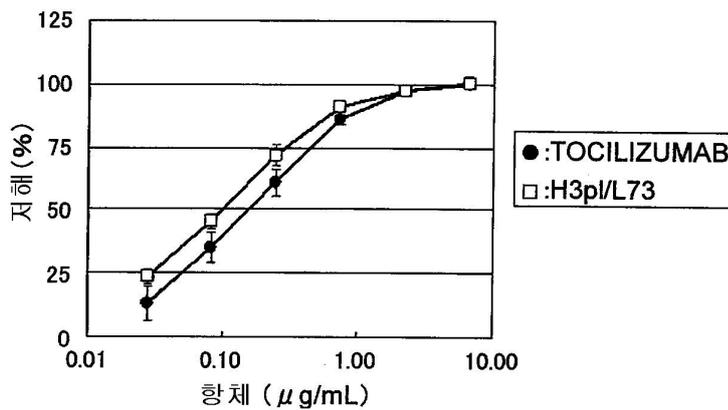
도면7



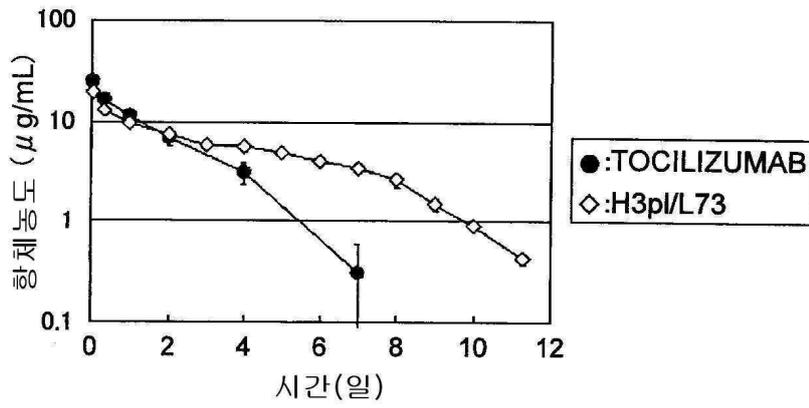
도면8

분류	TOCILIZUMAB 서열	변이개소 (Kabat No)	TOCILIZUMAB 변이후의 의아미노산	변이후의 아미노산	변이후 서열
HFR1	QVQLQESGPGILVRPSQTL LTCTVSGYSIT (서열번호:93)	27	Y	H	QVQLQESGPGILVRPSQTL LTCTVSGHSIT (서열번호:114)
HCDR1	SDHAW (서열번호:95)	31	S	H	HDHAW (서열번호:115)
LCDR1	RASQDISSYLN (서열번호:87)	32	Y	H	RASQDISSHLN (서열번호:116)
LCDR2	YTSRLHS (서열번호:107)	53	R	H	YTSHLHS (서열번호:117)

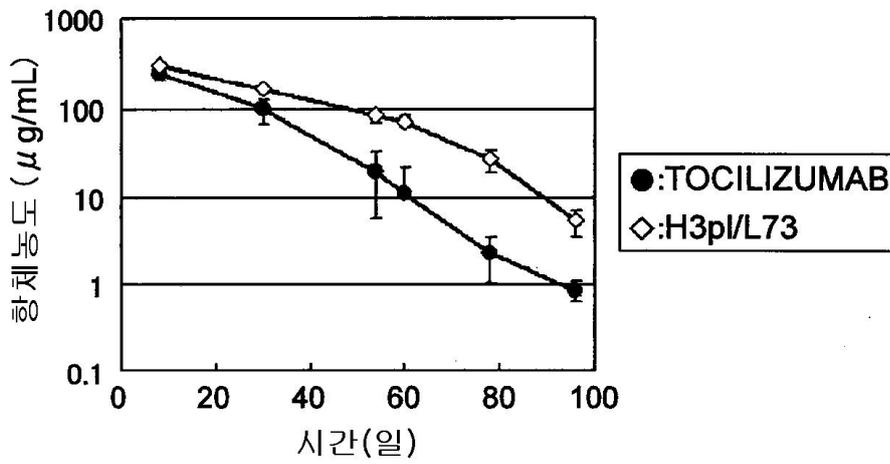
도면9



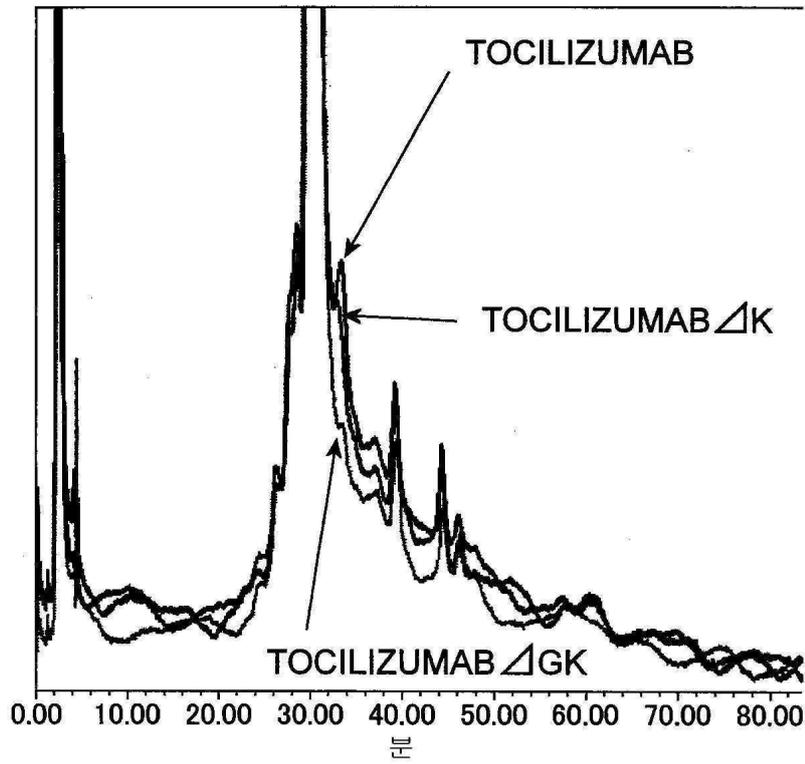
도면10



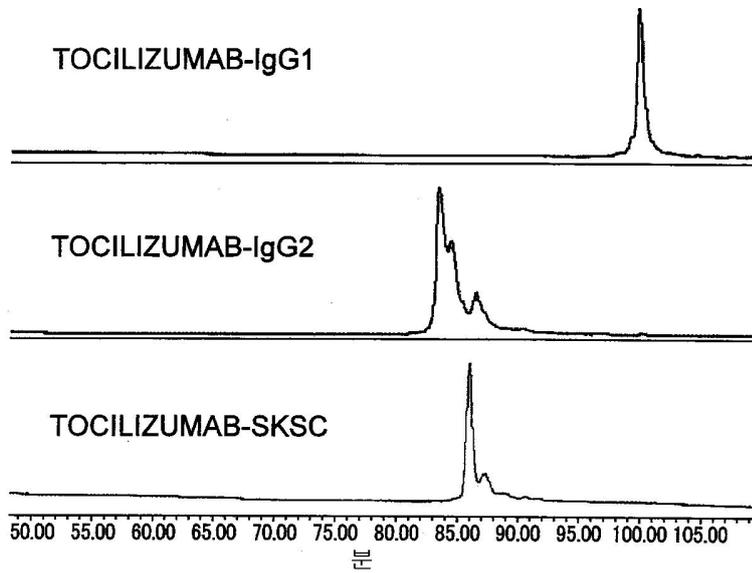
도면11



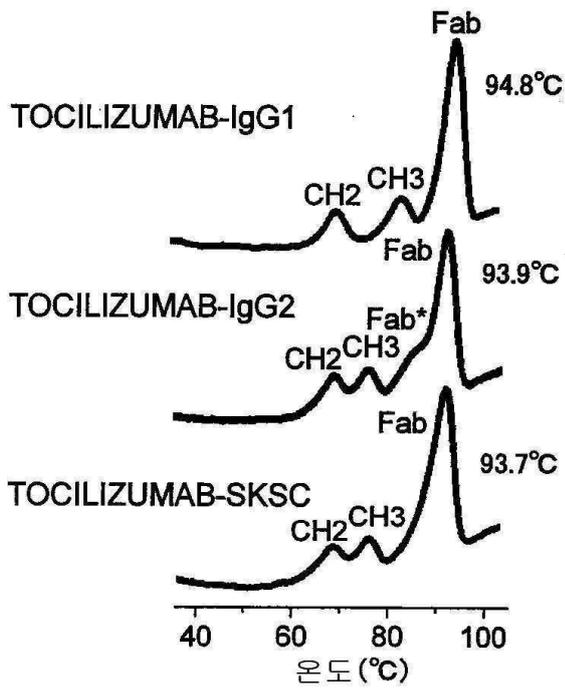
도면12



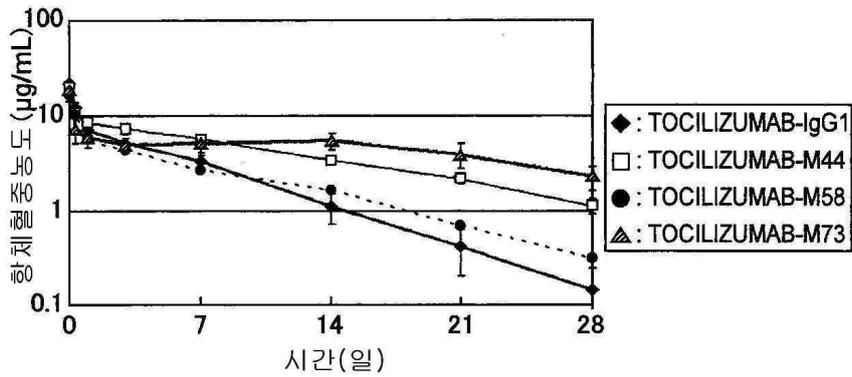
도면13



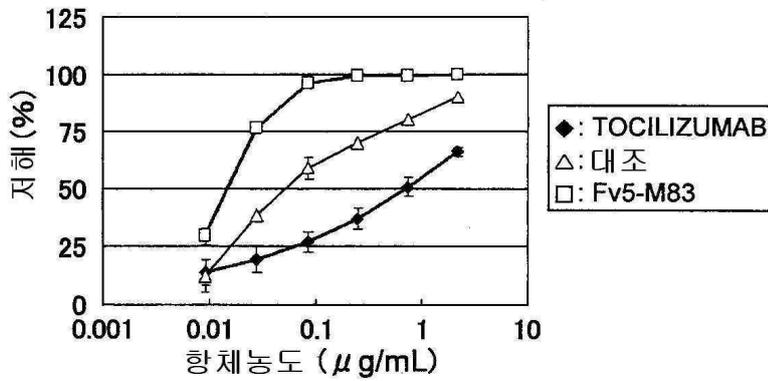
도면14



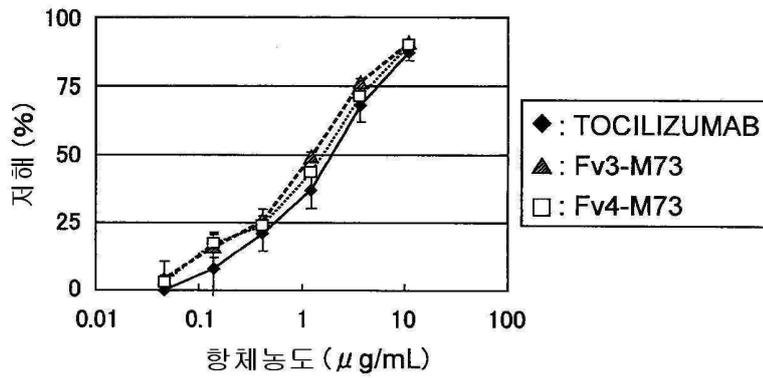
도면15



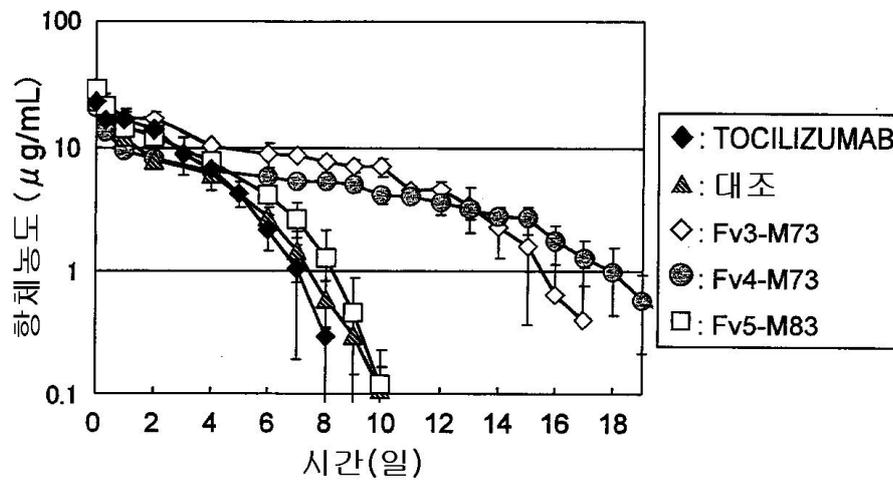
도면16



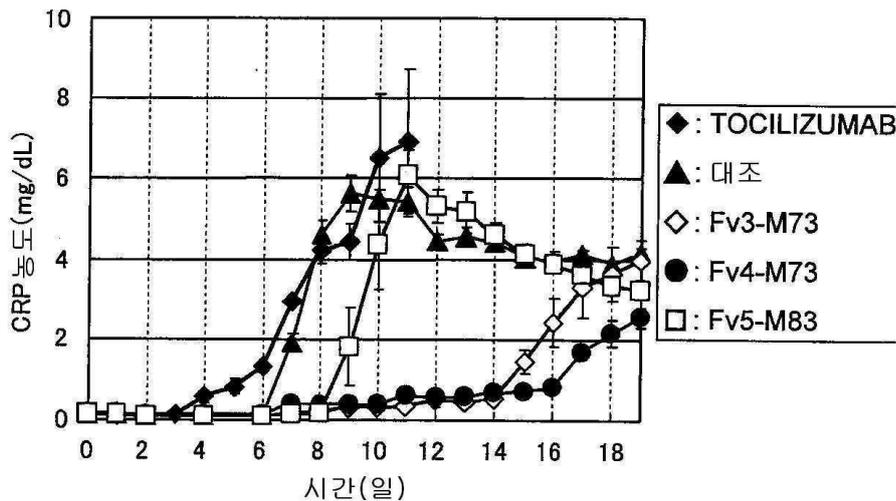
도면17



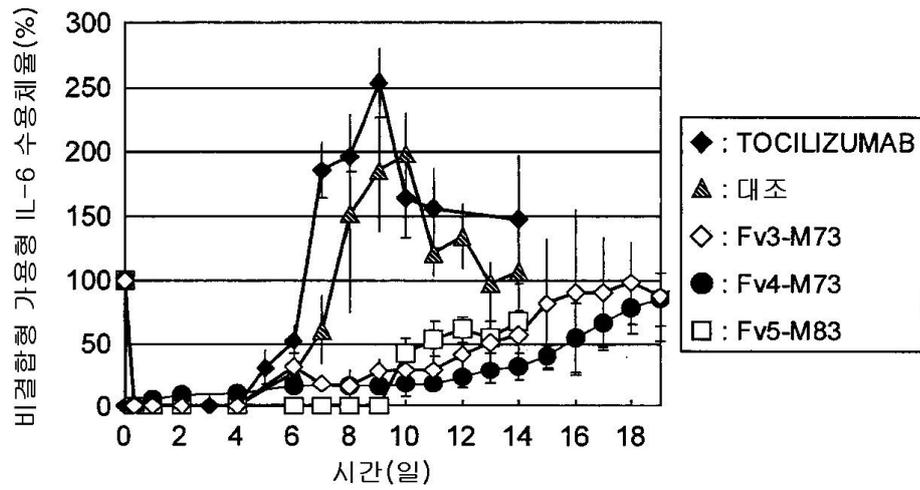
도면18



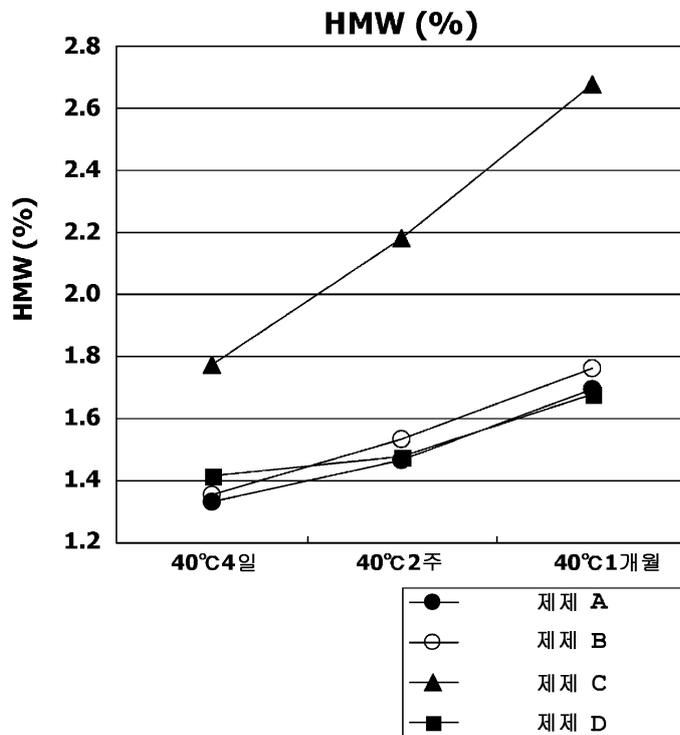
도면19



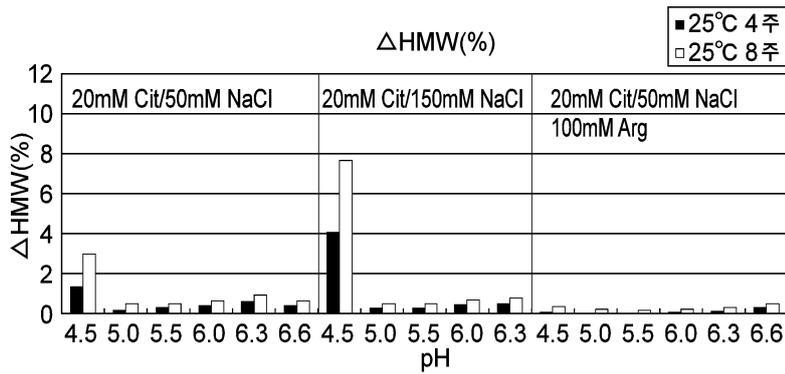
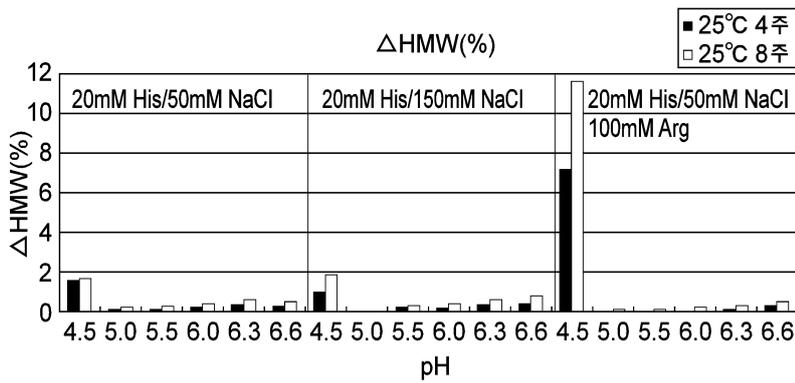
도면20



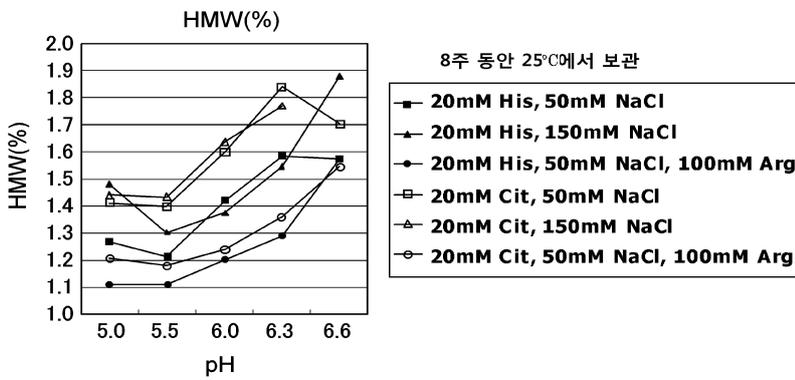
도면21



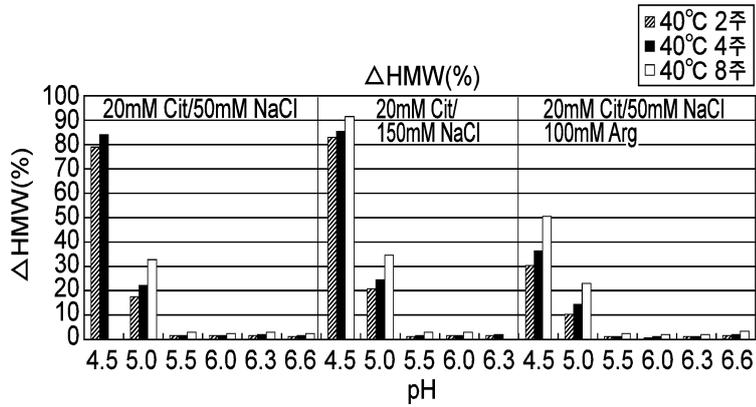
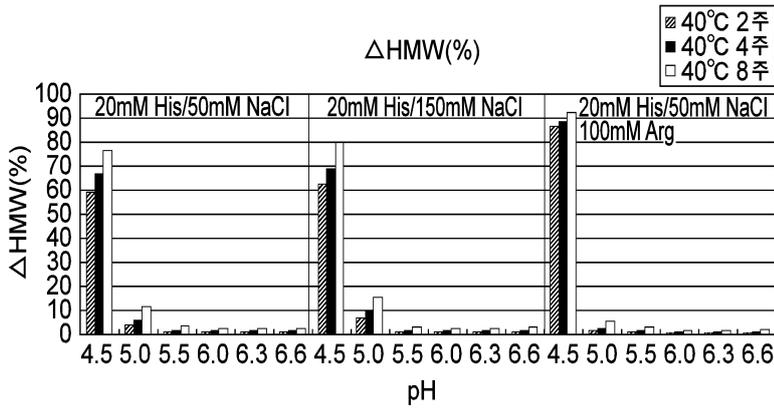
도면22



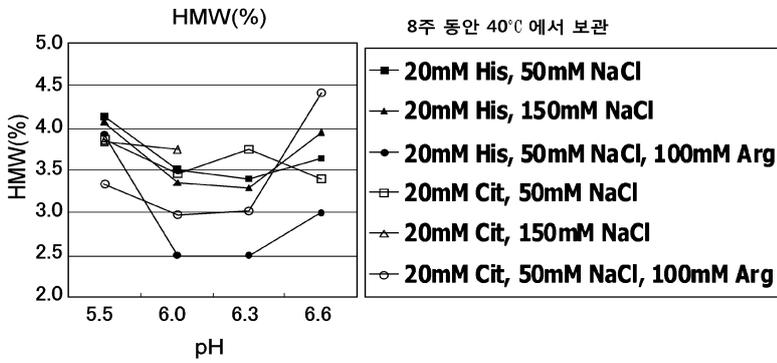
도면23



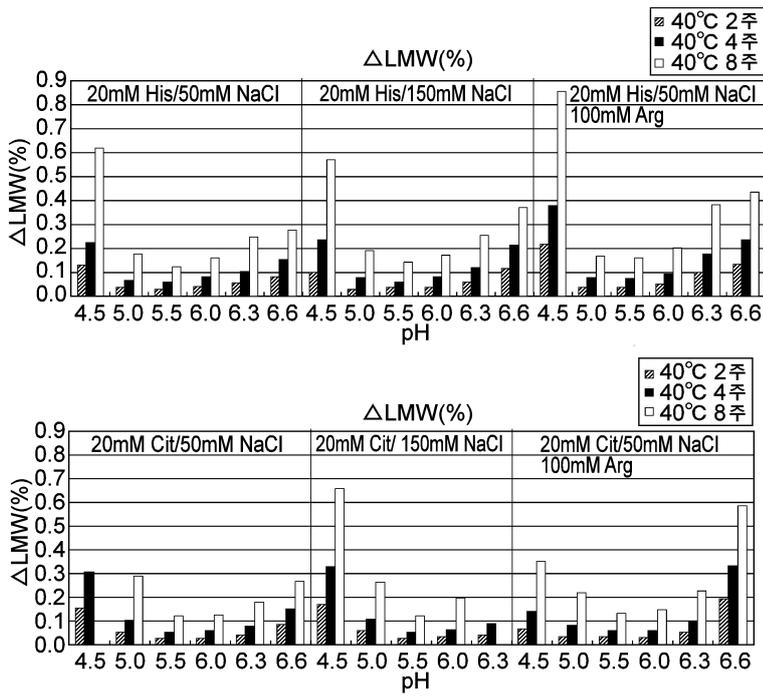
도면24



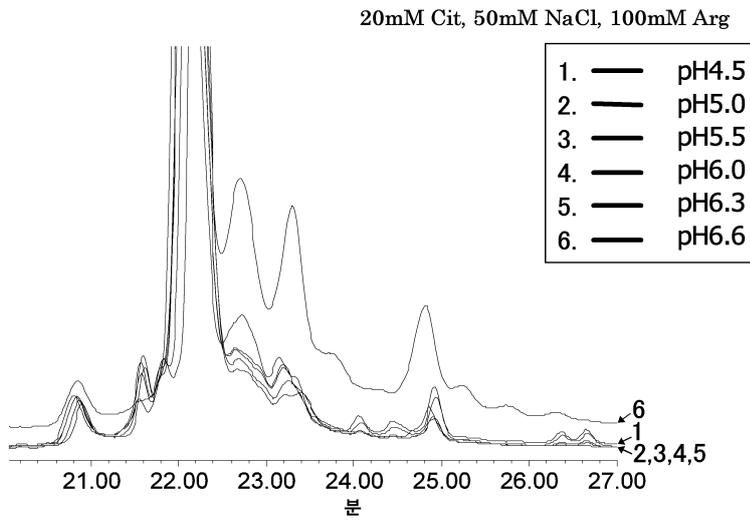
도면25



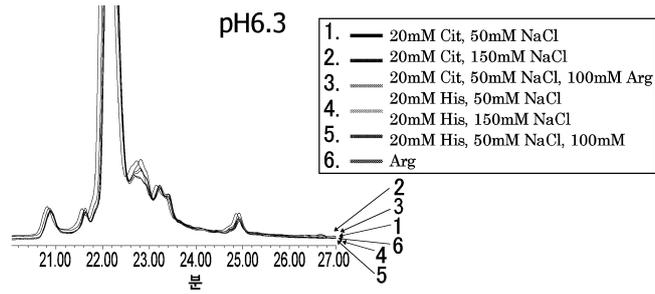
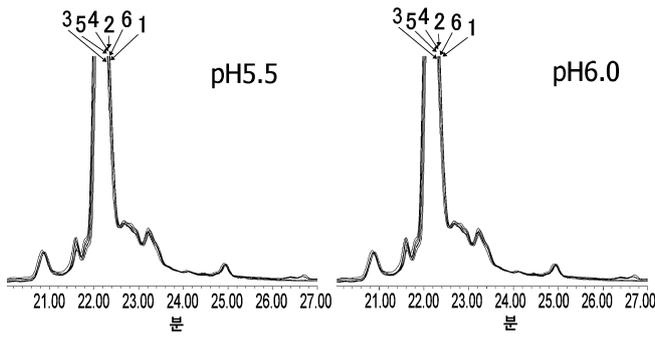
도면26



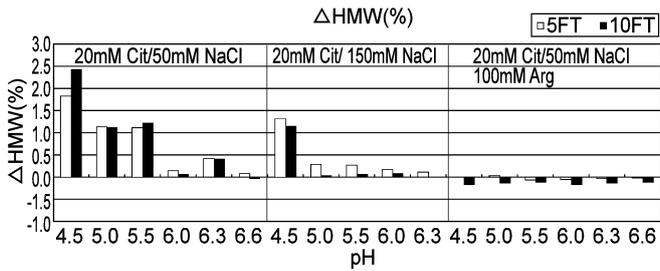
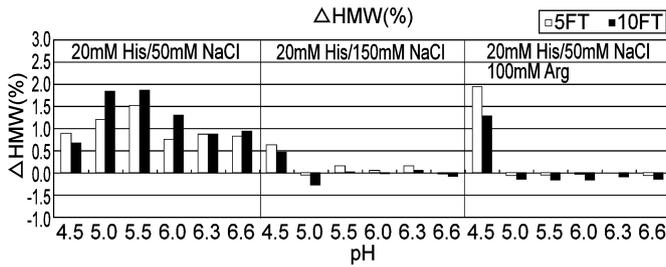
도면27



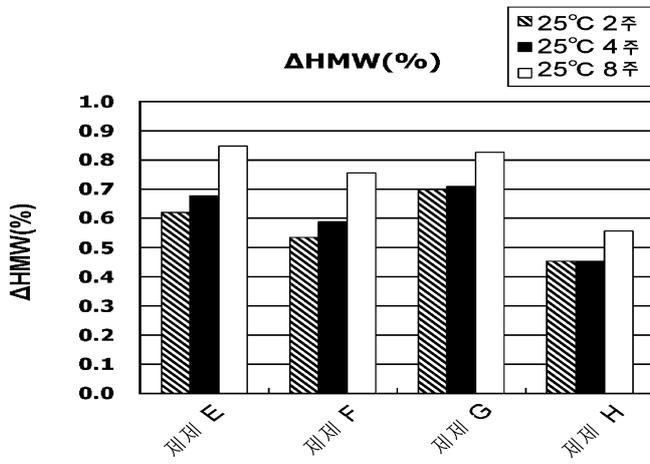
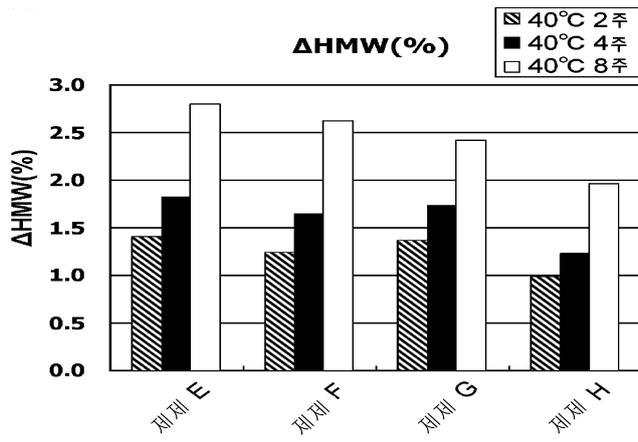
도면28



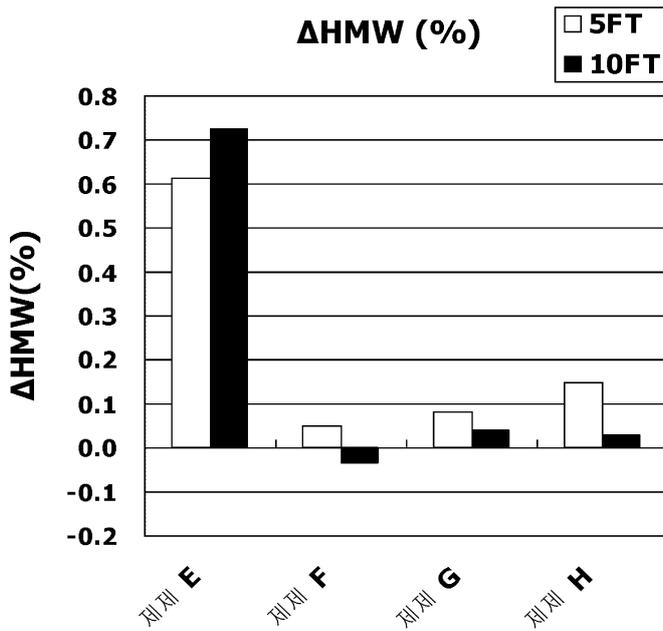
도면29



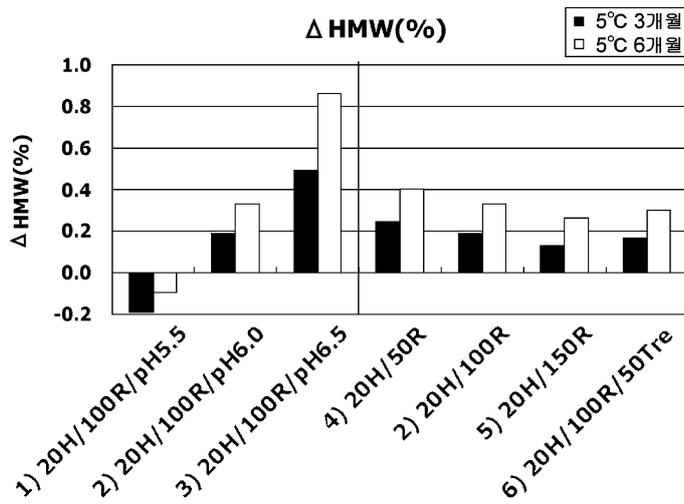
도면30



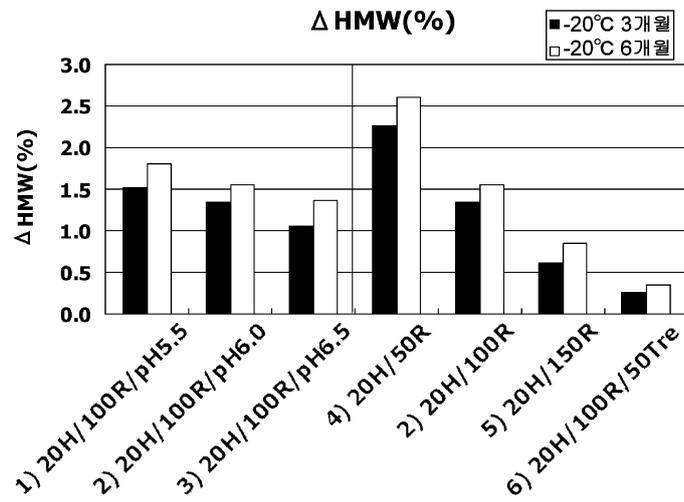
도면31



도면32



도면33



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
- <120> PHARMACEUTICAL FORMULATION CONTAINING IMPROVED ANTIBODY MOLECULES
- <130> C1-A0905P
- <150> JP 2009-069095
- <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



<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  
                          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  
                                  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  
                          435                    440

<210> 27

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<400> 27

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



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> 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

<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



325

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence

<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 cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120  
  
 tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180  
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240  
 aaacacaaag tctacgcctg 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 ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg 60  
 ggacacgagg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120  
 tggaaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgcct acagtctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300  
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgceca ccgtgccagc cacctgaact cctgggggga 360  
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcattgatctc ccggaccct 420  
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagtacaac 540  
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 600  
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660

aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 720  
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780  
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc gagaacaact acaagaccac gctctccgtg 840  
 ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg 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  
                                  115                    120                    125  
  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
                                  130                    135                    140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145                    150                    155                    160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
                                  165                    170                    175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
                                  180                    185                    190  
  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
                                  195                    200                    205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
                                  210                    215                    220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225                    230                    235                    240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                                  245                    250                    255  
  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                                  260                    265                    270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
                                  275                    280                    285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
                                  290                    295                    300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305                    310                    315                    320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 41

<211> 984

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct cctccaagag cacctccgag    60
agcacagcgg cctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg    120
tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc    240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc    300

aaatcttgtg tcgagtgcc accgtgccca gcaccactg tggcaggacc gtcagtcttc    360
cttttcccc caaaaccca ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacgtgc    420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggtg cgtggacggc    480
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt    540
gtggtcagcg tctcaccgt cgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc    600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaggg    660
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac    720

caggtcagcc tgacctgect ggtcaaagc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg    780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac    840
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac    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



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

<210> 43

<211> 995

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

gctagcacca agggcccatc cgttttcccc ctggcgcct gctccaggag cacctccgag 60  
 agcacagccg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtcgc 120  
 tggaaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180  
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240  
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300  
 aaatatggtc ccccatgccc accatgcca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360  
  
 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420  
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480  
 ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgccggagg agcagttcaa cagcacgtac 540  
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600  
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660  
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 720  
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtaaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780  
  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840  
 gacggctcct tcttctctca cagcaggctc accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900  
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960  
 ctctccctgt 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

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 Lys Thr

65                    70                    75                    80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85                    90                    95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100                    105                    110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115                    120                    125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

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

165                    170                    175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180                    185                    190

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

195                    200                    205

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

210                    215                    220



<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 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  
 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> 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



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





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> 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



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> 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  
  
 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> 68  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> An artificially synthesized polypeptide sequence  
 <400> 68

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



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



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 Cys Ser Arg 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 Cys 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  
 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

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  
 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 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 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  
 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 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

                  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 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  
  
                   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 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



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



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  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                    70                    75                    80  
  
 Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Tyr  
                   85                    90                    95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 79  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 79

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser  
 1                    5                    10                    15

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro  
                   20                    25                    30

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

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