



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0143070

(43) 공개일자 2019년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/24 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/241 (2013.01)

A61P 1/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2018-0070573

(22) 출원일자 2018년06월20일

심사청구일자 2018년06월20일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

김동일

인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 1302호(송도동, 송도글로벌캠퍼스푸르지오)

차현명

서울특별시 중구 다산로36길 109, 6동 203호(신당동, 현대아파트)

임진혁

서울특별시 구로구 중앙로6길 26, 112동 602호(고척동, 조양휴캐슬)

(74) 대리인

김순용

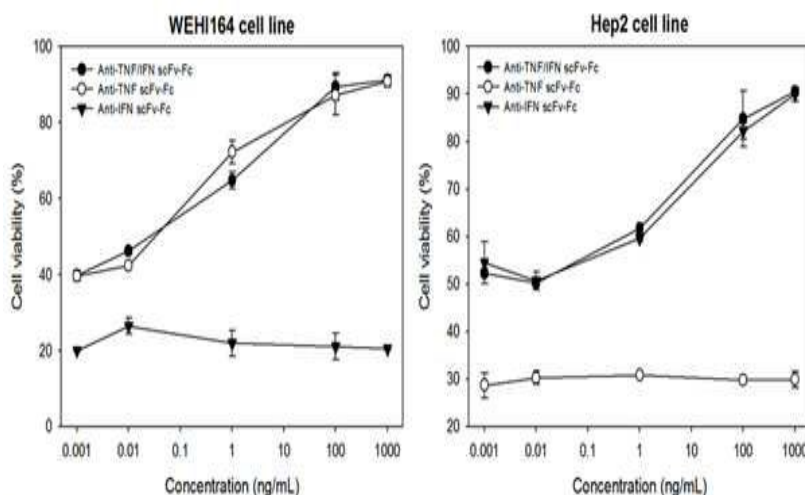
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 항 TNF/IFN scFv-Fc 이중 표적 항체 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 항 TNF/IFN scFv-Fc 이중 표적 항체 및 이를 이용한 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체는 scFv 이중항체에 Fc 가 결합된 형태로 제조과정 중 정제과정이 용이한 장점이 있을 뿐만 아니라, 크론병을 유발하는데 독립적으로 중요한 역할을 하는 TNF- α 및 IFN- γ 에 효과적으로 동시에 결합할 수 있어 크론병을 포함하는 염증성 장질환의 치료에 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

C07K 16/249 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M3A9B6075887

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발

연구과제명 글리칸 변이 바이오의약품의 생산을 위한 글리칸 조절 및 제어 원천기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.20 ~ 2018.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 2로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 를 포함하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체 암호화 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

서열번호 3으로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 4 로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 을 포함하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체.

청구항 3

제2항의 이중 표적 항체를 암호화하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체 암호화 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제1항 또는 제3항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조함 발현 벡터.

청구항 5

제4항의 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 숙주세포는 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균 및 곤충세포로 이루어진 군에서 선택된 1 종인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 7

- 1) 서열번호 1로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 2로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- 2) 상기 형질전환체를 배양하고 배지 내로 발현된 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체를 분리 정제하는 단계;를 포함하는 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 2) 단계의 분리 정제 단계는 Fc 영역을 표적으로 하여 수행되는 것인, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체의 제조방법.

청구항 9

제7항의 제조방법으로 제조된 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 이중 표적 항체는 서열번호 3으로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 4 로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 을 포함하는 것을 특징으로 하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체.

청구항 11

제9항 또는 제10항의 이중 표적 항체를 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 크론병, 궤양성 대장염, 장형 베체트병, 장결핵 장염 및 설사로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항 TNF/IFN scFv-Fc 이중 표적 항체 및 이를 이용한 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 일반적으로 항체는 분자량이 큰 중쇄와 분자량이 작은 경쇄의 폴리펩티드가 이황화 결합(disulfide bond)으로 연결이 되어 이형 이중체(heterodimer)을 형성하며, 두 개의 이형 이중체가 다시 이황화 결합으로 연결이 되어 4중체(tetramer)를 형성한다. 중쇄를 만드는 폴리펩티드는 N-말단에서부터 가변영역, 불변영역 1, 불변영역 2 및 불변영역 3으로 구성된 4개의 영역(domain)으로 이루어져 있고, 경쇄를 만드는 폴리펩티드는 N-말단에서부터 가변영역, 불변영역 2개의 영역으로 이루어져 있다. 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역의 결합체가 1 개의 항원과 결합하게 된다.

[0004] 항체의 항원-항체 결합 반응은 고도의 특이성을 나타내며 항체와 상호작용하는 항원 부위를 항원 결정기 또는 에피토프(epitope)라 하고, 항원 결정기와 항체의 항원 결합부위인 가변영역이 특이적으로 결합하게 된다. 항원 결합부위는 단 1개의 항원결정기와 결합할 수 있으므로 수 많은 항체들은 각자가 특정 결정기를 가진 항원에 대한 특유의 면역성을 제공할 수 있다.

[0005] 한편 두 종류의 항원을 인식할 수 있는 이중 특이성 항체 (bispecific antibody) 가 존재하며, 이는 재조합 DNA 기술에 의해서 항체를 변형시켜 2 개의 서로 다른 항원과 결합할 수 있는 항원결합부위를 갖도록 하여 제조되거나 1 개의 항원결합부위를 갖는 정상적인 항체로서 2 개의 서로 다른 항원과 결합할 수 있는 능력을 갖는 항체인 투-인-원(two-in-one) 항체로 제조될 수 있다(Bostrom, J et. al., Science 323, 1610-1614, 2009). 전자의 방법으로 제조되는 이중 항체는 1 개의 결합부위는 특정 항원에 대하여 특이적이고, 제 2의 결합부위는 또 다른 항원에 대해서 특이적인 항체로 동시에 2 개의 항원과 결합할 수 있다(Beck A et. al., Nat Rev immunology 10;345-352, 2010). 후자의 방법으로 제조된 이중 항체는 1 개의 항원결합부위를 갖는 정상적인 항체로서 2 개의 서로 다른 항원과 결합할 수 있는 능력을 갖는 항체이며, 이러한 투-인-원 항체는 1 개의 항원결합 부위를 가지기 때문에 2 개의 항원과 결합하기보다는 한번에 1 개의 항원과 결합할 수는 있으나, 서로 다른 2 개의 항원에 결합할 수 있는 능력을 갖고 있는 항체이다. 이러한 이중 특이성 항체는 특정 독성 세포 및 표적 세포에 결합하여 작용할 수 있으므로 표적 특이성이 높은 장점을 가진다.

[0006] 크론병과 궤양성 대장염으로 대표되는 염증성 장질환은 만성적인 질환으로 면역반응 조절 이상이 중요한 병인일 것으로 알려져 있다. 최근에 이에 대한 활발한 연구를 통해 염증 성장 질환과 관련이 있는 사이토카인이나 세포들이 밝혀지면서 장내 염증과 관련된 특정 분자나 경로를 선택적으로 공격하는 생물학적 제제에 대한 연구가 다수 이루어지고 있다. 염증성 장질환에서 고려될 수 있는 생물학적 제제는 작용기전에 따라 크게 종양괴사 인자(anti-tumor Necrosis Factor, 항 TNF) 제제를 포함하는 염증성 사이토카인억제제, 항 염증성 사이토카인, 세포 부착 방해인자, T세포 활성화 방해제제, 면역촉진제, 유전자치료, mitogen-activated protein kinase(MAPK) 억제제 등이 있다. 항 TNF 제제는 생물학적 제제 중 가장 먼저 염증성 장질환의 치료에 이용되기 시작하였으며 이중 infliximab과 adalimumab이 크론병에, infliximab이 궤양성대장염에서 승인을 받고 이용되고 있다.

[0007] 하지만 이러한 항 TNF 제제도 1/3의 환자에서는 반응이 없으며, 항체 형성으로 인한 치료 반응 감소를 경험하게 되고, 감염이나 악성림프종 같은 심각한 부작용이 보고 되고 있다. 이에 크론병과 같은 염증성 장질환을 치료할 수 있는 새로운 제제에 대한 개발의 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명에서는 크론병과 같은 염증성 장질환을 치료할 수 있는 새로운 제제에 대하여 연구하던 중, 크론병에 독립적으로 작용하는 TNF- α , IFN- γ 를 동시에 표적으로 하는 경우, 우수한 크론병 치료 효과를 기대할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 2로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 를 포함하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체 암호화 폴리뉴클레오티드, 이의 제조방법 및 상기 이중 표적 항체를 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 2로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 를 포함하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체 암호화 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 서열번호 3으로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 4로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 을 포함하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 1) 서열번호 1로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 2로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계 및 2) 상기 형질전환체를 배양하고 배지 내로 발현된 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체를 분리 정제하는 단계를 포함하는 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체의 제조방법을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 이중 표적 항체를 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 상기 이중 표적 항체를 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체는 scFv 이중항체에 Fc 절편이 결합된 형태로 제조과정 중 정제과정이 용이한 장점이 있을 뿐만 아니라, 크론병을 유발하는데 독립적으로 중요한 역할을 하는 TNF- α 및 IFN- γ 에 효과적으로 동시에 결합할 수 있어 크론병을 포함하는 염증성 장질환의 치료에 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 CHO-DG44 세포주로의 형질전환에 사용된 항-TNF- α scFv 및 항-IFN- γ scFv 를 제조하기 위한 발현 벡터를 나타낸 도이다.
- 도 2는 합성된 항-TNF scFv-Fc와 항-IFN scFv-Fc 유전자의 발현을 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 이중항체 발현 세포주 제작 공정을 나타낸 모식도이다.
- 도 4는 pOptiVEC/TNF와 pOptiVEC/IFN 발현벡터가 모두 삽입된 형질전환된 CHO 세포의 세포 밀도 및 세포 생존을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 Protein A 정제방법을 이용하여 정제된 이중항체 정제 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 정제된 이중 항체의 발현 및 분자량을 SDS-PAGE (a), 웨스턴 블랏 (b) 을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 8은 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체, 항-TNF scFv-Fc 단일 항체, 항-IFN scFv-Fc 단일 항체 존재에 따른 WEHI164 세포, Hep2세포주의 세포 생존을 변화를 통해 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체의 TNF- α 및 IFN- γ 에 대한 결합능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명은 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체에 관한 것으로, 서열번호 1로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 2로 표시되는 항-IFN scFv-Fc를 포함하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체 암호화 폴리뉴클오티드를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체는 Fc 절편의 융합에 의해 쉽고 빠른 정제가 가능하며, 크론병을 포함하는 염증성 장질환을 유발하는 사이토카인인 TNF- α 및 IFN- γ 에 모두 우수한 결합능을 나타내므로, 염증성 장질환의 새로운 치료제로 활용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체 암호화 폴리뉴클오티드는 scFv 이중항체에 Fc 절편이 결합된 형태이며, Fc 절편을 이용하여 제조된 항체를 용이하게 정제할 수 있고, 이를 통해 반감기가 증대될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 2로 표시되는 항-IFN scFv-Fc를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 포유동물 세포주에서 발현하기 위하여 코돈 최적화된 유전자이며, 이에 의해 암호화되는 아미노산의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않는 한, 이와 60% 이상, 바람직하게는 75% 이상 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명은 서열번호 3으로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 4로 표시되는 항-IFN scFv-Fc를 포함하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체를 제공한다.
- [0028] 또한 본 발명의 항체의 특성이 유지되는 한, 가변영역 내에서의 변이가 일어난 항체도 본 발명의 권리범위에 포함된다. 그러한 예로서 가변영역에서의 아미노산의 보존적 치환(conservative substitution)을 들 수 있다. 보존적 치환은 원래의 아미노산 서열과 유사한 특성을 가지는 다른 아미노산 잔기로의 치환을 의미하는데, 예를 들어 라이신, 아르기닌, 히스티딘은 염기 결사슬을 가지고 있어 유사한 특성을 가지고, 아스파라틱산과 글루탐산은 산 결사슬을 가진다는 점에서 유사한 특성을 가진다. 또한, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판은 비전하 극성 결사슬을 가진다는 점에서 특성이 유사하며, 알라닌, 발린, 루신, 트레오닌, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌은 비극성 결사슬을 가지고 있다는 점에서, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘은 방향족 결사슬을 가지고 있다는 점에서 유사한 특성을 가진다. 따라서, 상기와 같이 유사한 특성을 가지는 그룹 내에서의 아미노산 치환이 일어나더라도 별다른 특성 변화를 보이지 않을 것이라는 점은 통상의 기술자에게는 자명한 것이므로, 본 발명에 따른 항체의 특성이 유지되는 한, 가변영역 내에서의 보존적 치환에 의한 변이가 일어난 항체도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

- [0030] 또한 본 발명은 상기 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체를 암호화하는 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체 암호화 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 즉, 단백질로 번역시 목적하는 서열번호 3으로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 4 로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 을 포함하는 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체를 생산할 수 있는 서열이라면 제한없이 본원 발명의 범주에 포함될 수 있으며, 바람직하게 이는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명은 또한 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 이와 같은 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0032] 본 발명에서 "재조합 발현 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 본 발명에서 "작동가능하게 연결된 (operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 수행할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용될 수 있는 적합한 발현 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서(enhancer) 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 개시코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 번역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.
- [0034] 상기 발현 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포가 선별 가능하다. 또한, 벡터는 복제가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다.
- [0035] 본 발명에 따른 항체 또는 항체 단편을 발현시키기 위해 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현 벡터로는 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associatedvirus), 시토크갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열 등이 사용될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서는 바람직한 일례로 pOptiVEC-TOPO 벡터를 이용하였다.
- [0036] 상기 재조합 벡터는 숙주세포에 삽입되어 형질전환체를 형성하는데, 적합한 숙주세포는 동물세포, 식물세포, 효모, 대장균, 곤충세포와 같은 진핵 세포일 수 있다. 또한 상기 숙주세포는 바람직하게는 식물, 포유동물로부터 유래할 수 있는데, 원숭이 신장 세포7(COS7 : monkey kidney cells) 세포, NSO 세포, SP2/0, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO : chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린햄스터 신장(BHK : baby hamster kidney)세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포 등이 이용가능하며, 바람직하게는 CHO 세포일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 보다 구체적으로 본 발명의 이중 표적 항체는 1) 서열번호 1로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 2로 표시되는 항-IFN scFv-Fc 를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계 및 2) 상기 형질전환체를 배양하고 배지 내로 발현된 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체를 분리 정제하는 단계를 포함하는 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체의 제조방법을 통해 제조될 수 있다.
- [0038] 상기 1) 단계에서는 숙주세포로의 형질전환을 통해 형질전환체를 제조하며, 본 발명에서 "숙주세포로의 형질전환"은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 당 분야에서 공지된 방법을 제한없이 포함하여 수행될 수 있다. 예컨대 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

- [0039] 상기 2) 단계에서는 재조합 벡터가 발현되는 형질전환체를 영양배지에서 배양함으로써 본 발명에 따른 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체를 대량으로 생산할 수 있으며, 배지와 배양조건은 숙주 세포에 따라 관용되는 것을 적당히 선택 이용할 수 있다. 배양시 세포의 생육과 단백질의 대량 생산에 적합하도록 온도, 배지의 pH 및 배양시간 등의 조건들을 적절하게 조절할 수 있다. 상기와 같이 재조합적으로 생산된 항체 또는 항체 단편은 배지 또는 세포 분해물로부터 회수될 수 있으며, 통상적인 생화학 분리 기술에 의해서 분리, 정제가 가능하다.
- [0040] 상기 2) 단계의 분리, 정제 단계는 전기영동, 원심분리, 겔여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역흡착 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 등), 등전점 포커싱 및 이의 다양한 변화 및 복합 방법 등이 이용 가능하지만 이에 한정되지 않으며, 특히 본원 발명의 항체가 Fc 절편이 융합된 형태임을 고려하면 Fc 영역을 표적으로 하여 수행하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 프로테인 A(Protein A)를 이용하여 분리, 정제하는 것이 바람직하다.
- [0042] 본 발명은 상기와 같은 제조방법으로 제조된 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체를 제공한다.
- [0043] 상기 이중 표적 항체는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오티드에 의하여 번역되는 아미노산 서열로 이루어지며, 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 항-TNF scFv-Fc 및 서열번호 4로 표시되는 항-IFN scFv-Fc를 포함하는 것을 특징으로 하는, TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체일 수 있고, 항체의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않는 하나 이상의 아미노산의 추가, 결실 또는 치환이 포함될 수 있다.
- [0044] 또한 본 발명에 따른 항체 또는 그 단편은 다른 물질과 접합된 복합체(conjugate)의 형태로도 이용 가능하다. 본 발명에 따른 항체 또는 그 단편과 접합하여 이용할 수 있는 물질로는 염증성 장질환 치료용 항체, 항히스티민제나 항염증제와 같은 통상적인 염증성 장질환 질환 치료제 등이 대표적인 예이지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 또한 본 발명은 TNF- α 및 IFN- γ 에 결합 특이성을 갖는 이중 표적 항체를 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0046] 상기 염증성 장질환은 크론병, 궤양성 대장염, 장형 베체트병, 장결핵 장염 및 설사로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (최신판)에 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한 약제학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어 “약학적 유효량”은 염증성 장질환을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제

또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명의 항체 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 항체는 항체-치료제 결합체 형태로 생체내로 투입하여 염증성 장질환 치료에 이용할 수 있다. 치료제는 화학치료제, 방사성핵종, 면역치료제, 사이토카인, 케모킨, 독소, 생물작용제 및 효소 저해물질 등을 포함한다.

[0051] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0053] 실시예 1. Anti-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체 발현백터 제작

[0054] 크론병(Crohn's disease)을 포함한 염증성 장질환의 원인이 되는 사이토카인인 TNF- α (tumor necrosis factor-alpha)와 IFN- γ (interferon-gamma)에 동시에 결합할 수 있는 이중항체를 생산하기 위하여 도 1과 같은 발현백터를 고안하였다.

[0055] 도 1에 나타난 바와 같이, 두 사이토카인에 각각 결합할 수 있는 single chain variable fragment(scFv) 에 항체의 Fc 도메인을 융합한 유전자 서열을 각각 디자인하였고, CHO-DG44 세포주에서 발현하기 위하여 코돈(codon)을 최적화한 후 유전자를 합성하였다. 코돈 최적화를 통해 합성된 유전자는 항-TNF scFv-Fc(1497bp, 서열번호 1), 항-IFN scFv-Fc(1476bp, 서열번호 2) 로 표시하였다.

[0056] 합성된 항-TNF scFv-Fc와 항-IFN scFv-Fc 유전자를 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였으며, 그 결과를 도 2의 a)에 나타내었다. 다음으로 확보한 유전자를 pOptiVEC-TOPO 백터에 TA 클로닝하여 발현백터를 제작하였고, pOptiVEC/TNF와 pOptiVEC/IFN으로 명명하였다. 각각의 발현백터를 TOP10 대장균에 heat-shock 방법으로 형질전환 시키고 암피실린(ampicillin) 항생제가 포함된 S.O.C. 배지(2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose)에 도말하였다. 이를 37℃에서 12시간 동안 배양한 후 형질전환된 대장균을 선별하기 위하여 콜로니 PCR을 실시하였으며, 그 결과를 도 2의 b)에 나타내었다.

[0057] 도 2의 b) 에 나타난 바와 같이, 형질전환된 대장균 중 각각의 목적 유전자를 발현하는 것으로 확인된 2번 및 5번의 대장균 클론을 선택하였으며, 이로부터 백터를 추출하였다. 선별된 백터는 TNF- α , IFN- γ 에 결합이 가능할 뿐만 아니라 Fc 도메인이 융합되어 있어 안정성과 정제가 용이한 이중항체를 생산할 수 있는 백터이다.

[0059] 실시예 2. CHO-DG44 세포주로 형질전환 및 이중항체 생산

[0060] 2.1 이중항체 발현 CHO 세포주 제작

[0061] 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체를 생산하기 위하여 실시예 1에서 제작한 두 발현백터를 다이하이드로폴 레이트 환원효소(dihydrofolate reductase) 유전자가 결핍된 CHO-DG44 세포에 동시에 삽입하였다. pOptiVEC/TNF와 pOptiVEC/IFN 발현백터를 각각 OptiPRO-SFM 배지와 혼합하고, Freestyle MAX reagent에 첨가하여 DNA-lipid 복합체를 제조하였다. 형성된 복합체는 4 mM 글루타민을 포함한 ProCHO5 배지에 첨가하여 5×10^5 cells/mL 농도의 CHO 세포를 접종하였다. 단일 클론 세포주를 확립하기 위하여 24시간 동안 세포를 배양한 후 50 nM 메토포트렉세이트(methotrexate)를 처리하여 목적 유전자가 도입된 CHO 세포주를 선별하였고, 96-웰 플레이트에서 제한 희석법(limiting dilution)을 이용하여 선별된 세포를 2주 동안 배양하였다. 이러한 이중항체 발현 CHO 세포주 제작 공정을 도 3에 모식화하여 나타내었다.

[0062] pOptiVEC/TNF와 pOptiVEC/IFN 발현백터가 모두 삽입된 단일 클론 형질전환체를 3×10^5 cells/mL 농도로 4 mM 글루타민을 포함한 ProCHO5 배지에 접종하고 100 rpm으로 부유식 배양을 진행하였다. 제작한 CHO 세포주를 9일 동안 회분식 배양하여 세포 성장과 생존율을 분석하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었으며, 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체의 생산량의 변화를 샌드위치 효소 연결 면역 흡착 분석법(sandwich enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)으로 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0063] 도 4 에 나타난 바와 같이, 형질전환된 CHO 세포는 5일차까지 꾸준히 증식하였지만 그 이후 급격한 세포 사멸을 보였고, 배양 9일차에는 60% 이하로 생존율이 감소하였다.

[0064] 도 5에 나타난 바와 같이, 이중항체가 400 mg/L 농도 이상으로 발현되는 것을 확인하였다.

[0066] 2.2 생산된 이중항체의 정제와 발현 확인

[0067] 형질전환된 CHO 세포 배양 후 배지 내로 발현된 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체를 정제하기 위하여 HiTrap Protein A 컬럼을 이용하였다. 배양액을 20 mM 인산 나트륨 완충액과 혼합한 뒤 레진에 결합(binding)시키고, 20 mM 인산 나트륨 완충액을 컬럼에 흘려주어 세척(washing)하였다. 그 후, 0.1 M citric acid 용리(elution) 완충액을 사용하여 UV 260 nm 파장에서 검출되는 피크를 확인한 후 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체를 분리하였으며, Protein A 정제방법을 이용하여 정제된 이중항체 정제 결과를 도 6에 나타내었다.

[0068] 정제된 이중항체는 10% SDS-PAGE 겔에서 분리하고, 쿠마시 블루(Coomassie blue) 용액으로 염색하여 그 분자량을 확인하였으며, 웨스턴 블랏 분석을 위하여 겔에서 전기영동한 후 니트로셀룰로오즈 막(nitrocellulose membrane)으로 전이시키고, goat anti-human IgG Fc와 rabbit anti-goat IgG를 각각 1차와 2차 항체로 하여 이중항체의 발현을 확인하였으며 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0069] 도 7의 a) 및 b) 에 나타난 바와 같이, 생산된 이중항체는 110 kDa 크기의 분자량을 갖는 것을 확인하였으며, SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 상에서 항체의 발현을 뚜렷하게 확인하였다.

[0071] 실시예 3. WEHI164와 Hep2세포주를 이용한 이중항체의 결합 능력 평가

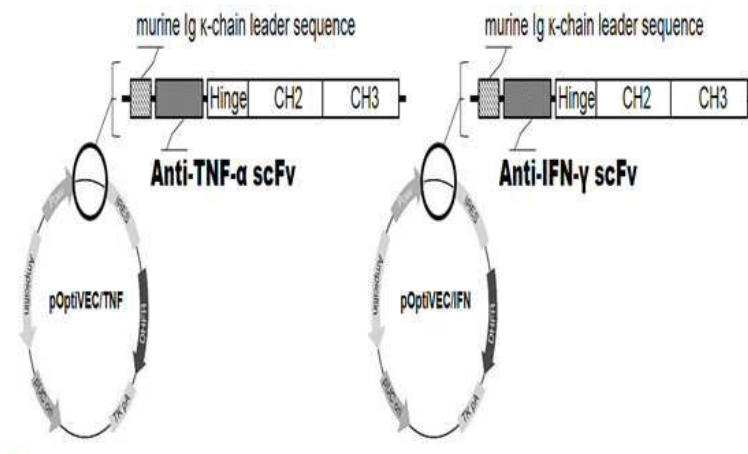
[0072] 항-TNF/IFN scFv-Fc 이중항체가 두 종류의 항원에 동시에 결합할 수 있는지 평가하기 위하여 WEHI164와 Hep2세포주를 사용하여 결합 능력 평가를 수행하였다. 두 세포주는 각각 TNF- α 와 IFN- γ 의 처리에 의해 성장이 저해되는 특징을 가지고 있다. 따라서 WEHI164 세포를 배양하는 배지에 TNF- α 를 첨가하고, 정제된 이중항체와 단일 항체(항-TNF scFv-Fc, 항-IFN scFv-Fc)를 단계별로 희석하여 처리하였다. 항체 처리에 의한 세포 생존을 확인한 결과를 도 8에 나타내었다.

[0073] 도 8에 나타난 바와 같이, 배지에 항-TNF/IFN scFv-Fc와 항-TNF scFv-Fc 항체가 존재하는 경우 TNF- α 와의 결합으로 인해 WEHI164 세포의 증식이 유지되는 것을 확인하였다. Hep2 세포의 배양 중 IFN- γ 를 처리한 조건에서는 항-TNF scFv-Fc 항체가 항원과 결합하지 못하기 때문에 세포의 성장이 억제되었다.

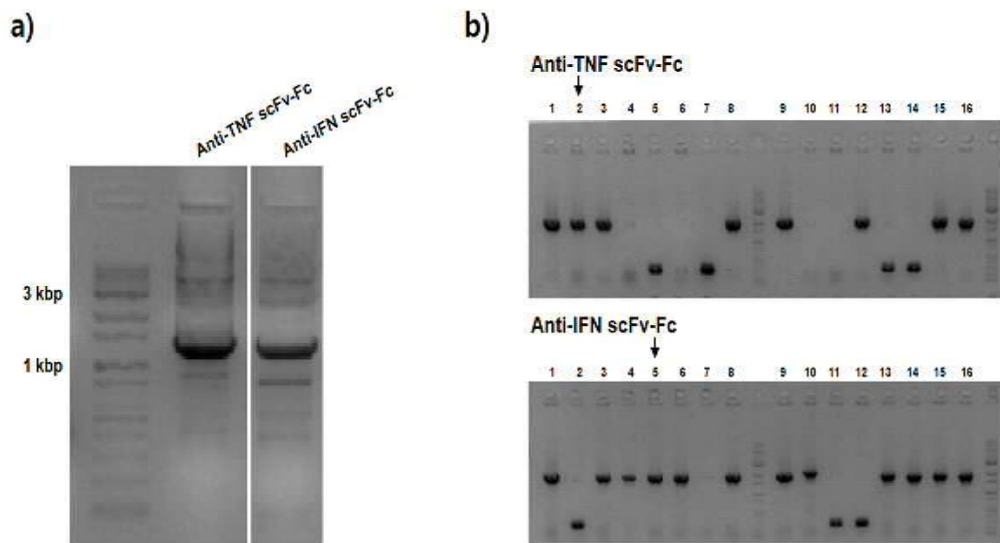
[0074] 이를 통해서 형질전환된 CHO 세포에서 생산한 이중항체가 TNF- α 와 IFN- γ 에 모두 결합하는 것을 증명하였으며, 이는 본 발명에서 개발한 신규 이중항체가 염증성 장질환의 원인이 되는 TNF- α 와 IFN- γ 에 결합하여 이를 억제함으로써 염증성 장질환의 치료에 사용할 수 있음을 보여주는 결과이다.

도면

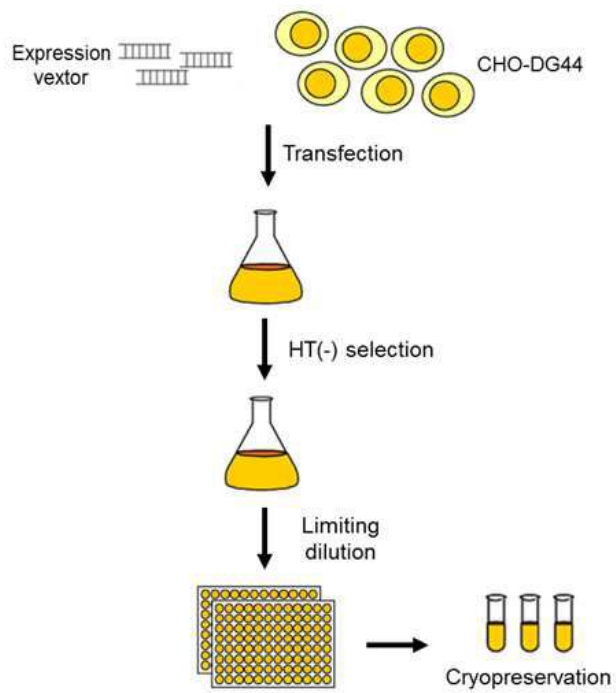
도면1



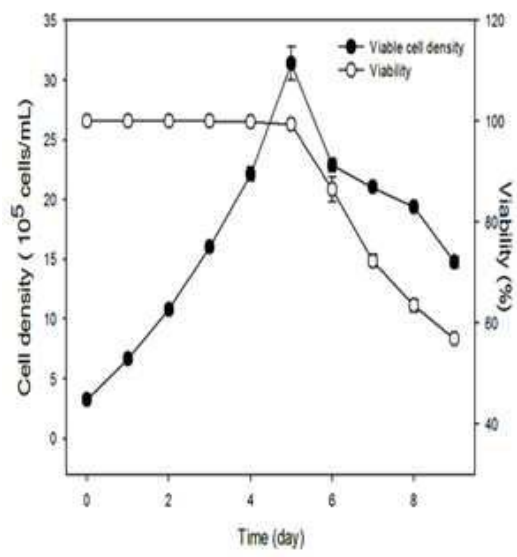
도면2



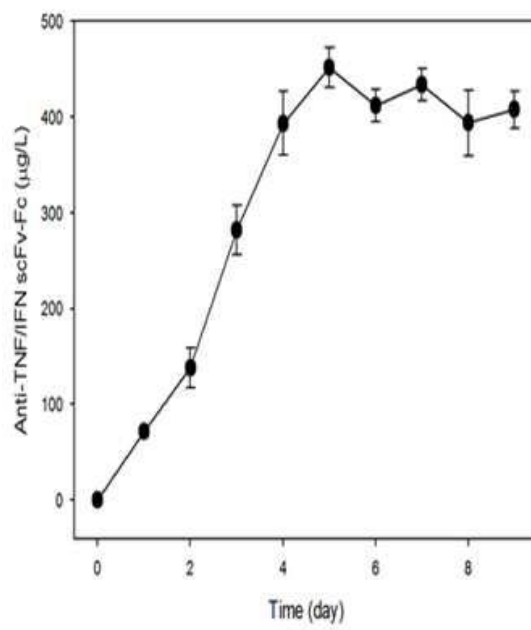
도면3



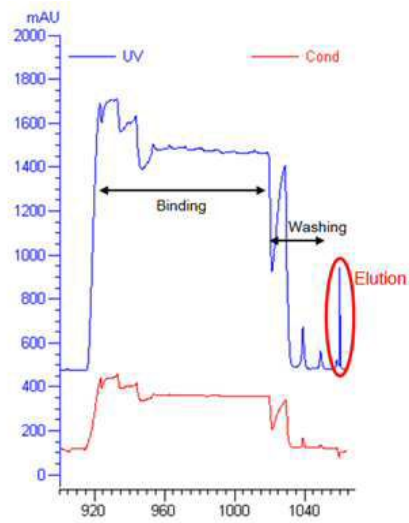
도면4



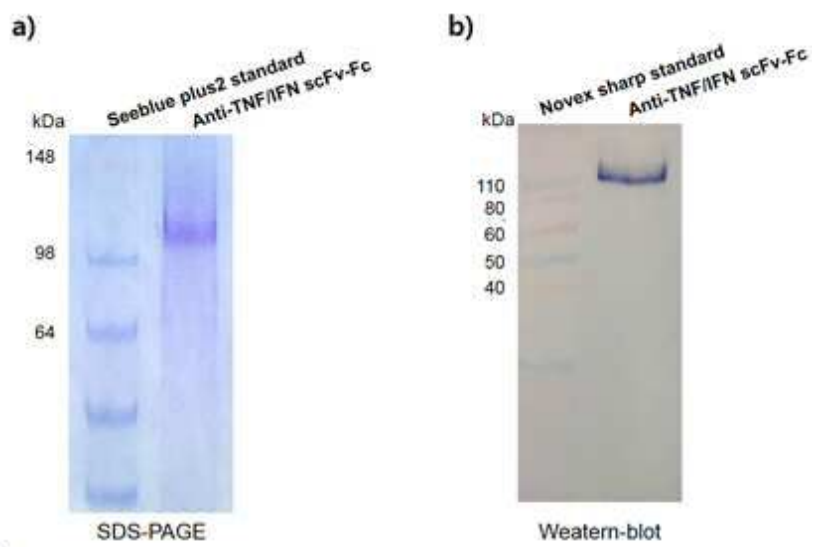
도면5



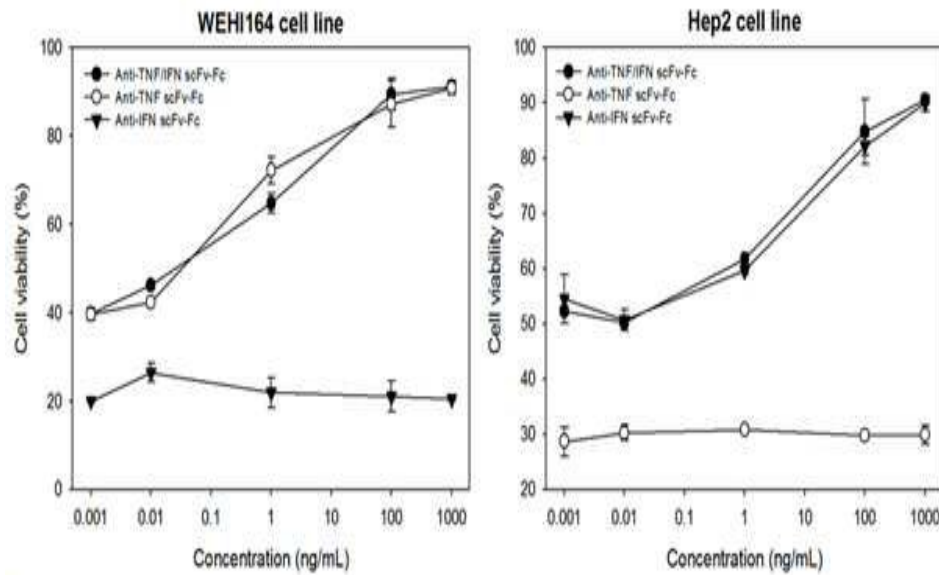
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Inha University Research and Business Foundation
- <120> Anti-TNF/IFN scFv-Fc Bispecific Antibody and uses thereof
- <130> 1-245P
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1497
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Anti-TNF scFv-Fc
- <400> 1

atggagaccg acacctgct gctgtgggtg ctgctgctgt ggggtcccgg cagcaccggc	60
gacatggcgg aggtgcagct gctggagagc ggcgggcgcc tgggtcagcc cggcggcagc	120
ctgagactga gctgcgccgc cagcggcttc accttcagca gctacgcat gagctgggtg	180
agacaggccc ccggcaaggg cctggagtgg gtgagcagca tcagcagcac cggcgccagc	240
accacctacg ccgacagcgt gaagggcaga ttaccatca gcagagaaa cagcaagaac	300
acctgtacc tgcagatgaa cagcctgaga gccgaggaca ccgccgtgta ctactgcgcc	360
aaggcgcgcg ccgccttcga ctactggggc cagggcaccc tgggtaccgt gagcagcggc	420
ggcgggcgga gcggcgggcg cggcagcggc ggcgggcgga gcaccgacat ccagatgacc	480

cagagcccca gcagcctgag cgccagcgtg ggcgacagag tgaccatcac ctgcagagcc 540
agccagagca tcagcagcta cctgaactgg taccagcaga agcccggcaa ggccccaag 600

ctgctgatct acagcgccag ctacctgcag agcggcgtgc ccagcagatt cagcggcagc 660
ggcagcggca ccgacttcac cctgaccatc agcagcctgc agcccagga cttcgccacc 720
tactactgcc agcaggccaa caacgcccc accaccttcg gccagggcac caaggtggag 780
atcaagagag ccgccgccga gcccagagc tgcgacaaga cccacacctg cccccctgc 840
cccgccccg agctgctggg cggccccagc gtgttctctgt tccccccaa gccaaggac 900
accctgatga tcagcagaac ccccgcgctg acctgcgtgg tgggtggacgt gagccacgag 960
gaccccgagg tgaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc 1020

aagcccagag aggagcagta caacagcacc tacagagtgg tgagcgtgct gaccgtgctg 1080
caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcagg tgagcaaca ggccctgccc 1140
gcccccatcg agaagacat cagcaaggcc aagggccagc ccagagagcc ccaggtgtac 1200
accctgcccc ccagcagaga cgagctgacc aagaaccagg tgagcctgac ctgcctggtg 1260
aagggttctt accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac 1320
aactacaaga ccaccccc cgtgctggac agcgacggca gcttcttctt gtacagcaag 1380
ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac 1440

gaggccctgc acaaccacta caccagaag agcctgagcc tgagccccgg caagtga 1497

<210> 2
<211> 1476
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Anti-IFN scFv-Fc
<400> 2

atggagaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgcccgg cagcaccggc 60
gacgaggtgc agctgctgga gagcggcggc ggcctggtgc agcccggcgg cagcctgaga 120
ctgagctgcg ccgccagcgg cttcaccttc agcagctacg ccatgagctg ggtgagacag 180
gccccggca agggcctgga gtgggtgagc gccatcagcg gcagcggcgg cagcacctac 240

tacgccgaca gcgtgaaggg cagattcacc atcagcagag acaacagcaa gaacaccctg 300
tacctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacaccgccg tgtactactg cgccaagaga 360
gccccgcct tcgactactg gggccagggc accctggtga ccgtgagcag cggcgacggc 420
agcagcggcg gcagcggcgg cgccagcacc ggcgagatcg tgctgacca gagccccggc 480

accctgagcc tgagccccgg cgagagagcc accctgagct gcagagccag ccagagcgtg 540
 agcagcagct acctggcctg gtaccagcag aagccccggc aggccccag actgtctgac 600
 tacggcgcca gcagcagagc caccggcatc cccgacagat tcagcggcag cggcagcggc 660

accgacttca ccctgacat cagcagactg gagccccgagg acttcgccgt gtactactgc 720
 cagcagatgg gcgacagccc caccaccttc ggccaggcca ccaaggtgga gatcaaggag 780
 cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ccgccccga gctgctgggc 840
 ggccccagcg tgttcctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagcagaacc 900
 cccggcgtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg accccgaggt gaagttaac 960
 tggctacgtg acggcgtgga ggtgcacaac gccaagacca agcccagaga ggagcagtac 1020
 aacagcacct acagagtggg gagcgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 1080

aaggagtaca agtgcaaggt gagcaacaag gcctgccccg ccccatcga gaagaccatc 1140
 agcaaggcca agggccagcc cagagagccc caggtgtaca cctgcccc cagcagagac 1200
 gagctgacca agaaccaggt gagcctgacc tgcttggtga agggcttcta cccacgcgac 1260
 atgcgcgtgg agtgggagag caacggccag ccgagaaca actacaagac ccccccccc 1320
 gtgctggaca gcgacggcag cttcttcttg tacagcaagc tgaccgtgga caagagcaga 1380
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1440
 acccagaaga gcctgagcct gagccccggc aagtga 1476

<210> 3
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Anti-TNF scFv-Fc
 <400> 3

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

50 55 60

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

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

 195 200 205
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Asn Ala Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 245 250 255
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 260 265 270

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

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
325 330 335

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
355 360 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
485 490 495

Lys

<210> 4
<211> 490
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Anti-IFN scFv-Fc
<400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 20 25 30
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 35 40 45

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

 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Ala Ser Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
 145 150 155 160
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 165 170 175
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 180 185 190

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

260	265	270	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
275	280	285	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Gly Val Thr Cys			
290	295	300	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
305	310	315	320
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
325	330	335	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
340	345	350	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
355	360	365	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
370	375	380	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
385	390	395	400
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
405	410	415	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
420	425	430	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
435	440	445	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
450	455	460	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
465	470	475	480
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
485	490		