(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월22일
(11) 등록번호 10-2469798
(24) 등록일자 2022년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7014350
(22) 출원일자(국제) 2017년10월16일
심사청구일자 2020년10월06일
(85) 번역문제출일자 2019년05월17일
(65) 공개번호 10-2019-0070957
(43) 공개일자 2019년06월21일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2017/056403
(87) 국제공개번호 WO 2018/073721
국제공개일자 2018년04월26일
(30) 우선권주장
201641035602 2016년10월18일 인도(IN)
(56) 선행기술조사문헌
WO2009113083 A1

(73) 특허권자
바이오콘 리미티드
인도 방갈로어 피.오. 560100 일렉트로닉 시티 제20 케이엠 호수르 로드
(72) 발명자
나일, 프라딥
인도, 칼나타카 방갈로어 560076, 오프 반넬가따 로오드, 아이크야 아파트 303
사하, 아린담
인도, 칼나타카 방갈로어 560076. 헵방고디, 다디스 가든 레이아웃, 다디스 루스트 368
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

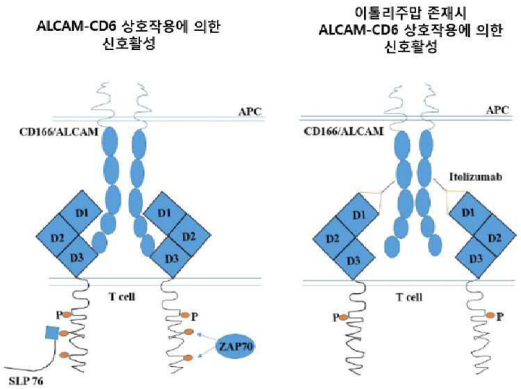
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 **이톨리주맙의 CD6 에 대한 인산화 감소 용도**

(57) 요 약

본 발명은 CD6 과인산화를 줄이고 T 세포 활성화 및 신호화 관련된 주요 분자의 도킹을 방지함으로써 ALCAM-CD6의 활성 동시 자극 신호를 직접적으로 감소하는 것을 포함하는 이톨리주맙의 주요 메커니즘을 개시한다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
(72) 발명자
사다쉬바라오, 라빈드라, 베라비나코디게
인도 칼나타카 칙카마가로레 디스트릭트 577127, 엔.알. 푸라 타룩, 카마라푸라 시술 포스트, 두파다사라, 라파벤드라 케이.알.
부가니, 우샤
인도, 칼나타카, 방갈로어 560068, 베걸 코파 메인 로오드, 에스엔엔 라 세레니티, 디3-507
메랄코드, 라마크리샨
인도, 칼나타카 방갈로어 560035, 살자풀 로오드, 레인보우 드라이브 레이아웃, 4 메인 8 크로스 288

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 2로 구성된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단일클론 항-CD6항체를 인간을 제외한 숙주세포 또는 생체 외 세포와 접촉시키는 단계를 포함하며,

상기 단일클론 항-CD6항체는 이톨리주맙(Itolizumab)이고, CD6상의 D1 수용체에 결합하여 CD6의 D3 수용체와 백혈구 세포 접착 분자(ALCAM)의 결합에 대한 입체 장애(steric hindrance)를 유발함으로써 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화를 감소시키는 것인, CD6-ALCAM 복합체의 인산화를 감소시키는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화 감소는 ZAP 70 및 SLP-76의 도킹(docking)을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화 감소는 탈인산화효소(phosphatase) SHP1 및 SHP2 의 발현을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 이톨리주맙 항체는 D3에서 ALCAM의 CD6에의 결합을 억제하지 않지만, 면역학적 시냅스에서의 입체 장애로 인해, CD6-ALCAM 간의 상호 작용을 억제하는 것인, 방법.

청구항 7

서열번호 1 및 2로 구성된 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함하는 단일클론 항-CD6항체를 인간을 제외한 숙주세포 또는 생체 외 세포와 접촉시키는 단계를 포함하며,

상기 단일클론 항-CD6항체는 이톨리주맙(Itolizumab)이고, CD6상의 D1 수용체에 결합하여 CD6의 D3 수용체와 ALCAM의 결합에 대한 입체 장애를 유발함으로써 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화를 감소시키는 것인, 면역학적 시냅스에서의 입체 장애로 인해 CD6-ALCAM 간의 상호 작용을 억제하는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화 감소는 ZAP 70 및 SLP-76의 도킹(docking)을 감소시키는 것인,

방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화 감소는 탈인산화효소 SHP1 및 SHP2의 발현을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 이톨리주맙 항체는 D3에서 ALCAM의 CD6에의 결합을 억제하지 않지만, 면역학적 시냅스에서의 입체 장애로 인해 CD6-ALCAM 간의 상호 작용을 억제하는 것인, 방법.

청구항 13

서열번호 1 및 2로 구성된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단일클론 항-CD6항체를 인간을 제외한 숙주세포 또는 생체 외 세포와 접촉시키는 단계를 포함하며,

상기 단일클론 항-CD6항체는 이톨리주맙(Itolizumab)이고, CD6상의 D1 수용체에 결합하여 CD6의 D3 수용체와 ALCAM의 결합에 대한 입체 장애를 유발함으로써 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화를 감소시켜 탈인산화효소 SHP1 및 SHP2의 발현을 감소시키는 것인, 탈인산화효소 SHP1 및 SHP2를 억제하는 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화 감소는 ZAP 70 및 SLP-76의 도킹(docking)을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 이톨리주맙 항체는 D3에서 ALCAM의 CD6에의 결합을 억제하지 않지만, 면역학적 시냅스에서의 입체 장애로 인해 CD6-ALCAM 간의 상호 작용을 억제하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 1. 관련출원

[0002] 본 출원은 인도 특허청에 2016년 10월 18일 자로 출원된 인도 특허 출원 201641035602호의 이익과 우선권을 주장한다. 2016년 10월 18일에 출원된 상기 출원의 내용은 PCT규정 4.18에 따라 PCT 규정 20.5(a)에 언급되었고 여기에 포함되지 않은 설명, 청구 또는 도면의 요소 또는 일부를 통합하는 것을 포함하여 모든 목적을 위해 본 문서에 통합된다.

[0003] 2. 기술분야

[0004] 본 발명은 인간화 IgG1 동종(Isotype) 항-CD6 단일클론항체(T1h)에 관한 것으로 이것은 흉선 상피세포, 단핵구, 활성화 T 세포 및 다양한 다른 유형 세포의 표면에 존재하는 CD6의 스캐빈저 수용체 시스테인-리치(SRCR) 도메인 1(D1)과 결합한다. 본 발명은 T-헬퍼 및 T 림프구 세포에 의해 매개되는 질병 상태의 예방을 포함한 치료 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] T 세포의 활성화, 분화 및 기능은 다양한 발현, 구조 및 기능을 갖는 공동 자극 및 공동 억제 수용체에 의해 조절되며, 대부분 상황 의존적이다. TCR의 활성화와 뒤따르는 ZAP70의 인산화는 CD6가 스캐폴드 단백질처럼 작용하여 어댑터 또는 도킹 단백질인 LAT와 독립적인 구아닌 뉴클레오티드 인자 Vav1을 집합 할 수 있는 TCR 복합체에 대한 CD6의 연결을 촉진시켰다. 또한 CD6의 세포질 꼬리상의 티로신, 세린 및 트레오닌 잔기에서의 과인산화는 SLP-76과 같은 어댑터 분자에 CD6의 결합을 유도한 다음 시간 및 용량에 의존적으로 MAPK 활성화가 이어진다(Nair P et al, 2010). CD6는 단독 발현으로, 즉 심지어 리간드 결합 없이도 T 세포 내에서의 신호를 억제하기에 충분한 신호 감쇠기로 밝혀졌다(Oliveira L et al, 2012). 더 최근에, Orta-Mascaro M et al., 2016은 CD6 null 생쥐에서 흉선 내 음성선택이 있고 말초에서 자기 또는 환경 항원에 대한 반응으로 증가된 활성화를 보여주었다. 이 발견은 CD6에 대한 억제 기능을 나타내는 기억 및 조절 표현형을 갖는 T 세포의 서브세트의 확장으로 나타난다.

[0006] CD6는 T 세포 조절과 관련이 있으며 여러가지의 자가 면역 질환과 관련이 있다. WO/2009/113083은 흉선 상피 세포, 단핵구, 활성화 T 세포 및 다양한 다른 유형 세포의 표면에 존재하는 CD6의 스캐빈저 수용체 시스테인-리치(SRCR) 도메인 1(D1)에 결합하는 인간화 IgG1 아이소타입 항-CD6 항체 (T1h) 보여준다. 스캐빈저 수용체 시스테인-리치 도메인 슈퍼패밀리(SRCR-SF)이며 상당한 구조 및 기능적 상동성을 공유하는 CD6과 CD5는, 기존의 원시적인 T 세포의 Th17 세포로의 분화를 위한 항 CD3와 CD28 매개 공동 자극 보다 개별적으로 우수한 것으로 밝혀졌다.

[0007] WO/2015/011658은 CD6 도메인 1 특이적 인간화 단일클론항체인 이톨리주맙이 항 CD3 항체로 자극된 또는 ALCAM과 함께 공동 자극된 T 림프구의 증식 및 사이토카인 생산을 억제한다는 것을 입증했다. 이톨리주맙은 또한 IL-17에 의해 발병된 것으로 알려진 인간 질병에서도 효능을 입증했다.

[0008] 이톨리주맙은 ALCAM 및 CD6 도메인 3과의 결합 방해 없이 CD6의 도메인 1과 결합하는 인간화 IgG1 비소모성 단일클론항체(mAb)이다. 이톨리주맙은 최근 임상 시험에서 건선 및 류마티스 관절염 환자에게서 효능이 입증되었으며, 이 약물은 인도에서 건선 치료에 승인되었다(Krupashankar DS et al, 2014). 그러나, 이 약물의 작용 방식은 명확하게 규명되지 않았다. 따라서 이톨리주맙의 작용 방식을 발견하는 것은 유리할 것이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Roncagalli R, Hauri S, Fiore F, Liang Y, Chen Z, Sansoni A, et al. Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. Nat Immunol. 2014 Apr;15(4):384-92.

(비특허문헌 0002) Nair P, Melarkode R, Rajkumar D, Montero E. CD6 synergistic co-stimulation promoting proinflammatory response is modulated without interfering with the activated leucocyte cell adhesion molecule interaction. Clin Exp Immunol. 2010 Oct;162(1):116-30.

(비특허문헌 0003) Oliveira MI, Goncalves CM, Pinto M, Fabre S, Santos AM, Lee SF, et al. CD6 attenuates early and late signaling events, setting thresholds for T-cell activation. Eur J Immunol. 2012 Jan;42(1):195-205.

(비특허문헌 0004) Orta-Mascaro M, Consuegra-Fernandez M, Carreras E, Roncagalli R, Carreras-Sureda A, Alvarez P, et al. CD6 modulates thymocyte selection and peripheral T cell homeostasis. J Exp Med. 2016 Jul 25;213(8):1387-97.

(비특허문헌 0005) Krupashankar DS, Dogra S, Kura M, Saraswat A, Budamakuntla L, Sumathy TK, et al. Efficacy and safety of itolizumab, a novel anti-CD6 monoclonal antibody, in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase-III

study. J Am Acad Dermatol. 2014 Sep;71(3):484-92.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 CD6 과인산화를 줄이고 T 세포 신호전달, 활성 및 증식과 관련된 주요 분자의 도킹(docking)을 방지함으로써 ALCAM-CD6의 동시 자극 신호 활성을 직접적으로 감소시키는 것을 포함하는 이톨리주맙의 주요 메커니즘을 개시한다.

[0011] 일 측면에서, 본 발명은 CD6-ALCAM 복합체의 인산화를 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은:

[0012] 서열번호 1 및 2로 구성된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단일클론 항-CD6항체를 숙주세포와 접촉시키는 단계를 포함하며,

[0013] 상기 단일클론 항-CD6항체는 CD6상의 D1 수용체에 결합하여 CD6의 D3 수용체와 ALCAM의 결합에 대한 입체 장애(steric hindrance)를 유발함으로써 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화를 감소시키는 것이다. 바람직하게, 상기 단일클론 항-CD6항체는 이톨리주맙(Itolizumab)이다.

[0014] 특히, CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화 감소는 또한 ZAP70(T 세포 반응을 개시하는 중요한 역할을 하는 세포질 단백질 티로신인산화효소) 및 SLP-76(도킹 분자)의 도킹 감소를 야기하고, 탈인산화효소(phosphatase) SHP1 및 SHP2의 발현을 감소시킨다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 면역학적 시냅스에서의 입체 장애로 인해, 형성된 CD6-ALCAM 복합체의 완전한 상호 작용을 억제하는 방법을 제공하며, 이 방법은:

[0016] 서열번호 1 및 2로 구성된 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함하는 단일클론 항-CD6항체를 숙주세포와 접촉시키는 단계를 포함하며,

[0017] 상기 단일클론 항-CD6항체는 CD6상의 D1 수용체에 결합하여 CD6의 D3 수용체와 ALCAM의 결합에 대한 입체 장애를 유발함으로써 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화를 감소시키는 것이다. 바람직하게, 상기 단일클론 항-CD6항체는 이톨리주맙이다.

[0018] 더 나아가, 본 발명은 ALCAM을 CD6의 D3에 결합함으로써 유도되는 CD6 수용체의 인산화 감소를 제공하며, 이 방법은:

[0019] 서열번호 1 및 2로 구성된 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함하는 단일클론 항-CD6항체를 숙주세포와 접촉시키는 단계를 포함하며,

[0020] 상기 단일클론 항-CD6항체는 CD6상의 D1 수용체에 결합하여 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화를 감소시키는 것인, CD6-ALCAM 복합체의 인산화를 감소시킨다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 탈인산화효소 SHP1 및 SHP2의 발현을 억제하는 방법을 제공하며, 이 방법은:

[0022] 서열번호 1 및 2로 구성된 중쇄 및 경쇄 가변영역을 포함하는 단일클론 항-CD6항체를 숙주세포와 접촉시키는 단계를 포함하며,

[0023] 상기 단일클론 항-CD6항체는 CD6상의 D1 수용체에 결합하여 CD6-ALCAM 복합체의 CD6 수용체의 인산화를 감소시켜 탈인산화효소 SHP1 및 SHP2의 발현을 감소시키는 것이다.

[0024] 상기 숙주세포는 바람직하게는 다발성경화증 또는 이식거부반응, 이식편대숙주병, 제1형 및 제2형 당뇨병, 피부 T세포림프종, 갑상선염 및 기타 T 세포 매개 자가면역 질환과 관련된 부작용과 같은 환자의 건선, 류마티스 관절염 또는 자가면역 반응과 같은 염증성 증상을 조절하기 위한 치료가 필요한 인간 대상체이다.

[0025] 본 발명의 다른 측면, 목적, 특징 및 장점은 본 발명의 바람직한 실시 예를 예시하는 다음의 상세한 설명을 통해 해당 기술자에게 명백히 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 이톨리주맙이 CD6-ALCAM 동시 자극 신호 전달 경로를 억제함을 나타낸다. 이톨리주맙 또는 Iso Ab 함께 인간 PBMC를 40분동안 ALCAM (10㎍/ml)가 코팅된 플레이트에 플레이팅 하였다. (A) CD6는 이톨리주맙 또는 Iso Ab와 함께 면역 침전시켰고 CD6, p-Tyr, Zap70 및 SLP-7(상단 패널)에 대해 면역 표지 하였다. 하단 패널은 CD6, ZAP70 및 SLP-76에 해당하는 10% 투입(Input) 대조군 샘플을 보여준다. 대표적인 표지는 서로 다른 기증자의 최소 3가지 독립적 실험에서 나온 것이다. (B-D) A에 나타난 p-Tyr, Zap70 및 SLP-76 강도의 전반적인 정량은 세 가지 독립적인 실험에서 막대 그래프로 표시하였다. 결과는 평균 ± SD로 표시하였다. (E) A에 나타난 것과 유사한 실험으로 CD6, p-Tyr 및 탈인산화효소 p-SHP1, SHP1, pSHP2 및 SHP2에 대해 면역 표지하였다. 이 표지는 다른 기증자의 세가지 독립적인 실험을 대표한다. (F 및 G) E에 나타난 것과 같이 p-SHP1 및 p-SHP2 강도의 전반적인 정량은 세 가지 독립적인 실험에서 막대 그래프로 표시하였다. 결과는 평균 ± SD로 표시하였다

도 2는 MEM-98 항체를 사용하여 CD6 면역 침전 샘플의 웨스턴 블롯을 나타낸다.

도 3은 나타낸다. (A) 이톨리주맙 또는 Iso Ab의 존재 혹은 부존재 하에 인간 PBMC를 0.5 ng/ml 항 CD3 항체 (OKT3)으로 24시간 동안 처리하였다. CD6는 이톨리주맙과 함께 면역 침전 되었고, CD6, p-Tyr, Zap70 및 SLP-76에 대해 면역 표지되었다. 상응하는 10% 투입 샘플을 음성 컨트롤로서 수행하였다. 대표적인 표지는 두가지 독립적인 실험에서 나온 것이다. (B-D) p-Tyr, Zap70, SLP-76 상대적인 강도의 정량화 (평균 ± SD). 그래프들은 서로 다른 실험 조건에서 폴드 차이를 계산하기 위해 2개의 독립적인 실험으로부터 그려졌다.

도 4는 이톨리주맙의 작용 기전을 묘사한 그림을 나타낸다. 여기에서 ALCAM-CD6 최적의 상호작용은 이톨리주맙에 의해 야기된 입체 장애에 의해 저해되는 것을 나타낸다. ALCAM-CD6 상호작용의 억제는 세포질 도메인에서 CD6 인산화를 감소시켜 T 세포 활성 신호 폭포의 하향 조절을 유도한다.

도 5는 이톨리주맙 항체의 경쇄 가변영역 아미노산 서열(서열번호 1), 중쇄 가변영역 아미노산 서열(서열번호 2), 중쇄 가변 및 불변 아미노산 서열(서열번호 5) 및 경쇄 가변 및 불변 아미노산 서열(서열번호 6)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 CD6의 도메인 1(D1)에 결합할 수 있는 항-CD6 단일클론항체를 제공하고 ALCAM에 의해 유도된 CD6 수용체 인산화를 직접적으로 억제 또는 감소시키고 뒤이은 ZAP70(키나아제) 및 도킹 단백질인 SLP76의 도킹을 감소시킨다. 또한, CD6 인산화 및 관련 신호 분자의 이러한 억제 및/또는 감소는 T 세포 활성 및 분화를 감소시킨다.

[0028] 본 발명의 실시는 달리 명시되지 않는 한 기술 범위 내에 있는 면역학, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학 및 재조합 DNA의 종래의 기법을 채택한다. 예를 들어, Sambrook, et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2판 (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, 및 ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

[0029] 정의

[0030] 달리 명시되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 사람이 일반적으로 이해하는 의미를 가져야 한다. 또한, 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수의 용어는 복수를 포함하고 복수의 용어는 단수를 포함해야 한다.

[0031] 본 발명을 기술하고 청구할 때, 하기 용어는 본원에 제시된 정의에 따라 사용될 것이다.

[0032] 본 발명에서 사용된, "항-CD6 항체"는 일반적으로 인간 CD6(hCD6)의 SRCR 도메인 1(D1)에 특이적으로 결합하는 항체이다. 본 발명의 바람직한 측면에서, CD6의 인간 SRCR 도메인1에 특이적으로 결합하고 CD6에 대한 활성화 백혈구 세포 접착 분자(ALCAM) 결합을 방해하지 않는 고유 및 인위적으로 변형된 항체와 항체 단편들을 포함하는 항체 및 다른 면역글로불린이 제공된다.

[0033] 본 발명에서 사용된, "단일클론항체"(mAb)는 대체로 동종의 항체 집단을 말하며; 즉, 해당 집단의 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단일클론항체는 단일 항원 결정기 인

“에피토프”에 대해 매우 특이적이다. 따라서, 수식어 “단일클론”은 동일한 에피토프에 대한 대체로 동종의 항체 집단을 나타내며, 어떤 특정한 방법에 의한 항체 생성이 요구되는 것으로 이해되서는 안된다. 단일클론항체는 해당 업계에 공지된 임의의 기술 또는 방법론에 의해 제조될 수 있음을 이해해야 한다; 예를 들어 해당 업계에 공지된 재조합 DNA 방법, 또는 파지항체 라이브러리를 사용하여 재조합으로 생성된 단일클론의 분리 방법을 포함한다.

[0034] 본 발명에서 사용된, “치료적 유효량”은 원하는 치료 결과를 얻기 위해 필요한 기간 동안 복용할 때 효과적인 양을 의미한다.

[0035]

[0036] 본 발명의 측면은 또한 “구성된” 및 “필수적으로 구성된” 양상을 포함하는 것으로 이해된다.

[0037]

[0038] 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2를 포함하는 CD6에 대한 ALCAM의 결합을 방해하지 않으면서 CD6의 D1 도메인에 특이적으로 결합할 수 있는 항-CD6 단일클론항체를 제공한다. 항-CD6 단일클론항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 3 및 서열번호 4을 포함하거나 또는 뉴클레오티드 서열은 적어도 서열번호 1 및 서열번호 2에 대해 적어도 90%의 상동성을 가진다.

[0039] 본 발명의 항-CD6 단일클론항체의 제조 방법

[0040] 본 발명은 또한 개시된 항-CD6 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 이 방법은 본 발명의 항체를 인코딩하는 분리된 핵산을 함유하는 숙주세포를 배양하는 것을 포함한다. 해당 기술자라면 알 수 있듯이, 이는 항체의 성질에 따라 다양한 방법으로 수행될 수 있다.

[0041] 일반적으로, 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산이 제공된다. 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA의 형태일 수 있다. DNA, cDNA, 게놈 DNA, 핵산 유사체 및 합성 DNA의 형태의 폴리뉴클레오티드는 본 발명 범위 내에 있다. 상기 DNA는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있으며, 만약 단일 가닥이면 코딩(센스) 가닥 또는 비코딩(안티센스) 가닥일 수 있다. 항-CD6 단일클론항체를 코딩하는 코딩 서열은 본 발명에서 제공된 코딩 서열과 동일할 수 있거나 또는 상이한 코딩 서열 일 수 있으며, 이 서열은 유전 코드의 불필요한 중복 또는 퇴화의 결과로서, 본 명세서에 제공된 DNA와 동일한 폴리펩티드를 코딩한다.

[0042] 일부 실시 양태에서, 본 발명의 항-CD6 단일클론항체를 코딩하는 핵산은 염색체외(extrachromosomal)의 발현 벡터를 포함하거나 제시된 숙주세포의 게놈에 통합되도록 설계될 수 있다. 발현 벡터는 많은 수의 적절한 조절 서열(전사 및 번역 조절 서열, 프로모터, 리보솜 결합 부위, 인핸서, 복제 기점 등을 포함하나 이에 한정되지는 않음) 또는 다른 구성요소(선택 유전자 등)를 포함할 수 있으며, 이들 모두는 해당 업계에 공지된 바와 같이 작동 가능하게 연결된다. 일부의 경우, 2개의 핵산이 사용되어 각각 다른 발현 벡터(예를 들어, 첫번째 발현 벡터 안에 중쇄, 두번째 발현 벡터 안에 경쇄)에 삽입되거나, 또는 동일한 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 설계는 숙주세포의 선택 즉, 목적하는 단백질의 발현 수준 등의 인자에 의해 좌우될 수 있음이 해당 기술자들에 의해 인식될 것이다.

[0043] 일반적으로, 핵산 및/또는 발현은 숙주세포를 선택하는(예를 들어, 형질전환, 형질주입, 전기천공, 감염) 적절한 방법을 사용하여 재조합 숙주세포를 생성하기 위해 적합한 숙주세포로 도입될 수 있고, 그런 경우 핵산 분자는 하나 또한 그 이상의 발현 조절 요소(예: 숙주세포 게놈에 통합된 세포에서의 과정에 의해 생성된 구조체 내의 벡터)에 가능하게 연결된다. 생성된 재조합 숙주세포는 발현(예, 유도물질의 존재 하에, 적합한 비인간 동물에서, 적당한 염, 성장 인자, 항생제, 영양 보충제 등이 있는 적합한 배양 배지에서 등)에 적합한 조건 하에 유지 될 수 있으며, 이로써 암호화 된 폴리펩티드가 생산된다. 어떠한 경우에는 중쇄가 한 세포에서 생성되고 경쇄는 다른 세포에서 생성된다.

[0044] 발현 벡터는 재조합 숙주세포 내 단일클론항체의 합성체를 얻기 위해 대장균 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포의 유인원 COS 세포와 같은 포유류 세포, 바실러스, 스트렙토마이세스 및 사카로미세스와 같은 숙주세포로 형질감염될 수 있다. 효모, 곤충 및 식물 세포 또한 재조합 항체를 발현하는데 사용될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 항체는 소 또는 닭과 같은 형질 전환 동물에서 생성될 수 있다.

[0045] 항체 분자 생물학, 발현 정제 및 스크리닝에 대한 일반적인 방법은, 예를 들어 Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 및 2010에 편집된 Antibody Engineering에 기술되어 있다.

[0046] 투여 방법

[0047] 아래 설명된 사용 방법에 따라 투여하는 경우, 항-CD6 단일클론항체는 이러한 치료를 필요로 하는 인간 대상체에 투여하기 전에, 비독성의 약학적으로 허용 가능한 물질(예: 보통의 식염수 또는 인산염-버퍼 식염수)로 혼합될 수 있고, 의료적으로 적절한 절차, 가령 비경구적 투여(예, 주사) 예를 들어 정맥주사 또는 동맥주사를 사용하여 투여될 수 있다.

[0048] 본 발명에 따라 사용된 항-CD6 단일클론항체의 제형은 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 동결 건조 제형 또는 수용액 형태의 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 혼합함으로써 제조될 수 있다. 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정제는 투여된 용량 및 농도에서 수용자에게 비독성이며, 인산염, 구연산염, 및 기타 유기산과 같은 완충제를 포함한다; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄과 같은 보존료; 헥사메토늄 염화물; 염화벤잘코늄, 염화벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필파라벤과 같은 알킬파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올 및 m-크레졸; 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류 및 글루코즈, 마노스 또는 덱스트린을 포함하는 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로오스, 만니톨, 트레할로스, 소르비톨과 같은 설탕; 나트륨과 같은 염-형성 반대-이온; 금속 복합체(예: Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제.

[0049] 상기 항-CD6 단일클론항체는 또한 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마이크로에멀젼에서 준비된 마이크로캡슐에 포획될 수 있다. 예를 들어, 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합, 예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로 캡슐 및 폴리(메틸메타크릴산염)-마이크로캡슐, 콜로이드성 약물전달시스템(예를 들어, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 마크로에멀젼이 있다. 이러한 기술들은 해당 업계에 잘 알려져 있다.

[0050] 서방출형 제제가 준비될 수 있다. 서방출형 제제의 적절한 예로 항-CD6 단일클론항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 매트릭스는 성형된 제품의 형태로 존재하며 예를 들어, 필름 또는 마이크로 캡슐이다. 서방출형 매트릭스의 예로, 폴리에스테르, 하이드로겔, L-글루탐산의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트 및 분해성 젖산-글리콜산 공중합체를 포함한다.

[0051] 상기 항-CD6 단일클론항체는 치료가 필요한 인간 대상체와 같은 포유 동물에 투여될 수 있으며, 공지의 방법에 따라, 예를 들어 볼루스로서 정맥 투여 또는 일정 기간 내에 걸친 연속 주입, 근육 내, 복강 내, 뇌척수 내, 피하의, 관절 내, 활액 내, 척수강 내, 또는 구강 내 경로로 투여될 수 있다. 상기 항-CD6 단일클론항체의 정맥 내 또는 피하 투여가 바람직하다.

[0052] 용량 용법은 최적의 원하는 반응(예, 치료 반응)을 제공하도록 조절된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여 될 수 있고, 여러 번 분할된 용량이 시간이 지남에 따라 투여될 수 있거나, 투여량은 치료 상황의 긴급성에 의해 나타난 바와 같이 비례하여 감소되거나 증가될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 상기 항-CD6 단일클론항체의 효율적인 투여량 및 투여 방법은 루푸스-유형 질환의 중증도에 달려있고, 해당 기술자에 의해 결정될 수 있다.

[0053] 본 발명에서 사용되는 상기 항-CD6 단일클론항체의 치료적 유효량에 대한 모범적 비제한적 범위는 대상체 중량 당 약 0.01-100 mg/kg, 예를 들어 약0.01-50 mg/kg, 예를 들어 약0.01-25 mg/kg이다. 해당 기술에 통상의 지식을 가진 의료 전문가는 필요한 약학적 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사는 원하는 치료 효과를 달성하고 원하는 효과가 달성 될 때까지 점차적으로 투여량을 증가시키기 위해 시작을 요구되는 것 보다 낮은 수준으로 항-CD6 단일클론항체를 투여할 수 있다.

[0054] 한 실시 양태에서, 상기 항-CD6 단일클론항체는 예를 들어 대상체 중량 당 1 내지 500 mg/kg, 20 내지 200 mg/kg의 주간 투여량으로 주입에 의해 투여 된다. 이러한 투여는 예를 들어 1 내지 8회, 3내지 5회 반복 될 수 있다. 대안적으로, 투여는 예를 들어 2 내지 24시간, 2내지 12시간의 기간 동안 연속 주입에 의해 수행될 수 있다.

[0055] 또 다른 실시 양태에서, 상기 항-CD6 단일클론항체는 10 mg 내지 200 mg의 주간 투여량으로 7회까지, 예를 들어 4 내지 6회 투여된다. 투여는 2 내지 24시간, 예를 들어 2내지 12시간의 기간 동안 연속 주입에 의해 수행될 수 있다. 그러한 요법은 필요에 따라, 예를 들어 6개월 또는 12개월 후에 1회 이상 반복 될 수 있다.

[0056] 다음의 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 제시되었지만, 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 실시예는 분석 과정에서 사용된 통상적인 방법에 대한 상세한 설명을 포함하지 않는다. 이러한 방법은 해당 기술자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 수 많은 문헌에 기재되어 있다.

[0057] 실시예

[0058] 본 발명자의 이전 연구에 의하면, 첨가된 이톨리주맙(서열번호 3 및 4에 의해 코딩된 서열번호 1-2)은 CD6의 도메인 1에 결합하고 T 세포의 Th17 세포로의 활성 및 분화를 감소시키고 IL-17의 생성을 감소시킨다. 이러한 효과는 주요 전사 인자인 pSTAT3 및 RORγ의 감소와 관련이 있다. 현재의 실시예에서, ALCAM-CD6 매개 T 세포 활성화에 대한 이톨리주맙의 효과는 억제 메커니즘을 이해하기 위해 평가되었다.

[0059] 단일클론항체인 이톨리주맙 및 니모투주맙(인간화 항 EGFR, 이톨리주맙과 동일한 Fc 영역) mAbs는 Biocon Ltd(Bangalore, India)에서 생산되었으며, 모든 실험에서 가용성 형태로 사용되었다. 니톨리주맙은 모든 실험에서 비특이적인 동종 대조군 항체(Iso Ab)로 사용되었다.

[0060] **이톨리주맙은 CD6-ALCAM 매개 공동 자극 신호 전달 경로를 억제한다.**

[0061] 이톨리주맙이 매개하는 T세포 활성 억제의 생리학적 기초를 이해하기 위해, 활성CD6-ALCAM 상호작용을 억제하는 이톨리주맙의 역할이 연구되고 있다. CD6에 대한 하류로의 신호 전달을 평가하기 위해, PBMCs는 플레이트 결합 ALCAM의 존재 하에서 이톨리주맙과 함께 또는 없이 처리되었다.

[0062] 이 실험에서, 6 well 플레이트는 TSM 버퍼(20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 1X 프로테아제 및 포스파타제 저해제 첨가) 중 Fc-ALCAM(10 μg/ml)으로 밤새 코팅되었다. 실험 당일, 코팅된 플레이트를 TSM 버퍼 중 1% BSA로 차단시켰다. 인간 PBMC (6 well 플레이트 중 $5x10^6$/well)를 플레이팅하고 이톨리주맙 또는 Iso Ab로 40분 동안 처리하였다.

[0063] 이 기술을 사용하여, 면역 침전 된 CD6 단백질로부터 ALCAM 의존성 CD6 인산화 및 CD6 상호 작용 분자를 조사하였다. 이톨리주맙에 의한 균등 CD6 풀다운은 2가지 다른 항체인 이톨리주맙 및 MEM-98(도 1 및 도 2)을 사용하여 CD6 면역 블롯을 통해 확인하였다. 추출된 CD6 단백질의 티로신 인산화를 조사한 결과, ALCAM-CD6 상호작용은 CD6 티로신 인산화를 2.5배 이상 증가시켰다. 이러한 인산화의 증가는 이톨리주맙에 의해 억제되었다. CD6의 결합 파트너로 알려진 Zap70(키나아제) 및 SLP-76(신호 및/또는 도킹 단백질)과 면역 침전된 CD6과의 연관성을 조사하였다. ALCAM-CD6 상호 작용은 SLP-76 및 Zap70과 CD6의 결합을 3-4배 증가시켰으며, 다시 이톨리주맙에 의해 억제되었다(도 1).

[0064] 수용체의 인산화는 포스파타아제의 발현에 의해 조절된다. SHP1 및 SHP2는 수용체 단백질과 관련되어 있으며 인산화를 제어하여 신호 전달을 조절하는 것으로 알려진 주요한 탈인산화효소이다. 면역 침전된 CD6과 상기 단백질들과의 결합 및 인산화는 이톨리주맙-매개 억제에서 연구되었다. 도 2에 나타난 바와 같이, ALCAM-CD6 상호작용의 결합 복합체는 SHP1 및 SHP2 관련CD6의 인산화를 3-4배 증가시켰다. 그러나, 놀랍게도, 이톨리주맙의 사용은 CD6과 관련된 인산화된(활성화 된) SHP1 및 SHP2를 모두 억제하여 발현 수준을 기준 수준(baseline)까지 가져왔다(도 1). 이러한 결과는 이톨리주맙에 의한 T세포 활성 억제가 탈인산화효소의 과발현 또는 활성화를 통한 것이 아니라 SHP1 및 SHP2와는 독립적인 CD6 과인산화물의 직접 감소에 의한 것임을 시사한다.

[0065] 보다 생리학적인 관련 조건에서 ALCAM-CD6의 효과를 입증하기 위해 TCR 활성화 실험을 이용하였다. 이 실험에서, PBMC는 이톨리주맙 또는 Iso Ab 항체의 존재 또는 부재하에 24시간 동안 0.5 ng/ml 항 CD3 항체(OKT3)로 처리하였다. 세포를 수확하고 CD6을 이톨리주맙 또는 Iso Ab와 함께 면역 침전시켰다. 10%의 총 용해물이 투입 대조군 샘플로 사용되었다. 면역 침전 및 투입 대조군 샘플 모두 면역 블롯 및 분석되었다. 여기에서 결과는 항 CD3-매개 활성이 CD6 인산화, Zap70 및 SLP-76과 CD6의 결합을 각각 2.5-3배 증가시키는 것을 나타낸다. 모든 경우에, 이 활성 신호는 도 3에 나타난 바와 같이 이톨리주맙의 존재 하에 완전히 억제 되었다. 전반적으로 이러한 결과는 이톨리주맙의 주요 작용 기전은 CD6의 과 인산화를 직접 감소시키고 T 세포 신호 전달, 활성화 및 증식과 관련된 핵심 분자의 도킹을 방지함으로써 활성 ALCAM-CD6 동시 자극 신호의 감소를 나타낸다.

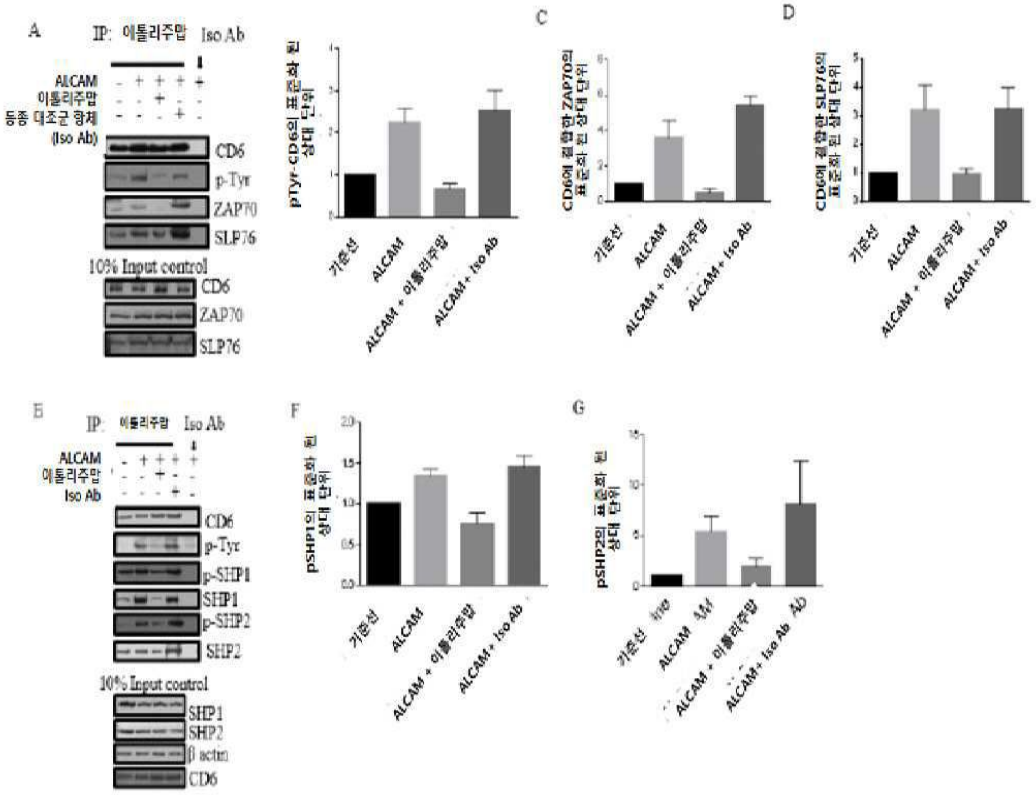
[0066] 본 발명은 분자 수준에서, 이톨리주맙이 T 세포 활성에 중요한 CD6-ALCAM의 최적의 결합을 방지한다는 것을 보여준다. 이러한 상호 작용에 대한 이론적 모델은 도 4에 나타내었다. 클러스터링은 T 세포 막에 CD6 수용체가 축적되는 것을 의미한다.

[0067] 면역시냅스에서 CD6의 축적(클러스터링)은 항원 제시 세포에서 ALCAM과 상호 작용하여 CD6-ALCAM 복합체를 형성

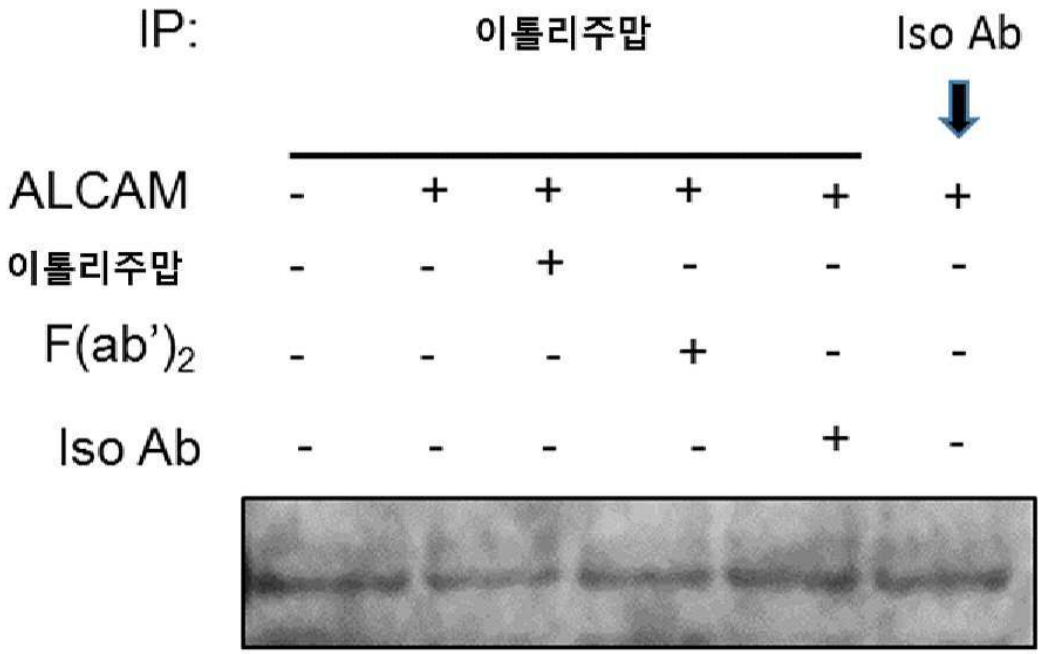
함으로써 CD6 수용체의 활성을 개시한다. 이 모델에서 이톨리주맙은 CD6의 도메인 1에 결합할 때 입체 장애를 제공하고 CD6의 도메인 3 (D3)과 ALCAM의 최적의 상호 작용을 억제한다고 제안한다. 이러한 입체 장애는 이 보조자극 분자 CD6에 의해 매개되는 T 세포 신호 전달의 감쇄를 초래한다. 다른 상황에서, CD6가 클러스터링 되지 않는 곳에서는 이톨리주맙이 이전에 보고된 것처럼 ALCAM-CD6 상호작용을 억제하거나 간섭하지 않는다. 이것은 활성 ALCAM-CD6 상호 작용이 차단되는 이톨리주맙의 주요 메커니즘을 설명한다.

도면

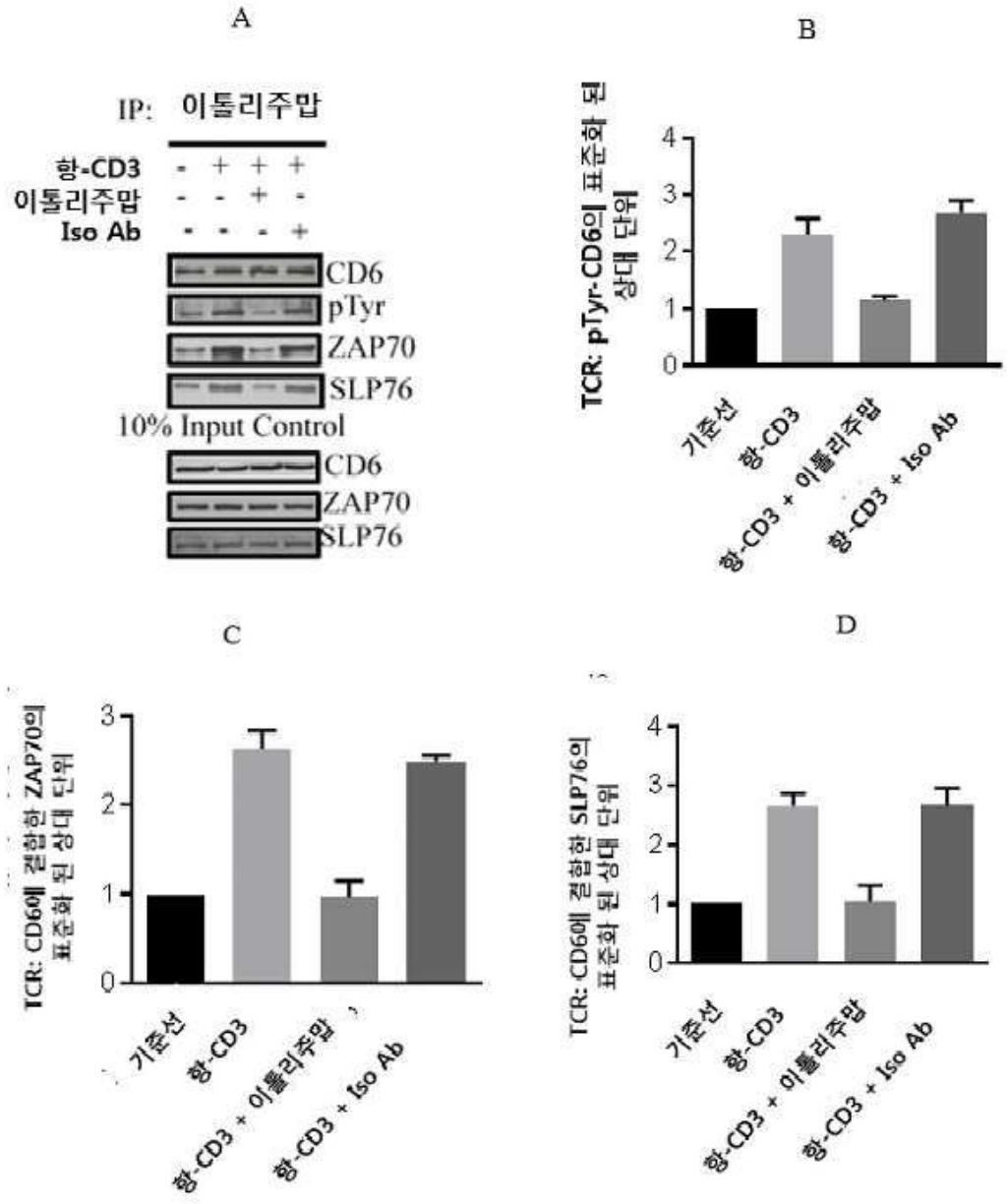
도면1



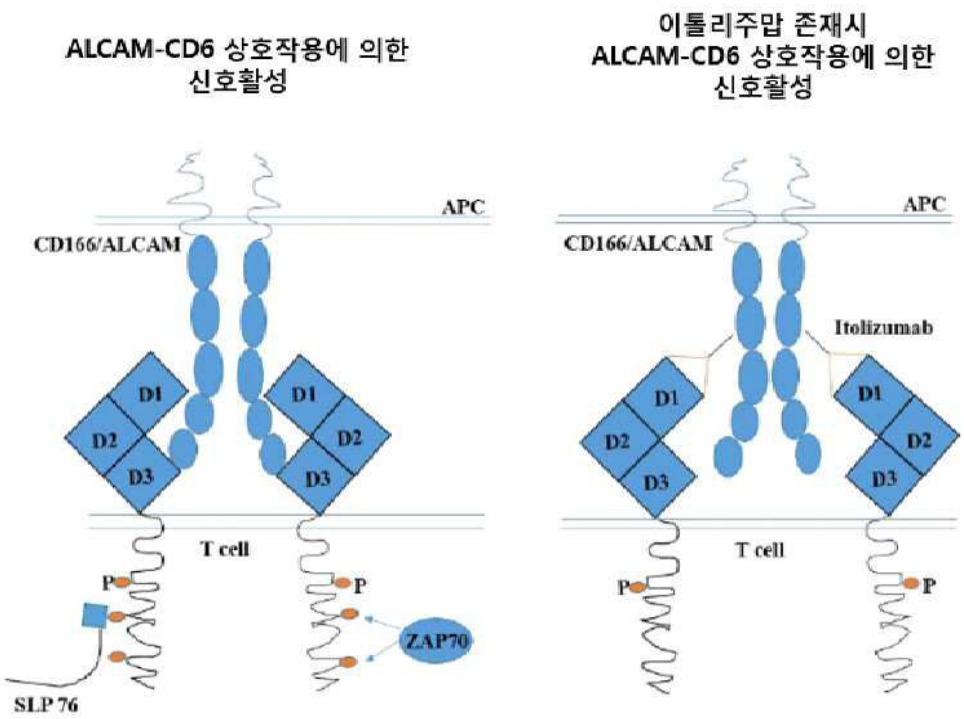
도면2



도면3


A
IP: 이톨리주맙
항-CD3
이톨리주맙
Iso Ab
CD6
pTyr
ZAP70
SLP76
10% Input Control
CD6
ZAP70
SLP76
B
TCR: pTyr-CD6의 표준화 된 상대 단위
기준선
항-CD3
항-CD3 + 이톨리주맙
항-CD3 + Iso Ab
C
TCR: CD6에 결합한 ZAP70의 표준화 된 상대 단위
기준선
항-CD3
항-CD3 + 이톨리주맙
항-CD3 + Iso Ab
D
TCR: CD6에 결합한 SLP76의 표준화 된 상대 단위
기준선
항-CD3
항-CD3 + 이톨리주맙
항-CD3 + Iso Ab

도면4



서 열 목 록

<110> Biocon Limited

<120> USE OF ITOLIZUMAB TO REDUCE PHOSPHORYLATION OF CD6

<130> 19FP30311IN

<150> IN 201641035602

<151> 2016-10-18

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable amino acid sequence: 107 amino acids

<400> 1

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 Lys Ala Ser Arg Asp Ile Arg Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65 70 75 80

Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Phe

85 90 95

Thr Leu Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable amino acid sequence: 119 amino acids

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable nucleotide sequence

<400> 3

gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caagtttagt agatatgcca tgtcttgggt tcgccaggct 120

ccggggaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtagtta catctactat 180

ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgtcaagaa caccctgtat 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagacgagat 300

tacgacctgg actactttga ctcctggggc caaggcaccc ttgtcaccgt ctcctca 357

<210> 4

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable nucleotide sequence

<400> 4

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat cggtgggaga cagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtcg ggacattaga agctatttaa cctggtacca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagaccct gatctattat gcaacaagct tggcagatgg ggtcccgtcg 180

agattcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtct 240

gacgatacag caacttacta ctgtctacaa catggtgaga gtccattcac gctcggctcg 300

gggaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 5

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain full amino acid sequence

<400> 5

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln 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> 6
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain full amino acid sequence

<400> 6

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 Lys Ala Ser Arg Asp Ile Arg Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

Thr Leu Gly Ser 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