



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월22일

(11) 등록번호 10-1831464

(24) 등록일자 2018년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/18 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7028433

(22) 출원일자(국제) 2011년03월30일

심사청구일자 2016년03월23일

(85) 번역문제출일자 2012년10월30일

(65) 공개번호 10-2013-0010002

(43) 공개일자 2013년01월24일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2011/001888

(87) 국제공개번호 WO 2011/122011

국제공개일자 2011년10월06일

(30) 우선권주장

JP-P-2010-079667 2010년03월30일 일본(JP)

JP-P-2010-250830 2010년11월09일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

WO2009125825 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 항원 제거를 촉진하는 FcRn에 대해 변경된 친화성을 갖는 항체

(57) 요약

본 발명의 목적은 항원-결합 분자-매개된 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는 방법, 혈장 중 항원 농도의 감소를 촉진하는 방법, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법, 항원-결합 분자의 약동학을 개선하는 방법, 세포 내로의 촉진된 항원 흡수를 위해 개선된 항원-결합 분자, 혈장 중 항원 농도의 감소를 촉진할 수 있는 항원-결합 분자, 항원에 대해 반복적으로 결합할 수 있는 항원-결합 분자, 개선된 약동학을 갖는 항원-결합 분자, 상기와 같은 항원-결합 분자를 포함하는 약학 조성물, 및 상술한 것들의 제조 방법을 제공하는 것이다. 본 발명자들은 세포 내로의 항원 흡수가, 혈장 pH에서 인간 FcRn-결합 활성 및 혈장 pH에서보다 초기 엔도솜 pH에서 더 낮은 항원-결합 활성을 갖는 항체에 의해 촉진되고; 상기와 같은 항체는 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시킬 수 있으며; 혈장 중 항원의 감소는, 상기와 같은 항체를 투여함으로써 촉진될 수 있고; 상기와 같은 항체를 사용함으로써 항체 약동학을 개선시킬 수 있음을 발견하였다.

(72) 발명자

마에다 아츠히코

일본국 시즈오카 고템바시 고마카도 1쵸메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내

나카이 다카시

일본국 시즈오카 고템바시 고마카도 1쵸메 135 추
가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항체로서,

상기 항체가 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖고, pH 6.0에서의 항원-결합 활성이 pH 7.4에서보다 더 낮고, pH 7.4에서의 인간 FcRn-결합 활성이 본래의(intact) 인간 IgG의 경우보다 더 강하며,

pH 6.0 및 pH 7.4에서의 항원-결합 활성의 비가 $KD(\text{pH } 6.0 \text{에서})/KD(\text{pH } 7.4 \text{에서})$ 값으로 2 이상이고,

상기 인간 FcRn-결합 도메인이 인간 IgG의 Fc 도메인을 포함하는, 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

항원-결합 도메인의 하나 이상의 아미노산에 대한 히스티딘의 치환 또는 하나 이상의 히스티딘의 삽입을 포함하는, 상기 항원-결합 도메인의 아미노산 돌연변이를 포함하는 항체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

항원-결합 도메인이 항원-결합 도메인 라이브러리로부터 수득되는 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

인간 FcRn-결합 도메인으로서, 모 인간 IgG의 Fc 도메인 중의 하나 이상의 아미노산에 대한 상이한 아미노산 치환으로부터 생성되는 Fc 도메인을 포함하는 항체.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

인간 FcRn-결합 도메인이 모 인간 IgG의 Fc 도메인 중 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산에 대해 상이한 아미노산의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인인 항체.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

EU 넘버링에서

237 번 위치에서 Gly 대신에 Met의 아미노산 치환;

238 번 위치에서 Pro 대신에 Ala의 아미노산 치환;

239 번 위치에서 Ser 대신에 Lys의 아미노산 치환;

248 번 위치에서 Lys 대신에 Ile의 아미노산 치환;

250 번 위치에서 Thr 대신에 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;

252 번 위치에서 Met 대신에 Phe, Trp 또는 Tyr의 아미노산 치환;

254 번 위치에서 Ser 대신에 Thr의 아미노산 치환;

255 번 위치에서 Arg 대신에 Glu의 아미노산 치환;

256 번 위치에서 Thr 대신에 Asp, Glu 또는 Gln의 아미노산 치환;

257 번 위치에서 Pro 대신에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, 또는 Val의 아미노산 치환;

258 번 위치에서 Glu 대신에 His의 아미노산 치환;

265 번 위치에서 Asp 대신에 Ala의 아미노산 치환;

270 번 위치에서 Asp 대신에 Phe의 아미노산 치환;

286 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 Glu의 아미노산 치환;

289 번 위치에서 Thr 대신에 His의 아미노산 치환;

297 번 위치에서 Asn 대신에 Ala의 아미노산 치환;

298 번 위치에서 Ser 대신에 Gly의 아미노산 치환;

303 번 위치에서 Val 대신에 Ala의 아미노산 치환;

305 번 위치에서 Val 대신에 Ala의 아미노산 치환;

307 번 위치에서 Thr 대신에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;

308 번 위치에서 Val 대신에 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, 또는 Thr의 아미노산 치환;

309 번 위치에서 Leu 또는 Val 대신에 Ala, Asp, Glu, Pro, 또는 Arg의 아미노산 치환;

311 번 위치에서 Gln 대신에 Ala, His 또는 Ile의 아미노산 치환;

312 번 위치에서 Asp 대신에 Ala 또는 His의 아미노산 치환;

314 번 위치에서 Leu 대신에 Lys 또는 Arg의 아미노산 치환;

315 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 His의 아미노산 치환;

317 번 위치에서 Lys 대신에 Ala의 아미노산 치환;

325 번 위치에서 Asn 대신에 Gly의 아미노산 치환;

332 번 위치에서 Ile 대신에 Val의 아미노산 치환;

334 번 위치에서 Lys 대신에 Leu의 아미노산 치환;

360 번 위치에서 Lys 대신에 His의 아미노산 치환;

376 번 위치에서 Asp 대신에 Ala의 아미노산 치환;

380 번 위치에서 Glu 대신에 Ala의 아미노산 치환;

382 번 위치에서 Glu 대신에 Ala의 아미노산 치환;

384 번 위치에서 Asn 또는 Ser 대신에 Ala의 아미노산 치환;

385 번 위치에서 Gly 대신에 Asp 또는 His의 아미노산 치환;

386 번 위치에서 Gln 대신에 Pro의 아미노산 치환;

387 번 위치에서 Pro 대신에 Glu의 아미노산 치환;

389 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 Ser의 아미노산 치환;

424 번 위치에서 Ser 대신에 Ala의 아미노산 치환;

428 번 위치에서 Met 대신에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;

433 번 위치에서 His 대신에 Lys의 아미노산 치환;

434 번 위치에서 Asn 대신에 Ala, Phe, His, Ser, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환; 및

436 번 위치에서 Tyr 대신에 His 또는 Phe의 아미노산 치환

중에서 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 모 인간 IgG의 Fc 도메인 중의 아미노산 치환을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항체.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

인간 FcRn-결합 도메인이 아미노산으로서, 모 인간 IgG의 Fc 도메인 중의

(EU 넘버링에서)

237 번 아미노산 위치에 Met;

238 번 아미노산 위치에 Ala;

239 번 아미노산 위치에 Lys;

248 번 아미노산 위치에 Ile;

250 번 아미노산 위치에 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr;

252 번 아미노산 위치에 Phe, Trp 또는 Tyr;

254 번 아미노산 위치에 Thr;

255 번 아미노산 위치에 Glu;

256 번 아미노산 위치에 Asp, Glu 또는 Gln;

257 번 아미노산 위치에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr 또는 Val;

258 번 아미노산 위치에 His;

265 번 아미노산 위치에 Ala;

270 번 아미노산 위치에 Phe;

286 번 아미노산 위치에 Ala 또는 Glu;

289 번 아미노산 위치에 His;

297 번 아미노산 위치에 Ala;

298 번 아미노산 위치에 Gly;

303 번 아미노산 위치에 Ala;

305 번 아미노산 위치에 Ala;

307 번 아미노산 위치에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr;

308 번 아미노산 위치에 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, 또는 Thr;

309 번 아미노산 위치에 Ala, Asp, Glu, Pro 또는 Arg;

311 번 아미노산 위치에 Ala, His 또는 Ile;

312 번 아미노산 위치에 Ala 또는 His;

314 번 아미노산 위치에 Lys 또는 Arg;

315 번 아미노산 위치에 Ala 또는 His;

317 번 아미노산 위치에 Ala;
 325 번 아미노산 위치에 Gly;
 332 번 아미노산 위치에 Val;
 334 번 아미노산 위치에 Leu;
 360 번 아미노산 위치에 His;
 376 번 아미노산 위치에 Ala;
 380 번 아미노산 위치에 Ala;
 382 번 아미노산 위치에 Ala;
 384 번 아미노산 위치에 Ala;
 385 번 아미노산 위치에 Asp 또는 His;
 386 번 아미노산 위치에 Pro;
 387 번 아미노산 위치에 Glu;
 389 번 아미노산 위치에 Ala 또는 Ser;
 424 번 아미노산 위치에 Ala;
 428 번 아미노산 위치에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, 또는 Tyr;
 433 번 아미노산 위치에 Lys;
 434 번 아미노산 위치에 Ala, Phe, His, Ser, Trp, 또는 Tyr; 및
 436 번 아미노산 위치에 His 또는 Phe
 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 항체.

청구항 8

제 1 항에 있어서,
 길항작용 활성을 갖는 항체.

청구항 9

제 1 항에 있어서,
 막 항원 또는 가용성 항원에 결합하는 항체.

청구항 10

제 1 항에 있어서,
 항체가 키메릭 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체 중에서 선택되는 항체.

청구항 11

제 1 항에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 12

- (a) pH 6.0에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항체의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다, pH 7.4에서 더 강한 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항체를 선택하는 단계로서, 상기 인간 FcRn-결합 도메인이 인간 IgG의 Fc 도메인을 포함하는, 단계;
- (b) 항체의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시키고, pH 6.0에서보다 pH 7.4에서 더 강한 항

원-결합 활성을 갖는 항체를 선택하는 단계로서, 이때 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 항원-결합 활성의 비가 KD(pH 6.0에서)/KD(pH 7.4에서)의 값으로 2 이상인, 단계;

(c) (a) 및 (b)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 링크된 항체를 암호화하는 유전자를 수득하는 단계; 및

(d) (c)에서 제조된 유전자를 사용하여 항체를 생성시키는 단계

를 포함하는, 항체의 제조 방법.

청구항 13

(a) pH 6.0에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항체의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다, pH 7.4에서 더 강한 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항체를 선택하는 단계로서, 상기 인간 FcRn-결합 도메인이 인간 IgG의 Fc 도메인을 포함하는, 단계;

(b) pH 6.0에서보다 pH 7.4에서 더 강한 항원-결합 활성을 갖는 항체를 선택하는 단계로서, 이때 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 항원-결합 활성의 비가 KD(pH 6.0에서)/KD(pH 7.4에서)의 값으로 2 이상인, 단계;

(c) (a) 및 (b)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 링크된 항체를 암호화하는 유전자를 수득하는 단계; 및

(d) (c)에서 제조된 유전자를 사용하여 항체를 생성시키는 단계

를 포함하는, 항체의 제조 방법.

청구항 14

제 12 항 또는 제 13 항에 따른 제조 방법에 의해 제조된 항체.

청구항 15

(a) pH 6.0에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항체의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다, pH 7.4에서 더 강한 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항체를 선택하는 단계로서, 상기 인간 FcRn-결합 도메인이 인간 IgG의 Fc 도메인을 포함하는, 단계;

(b) 항체의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시키고, 상기 pH 6.0에서보다 pH 7.4에서 더 강한 항원-결합 활성을 갖는 항체를 선택하는 단계로서, 이때 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 항원-결합 활성의 비가 KD(pH 6.0에서)/KD(pH 7.4에서)의 값으로 2 이상인, 단계;

(c) (a) 및 (b)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 링크된 항체를 암호화하는 유전자를 수득하는 단계; 및

(d) (c)에서 제조된 유전자를 사용하여 항체를 생성시키는 단계

를 포함하는, 항체의 스크리닝 방법.

청구항 16

(a) pH 6.0에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항체의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다, pH 7.4에서 더 강한 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항체를 선택하는 단계로서, 상기 인간 FcRn-결합 도메인이 인간 IgG의 Fc 도메인을 포함하는, 단계;

(b) 상기 pH 6.0에서보다 pH 7.4에서 더 강한 항원-결합 활성을 갖는 항체를 선택하는 단계로서, 이때 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 항원-결합 활성의 비가 KD(pH 6.0에서)/KD(pH 7.4에서)의 값으로 2 이상인, 단계;

(c) (a) 및 (b)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 링크된 항체를 암호화하는 유전자를 수득하는 단계; 및

(d) (c)에서 제조된 유전자를 사용하여 항체를 생성시키는 단계

를 포함하는, 항체의 스크리닝 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은
- [0002] 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 촉진하는 방법;
- [0003] 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법;
- [0004] 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원 농도의 감소를 증대시키는 방법;
- [0005] 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키는 방법;
- [0006] 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도를 감소시키는 방법;
- [0007] 세포 내로의 항원 흡수를 개선시키는 항원-결합 분자;
- [0008] 증가된 수의 결합 항원을 갖는 항원-결합 분자;
- [0009] 항원-결합 분자의 투여에 의해 혈장 항원 농도의 감소를 증대시킬 수 있는 상기 항원-결합 분자;
- [0010] 개선된 약동학을 갖는 항원-결합 분자;
- [0011] 상기 항원-결합 분자를 포함하는 약학 조성물;
- [0012] 상술한 것들의 제조 방법 등
- [0013]에 관한 것이다.

[0014] 우선권

본 발명은 2010년 3월 30일자로 출원된 일본 특허 출원 제 2010-079667 호, 및 2010년 11월 9일자로 출원된 일본 특허 출원 제 2010-250830 호의 이점을 청구하며, 이들 출원은 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

배경기술

항체는 혈장 중에서 대단히 안정하고 부작용이 거의 없으므로 약제로서 관심을 끌고 있다. 현재, 다수의 IgG 유형 항체 약제들을 시중에서 입수할 수 있으며 많은 항체 약제들이 현재 개발하에 있다(비특허문헌(NPL) 1 및 2). 한편, 효과기 작용, 항원-결합 능력, 약동학(pharmacokinetics) 및 안정성을 증대시키는 기술, 및 면역원성의 위험을 감소시키는 기술을 비롯하여, 2세대 항체 약제에 적용할 수 있는 다양한 기술들이 보고되었다(NPL 3). 일반적으로, 항체 약제의 필수 용량은 매우 높다. 차례로, 이는 높은 생산 비용뿐만 아니라 피하 제형 생산의 어려움과 같은 문제들을 도출한다. 이론상, 항체 약동학을 개선시키거나 또는 항체와 항원 간의 친화성을 개선시킴으로써 항체 약제의 용량을 감소시킬 수 있다.

[0017] 상기 문헌은 불변 영역(constant region) 중의 아미노산의 인위적인 치환을 사용하여 항체 약동학을 개선시키는 방법을 보고하였다(NPL 4 및 5). 유사하게, 친화성 성숙이 항원-결합 능력 또는 항원-중화 활성을 증대시키는 기술로서 보고되었다(NPL 6). 상기 기술은 가변 영역 등의 CDR 영역 내로의 아미노산 돌연변이(mutation)의 도입 등에 의해 항원-결합 활성의 증대를 가능하게 한다. 상기 항원-결합 능력의 증대는 시험관 내 생물 활성의 개선 또는 투여량의 감소를 가능하게 하며, 생체 내 효능의 개선을 또한 가능하게 한다(NPL 7).

[0018] 단일 항체 분자의 항원-중화 능력은 그의 친화성에 따라 변한다. 상기 친화성을 증가시킴으로써, 항원을 보다 적은 양의 항체에 의해 중화시킬 수 있다. 다양한 방법들을 사용하여 항체 친화성을 증대시킬 수 있다(NPL 6). 더욱 또한, 상기 친화성을 항원에 항체를 공유 결합시킴으로써 무한히 만들어낼 수 있다면, 단일 항체 분자는 하나의 항원 분자를 중화시킬 수 있을 것이다(2가 항체는 2 개의 항원 분자를 중화시킬 수 있다). 그러나, 하나의 항원에 대한 하나의 항체의 화학량론적 중화(2 개의 항원에 대한 하나의 2가 항체)는 기존 방법의 한계이며, 따라서 항원의 양보다 적은 양의 항체로 항원을 완벽하게 중화시키는 것은 불가능하다. 즉, 상기 친화성 증대 효과는 한계가 있다(NPL 9). 일정 기간 동안 중화 항체의 중화 효과를 연장하기 위해서, 상기 항체를 동일한 기간 동안 체내에서 생산되는 항원의 양보다 더 많은 용량으로 투여해야 한다. 따라서 상술한 항체 약동학 또는 친화성 성숙 기술의 개선만으로는, 필요한 항체 용량의 감소에 한계가 있다. 따라서, 항원의 양보다 적은 양의 항체로 표적 기간 동안 항체의 항원-중화 효과를 지속하기 위해서, 단일 항체는 다수의 항원을 중화시켜야 한다. 최근에 pH-의존적인 방식으로 항원에 결합하는 항체가 상기 목적을 성취하기 위한 신규의 방법으로서 보고되었다(특허문헌(PTL) 1). 혈장 중의 중성 조건 하에서 항원에 강하게 결합하고 엔도솜 중의 산성 조건 하에서 상기 항원으로부터 해리되는 pH-의존성 항원-결합 항체를 상기 엔도솜 중에서 항원으로부터 해리시킬 수 있다. 상기 항원으로부터 해리되는 pH-의존성 항원-결합 항체를 FcRn에 의해 혈장으로 재순환시키는 경우, 상기 항체는 또 다른 항원에 다시 결합할 수 있다. 따라서, 단일의 pH-의존성 항원-결합 항체는 다수의 항원에 반복적으로 결합할 수 있다.

[0019] 또한, 항원의 혈장 체류는 FcRn 결합을 통해 재순환되는 항체에 비해 매우 짧다. 상기와 같은 긴 혈장 체류를 갖는 항체가 상기 항원에 결합하는 경우, 상기 항원-항체 복합체의 혈장 체류 시간은 상기 항체의 경우와 동일하게 연장된다. 따라서, 상기 항원의 혈장 체류는 상기 항체에의 결합에 의해 연장되며, 따라서 상기 혈장 항원 농도가 증가한다.

[0020] IgG 항체는 FcRn 결합의 결과로서 보다 긴 혈장 체류 시간을 갖는다. 상기 IgG와 FcRn 간의 결합은 오직 산성 조건(pH 6.0) 하에서만 관찰된다. 대조적으로, 상기 결합은 중성 조건(pH 7.4)에서는 거의 검출될 수 없다. IgG 항체는 비특이적인 방식으로 세포에 흡수된다. 상기 항체는 엔도솜 산성 조건 하에서 엔도솜 FcRn에의 결합에 의해 세포 표면으로 돌아가고, 이어서 혈장 중성 조건 하에서 FcRn으로부터 해리된다. 상기 산성 조건 하에서의 FcRn 결합이 IgG Fc 도메인 내로의 돌연변이의 도입에 의해 상실되는 경우, 상기 엔도솜으로부터 혈장으로 재순환하는 항체의 부재는 혈장 중에서의 상기 항체의 체류 시간을 현저하게 감소시킨다. 상기 IgG 항체의 혈장 체류에 대해 보고된 개선 방법은 산성 조건 하에서 FcRn 결합을 증대시키는 것이다. 아미노산 돌연변이를 IgG 항체의 Fc 도메인 내로 도입시켜 산성 조건 하에서의 FcRn 결합을 개선시킨다. 이는 엔도솜으로부터 혈장으로의 재순환 효율을 증가시켜, 혈장 체류를 개선시킨다. 아미노산 치환에서 중요한 요건은 상기 FcRn 결합을 중성 조건 하에서 증대시키지 않도록 하는 것이다. IgG 항체가 중성 조건 하에서 FcRn에 결합하는 경우, 상기 항체는 엔도솜 산성 조건 하에서 FcRn에의 결합에 의해 세포 표면으로 돌아가고 혈장 중성 조건 하에서 FcRn으

로부터 해리되지 않는다. 이 경우에, 상기 혈장 체류는 상기 IgG 항체가 혈장으로 재순환되지 않으므로 오히려 상실된다. 예를 들어 문헌[J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80]에 개시된 바와 같이, 생성 항체가 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 결합할 수 있도록 아미노산 치환을 도입시킴으로써 변형된 IgG1 항체는 마우스에게 투여 시 매우 불충분한 혈장 체류를 나타내는 것으로 보고되었다. 더욱 또한, 문헌[J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71]; [J Biol Chem. 2007 Jan. 19; 282(3): 1709-17]; 및 [J Immunol. 2002 Nov. 1; 169(9): 5171-80]에 개시된 바와 같이, IgG1 항체를, 생성 항체가 산성 조건(pH 6.0) 하에서 개선된 인간 FcRn 결합을 나타내고 동시에 중성 조건(pH 7.4) 하에서 인간 FcRn에 결합할 수 있게 되도록 아미노산 치환을 도입시킴으로써 변형시켰다. 상기 생성 항체는 키노몰구스 원숭이에게 투여 시 혈장 체류의 개선도 변화도 나타내지 않은 것으로 보고되었다. 따라서, 항체 작용을 개선하기 위한 항체 공학 기술은 중성 조건(pH 7.4) 하에서의 중대 없이 단지 산성 조건 하에서 인간 FcRn 결합을 증대시킴으로써 항체 혈장 체류를 개선시키는 것에만 초점을 맞추었다. 지금까지, IgG 항체의 Fc 도메인에 아미노산 치환을 도입시킴으로써 중성 조건(pH 7.4) 하에서 인간 FcRn 결합을 개선시키는 이점을 개시하는 보고서는 없었다. 비록 상기 항체의 항원 친화성이 개선된다 하더라도, 혈장으로부터 항원 제거를 증대시킬 수는 없다. 상술한 pH-의존성 항원-결합 항체는 전형적인 항체에 비해 혈장으로부터 항원 제거를 증대시키는 방법으로서 더 유효한 것으로 보고되었다(PTL 1).

[0021] 따라서, 단일의 pH-의존성 항원-결합 항체는 다수의 항원에 결합하며 전형적인 항체에 비해 혈장으로부터 항원 제거를 촉진할 수 있다. 따라서, 상기 pH-의존성 항원-결합 항체는 전형적인 항체에 의해서 성취되지 않는 효과를 갖는다. 그러나, 지금까지, 항원에 반복적으로 결합하는 pH-의존성 항원-결합 항체의 능력 및 혈장으로부터 항원 제거를 증대시키는 효과를 더욱 개선시키기 위한 항체 공학 방법에 대한 보고서는 없다.

[0022] 본 발명과 관련된 종래 기술의 문헌들을 하기에 나타낸다:

선행기술문헌

특허문헌

[0023] (특허문헌 0001) WO 2009/125825, ANTI-GEN-BINDING MOLECULE CAPABLE OF BINDING TO TWO OR MORE ANTIGEN MOLECULES REPEATEDLY

비특허문헌

[0024] (비)특허문헌 0001) Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 23, 1073 - 1078 (2005)

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

(비)특허문헌 0003) Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 2005 Aug 31; 20(1): 17-29. Review

(비)특허문헌 0004) 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

(비)특허문헌 0005) 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

(비)특허문헌 0006) Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14; 102(24): 8466-71. Epub 2005 Jun 6. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R

(비)특허문헌 0007) 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

(비)특허문헌 0008) Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S. Catalytic antibodies and their applications. Curr

Opin Biotechnol. 2005 Dec; 16(6): 631-6

(비특허문헌 0009) Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcock J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Sep 9; 334(4): 1004-13

발명의 내용

해결하려는 과제

[0025] 발명의 요약

[0026] 기술적인 문제

[0027] 본 발명은 상술한 상황에 비추어 성취되었다. 본 발명의 목적은 항원-결합 분자를 사용함으로써 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는 방법, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법, 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원 농도의 감소를 증대시키는 방법, 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키는 방법, 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는 항원-결합 분자, 증가된 수의 결합 항원을 갖는 항원-결합 분자, 투여에 의해 혈장 항원 농도의 감소를 증대시킬 수 있는 항원-결합 분자, 개선된 약동학을 갖는 항원-결합 분자, 상기 항원-결합 분자를 포함하는 약학 조성물, 및 상술한 것들의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0028] 문제의 해결 방법

[0029] 본 발명자들은 항원-결합 분자(항원-결합 능력을 갖는 분자, 예를 들어 폴리펩타이드)를 통해 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는 방법, 항원-결합 분자가 항원에 반복적으로 결합하도록 하는 방법, 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원 농도의 감소를 증대시키는 방법, 및 항원-결합 분자의 혈장 체류를 개선시키는 방법에 대한 예의 연구를 수행하였다. 그 결과, 본 발명자들은 초기 엔도솜 pH에서 인간 FcRn-결합 능력을 갖고 혈장 pH에서 본래의(intact) 인간 IgG-유형 면역글로불린의 경우보다 더 높은 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자가 세포 내로의 항원 흡수를 촉진할 수 있음을 발견하였다. 본 발명자들은 또한 혈장 pH에서보다 초기 엔도솜 pH에서 더 약한 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 사용함으로써 세포 내로의 상기 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 더욱 증대시킬 수 있고 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시킬 수 있으며; 상기와 같은 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원 농도의 감소를 증대시킬 수 있고; 항원-결합 분자의 약동학을 개선시킬 수 있음을 발견하였다.

[0030] 구체적으로, 본 발명은

[0031] 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 촉진하는 방법;

[0032] 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법;

[0033] 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원 농도의 감소를 증대시키는 방법;

[0034] 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키는 방법;

[0035] 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도를 감소시키는 방법;

[0036] 세포 내로의 항원 흡수를 개선시키는 항원-결합 분자;

[0037] 증가된 수의 결합 항원을 갖는 항원-결합 분자;

[0038] 항원-결합 분자의 투여에 의해 혈장 항원 농도의 감소를 증대시킬 수 있는 상기 항원-결합 분자;

[0039] 개선된 약동학을 갖는 항원-결합 분자;

[0040] 상기 항원-결합 분자를 포함하는 약학 조성물;

[0041] 상술한 것들의 제조 방법 등

[0042] 예 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 하기를 제공한다:

- [0043] [1] 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자로, 상기 중성 pH 범위에서의 상기 인간 FcRn-결합 활성이 KD 3.2 마이크로몰보다 더 강한 분자;
- [0044] [2] 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자로, 상기 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성이 본래(intact)의 인간 IgG보다 28 배 더 강한 분자;
- [0045] [3] 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자로, 상기 중성 pH 범위에서의 상기 인간 FcRn-결합 활성이 KD 2.3 마이크로몰보다 더 강한 분자;
- [0046] [4] 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자로, 상기 중성 pH 범위에서의 상기 인간 FcRn-결합 활성이 본래의 인간 IgG보다 38 배 더 강한 분자;
- [0047] [5] 상기 [1] 내지 [4] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 중성 pH 범위가 pH 7.0 내지 8.0인 분자;
- [0048] [6] 비-인간 동물에게 항원-결합 분자 투여 후의 혈장 중 총 항원 농도가, 동일한 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인으로서 본래의 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 비-인간 동물에게 대조(reference) 항원-결합 분자 투여 후의 혈장 중 총 항원 농도보다 더 낮은, 상기 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자;
- [0049] [7] 비-인간 동물에게 항원-결합 분자 투여 후의 혈장 항원 농도가, 상기 항원-결합 분자를 투여하지 않은 비-인간 동물로부터 수득한 혈장 중의 총 항원 농도보다 더 낮은 항원-결합 분자;
- [0050] [8] 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자로, $C = A/B$ 와 같이 계산된 상기 항원-결합 분자의 항원/항원-결합 분자의 몰 비(C)가 $C' = A'/B'$ 와 같이 계산된, 동일한 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인으로서 본래의 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 항원-결합 분자의 항원/항원-결합 분자의 몰 비(C')보다 더 낮은 분자:
- [0051] 상기 식들에서,
- [0052] A는 비-인간 동물에게 항원-결합 분자 투여 후의 혈장 중 총 항원 농도이고,
- [0053] B는 비-인간 동물에게 항원-결합 분자 투여 후의 항원-결합 분자의 혈장 농도이고,
- [0054] A'는 비-인간 동물에게 대조 항원-결합 분자 투여 후의 혈장 중 총 항원 농도이고,
- [0055] B'는 비-인간 동물에게 대조 항원-결합 분자 투여 후의 항원-결합 분자의 혈장 농도이다;
- [0056] [9] 상기 [6] 내지 [8] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 비-인간 동물이 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스인 분자;
- [0057] [10] 상기 [6] 내지 [9] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 혈장 중 항원 농도가 혈장 중 장기간의 총 항원 농도인 분자;
- [0058] [11] 상기 [6] 내지 [9] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 혈장 중 항원 농도가 혈장 중 단기간의 총 항원 농도인 분자;
- [0059] [12] 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자로, 상기 중성 pH 범위에서의 상기 인간 FcRn-결합 활성이 본래의 인간 IgG의 경우보다 더 강한 분자;
- [0060] [13] 상기 [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 도메인의 항원-결합 활성이 중성 pH 범위에서의 경우보다 더 낮은 분자;
- [0061] [14] 상기 [12] 또는 [13]의 항원-결합 분자로, 산성 pH 범위 및 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성의 비가 KD(산성 pH 범위에서)/KD(중성 pH 범위에서)의 값에서 2 이상인 분자;
- [0062] [15] 상기 [12] 내지 [14] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 항원-결합 도메인의 하나 이상의 아미노산에 대한 히스티딘의 치환 또는 하나 이상의 히스티딘의 삽입을 포함하는, 상기 항원-결합 도메인의 아미노산 돌연변이를

포함하는 문자;

- [0063] [16] 상기 [12] 내지 [14] 중 어느 하나의 항원-결합 문자로, 항원-결합 도메인이 항원-결합 도메인 라이브러리로부터 수득되는 문자;
- [0064] [17] 상기 [1] 내지 [16] 중 어느 하나의 항원-결합 문자로, 인간 FcRn-결합 도메인으로서, 모 IgG(parent IgG)의 Fc 도메인 중의 하나 이상의 아미노산에 대한 상이한 아미노산 치환으로부터 생성되는 Fc 도메인을 포함하는 문자;
- [0065] [18] 상기 [1] 내지 [17] 중 어느 하나의 항원-결합 문자로, 인간 FcRn-결합 도메인이 모 IgG의 Fc 도메인 중 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산에 대해 상이한 아미노산의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인인 문자;
- [0066] [19] 상기 [1] 내지 [18] 중 어느 하나의 항원-결합 문자로,
- [0067] EU 넘버링에서
- [0068] 237 번 위치에서 Gly 대신에 Met의 아미노산 치환;
- [0069] 238 번 위치에서 Pro 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0070] 239 번 위치에서 Ser 대신에 Lys의 아미노산 치환;
- [0071] 248 번 위치에서 Lys 대신에 Ile의 아미노산 치환;
- [0072] 250 번 위치에서 Thr 대신에 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0073] 252 번 위치에서 Met 대신에 Phe, Trp 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0074] 254 번 위치에서 Ser 대신에 Thr의 아미노산 치환;
- [0075] 255 번 위치에서 Arg 대신에 Glu의 아미노산 치환;
- [0076] 256 번 위치에서 Thr 대신에 Asp, Glu 또는 Gln의 아미노산 치환;
- [0077] 257 번 위치에서 Pro 대신에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, 또는 Val의 아미노산 치환;
- [0078] 258 번 위치에서 Glu 대신에 His의 아미노산 치환;
- [0079] 265 번 위치에서 Asp 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0080] 270 번 위치에서 Asp 대신에 Phe의 아미노산 치환;
- [0081] 286 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 Glu의 아미노산 치환;
- [0082] 289 번 위치에서 Thr 대신에 His의 아미노산 치환;
- [0083] 297 번 위치에서 Asn 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0084] 298 번 위치에서 Ser 대신에 Gly의 아미노산 치환;
- [0085] 303 번 위치에서 Val 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0086] 305 번 위치에서 Val 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0087] 307 번 위치에서 Thr 대신에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0088] 308 번 위치에서 Val 대신에 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, 또는 Thr의 아미노산 치환;
- [0089] 309 번 위치에서 Leu 또는 Val 대신에 Ala, Asp, Glu, Pro, 또는 Arg의 아미노산 치환;
- [0090] 311 번 위치에서 Gln 대신에 Ala, His 또는 Ile의 아미노산 치환;
- [0091] 312 번 위치에서 Asp 대신에 Ala 또는 His의 아미노산 치환;

- [0092] 314 번 위치에서 Leu 대신에 Lys 또는 Arg의 아미노산 치환;
- [0093] 315 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 His의 아미노산 치환;
- [0094] 317 번 위치에서 Lys 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0095] 325 번 위치에서 Asn 대신에 Gly의 아미노산 치환;
- [0096] 332 번 위치에서 Ile 대신에 Val의 아미노산 치환;
- [0097] 334 번 위치에서 Lys 대신에 Leu의 아미노산 치환;
- [0098] 360 번 위치에서 Lys 대신에 His의 아미노산 치환;
- [0099] 376 번 위치에서 Asp 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0100] 380 번 위치에서 Glu 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0101] 382 번 위치에서 Glu 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0102] 384 번 위치에서 Asn 또는 Ser 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0103] 385 번 위치에서 Gly 대신에 Asp 또는 His의 아미노산 치환;
- [0104] 386 번 위치에서 Gln 대신에 Pro의 아미노산 치환;
- [0105] 387 번 위치에서 Pro 대신에 Glu의 아미노산 치환;
- [0106] 389 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 Ser의 아미노산 치환;
- [0107] 424 번 위치에서 Ser 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0108] 428 번 위치에서 Met 대신에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0109] 433 번 위치에서 His 대신에 Lys의 아미노산 치환;
- [0110] 434 번 위치에서 Asn 대신에 Ala, Phe, His, Ser, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환; 및
- [0111] 436 번 위치에서 Tyr 대신에 His 또는 Phe의 아미노산 치환
- [0112] 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 모 IgG의 Fc 도메인 중의 아미노산 치환을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 분자;
- [0113] [20] 상기 [1] 내지 [18] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 상기 분자의 인간 FcRn-결합 도메인이 모 IgG의 Fc 도메인 중의
- [0114] (EU 넘버링에서)
- [0115] 237 번 아미노산 위치에 Met;
- [0116] 238 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0117] 239 번 아미노산 위치에 Lys;
- [0118] 248 번 아미노산 위치에 Ile;
- [0119] 250 번 아미노산 위치에 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr;
- [0120] 252 번 아미노산 위치에 Phe, Trp 또는 Tyr;
- [0121] 254 번 아미노산 위치에 Thr;
- [0122] 255 번 아미노산 위치에 Glu;
- [0123] 256 번 아미노산 위치에 Asp, Glu 또는 Gln;
- [0124] 257 번 아미노산 위치에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr 또는 Val;

- [0125] 258 번 아미노산 위치에 His;
- [0126] 265 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0127] 270 번 아미노산 위치에 Phe;
- [0128] 286 번 아미노산 위치에 Ala 또는 Glu;
- [0129] 289 번 아미노산 위치에 His;
- [0130] 297 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0131] 298 번 아미노산 위치에 Gly;
- [0132] 303 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0133] 305 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0134] 307 번 아미노산 위치에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr;
- [0135] 308 번 아미노산 위치에 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, 또는 Thr;
- [0136] 309 번 아미노산 위치에 Ala, Asp, Glu, Pro 또는 Arg;
- [0137] 311 번 아미노산 위치에 Ala, His 또는 Ile;
- [0138] 312 번 아미노산 위치에 Ala 또는 His;
- [0139] 314 번 아미노산 위치에 Lys 또는 Arg;
- [0140] 315 번 아미노산 위치에 Ala 또는 His;
- [0141] 317 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0142] 325 번 아미노산 위치에 Gly;
- [0143] 332 번 아미노산 위치에 Val;
- [0144] 334 번 아미노산 위치에 Leu;
- [0145] 360 번 아미노산 위치에 His;
- [0146] 376 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0147] 380 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0148] 382 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0149] 384 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0150] 385 번 아미노산 위치에 Asp 또는 His;
- [0151] 386 번 아미노산 위치에 Pro;
- [0152] 387 번 아미노산 위치에 Glu;
- [0153] 389 번 아미노산 위치에 Ala 또는 Ser;
- [0154] 424 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0155] 428 번 아미노산 위치에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, 또는 Tyr;
- [0156] 433 번 아미노산 위치에 Lys;
- [0157] 434 번 아미노산 위치에 Ala, Phe, His, Ser, Trp, 또는 Tyr; 및
- [0158] 436 번 아미노산 위치에 His 또는 Phe

- [0159] 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 분자;
- [0160] [21] 상기 [18] 내지 [20] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 모 IgG가 비-인간 동물로부터 수득된 IgG 중에서 선택되는 분자;
- [0161] [22] 상기 [18] 내지 [20] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 모 IgG가 인간 IgG인 분자;
- [0162] [23] 상기 [1] 내지 [22] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 길항작용 활성을 갖는 분자;
- [0163] [24] 상기 [1] 내지 [23] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 막 항원 또는 가용성(soluble) 항원에 결합하는 분자;
- [0164] [25] 상기 [1] 내지 [24] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 항원-결합 도메인이, 수용체에 결합하는 인공 리간드를 포함하는 분자;
- [0165] [26] 상기 [1] 내지 [24] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 항원-결합 도메인이, 리간드에 결합하는 인공 수용체를 포함하는 분자;
- [0166] [27] 상기 [1] 내지 [24] 중 어느 하나의 항원-결합 분자로, 항체인 분자;
- [0167] [28] 상기 [27]의 항원-결합 분자로, 항체가 키메릭 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체 중에서 선택되는 분자;
- [0168] [29] 상기 [1] 내지 [28] 중 어느 하나의 항원-결합 분자를 포함하는 약학 조성물;
- [0169] [30] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시킴으로써 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 촉진하는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0170] [31] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 상기 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 촉진하는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0171] [32] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시킴으로써 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0172] [33] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 상기 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0173] [34] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시킴으로써 혈장으로부터 항원을 제거하는 항원-결합 분자의 능력을 증대시키는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0174] [35] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 상기 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써 혈장으로부터 항원을 제거하는 항원-결합 분자의 능력을 증대시키는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0175] [36] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시킴으로써 항원-결합 분자의 약동학(pharmacokinetics)을 개선하는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0176] [37] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 상기 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써 항원-결합 분자의 약동학을 개선하는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0177] [38] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 상기 중성

pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써, 항원-결합 분자로부터 세포 밖에서 상기 항원-결합 분자에 결합된 항원의 세포 내 해리를 촉진하는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;

- [0178] [39] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 상기 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써, 항원-결합된 형태로 세포 내로 흡수된 항원-결합 분자의 무-항원 형태(antigen-free form)의 세포 외 방출을 촉진하는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0179] [40] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시킴으로써, 혈장 중 총 또는 유리 혈장 항원 농도를 감소시키는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0180] [41] 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 상기 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써, 혈장 중 총 또는 유리 혈장 항원 농도를 감소시키는 방법으로, 상기 항원-결합 분자가 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하고 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 방법;
- [0181] [42] 상기 [30] 내지 [41] 중 어느 하나의 방법으로, 산성 pH 범위가 pH 5.5 내지 6.5이고 중성 pH 범위가 pH 7.0 내지 8.0인 방법;
- [0182] [43] 상기 [30] 내지 [41] 중 어느 하나의 방법으로, 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성의 증가가, 인간 FcRn-결합 도메인의 모 IgG Fc 도메인 중의 하나 이상의 아미노산에 대한 상이한 아미노산의 치환에 의한 증가인 방법;
- [0183] [44] 상기 [30] 내지 [41] 중 어느 하나의 방법으로, 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성의 증가가, 인간 FcRn-결합 도메인의 모 IgG Fc 도메인 중의 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 432, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산에 대한 상이한 아미노산의 치환에 의한 증가인 방법;
- [0184] [45] 상기 [31], [33], [35], [37] 내지 [39] 및 [41] 중 어느 하나의 방법으로, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 상기 항원-결합 분자의 하나 이상의 아미노산에 대한 히스티딘의 치환 또는 하나 이상의 히스티딘의 삽입에 의해 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시키는 방법;
- [0185] [46] 상기 [31], [33], [35], [37] 내지 [39] 및 [41] 중 어느 하나의 방법으로, 항원-결합 도메인을 항원-결합 도메인 라이브러리로부터 수득하는 방법;
- [0186] [47] 상기 [31], [33], [35], [37] 내지 [39] 및 [41] 중 어느 하나의 방법으로, 항원-결합 활성의 감소를, 히스티딘 치환 또는 삽입 전에 비해, 산성 pH 범위 및 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성의 비인 KD(산성 pH 범위에서)/KD(중성 pH 범위에서)의 값의 증가에 의해 나타내는 방법;
- [0187] [48] (a) 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴(alter)으로써 수득한 KD 3.2 마이크로몰 보다 강한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;
- [0188] (b) (a)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 결합된 (linked) 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 수득하고;
- [0189] (c) (b)에서 제조된 유전자를 사용하여 항원-결합 분자를 생성시키는
- [0190] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 제조 방법;
- [0191] [49] (a) 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;
- [0192] (b) 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시키고 산성 pH 범위에서보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;
- [0193] (c) (a) 및 (b)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 결합된 항원-결합 분자를 암호화하는

유전자를 수득하고;

[0194] (d) (c)에서 제조된 유전자를 사용하여 항원-결합 분자를 생성시키는

[0195] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 제조 방법;

[0196] [50] (a) 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0197] (b) 산성 pH 범위에서보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0198] (c) (a) 및 (b)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 결합된 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 수득하고;

[0199] (d) (c)에서 제조된 유전자를 사용하여 항원-결합 분자를 생성시키는

[0200] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 제조 방법;

[0201] [51] 상기 [48] 내지 [50] 중 어느 하나의 제조 방법에 의해 제조된 항원-결합 분자;

[0202] [52] (a) 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴으로써 수득한 KD 3.2 마이크로몰 보다 강한 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0203] (b) (a)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 결합된 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 수득하고;

[0204] (c) (b)에서 제조된 유전자를 사용하여 항원-결합 분자를 생성시키는

[0205] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 선별 방법;

[0206] [53] (a) 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0207] (b) 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시키고 상기 산성 pH 범위에서보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0208] (c) (a) 및 (b)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 결합된 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 수득하고;

[0209] (d) (c)에서 제조된 유전자를 사용하여 항원-결합 분자를 생성시키는

[0210] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 선별(screening) 방법;

[0211] [54] (a) 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0212] (b) 상기 산성 pH 범위에서보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0213] (c) (a) 및 (b)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 결합된 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 수득하고;

[0214] (d) (c)에서 제조된 유전자를 사용하여 항원-결합 분자를 생성시키는

[0215] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 선별 방법;

[0216] [55] 상기 [30] 내지 [54] 중 어느 하나의 방법으로, 항원-결합 도메인이, 수용체에 결합하는 인공 리간드를 포함하는 방법;

[0217] [56] 상기 [30] 내지 [54] 중 어느 하나의 방법으로, 항원-결합 도메인이, 리간드에 결합하는 인공 수용체를 포함하는 방법; 및

[0218] [57] 상기 [30] 내지 [54] 중 어느 하나의 방법으로, 항원-결합 분자가 항체인 방법.

발명의 효과

발명의 유리한 효과

[0220] 본 발명은 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 촉진하는 방법, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법; 및 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원 농도의 감소를 증대시키는 방법을 제공한다. 상기 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수가 촉진되는 경우, 상기와 같은 항원-결합 분자를 투여함으로써 상기 혈장 항원 농도의 감소를 증대시킬 수 있으며, 상기 항원-결합 분자의 약동학을 개선시켜 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시킬 수 있다. 따라서, 상기 항원-결합 분자는 통상적인 항원-결합 분자보다 더 우수한 생체 내 효과를 생성시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[도 1] 도 1은 가용성 형태의 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276) (정상 상태 주입 모델)에게 항-인간 IL-6 수용체 항체 투여 후의 인간 IL-6 수용체의 가용성 형태의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 2] 도 2는 엔도솜에서 가용성 항원으로부터 IgG 항체 분자의 해리 결과 항원 제거가 증대되어, 또 다른 항원에 대한 새로운 라운드의 결합에 이르게 됨을 도시하는 개략도이다.

[도 3] 도 3은 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에서 혈장 항체 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 4] 도 4는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에서 인간 IL-6 수용체의 가용성 형태의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 5] 도 5는 정상 마우스에서 혈장 항체 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 6] 도 6은 정상 마우스에서 인간 IL-6 수용체의 가용성 형태의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 7] 도 7은 정상 마우스에서 인간 IL-6 수용체의 결합되지 않은 가용성 형태의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 8] 도 8은 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에서 인간 IL-6 수용체의 가용성 형태의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 9] 도 9는 저 용량(0.01 mg/kg) 또는 1 mg/kg의 Fv4-IgG1-F14 투여 후 인간 IL-6 수용체의 가용성 형태의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 10] 도 10은 저 용량(0.01 mg/kg) 또는 1 mg/kg의 Fv4-IgG1-F14 투여 후 혈장 항체 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 11] 도 11은 가용성 형태의 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도가 일정한 정상 마우스에게 항-인간 IL-6 수용체 항체 투여 후 인간 IL-6 수용체의 가용성 형태의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 12] 도 12는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276)에게 hsIL-6R 및 항-인간 IL-6 수용체 항체의 동시 주사 후 혈장 항체 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 13] 도 13은 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276)에게 hsIL-6R 및 항-인간 IL-6 수용체 항체의 동시 주사 후 가용성 형태의 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 14] 도 14는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276)에게 hsIL-6R 및 항-인간 IL-6 수용체 항체의 동시 주사 후 1일째의 혈장 hsIL-6R 농도와 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 Fc 변체(variant)의 결합 친화성 간의 관계를 개시한다.

[도 15] 도 15는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276)에게 hsIL-6R 및 항-인간 IL-6 수용체 항체의 동시 주사 후 1일째의 혈장 항체 농도와 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 Fc 변체의 결합 친화성 간의 관계를 개시한다.

[도 16] 도 16은 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276)에게 hsIL-6R 및 항-인간 IL-6 수용체 항체의 동시 주사 후 항원/항체 몰 비(값 C)의 시간 과정을 개시한다.

[도 17] 도 17은 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276)에게 hsIL-6R 및 항-인간 IL-6 수용체 항체의 동시 주사 후 1일째의 항원/항체 몰 비(값 C)와 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 Fc 변체의 결합 친화성 간의 관계를 개시한다.

[도 18] 도 18은 hsIL-6R의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276)(정상 상태 주입 모델)에게 저 용량(0.01 또는 0.2 mg/kg) 또는 1 mg/kg의 Fv4-IgG1-F14 투여 후 hsIL-6R의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 19] 도 19는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276 및 32)에게 hsIL-6R 및 항-인간 IL-6 수용체 항체의 동시 주사 후 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 계열 276 및 계열 32에서의 혈장 hsIL-6R 농도의 시간 과정을 개시한다.

[도 20] 도 20은 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 276 및 32)에게 hsIL-6R 및 항-인간 IL-6 수용체 항체의 동시 주사 후 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 계열 276 및 계열 32에서의 혈장 항체 농도의 시간 과정을 개시한다.

[도 21] 도 21은 hsIL-6R의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 32)(정상 상태 주입 모델)에게 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 hsIL-6R의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 22] 도 22는 hsIL-6R의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 32)(정상 상태 주입 모델)에게 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 항체의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 23] 도 23은 hsIL-6R의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 32)(정상 상태 주입 모델)에게 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 항원/항체 몰 비(값 C)의 시간 과정을 개시한다.

[도 24] 도 24는 hsIL-6R의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 32)(정상 상태 주입 모델)에게 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 1일째의 항원/항체 몰 비(값 C)와 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 Fc 변체의 결합 친화성 간의 관계를 개시한다.

[도 25] 도 25는 hsIL-6R의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 32)(정상 상태 주입 모델)에게 F11, F39, F48 및 F264의 Fc 변체를 갖는 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 혈장 항체 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 26] 도 26은 hsIL-6R의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 32)(정상 상태 주입 모델)에게 F11, F39, F48 및 F264의 Fc 변체를 갖는 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 hsIL-6R의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 27] 도 27은 hsIL-6R의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 32)(정상 상태 주입 모델)에게 F157, F196 및 F262의 Fc 변체를 갖는 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 혈장 항체 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 28] 도 28은 hsIL-6R의 혈장 농도가 일정한 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(계열 32)(정상 상태 주입 모델)에게 F157, F196 및 F262의 Fc 변체를 갖는 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 hsIL-6R의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 29] 도 29는 통상적인 항체 및 항원 제거 항체의 인실리코(in silico) 연구에 사용되는 약동학 모델을 개시한다.

[도 30] 도 30은 정상 마우스에게 인간 IL-6 및 항-인간 IL-6 항체의 동시 주사 후 인간 IL-6의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 31] 도 31은 정상 마우스에게 인간 IL-6 및 항-인간 IL-6 항체의 동시 주사 후 항체의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 32] 도 32는 비아코어(Biacore)를 사용하는, pH 7.4 및 pH 6.0에서 CD89-Fc 융합 단백질에 대한 인간 IgA 결합의 센소그램을 도시한다.

[도 33] 도 33은 정상 마우스에게 인간 IgA 및 CD89-Fc 융합 단백질의 동시 주사 후 인간 IgA의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 34] 도 34는 정상 마우스에게 인간 IgA 및 CD89-Fc 융합 단백질의 동시 주사 후 항체의 혈장 농도의 시간 과정 그래프를 도시한다.

[도 35] 도 35는 정상 마우스에게 가용성 인간 플렉신 A1 및 항-인간 플렉시 A1 항체의 동시 주사 후 7 시간째의 가용성 인간 플렉신 A1의 혈장 농도의 그래프를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0222] 실시태양의 설명

본 발명은 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 촉진하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자에 의해 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는 방법을 제공하며, 이는 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시킴을 기본으로 한다. 본 발명은 또한, 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴을 기본으로 하는, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자에 의해 세포 내로의 항원 흡수를 개선시키는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 모 IgG의 Fc 도메인을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인의 모 IgG Fc 도메인 중의 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산에 대해 상이한 아미노산의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인을 사용함을 기본으로 하는, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자에 의해 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 상술한 항원-결합 분자의 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성(결합 능력)을 중성 pH 범위에서의 그의 항원-결합 활성보다 작게 감소시킴으로써, 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 촉진하는 방법을 제공하며; 이는 세포 내로의 항원 흡수를 촉진한다. 본 발명은 또한 상술한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시켜 세포 내로의 항원 흡수를 촉진함을 기본으로 하는, 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 촉진하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 상술한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 내로의 하나 이상의 히스티딘의 삽입 또는 하나 이상의 아미노산에 대한 히스티딘의 치환으로 세포 내로의 항원 흡수를 촉진함을 기본으로 하는, 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수를 촉진하는 방법을 제공한다.

본 발명에서, 항원-결합 분자에 의해 매개된 "세포 내로의 항원 흡수"는 항원이 세포 이물 흡수에 의해 세포 내로 흡수됨을 의미한다. 한편, 본 발명에서 "세포 내로의 흡수를 촉진한다"는 혈장 중 항원에 결합된 항원-결합 분자의 세포 내 흡수율이 증대되고/되거나 상기 혈장으로의 흡수된 항원의 재순환 양이 감소함을 의미한다. 이는 세포 내로의 흡수율이, 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성 증가 전 또는 인간 FcRn-결합 활성이 증가하고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성(결합 능력)이 중성 pH 범위에서의 그의 항원-결합 활성보다 작게 감소하기 전의 항원-결합 분자에 비해 촉진됨을 의미한다. 상기 흡수율은 바람직하게는 본래의 인간 IgG에 비해, 보다 바람직하게는 본래의 인간 IgG에 비해 개선된다. 따라서, 본 발명에서, 세포 내로의 항원 흡수가 항원-결합 분자에 의해 촉진되는 지의 여부를 상기 세포 내로의 항원 흡수율의 증가를 근거로 평가할 수 있다. 상기 세포 내로의 항원 흡수율을, 예를 들어 인간 FcRn-발현 세포를 함유하는 배양 배지에 상기 항원 및 항원-결합 분자를 첨가한 후에 상기 배지 중의 항원 농도의 시간에 따른 감소를 모니터하거나, 또는 인간 FcRn-발현 세포 내로의 항원 흡수량을 시간에 따라 모니터함으로써 계산할 수 있다. 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수율을 촉진하는 본 발명의 방법을 사용하여, 예를 들어, 상기 혈장으로부터 항원 제거 속도를 항원-결합 분자를 투여하여 증대시킬 수 있다. 따라서, 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수가 촉진되는 지의 여부를 또한, 예를 들어 상기 혈장으로부터의 항원 제거 속도가 가속화되는지의 여부 또는 혈장 중 총 항원 농도가 항원-결합 분자의 투여에 의해 감소하는 지의 여부를 시험함으로써 평가할 수 있다.

본 발명에서, "혈장 중 총 항원 농도"는 항원-결합 분자 결합된 항원, 및 비-결합된 항원 농도 또는 항원-결합 분자 비-결합된 항원 농도인 "혈장 중 유리 항원 농도"의 합계를 의미한다. "혈장 중 총 항원 농도" 또는 "혈장 중 유리 항원 농도"를 측정하는 다양한 방법들은 본 발명에서 이후에 개시하는 바와 같이 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

본 발명에 사용된 바와 같은 "본래의 인간 IgG(intact human IgG)"는 변형되지 않은 인간 IgG를 의미하며 특정

한 부류의 IgG로 제한되지 않는다. 이는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를, 이들이 산성 pH 범위에서 인간 FcRn에 결합할 수 있는 한 "본래의 인간 IgG"로서 사용할 수 있음을 의미한다. 바람직하게는, "본래의 인간 IgG"는 인간 IgG1일 수 있다.

[0229] 본 발명은 또한 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시킴으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0230] 본 발명은 또한 모 IgG Fc 도메인을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인의 모 IgG Fc 도메인 중 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산이 상이한 아미노산으로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인을 사용함으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0231] 본 발명에 사용된 바와 같은 "모 IgG"는 모 IgG의 변형된 변체(variant)가 산성 pH 범위에서 인간 FcRn에 결합할 수 있는 한 후속적으로 변형되어 변체를 생성하는 변형되지 않은 IgG를 의미한다(따라서, 모 IgG는 산성 조건에서 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 반드시 필요로 하지는 않는다). 상기 모 IgG는 천연 IgG이거나, 또는 천연 IgG의 변체 또는 조작된 버전일 수 있다. 모 IgG는 폴리펩타이드 자체, 상기 모 IgG를 포함하는 조성물, 또는 이를 암호화하는 아미노산 서열을 지칭할 수 있다. "모 IgG"가 하기에 개략하는 바와 같이, 공지된 상업적인, 재조합적으로 생산된 IgG를 포함함을 알아야 한다. "모 IgG"의 기원은 제한되지 않으며 비-인간 동물의 임의의 유기체 또는 인간으로부터 수득될 수 있다. 바람직하게는, 유기체는 마우스, 래트, 기니 퍼그, 햄스터, 게르빌루스 쥐, 고양이, 토끼, 개, 염소, 양, 소, 말, 낙타, 및 비-인간 영장류 중에서 선택된다. 또 다른 실시태양에서, "모 IgG"를 또한 키노몰구스 원숭이, 명주 원숭이, 붉은 털 원숭이, 침팬지 또는 인간으로부터 수득할 수 있다. 바람직하게는, "모 IgG"를 인간 IgG1으로부터 수득하지만 상기는 특정 부류의 IgG로 제한되지 않는다. 이는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 "모 IgG"로서 적합하게 사용할 수 있음을 의미한다. 유사한 방식으로, 본 발명에서 앞서 임의의 유기체로부터의 IgG의 임의의 부류 또는 하위 부류를 바람직하게는 "모 IgG"로서 사용할 수 있다. 천연 IgG의 변체 또는 조작된 버전의 예는 문헌[Curr Opin Biotechnol. 2009 Dec; 20(6): 685-91], [Curr Opin Immunol. 2008 Aug; 20(4): 460-70], [Protein Eng Des Sel. 2010 Apr; 23(4): 195-202], WO 2009/086320, WO 2008/092117, WO 2007/041635 및 WO 2006/105338에 개시되어 있으나, 이들로 제한되지 않는다.

[0232] 더욱 또한, 본 발명은 증가된 항원 결합 사건의 수를 갖는 상술한 항원-결합 분자의 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성(결합 능력)을 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성보다 작게 감소시킴으로써, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 증가된 수의 항원 결합 사건을 갖는 상술한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴으로써, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 증가된 수의 항원 결합 사건을 갖는 상술한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 히스티딘으로 치환하거나 또는 상기 도메인 내로 하나 이상의 히스티딘을 삽입함으로써, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 방법을 제공한다.

[0233] 본 발명에서, "단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수"는 상기 분자가 분해로 인해 제거될 때까지 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 의미한다. 본 발명에서 "단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수의 증가"는 상기 항원-결합 분자가 분해로 인해 제거될 때까지 성취되는 순환의 수의 증가를 의미하며, 여기에서 각각의 순환은 혈장 중 항원-결합 분자에 대한 항원의 결합, 상기 항원에 결합된 항원-결합 분자의 세포 내 흡수, 및 엔도솜에서 상기 항원으로부터의 해리에 이은 상기 항원-결합 분자의 혈장으로의 복귀로 이루어진다. 이는 상기 순환의 수가, 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성 증가 전, 또는 인간 FcRn-결합 활성이 증가하고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성(결합 능력)이 중성 pH 범위에서의 그의 항원-결합 활성보다 작게 감소하기 전의 항원-결합 분자에 비해 증가함을 의미한다. 따라서, 상기 순환의 수가 증가하는 지의 여부를, 상술한 "세포 내 흡수가 촉진되는" 지의 여부 또는 하기 개시하는

바와 같이 "약동학이 개선되는" 지의 여부를 시험함으로써 평가할 수 있다.

[0234]

본 발명은 또한 세포의 밖에서 항원에 결합하는 항원-결합 분자로부터의 항원의 세포 내 해리를 촉진하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고, 산성 pH 범위에서의 그의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써, 세포의 밖에서 항원에 결합하는 항원-결합 분자로부터 항원의 세포 내 해리를 촉진하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변, 및 동시에 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변을 기본으로 하는, 세포의 밖에서 항원에 결합하는 항원-결합 분자로부터 항원의 세포 내 해리를 촉진하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 히스티딘으로 치환시키거나 또는 상기 도메인 내로 하나 이상의 히스티딘을 삽입하고, 동시에 인간 FcRn-결합 도메인의 모 IgG Fc 도메인 중 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 상이한 아미노산으로 치환시킴으로써, 세포의 밖에서 항원에 결합하는 항원-결합 분자로부터 항원의 세포 내 해리를 촉진하는 방법을 제공한다.

[0235]

본 발명에서, 항원을 세포 내 어디에서나 상기 항원-결합 분자로부터 해리시킬 수 있으나; 바람직한 해리 장소는 초기 엔도솜이다. 본 발명에서 "항원-결합 분자로부터, 세포의 밖에서 항원-결합 분자에 결합된 항원의 세포 내 해리"는 항원-결합 분자에 대한 결합을 통해 세포 내로 흡수된 항원들이 모두 상기 세포 내에서 상기 항원-결합 분자로부터 해리됨을 반드시 의미하는 것은 아니다. 따라서, 상기 세포 내에서 상기 항원-결합 분자로부터 해리된 항원의 비율이, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시키고 동시에 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키기 전에 비해 증가하는 것은 허용될 수 있다. 상기와 같은, 세포 밖에서 항원에 결합된 항원-결합 분자로부터 항원의 세포 내 해리를 촉진하는 방법은 상기 항원에 결합된 항원-결합 분자의 흡수를 촉진함으로써 상기 항원-결합 분자로부터 항원의 세포 내 해리를 촉진하는 성질을 상기 항원-결합 분자에 부여하는 방법과 동의어이다.

[0236]

본 발명은 또한 항원-결합된 형태로 세포 내로 흡수된 항원-부재 항원-결합 분자의 세포 외 방출을 촉진하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고, 산성 pH 범위에서의 그의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써, 항원-결합된 형태로 세포 내 흡수된 항원-부재 항원-결합 분자의 세포 외 방출을 촉진하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항원-결합 분자의 하나 이상의 아미노산의 개변, 및 동시에 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변을 기본으로 하는, 항원-결합된 형태로 세포 내 흡수된 항원-부재 항원-결합 분자의 세포 외 방출을 촉진하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항원-결합 분자의 하나 이상의 아미노산을 히스티딘으로 치환시키거나 또는 상기 분자 내로 하나 이상의 히스티딘을 삽입하고, 동시에 인간 FcRn-결합 도메인의 모 IgG Fc 도메인 중 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 상이한 아미노산으로 치환시킴으로써, 항원-결합된 형태로 세포 내 흡수된 항원-부재 항원-결합 분자의 세포 외 방출을 촉진하는 방법을 제공한다.

[0237]

본 발명에서, "항원-결합된 형태로 세포 내 흡수된 항원-부재 항원-결합 분자의 세포 외 방출"은 세포 내로 흡수된 항원에 결합된 항원-결합 분자가 모두 상기 세포의 밖에서 항원-부재 형태로 방출됨을 반드시 의미하는 것은 아니다. 항원-부재 형태로 세포 밖으로 방출된 항원-결합 분자의 비율이, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시키고 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키기 전에 비해 증가하는 것은 허용될 수 있다. 상기 세포의 밖으로 방출된 항원-결합 분자는 바람직하게는 항원-결합 활성을 유지한다. 상기와 같은, 항원-결합된 형태로 세포 내 흡수된 항원-부재 항원-결합 분자의 세포 외 방출을 촉진하는 방법은 항원에 결합된 항원-결합 분자의 세포 내로의 흡수를 촉진함으로써 항원-결합된 형태로 세포에 흡수된 항원-부재 항원-결합 분자의 세포 외 방출을 촉진하는 성질을 상기 항원-결합 분자에 부여하는 방법과 동의어이다.

[0238]

본 발명은 또한 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명에서, "혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키는 방법"은 "혈장으로부터 항원을 제거하는 항원-결합 분자의 능력을 증대시키는 방법"과 동의어이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인

간 FcRn-결합 활성을 증가시킴으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자에 의해 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴을 기본으로 하는, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자에 의해 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0239] 본 발명은 또한 모 IgG의 Fc 도메인을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인의 모 IgG Fc 도메인 중 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산의 상이한 아미노산에 의한 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인을 사용함으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자에 의해 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0240] 본 발명은 또한 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성에 비해, 혈장 항원을 제거하는 개선된 능력을 갖는 상술한 항원-결합 분자의 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 감소시킴으로써, 항원-결합 분자에 의해 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 혈장 항원을 제거하는 개선된 능력을 갖는 상술한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴으로써, 항원-결합 분자에 의해 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 혈장 항원을 제거하는 개선된 능력을 갖는 상술한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 히스티딘으로 치환시키거나 또는 상기 도메인 내로 하나 이상의 히스티딘을 삽입함으로써, 항원-결합 분자를 투여하여 혈장 항원을 제거하는 능력을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0241] 본 발명에서, "혈장 항원을 제거하는 능력"은 항원-결합 분자를 투여하거나 상기 분자가 생체 내로 분비되는 경우 혈장으로부터 항원을 제거하는 능력을 의미한다. 따라서, 본 발명에서 "혈장 항원을 제거하는 항원-결합 분자의 능력의 증가"는 혈장으로부터 항원 제거 속도가 상기 항원-결합 분자의 투여 시, 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키기 전, 또는 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고 동시에 산성 pH 범위에서의 그의 항원-결합 활성을 증가시키는 경우보다 작게 감소시키기 전에 비해 가속화됨을 의미한다. 혈장으로부터 항원을 제거하는 항원-결합 분자의 활성의 증가를, 예를 들어 생체 내에 가용성 항원 및 항원-결합 분자를 투여하고 투여 후 혈장 중 상기 가용성 항원의 농도를 측정함으로써 평가할 수 있다. 상기 가용성 항원 및 항원-결합 분자를 투여 후, 중성 pH 범위에서의 상기 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키거나 또는 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키고 동시에 산성 pH 범위에서의 그의 항원-결합 활성을 증가시키는 경우보다 작게 감소시킴으로써 혈장 중 가용성 항원의 농도를 감소시키는 경우, 상기 혈장 항원을 제거하는 항원-결합 분자의 능력은 증가하는 것으로 판단할 수 있다. 가용성 항원의 한 형태는 각각 "혈장 중 항원-결합 분자 결합된 항원 농도" 및 "혈장 중 항원-결합 분자 비-결합된 항원 농도"(후자는 "혈장 중 유리 항원 농도"와 동의어이다)로서 측정될 수 있는 농도를 갖는 항원-결합 분자 결합된 항원 또는 항원-결합 분자 비-결합된 항원일 수 있다. "혈장 중 총 항원 농도"는 항원-결합 분자 결합된 항원 및 비-결합된 항원 농도 또는 "혈장 중 유리 항원 농도"(이는 항원-결합 분자 비-결합된 항원 농도이다)의 합을 의미하므로, 상기 가용성 항원의 농도를 "혈장 중 총 항원 농도"로서 측정할 수 있다. "혈장 중 총 항원 농도" 또는 "혈장 중 유리 항원 농도"를 측정하는 다양한 방법들이 이후에 개시되는 바와 같이 당해분야에 널리 공지되어 있다.

[0242] 본 발명은 또한 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시킴으로써 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키는 방법을 제공한다. 더욱 또한, 본 발명은 상기 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴으로써 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키는 방법을 제공한다.

[0243] 본 발명은 또한 IgG의 Fc 도메인을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인의 모 IgG Fc 도메인 중 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산에 대한 상이한 아미노산의 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인을 사용함으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키는 방법을 제공한다.

[0244] 더욱 또한, 본 발명은 개선된 약동학을 갖는 상술한 항원-결합 분자의 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 증가시킴으로써, 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키는 방법

을 제공한다. 본 발명은 또한 개선된 약동학을 갖는 상술한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴으로써, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 개선된 약동학을 갖는 상술한 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 히스티딘으로 치환시키거나 또는 상기 도메인 내로 하나 이상의 히스티딘을 삽입함으로써 약동학을 개선시키는 방법을 제공한다.

[0245] 본 발명에서 "약동학의 증대", "약동학의 개선", 및 "우수한 약동학"을 "혈장 (혈액) 체류의 증대", "혈장 (혈액) 체류의 개선", "우수한 혈장 (혈액) 체류", 및 "연장된 혈장 (혈액) 체류"로서 고쳐 말할 수 있다. 이들 용어는 동의어이다.

[0246] 본 발명에서, "약동학의 개선"은 상기 항원-결합 분자의 인간, 또는 비-인간, 예를 들어 마우스, 래트, 원숭이, 토끼 및 개에의 투여 후 혈장으로부터 제거될 때까지(예를 들어 상기 항원-결합 분자가 세포 내에서 또는 유사하게 분해되고 혈장으로 복귀할 수 없을 때까지)의 기간의 연장뿐만 아니라 투여 기간 동안 분해로 인한 제거까지 항원 결합을 허용하는 형태(예를 들어 상기 항원-결합 분자의 항원-부재 형태)의 상기 항원-결합 분자의 혈장 체류의 연장을 의미한다. 본래의 인간 IgG는 비-인간 동물로부터의 FcRn에 결합할 수 있다. 예를 들어, 본래의 인간 IgG는 인간 FcRn보다 마우스 FcRn에 더 강하게 결합할 수 있으므로 본 발명의 항원-결합 분자의 성질을 확인하기 위해서는 마우스를 투여에 사용하는 것이 바람직할 수 있다(문헌[Int Immunol. 2001 Dec; 13(12):1551-9]). 또 다른 예로서, 고유 FcRn 유전자가 파괴되고 인간 FcRn 유전자에 대한 트랜스유전자가 발현되도록 잠복되어 있는 마우스(문헌[Methods Mol Biol. 2010; 602:93-104])를 또한 이후에 개시하는 본 발명의 항원-결합 분자의 성질을 확인하기 위해 투여에 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 구체적으로, "약동학의 개선"은 또한 항원에 결합되지 않은 항원-결합 분자(항원-결합 분자의 항원-부재 형태)의 분해로 인한 제거 시까지의 기간의 연장을 포함한다. 혈장 중 상기 항원-결합 분자는 상기 항원-결합 분자가 이미 항원에 결합된 경우 새로운 항원에 결합할 수 없다. 따라서, 상기 항원-결합 분자가 항원에 결합되지 않은 기간이 길수록, 새로운 항원에 결합할 수 있는 기간이 길어진다(또 다른 항원에 결합할 기회가 더 높아진다). 이는 항원이 생체 내에서 상기 항원-결합 분자에 없는 기간의 감소 및 항원이 상기 항원-결합 분자에 결합되는 기간의 연장을 가능하게 한다. 상기 항원-결합 분자의 투여에 의해 혈장으로부터 항원 제거를 가속화함으로써 상기 항원-결합 분자의 항원-부재 형태의 혈장 농도를 증가시킬 수 있고 상기 항원이 항원-결합 분자에 결합하는 기간을 연장시킬 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 "항원-결합 분자의 약동학의 개선"은 항원-결합 분자의 항원-부재 형태의 약동학적 매개변수의 개선(혈장 중 반감기의 연장, 혈장 중 평균 체류 시간의 연장, 및 혈장 제거의 장애 중 어느 하나), 항원-결합 분자의 투여 후 항원이 상기 항원-결합 분자에 결합하는 기간의 연장, 및 혈장으로부터 항원-결합 분자-매개된 항원 제거의 가속화를 포함한다. 상기 항원-결합 분자의 약동학의 개선을, 상기 매개변수들인, 혈장 중 반감기, 평균 혈장 체류 시간, 및 항원-결합 분자 또는 그의 항원-부재 형태의 혈장 제거 중의 어느 하나를 측정함으로써 평가할 수 있다(문헌["Pharmacokinetics: Enshu-niyoru Rikai (실행을 통한 이해)" Nanzando]). 예를 들어 상기 항원-결합 분자 또는 그의 항원-부재 형태의 혈장 농도를 마우스, 래트, 원숭이, 토끼, 개 또는 인간에게 상기 항원-결합 분자의 투여 후에 측정한다. 이어서, 각각의 매개변수를 측정한다. 상기 혈장 반감기 또는 평균 혈장 체류 시간이 연장되는 경우, 상기 항원-결합 분자의 약동학은 개선되는 것으로 판단할 수 있다. 상기 매개변수들을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. 상기 매개변수들을 예를 들어 첨부된 사용 설명서에 따라 약동학 분석 소프트웨어 윈놀린(WinNonlin)(파사이트(Pharsight))을 사용하여 비-구획 분석에 의해 적합하게 평가할 수 있다. 상기 항원-부재 항원-결합 분자의 혈장 농도를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법, 예를 들어 문헌[Clin Pharmacol. 2008 Apr; 48(4): 406-17]에 개시된 분석 방법을 사용하여 측정할 수 있다.

[0247] 본 발명에서, "약동학의 개선"은 또한 항원-결합 분자의 투여 후 상기 항원-결합 분자에 항원이 결합하는 기간의 연장을 포함한다. 상기 항원-결합 분자의 투여 후 상기 항원-결합 분자에 항원이 결합하는 기간이 연장되는 지의 여부를 유리 항원의 혈장 농도를 측정함으로써 평가할 수 있다. 상기 연장은 유리 항원 농도 대 총 항원 농도의 비의 증가에 필요한 시간 또는 유리 항원의 측정된 혈장 농도를 근거로 판단될 수 있다.

[0248] 상기 항원-결합 분자에 결합되지 않은 유리 항원의 혈장 농도 또는 유리 항원 농도 대 총 농도의 비를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 문헌[Pharm Res. 2006 Jan; 23 (1): 95-103]에 개시된 방법에 의해 측정할 수 있다. 한편으로, 항원이 생체 내에서 특정 작용을 나타내는 경우, 상기 항원이 상기 항원 작용을 중화하는 항원-결합 분자(길항 분자)에 결합하는 지의 여부를 상기 항원 작용이 중화되는 지의 여부의 시험에 의해 평가할 수 있다. 상기 항원 작용이 중화되는 지의 여부를, 상기 항원 작용을 반영하는 생체 내 마커를 분석함으로써 평가할 수 있다. 상기 항원이 상기 항원 작용을 활성화하는 항원-결합 분자(작용 분자)에

결합하는 지의 여부를, 상기 항원 작용을 반영하는 생체 내 마커를 분석함으로써 평가할 수 있다.

- [0249] 유리 항원의 혈장 농도 및 혈장 중 유리 항원의 양 대 혈장 중 총 항원의 양의 비의 측정, 생체 내 마커 분석, 및 상기와 같은 측정은 특별히 제한되지 않지만; 상기 분석을 바람직하게는 상기 항원-결합 분자 투여 후 일정 기간이 지난 후에 수행한다. 본 발명에서, 상기 항원-결합 분자의 투여 후 기간은 특별히 제한되지 않으며; 당해 분야의 숙련가들은 상기 투여된 항원-결합 분자의 성질 등에 따라 적합한 기간을 결정할 수 있다. 상기와 같은 기간은 예를 들어 상기 항원-결합 분자 투여 후 1일째, 상기 항원-결합 분자 투여 후 3일째, 상기 항원-결합 분자 투여 후 7일째, 상기 항원-결합 분자 투여 후 14일째, 및 상기 항원-결합 분자 투여 후 28일째를 포함한다. 본 발명에서, "혈장 항원 농도"는 항원-결합 분자 결합된 항원과 비-결합된 항원 농도의 합인 "혈장 중 총 항원 농도"이거나 또는 항원-결합 분자 비-결합된 항원 농도인 "혈장 중 유리 항원 농도"를 의미한다.
- [0250] 혈장 중 총 항원 농도를 본 발명의 항원-결합 분자의 투여에 의해, 인간 FcRn-결합 도메인으로서 본래의 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 대조 항원-결합 분자의 투여에 비해 또는 본 발명의 항원-결합 도메인 분자를 투여하지 않은 경우에 비해 2 배, 5 배, 10 배, 20 배, 50 배, 100 배, 200 배, 500 배, 1,000 배까지 또는 심지어 더 많이 낮출 수 있다.
- [0251] 항원/항원-결합 분자의 몰 비를 하기 나타낸 바와 같이 계산할 수 있다;
- [0252] 값 A: 각 시점에서의 몰 항원 농도
- [0253] 값 B: 각 시점에서의 몰 항원-결합 분자 농도
- [0254] 값 C: 각 시점에서 몰 항원-결합 분자 농도에 따른 몰 항원 농도(항원/항원-결합 분자 몰 비)
- [0255] $C = A/B$.
- [0256] 보다 작은 값 C는 항원-결합 분자당 더 높은 항원 제거 효율을 가리키는 반면, 보다 높은 값 C는 항원-결합 분자당 더 낮은 항원 제거 효율을 가리킨다.
- [0257] 항원/항원-결합 분자 몰 비를 상술한 바와 같이 계산할 수 있다.
- [0258] 항원/항원-결합 분자 몰 비를 본 발명의 항원-결합 분자의 투여에 의해, 인간 FcRn-결합 도메인으로서 본래의 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 대조 항원-결합 분자의 투여에 비해 2 배, 5 배, 10 배, 20 배, 50 배, 100 배, 200 배, 500 배, 1,000 배까지 또는 심지어 더 많이 낮출 수 있다.
- [0259] 본 발명에서, 본래의 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 바람직하게는, 그의 인간 FcRn 결합 활성 또는 생체 내 활성에 대해 비교용의 본래의 인간 IgG와 상기 항원-결합 분자를 비교할 목적으로 본래의 인간 IgG로서 사용한다. 바람직하게는, 관심의 항원-결합 분자와 동일한 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인으로서 본래의 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 대조 항원-결합 분자가 적합하게 사용될 수 있다. 보다 바람직하게는, 본래의 인간 IgG1을 그의 인간 FcRn 결합 활성 또는 생체 내 활성에 대해 비교용의 본래의 인간 IgG와 상기 항원-결합 분자를 비교할 목적으로 사용한다.
- [0260] 혈장 중 총 항원 농도 또는 항원/항체 몰 비의 감소를 실시예 6, 8 및 13에 개시된 바와 같이 평가할 수 있다. 보다 구체적으로, 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 계열 32 또는 계열 276(잭슨 레보라토리즈(Jackson Laboratories), 문헌[Methods Mol Biol. 2010; 602:93-104])을 사용하여, 이들을, 항원-결합 분자가 상기 마우스 대응 항원과 교차 반응하지 않는 경우 항원-항체 동시-주사 모델 또는 정상 상태 항원 주입 모델에 의해 평가할 수 있다. 항원-결합 분자가 마우스 대응물과 교차 반응하는 경우, 이들을 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 계열 32 또는 계열 276(잭슨 레보라토리즈)에 항원-결합 분자를 단순히 주사함으로써 평가할 수 있다. 동시 주사 모델에서, 항원-결합 분자와 항원의 혼합물을 상기 마우스에게 투여한다. 정상 상태 항원 주입 모델에서, 항원 용액을 함유하는 주입 펌프를 상기 마우스에게 이식하여 일정한 혈장 항원 농도를 성취하고, 이어서 항원-결합 분자를 상기 마우스에게 주사한다. 시험 항원-결합 분자를 동일한 투여량으로 투여한다. 혈장 중 총 항원 농도, 혈장 중 유리 항원 농도 및 혈장 항원-결합 분자 농도를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법을 사용하여 적합한 시점에서 측정한다.
- [0261] 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도 및 항원/항원-결합 분자 몰 비를 본 발명의 장기적인 효과의 평가를 위해 투여 후 2, 4, 7, 14, 28, 56 또는 84일째에 측정할 수 있다. 즉, 장기적인 혈장 항원 농도를, 본 발명의 항원 결합 분자의 성질을 평가하기 위해 항원-결합 분자의 투여 후 2, 4, 7, 14, 28, 56 또는 84일째에 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도 및 항원/항원-결합 분자 몰 비를 측정함으로써 측정한다. 상기 혈장 항원 농도 또는 항원/항원

-결합 분자 몰 비의 감소가 본 발명에 개시된 항원-결합 분자에 의해 성취되는 지의 여부를 상술한 시점들 중 임의의 하나 이상의 시점에서 상기 감소의 평가에 의해 결정할 수 있다.

[0262] 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도 및 항원/항원-결합 분자 몰 비를 본 발명의 단기 효과의 평가를 위해 투여 후 15 분, 1, 2, 4, 8, 12 또는 24 시간째에 측정할 수 있다. 즉, 단기 혈장 항원 농도를, 본 발명의 항원 결합 분자의 성질을 평가하기 위해 항원-결합 분자의 투여 후 15 분, 1, 2, 4, 8, 12 또는 24 시간째에 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도 및 항원/항원-결합 분자 몰 비를 측정함으로써 측정한다.

[0263] 본 발명의 항원-결합 분자의 투여 경로를 피 내, 정맥 내, 안내, 피하, 복강 내, 비경구 및 근육 내 주사 중에서 선택할 수 있다.

[0264] 본 발명에서, 인간에서의 약동학의 개선이 바람직하다. 인간에서 혈장 체류를 측정하기 어려운 경우, 마우스 (예를 들어 정상 마우스, 인간 항원-발현 트랜스제닉 마우스, 인간 FcRn-발현 트랜스제닉 마우스) 또는 원숭이 (예를 들어 키노몰구스 원숭이)에서의 혈장 체류를 근거로 상기 체류를 예견할 수도 있다.

[0265] 본 발명에서, 산성 pH 범위는 전형적으로 pH 4.0 내지 pH 6.5를 지칭한다. 상기 산성 pH 범위는 pH 5.5 내지 6.5 이내의 임의의 pH 값에 의해 지시되는 범위, 바람직하게는 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 및 6.5, 특히 바람직하게는 생체 내에서 초기 엔도솜 중의 pH에 가까운 pH 5.8 내지 6.0 중에서 선택된다. 한편, 본 발명에서 중성 pH 범위는 전형적으로는 pH 6.7 내지 pH 10.0을 지칭한다. 상기 중성 pH 범위는 pH 7.0 내지 pH 8.0 이내의 임의의 pH 값에 의해 지시되는 범위, 바람직하게는 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 및 8.0 중에서 선택되고, 특히 바람직하게는 생체 내 혈장 (혈액) pH에 가까운 pH 7.4이다. pH 7.4에서의 낮은 친화성으로 인해 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 평가하기 어려운 경우 pH 7.4 대신에 pH 7.0을 사용할 수 있다. 상기 분석 조건에 사용되는 온도로서, 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 10 °C 내지 50 °C 중 임의의 온도에서 평가할 수 있다. 바람직하게는 15 °C 내지 40 °C의 온도를 상기 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해 사용한다. 보다 바람직하게, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 및 35 °C 중 어느 하나와 같이, 20 내지 35 °C 중 임의의 온도를 상기 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해 또한 사용한다. 실시예 5에 개시된 25 °C의 온도가 본 발명의 실시태양에 대한 일례이다.

[0266] 따라서, 본 발명에서 "산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴"은 pH 4.0 내지 pH 6.5에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성이 pH 6.7 내지 pH 10.0에서의 그의 항원-결합 활성이 비해 감소함을 의미한다. 바람직하게는, 상기 어구는 pH 5.5 내지 pH 6.5에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성이 pH 7.0 내지 pH 8.0에서의 경우에 비해 감소함을 의미하며, 보다 바람직하게는 초기 엔도솜 pH에서의 항원-결합 활성이 생체 내 혈장 pH에서의 그의 항원-결합 활성에 비해 감소함을 의미한다. 구체적으로, pH 5.8 내지 pH 6.0에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성이 pH 7.4에서의 상기 항원-결합 분자의 항원-결합 활성에 비해 감소한다.

[0267] 한편, 본 발명에서 "산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴"을 또한 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 산성 pH 범위에서의 경우보다 더 증가시킴"으로도 표현한다. 구체적으로, 본 발명에서 산성 및 중성 pH 범위 간의 항원-결합 분자의 항원 결합 활성의 비를 증가시키는 것이 가능하다. 예를 들어 KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)의 값이 하기에 개시하는 실시태양에서 증가된다. 산성 및 중성 pH 범위 간의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성의 비를 예를 들어 산성 pH 범위에서의 상기 분자의 항원-결합 활성을 감소시키거나, 중성 pH 범위에서의 상기 분자의 항원-결합 활성을 증가시키거나, 또는 이 둘 모두에 의해 증가시킬 수 있다.

[0268] 본 발명에서, "산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우에 비해 손상시킴"이란 표현은 때때로 "산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴" 대신에 사용된다.

[0269] 본 발명에서, 산성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성은 pH 4.0 내지 pH 6.5에서의 인간 FcRn-결합 활성, 바람직하게는 pH 5.5 내지 pH 6.5에서의 인간 FcRn-결합 활성, 및 특히 바람직하게는 pH 5.8 내지 pH 6.0(이는 생체 내 초기 엔도솜 pH에 필적한다)에서의 인간 FcRn-결합 활성을 의미한다. 한편, 본 발명에서 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성은 pH 6.7 내지 pH 10.0에서의 인간 FcRn-결합 활성, 바람직하게는 pH 7.0 내지 pH 8.0에서의 인간 FcRn-결합 활성, 및 특히 바람직하게는 pH 7.4(이는 생체 내 혈장 pH에 필적한다)에서의 인간 FcRn-결합 활성을 의미한다.

[0270] 본 발명의 항원-결합 분자는 인간 FcRn-결합 도메인을 갖는다. 상기 인간 FcRn-결합 도메인은 상기 항원-결합

분자가 산성 및 중성 pH 범위에서 상기 인간 FcRn-결합 활성을 나타내는 한, 특별히 제한되지 않는다. 한편으로, 상기 도메인은 직접적인 또는 간접적인 인간 FcRn-결합 활성을 가질 수도 있다. 상기와 같은 도메인은 예를 들어 IgG-유형 면역글로불린, 알부민, 알부민 도메인 3, 항-인간 FcRn 항체, 항-인간 FcRn 웨პ타이드, 및 항-인간 FcRn 스캐폴드(scaffold) 분자(이들은 모두 인간 FcRn에 대해 직접 결합하는 활성을 갖는다); 및 IgG 또는 알부민에 결합하는 분자(상기는 인간 FcRn에 간접적으로 결합하는 활성을 갖는다)의 Fc 도메인을 포함한다. 본 발명의 상기와 같은 바람직한 도메인들은 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는다. 상기 도메인이 이미 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 한 상기 도메인을 어떠한 변경 없이도 사용할 수 있다. 상기 도메인이 산성 및/또는 중성 pH 범위에서 단지 약한 인간 FcRn-결합 활성을 갖거나 또는 상기 활성을 전혀 갖지 않는 경우, 상기 항원-결합 분자 중의 아미노산을 개변시킴으로써 상기 인간 FcRn-결합 활성을 부여할 수도 있다. 그러나, 산성 및/또는 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 상기 인간 FcRn-결합 도메인 중의 아미노산을 개변시킴으로써 부여하는 것이 바람직하다. 한편으로, 산성 및/또는 중성 pH 범위에서 이미 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 도메인 중의 아미노산을 상기 인간 FcRn-결합 활성이 증가하도록 개변시킬 수도 있다. 상기 인간 FcRn-결합 도메인 중의 목적하는 아미노산 변경을, 아미노산 개변 전후의 산성 및/또는 중성 pH 범위에서의 상기 인간 FcRn-결합 활성을 비교함으로써 선택할 수 있다.

[0271] 바람직한 인간 FcRn-결합 도메인은 인간 FcRn에 직접 결합하는 영역이다. 상기와 같은 바람직한 인간 FcRn-결합 영역은 예를 들어 항체 Fc 도메인을 포함한다. 한편, 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 알부민 또는 IgG와 같은 폴리웨პ타이드에 결합할 수 있는 영역은 알부민, IgG 또는 상기와 같은 존재를 통해 인간 FcRn에 간접적으로 결합할 수 있다. 따라서, 본 발명의 상기와 같은 인간 FcRn-결합 영역은 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 폴리웨პ타이드에 결합하는 영역일 수 있다.

[0272] 본 발명의 항원-결합 분자는 상기 분자가 표적 항원에 특이적인 결합 활성을 갖는 항원-결합 도메인을 포함하는 한, 특별히 제한되지 않는다. 상기와 같은 바람직한 항원-결합 도메인은 예를 들어 항체의 항원-결합 영역을 갖는 도메인을 포함한다. 항체의 항원-결합 영역은 예를 들어 CDR 및 가변 영역을 포함한다. 항체의 항원-결합 영역이 CDR인 경우, 상기 영역은 전체 항체로부터의 6 개 CDR 모두, 또는 1개, 2개 또는 그 이상의 CDR을 함유할 수도 있다. CDR을 항체의 결합 영역으로서 함유하는 경우, 상기 CDR은 아미노산 결실, 치환, 첨가 및/또는 삽입을 포함하거나 또는 CDR의 일부일 수 있다.

[0273] 다른 한편으로, 본 발명의 방법에 사용되는 항원-결합 분자는 길항작용 활성(길항작용성 항원-결합 분자)을 갖는 항원-결합 분자, 작용 활성을 갖는 항원-결합 분자(작용성 항원-결합 분자), 및 세포독성을 갖는 분자를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 항원-결합 분자는 길항성 항원-결합 분자, 특히 수용체 또는 사이토킨과 같은 항원을 인식하는 길항성 항원-결합 분자를 포함한다.

[0274] 본 발명에서, 관심의 항원-결합 분자는 특별히 제한되지 않으며, 임의의 항원-결합 분자일 수 있다. 본 발명의 항원-결합 분자는 바람직하게는 항원-결합 활성(항원-결합 도메인) 및 인간 FcRn-결합 도메인을 모두 포함한다. 특히, 본 발명의 바람직한 항원-결합 분자는 인간 FcRn에 결합하는 도메인을 포함한다. 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 모두 포함하는 항원-결합 분자는 예를 들어 항체를 포함한다. 본 발명과 관련하여 바람직한 항체는 예를 들어 IgG 항체를 포함한다. 상기 사용되는 항체가 IgG 항체인 경우, IgG의 유형은 제한되지 않으며; 임의의 아이소타입(하위부류)에 속하는 IgG, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 사용할 수 있다. 더욱 또한, 본 발명의 항원-결합 분자는 항체 불변 영역을 포함할 수 있으며, 아미노산 돌연변이를 상기 불변 영역에 도입시킬 수 있다. 도입되는 아미노산 돌연변이는 예를 들어 Fc감마 수용체에 대한 결합을 강화하거나 손상하는 것들(문헌[Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14; 103(11): 4005-10])을 포함하나, 이들 예로 제한되지 않는다. 한편으로, IgG2의 것과 같은 적합한 불변 영역을 선택함으로써 pH-의존적인 결합을 변경시키는 것도 또한 가능하다.

[0275] 본 발명의 관심의 항원-결합 분자가 항체인 경우, 상기 항체는 임의의 동물로부터 유래한 항체, 예를 들어 마우스 항체, 인간 항체, 래트 항체, 토끼 항체, 염소 항체, 또는 낙타 항체일 수 있다. 더욱 또한, 상기 항체는 변경된 항체, 예를 들어 키메릭 항체, 및 특히 인간화된 항체의 서열에 아미노산 치환을 포함하는 변경된 항체 등일 수도 있다. 상기 항체는 또한 이중특이성 항체, 다양한 분자들과 결합된 항체 변형 산물, 및 항체 단편을 포함하는 폴리웨პ타이드를 포함한다.

[0276] "키메릭 항체"는 상이한 동물들로부터 유래한 서열들을 결합시켜 제조한 항체이다. 구체적으로, 상기 키메릭 항체는 예를 들어 마우스 항체의 중쇄 및 경쇄 가변(V) 영역 및 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 불변(C) 영역을 갖는 항체를 포함한다.

- [0277] "인간화된 항체"(또한 개장된(reshaped) 인간 항체라고도 칭함)는 비인간 포유동물, 예를 들어 마우스로부터 유래한 항체의 상보성 결정 영역(CDR)이 인간 항체의 CDR 내로 이식된 항체이다. CDR의 동정 방법은 공지되어 있다(문헌[Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987)], [National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877]). 상기 목적에 적합한 일반적인 유전자 재조합 기술들도 또한 공지되어 있다(유럽 특허 출원 EP 125023; 및 WO 96/02576을 참조하시오).
- [0278] 이중특이성 항체는 동일한 항체 분자 안에 상이한 에피토프를 인식하는 가변 영역들을 갖는 항체를 지칭한다. 이중특이성 항체는 2 개 이상의 상이한 항원을 인식하는 항체, 또는 동일 항원 상의 2 개 이상의 상이한 에피토프를 인식하는 항체일 수 있다.
- [0279] 더욱 또한, 항체 단편을 포함하는 폴리펩타이드는 예를 들어 Fab 단편, F(ab')2 단편, scFv(문헌[Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9): 1126-36]), 도메인 항체(dAb)(WO 2004/058821, WO 2003/002609), scFv-Fc(WO 2005/037989), dAb-Fc 및 Fc 융합 단백질을 포함한다. Fc 도메인을, 분자가 Fc 도메인을 포함하는 경우 인간 FcRn-결합 도메인으로서 사용할 수 있다. 한편으로, FcRn-결합 도메인을 상기 분자에 융합시킬 수도 있다.
- [0280] 더욱이, 본 발명에 적용할 수 있는 항원-결합 분자는 항체-유사 분자일 수 있다. 항체-유사 분자(스캐폴드 분자, 웨타이드 분자)는 표적 분자에 결합함으로써 기능을 발휘할 수 있는 분자이며(문헌[Current Opinion in Biotechnology (2006) 17: 653-658]; [Current Opinion in Biotechnology (2007) 18: 1-10]; [Current Opinion in Structural Biology (1997) 7: 463-469]; [Protein Science (2006) 15: 14-27]), 예를 들어 DARPin(WO 2002/020565), 애피바디(Affibody)(WO 1995/001937), 애비머(Avimer) (WO 2004/044011; WO 2005/040229), 및 애드넥틴(Adnectin) (WO 2002/032925)을 포함한다. 이들 항체-유사 분자가 pH-의존적인 방식으로 표적 분자에 결합하고/하거나 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 가질 수 있는 경우, 상기 분자는 항원-결합 분자에 의한 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하고, 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원 농도의 감소를 촉진하고, 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키고, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시킬 수 있다.
- [0281] 더욱 또한, 상기 항원-결합 분자는 인간 FcRn-결합 도메인과, 리간드를 포함하는 표적에 결합하는 수용체 단백질 간의 융합으로부터 생성되는 단백질일 수 있으며, 예를 들어 TNFR-Fc 융합 단백질, IL1R-Fc 융합 단백질, VEGFR-Fc 융합 단백질, 및 CTLA4-Fc 융합 단백질을 포함한다(문헌[Nat Med. 2003, Jan; 9(1): 47-52]; [BioDrugs. (2006) 20(3): 151-60]). 이들 수용체-인간 FcRn-결합 도메인 융합 단백질이 pH-의존적인 방식으로 리간드를 포함하는 표적 분자에 결합하고/하거나 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 경우, 상기 단백질은 항원-결합 분자에 의한 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하고, 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원 농도의 감소를 촉진하고, 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키고, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시킬 수 있다. 수용체 단백질을, 리간드를 포함한 표적에 대한 상기 수용체 단백질의 결합 도메인을 포함하도록 적합하게 디자인하고 변형시킨다. TNFR-Fc 융합 단백질, IL1R-Fc 융합 단백질, VEGFR-Fc 융합 단백질, 및 CTLA4-Fc 융합 단백질을 포함하는 이후의 실시예에 대해 언급하는 바와 같이, 리간드를 포함하는 상기 표적에의 결합에 필요한 수용체 단백질의 세포 외 도메인을 포함하는 가용성 수용체 분자를 본 발명에 사용하는 것이 바람직하다. 상기 디자인되고 변형된 수용체 분자를 본 발명에서 인공 수용체라 지칭한다. 인공 수용체 분자의 제작을 위해 수용체 분자를 디자인하고 변형시키는데 사용되는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0282] 더욱이, 상기 항원-결합 분자는, 표적에 결합하고 중화 효과를 갖는 인공 리간드 단백질이 인간 FcRn-결합 도메인과 융합된 융합 단백질일 수 있으며, 인공 리간드 단백질은 예를 들어 돌연변이 IL-6을 포함한다(문헌[EMBO J. 1994 Dec 15; 13(24): 5863-70]). 상기와 같은 인공 리간드 융합 단백질이 pH-의존적인 방식으로 표적 분자에 결합하고/하거나 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 경우, 상기 단백질은 항원-결합 분자에 의한 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하고, 항원-결합 분자를 투여함으로써 혈장 항원 농도의 감소를 촉진하고, 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키고, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시킬 수 있다.
- [0283] 더욱 또한, 본 발명의 항체들은 변형된 당 쇄를 포함할 수도 있다. 변형된 당 쇄를 갖는 항체는 예를 들어 변형된 글리코실화를 갖는 항체(WO 99/54342), 당 쇄에 첨가된 퓨코스가 불충분한 항체(WO 00/61739; WO 02/31140; WO 2006/067847; WO 2006/067913) 및 양분하는 GlcNAc가 있는 당 쇄를 갖는 항체(WO 02/79255)를 포함한다.
- [0284] pH 이외에 항원-결합 또는 인간 FcRn-결합 활성을 대한 분석에 사용되는 조건은 당해 분야의 숙련가들에 의해 적합하게 선택될 수 있으며, 상기 조건들은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, WO 2009/125825에 개시된 바와 같이 37 °C에서 MES 완충제를 사용하는 조건을 사용하여 상기 활성을 측정할 수 있다. 또 다른 실시태양에

서, 실시예 4 또는 5에 개시된 바와 같이 25 °C에서 Na-포스페이트 완충제를 사용하여 상기 활성을 측정할 수 있다. 한편, 항원-결합 분자의 항원-결합 활성 및 인간 FcRn-결합 활성을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 비아코어(GE 헬쓰케어(Healthcare)) 등을 사용하여 측정할 수 있다. 상기 항원이 가용성 항원인 경우, 상기 가용성 항원에 결합하는 항원-결합 분자의 활성을, 분석물로서 상기 항원을 상기 항원-결합 분자가 고정화된 칩 상에 로딩함으로써 측정할 수 있다. 한편으로, 상기 항원이 막-유형 항원인 경우, 상기 막-유형 항원에 결합하는 항원-결합 분자의 활성을 항원-고정화된 칩 상에 분석물로서 상기 항원-결합 분자를 로딩함으로써 측정할 수 있다. 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성을, 각각 상기 항원-결합 분자 또는 인간 FcRn이 고정화된 칩 상에 분석물로서 인간 FcRn 또는 항원-결합 분자를 로딩함으로써 측정할 수 있다.

[0285] 본 발명에서, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성과 중성 pH 범위에서의 상기 활성 간의 비는 상기 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성이 중성 pH 범위에서의 경우보다 낮은 한 특별히 제한되지 않는다. 그러나, KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)의 값(이는 pH 5.8 및 pH 7.4에서 항원에 대한 해리 상수(KD)의 비이다)은 바람직하게는 2 이상, 보다 바람직하게는 10 이상, 훨씬 더 바람직하게는 40 이상이다. 상기 KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4) 값의 상한은 특별히 제한되지 않으며, 당해 분야의 숙련가들의 기술을 사용하여 생성이 가능한 한은 임의의 값, 예를 들어 400, 1,000 또는 10,000일 수 있다.

[0286] 상기 항원이 가용성 항원인 경우, 상기 항원-결합 활성의 값을 해리 상수(KD)에 의해 나타낼 수 있다. 다른 한편으로, 상기 항원이 막-유형 항원인 경우, 상기 활성을 겉보기 해리 상수(겉보기 KD)에 의해 나타낼 수 있다. 상기 해리 상수(KD) 및 겉보기 해리 상수(겉보기 KD)를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 비아코어(GE 헬쓰케어), 스캐차드(Scatchard) 플롯, 유식 세포측정계 등을 사용하여 측정할 수 있다.

[0287] 본 발명에서, 산성과 중성 pH 범위 간의 항원-결합 활성의 비를 나타내는 다른 매개변수는 예를 들어 해리속도 상수 k_d 를 포함한다. 상기 해리속도 상수(k_d)를 상기 결합 활성 비를 나타내는 매개변수로서 해리 상수(KD) 대신에 사용하는 경우, k_d (산성 pH 범위에서)/ k_d (중성 pH 범위에서)의 값(이는 산성 pH 범위 및 중성 pH 범위에서 항원에 대한 k_d (해리속도 상수)의 비이다)은 바람직하게는 2 이상, 보다 바람직하게는 5 이상, 훨씬 더 바람직하게는 10 이상, 및 훨씬 더 바람직하게는 30 이상이다. 상기 k_d (산성 pH 범위에서)/ k_d (중성 pH 범위에서)의 상한은 특별히 제한되지 않으며, 당해 분야의 숙련가들의 기술을 사용하여 생성이 가능한 한은 임의의 값, 예를 들어 50, 100 또는 200일 수 있다.

[0288] 상기 항원이 가용성 항원인 경우, 상기 항원-결합 활성의 값을 해리속도 상수(k_d)에 의해 나타낼 수 있다. 한편으로, 상기 항원이 막-유형 항원인 경우, 상기 값을 겉보기 k_d (겉보기 해리속도 상수)에 의해 나타낼 수 있다. 상기 해리속도 상수(k_d) 및 겉보기 해리속도 상수(겉보기 k_d)를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 비아코어(GE 헬쓰케어), 유식 세포측정계 등을 사용하여 측정할 수 있다.

[0289] 본 발명에서, 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 상이한 pH에서 측정하는 경우, pH를 제외한 상기 측정 조건은 일정한 것이 바람직하다.

[0290] 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소(손상)시키는 방법(pH-의존적인 결합 능력을 부여하는 방법)은 특별히 제한되지 않으며 임의의 방법에 의해 성취될 수 있다. 구체적으로, WO 2009/125825에 개시된 바와 같이, 상기 방법은 예를 들어 항원-결합 분자 중의 아미노산을 히스티딘으로 치환시키거나 상기 항원-결합 분자 내로 히스티딘을 삽입함으로써 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소(손상)시키는 방법을 포함한다. 항체 중의 아미노산을 히스티딘으로 치환시킴으로써 항체에 pH-의존적인 항원-결합 활성을 부여할 수 있음은 이미 공지되어 있다(문헌[FEBS Letter (1992) 309(1): 85-88]). 상기와 같은 히스티딘 돌연변이(치환) 또는 삽입 부위는 특별히 제한되지 않으며; 히스티딘을 임의의 부위에서 아미노산 대신 사용하거나 또는 임의의 부위에서 삽입할 수 있다. 히스티딘 돌연변이(치환) 또는 삽입에 바람직한 부위는 예를 들어 상기 돌연변이 또는 삽입이 항원-결합 분자의 항원-결합 활성에 영향을 미치는 영역을 포함한다. 상기와 같은 영역은 상기 돌연변이 또는 삽입이 돌연변이 또는 삽입 전에 비해, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소(손상)시키는(KD(산성 pH 범위에서)/KD(중성 pH 범위에서) 값이 증가한다) 부위를 포함한다. 상기 항원-결합 분자가 항체인 경우, 상기와 같은 영역은 예를 들어 항체 가변 영역 및 CDR을 포함한다. 도입되는(성취되는) 히스티딘 돌연변이 또는 삽입의 수를 당해 분야의 숙련가들에 의해 적합하게 정할 수 있다. 히스티딘 치환은 오직 단일 부위에만 또는 2 개 이상의 부위에 도입시킬 수 있다. 한편으로, 히스티딘을 오직 단일 부위에만 또는 2 개 이상의 부위에 삽입

시킬 수 있다. 더욱 또한, 히스티딘 돌연변이 이외의 돌연변이(히스티딘 이외의 아미노산에 의한 돌연변이(결실, 첨가, 삽입 및/또는 치환))를 히스티딘 돌연변이에 부가하여 도입시킬 수도 있다. 한편으로, 히스티딘 돌연변이를 히스티딘 삽입과 병행할 수도 있다. 상기와 같은 히스티딘 치환 또는 삽입을 랜덤한 방법, 예를 들어 히스티딘 스캐닝(당해 분야의 숙련가들에게 공지된 알라닌 스캐닝에서 알라닌 대신에 히스티딘을 사용함으로써 수행함)에 의해 수행할 수 있다. 이어서, 상기 돌연변이의 도입 전보다 더 큰 KD(산성 pH 범위에서)/KD(중성 pH 범위에서) 값을 갖는 항원-항체 분자를, 랜덤한 히스티딘 돌연변이 또는 삽입이 도입된 항원-결합 분자의 라이브러리로부터 선택할 수 있다.

[0291] 히스티딘을 상기 항원-결합 분자 중의 아미노산 대신에 사용하거나 또는 히스티딘을 상기 항원-결합 분자에 삽입하는 경우, 히스티딘 치환 또는 삽입 후 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 바람직하게는 히스티딘 치환 또는 삽입 전 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성과 동등하지만 특별히 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, "히스티딘 치환 또는 삽입 후 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성은 히스티딘 치환 또는 삽입 전 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성과 동등하다"는 상기 히스티딘 치환 또는 삽입 후 항원-결합 분자가 상기 히스티딘 치환 또는 삽입 전 항원-결합 분자의 항원-결합 활성의 10% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 및 훨씬 더 바람직하게는 90% 이상 유지함을 의미한다. 항원-결합 분자의 항원-결합 활성이 히스티딘 치환 또는 삽입으로 인해 감소하는 경우, 상기 항원-결합 활성을, 상기 항원-결합 활성이 히스티딘 치환 또는 삽입 전의 경우와 동등해지도록 상기 항원-결합 분자 내로 하나 이상의 아미노산을 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입함으로써 조절할 수도 있다. 본 발명은 또한 히스티딘 치환 또는 삽입 후 항원-결합 분자 내로의 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입의 결과로서 동등해진 결합 활성을 갖는 상기와 같은 항원-결합 분자를 포함한다.

[0292] 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소(손상)시키는 다른 방법은 상기 항원-결합 분자 중의 아미노산을 비-천연 아미노산으로 치환시키거나 또는 상기 항원-결합 분자 내로 비-천연 아미노산을 삽입하는 방법을 포함한다. pKa를 비-천연 아미노산을 사용하여 인위적으로 조절할 수 있음은 공지되어 있다(문헌[Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 34]; [Chem Soc Rev. 2004 Sep 10, 33 (7): 422-30]; [Amino Acids. (1999) 16(3-4): 345-79]). 따라서, 본 발명에서, 상술한 히스티딘 대신에 비-천연 아미노산을 사용하는 것이 가능하다. 비-천연 아미노산을 도입시키는 부위는 특별히 제한되지 않으며, 비-천연 아미노산을 임의의 부위에서 치환하거나 삽입할 수도 있다. 비-천연 아미노산 치환 또는 삽입의 바람직한 부위는 예를 들어 상기 치환 또는 삽입이 항원-결합 분자의 항원-결합 활성에 영향을 미치는 영역을 포함한다. 예를 들어, 상기 항원-결합 분자가 항체인 경우, 상기와 같은 영역은 항체 가변 영역 및 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 한편, 상기 도입되는 비-천연 아미노산의 수는 특별히 제한되지 않으며; 단지 단일 부위에서만 또는 2 개 이상의 부위에서 비-천연 아미노산을 치환시키는 것이 가능하다. 한편으로, 비-천연 아미노산을 단지 단일 부위에 또는 2 개 이상의 부위에 삽입할 수 있다. 더욱 또한, 비-천연 아미노산의 치환 또는 삽입에 부가하여 다른 아미노산들을 결실, 첨가, 삽입 및/또는 치환시킬 수도 있다. 더욱 또한, 비-천연 아미노산을 상술한 히스티딘 치환 및/또는 삽입과 병행하여 치환 및/또는 삽입할 수도 있다. 임의의 비-천연 아미노산을 본 발명에서 사용할 수도 있다. 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 비-천연 아미노산을 사용하는 것이 가능하다.

[0293] 본 발명에서, 상기 항원-결합 분자가 항체인 경우에, 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 치환의 가능한 부위는 예를 들어 CDR 서열 및 항체의 CDR 구조에 기여하는 서열, 예를 들어 WO 2009/125825에 개시된 부위를 포함한다. 상기 아미노산 위치는 카밧 넘버링에 따라 나타낸다(문헌[Kabat EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH]).

[0294] 상기 카밧 넘버링 시스템을 일반적으로는 가변 도메인 중의 잔기(대략 경쇄의 1 내지 107 잔기 및 중쇄의 1 내지 113 잔기)를 지칭하는 경우에 사용한다(예를 들어 문헌[Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). 상기 "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 색인"을 일반적으로는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 중의 잔기를 지칭하는 경우 사용한다(예를 들어 상기 카밧 등의 문헌에 보고된 EU 색인). "카밧에서와 같은 EU 색인"은 인간 IgG₁ EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 본 발명에서 달리 나타내지 않는 한, 항체의 가변 도메인 중의 잔기 번호에 대한 언급은 상기 카밧 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본 발명에서 달리 나타내지 않는 한, 항체의 불변 도메인 중의 잔기 번호에 대한 언급은 상기 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다(예를 들어 WO 2006073941을 참조하시오).

- [0295] 중쇄: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b, 및 H102
- [0296] 경쇄: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92, 및 L94
- [0297] 이들 개변 부위 중에서, H32, H61, L53, L90, 및 L94는 대단히 일반적인 개변 부위인 것으로 추정된다.
- [0298] 상기 항원이 IL-6 수용체(예를 들어 인간 IL-6 수용체)인 경우에, 상기 바람직한 개변 부위는 하기를 포함한다. 그러나, 상기 개변 부위는 이들로 특별히 제한되지 않는다.
- [0299] 중쇄: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H100b, 및 H102
- [0300] 경쇄: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, 및 L94
- [0301] 구체적으로, 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 치환에 바람직한 부위들의 조합은 예를 들어 H27, H31, 및 H35의 조합; H27, H31, H32, H35, H58, H62, 및 H102의 조합; L32 및 L53의 조합; 및 L28, L32, 및 L53의 조합을 포함한다. 더욱 또한, 중쇄 및 경쇄 중의 치환 부위의 바람직한 조합은 예를 들어 H27, H31, L32 및 L53의 조합을 포함한다.
- [0302] 이들 부위 중에서, 히스티딘 또는 비-천연 아미노산을 오직 단일 부위 또는 보다 많은 부위에서 치환시킨다.
- [0303] 한편, 상기 항원-결합 분자가 항체 불변 영역을 갖는 물질인 경우에, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소(손상)시키는 방법은 예를 들어 상기 항체 불변 영역 중의 아미노산을 개변시키는 방법을 포함한다. 구체적으로, 상기와 같은 방법은 예를 들어 WO 2009/125825에 개시된 불변 영역(서열번호 11, 12, 13 및 14)을 치환하는 방법을 포함한다. 한편, 항체 불변 영역을 변경시키는 방법은 예를 들어 다양한 불변 영역 아이소타입(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)을 평가하고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 감소시키는(산성 pH 범위에서의 해리속도를 증가시키는) 아이소타입을 선택하는 방법을 포함한다. 상기와 같은 방법은 또한 야생형 아이소타입의 아미노산 서열(야생형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 아미노산 서열) 내로 아미노산 치환을 도입시킴으로써 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 감소시키는(산성 pH 범위에서의 해리속도를 증가시키는) 방법을 포함한다. 상기 항체 불변 영역 중의 힌지 영역의 서열은 아이소타입들(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4) 가운데에서도 상당히 상이하며, 상기 힌지 영역 아미노산 서열의 차이는 상기 항원-결합 활성에 큰 영향을 미친다. 따라서 항원 또는 에피토프의 유형에 따라 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 감소시키기 위해(산성 pH 범위에서의 해리속도를 증가시키기 위해) 적합한 아이소타입을 선택하는 것이 가능하다. 더욱 또한, 상기 힌지 영역 아미노산 서열의 차이가 상기 항원-결합 활성에 큰 영향을 미치므로, 야생형 아이소타입의 아미노산 서열 중 바람직한 아미노산 치환 부위는 상기 힌지 영역 내에 있는 것으로 추정된다.
- [0304] 상기 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 상술한 방법 등에 의해 중성 pH 범위에서의 경우 보다 더 작게 감소시키는(약화시키는) 경우(KD(산성 pH 범위에서)/KD(중성 pH 범위에서))의 값을 증가시키는 경우, 일반적으로 상기 KD(산성 pH 범위에서)/KD(중성 pH 범위에서) 값은 원래의 항체에 비해 2 배 이상, 바람직하게는 5 배 이상, 보다 바람직하게는 10 배 이상이 바람직하지만, 상기 값들로 특별히 제한되지는 않는다.
- [0305] 상술한 방법들을 사용하여 상기와 같은 성질을 갖지 않는 항원-결합 분자로부터 아미노산 치환 또는 삽입에 의해 상기 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성이 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소되는(약화되는) 항원-결합 분자(pH-의존적인 방식으로 결합하는 항원-결합 분자)를 생성시킬 수 있다. 다른 방법은 상술한 성질을 갖는 항원-결합 분자를 직접 수득하는 방법을 포함한다. 예를 들어, 목적하는 관심 성질을 갖는 항체를, 동물(마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 인간 면역글로불린-트랜스제닉 마우스, 인간 면역글로불린-트랜스제닉 래트, 인간 면역글로불린-트랜스제닉 토끼, 라마, 낙타 등)을 항원으로 면역시켜 수득한 항체로부터 지표로서 상기 pH-의존적인 항원 결합을 사용하여 선별함으로써 직접 선택할 수도 있다. 항체를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법들인 하이브리도마 기술 또는 B-세포 클로닝 기술(문헌[Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 23; 93(15): 7843-8]; [J Immunol Methods. 2006 Oct 20; 316(1-2): 133-43]; [Journal of the Association for Laboratory Automation]; WO 2004/106377; WO 2008/045140; 및 WO 2009/113742]에 의해 생성시킬 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 한편으로, 관심 성질을 갖는 항체를, 시험관 내에서 항원-결합 도메인을 제공하는 라이브리리로부터 지표로서 pH-의존적인 항원 결합을 사용하여 선별함으로써 직접 선택할 수도 있다. 상기와 같은 라이브리리는 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 라이브리리들인 인간 본래의 라이브리, 비-인간 동물 및 인간으로부터의 면역된 라이브리리, 반-합성 라이브리리 및 합성 라이브리리를 포함하나(문헌[Methods Mol Biol. 2002; 178: 87-100]; [J Immunol Methods. 2004 Jun; 289(1-2): 65-80]; 및 [Expert Opin Biol Ther.

2007 May; 7(5): 763-79]), 이들로 제한되지 않는다. 그러나, 상기 방법들은 이들 예로 특별히 제한되지 않는다.

[0306] 본 발명은 혈장 및 엔도솜에서 항원에 대한 항원 결합 분자의 차별적인 결합 친화성(혈장에서 강한 결합 및 엔도솜에서 약한 결합)에 대해 혈장과 엔도솜 간의 환경적 차이로서 pH의 차이를 이용하였다. 혈장과 엔도솜 간의 환경적 차이가 pH의 차이로 제한되지 않으므로, 항원 상의 항원-결합 분자의 결합에 대한 pH 의존적인 결합 성질은 상기 혈장과 엔도솜 내에서 농도가 상이한 다른 인자들의 사용에 의해 대체될 수 있다. 상기와 같은 인자를 또한, 혈장 내에서 항원에 결합하지만 엔도솜 내에서는 항원을 해리하는 항체를 생성시키는데 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한, 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖고 혈장에서보다는 엔도솜에서 더 낮은 항원-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자를 포함하며, 여기에서 상기 혈장에서의 인간 FcRn-결합 활성을 본래의 인간 IgG의 경우보다 더 강하다.

[0307] 중성 pH 범위에서 본 발명의 항원-결합 분자 중의 인간 FcRn-결합 도메인의 인간 RcRn-결합 활성을 증가시키는 방법은 특별히 제한되지 않으며 임의의 방법에 의해 증가시킬 수 있다. 구체적으로, IgG-유형 면역글로불린의 Fc 도메인을 인간 FcRn-결합 도메인으로서 사용하는 경우, 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 그의 아미노산의 개변에 의해 증가시킬 수 있다. 변경되는 상기와 같은 바람직한 IgG-유형 면역글로불린의 Fc 도메인은 예를 들어 모 인간 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 및 이들의 조작된 변체)의 Fc 도메인을 포함한다. 임의의 부위의 아미노산을, 상기 인간 FcRn-결합 활성이 중성 pH 범위에서 부여되거나 증가되는 한 다른 아미노산으로 개변시킬 수도 있다. 상기 항원-결합 분자가 인간 FcRn-결합 도메인으로서 인간 IgG1 Fc 도메인을 갖는 경우, 상기 분자는 모 인간 IgG1의 경우에 비해 중성 pH 범위에서 인간 FcRn에 대한 결합을 강화하는 개변을 갖는 것이 바람직하다. 상기와 같은 개변이 성취될 수 있는 아미노산은 예를 들어 221 내지 225, 227, 228, 230, 232, 233 내지 241, 243 내지 252, 254 내지 260, 262 내지 272, 274, 276, 278 내지 289, 291 내지 312, 315 내지 320, 324, 325, 327 내지 339, 341, 343, 345, 360, 362, 370, 375 내지 378, 380, 382, 385 내지 387, 389, 396, 414, 416, 423, 424, 426 내지 438, 440, 및 442 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들을 포함한다. 보다 구체적으로, 상기와 같은 아미노산 개변은 예를 들어 표 1에 나열된 것들을 포함한다. 중성 pH 범위에서의 IgG-유형 면역글로불린의 Fc 도메인의 인간 FcRn 결합을 상술한 개변들을 사용함으로써 강화시킬 수 있다.

[0308] 더욱 또한, 모 인간 IgG에 비해 산성 pH 범위에서의 인간 FcRn에 대한 결합을 강화할 수 있는 개변들을 표 2에 예로서 나타낸다. 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn에 대한 결합을 또한 강화할 수 있는 적합한 개변을 상술한 개변들 중에서 선택하는 경우, 이를 본 발명에 적용할 수 있다. 한편, 산성 조건 하에서 인간 FcRn에 대한 Fv4-IgG1의 결합을 강화할 수 있는 개변들의 조합을 표 6-1 및 6-2에 나타낸다. 모 인간 IgG Fc 도메인 중에서 개변되는 특히 바람직한 아미노산은 예를 들어 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들을 포함한다. 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성을, 상술한 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 상이한 아미노산으로 치환시킴으로써 중성 pH 범위에서 증가시킬 수 있다.

[0309] 특히 바람직한 개변은 예를 들어 하기를 포함한다:

[0310] 모 IgG Fc 도메인 중의

[0311] 237 번 위치에서 Gly 대신에 Met의 아미노산 치환;

[0312] 238 번 위치에서 Pro 대신에 Ala의 아미노산 치환;

[0313] 239 번 위치에서 Ser 대신에 Lys의 아미노산 치환;

[0314] 248 번 위치에서 Lys 대신에 Ile의 아미노산 치환;

[0315] 250 번 위치에서 Thr 대신에 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;

[0316] 252 번 위치에서 Met 대신에 Phe, Trp 또는 Tyr의 아미노산 치환;

[0317] 254 번 위치에서 Ser 대신에 Thr의 아미노산 치환;

[0318] 255 번 위치에서 Arg 대신에 Glu의 아미노산 치환;

[0319] 256 번 위치에서 Thr 대신에 Asp, Glu 또는 Gln의 아미노산 치환;

- [0320] 257 번 위치에서 Pro 대신에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, 또는 Val의 아미노산 치환;
- [0321] 258 번 위치에서 Glu 대신에 His의 아미노산 치환;
- [0322] 265 번 위치에서 Asp 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0323] 270 번 위치에서 Asp 대신에 Phe의 아미노산 치환;
- [0324] 286 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 Glu의 아미노산 치환;
- [0325] 289 번 위치에서 Thr 대신에 His의 아미노산 치환;
- [0326] 297 번 위치에서 Asn 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0327] 298 번 위치에서 Ser 대신에 Gly의 아미노산 치환;
- [0328] 303 번 위치에서 Val 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0329] 305 번 위치에서 Val 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0330] 307 번 위치에서 Thr 대신에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0331] 308 번 위치에서 Val 대신에 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, 또는 Thr의 아미노산 치환;
- [0332] 309 번 위치에서 Leu 또는 Val 대신에 Ala, Asp, Glu, Pro, 또는 Arg의 아미노산 치환;
- [0333] 311 번 위치에서 Gln 대신에 Ala, His 또는 Ile의 아미노산 치환;
- [0334] 312 번 위치에서 Asp 대신에 Ala 또는 His의 아미노산 치환;
- [0335] 314 번 위치에서 Leu 대신에 Lys 또는 Arg의 아미노산 치환;
- [0336] 315 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 His의 아미노산 치환;
- [0337] 317 번 위치에서 Lys 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0338] 325 번 위치에서 Asn 대신에 Gly의 아미노산 치환;
- [0339] 332 번 위치에서 Ile 대신에 Val의 아미노산 치환;
- [0340] 334 번 위치에서 Lys 대신에 Leu의 아미노산 치환;
- [0341] 360 번 위치에서 Lys 대신에 His의 아미노산 치환;
- [0342] 376 번 위치에서 Asp 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0343] 380 번 위치에서 Glu 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0344] 382 번 위치에서 Glu 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0345] 384 번 위치에서 Asn 또는 Ser 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0346] 385 번 위치에서 Gly 대신에 Asp 또는 His의 아미노산 치환;
- [0347] 386 번 위치에서 Gln 대신에 Pro의 아미노산 치환;
- [0348] 387 번 위치에서 Pro 대신에 Glu의 아미노산 치환;
- [0349] 389 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 Ser의 아미노산 치환;
- [0350] 424 번 위치에서 Ser 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0351] 428 번 위치에서 Met 대신에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0352] 433 번 위치에서 His 대신에 Lys의 아미노산 치환;
- [0353] 434 번 위치에서 Asn 대신에 Ala, Phe, His, Ser, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환; 및

[0354] 436 번 위치에서 Tyr 대신에 His 또는 Phe의 아미노산 치환(EU 넘버링).

[0355] 한편, 상기 개변되는 아미노산의 수는 특별히 제한되지 않으며; 단지 단일 부위에서만 또는 2 개 이상의 부위에서 아미노산을 개변시킬 수 있다. 2 개 이상의 아미노산 개변의 조합은 예를 들어 표 3에 나타낸 것들을 포함한다. 한편, 모 인간 IgG에 비해 산성 pH 범위에서의 인간 FcRn에 대한 결합을 강화할 수 있는 개변들의 조합을 표 4-1 내지 4-5에 나타낸다. 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn에 대한 결합을 또한 강화할 수 있는 적합한 개변들의 조합을 상술한 개변들 중에서 선택하는 경우, 이를 본 발명에 적용할 수 있다. 더욱 또한, 중성 조건 하에서 인간 FcRn에 대한 Fv4-IgG1의 결합을 강화할 수 있는 개변들의 조합을 표 6-1 및 6-2에 나타낸다.

[0356] 표에서 기호 "^"는 EU 넘버링에서 지시된 번호 뒤의 아미노산 삽입을 나타낸다. 예를 들어 ^281S는 S가 EU 넘버링에서 281 번 위치와 282 번 위치 사이에 삽입됨을 의미한다.

[0357] [표 1]

위치	아미노산 개변
256	P
280	K
339	T
385	H
428	L
434	W, Y, F, A, H

[0358]

[0359]

[표 2]

위 치	아미노산 개별
221	Y, K
222	Y
223	E, K
224	Y, E
225	E, K, W
227	K, E, G
228	Y, K, G
230	E, G
232	K
233	R, S, M, T, W, Y, G
234	H, R, E, I, V, F, D, Y, G
235	Y, V, N, S, T, Q, D
236	I, V, K, P, E, Q, H, W, Y, D, T, M, A, F, S, N, R
237	I, W, S, T, E, R, N, Q, K, H, D, P, L, M
238	A, L, D, S, T, H, W, V, I, G, M, F, E, K
239	M, R, T, G, V, E, D, L, A
240	I, M, T
241	E, W, L
243	E, W
244	L
245	R
246	Y, H
247	D
248	Y
249	P, Q, Y, H
250	I, E, Q
251	T, D
252	Y, W, Q
254	H
255	E, Y, H
256	A
257	A, I, M, N, S, V, T, L, Y, C
258	D, Y, H, A
259	I, F, N
260	S, D, E, H, Y
262	L, E
263	I
264	F, A, I, T, N, S, D
265	R, P, G, A
266	I
267	K, E, A
268	E, M
269	M, W, K, P, I, S, G, V, F, Y, A
270	K, S, I, A
271	A, V, S, Y, I, T
272	A, L, R, I, D, H, V, W, Y, P, T
274	M, F, G, E, I, T, N
276	D, F, H, R, I, V, W, A
278	R, S, V, M, N, I, L, D
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y, C, I
281	D, Y
282	G, K, E, Y
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y
284	T, L, Q, E
285	N, Y, W, Q, K, E, D, Y
286	F, L, Y, E, P, D, K, A
287	S, H
288	N, P, Y, H, D, I, V, C, E, G, L, Q, R
289	H
291	Q, H
292	Y, E, D
293	V
294	I, K, G
295	V, T
296	E, I, L
298	F, E, T, H

위 치	아미노산 개별
299	W, F, H, Y
300	K, A, G, V, M, Q, N, E
301	E
302	I
303	Y, E, A
304	N, T
305	A, H
306	Y
307	A, E, M, G, Q, H
308	A, R, F, C, Y, W, N, H
311	A, I, K, L, M, V, W, T, H
312	A, P, H
315	T, H
316	K
317	A, P, H
318	N, T, R, L, Y
319	L, I, W, H, M, V, A
320	L, W, H, N
324	T, D
325	F, M, D
326	A
327	D, K, M, Y, H, L
328	G, A, W, R, F
329	K, R, W
330	G, W, V, P, H, F
331	L, F, Y
332	F, H, K, L, M, R, S, W, T, Q, E, Y, D, N, V
333	L, F, M, A
334	A
335	H, F, N, V, M, W, I, S, P, L
336	E, K
337	A
338	A
339	N, W
341	P
343	E, H, K, Q, R, T, Y
360	H, A
362	A
375	R
376	A, G, I, M, P, T, V
377	K
378	Q, D, N, W
380	A, N, S, T, Q, R, H
382	A, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
385	N, E
386	H
387	H, Q
414	A
423	N
424	A
426	H, L, V, R
427	N
428	F
429	Q
430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
431	H, K
432	H
433	P
434	G, T, M, S,
435	K
436	I, L, T
437	H
438	K, L, T, W
440	K
442	K

[0360]

[0361]

[표 3]

아미노산 개변의 조합
M252Y/S254T/T256E
M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H
H433K/N434F/Y436H
T307A/E380A
T307A/E380A/N434H
T307A/E380A/N434A
N434H/N315H
N434H/T289H
N434H/T370A/E380A
T250Q/M428L
T250Q/N434A
M252W/N434A
M252Y/N434A
T256A/N434A
T256D/N434A
T256E/N434A
T256S/N434A
P257I/Q311I
T307A/N434A
T307E/N434A
T307Q/N434A
V308P/N434A
L309G/N434A
Q311H/N434A
Q311R/N434A
N315D/N434A
A378V/N434A
E380S/N434A
E382V/N434A
S424E/N434A
M428L/N434A
N434A/Y436I
T437Q/N434A
T437R/N434A

[0362]

[0363]

[표 4-1]

아미노산 개변의 조합	
L234I/L235D	
G236A/V308F/I332E	
G236R/L328R	
G236A/I332E/N434S	
S239E/V264I/A330Y/I332E	
S239E/V264I/I332E	
S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E	
S239D/D265H/N297D/I332E	
S239D/E272Y/I332E	
S239D/E272S/I332E	
S239D/E272I/I332E	
S239D/N297D/I332E	
S239D/K326T/I332E	
S239Q/I332Q	
S239Q/I332N	
S239D/I332D	
S239D/I332E	
S239Q/I332F	
S239E/I332E	
F241W/F243W	
F241Y/F243Y/V262T/V264T	
F241W/F243W/V262A/V264A	
F241L/V262I	
F243L/V262I/V264W	
F243L/K288D/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K	
F243L/K288D/R292P/Y300L/H435K	
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K	
P245G/V308F	
T250I/V259I/V308F	
T250I/V308F	
T250I/V308F/N434S	
T250Q/V308F/M428L	
T250Q/M428L	
L251I/N434S	
L251N/N434S	
L251F/N434S	
L251V/N434S	
L251M/N434S	
T252L/T254S/T256F	
M252Y/S254T/T256E/N434M	
M252Y/S254T/T256E/M428L/N434S	
M252Y/S254T/T256E	
M252Y/S254T/T256E/V308F	
M252Y/S254T/T256E/N434S	
M252Y/S254T/T256E/N434A	
M252Y/S254T/T256E/M428L	
M252Y/S254T/T256E/T307Q	
M252F/T256D	
M252Y/T256Q	
M252Y/P257L	
M252Y/P257N	
M252Y/V259I	
M252Y/V279Q	
M252Y/V308P/N434Y	
M252Q/V308F	
M252Y/V308F	

[0364]

표 4-2는 표 4-1의 계속이다.

[0365]

[0366]

[표 4-2]

M252Q/V308F/N434S
M252Y/V308F/M428L
M252Y/V308F/N434M
M252Y/V308F/N434S
M252Y/Y319I
M252Q/M428L/N434S
M252Y/M428L
M252Y/N434M
M252Y/N434S
M252Y/N434A
M252Y/N434Y
S254T/V308F
R255H/N434A
R255Q/N434S
R255H/N434S
T256V/V308F
T256P/Q311I
T256P/I332E
T256P/I332E/S440Y
T256P/E430Q
T256P/N434H
T256E/N434Y
T256P/S440Y
P257Y/V279Q
P257L/V279E
P257N/V279Q
P257N/V279E
P257N/V279Y
P257L/V279Q
P257N/281S
P257L/281S
P257N/V284E
P257N/L306Y
P257L/V308Y
P257L/V308F
P257N/V308Y
P257I/Q311I/N434H
P257L/Q311V
P257L/G385N
P257L/M428L
P257I/E430Q
P257I/N434H
P257L/N434Y
E258H/N434A
E258H/N434H
V259I/T307Q/V308F
V259I/V308F
V259I/V308F/Y319L
V259I/V308F/Y319I
V259A/V308F
V259I/V308F/N434M
V259I/V308F/N434S
V259I/V308F/M428L/N434S
V259I/V308F/M428L
V259I/Y319I
V259I/Y319I/N434S
V259I/M428L
V259I/M428L/N434S
V259I/N434S

[0367]

표 4-3은 표 4-2의 계속이다.

[0368]

[표 4-3]

V259I/N434Y
V264I/A330L/I332E
V264I/I332E
D265F/N297E/I332E
S267L/A327S
E272R/V279L
V279E/V284E
V279Q/L306Y
V279Y/V308F
V279Q/V308F
V279Q/G385H
^281S/V308Y
^281S/V308F
^281S/N434Y
E283F/V284E
V284E/V308F
V284E/G385H
K288A/N434A
K288D/H435K
K288V/H435D
T289H/N434A
T289H/N434H
L306I/V308F
T307P/V308F
T307Q/V308F/N434S
T307Q/V308F/Y319L
T307S/V308F
T307Q/V308F
T307A/E310A/N434A
T307Q/E380A/N434A
T307Q/M428L
T307Q/N434M
T307I/N434S
T307V/N434S
T307Q/N434S
T307Q/N434Y
V308T/L309P/Q311S
V308F/L309Y
V308F/Q311V
V308F/Y319F
V308F/Y319I/N434M
V308F/Y319I
V308F/Y319L
V308F/Y319I/M428L
V308F/Y319I/M428L/N434S
V308F/Y319L/N434S
V308F/I332E
V308F/G385H
V308F/M428L/N434M
V308F/M428L
V308F/M428L/N434S
V308P/N434Y
V308F/N434M
V308F/N434S
V308F/N434Y
Q311G/N434S
Q311D/N434S
Q311E/N434S
Q311N/N434S

[0370]

표 4-4는 표 4-3의 계속이다.

[0371]

[표 4-4]

Q311Y/N434S
Q311F/N434S
Q311W/N434S
Q311A/N434S
Q311K/N434S
Q311T/N434S
Q311R/N434S
Q311L/N434S
Q311M/N434S
Q311V/N434S
Q311I/N434S
Q311A/N434Y
D312H/N434A
D312H/N434H
L314Q/N434S
L314V/N434S
L314M/N434S
L314F/N434S
L314I/N434S
N315H/N434A
N315H/N434H
Y319I/V308F
Y319I/M428L
Y319I/M428L/N434S
Y319I/N434M
Y319I/N434S
L328H/I332E
L328N/I332E
L328E/I332E
L328I/I332E
L328Q/I332E
L328D/I332E
L328R/M428L/N434S
A330L/I332E
A330Y/I332E
I332E/D376V
I332E/N434S
P343R/E345D
D376V/E430Q
D376V/E430R
D376V/N434H
E380A/N434A
G385R/Q386T/P387R/N389P
G385D/Q386P/N389S
N414F/Y416H
M428L/N434M
M428L/N434S
M428L/N434A
M428L/N434Y
H429N/N434S
E430D/N434S
E430T/N434S
E430S/N434S
E430A/N434S
E430F/N434S
E430Q/N434S
E430L/N434S
E430I/N434S
A431T/N434S

[0373]

표 4-5는 표 4-4의 계속이다.

[0374]

[0375]

[표 4-5]

A431S/N434S
A431G/N434S
A431V/N434S
A431N/N434S
A431F/N434S
A431H/N434S
L432F/N434S
L432N/N434S
L432Q/N434S
L432H/N434S
L432G/N434S
L432I/N434S
L432V/N434S
L432A/N434S
H433K/N434F
H433L/N434S
H433M/N434S
H433A/N434S
H433V/N434S
H433K/N434S
H433S/N434S
H433P/N434S
N434S/M428L
N434S/Y436D
N434S/Y436Q
N434S/Y436M
N434S/Y436G
N434S/Y436E
N434S/Y436F
N434S/Y436T
N434S/Y436R
N434S/Y436S
N434S/Y436H
N434S/Y436K
N434S/Y436L
N434S/Y436V
N434S/Y436W
N434S/Y436I
N434S/T437I

[0376]

[0377]

상기와 같은 아미노산 개변을 공지된 방법을 사용하여 적합하게 도입시킬 수 있다. 예를 들어, 본래의 인간 IgG1의 Fc 도메인의 변경은 문헌[Drug Metab Dispos. 2007 Jan. 35(1): 86-94]; [Int Immunol. 2006 Dec. 18, (12): 1759-69]; [J Biol Chem. 2001 Mar. 2, 276(9): 6591-604]; [J Biol Chem. (2007) 282(3): 1709-17]; [J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80]; [J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71]; [Molecular Cell, Vol. 7, 867-877, April, 2001; Nat Biotechnol. 1997 Jul. 15, (7): 637-40]; [Nat Biotechnol. 2005 Oct. 23, (10): 1283-8]; [Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec. 5, 103(49): 18709-14]; EP 2154157; US 20070141052; WO 2000/042072; WO 2002/060919; WO 2006/020114; WO 2006/031370; WO 2010/033279; WO 2006/053301; 및 WO 2009/086320에 개시되어 있다.

[0378]

문헌[Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671]에 따라, 산성 pH 범위(pH 6.0)에서의 본래의 인간 IgG1의 인간 FcRn-결합 활성은 KD 1.7 마이크로몰(microM)인 반면, 중성 pH 범위에서 상기 활성은 거의 검출할 수 없다. 따라서, 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 방법에 사용되는 항원-결합 분자는 산성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성이 KD 20 마이크로몰 이상이고 본래의 인간 IgG의 경우보다 중성 pH 범위에서 더 강하거나 동일한 항원-결합 분자를 포함한다. 보다 바람직한 실시태양에서, 상기 항원-결합 분자는 인간 FcRn-결합 활성이 산성 pH 범위에서 KD 2.0 마이크로몰 이상이고 중성 pH 범위에서 KD 40 마이크로몰 이상인 항원-결합 분자를 포함한다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 상기 항원-결합 분자는 인간 FcRn-결합 활성이 산성 pH 범위에서 KD 0.5 마이크로몰 이상이고 중성 pH 범위에서 KD 15 마이크로몰 이상인 항원-결합 분자를 포함한다. 상기 KD 값을 문헌[the Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671]에 개시된 방법에 의해 측정한다(칩 상에 항원-결합 분자를 고정화하고 분석물로서 인간 FcRn을 로딩함으로써).

[0379]

해리 상수(KD)를 인간 FcRn-결합 활성의 값으로서 사용할 수 있다. 그러나, 본래의 인간 IgG의 인간 FcRn-결합 활성은 중성 pH 범위(pH 7.4)에서 인간 FcRn-결합 활성을 거의 갖지 않으며 따라서 KD로서 상기 활성을 계산하기 어렵다. 인간 FcRn-결합 활성이 pH 7.4에서 본래의 인간 IgG의 경우보다 더 큰지의 여부를 평가하는 방법은

동일한 농도로 분석물을 로딩한 후 비아코어 반응의 강도를 비교함에 의한 평가 방법을 포함한다. 구체적으로, pH 7.4에서 항원-결합 분자가 고정화된 인간 FcRn 침의 로딩 후 반응이 pH 7.4에서 본래의 인간 IgG가 고정화된 침 상에 인간 FcRn 로딩 후의 반응보다 더 강한 경우, 상기 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성은 pH 7.4에서 본래의 인간 IgG의 경우보다 더 큰 것으로 판단된다.

[0380] pH 7.0을 또한 중성 pH 범위로서 사용할 수 있다. 중성 pH로서 pH 7.0의 사용은 인간 FcRn과 FcRn-결합 도메인의 약한 상호작용을 촉진할 수 있다. 상기 분석 조건에 사용된 온도로서, 10 내지 50 °C 중 임의의 온도에서 결합 친화성을 평가할 수 있다. 바람직하게는 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해서 15 내지 40 °C의 온도를 사용한다. 보다 바람직하게는, 20 내지 35 °C 중 임의의 온도, 예를 들어 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 및 35 °C 중 어느 하나의 온도를 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해서 또한 사용한다. 실시예 5에 개시된 25 °C의 온도가 본 발명의 실시태양에 대한 일례이다. 바람직한 실시태양에서, 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 상호작용을 실시예 5에 개시된 바와 같이 pH 7.0 및 25 °C에서 측정할 수 있다. 인간 FcRn에 대한 항원-결합 분자의 결합 친화성을 실시예 5에 개시된 바와 같이 비아코어에 의해 측정할 수 있다.

[0381] 보다 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 pH 7.0 및 25 °C에서 인간 FcRn-결합 활성을 가지며, 이는 본래의 인간 IgG보다 더 강하다. 보다 바람직한 실시태양에서, pH 7.0 및 25 °C에서 인간 FcRn-결합 활성은 본래의 인간 IgG보다 28 배 더 강하거나 또는 KD 3.2 마이크로 몰보다 더 강하다. 보다 바람직한 실시태양에서, pH 7.0 및 25 °C에서 인간 FcRn-결합 활성은 본래의 인간 IgG보다 38 배 더 강하거나 또는 KD 2.3 마이크로 몰보다 더 강하다.

[0382] 본래의 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 바람직하게는 인간 FcRn 결합 활성 또는 생체 내 활성에 대해, 비교용의 본래의 인간 IgG를 상기 항원-결합 분자와 비교하기 위해서 상기 본래의 인간 IgG로서 사용한다. 바람직하게는, 관심의 항원-결합 분자와 동일한 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인으로서 본래의 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 대조 항원-결합 분자가 적합하게 사용될 수 있다. 보다 바람직하게는, 본래의 인간 IgG1을 그의 인간 FcRn 결합 활성 또는 생체 내 활성에 대해, 비교용의 본래의 인간 IgG와 상기 항원-결합 분자를 비교할 목적으로 사용한다.

[0383] 보다 구체적으로, 본 발명에 개시된 혈장 중 항원을 제거하기 위한 활성에 대해 장기적인 효과를 갖는 항원-결합 분자는 pH 7.0 및 25 °C에서 본래의 인간 IgG1보다 28 배 내지 440 배 더 강한 범위 이내의 인간 FcRn-결합 활성 또는 3.0 마이크로 몰 내지 0.2 마이크로 몰 범위 이내의 KD를 갖는다. 장기적인 혈장 항원 농도를, 혈장 중 항원 제거 활성에 대한 본 발명의 항원-결합 분자의 장기적인 효과의 평가를 위해 상기 항원-결합 분자 투여 후 2, 4, 7, 14, 28, 56 또는 84일째에 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도 및 항원/항원-결합 분자 몰 비를 측정함으로써 측정할 수 있다. 상기 혈장 항원 농도 또는 항원/항원-결합 분자 몰 비의 감소가 본 발명에 개시된 항원-결합 분자에 의해 성취되는 지의 여부를 상술한 시점들 중 임의의 하나 이상의 시점에서 상기 감소의 평가에 의해 결정할 수 있다.

[0384] 훨씬 더 구체적으로, 본 발명에 개시된 혈장 중 항원 제거 활성에 대해 단기 효과를 갖는 항원-결합 분자는 pH 7.0 및 25 °C에서 본래의 인간 IgG보다 440 배 더 강한 인간 FcRn-결합 활성 또는 0.2 마이크로 몰보다 강한 KD를 갖는다. 단기 혈장 항원 농도를, 혈장 중 항원 제거 활성에 대한 본 발명의 항원-결합 분자의 단기 효과를 평가하기 위해 항원-결합 분자 투여 후 15 분, 1, 2, 4, 8, 12 또는 24 시간째에 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도 및 항원/항원-결합 분자 몰 비를 측정함으로써 측정한다.

[0385] 본 발명의 방법들을 표적 항원 유형에 관계없이 임의의 항원-결합 분자들에 적용할 수 있다.

[0386] 본 발명의 방법에서 항원-결합 분자, 예를 들어 관심 항체에 의해 인식되는 항원은 특별히 제한되지 않는다. 상기와 같은 관심 항체는 임의의 항원을 인식할 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 개선되는 약동학을 갖는 항체는 예를 들어 수용체 단백질(막-결합된 수용체 및 가용성 수용체), 세포 표면 마커와 같은 막 항원을 인식하는 항체, 및 사이토kin과 같은 가용성 항원을 인식하는 항체를 포함한다. 본 발명의 방법에 의해 개선된 약동학을 갖는 항체에 의해 인식되는 항원의 구체적인 예는 예를 들어 하기를 포함한다: 17-IA, 4-1 BB, 4Dc, 6-케토-PGF1a, 8-아이소-PGF2a, 8-옥소-dG, A1 아데노신 수용체, A33, ACE, ACE-2, 액티빈(Activin), 액티빈 A, 액티빈 AB, 액티빈 B, 액티빈 C, 액티빈 RIA, 액티빈 RIA ALK-2, 액티빈 RIB ALK-4, 액티빈 RIIA, 액티빈 RIIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, 아드레신(Addressin), 아디포넥틴, ADP 리보실 사이클라제-1, aFGF, AGE, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, 알레르겐, 알파-1-안티케모트립신, 알파-1-안티트립신, 알파-시누클레인, 알파-V/베타-1 길항물질, 아미닌, 아밀린, 아밀로이드 베

타, 아밀로이드 면역글로불린 중쇄 가변 영역, 아밀로이드 면역글로불린 경쇄 가변 영역, 안드로젠, ANG, 안지오텐시노젠, 안지오포이에틴 리간드-2, 안티-Id, 안티트롬빈III, 안트락스(Anthrax), APAF-1, APE, APJ, 아포A1, 아포 혈청 아밀로이드 A, 아포-SAA, APP, APRIL, AR, ARC, ART, 알테민(Artemin), ASPARTIC, 심방 나트륨 이뇨 인자, 심방 나트륨 이뇨 펩타이드, 심방 나트륨 이뇨 펩타이드 A, 심방 나트륨 이뇨 펩타이드 B, 심방 나트륨 이뇨 펩타이드 C, av/b3 인테그린, Ax1, B7-1, B7-2, B7-H, BACE, BACE-1, 탄저균 보호 항원, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bc1, BCMA, BDNF, b-ECGF, 베타-2-마이크로글로불린, 베타락타마제, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, B-림프구 자극제 (BIyS), BMP, BMP-2 (BMP-2a), BMP-3 (오스테오제닌(Osteogenin)), BMP-4 (BMP-2b), BMP-5, BMP-6 (Vgr-1), BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BMPR-II (BRK-3), BMPs, BOK, 봄베신(Bombesin), 뼈-유래 신경영양인자, 소 성장 호르몬, BPDE, BPDE-DNA, BRK-2, BTC, B-림프구 부착 분자, C10, C1-억제제, C1q, C3, C3a, C4, C5, C5a(보체5a), CA125, CAD-8, 카데린(Cadherin)-3, 칼시토닌(Calcitonin), cAMP, 카보닉 안하이드라제-IX, 암태아성 항원(CEA), 암종-관련 항원, 카디오토로핀(Cardiotrophin)-1, 카텝신(Cathepsin) A, 카텝신 B, 카텝신 C/DPPI, 카텝신 D, 카텝신 E, 카텝신 H, 카텝신 L, 카텝신 O, 카텝신 S, 카텝신 V, 카텝신 X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1/I-309, CCL11/에오틱신(Eotaxin), CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL16/HCC-4, CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL19/ELC, CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3-알파, CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MPIF-1, CCL24/에오틱신-2, CCL25/TECK, CCL26/에오틱신-3, CCL27/CTACK, CCL28/MEC, CCL3/M1P-1-알파, CCL3L1/LD-78-베타, CCL4/MIP-1-베타, CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/10/MTP-1-감마, CCR, CCR1, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD10, CD105, CD11a, CD11b, CD11c, CD123, CD13, CD137, CD138, CD14, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD15, CD152, CD16, CD164, CD18, CD19, CD2, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD26, CD27L, CD28, CD29, CD3, CD30, CD30L, CD32, CD33 (p67 단백질), CD34, CD37, CD38, CD3E, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD49b, CD5, CD51, CD52, CD54, CD55, CD56, CD6, CD61, CD64, CD66e, CD7, CD70, CD74, CD8, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD105, CD158a, CEA, CEACAM5, CFTR, cGMP, CGRP 수용체, CINC, CKb8-1, 클라우딘(Claudin)18, CLC, 클로스트리듐 보툴리눔 독소, 클로스트리듐 디피실 독소, 클로스트리듐 페르프린젠스 독소, c-Met, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, 보체 인자 3 (C3), 보체 인자 D, 코르티코스테로이드-결합 글로불린, 콜로니 자극 인자-1 수용체, COX, C-Ret, CRG-2, CRTH2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1/프락탈킨(Fractalkine), CX3CR1, CXCL, CXCL1/Gro-알파, CXCL10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1-알파/베타, CXCL13/BCA-1, CXCL14/BRAK, CXCL15/렁킨(Lungkine). CXCL16, CXCL16, CXCL2/Gro-베타 CXCL3/Gro-감마, CXCL3, CXCL4/PF4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8, CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, 시스타틴 C, 사이토케라틴 종양-관련 항원, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, 부페 촉진 인자, 멜타-유형 단백질 리간드 4, des(1-3)-IGF-1 (뇌 IGF-1), Dhh, DHICA 옥시다제, Dickkopf-1, 디곡신, 다이펩티딜 펩티다제 IV, DK1, DNAM-1, Dnase, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EGF 유형 도메인 함유 단백질 7, 엘라스타제(Elastase), 엘라스틴, EMA, EMMPRIN, ENA, ENA-78, 엔도시알린(Endosialin), 엔도텔린 수용체, 내독소, 엔케팔리나제(Enkephalinase), eNOS, Eot, 에오틱신, 에오틱신-2, 에오틱신-3, EpCAM, 에프린(Ephrin) B2/EphB4, EphA2 티로신 키나제 수용체, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), ErbB2 수용체, ErbB3 티로신 키나제 수용체, ERCC, 에리쓰로포이에틴(EPO), 에리쓰로포이에틴 수용체, E-셀렉틴, ET-1, 엑소두스(Exodus)-2, RSV의 F 단백질, F10, F11, F12, F13, F5, F9, 인자 Ia, 인자 IX, 인자 Xa, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 VIIc, Fas, Fc알파R, Fc엡실론RI, Fc감마IIb, Fc감마RI, Fc감마RIIa, Fc감마RIIIa, Fc감마RIIIb, FcRn, FEN-1, 페리틴(Ferritin), FGF, FGF-19, FGF-2, FGF-2 수용체, FGF-3, FGF-8, FGF-산성, FGF-염기성, FGFR, FGFR-3, 피브린, 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), 섬유아세포 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자-10, 피브로넥틴, FL, FLIP, F1t-3, FLT3 리간드, 플레이트 수용체, 여포 자극 호르몬(FSH), 프락탈킨(CX3C), 유리 중쇄, 유리 경쇄, FZD1, FZD10, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, G-CSF, G-CSF 수용체, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-15 (MIC-1), GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14/CDMP-1), GDF-6 (BMP-13/CDMP-2), GDF-7 (BMP-12/CDMP-3), GDF-8 (미오스타틴), GDF-9, GDNF, 젤솔린(Gelsolin), GFAP, GF-CSF, GFR-알파1, GFR-알파2, GFR-알파3, GF-베타1, gH 외막 당단백질, GITR, 글루카곤, 글루카곤 수용체, 글루카곤-유형 펩타이드 1 수용체, 글럿(Glut) 4, 글루타메이트 카복시펩티다제 II, 당단백질 호르몬 수용체, 당단백질 IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), 글리피칸(Glypican)-3, GM-CSF, GM-CSF 수용체, gp130, gp140, gp72, 과립구-CSF (G-CSF), GRO/MGSA, 성장 호르몬 방출 인자, GRO-베타, GRO-감마, 에이치 파일로리, 합텐(NP-cap 또는 NIP-cap), HB-EGF, HCC, HCC 1, HCMV gB 외막 당단백질, HCMV UL, 조혈 성장 인자(HGF), Hep B gp120, 헤파라나제, 헤파린 보조인자 II, 간 성장 인자, 탄저균 보호 항원, C형 간염 바이러스 E2 당단백질, E형 간염, 헤프시딘(Hepcidin), Her1, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), 헤르페스 단순 바이러스 (HSV) gB 당단

백질, HGF, HGFA, 고 분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), HIV 외막 단백질, 예를 들어 GP120, HIV MIB gp 120 V3 고리, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HMGB-1, HRG, Hrk, HSP47, Hsp90, HSV gd 당단백질, 인간 심장 미오신, 인간 거대세포바이러스(HCMV), 인간 성장 호르몬(hGH), 인간 혈청 알부민, 인간 조직-유형 플라스미노겐 활성제(t-PA), 헌팅틴(Huntingtin), HVEM, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFN-알파, IFN-베타, IFN-감마, IgA, IgA 수용체, IgE, IGF, IGF 결합 단백질, IGF-1, IGF-1 R, IGF-2, IGFBP, IGFR, IL, IL-1, IL-10, IL-10 수용체, IL-11, IL-11 수용체, IL-12, IL-12 수용체, IL-13, IL-13 수용체, IL-15, IL-15 수용체, IL-16, IL-16 수용체, IL-17, IL-17 수용체, IL-18 (IGIF), IL-18 수용체, IL-1알파, IL-1베타, IL-1 수용체, IL-2, IL-2 수용체, IL-20, IL-20 수용체, IL-21, IL-21 수용체, IL-23, IL-23 수용체, IL-2 수용체, IL-3, IL-3 수용체, IL-31, IL-31 수용체, IL-3 수용체, IL-4, IL-4 수용체 IL-5, IL-5 수용체, IL-6, IL-6 수용체, IL-7, IL-7 수용체, IL-8, IL-8 수용체, IL-9, IL-9 수용체, 면역글로불린 면역 복합체, 면역글로불린, INF-알파, INF-알파 수용체, INF-베타, INF-베타 수용체, INF-감마, INF-감마 수용체, IFN 유형-I, IFN 유형-I 수용체, 인플루엔자, 인하빈, 인하빈 알파, 인하빈 베타, iNOS, 인슐린, 인슐린 A-쇄, 인슐린 B-쇄, 인슐린-유형 성장 인자 1, 인슐린-유형 성장 인자 2, 인슐린-유형 성장 인자 결합 단백질, 인테그린, 인테그린 알파2, 인테그린 알파3, 인테그린 알파4, 인테그린 알파4/베타1, 인테그린 알파-V/베타-3, 인테그린 알파-V/베타-6, 인테그린 알파4/베타7, 인테그린 알파5/베타1, 인테그린 알파5/베타3, 인테그린 알파5/베타6, 인테그린 알파-엘타 (알파V), 인테그린 알파-제타, 인테그린 베타1, 인테그린 베타2, 인테그린 베타3(GPIIb-IIIa), IP-10, I-TAC, JE, 칼리클레인, 칼리크레인(Kallikrein) 11, 칼리크레인 12, 칼리크레인 14, 칼리크레인 15, 칼리크레인 2, 칼리크레인 5, 칼리크레인 6, 칼리크레인 L1, 칼리크레인 L2, 칼리크레인 L3, 칼리크레인 L4, 칼리스타틴, KC, KDR, 각질세포 성장 인자 (KGF), 각질세포 성장 인자-2 (KGF-2), KGF, 퀼러 면역글로불린-유형 수용체, 키트 리간드 (KL), 키트 타이로신 키나제, 라미닌 5, LAMP, LAPP (아밀린, 섬-아밀로이드 폴리펩타이드), LAP (TGF- 1), 잠복 관련된 펩타이드, 잠복성 TGF-1, 잠복성 TGF-1 bp1, LBP, LDGF, LDL, LDL 수용체, LECT2, 레프티(Lefty), 렙틴(Leptin), 황체 호르몬 (LH), 루이스-Y 항원, 루이스-Y 관련 항원, LFA-1, LFA-3, LFA-3 수용체, Lfo, LIF, LIGHT, 지단백질, LIX, LKN, Lptn, L-셀렉틴, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, 폐 계면활성제, 황체 호르몬, 림포탁틴(Lymphotactin), 림포톡신(Lymphtoxin) 베타 수용체, 리소스핑고리피드(Lysosphingolipid) 수용체, Mac-1, 대식세포-CSF (M-CSF), MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, 매스핀, MCAM, MCK-2, MCP, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-1 (MCAF), M-CSF, MDC, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), 메그신, Mer, MET 타이로신 키나제 수용체 패밀리, METALLOPROTEASES, 막 당단백질 OX2, 메소텔린(Mesothelin), MGDF 수용체, MGMT, MHC (HLA-DR), 미생물 단백질, MIF, MIG, MIP, MIP-1 알파, MIP-1 베타, MIP-3 알파, MIP-3 베타, MIP-4, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, 단핵구 유인 단백질, 단핵구 콜로니 억제 인자, 마우스 성선자극호르몬 관련 펩타이드, MPIF, Mpo, MSK, MSP, MUC-16, MUC18, 뮤신 (Mud), 물러리안-억제 물질, Mug, MuSK, 마이엘린 관련 당단백질, 골수양 선조세포 억제 인자-1 (MPIF-I), NAIP, 나노바디(Nanobody), NAP, NAP-2, NCA 90, NCAD, N-카데린, NCAM, 네프릴리신(Neprilysin), 신경세포 부착 분자, 네로서핀, 신경세포 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 뉴로트로핀-6, 뉴로필린 1, 뉴르튜린(Neurturin), NGF-베타, NGFR, NKG20, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, nNOS, NO, 노고(Nogo)-A, 노고 수용체, C형 간염 바이러스로부터의 비-구조 단백질 유형 3 (NS3), NOS, Npr, NRG-3, NT, NT-3, NT-4, NTN, OB, OGG1, 온코스타틴(Oncostatin) M, OP-2, OPG, OPN, OSM, OSM 수용체, 골유도 인자, 오스테오폰틴, OX40L, OX40R, 산화된 LDL, p150, p95, PADPr, 부갑상선 호르몬, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherin, PCNA, PCSK9, PDGF, PDGF 수용체, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-D, PDK-1, PECAM, PEDF, PEM, PF-4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIGF, PIN, PLA2, 태반 성장 인자, 태반 알칼리성 포스파타제 (PLAP), 태반 락토젠, 플라스미노겐 활성제 억제제-1, 혈소판-성장 인자, pIgR, PLP, 상이한 크기의 폴리 글리콜 쇄(예를 들어 PEG-20, PEG-30, PEG40), PP14, 칼리크레인 전구물질, 프리온 단백질, 프로칼시토닌, 프로그램화된 세포사 단백질 1, 프로인슐린, 프로락틴, 전구단백질 컨버타제 PC9, 프로릴렉신, 전립선 특이성 막 항원 (PSMA), 단백질 A, 단백질 C, 단백질 D, 단백질 S, 단백질 Z, PS, PSA, PSCA, PsmAr, PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, P-셀렉틴 당단백질 리간드-1, R51, RAGE, RANK, RANKL, RANTES, 릴렉신, 릴렉신 A-쇄, 릴렉신 B-쇄, 레닌, 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV) F, Ret, 레티큘론 4, 류마티스양 인자, RLI P76, RPA2, RPK-1, RSK, RSV Fgp, S100, RON-8, SCF/KL, SCGF, 스클레로스틴(Sclerostin), SDF-1, SDF1 알파, SDF1 베타, SERINE, 혈청 아밀로이드 P, 혈청 알부민, sFRP-3, Shh, 쉬가형 독소 II, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, 스팅고신 1-포스페이트 수용체 1, 스타필로코커스 리포테이코산(Staphylococcal lipoteichoic acid), Stat, STEAP, STEAP-II, 줄기 세포 인자 (SCF), 스트렙토카니제, 과산화물 디스뮤타제, 신데칸-1, TACE, TACI, TAG-72 (종양-관련 당단백질-72), TARC, TB, TCA-3, T-세포 수용체 알파/베타, TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, 테나신, TERT, 고환 PLAP-유형 알칼리성 포스파타제, TfR, TGF, TGF-알파, TGF-베타 웬 특이성, TGF-베타 RII, TGF-베타 RIb,

TGF-베타 RIII, TGF-베타 R1 (ALK-5), TGF-베타1, TGF-베타2, TGF-베타3, TGF-베타4, TGF-베타5, TGF-I, 트롬빈, 트롬보포이에틴 (TPO), 흥선 간질 램포단백질 수용체, 흥선 Ck-1, 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 티록신, 티록신-결합 글로불린, Tie, TIMP, TIQ, 조직 인자, 조직 인자 프로테아제 억제제, 조직 인자 단백질, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF 수용체 I, TNF 수용체 II, TNF-알파, TNF-베타, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2/DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5/KILLER/TRICK-2A/TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1/LIT/TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2/TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R/TRANSE R), TNFRSF11B (OPG OCIF/TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF12A, TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR/HveA/LIGHT R/TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ/TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF R1 CD120a/p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b/p75-80), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRSF25 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68/TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1 BB CD137/ILA), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFSF10 (TRAIL Apo-2 리간드/TL2), TNFSF11 (TRANSE/RANK 리간드 ODF/OPG 리간드), TNFSF12 (TWEAK Apo-3 리간드/DR3 리간드), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20), TNFSF14 (LIGHT HVEM 리간드/LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (GITR 리간드 AITR 리간드/TL6), TNFSF1A (TNF-a 코넥틴(Connexin)/DIF/TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa/TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC/p33), TNFSF4 (OX40 리간드 gp34/TXGP1), TNFSF5 (CD40 리간드 CD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP), TNFSF6 (Fas 리간드 Apo-1 리간드/APT1 리간드), TNFSF7 (CD27 리간드 CD70), TNFSF8 (CD30 리간드 CD153), TNFSF9 (4-1 BB 리간드 CD137 리간드), TNF-알파, TNF-베타, TNIL-I, 독성 대사산물, TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANSE, 트랜스페린 수용체, 형질전환 성장 인자 (TGF), 예를 들어 TGF-알파 및 TGF-베타, 막관통 당단백질 NMB, 트랜스티레틴(Transthyretin), TRF, Trk, TROP-2, 영양세포총 당단백질, TSG, TSLP, 종양 괴사 인자 (TNF), 종양-관련 항원 CA 125, 루이스 Y 관련 탄수화물을 발현시키는 종양-관련 항원, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, 유로키나제, VAP-1, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 바스핀, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-카데린, VE-카데린-2, VEFGR-1 (f1t-1), VEFGR-2, VEGF 수용체 (VEGFR), VEGFR-3 (f1t-4), VEGI, VIM, 바이러스 항원, VitB12 수용체, 비트로넥틴 수용체, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR 인테그린, 폰 빌레브란트 인자 (vWF), WIF-1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, XCL1, XCL2/SCM-1-베타, XCL1/림포탁틴, XCR1, XEDAR, XIAP, 및 XPD.

[0387]

본 발명에 개시된 항원 결합 분자는 상술한 항원의 혈장 중 총 항원 농도를 감소시킬 수 있다. 본 발명에 개시된 항원 결합 분자는 또한, 바이러스, 세균 및 진균의 구조 성분에 결합함으로써 혈장 바이러스, 세균 및 진균을 제거할 수 있다. 특히, RSV의 F 단백질, 스타필로코커스 리포테이코산, 클로스트리듐 디피실 독소, 쉬가형 독소 II, 탄저균 보호 항원 및 C형 간염 바이러스 E2 당단백질을 바이러스, 세균 및 진균의 구조 성분으로서 사용할 수 있다.

[0388]

본 발명의 방법들을 임의의 특정한 이론으로 제한하지는 아니지만, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성의, 중성 pH 범위에서의 경우보다 작은 감소(손상) 및/또는 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성의 증가(증대)와 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수의 증가 간의 관계를, 세포 내로의 항원-결합 분자의 흡수 촉진 및 혈장으로부터의 항원 제거의 증대에 기인하여 하기와 같이 설명할 수 있다.

[0389]

예를 들어, 상기 항원-결합 분자가 막 항원에 결합하는 항체인 경우, 체내에 투여되는 항체는 상기 항원에 결합하고 이어서 상기 항원에 대한 결합을 유지하면서 상기 항원과 함께 세포 중의 엔도솜 내로의 내면화를 통해 흡수된다. 이어서, 상기 항체는 상기 항원에 대한 결합을 유지하면서 리소솜으로 전위하고, 상기 항원과 함께 상기 리소솜에 의해 분해된다. 상기 혈장으로부터의 내면화-매개된 제거를 항원-의존적인 제거라 칭하며, 상기와 같은 제거는 다수의 항체 분자들에 대해 보고되었다(문헌[Drug Discov Today. 2006 Jan; 11(1-2): 81-8]). IgG 항체의 단일 분자가 2가 방식으로 항원에 결합하는 경우, 상기 단일 항체 분자는 상기 2 개 항원 분자에 대한 결합을 유지하면서 내면화되고, 상기 리소솜에서 분해된다. 따라서, 전형적인 항체의 경우에, IgG 항체의 한 분자는 항원의 3 개 이상의 분자에 결합할 수 없다. 예를 들어 중화 활성을 갖는 단일의 IgG 항체 분자는 3 개 이상의 항원 분자를 중화시킬 수 없다.

[0390]

혈장 중 IgG 분자의 비교적 연장된 체류(느린 제거)는 IgG 분자의 구조 수용체로서 공지된 인간 FcRn의 작용에 기인한다. IgG 분자는 음세포작용을 통해 엔도솜 내로 흡수된 경우, 상기 엔도솜 중의 산성 조건 하에서 상기 엔도솜에서 발현된 인간 FcRn에 결합한다. 인간 FcRn에 결합하지 않은 IgG 분자는 리소솜으로 이동하는 반면

(여기에서 분해된다), 인간 FcRn에 결합한 IgG 분자는 세포 표면으로 전위하고 혈장 중의 중성 조건 하에서 인간 FcRn으로부터의 해리에 의해 상기 혈장 중에 다시 복귀한다.

[0391] 한편으로, 상기 항원-결합 분자가 가용성 항원에 결합하는 항체인 경우에, 체내로 투여된 항체는 상기 항원에 결합하고 이어서 상기 항원에 대한 결합을 유지하면서 세포 내로 흡수된다. 세포 내로 흡수된 다수의 항체는 FcRn을 통해 상기 세포 밖으로 방출된다. 그러나, 상기 항체는 상기 세포 밖으로 방출되기 때문에(이때 상기 항체는 항원에 결합된 채로 유지된다), 항원에 다시 결합할 수 없다. 따라서, 막 항원에 결합하는 항체와 유사하게, 전형적인 항체의 경우에, IgG 항체의 하나의 분자는 3 개 이상의 항원 분자에 결합할 수 없다.

[0392] 혈장 중의 중성 조건 하에서 항원에 강하게 결합하지만 엔도솜 중의 산성 조건 하에서는 상기 항원으로부터 해리되는 pH-의존성 항원-결합 항체(중성 조건 하에서는 결합하지만 산성 조건 하에서는 해리되는 항체)는 상기 엔도솜 내에서 상기 항원으로부터 해리될 수 있다. 상기와 같은 pH-의존성 항원-결합 항체는 항원 해리 후 FcRn에 의해 혈장으로 재순환되는 경우 항원에 다시 결합할 수 있으며; 따라서 각각의 항체는 다수의 항원에 반복적으로 결합할 수 있다. 더욱 또한, 상기 항원-결합 분자에 결합된 항원은 상기 엔도솜 내에서 해리되고 혈장으로 재순환되지 않는다. 이는 상기 항원-결합 분자-매개된 항원의 세포 내로의 흡수를 촉진한다. 따라서, 항원-결합 분자의 투여는 항원 제거를 증대시킬 수 있으며 이에 의해 혈장 항원 농도가 감소한다.

[0393] pH-의존적인 방식으로 항원에 결합하는(중성 조건 하에서 결합하지만 산성 조건 하에서는 해리되는) 항체에 중성 조건(pH 7.4) 하에서 상기 인간 FcRn-결합 활성을 부여함으로써 상기 항원-결합 분자-매개된 항원의 세포 내로의 흡수를 더욱 촉진시킬 수 있다. 따라서, 항원-결합 분자의 투여는 항원 제거를 증대시키고 이에 의해 혈장 항원 농도를 감소시킬 수 있다. 통상적으로, 항체와 항원-항체 복합체는 모두 비-특이적인 세포 이물 흡수에 의해 세포 내로 흡수되고, 이어서 엔도솜 중의 산성 조건 하에서 FcRn에 결합함으로써 세포 표면으로 이동한다. 상기 항체 및 항원-항체 복합체는 세포 표면상의 중성 조건 하에서 FcRn으로부터의 해리를 통해 혈장으로 재순환된다. 따라서, 항원 결합에서 충분한 pH 의존성을 나타내는(중성 조건 하에서 결합하지만 산성 조건 하에서는 해리되는) 항체가 혈장 중의 항원에 결합하고 이어서 엔도솜 중의 결합된 항원으로부터 해리되는 경우, 상기 항원 제거 속도는 비-특이적인 세포 이물 흡수를 통한 항원 흡수 속도와 동일한 것으로 추정된다. 다른 한편으로, 상기 pH 의존성이 불충분하면, 상기 엔도솜 중에서 해리되지 않은 항원은 또한 혈장으로 재순환된다. 한편, 상기 pH 의존성이 충분한 경우, 상기 항원 제거에서 속도-결정 단계는 상기 비-특이적 세포 이물 흡수에 의한 세포 내로의 흡수이다. FcRn 중 일부는 세포 표면상에 집중되는 것으로 추정되는데, 그 이유는 FcRn이 항체를 상기 엔도솜으로부터 세포 표면으로 운반하기 때문이다.

[0394] 본 발명자들은 항원-결합 분자 중 하나인 IgG-유형 면역글로불린이 전형적으로 중성 pH 범위에서는 FcRn-결합 능력을 거의 갖지 않지만 중성 pH 범위에서 FcRn-결합 능력을 나타내는 것들은 세포 표면상의 FcRn에 결합할 수 있으며 따라서 세포-표면 FcRn에 결합함으로써 FcRn-의존적인 방식으로 세포 내로 흡수됨을 추정하였다. 세포 내로 FcRn-매개된 흡수의 속도는 비-특이적인 세포 이물 흡수에 의한 세포 내로의 흡수 속도보다 더 빠르다. 따라서, 항원 제거 속도를, 중성 pH 범위에서의 FcRn-결합 능력을 부여함으로써 더욱 가속시킬 수 있다. 구체적으로, 중성 pH 범위에서 FcRn-결합 능력을 갖는 항원-결합 분자는 전형적인(본래의 인간) IgG-유형 면역글로불린보다 더 빠르게 세포 내로 항원을 운반하며, 이어서 상기 항원-결합 분자는 엔도솜 중에서 상기 항원으로부터 해리된다. 상기 항원-결합 분자는 세포 표면 또는 혈장으로 재순환되고, 다시 또 다른 항원에 결합하며 FcRn을 통해 세포 내로 흡수된다. 상기 순환의 속도는 중성 pH 범위에서의 FcRn-결합 능력을 개선함으로써 가속화될 수 있으며, 이는 혈장으로부터 항원 제거 속도를 가속화할 수 있다. 더욱 또한, 상기 효율을, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시킴으로써 추가로 개선시킬 수 있다. 또한, 단일 항원-결합 분자에 결합할 수 있는 항원의 수는 단일 항원-결합 분자에 의해 성취된 순환의 증가 수에 따라 증가하는 것으로 추정된다. 본 발명의 항원-결합 분자는 항원-결합 도메인 및 FcRn-결합 도메인을 포함한다. 상기 FcRn-결합 도메인은 항원-결합에 영향을 미치지 않으므로, 또는 상술한 기전에 비추어, 상기 세포 내로의 항원-결합 분자-매개된 항원 흡수의 촉진은 항원의 유형에 관계없이 예상될 수 있으며, 그 결과 산성 pH 범위에서 항원-결합 분자의 항원-결합 능력(결합 능력)을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시키고/시키거나 혈장 pH에서 그의 FcRn-결합 활성을 증가시킴으로써 항원 제거 속도를 증가시킨다.

[0395] <항원-결합 분자로서 작용하는 물질>

[0396] 더욱 또한, 본 발명은 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성이 중성 pH 범위에서의 경우보다 더 낮은 항원-결합 분자를 제공한다. 항원-결합 분자의 구체적인 예는 pH 5.8 내지 pH 6.0 및 pH 7.4(각각 초기 엔도솜 및 혈장의 생체 내 pH인 것으로 추정됨)에서 인간 FcRn-결합 활성

을 갖고 항원-결합 활성이 pH 7.4에서보다 pH 5.8에서 더 낮은 것들을 포함한다. pH 7.4에서보다 pH 5.8에서 더 낮은 항원 결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 또한 pH 5.8에서보다 pH 7.4에서 더 강한 항원 결합 활성을 갖는 항원-결합 분자라 칭할 수 있다.

[0397] 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 본 발명의 항원-결합 분자는 바람직하게는 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 또한 갖고 중성 pH 범위에서의 본래의 인간 IgG보다 더 강한 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자이다. 상기 결합 활성 비는, 상기 분자의 인간 FcRn-결합 활성이 pH 7.4에서 심지어 약간 더 강한 한, 제한되지 않는다.

[0398] 문헌[Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671]에 따라, 본래의 인간 IgG1의 인간 FcRn-결합 활성은 산성 pH 범위(pH 6.0)에서 KD 1.7 마이크로몰인 반면, 중성 pH 범위에서 상기 활성은 거의 검출할 수 없다. 따라서, 바람직한 실시태양에서, 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 본 발명의 항원-결합 분자는 산성 pH 범위에서 KD 20 마이크로몰 이상(이는 중성 pH 범위에서 본래의 인간 IgG의 경우와 동일하거나 더 강하다)인 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 포함한다. 보다 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 인간 FcRn-결합 활성이 산성 pH 범위에서 KD 2.0 마이크로몰 이상이고 중성 pH 범위에서 KD 40 마이크로몰 이상인 항원-결합 분자를 포함한다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 인간 FcRn-결합 활성이 산성 pH 범위에서 KD 0.5 마이크로몰 이상이고 중성 pH 범위에서 KD 15 마이크로몰 이상인 항원-결합 분자를 포함한다. 상기 KD 값들을 문헌[the Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671]에 개시된 방법에 의해 측정한다(칩 상에 항원-결합 분자를 고정화하고 분석물로서 인간 FcRn을 로딩함으로써).

[0399] 본 발명은 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자를 제공하며, 여기에서 인간 FcRn, 및 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 낮은 항원-결합 활성은 KD 3.2 마이크로 몰보다 더 강하다. 본 발명은 또한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성이 본래의 인간 IgG의 경우보다 28 배 더 강한, 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자를 제공한다. 본 발명의 항원-결합 분자는 pH 7.0 및 25 °C에서 본래의 인간 IgG보다 더 강한 인간 FcRn-결합 활성을 갖는다. 보다 바람직한 실시태양에서 pH 7.0 및 25 °C에서 인간 FcRn-결합 활성은 본래의 인간 IgG보다 28 배 더 강하거나 또는 KD 3.2 마이크로 몰보다 더 강하다.

[0400] 본 발명은 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자를 제공하며, 여기에서 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성은 KD 2.3 마이크로 몰보다 더 강하다. 본 발명은 또한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성이 본래의 인간 IgG의 경우보다 38 배 더 강한, 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자를 제공한다.

[0401] 본 발명에서, 상기 산성 pH 범위는 전형적으로 pH 4.0 내지 pH 6.5를 지칭한다. 상기 산성 pH 범위는 pH 5.5 내지 6.5 이내의 임의의 pH 값에 의해 지시되는 범위, 바람직하게는 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 및 6.5, 특히 바람직하게는 생체 내에서 초기 엔도솜 중의 pH에 가까운 pH 5.8 내지 6.0 중에서 선택된다. 한편, 본 발명에서 중성 pH 범위는 전형적으로는 pH 6.7 내지 pH 10.0을 지칭한다. 상기 중성 pH 범위는 pH 7.0 내지 pH 8.0 이내의 임의의 pH 값에 의해 지시되는 범위, 바람직하게는 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 및 8.0 중에서 선택되고, 특히 바람직하게는 생체 내 혈장 (혈액) pH에 가까운 pH 7.4이다. pH 7.4에서의 낮은 친화성으로 인해 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 평가하기 어려운 경우 pH 7.4 대신에 pH 7.0을 사용할 수 있다. 상기 분석 조건에 사용되는 온도로서, 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 10 °C 내지 50 °C 중 임의의 온도에서 평가할 수 있다. 바람직하게는 15 °C 내지 40 °C의 온도를 상기 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해 사용한다. 보다 바람직하게, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 및 35 °C 중 어느 하나와 같이, 20 내지 35 °C 중 임의의 온도를 또한 상기 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해 사용한다. 실시예 5에 개시된 25 °C의 온도가 본 발명의 실시태양에 대한 일례이다.

[0402] 보다 바람직한 실시태양에서, pH 7.0 및 25 °C에서 인간 FcRn-결합 활성은 본래의 인간 IgG보다 38 배 더 강하거나 또는 KD 2.3 마이크로 몰보다 더 강하다. 인간 FcRn 결합 활성에 대해 비교용의 본래의 인간 IgG를 상기 항원-결합 분자와 비교하기 위해서, 본래의 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 본래의 인간 IgG로서 사용한다. 보다 바람직하게는, 본래의 인간 IgG1을 그의 인간 FcRn 결합 활성에 대해 비교용의 본래의 인간 IgG와 상기 항

원-결합 분자를 비교할 목적으로 사용한다.

- [0403] 본 발명은 비-인간 동물에게 항원-결합 분자의 투여 후 혈장 중 총 항원 농도가 비-인간 동물에게 대조 항원-결합 분자의 투여 후 혈장 중 총 항원 농도보다 낮은, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자를 제공한다.
- [0404] 본 발명은 또한 비-인간 동물에게 항원-결합 분자의 투여 후 혈장 항원 농도가, 상기 항원-결합 분자가 투여되지 않은 비-인간 동물로부터 수득한 혈장 중 총 항원 농도보다 낮은 항원-결합 분자를 제공한다.
- [0405] 혈장 중 총 항원 농도를, 본 발명의 항원-결합 분자의 투여에 의해, 인간 FcRn-결합 도메인으로서 본래의 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 대조 항원-결합 분자의 투여에 비해 또는 본 발명의 항원-결합 도메인 분자를 투여하지 않은 경우에 비해 2 배, 5 배, 10 배, 20 배, 50 배, 100 배, 200 배, 500 배 및 1,000 배까지 또는 심지어 더 많이 낮출 수 있다.
- [0406] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 $C = A/B$ 와 같이 계산된 상기 항원-결합 분자의 항원/항원-결합 분자의 몰 비(C)가, $C' = A'/B'$ 와 같이 계산된, 동일한 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인으로서 본래의 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 항원-결합 분자의 항원/항원-결합 분자의 몰 비(C')보다 낮은, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자를 제공한다:
- [0407] 상기 식에서,
- [0408] A는 비-인간 동물에게 항원-결합 분자 투여 후의 혈장 중 총 항원 농도이고,
- [0409] B는 비-인간 동물에게 항원-결합 분자 투여 후의 항원-결합 분자의 혈장 농도이고,
- [0410] A'는 비-인간 동물에게 대조 항원-결합 분자 투여 후의 혈장 중 총 항원 농도이고,
- [0411] B'는 비-인간 동물에게 대조 항원-결합 분자 투여 후의 항원-결합 분자의 혈장 농도이다.
- [0412] 항원/항원-결합 분자 몰 비를 본 발명의 항원-결합 분자의 투여에 의해, 인간 FcRn-결합 도메인으로서 본래의 인간 IgG Fc 도메인을 포함하는 항원-결합 분자의 투여에 비해 2 배, 5 배, 10 배, 20 배, 50 배, 100 배, 200 배, 500 배 및 1,000 배까지 또는 심지어 더 많이 낮출 수 있다.
- [0413] 혈장 중 총 항원 농도 또는 항원/항체 몰 비의 감소를 실시예 6, 8 및 13에 개시된 바와 같이 평가할 수 있다. 보다 구체적으로, 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 계열 32 또는 계열 276(잭슨 레보라토리즈(Jackson Laboratories), 문헌[Methods Mol Biol. 2010; 602:93-104])을 사용하여, 이들을 항원-결합 분자가 상기 마우스 대응 항원과 교차 반응하지 않는 경우 항원-항체 동시-주사 모델 또는 정상 상태 항원 주입 모델에 의해 평가할 수 있다. 항원-결합 분자가 마우스 대응물과 교차 반응하는 경우, 상기 분자를 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 계열 32 또는 계열 276(잭슨 레보라토리즈)에 항원-결합 분자를 단순히 주사함으로써 평가할 수 있다. 동시 주사 모델에서, 항원-결합 분자와 항원의 혼합물을 상기 마우스에게 투여한다. 정상 상태 항원 주입 모델에서, 항원 용액을 함유하는 주입 펌프를 상기 마우스에게 이식하여 일정한 혈장 항원 농도를 성취하고, 이어서 항원-결합 분자를 상기 마우스에게 주사한다. 시험 항원-결합 분자를 동일한 투여량으로 투여한다. 혈장 중 총 항원 농도, 혈장 중 유리 항원 농도 및 혈장 항원-결합 분자 농도를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법을 사용하여 적합한 시점에서 측정한다.
- [0414] 본 발명의 항원-결합 분자의 투여 경로를 피 내, 정맥 내, 유리체 내(intravitreal), 피하, 복강 내, 비 경구 및 근육 내 주사 중에서 선택할 수 있다.
- [0415] 보다 구체적으로, 본 발명에 개시된 혈장 중 항원 제거 활성에 대해 장기적인 효과를 갖는 항원-결합 분자는 pH 7.0 및 25 °C에서 본래의 인간 IgG1보다 28 배 내지 440 배 더 강한 범위 이내의 인간 FcRn-결합 활성 또는 3.0 마이크로 몰 내지 0.2 마이크로 몰 범위 이내의 KD를 갖는다. 장기적인 혈장 항원 농도를, 혈장 중 항원 제거 활성에 대한 본 발명의 항원-결합 분자의 장기적인 효과의 평가를 위해 상기 항원-결합 분자의 투여 후 2, 4, 7, 14, 28, 56 또는 84일째에 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도 및 항원/항원-결합 분자 몰 비를 측정함으로써 측정한다. 상기 혈장 항원 농도 또는 항원/항원-결합 분자 몰 비의 감소가 본 발명에 개시된 항원-결합 분자에 의해 성취되는 지의 여부를 상술한 시점들 중 임의의 하나 이상의 시점에서 상기 감소의 평가에 의해 결정할 수 있다.
- [0416] 훨씬 더 구체적으로, 본 발명에 개시된 혈장 중 항원 제거 활성에 대해 단기 효과를 갖는 항원-결합 분자는 pH 7.0 및 25 °C에서 본래의 인간 IgG1보다 440 배 더 강한 인간 FcRn-결합 활성 또는 0.2 마이크로 몰보다 강한

KD를 갖는다. 단기 혈장 항원 농도를, 혈장 중 항원 제거 활성에 대한 본 발명의 항원-결합 분자의 단기 효과를 평가하기 위해 항원-결합 분자의 투여 후 15 분, 1, 2, 4, 8, 12 또는 24 시간째에 혈장 중 총 또는 유리 항원 농도 및 항원/항원-결합 분자 몰 비를 측정함으로써 측정한다.

[0417] 더욱 또한, 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 낮은 항원-결합 활성을 갖는 본 발명의 항원-결합 분자에서, 상기 결합 활성 비는 상기 항원-결합 활성이 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 낮은 한, 제한되지 않는다. 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성이 심지어 약간 더 낮은 한, 상기 항원-결합 분자는 허용 가능하다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 pH 7.4에서의 항원-결합 활성이 pH 5.8에서의 경우보다 2 배 이상인 항원-결합 분자를 포함한다. 보다 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 pH 7.4에서의 항원-결합 활성이 pH 5.8에서의 경우보다 10 배 이상인 항원-결합 분자를 포함한다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 pH 7.4에서의 항원-결합 활성이 pH 5.8에서의 경우보다 40 배 이상인 항원-결합 분자를 포함한다.

[0418] 구체적으로, 본 발명의 항원-결합 분자는 예를 들어 WO 2009/125825에 개시된 실시태양을 포함한다. 보다 구체적으로, 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 pH 7.4에서 보다 더 낮은 pH 5.8에서의 항원-결합 활성을 가지며, 여기에서 $KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)$ 의 값(이는 pH 5.8 및 pH 7.4에서 항원에 대한 KD의 비이다)은 바람직하게는 2 이상, 보다 바람직하게는 10 이상, 훨씬 더 바람직하게는 40 이상이다. 상기 $KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)$ 값의 상한은 특별히 제한되지 않으며, 당해 분야의 숙련가들의 기술을 사용하여 생성이 가능한 한은 임의의 값, 예를 들어 400, 1,000 또는 10,000일 수 있다.

[0419] 또 다른 바람직한 실시태양에서, pH 5.8에서의 항원-결합 활성이 pH 7.4에서보다 더 낮은 본 발명의 항원-결합 분자는 $K_d(pH 5.8)/K_d(pH 7.4)$ 의 값(이는 pH 5.8에서 항원에 대한 k_d 및 pH 7.4에서 항원에 대한 K_d 의 비이다)이 바람직하게는 2 이상, 보다 바람직하게는 5 이상, 훨씬 더 바람직하게는 10 이상, 훨씬 더 바람직하게는 30 이상이다. 상기 $K_d(pH 5.8)/K_d(pH 7.4)$ 의 상한은 특별히 제한되지 않으며, 당해 분야의 숙련가들의 기술을 사용하여 생성이 가능한 한은 임의의 값, 예를 들어 50, 100 또는 200일 수 있다.

[0420] pH 이외에 항원-결합 활성 및 인간 FcRn-결합 활성이 측정되는 조건은 당해 분야의 숙련가들에 의해 적합하게 선택될 수 있고, 상기 조건들은 특별히 제한되지 않으나; 상기 측정을 예를 들어 실시예에 개시된 바와 같이 37 °C에서 MES 완충제를 사용하는 조건 하에서 수행할 수 있다. 더욱 또한, 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 실시예에 개시된 바와 같이 비아코어 T100(GE 헬쓰케어) 등을 사용하여 측정할 수 있다.

[0421] 본 발명의 항원-결합 분자는 세포 내로의 항원 흡수를 촉진한다. 상기 분자는 엔도솜에서 항원으로부터 쉽게 해리되고, 이어서 인간 FcRn에의 결합에 의해 세포 밖으로 방출된다. 본 발명의 항원-결합 분자는 다시 혈장 중에서 항원에 쉽게 결합하는 것으로 추정된다. 따라서, 예를 들어 본 발명의 항원-결합 분자가 중화 항원-결합 분자인 경우, 상기 혈장 항원 농도의 감소는 상기 분자의 투여에 의해 촉진될 수 있다. 따라서, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자는 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 낮은 항원-결합 활성을 가지며; 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자는, 우수한 약동학을 가지며 분자당 더 많은 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 분자인 듯하다.

[0422] 바람직한 실시태양에서, 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 상기와 같은 항원-결합 분자는 인간 FcRn에 직접 또는 간접적으로 결합하는 능력을 갖는 인간 FcRn-결합 도메인을 함유하는 것들을 포함한다. 상기 도메인이 이미 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 능력을 갖는 경우 상기 도메인을 그대로 사용할 수 있다. 한편으로, 상기 도메인이 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖지만 중성 pH 범위에서는 단지 약한 인간 FcRn-결합 활성을 나타내거나 또는 전혀 나타내지 않는다 하더라도, 상기 도메인 중의 아미노산을 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖도록 개변시킨 후에 사용할 수 있다. 한편으로, 산성 및 중성 pH 범위에서 이미 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 도메인 중의 아미노산을 개변시킴으로써 상기 인간 FcRn-결합 활성을 증대시키는 것도 가능하다. 상기와 같은 항원-결합 분자는 예를 들어 하나 이상의 아미노산의 개변을 함유하는 IgG Fc 도메인의 아미노산 서열을 갖는 것들을 포함한다. 상기 아미노산 개변은 특별히 제한되지 않으며; 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성이 개변전보다 강한 한 어떠한 부위에서도 개변을 수행할 수 있다.

[0423] 구체적으로, 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 제공하는 아미노산 개변은 예를 들어 상술한 모 IgG Fc 도메인 중의 221 내지 225, 227, 228, 230, 232, 233 내지 241, 243 내지 252, 254 내지 260, 262 내지 272, 274, 276, 278 내지 289, 291 내지 312, 315 내지 320, 324, 325, 327 내지 339, 341, 343, 345, 360,

362, 370, 375 내지 378, 380, 382, 385 내지 387, 389, 396, 414, 416, 423, 424, 426 내지 438, 440, 및 442 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들의 개변을 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 아미노산 개변은 표 1, 2, 6-1, 6-2 및 9에 나타낸 부위(EU 넘버링)의 것들을 포함한다. 바람직한 항원-결합 분자는 EU 넘버링에서 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산의 개변으로부터 생성되는 아미노산 서열을 포함하는 것들을 포함한다.

- [0424] 바람직한 실시태양에서, 상기와 같은 아미노산 개변은 하기를 포함한다:
- [0425] EU 넘버링에서
- [0426] 237 번 위치에서 Gly 대신에 Met의 아미노산 치환;
- [0427] 238 번 위치에서 Pro 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0428] 239 번 위치에서 Ser 대신에 Lys의 아미노산 치환;
- [0429] 248 번 위치에서 Lys 대신에 Ile의 아미노산 치환;
- [0430] 250 번 위치에서 Thr 대신에 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0431] 252 번 위치에서 Met 대신에 Phe, Trp 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0432] 254 번 위치에서 Ser 대신에 Thr의 아미노산 치환;
- [0433] 255 번 위치에서 Arg 대신에 Glu의 아미노산 치환;
- [0434] 256 번 위치에서 Thr 대신에 Asp, Glu 또는 Gln의 아미노산 치환;
- [0435] 257 번 위치에서 Pro 대신에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, 또는 Val의 아미노산 치환;
- [0436] 258 번 위치에서 Glu 대신에 His의 아미노산 치환;
- [0437] 265 번 위치에서 Asp 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0438] 270 번 위치에서 Asp 대신에 Phe의 아미노산 치환;
- [0439] 286 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 Glu의 아미노산 치환;
- [0440] 289 번 위치에서 Thr 대신에 His의 아미노산 치환;
- [0441] 297 번 위치에서 Asn 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0442] 298 번 위치에서 Ser 대신에 Gly의 아미노산 치환;
- [0443] 303 번 위치에서 Val 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0444] 305 번 위치에서 Val 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0445] 307 번 위치에서 Thr 대신에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0446] 308 번 위치에서 Val 대신에 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, 또는 Thr의 아미노산 치환;
- [0447] 309 번 위치에서 Leu 또는 Val 대신에 Ala, Asp, Glu, Pro, 또는 Arg의 아미노산 치환;
- [0448] 311 번 위치에서 Gln 대신에 Ala, His 또는 Ile의 아미노산 치환;
- [0449] 312 번 위치에서 Asp 대신에 Ala 또는 His의 아미노산 치환;
- [0450] 314 번 위치에서 Leu 대신에 Lys 또는 Arg의 아미노산 치환;
- [0451] 315 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 His의 아미노산 치환;
- [0452] 317 번 위치에서 Lys 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0453] 325 번 위치에서 Asn 대신에 Gly의 아미노산 치환;

- [0454] 332 번 위치에서 Ile 대신에 Val의 아미노산 치환;
- [0455] 334 번 위치에서 Lys 대신에 Leu의 아미노산 치환;
- [0456] 360 번 위치에서 Lys 대신에 His의 아미노산 치환;
- [0457] 376 번 위치에서 Asp 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0458] 380 번 위치에서 Glu 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0459] 382 번 위치에서 Glu 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0460] 384 번 위치에서 Asn 또는 Ser 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0461] 385 번 위치에서 Gly 대신에 Asp 또는 His의 아미노산 치환;
- [0462] 386 번 위치에서 Gln 대신에 Pro의 아미노산 치환;
- [0463] 387 번 위치에서 Pro 대신에 Glu의 아미노산 치환;
- [0464] 389 번 위치에서 Asn 대신에 Ala 또는 Ser의 아미노산 치환;
- [0465] 424 번 위치에서 Ser 대신에 Ala의 아미노산 치환;
- [0466] 428 번 위치에서 Met 대신에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환;
- [0467] 433 번 위치에서 His 대신에 Lys의 아미노산 치환;
- [0468] 434 번 위치에서 Asn 대신에 Ala, Phe, His, Ser, Trp, 또는 Tyr의 아미노산 치환; 및
- [0469] 436 번 위치에서 Tyr 대신에 His 또는 Phe의 아미노산 치환.
- [0470] 상기 개변되는 아미노산의 수는 특별히 제한되지 않으며; 단지 단일 부위에서만 또는 2 개 이상의 부위에서 아미노산을 개변시킬 수 있다. 2 개 이상의 아미노산 개변의 조합은 예를 들어 표 3, 4-1 내지 4-5, 6-1, 6-2 및 9에 나타낸 것들을 포함한다.
- [0471] 한편, 산성 및 중성 pH 범위에서 이미 인간 FcRn-결합 능력을 갖는 도메인은 예를 들어 모 IgG Fc 도메인 중의
- [0472] 237 번 아미노산 위치에 Met;
- [0473] 238 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0474] 239 번 아미노산 위치에 Lys;
- [0475] 248 번 아미노산 위치에 Ile;
- [0476] 250 번 아미노산 위치에 Ala, Phe, Ile, Met, Gln, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr;
- [0477] 252 번 아미노산 위치에 Phe, Trp 또는 Tyr;
- [0478] 254 번 아미노산 위치에 Thr;
- [0479] 255 번 아미노산 위치에 Glu;
- [0480] 256 번 아미노산 위치에 Asp, Glu 또는 Gln;
- [0481] 257 번 아미노산 위치에 Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr 또는 Val;
- [0482] 258 번 아미노산 위치에 His;
- [0483] 265 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0484] 270 번 아미노산 위치에 Phe;
- [0485] 286 번 아미노산 위치에 Ala 또는 Glu;
- [0486] 289 번 아미노산 위치에 His;

- [0487] 297 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0488] 298 번 아미노산 위치에 Gly;
- [0489] 303 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0490] 305 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0491] 307 번 아미노산 위치에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Val, Trp, 또는 Tyr;
- [0492] 308 번 아미노산 위치에 Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Pro, Gln, 또는 Thr;
- [0493] 309 번 아미노산 위치에 Ala, Asp, Glu, Pro 또는 Arg;
- [0494] 311 번 아미노산 위치에 Ala, His 또는 Ile;
- [0495] 312 번 아미노산 위치에 Ala 또는 His;
- [0496] 314 번 아미노산 위치에 Lys 또는 Arg;
- [0497] 315 번 아미노산 위치에 Ala 또는 His;
- [0498] 317 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0499] 325 번 아미노산 위치에 Gly;
- [0500] 332 번 아미노산 위치에 Val;
- [0501] 334 번 아미노산 위치에 Leu;
- [0502] 360 번 아미노산 위치에 His;
- [0503] 376 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0504] 380 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0505] 382 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0506] 384 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0507] 385 번 아미노산 위치에 Asp 또는 His;
- [0508] 386 번 아미노산 위치에 Pro;
- [0509] 387 번 아미노산 위치에 Glu;
- [0510] 389 번 아미노산 위치에 Ala 또는 Ser;
- [0511] 424 번 아미노산 위치에 Ala;
- [0512] 428 번 아미노산 위치에 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Ser, Thr, Val, Trp, 또는 Tyr;
- [0513] 433 번 아미노산 위치에 Lys;
- [0514] 434 번 아미노산 위치에 Ala, Phe, His, Ser, Trp, 또는 Tyr; 및
- [0515] 436 번 아미노산 위치에 His 또는 Phe(EU 넘버링)
- [0516] 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 인간 FcRn-결합 도메인을 포함한다.
- [0517] 단일 부위의 아미노산 또는 2 개 이상의 부위의 아미노산이 이를 아미노산을 가질 수도 있다. 2 개 이상의 위치의 아미노산의 조합은 예를 들어 표 3, 4-1 내지 4-5, 6-1, 6-2 및 9에 나타낸 것들을 포함한다.
- [0518] 한편으로, 바람직한 실시태양에서, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성이 중성 pH 범위에서의 경우보다 더 낮은 항원-결합 분자는 상기 항원-결합 분자 중의 하나 이상의 아미노산이 히스티딘 또는 비-천연 아미노산으로 치환되거나, 또는 하나 이상의 히스티딘 또는 비-천연 아미노산이 삽입된 항원-결합 분자를 포함한다. 상기 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이가 도입되는 부위는 특별히 제한되지 않으며, 치환 전에 비해 산성 pH 범위

에서의 항원-결합 활성이 중성 pH 범위에서의 경우보다 더 약한 (KD(산성 pH 범위에서)/KD(중성 pH 범위에서) 값이 더 크거나 또는 k_d (산성 pH 범위에서)/ k_d (중성 pH 범위에서) 값이 더 큰) 한, 어떠한 부위일 수도 있다. 예로서 상기 항원-결합 분자가 항체인 경우에 상기 항체의 가변 영역 및 CDR을 포함한다. 히스티딘 또는 비-천연 아미노산으로 치환되는 아미노산의 수 및 삽입되는 아미노산의 수는 당해 분야의 숙련가들에 의해 적합하게 결정될 수 있다. 하나의 아미노산이 히스티딘 또는 비-천연 아미노산으로 치환되거나, 또는 하나의 아미노산이 삽입되거나, 또는 2 개 이상의 아미노산이 히스티딘 또는 비-천연 아미노산으로 치환되거나, 또는 2 개 이상의 아미노산이 삽입될 수도 있다. 더욱이, 히스티딘 또는 비-천연 아미노산의 치환 또는 히스티딘 또는 비-천연 아미노산의 삽입과 별개로, 다른 아미노산들의 결실, 침가, 삽입 및/또는 치환 등이 동시에 수행될 수도 있다. 히스티딘 또는 비-천연 아미노산의 치환 또는 히스티딘 또는 비-천연 아미노산의 삽입을 히스티딘 스캐닝(당해 분야의 숙련가들에게 공지된 알라닌 스캐닝에서 알라닌 대신에 히스티딘을 사용한다)과 같은 방법을 사용하여 랜덤하게 수행할 수 있다. 상기 돌연변이의 도입 전에 비해 KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4) 또는 k_d (pH 5.8)/ k_d (pH 7.4)가 증가된 항원-결합 분자를, 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이가 랜덤하게 도입된 항원-결합 분자의 라이브러리로부터 선택할 수 있다.

[0519]

히스티딘 또는 비-천연 아미노산에 대한 돌연변이를 갖고 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성이 중성 pH 범위에서의 경우보다 더 낮은 바람직한 항원-결합 분자는 예를 들어 히스티딘 또는 비-천연 아미노산에 대한 돌연변이 후 pH 7.4에서의 항원-결합 활성이 히스티딘 또는 비-천연 아미노산에 대한 돌연변이 전 pH 7.4에서의 항원-결합 활성과 동등한 항원-결합 분자를 포함한다. 본 발명에서, "히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이 후의 항원-결합 분자가 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이 전의 항원-결합 분자의 경우와 동등한 항원-결합 활성을 갖는다"는 상기 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이 전의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성을 100%로 정하는 경우, 상기 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이 후의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성이 10% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 및 더욱 더 바람직하게는 90% 이상임을 의미한다. 상기 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이 후 pH 7.4에서의 항원-결합 활성이 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이 전 pH 7.4에서의 항원-결합 활성보다 더 강할 수도 있다. 상기 항원-결합 분자의 항원-결합 활성이 히스티딘 또는 비-천연 아미노산의 치환 또는 삽입으로 인해 감소하는 경우, 상기 항원-결합 활성을, 상기 항원-결합 활성이 히스티딘 치환 또는 삽입 전의 경우와 동등해지도록 상기 항원-결합 분자 내로 하나 이상의 아미노산을 치환, 결실, 침가 및/또는 삽입하는 등으로써 조절할 수도 있다. 본 발명은 또한 히스티딘 치환 또는 삽입 후 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실, 침가 및/또는 삽입의 결과로서 동등해진 결합 활성을 갖는 상기와 같은 항원-결합 분자를 포함한다.

[0520]

더욱이, 상기 항원-결합 분자가 항체 불변 영역을 포함하는 물질인 경우, pH 5.8에서의 항원-결합 활성이 pH 7.4에서의 경우보다 더 낮은 항원-결합 분자의 또 다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 상기 항원-결합 분자 중에 함유된 항체 불변 영역을 변경시키는 방법을 포함한다. 변경 후 항체 불변 영역의 구체적인 예는 WO 2009/125825에서 실시예에 개시된 불변 영역들(서열번호 11, 12, 13 및 14)을 포함한다.

[0521]

상기 pH 5.8에서의 항원-결합 물질의 항원-결합 활성이 상술한 방법 등에 의해 pH 7.4에서의 경우에 비해 약화되는 경우(KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)의 값이 증가되는 경우), 일반적으로 상기 KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4) 값은 원래 항체의 경우에 비해 2 배 이상, 보다 바람직하게는 5 배 이상, 훨씬 더 바람직하게는 10 배 이상이 바람직하지만, 상기 값들로 특별히 제한되지는 않는다.

[0522]

더욱 또한, 본 발명은 하기에 개시된 부위들 중 한 부위에서 하나 이상의 아미노산에 대해 히스티딘 또는 비-천연 아미노산의 치환을 갖는 항원-결합 분자를 제공한다. 상기 아미노산 위치를 카밧 넘버링에 따라 나타낸다(문헌[Kabat EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH]).

[0523]

중쇄: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b, 및 H102

[0524]

경쇄: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92, 및 L94

[0525]

이들 개변 부위 중에서, H32, H61, L53, L90, 및 L94는 대단히 일반적인 개변 부위인 것으로 추정된다.

[0526]

구체적으로, 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 치환에 바람직한 부위들의 조합은 예를 들어 H27, H31, 및 H35의 조합; H27, H31, H32, H35, H58, H62, 및 H102의 조합; L32 및 L53의 조합; 및 L28, L32, 및 L53의 조합을 포함한다. 더욱 또한, 중쇄 및 경쇄 중의 치환 부위의 바람직한 조합은 예를 들어 H27, H31, L32 및 L53의 조합을 포함한다.

- [0527] 본 발명의 항원-결합 분자는 다른 성질들을 가질 수도 있으며, 예를 들어 상기 분자의 항원-결합 활성이 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 낮고 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 한, 작용성 또는 길항작용성 항원-결합 분자일 수 있다. 본 발명의 바람직한 항원-결합 분자는 예를 들어 길항작용성 항원-결합 분자이다. 상기와 같은 길항작용성 항원-결합 분자는 전형적으로 리간드(작용물질)와 수용체 간의 결합을 차단함으로써 수용체-매개된 세포 내 신호전달을 억제하는 항원-결합 분자이다.
- [0528] 한편, 본 발명의 항원-결합 분자는 임의의 항원을 인식할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 항원-결합 분자에 의해 인식된 항원은 예를 들어 상술한 수용체 단백질(막-결합된 수용체 및 가용성 수용체), 막 항원, 예를 들어 세포-표면 마커, 및 가용성 항원, 예를 들어 사이토kin을 포함한다. 상기와 같은 항원은 예를 들어 상술한 항원들을 포함한다.
- [0529] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 갖는 IgG-유형 면역글로불린(IgG 항체)을 포함한다. IgG 항체가 항원-결합 분자로서 사용되는 경우, 상기 유형은 제한되지 않으며; IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 등을 사용하는 것이 가능하다.
- [0530] 본 발명의 항원-결합 분자의 기원은 특별히 제한되지 않으며, 임의의 기원을 가질 수 있다. 예를 들어, 마우스 항체, 인간 항체, 래트 항체, 토끼 항체, 염소 항체, 낙타 항체 등을 사용하는 것이 가능하다. 더욱 또한, 상기 항체들은 예를 들어 상술한 키메릭 항체, 및 특히 아미노산 서열 치환을 갖는 변경된 항체, 예를 들어 인간화된 항체일 수도 있다. 상기 항체들은 또한 상술한 이중 특이성 항체, 다양한 분자들이 결합된 항체 변경 산물, 항체 단편을 포함하는 폴리펩타이드, 및 변경된 당 쇄를 갖는 항체일 수 있다.
- [0531] 이중 특이성 항체는 동일한 항체 분자 중에 상이한 에피토프를 인식하는 가변 영역들을 갖는 항체를 지칭한다. 이중 특이성 또는 다중 특이성 항체는 2 개 이상의 상이한 항원을 인식하는 항체, 또는 동일한 항원 상의 2 개 이상의 상이한 에피토프를 인식하는 항체일 수 있다.
- [0532] 더욱 또한, 항체 단편을 포함하는 폴리펩타이드는 예를 들어 Fab 단편, F(ab')2 단편, scFv(문헌[Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9): 1126-36]), 도메인 항체 (dAb) (WO 2004/058821, WO 2003/002609), scFv-Fc (WO 2005/037989), dAb-Fc 및 Fc 융합 단백질을 포함한다. Fc 도메인을, 분자가 Fc 도메인을 포함하는 경우, 인간 FcRn-결합 도메인으로서 사용할 수 있다. 한편으로, FcRn-결합 도메인을 상기 분자에 융합시킬 수도 있다.
- [0533] 더욱이, 본 발명에 적용할 수 있는 항원-결합 분자는 항체-유사 분자일 수도 있다. 항체-유사 분자(스캐폴드 분자, 웨타이드 분자)는 표적 분자에 결합함으로써 작용을 발휘할 수 있는 분자이며(문헌[Current Opinion in Biotechnology (2006) 17: 653-658]; [Current Opinion in Biotechnology (2007) 18: 1-10]; [Current Opinion in Structural Biology (1997) 7: 463-469]; [Protein Science (2006) 15: 14-27]), 예를 들어 DARPin (WO 2002/020565), 애피바디(Affibody) (WO 1995/001937), 애비머(Avimer) (WO 2004/044011; WO 2005/040229), 및 애드넥틴 (WO 2002/032925)을 포함한다. 이들 항체-유사 분자가 pH-의존적인 방식으로 표적 분자에 결합하고/하거나 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 가질 수 있는 경우, 항원-결합 분자에 의한 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하고, 항원-결합 분자의 투여에 의해 혈장 항원 농도의 감소를 촉진하며, 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키고, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 것이 가능하다.
- [0534] 더욱 또한, 상기 항원-결합 분자는 리간드를 포함하는 표적에 결합하는 수용체 단백질과 인간 FcRn-결합 도메인 간의 융합으로부터 생성되는 단백질일 수도 있고, 예를 들어 TNFR-Fc 융합 단백질, IL1R-Fc 융합 단백질, VEGFR-Fc 융합 단백질, 및 CTLA4-Fc 융합 단백질을 포함한다(문헌[Nat Med. 2003, Jan; 9(1): 47-52]; [BioDrugs. (2006) 20(3): 151-60]). 이들 수용체-인간 FcRn-결합 도메인 융합 단백질이 pH-의존적인 방식으로 리간드 포함 표적 분자에 결합하고/하거나 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 경우, 항원-결합 분자에 의한 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하고, 항원-결합 분자의 투여에 의해 혈장 항원 농도의 감소를 촉진하며, 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키고, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 것이 가능하다. 수용체 단백질을 리간드를 포함하는 표적에 상기 수용체 단백질의 결합 도메인을 포함하도록 적합하게 디자인하고 변형시킨다. TNFR-Fc 융합 단백질, IL1R-Fc 융합 단백질, VEGFR-Fc 융합 단백질 및 CTLA4-Fc 융합 단백질을 포함하여 이전의 예에 대해 언급한 바와 같이, 리간드를 포함하는 상기 표적들에 결합하기 위해 필요한 수용체 단백질의 세포 외 도메인을 포함하는 가용성 수용체 분자가 본 발명에 바람직하게 사용된다. 상기 디자인되고 변형된 수용체 분자를 본 출원에서 인공 수용체라 칭한다. 인공 수용체 분자를 제작

하기 위해 수용체 분자를 디자인하고 변형시키는데 사용되는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0535] 더욱이, 상기 항원-결합 분자는, 표적에 결합하고 중화 효과를 갖는 인공 리간드 단백질이 인간 FcRn-결합 도메인과 융합된 융합 단백질일 수 있으며, 인공 리간드 단백질은 예를 들어 돌연변이 IL-6을 포함한다(문헌[EMBO J. 1994 Dec 15; 13(24): 5863-70]). 상기와 같은 인공 리간드 융합 단백질이 pH-의존적인 방식으로 표적 분자에 결합하고/하거나 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 가질 수 있는 경우, 항원-결합 분자에 의한 세포 내로의 항원 흡수를 촉진하고, 항원-결합 분자의 투여에 의해 혈장 항원 농도의 감소를 촉진하며, 항원-결합 분자의 약동학을 개선시키고, 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시키는 것이 가능하다.

[0536] 더욱 또한, 본 발명의 항체는 변형된 당 쇄를 포함할 수도 있다. 변형된 당 쇄를 갖는 항체는 예를 들어 변형된 글리코실화를 갖는 항체(WO 99/54342), 상기 당 쇄에 첨가된 퓨코스(fucose)가 불충분한 항체(WO 02/31140; WO 2006/067847; WO 2006/067913) 및 양분하는 GlcNAc가 있는 당 쇄를 갖는 항체(WO 02/79255)를 포함한다.

[0537] pH 이외에 항원-결합 또는 인간 FcRn-결합 활성을 대한 분석에 사용되는 조건은 당해 분야의 숙련가들에 의해 적합하게 선택될 수 있으며, 상기 조건들은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, WO 2009/125825에 개시된 바와 같이 37 °C에서 MES 완충제를 사용하는 조건을 사용하여 상기 활성을 측정할 수 있다. 한편, 항원-결합 분자의 항원-결합 활성 및 인간 FcRn-결합 활성을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 비아코어(GE 헬쓰케어) 등을 사용하여 측정할 수 있다. 상기 항원이 가용성 항원인 경우, 상기 가용성 항원에 결합하는 항원-결합 분자의 활성을, 분석물로서 상기 항원을 상기 항원-결합 분자가 고정화된 칩 상에 로딩함으로써 측정할 수 있다. 한편으로, 상기 항원이 막-유형 항원인 경우, 상기 막-유형 항원에 결합하는 항원-결합 분자의 활성을, 항원-고정화된 칩 상에 분석물로서 상기 항원-결합 분자를 로딩함으로써 측정할 수 있다. 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성을, 각각 상기 항원-결합 분자 또는 인간 FcRn이 고정화된 칩 상에 분석물로서 인간 FcRn 또는 항원-결합 분자를 로딩함으로써 측정할 수 있다.

[0538] 키메릭 항체의 생성은 공지되어 있다. 예를 들어 인간-마우스 키메릭 항체의 경우에, 항체 V 영역을 암호화하는 DNA를 인간 항체 C 영역을 암호화하는 DNA에 결합시킬 수 있으며; 이를 발현 벡터 내로 삽입하고 숙주에 도입시켜 키메릭 항체를 생성시킬 수 있다.

[0539] "인간화된 항체"는 또한 개장된(reshaped) 인간 항체라고도 지칭되고 비인간 포유동물, 예를 들어 마우스의 상보성 결정 영역(CDR)이 인간 항체의 CDR로 이식된 항체이다. CDR의 동정 방법은 공지되어 있다(문헌[Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.]; [Chothia et al., Nature (1989) 342: 877]). 상기 목적에 적합한 일반적인 유전자 재조합 기술들도 또한 공지되어 있다(유럽 특허 출원 EP 125023; 및 WO 96/02576을 참조하시오). 인간화된 항체를 공지된 방법에 의해 생성시킬 수 있다, 예를 들어 마우스 항체의 CDR을 결정하고, 상기 CDR이 인간 항체의 프레임워크 영역(FR)에 결합된 항체를 암호화하는 DNA를 수득한다. 이어서 인간화된 항체를 통상적인 발현 벡터를 사용하는 시스템을 사용하여 생성시킬 수 있다. 상기와 같은 DNA를, CDR 및 FR 모두의 단부 영역과 겹치는 부분들을 갖도록 제조된 여러 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로서 사용하여, PCR에 의해 합성할 수 있다(WO 98/13388에 개시된 방법을 참조하시오). CDR을 통해 결합된 인간 항체 FR을 상기 CDR이 적합한 결합 부위를 형성하도록 선택한다. 경우에 따라, 항체 가변 영역의 FR 중의 아미노산을, 상기 개장된 인간 항체의 CDR이 적합한 항원 결합 부위를 형성할 수 있도록 개변시킬 수도 있다(문헌[Sato et al., Cancer Res. (1993) 53: 10.01-6]). 개변시킬 수 있는 FR 중의 아미노산 잔기는 비-공유 결합을 통해 항원에 직접 결합하는 부분(문헌[Amit et al., Science (1986) 233: 747-53]), CDR 구조에 영향을 미치는 부분(문헌[Chothia et al., J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17]), 및 VH-VL 상호작용에 관여하는 부분(EP 239400)을 포함한다.

[0540] 본 발명의 항원-결합 분자가 키메릭 항체 또는 인간화된 항체인 경우, 이들 항체의 C 영역은 바람직하게는 인간 항체로부터 유래한다. 예를 들어, H 쇄의 경우 C-감마1, C-감마2, C-감마3, 및 C-감마4를 사용할 수 있는 반면, L 쇄의 경우 C-카파 및 C-람다를 사용할 수 있다. 더욱이, 경우에 따라, 아미노산 돌연변이를, Fc-감마 수용체에 대한 결합을 증대 또는 감소시키거나, 또는 항체 안정성 또는 생산성을 개선시키기 위해서 인간 항체 C 영역 내로 도입시킬 수도 있다. 본 발명의 키메릭 항체는 바람직하게는 비인간 포유동물로부터 유래한 항체의 가변 영역 및 인간 항체로부터 유래한 불변 영역을 포함한다. 한편, 인간화된 항체는 바람직하게는 비인간 포유동물로부터 유래한 항체의 CDR 및 인간 항체로부터 유래한 FR 및 C 영역을 포함한다. 상기 인간 항체로부터 유래한 불변 영역은 바람직하게는 인간 FcRn-결합 영역을 포함한다. 상기와 같은 항체는 예를 들어 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)를 포함한다. 본 발명의 인간화된 항체에 사용되는 불변 영역은 임의의 아이소

타입의 항체의 불변 영역일 수 있다. 바람직하게는 인간 IgG1으로부터 유래한 불변 영역이 사용되지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 상기 인간화된 항체에 사용되는, 인간 항체로부터 유래한 FR들은 어느 것으로도 특별히 제한되지 않으며, 임의의 아이소타입의 항체로부터 유래될 수 있다.

[0541] 본 발명의 키메릭 및 인간화된 항체의 가변 및 불변 영역을, 원래 항체의 결합 특이성이 발휘되는 한, 결실, 치환, 삽입 및/또는 첨가 등에 의해 변경시킬 수 있다.

[0542] 인간 신체 중의 면역원성이 낮아지므로, 인간-유래한 서열을 사용하는 키메릭 및 인간화된 항체가 치료 목적 등으로 인간에게 투여될 때 유용한 것으로 생각된다.

[0543] 본 발명의 상기와 같은 항원-결합 분자를 임의의 방법에 의해 수득할 수 있다. 예를 들어, 산성 pH 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 원래 갖지 않는 항원-결합 분자, 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 강한 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자, 또는 산성 및 중성 pH 범위에서 필적하는 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 상술한 아미노산 개변 등을 통해 목적하는 활성을 갖는 항원-결합 분자로 인위적으로 변경시킬 수도 있다. 한편으로, 목적하는 활성을 갖는 항체를 하기 개시하는 항체 라이브러리 또는 하이브리도마로부터 수득된 다수의 항체로부터 선별에 의해 선택할 수 있다.

[0544] 항원-결합 분자 중의 아미노산 개변 시, 개변 전의 항원-결합 분자의 아미노산 서열에 대해 공지된 서열 또는 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 새롭게 확인된 항원-결합 분자의 아미노산 서열을 사용하는 것이 가능하다. 예를 들어, 상기 항원-결합 분자가 항체인 경우, 이를 항체 라이브러리로부터 또는 단클론 항체-생산 하이브리도마로부터 항체-암호화 유전자를 클로닝함으로써 수득할 수 있다.

[0545] 항체 라이브러리에 관하여, 다수의 항체 라이브러리들이 이미 공지되어 있으며, 항체 라이브러리의 생성 방법이 또한 공지되어 있고; 따라서 당해 분야의 숙련가들은 항체 라이브러리를 적합하게 획득할 수 있다. 예를 들어 과지 라이브러리에 관하여, 예를 들어 문헌[Clackson et al., *Nature* (1991) 352: 624-8]; [Marks et al., *J. Mol. Biol.* (1991) 222: 581-97]; [Waterhouses et al., *Nucleic Acids Res.* (1993) 21: 2265-6]; [Griffiths et al., *EMBO J.* (1994) 13: 324.0-60]; [Vaughan et al., *Nature Biotechnology* (1996) 14: 309-14]; 및 일본 특허 공개 공보 제 (JP-A) H20-504970 호(비-일본 국제 공보에 상응하는 일본 비심사 국내 단계 공개 공보)를 참조할 수 있다. 또한, 공지된 방법들, 예를 들어 라이브러리로서 전핵 생물 세포를 사용하는 방법(WO 95/15393) 및 리보솜 디스플레이 방법을 사용하는 것이 가능하다. 더욱 또한, 인간 항체 라이브러리를 사용하는 패닝(panning)에 의해 인간 항체를 수득하는 기술이 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 항체의 가변 영역을 과지 디스플레이 방법을 사용하여 단체 항체(scFv)로서 과지의 표면상에서 발현시킬 수 있으며, 항원에 결합하는 과지를 선택할 수 있다. 상기 선택된 과지의 유전자 분석은 상기 항원에 결합하는 인간 항체의 가변 영역을 암호화하는 DNA 서열을 결정할 수 있다. 일단 상기 항원에 결합하는 scFv의 DNA 서열이 밝혀지면, 적합한 발현 벡터를 상기 서열을 근거로 제조하여 인간 항체를 수득할 수 있다. 이러한 방법들은 이미 널리 공지되어 있으며, WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, 및 WO 95/15388을 참조할 수 있다.

[0546] 하이브리도마로부터 항체를 암호화하는 유전자를 수득하기 위한 방법에 관하여, 목적하는 항원 또는 감작 항원으로서 목적하는 항원을 발현하는 세포를 사용하고, 이를 사용하여 통상적인 면역화 방법에 따라 면역화를 수행하고, 생성된 면역 세포를 통상적인 세포 융합 방법에 의해 공지된 모 세포와 융합시키고, 통상적인 선별 방법에 의해 단클론 항체 생산 세포(하이브리도마)를 선별하고, 역 전사효소를 사용하여 상기 수득된 하이브리도마의 mRNA로부터 항체 가변 영역(V 영역)의 cDNA를 합성하고, 이를 목적하는 항체 불변 영역(C 영역)을 암호화하는 DNA와 결합시킴을 수반하는 공지된 기술들을 기본적으로 사용할 수 있다.

[0547] 보다 구체적으로, H 쇄 및 L 쇄를 암호화하는 상술한 항원-결합 분자 유전자를 수득하기 위한 항원 감작화는 예를 들어 면역원성을 갖는 완전 항원 및 면역원성이 없는 합텐 등을 포함한 불완전 항원 모두를 포함할 수 있지만; 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 전체 단백질 및 단백질의 관심 부분 웹타이드를 사용하는 것이 가능하다. 또한, 폴리사카라이드, 핵산, 지질 등을 포함하는 물질이 항원일 수 있음은 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 항원-결합 분자의 항원은 특별히 제한되지 않는다. 상기 항원을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 바클로바이러스 기재 방법(예를 들어 WO 98/46777) 등에 의해 제조할 수 있다. 하이브리도마를 예를 들어 문헌[G. Kohler and C. Milstein, *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46]의 방법 등에 의해 생성시킬 수 있다. 항원의 면역원성이 낮은 경우, 상기 항원과 면역원성을 갖는 거대분자, 예를 들어 알부민과의 결합 후에 면역화를 수행할 수도 있다. 한편으로, 필요에 따라, 항원을 다른 분자와의 결합에 의해 가용성 항원으로 전환시킬 수도 있다. 막관통 분자, 예를 들어 막 항원(예를 들어 수용체)을 항원으로서 사용하는 경우,

상기 막 항원의 세포 외 영역의 부분을 단편으로서 사용하거나, 또는 표면상에서 막관통 분자를 발현하는 세포를 면역원으로서 사용할 수도 있다.

[0548] 항원-결합 분자-생산 세포를 상술한 적합한 감작 항원을 사용하여 동물을 면역시킴으로써 수득할 수 있다. 한편으로, 항원-결합 분자-생산 세포를, 항원-결합 분자를 생산할 수 있는 림프구의 시험관 내 면역화에 의해 제조할 수 있다. 다양한 포유동물을 면역화에 사용할 수 있으며; 상기와 같은 통상적으로 사용되는 동물은 설치류, 토끼목 및 영장류를 포함한다. 상기와 같은 동물로는 예를 들어 설치류, 예를 들어 마우스, 래트 및 햄스터; 토끼목, 예를 들어 토끼; 및 원숭이, 예를 들어 키노몰구스 원숭이, 붉은털 원숭이, 개코원숭이 및 침팬지를 포함한 영장류가 있다. 또한, 인간 항체 유전자 레퍼토리를 수반하는 트랜스제닉 동물이 또한 공지되어 있으며, 인간 항체를 이들 동물을 사용하여 수득할 수 있다(WO 96/34096; 문헌[Mendez et al., Nat. Genet. (1997) 15: 146-56]을 참조하시오). 상기와 같은 트랜스제닉 동물 대신에, 예를 들어 항원에 대한 결합 활성을 갖는 목적하는 인간 항체를, 목적하는 항원을 갖는 인간 림프구 또는 목적하는 항원을 발현하는 세포의 시험관 내 감작화, 및 이어서 상기 감작된 림프구와 인간 골수종 세포, 예를 들어 U266과의 융합에 의해 수득할 수 있다(일본 특허 출원 공고 공보 제 (JP-B) H01-59878 호 (반박을 위해 공개된 승인된 일본 특허 출원 공고 공보)를 참조하시오). 더욱 또한, 목적하는 인간 항체를, 인간 항체 유전자의 완전한 레퍼토리를 수반하는 트랜스제닉 동물을 목적하는 항원으로 면역시킴으로써 수득할 수 있다(WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 96/34096, 및 WO 96/33735를 참조하시오).

[0549] 동물 면역화는 감작 항원을 포스페이트 완충된 염수(PBS), 생리 식염수 등에서 적합하게 희석 및 혼탁하고, 필요에 따라 이를 항원보강제와 혼합하여 유화시킴으로써 수행될 수 있다. 이어서 이를 동물 내로 복강 내 또는 피하 주사한다. 이어서, 프로인트 불완전 항원보강제와 혼합된 상기 감작 항원을 바람직하게는 매 4 내지 21일마다 수회 투여한다. 항체 생산은 통상적인 방법을 사용하여 동물 혈청 중의 관심 항체의 역가를 측정함으로써 확인할 수 있다.

[0550] 목적하는 항원으로 면역된 동물 또는 림프구로부터 수득된 항원-결합 분자-생산 세포를 통상적인 융합제(예를 들어 폴리에틸렌 글리콜)를 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마를 생성시킬 수 있다(문헌[Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) 59-103]). 필요한 경우, 하이브리도마 세포를 배양 및 생육시킬 수 있으며, 이들 하이브리도마로부터 생산된 항원-결합 분자의 결합 특이성을 공지된 분석 방법, 예를 들어 면역침전법, 방사성 면역분석(RIA) 및 효소-결합된 면역흡수 분석(ELISA)을 사용하여 측정할 수 있다. 그 후에, 필요에 따라, 특이성, 친화성 또는 활성이 측정된 관심 항원-결합 분자 생산 하이브리도마를 제한 희석과 같은 방법에 의해 서브클로닝할 수 있다.

[0551] 이어서, 상기 선택된 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 상기 항원-결합 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 탐침(예를 들어 상기 항체 불변 영역을 암호화하는 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드)을 사용하여 하이브리도마 또는 항원-결합 분자-생산 세포(감작된 림프구 등)로부터 클로닝할 수 있다. 또한 RT-PCR을 사용하여 mRNA로부터 상기 유전자를 클로닝하는 것도 가능하다. 면역글로불린을 5 가지 상이한 부류들, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 분류한다. 이들 부류를 여러 개의 하위부류(아이소타입)(예를 들어 IgG-1, IgG-2, IgG-3 및 IgG-4; IgA-1 및 IgA-2 등)로 추가로 분류한다. 항원-결합 분자의 생성을 위해 본 발명에 사용되는 H 쇄 및 L 쇄는 특별히 제한되지 않으며 이들 부류 또는 하위부류 중 어느 하나에 속하는 항체로부터 기원할 수 있으나; IgG가 특히 바람직하다.

[0552] 본 발명에서, 유전 공학 기술을 사용하여 H-쇄-암호화 유전자 및 L-쇄-암호화 유전자를 변경시키는 것이 가능하다. 유전자 변경된 항체, 예를 들어 키메릭 항체 및 인간화된 항체(인간에 대한 이종 면역원성 등의 감소를 목적으로 인위적으로 변경되었다)를 마우스 항체, 래트 항체, 토끼 항체, 햄스터 항체, 양 항체 및 낙타 항체에 대해 적합하게 생성시킬 수 있다. 키메릭 항체는 비인간 포유동물 항체, 예를 들어 마우스 항체의 H-쇄 및 L-쇄 가변 영역, 및 인간 항체의 H-쇄 및 L-쇄 불변 영역을 포함하는 항체이다. 키메릭 항체를, 마우스 항체의 가변 영역을 암호화하는 DNA를 인간 항체의 불변 영역을 암호화하는 DNA에 연결하고, 이를 발현 벡터에 삽입하고, 상기 벡터를 숙주에 도입시켜 항체를 생산함으로써 수득할 수 있다. 인간화된 항체(또한 개장된 인간 항체라 칭한다)를, 상기 항체가 마우스와 같은 비인간 포유동물의 항체의 상보성 결정 영역(CDR)을 결합시키기 위해 디자인된 DNA 서열의 단부에 겹치는 부분을 갖도록 상기 생성된 다수의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 PCR에 의해 합성할 수 있다. 상기 생성되는 DNA를 인간 항체 불변 영역을 암호화하는 DNA에 연결시킬 수 있다. 상기 연결된 DNA를 발현 벡터에 삽입하고 상기 벡터를 숙주에 도입시켜 항체를 생산할 수 있다(EP 239400 및 WO 96/02576을 참조하시오). CDR을 통해 연결된 인간 항체 FR을, CDR이 유리한 항원-결합 부위를 형성하는 경우 선택한다. 필요한 경우, 항체 가변 영역의 프레임워크 영역 중의 아미노산을, 상기 개장된 인간 항체의 CDR이

적합한 항원-결합 부위를 형성하도록 치환시킬 수도 있다(문헌[K. Sato et al., Cancer Res. (1993) 53: 10.01-10.06]).

[0553] 상술한 인간화 이외에, 항체를 그의 생물학적 성질, 예를 들어 항원에 대한 결합을 개선하기 위해 변경시킬 수 있다. 본 발명에서, 상기와 같은 변경은 위치-지정 돌연변이(예를 들어 문헌[(1910.0) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488]을 참조하시오), PCR 돌연변이, 및 카세트 돌연변이와 같은 방법에 의해 성취될 수 있다. 일반적으로, 생물학적 성질이 개선된 돌연변이 항체는 원래의 항체 가변 영역의 아미노산 서열에 비해, 70% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 및 훨씬 더 바람직하게는 90% 이상(예를 들어 95% 이상, 97%, 98%, 또는 99%)의 아미노산 서열 상동성 및/또는 유사성을 나타낸다. 본 발명에서, 서열 상동성 및/또는 유사성은, 필요한 경우 서열 상동성 값을 서열 정렬 및 중단(gap) 도입에 의해 최대화한 후, 원래의 항체 잔기에 대해 상동성이거나(동일한 잔기) 또는 유사한(아미노산 측쇄의 일반적인 성질을 기준으로 동일한 그룹으로 분류된 아미노산 잔기) 아미노산 잔기의 비로서 정의된다. 일반적으로, 천연 아미노산 잔기는 그의 측쇄의 특성을 기준으로 하기와 같은 그룹으로 분류된다:

[0554] (1) 소수성: 알라닌, 아이소류신, 발린, 메티오닌, 및 류신;

[0555] (2) 중성 친수성: 아스파라진, 글루타민, 시스테인, 트레오닌, 및 세린;

[0556] (3) 산성: 아스파트산 및 글루탐산;

[0557] (4) 염기성: 아르기닌, 히스티딘, 및 리신;

[0558] (5) 쇄의 배향에 영향을 미치는 잔기: 글리신, 및 프롤린; 및

[0559] (6) 방향족: 타이로신, 트립토판, 및 페닐알라닌.

[0560] 일반적으로, H 쇄 및 L 쇄 가변 영역 상에 존재하는 총 6 개의 상보성 결정 영역들(CDR: 초가변 영역)이 서로 반응하여 항체의 항원-결합 부위를 형성한다. 하나의 가변 영역은 단독으로 항원을 인식하여 결합할 수 있는 것으로 또한 공지되어 있지만, 그의 친화성은 전체 결합 부위의 친화성보다 낮다. 따라서, 본 발명의 H 쇄 및 L 쇄를 암호화하는 항체 유전자는, 상기 유전자에 의해 암호화된 폴리펩타이드가 목적하는 항원에 대한 결합 활성을 유지하는 한, 각각 상기 H 쇄 또는 L 쇄 항원-결합 부위를 포함하는 단편들을 암호화할 수 있다.

[0561] 상술한 바와 같이, 중쇄 가변 영역은 일반적으로 3 개의 CDR 및 4 개의 FR에 의해 구성된다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, "개변되는" 아미노산 잔기를 예를 들어 CDR 또는 FR 중의 아미노산 잔기들로부터 적합하게 선택할 수 있다. 일반적으로, CDR 중의 아미노산 잔기의 개변은 항원-결합 능력을 감소시킬 수도 있다. 따라서, 본 발명에서 "개변되는" 적합한 아미노산 잔기를 바람직하게는 FR 중의 아미노산 잔기들로부터 선택하나, 이들로 제한되지 않는다. 상기 개변이 상기 결합 능력을 감소시키지 않는 것으로 확인된 한 CDR 중의 아미노산을 선택하는 것이 가능하다. 한편으로, 공개된 데이터 베이스 등을 사용하여, 당해 분야의 숙련가들은 인간 또는 마우스와 같은 유기체의 항체 가변 영역의 FR로서 사용될 수 있는 적합한 서열을 획득할 수 있다.

[0562] 더욱 또한, 본 발명은 본 발명의 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자는 임의의 유전자일 수 있으며, DNA, RNA, 핵산 동족체 등일 수 있다.

[0563] 더욱 또한, 본 발명은 또한 상술한 유전자를 운반하는 숙주 세포를 제공한다. 상기 숙주 세포는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 에스케리키아 콜라이 및 다양한 동물 세포를 포함한다. 상기 숙주 세포를 예를 들어 본 발명의 항체를 생산하고 발현하는 생산 시스템으로서 사용할 수도 있다. 시험관 내 및 생체 내 생산 시스템을 폴리펩타이드 생산 시스템에 이용할 수 있다. 상기와 같은 시험관 내 생산 시스템은 예를 들어 진핵생물 세포 또는 원핵생물 세포를 사용하는 생산 시스템을 포함한다.

[0564] 숙주 세포로서 사용될 수 있는 진핵생물 세포는 예를 들어 동물 세포, 식물 세포, 및 진균 세포를 포함한다. 동물 세포는 포유동물 세포, 예를 들어 CHO (문헌[J. Exp. Med. (1995) 108: 94.0]), COS, HEK293, 3T3, 콜수종, BHK (아기 햄스터 신장), HeLa, 및 Vero; 양서류 세포, 예를 들어 손톱 개구리 난모세포 (문헌[Valle et al., Nature (1981) 291: 338-340]); 및 곤충 세포, 예를 들어 Sf9, Sf21, 및 Tn5를 포함한다. CHO-DG44, CHO-DX11B, COS7 세포, HEK293 세포, 및 BHK를 본 발명의 항체의 발현에 사용하는 것이 바람직하다. 동물 세포들 중에서, CHO 세포가 대규모 발현에 특히 바람직하다. 벡터를 예를 들어 칼슘 포스페이트 방법, DEAE-덱스트란 방법, 양이온성 리포솜 DOTAP(베링거-만하임(Boehringer-Mannheim))를 사용하는 방법, 일렉트로포레이션 방법, 및 리포펙션 방법에 의해 숙주 세포에 도입시킬 수 있다.

- [0565] 식물 세포에 관하여, 예를 들어 담배 니코틴-유래된 세포 및 좀개구리밥(렘나 미노르)이 단백질 생산 시스템으로서 공지되어 있다. 상기 세포로부터 칼루스를 배양하여 본 발명의 항원-결합 분자를 생산할 수 있다. 친균 세포에 관하여, 공지된 단백질 발현 시스템은 효모 세포, 예를 들어 사카로마이세스 속(예를 들어 사카로마이세스 세레비지아에 및 사카로마이세스 폼베)의 세포; 및 사상균, 예를 들어 아스퍼지러스 속(예를 들어 아스퍼지러스 니거)의 세포를 사용하는 것들이다. 이들 세포를 숙주로서 사용하여 본 발명의 항원-결합 분자를 생산할 수 있다.
- [0566] 세균 세포를 원핵생물 생산 시스템에 사용할 수 있다. 세균 세포에 관하여, 상술한 에스케리키아 콜라이를 사용하는 생산 시스템 이외에 바실러스 서브틸리스를 사용하는 생산 시스템이 공지되어 있다. 상기와 같은 시스템을 본 발명의 항원-결합 분자의 생산에 사용할 수 있다.
- [0567] <선별 방법(Screening method)>
- [0568] 본 발명은 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖고 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 낮은 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 세포 내로의 항원 흡수를 촉진할 수 있는 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 분자당 더 많은 항원에 결합할 수 있도록 변경된 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항원 제거를 촉진할 수 있는 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 개선된 약동학을 갖는 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 세포 밖에서 결합된 항원으로부터의 세포 내 해리가 촉진된 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 항원-결합된 형태로 세포 내로 흡수 후 항원-부재 형태로 세포 외 방출이 촉진된 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 약학 조성물로서 특히 유용한 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다. 상술한 방법들은 혈장 체류에 특히 우수하고 상기 혈장으로부터 항원을 제거하는 우수한 능력을 갖는 항원-결합 분자의 선별에 유용하다.
- [0569] 구체적으로, 본 발명은
- [0570] (a) 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;
- [0571] (b) 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시키고 산성 pH 범위에서보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하는
- [0572] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다.
- [0573] 단계 (a) 및 (b)를 어느 순서로도 수행할 수 있다. 더욱 또한, 각 단계를 2 회 이상 반복할 수도 있다. 단계 (a) 및 (b)를 반복하는 회수는 특별히 제한되지 않지만; 상기 회수는 전형적으로는 10 회 이하이다.
- [0574] 본 발명의 선별 방법에서, 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성은, pH 6.7 내지 10.0의 범위에서 항원-결합 활성이 있는 한, 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, WO 2009/125825에 개시된 실시태양들이 포함된다. 바람직한 항원-결합 활성은 pH 7.0 내지 8.0 범위에서의 항원-결합 활성을 포함한다. 보다 바람직한 항원-결합 활성은 pH 7.4에서의 항원-결합 활성을 포함한다. 한편, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성은, pH 4.0 내지 6.5의 범위에서 항원-결합 활성이 있는 한, 특별히 제한되지 않는다. 바람직한 항원-결합 활성은 pH 5.5 내지 6.5 범위에서의 항원-결합 활성을 포함한다. 보다 바람직한 항원-결합 활성은 pH 5.8 또는 pH 5.5에서의 항원-결합 활성을 포함한다.
- [0575] 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성은, pH 6.7 내지 10.0의 범위에서 인간 FcRn-결합 활성이 있는 한, 특별히 제한되지 않는다. 바람직한 인간 FcRn-결합 활성은 pH 7.0 내지 8.0 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 포함한다. 보다 바람직한 인간 FcRn-결합 활성은 pH 7.4에서의 인간 FcRn-결합 활성을 포함한다.
- [0576] 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성은, pH 4.0 내지 6.5의 범위에서 인간 FcRn-결합 활성이 있는 한, 특별히 제한되지 않는다. 바람직한 인간 FcRn-결합 활성은 pH 5.5 내지 6.5 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 포함한다. 보다 바람직한 인간 FcRn-결합 활성은 pH 5.8 내지 pH 6.0 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 포함한다.
- [0577] 본 발명에서, 산성 pH 범위는 전형적으로 pH 4.0 내지 pH 6.5를 지칭한다. 상기 산성 pH 범위는 바람직하게는 pH 5.5 내지 6.5 이내의 임의의 pH 값에 의해 지시되는 범위, 바람직하게는 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0,

6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 및 6.5, 특히 바람직하게는 생체 내에서 초기 엔도솜 중의 pH에 가까운 pH 5.8 내지 6.0 중에서 선택된다. 한편, 본 발명에서 중성 pH 범위는 전형적으로는 pH 6.7 내지 pH 10.0을 지칭한다. 상기 중성 pH 범위는 바람직하게는 pH 7.0 내지 pH 8.0 이내의 임의의 pH 값에 의해 지시되는 범위, 바람직하게는 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 및 8.0 중에서 선택되고, 특히 바람직하게는 생체 내 혈장 (혈액) pH에 가까운 pH 7.4이다. pH 7.4에서의 낮은 친화성으로 인해 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 평가하기 어려운 경우 pH 7.4 대신에 pH 7.0을 사용할 수 있다. 상기 분석 조건에 사용되는 온도로서, 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 10 °C 내지 50 °C 중 임의의 온도에서 평가할 수 있다. 바람직하게는 15 °C 내지 40 °C의 온도를 상기 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해 사용한다. 보다 바람직하게, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 및 35 °C 중 어느 하나와 같이, 20 내지 35 °C 중 임의의 온도를 상기 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해 사용한다. 실시예 5에 개시된 25 °C의 온도가 본 발명의 실시태양에 대한 일례이다.

[0578] 항원-결합 분자의 항원-결합 활성 및 인간 FcRn-결합 활성을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 측정할 수 있다. pH 이외의 적합한 조건은 당해 분야의 숙련가들에 의해 선택될 수 있다. 항원-결합 분자의 항원-결합 활성 및 인간 FcRn-결합 활성을 KD(해리 상수), 겉보기 KD(겉보기 해리 상수), 해리속도 k_d (해리속도), 겉보기 k_d (겉보기 해리: 겉보기 해리속도) 등을 사용하여 평가할 수 있다. 상기를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해, 예를 들어 비아코어(GE 헬쓰케어), 스캣차드 플롯, 유식 세포 측정계 등을 사용하여 측정할 수 있다.

[0579] 문헌[Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671]에 따라, 본래의 인간 IgG1의 인간 FcRn-결합 활성은 산성 pH 범위(pH 6.0)에서 KD 1.7 마이크로몰인 반면, 중성 pH 범위에서 상기 활성은 거의 검출할 수 없다. 따라서, 바람직한 실시태양에서, 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖고 산성 pH 범위에서 KD20 마이크로몰 이상(이는 중성 pH 범위에서 본래의 인간 IgG의 경우와 동일하거나 더 강하다)인 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 본 발명의 항원-결합 분자를 선별할 수 있다. 보다 바람직한 실시태양에서, 인간 FcRn-결합 활성이 산성 pH 범위에서 KD 2.0 마이크로몰 이상이고 중성 pH 범위에서 KD 40 마이크로몰 이상인 항원-결합 분자를 포함하는 본 발명의 항원-결합 분자를 선별할 수 있다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 상기 항원-결합 분자는 인간 FcRn-결합 활성이 산성 pH 범위에서 KD 0.5 마이크로몰 이상이고 중성 pH 범위에서 KD 15 마이크로몰 이상인 항원-결합 분자를 포함하는 본 발명의 항원-결합 분자를 선별할 수 있다. 상기 KD 값들을 문헌[the Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671]에 개시된 방법에 의해 측정한다(칩 상에 항원-결합 분자를 고정화하고 분석 물로서 인간 FcRn을 로딩함으로써).

[0580] 본 발명은

[0581] (a) 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴으로써 수득한 3.2 마이크로몰 보다 강한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0582] (b) (a)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 결합된 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 수득하고;

[0583] (c) (b)에서 제조된 유전자를 사용하여 항원-결합 분자를 생성시키는

[0584] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공한다.

[0585] 하나의 실시태양에서, 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자(여기에서 인간 FcRn, 및 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 낮은 항원-결합 활성은 KD 3.2 마이크로몰 보다 강하다)를 앞서 개시된 바와 같이 당해 분야의 숙련가에 의해 사용된 방법에 따라 선별할 수 있다. 보다 바람직한 실시태양에서, pH 7.0 및 25 °C에서 인간 FcRn-결합 활성은 KD 3.2 마이크로 몰보다 더 강하다.

[0586] 본 발명은 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공하며, 여기에서 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성은 KD 2.3 마이크로 몰보다 더 강하다. 본 발명은 또한 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자의 선별 방법을 제공하며, 여기에서 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성은 본래의 인간 IgG보다 38 배 더 강하다.

- [0587] 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 본 발명의 항원-결합 분자는, 상기 분자가 pH 6.7 내지 10.0에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 한 특별히 제한되지 않는다. 그러나, 바람직한 항원-결합 분자의 pH 6.7 내지 10.0에서의 인간 FcRn-결합 활성은 본래의 인간 IgG의 경우보다 더 강하다.
- [0588] 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 본 발명의 항원-결합 분자는, 상기 분자가 pH 4.0 내지 6.5에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 한 특별히 제한되지 않는다. 그러나, 바람직한 항원-결합 분자의 pH 5.5 내지 6.5에서의 인간 FcRn-결합 활성은 본래의 인간 IgG의 경우에 필적하거나 이보다 더 강하다.
- [0589] 본 발명에서, 산성 pH 범위에서보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 선택 단계는 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 낮은 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 선택 단계와 동의어이다.
- [0590] 중성과 산성 pH 범위 간의 항원-결합 활성 비는 상기 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성이 산성 pH 범위에서의 경우보다 더 강한 한 특별히 제한되지 않는다. 그러나, pH 6.7 내지 10.0에서의 항원-결합 활성은 바람직하게는 pH 4.0 내지 6.5에서의 항원-결합 활성의 2 배 이상, 보다 바람직하게는 10 배 이상, 및 훨씬 더 바람직하게는 40 배 이상이다.
- [0591] 본 발명의 선별 방법에서, 파지 라이브러리와 같은 라이브러리를 사용하는 것이 가능하다.
- [0592] 본 발명의 방법에서, 항원 및 항원-결합 분자를 임의의 상태로 함께 결합시킬 수 있으며, 따라서 상기 상태는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 항원을 고정화된 항원-결합 분자와 접촉시켜 이들의 결합을 성취할 수도 있다. 한편으로, 상기 항원-결합 분자를 고정화된 항원과 접촉시켜 이들의 결합을 성취할 수도 있다. 한편으로, 상기 항원-결합 분자 및 항원을 서로 용액 중에서 접촉시켜 이들의 결합을 성취할 수 있다.
- [0593] 본 발명의 선별 방법에 의해 선별되는 항원-결합 분자를 임의의 방법에 의해 제조할 수 있다. 예를 들어, 기존의 항체, 기존의 항원-결합 도메인 라이브러리(파지 라이브러리 등), 면역된 동물의 B 세포 또는 동물 면역화에 의해 제조된 하이브리도마로부터 제조된 항체 또는 항원-결합 도메인 라이브러리, 랜덤한 아미노산 변경을 상술한 항체 또는 항원-결합 도메인 라이브러리에 도입시켜 획득한 항체 또는 항원-결합 도메인 라이브러리, 히스티딘 돌연변이 또는 비-천연 아미노산 돌연변이가 도입된 항체 또는 항원-결합 도메인 라이브러리(히스티딘 또는 비-천연 아미노산의 함량이 높은 라이브러리, 특정 부위에서 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이가 도입된 항원-결합 도메인 라이브러리 등) 등을 사용하는 것이 가능하다.
- [0594] 항원에 수회 결합하는(따라서 혈장 체류에서 우수한) 항원-결합 분자를 본 발명의 선별 방법에 의해 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 선별 방법을, 혈장 체류에서 우수한 항원-결합 분자를 수득하기 위한 선별 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0595] 더욱 또한, 인간, 마우스 또는 원숭이와 같은 동물에게 투여 시 항원에 2 회 이상 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 본 발명의 선별 방법에 의해 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 선별 방법을 항원에 2 회 이상 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 수득하기 위한 선별 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0596] 더욱 또한, 인간, 마우스 또는 원숭이와 같은 동물에게 투여 시 항원-결합 부위의 수에 비해 더 많은 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 본 발명의 선별 방법에 의해 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 선별 방법을, 항원-결합 부위의 수에 비해 더 많은 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 수득하기 위한 선별 방법으로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 항체가 중화 항체인 경우에, 본 발명의 선별 방법을 항원-결합 분자의 항원-결합 부위의 수에 비해 더 많은 항원을 중화할 수 있는 항원-결합 분자를 수득하기 위한 선별 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0597] 더욱 또한, 인간, 마우스 또는 원숭이와 같은 동물에게 투여 시 세포 외-결합된 항원으로부터 세포 내에서 해리될 수 있는 항원-결합 분자를 본 발명의 선별 방법에 의해 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 선별 방법을 세포 외-결합된 항원으로부터 세포 내에서 해리될 수 있는 항원-결합 분자를 수득하기 위한 선별 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0598] 더욱 또한, 인간, 마우스 또는 원숭이와 같은 동물에게 투여 시 항원에 결합되고 세포 내로 흡수되며, 항원-부재 형태로 상기 세포 밖으로 방출되는 항원-결합 분자를 본 발명의 선별 방법에 의해 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 선별 방법을, 항원에 결합되고 세포 내로 흡수되며, 항원-부재 형태로 상기 세포 밖으로 방출되는 항원-결합 분자를 수득하기 위한 선별 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0599] 더욱 또한, 인간, 마우스 또는 원숭이와 같은 동물에게 투여 시 혈장 중 항원을 신속하게 제거할 수 있는 항원-

결합 분자를 본 발명의 선별 방법에 의해 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 선별 방법을, 혈장 중 항원을 제거하는 증가된(높은) 능력을 갖는 항원-결합 분자를 수득하기 위한 선별 방법으로서 사용할 수 있다.

[0600] 더욱 또한, 상기와 같은 항원-결합 분자는 환자에 있어서 투여 용량 및 회수를 감소시킬 수 있고 결과적으로 총 투여량을 감소시킬 수 있기 때문에, 약제로서 특히 우수한 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 선별 방법을 약학 조성물로서 사용하기 위한 항원-결합 분자의 선별 방법으로서 사용할 수 있다.

[0601] <항원-결합 분자의 생성 방법>

[0602] 본 발명은 엔도솜 pH 및 혈장 pH에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖고, 혈장 pH에서보다 엔도솜 pH에서 더 낮은 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 생성 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 약동학이 우수하고 투여 시 혈장 항원 농도의 감소를 촉진하는데 우수한 항원-결합 분자의 생성 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 약학 조성물로서 사용 시 특히 유용한 항원-결합 분자의 생성 방법을 제공한다.

[0603] 구체적으로, 본 발명은

[0604] (a) 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변 전보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0605] (b) 항원-결합 분자의 항원-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시키고 산성 pH 범위에서보다 더 강한 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0606] (c) (a) 및 (b)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 결합된 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 수득하고;

[0607] (d) (c)에서 제조된 유전자를 사용하여 항원-결합 분자를 생성시키는

[0608] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 생성 방법을 제공한다.

[0609] 단계 (a) 및 (b)를 어느 순서로도 수행할 수 있다. 더욱 또한, 각 단계를 2 회 이상 반복할 수도 있다. 단계 (a) 및 (b)를 반복하는 회수는 특별히 제한되지 않지만; 상기 회수는 전형적으로는 10 회 이하이다.

[0610] (a) 및 (b)에서 제조된 인간 FcRn-결합 도메인 및 항원-결합 도메인을 작동적으로 결합시키는 링커는 임의의 형태로 제한되지 않는다. 상기 인간 FcRn-결합 도메인 및 항원-결합 도메인을 공유력 또는 비-공유력에 의해 결합시킬 수 있다. 특히, 상기 링커는 웨타이드 링커 또는 화학적 링커 또는 비오틴과 스트렙트아비딘의 조합 같은 결합 쌍일 수 있다. 상기 인간 FcRn-결합 도메인 및 항원-결합 도메인을 포함하는 폴리웨타이드의 변형은 당해 분야에 공지되어 있다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 인간 FcRn-결합 도메인 및 항원-결합 도메인을 상기 인간 FcRn-도메인과 항원-결합 도메인 간에 융합 단백질을 형성시킴으로써 결합시킬 수 있다. 상기 인간 FcRn-결합 도메인 및 항원-결합 도메인 간의 융합 단백질을 제작하기 위해서, 상기 인간 FcRn-결합 도메인 및 항원-결합 도메인을 암호화하는 유전자를 인프레임 융합 폴리웨타이드가 형성되도록 작동적으로 결합시킬 수 있다. 적합하게는, 다수의 아미노산으로 이루어진 웨타이드를 포함하는 링커를 상기 인간 FcRn-결합 도메인과 항원-결합 도메인 사이에 삽입할 수 있다. $(GGGGS)_n$ 으로 이루어진 서열을 갖는 링커와 같은 다양한 가요성 링커들이 당해 분야에 공지되어 있다.

[0611] 본 발명의 생성 방법에 사용되는 항원-결합 분자를 임의의 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 기존의 항체, 기존의 라이브러리(파지 라이브러리 등), 면역된 동물의 B 세포로부터 또는 동물 면역화에 의해 수득된 하이브리도마로부터 제조된 항체 및 라이브러리, 랜덤한 아미노산 개변을 상술한 항체 및 라이브러리에 도입시켜 제조된 항체 및 라이브러리, 히스티딘 또는 비-천연 아미노산 돌연변이를 상술한 항체 및 라이브러리에 도입시켜 제조된 항체 및 라이브러리(히스티딘 또는 비-천연 아미노산의 함량이 높은 라이브러리, 특정 부위에서 히스티딘 또는 비-천연 아미노산이 도입된 라이브러리 등) 등을 사용하는 것이 가능하다.

[0612] 상술한 생성 방법에서, 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성은, pH 6.7 내지 10.0의 범위에서 인간 FcRn-결합 활성이 있는 한, 특별히 제한되지 않는다. 바람직한 인간 FcRn-결합 활성은 pH 7.0 내지 8.0 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 포함한다. 보다 바람직한 인간 FcRn-결합 활성은 pH 7.4에서의 인간 FcRn-결합 활성을 포함한다.

[0613] 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성은, pH 4.0 내지 6.5의 범위에서 인간 FcRn-결합 활성이 있는 한, 특별히 제한되지 않는다. 바람직한 인간 FcRn-결합 활성은 pH 5.5 내지 6.5 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 포함한다. 보다 바람직한 인간 FcRn-결합 활성은 pH 6.0에서의 인간 FcRn-결합 활성을 포함

한다.

[0614] 본 발명에서, 산성 pH 범위는 전형적으로 pH 4.0 내지 pH 6.5를 지칭한다. 상기 산성 pH 범위는 pH 5.5 내지 6.5 이내의 임의의 pH 값에 의해 지시되는 범위, 바람직하게는 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 및 6.5, 특히 바람직하게는 생체 내에서 초기 엔도솜 중의 pH에 가까운 pH 5.8 내지 6.0 중에서 선택된다. 한편, 본 발명에서 중성 pH 범위는 전형적으로는 pH 6.7 내지 pH 10.0을 지칭한다. 상기 중성 pH 범위는 pH 7.0 내지 pH 8.0 이내의 임의의 pH 값에 의해 지시되는 범위, 바람직하게는 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 및 8.0 중에서 선택되고, 특히 바람직하게는 생체 내 혈장 (혈액) pH에 가까운 pH 7.4이다. pH 7.4에서의 낮은 친화성으로 인해 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 평가하기 어려운 경우 pH 7.4 대신에 pH 7.0을 사용할 수 있다. 상기 분석 조건에 사용되는 온도로서, 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 10 °C 내지 50 °C 중 임의의 온도에서 평가할 수 있다. 바람직하게는 15 °C 내지 40 °C의 온도를 상기 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해 사용한다. 보다 바람직하게, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 및 35 °C 중 어느 하나와 같이, 20 내지 35 °C 중 임의의 온도를 또한 상기 인간 FcRn-결합 도메인과 인간 FcRn 간의 결합 친화성을 측정하기 위해 사용한다. 실시예 5에 개시된 25 °C의 온도가 본 발명의 실시태양에 대한 일례이다.

[0615] 본 발명은

[0616] (a) 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산을 개변시킴으로써 수득한 KD 3.2 마이크로몰 보다 강한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자를 선택하고;

[0617] (b) (a)에서 제조된 항원-결합 도메인과 인간 FcRn-결합 도메인이 결합된 항원-결합 분자를 암호화하는 유전자를 수득하고;

[0618] (c) (b)에서 제조된 유전자를 사용하여 항원-결합 분자를 생성시키는

[0619] 단계들을 포함하는, 항원-결합 분자의 생성 방법을 제공한다.

[0620] 바람직한 실시태양에서, 산성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성이 KD 20 마이크로몰 이상(이는 중성 pH 범위에서 본래의 인간 IgG의 경우와 동일하거나 더 강하다)인 항원-결합 분자를 포함하는, 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 본 발명의 항원-결합 분자를 생성시킬 수 있다. 보다 바람직한 실시태양에서, 인간 FcRn-결합 활성이 산성 pH 범위에서 KD 2.0 마이크로몰 이상이고 중성 pH 범위에서 KD 40 마이크로몰 이상인 항원-결합 분자를 포함하는 본 발명의 항원-결합 분자를 또한 생성시킬 수 있다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 바람직하게는, 인간 FcRn-결합 활성이 산성 pH 범위에서 KD 0.5 마이크로몰 이상이고 중성 pH 범위에서 KD 15 마이크로몰 이상인 항원-결합 분자를 포함하는 본 발명의 항원-결합 분자를 생성시킬 수 있다. 상기 KD 값을 문헌[the Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671]에 개시된 방법에 의해 측정한다(침 상에 항원-결합 분자를 고정화하고 분석물로서 인간 FcRn을 로딩함으로써). 하나의 실시태양에서, 산성 및 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자(여기에서 인간 FcRn, 및 중성 pH 범위에서보다 산성 pH 범위에서 더 낮은 항원-결합 활성은 KD 3.2 마이크로 몰보다 더 강하다)를 이전에 개시된 바와 같이 당해 분야의 숙련가에 의해 사용된 방법에 따라 생성시킬 수 있다. 보다 바람직한 실시태양에서, pH 7.0 및 25 °C에서 상기와 같이 생성된 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성은 KD 3.2 마이크로 몰보다 더 강하다.

[0621] 본 발명은 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자의 생성 방법을 제공하며, 여기에서 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성은 KD 2.3 마이크로 몰보다 더 강하다. 본 발명은 또한 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성이 본래의 인간 IgG의 경우보다 38 배 더 강한, 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는, 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인을 포함하는 항원-결합 분자의 생성 방법을 제공한다.

[0622] 상술한 생성 방법에서, 중성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성은, 상기 항원-결합 활성이 pH 6.7 내지 pH 10.0의 pH에서의 활성인 한, 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, WO 2009/125825에 개시된 실시태양을 포함한다. 바람직한 항원-결합 활성은 pH 7.0 내지 pH 8.0의 pH에서의 활성이고, 보다 바람직한 항원-결합 활성은 pH 7.4에서의 활성이다. 한편, 산성 pH 범위에서의 항원-결합 분자의 항원-결합 활성은, 상기 항원-결합 활성이 pH 4.0 내지 pH 6.5의 pH에서의 활성인 한, 특별히 제한되지 않는다. 바람직한 항원-결합 활성은 pH 5.5 내지 pH 6.5의 pH에서의 활성이고, 보다 바람직한 항원-결합 활성은 pH 5.8 또는 pH 5.5에서의 활성이다.

[0623] 항원-결합 분자의 항원-결합 활성 및 인간 FcRn 결합 활성을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 측

정할 수 있다. pH를 제외한 조건들은 당해 분야의 숙련가들에 의해 적합하게 측정될 수 있다.

[0624] 본 발명의 생성 방법에서, 중성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자는, 상기 분자가 pH 6.7 내지 10.0에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 한, 특별히 제한되지 않는다. 그러나, pH 6.7 내지 10.0에서 상기 항원-결합 분자의 인간 FcRn-결합 활성은 바람직하게는 본래의 인간 IgG의 경우보다 더 강하다. 보다 바람직하게는, 상기 항원-결합 분자는 KD 40 마이크로 몰보다 더 강한, 훨씬 더 바람직하게는 KD 15 마이크로 몰보다 더 강한 인간 FcRn-결합 활성을 갖는다.

[0625] 본 발명의 생성 방법에서, 산성 pH 범위에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 항원-결합 분자는, 상기 분자가 pH 4.0 내지 6.5에서 인간 FcRn-결합 활성을 갖는 한, 특별히 제한되지 않는다. 그러나, pH 5.5 내지 6.5에서 상기 항원-결합 분자는 바람직하게는 KD 20 마이크로 몰 보다 더 강한 인간 FcRn-결합 활성을 갖는다. 인간 FcRn-결합 활성은 보다 바람직하게는 본래의 인간 IgG의 경우에 편리하거나 또는 이보다 더 강하고(KD 1.7 마이크로 몰보다 더 강하고), 보다 바람직하게는 KD 0.5 마이크로 몰 보다 더 강하다.

[0626] 상술한 KD 값들을 문헌[The Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671]에 개시된 방법에 의해 측정한다(침상에 항원-결합 분자를 고정화하고 분석물로서 인간 FcRn을 로딩함으로써).

[0627] 본 발명의 생성 방법에서, pH 6.7 내지 pH 10.0에서의 항원-결합 활성이 pH 4.0 내지 pH 6.5에서의 경우보다 더 강한 항원-결합 분자를 선택하는 단계는 pH 4.0 내지 pH 6.5에서 항원-결합 활성이 pH 6.7 내지 pH 10.0에서의 경우보다 더 낮은 항원-결합 분자를 선택하는 단계와 동의어이다.

[0628] 중성 pH 범위 및 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성 간의 비는, 중성 pH 범위에서의 항원-결합 활성이 산성 pH 범위에서의 경우보다 더 강한 한은 특별히 제한되지 않는다. pH 6.7 내지 pH 10.0에서의 항원-결합 활성은 바람직하게는 pH 4.0 내지 pH 6.5에서의 경우보다 2 배 이상, 보다 바람직하게는 10 배 이상, 및 훨씬 더 바람직하게는 40 배 이상 더 강하다.

[0629] 상술한 생성 방법에서, 항원 및 항원-결합 분자를 임의의 상태로 서로 결합시킬 수 있고, 상기 인간 FcRn과 항원-결합 분자를 서로 임의의 상태로 결합시킬 수 있다. 상기 상태는 특별히 제한되지 않으며; 예를 들어, 상기 항원 또는 인간 FcRn을 고정화된 항원-결합 분자와 접촉시켜 상기 항원-결합 분자를 결합시킬 수 있다. 한편으로, 상기 항원-결합 분자를 고정화된 항원 또는 인간 FcRn과 접촉시켜 상기 항원-결합 분자를 결합시킬 수 있다. 한편으로, 상기 항원-결합 분자를 용액 중에서 상기 항원 또는 인간 FcRn과 접촉시켜 상기 항원-결합 분자를 결합시킬 수 있다.

[0630] 상술한 방법에 의해 생성된 항원-결합 분자는 임의의 항원-결합 분자일 수 있으며; 바람직한 항원-결합 분자는 예를 들어 항원-결합 도메인 및 인간 FcRn-결합 도메인(상기 인간 FcRn-결합 도메인 중의 하나 이상의 아미노산의 개변, 및 아미노산(들)에 대한 히스티딘 치환 또는 하나 이상의 히스티딘의 삽입을 함유한다)을 갖는 것들을 포함한다.

[0631] 상기 인간 FcRn-결합 도메인 중의 아미노산 개변은 상기 개변이 중성 pH 범위에서의 인간 FcRn-결합 활성을 증가시키는 한은 특별히 제한되지 않는다. 상기 개변은 예를 들어 상술한 IgG Fc 도메인 중의 221 내지 225, 227, 228, 230, 232, 233 내지 241, 243 내지 252, 254 내지 260, 262 내지 272, 274, 276, 278 내지 289, 291 내지 312, 315 내지 320, 324, 325, 327 내지 339, 341, 343, 345, 360, 362, 370, 375 내지 378, 380, 382, 385 내지 387, 389, 396, 414, 416, 423, 424, 426 내지 438, 440, 및 442 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들의 개변을 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 아미노산 개변은 표 1, 2, 6-1 및 6-2에 나타낸 아미노산 위치(EU 넘버링)의 것들을 포함한다. 바람직하게는, 상기 인간 FcRn-결합 활성을, 237, 238, 239, 248, 250, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 265, 270, 286, 289, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 315, 317, 325, 332, 334, 360, 376, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 424, 428, 433, 434, 및 436 번(EU 넘버링) 위치의 아미노산들 중에서 선택된 하나 이상의 아미노산의 개변에 의해 중성 pH 범위에서 증가시킬 수 있다. 상기 개변되는 아미노산의 수는 특별히 제한되지 않으며; 단지 단일 부위에서 또는 2 개 이상의 부위에서 아미노산을 개변시키는 것이 가능하다. 2 개 이상의 아미노산 개변들의 조합은 예를 들어 표 3, 4-1 내지 4-5, 6-1 및 6-2에 나타낸 것들을 포함한다.

[0632] 한편, 히스티딘 돌연변이가 도입되는 부위는 특별히 제한되지 않으며, 따라서 상기 히스티딘 돌연변이는 상기 돌연변이가 산성 pH 범위에서의 항원-결합 활성을 중성 pH 범위에서의 경우보다 작게 감소시키는 한 임의의 위치에 도입될 수 있다. 상기와 같은 히스티딘 돌연변이를 단일 부위 또는 2 개 이상의 부위에 도입시킬 수도 있다.

- [0633] 따라서, 본 발명의 생성 방법은 상술한 아미노산의 개변 및 히스티딘의 치환 또는 삽입 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 생성 방법에서, 비-천연 아미노산을 히스티딘 대신에 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 상기 언급한 히스티딘을 비-천연 아미노산으로 치환시킴으로써 이해될 수 있다.
- [0634] 더욱 또한, 또 다른 실시태양에서, 상술한 생성 방법에 의해 생성된 항원-결합 분자는 예를 들어 변경된 항체 불변 영역을 포함하는 항원-결합 분자를 포함한다. 따라서, 본 발명의 생성 방법은 항체 불변 영역의 아미노산을 개변시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0635] 본 발명의 생성 방법에 의해 생성된 항원-결합 분자를 혈장 항원 농도의 감소를 촉진하기 위해 투여한다. 따라서, 본 발명의 생성 방법을, 투여 시 혈장 항원 농도의 감소를 촉진하기 위해 항원-결합 분자를 생성시키는 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0636] 한편으로, 본 발명의 생성 방법에 의해 생성된 항원-결합 분자는 개선된 약동학을 갖는다. 따라서, 본 발명의 생성 방법을 개선된 약동학을 갖는 항원-결합 분자를 생성시키는 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0637] 한편으로, 본 발명의 생성 방법에 의해 생성된 항원-결합 분자는 인간, 마우스 및 원숭이와 같은 동물에게 투여 시 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 항원의 수를 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 생성 방법을 단일 항원-결합 분자가 결합할 수 있는 증가된 수의 항원을 갖는 항원-결합 분자를 생성시키는 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0638] 더욱 또한, 본 발명의 생성 방법에 의해 생성된 항원-결합 분자는 인간, 마우스 또는 원숭이와 같은 동물에게 투여 시 세포 외-결합된 항원으로부터 세포 내에서 해리될 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 생성 방법을 세포 외-결합된 항원으로부터 세포 내에서 해리될 수 있는 항원-결합 분자를 생성시키는 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0639] 더욱 또한, 본 발명의 생성 방법에 의해 생성된 항원-결합 분자는 인간, 마우스 또는 원숭이와 같은 동물에게 투여 시 항원에 결합되고 세포 내로 흡수될 뿐만 아니라 항원-부재 형태로 상기 세포 밖으로 방출될 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 생성 방법을 항원에 결합되고 세포 내로 흡수되며, 항원-부재 형태로 상기 세포 밖으로 방출될 수 있는 항원-결합 분자를 생성시키는 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0640] 더욱 또한, 상기와 같은 항원-결합 분자는 전형적인 항원-결합 분자에 비해 투여에 의해 혈장 항원 농도를 감소시키기에 더 큰 활성을 가지므로, 상기 분자는 약제로서 특히 우수한 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 생성 방법을 약학 조성물로서 사용하기 위한 항원-결합 분자를 생성시키는 방법으로서 사용할 수 있다.
- [0641] 본 발명의 생성 방법에 의해 수득된 유전자는 전형적으로는 적합한 벡터에 의해 운반되며(상기 벡터 내로 삽입되며), 이어서 숙주 세포 내로 도입된다. 상기 벡터는 상기 삽입된 핵산을 안정하게 유지하는 한 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 에스케리키아 콜라이를 숙주로서 사용하는 경우, 바람직한 클로닝 벡터는 p블루스크립트(pBluescript) 벡터(스트라타진(Stratagene))를 포함하지만; 다양한 상업적으로 입수할 수 있는 벡터들을 사용할 수도 있다. 본 발명의 항원-결합 분자를 생성시키기 위해 벡터를 사용하는 경우, 발현 벡터가 특히 유용하다. 상기 발현 벡터는 시험관 내, 에스케리키아 콜라이 내, 배양 세포 내, 또는 유기체의 몸 안에서 상기 항원-결합 분자를 발현하는 한 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, pBEST 벡터(프로메가(Promega))가 시험관 내 발현에 바람직하고; pET 벡터(인비트로젠(Invitrogen))는 에스케리키아 콜라이에 대해 바람직하며; pME18S-FL3 벡터(진뱅크 수납 번호 AB009864)는 배양 세포에 바람직하고; pME18S 벡터(문헌[Mol Cell Biol. (1988) 8:466-472])는 유기체의 몸에 바람직하다. 본 발명의 DNA를 통상적인 방법에 의해, 예를 들어 제한 효소 부위를 사용하는 연결에 의해 상기 벡터 내로 삽입할 수 있다(문헌[Current protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel et al., (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 11.4-11.11]).
- [0642] 상기 숙주 세포는 특별히 제한되지 않으며, 다양한 숙주 세포를 목적에 따라 사용할 수 있다. 항원-결합 분자를 발현시키기 위한 세포의 예는 세균 세포(예를 들어 스트렙토코커스, 스타필로코커스, 에스케리키아 콜라이, 스트렙토마이세스 및 바실러스 세포), 진핵생물 세포(예를 들어 효모 및 아스퍼지스의 세포), 곤충 세포(예를 들어 드로소필라 S2 및 스포도프테라 SF9), 동물 세포(예를 들어, CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293 및 보우스 흑색종 세포), 및 식물 세포를 포함한다. 벡터를 공지된 방법, 예를 들어 칼슘 포스페이트 침전 방법, 일렉트로포레이션 방법(문헌[Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 9.1-9.9]), 리포렉션 방법, 및 미세주사 방법에 의해 숙주 세포 내로 도입시킬 수 있다.

- [0643] 상기 숙주 세포를 공지된 방법에 의해 배양할 수 있다. 예를 들어, 숙주로서 동물 세포를 사용하는 경우, DMEM, MEM, RPMI1640, 또는 IMDM을 배양 배지로서 사용할 수 있다. 상기 배지를 FBS 또는 송아지 태아 혈청 (FCS)과 같은 혈청 보충물과 함께 사용할 수도 있다. 상기 세포를 무혈청 배양물 중에서 배양할 수도 있다. 바람직한 pH는 배양 과정 동안 약 6 내지 8이다. 배양을 전형적으로는 약 15 내지 200 시간 동안 30 내지 40 °C에서 수행한다. 배지를 필요에 따라 교환하거나, 통기하거나, 교반한다.
- [0644] 적합한 분비 신호를, 상기 숙주 세포에서 발현된 항원-결합 분자가 소포체의 관강 내로, 원형질 공간 내로, 또는 세포 외 환경 내로 분비되도록 관심 폴리펩타이드에 통합시킬 수 있다. 상기 신호는 상기 관심 항원-결합 분자에 대해 내생적이거나 또는 이종 신호일 수도 있다.
- [0645] 다른 한편으로, 예를 들어 동물 또는 식물을 사용하는 생산 시스템을 생체 내에서 폴리펩타이드를 생산하기 위한 시스템으로서 사용할 수도 있다. 관심 폴리뉴클레오타이드를 동물 또는 식물 내에 도입시키고 상기 폴리펩타이드를 상기 동물 또는 식물의 몸 안에 생성시키고 이어서 수거한다. 본 발명의 "숙주"는 상기와 같은 동물 및 식물을 포함한다.
- [0646] 동물을 사용하는 생산 시스템은 포유동물 또는 곤충을 사용하는 것들을 포함한다. 염소, 돼지, 양, 마우스 및 소와 같은 포유동물을 사용하는 것이 가능하다(문헌[Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)]). 상기 포유동물은 트랜스제닉 동물일 수도 있다.
- [0647] 예를 들어, 본 발명의 항원-결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 우유(milk) 중에서 특이적으로 생성된 폴리펩타이드, 예를 들어 염소 베타-카제인을 암호화하는 유전자와 융합 유전자로서 제조한다. 이어서, 염소 태아에 상기 융합 유전자를 함유하는 폴리뉴클레오타이드 단편을 주사하고, 이어서 암컷 염소에 이식한다. 목적하는 항원-결합 분자를 트랜스제닉 염소(상기 태아를 수태한 염소, 또는 그의 자손으로부터 태어난)에 의해 생산된 우유로부터 수득할 수 있다. 적합한 경우 호르몬을 투여하여 상기 트랜스제닉 염소에 의해 생산된 항원-결합 분자를 함유하는 우유의 부피를 증가시킬 수도 있다(문헌[Ebert et al., Bio/Technology (1994) 12: 699-702]).
- [0648] 누에와 같은 곤충을 사용하여 본 발명의 항원-결합 분자를 생산할 수 있다. 누에를 사용하는 경우, 관심 항원-결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 운반하는 바클로바이러스를 사용하여 누에를 감염시키고, 상기 관심 항원-결합 분자를 그의 체액으로부터 수득할 수 있다.
- [0649] 더욱 또한, 식물을 본 발명의 항원-결합 분자의 생산에 사용하는 경우, 예를 들어 담배를 사용할 수도 있다. 담배가 사용되는 경우, 관심 항원-결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 식물 발현 벡터, 예를 들어 pMON 530에 삽입하고, 이어서 상기 벡터를 세균, 예를 들어 아그로박테리움 투메파시엔스 내로 도입시킨다. 이어서 상기 세균이 니코티아나 타바쿰과 같은 담배를 감염시키게 하고, 목적하는 항원-결합 분자를 상기 담배의 잎으로부터 수거할 수 있다(문헌[Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 131-138]). 한편으로, 좀개구리밥(렘나 미노르)을 유사한 세균으로 감염시키는 것이 가능하다. 클로닝 후, 상기 목적하는 항원-결합 분자를 상기 좀개구리밥 세포로부터 수득할 수 있다(문헌[Cox KM et al., Nat. Biotechnol. 2006 Dec; 24(12): 1591-1597]).
- [0650] 상기와 같이 수득한 항원-결합 분자를 숙주 세포의 내부 또는 외부(예를 들어 배지 및 우유)로부터 단리할 수 있으며, 실질적으로 순수하고 균일한 항원-결합 분자로서 정제할 수 있다. 상기 항원-결합 분자의 단리 및 정제 방법은 특별히 제한되지 않으며, 폴리펩타이드 정제에 통상적으로 사용되는 단리 및 정제 방법을 사용할 수 있다. 항원-결합 분자를, 예를 들어 크로마토그래피 컬럼, 여과, 한외여과, 염석, 용매 침전, 용매 추출, 증류, 면역침전, SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동, 등전점 전기영동, 투석 및 쟈결정화를 적합하게 선택하고 병용하여 단리 및 정제할 수 있다.
- [0651] 크로마토그래피는 예를 들어 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 젤 여과, 역상 크로마토그래피, 및 흡착 크로마토그래피를 포함한다(문헌[Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press]). 상기와 같은 크로마토그래피 방법을 HPLC 및 FPLC와 같은 액상 크로마토그래피를 사용하여 수행할 수 있다. 친화성 크로마토그래피에 사용되는 컬럼은 단백질 A 컬럼 및 단백질 C 컬럼을 포함한다. 단백질 A를 사용하는 컬럼은 예를 들어 하이퍼(Hyper) D, POROS, 및 세파로스 F.F.(파마시아(Pharmacia))를 포함한다.
- [0652] 필요한 경우, 항원-결합 분자를 임의로 변형시킬 수 있으며, 웨타이드를, 적합한 단백질 변형 효소가 상기 항원

-결합 분자의 정체 전 또는 후에 작용하게 함으로써 부분적으로 결실시킬 수 있다. 상기와 같은 단백질 변형 효소는 예를 들어 트립신, 키모트립신, 리실 엔도펩티다제, 단백질 키나제, 및 글루코시다제를 포함한다.

[0653] <약학 조성물>

본 발명은 또한 본 발명의 항원-결합 분자, 본 발명의 선별 방법에 의해 단리된 항원-결합 분자, 또는 본 발명의 생성 방법에 의해 생성된 항원-결합 분자를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항원-결합 분자 및 본 발명의 생성 방법에 의해 생성된 항원-결합 분자는 전형적인 항원-결합 분자에 비해, 투여에 의해 혈장 항원 농도를 감소시키기에 더 큰 능력을 가지며, 따라서 약학 조성물로서 유용하다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

[0655] 본 발명에서, 약학 조성물을 통상적으로는 질병의 치료 또는 예방, 또는 시험 및 진단을 위한 작용제라 칭한다.

[0656] 본 발명의 약학 조성물을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 제형화할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물을 비경구에 의해, 물 또는 다른 약학적으로 허용 가능한 액체를 포함하는 멸균 용액 또는 혼탁액의 주사의 형태로 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기와 같은 조성물을, 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 매질, 구체적으로 멸균 수, 생리 식염수, 식물성 오일, 유화제, 혼탁제, 계면활성제, 안정제, 풍미제, 부형제, 비히클, 보존제, 결합제 등과 적합하게 배합함으로써 일반적으로 승인된 약물 제조 실시에 필요한 단위 용량의 형태로 혼합함으로써 제형화할 수 있다. 상기와 같은 제형에서, 활성 성분의 양을, 적합한 양을 소정의 범위로 획득하기 위해 조절한다.

[0657] 주사용 멸균 조성물을 표준 제형화 실시에 따라, 비히클, 예를 들어 주사용 중류수를 사용하여 제형화할 수 있다. 주사용 수용액은 예를 들어 생리식염수, 및 텍스트로스 또는 다른 보조제(예를 들어 D-솔비톨, D-만노오스, D-만니톨, 및 염화 나트륨)를 함유하는 등장성 용액을 포함한다. 적합한 용해제들, 예를 들어 알콜(에탄올 등), 폴리알콜(프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 비-이온성 계면활성제(폴리솔베이트 80(상표), HCO-50 등)를 함께 사용하는 것도 또한 가능하다.

[0658] 오일은 참깨 오일 및 대두 오일을 포함한다. 벤질 벤조에이트 및/또는 벤질 알콜을 용해제로서 함께 사용할 수 있다. 완충제(예를 들어 포스페이트 완충제 및 나트륨 아세테이트 완충제), 진정제(예를 들어 프로카인 하이드로클로라이드), 안정제(예를 들어 벤질 알콜 및 폐놀), 및/또는 산화방지제를 병용하는 것도 또한 가능하다. 적합한 앰풀을 상기 제조된 주사액으로 충전한다.

[0659] 본 발명의 약학 조성물을 바람직하게는 비경구 투여한다. 예를 들어 상기 조성물은 주사, 경비 투여, 경폐 투여, 또는 경피 투여를 위한 투여일 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물을 정맥 내 주사, 근육 내 주사, 복강 내 주사, 피하 주사 등에 의해 전신 또는 국소 투여할 수 있다.

[0660] 투여 방법을 환자의 연령 및 증상을 고려하여 적합하게 선택할 수 있다. 항원-결합 분자를 함유하는 약학 조성물의 용량은 예를 들어 각각의 투여에 대해 0.0001 내지 1,000 mg/kg일 수 있다. 한편으로, 상기 용량은 예를 들어 환자당 0.001 내지 100,000 mg일 수 있다. 그러나, 본 발명은 상술한 수치들로 제한되지 않는다. 상기 용량 및 투여 방법은 환자의 체중, 연령, 증상 등에 따라 변한다. 당해 분야의 숙련가들은 상술한 인자들을 고려하여 적합한 용량 및 투여 방법을 정할 수 있다.

[0661] 본 발명의 아미노산 서열 중에 함유된 아미노산을 번역 후 변형시킬 수도 있다. 예를 들어 N-말단 글루타민을 피로글루타밀화에 의해 피로글루탐산으로 변형시키는 것은 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지되어 있다. 물론, 상기와 같은 번역 후 변형된 아미노산들은 본 발명의 아미노산 서열 중에 포함된다.

[0662] 명세서에 인용된 모든 선행 기술 문헌들은 본 발명에 참고로 인용된다.

[0663] 실시예

[0664] 하기에서, 본 발명을 실시예들을 참고로 구체적으로 개시할 것이다, 본 발명이 이를 실시예로 제한되는 것으로 해석해서는 안 된다.

[0665] [실시예 1] 항체의 항원 제거-촉진 효과의 증대에 대한 연구

[0666] 항-IL-6 수용체 항체

[0667] 중성 조건 하에서 FcRn-결합 활성을 갖는 항-인간 IL-6 수용체 항체의 제조

[0668] WO 2009/125825에 개시된 H54(서열번호 1) 및 L28(서열번호 2)을 포함하는 H54/L28-IgG1은 인간화된 항-IL-6

수용체 항체이다. 돌연변이(mutation)를 H54(서열번호 1)에 도입시켜 중성 pH 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합을 증가시켰다. 구체적으로, H54-IgG1-F14(서열번호 3)를, EU 넘버링에서 252 번 위치에서 Met 대신에 Trp를 치환하고 434번 위치에서 Asn 대신에 Trp를 치환하여 IgG1의 중쇄 불변 영역(heavy chain constant region)으로부터 제조하였다. 상기 아미노산 치환을 비교 실시예 1에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 도입시켰다.

[0669] H54(서열번호 1) 및 L28(서열번호 2)을 포함하는 H54/L28-IgG1 및 H54-IgG1-F14(서열번호 3) 및 L28(서열번호 2)을 포함하는 H54/L28-IgG1-F14를 비교 실시예 2에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현시키고 정제시켰다.

[0670] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 계열 276을 사용하는 정상 상태 주입 모델에 의한 항체의 생체 내 연구

[0671] 상술한 바와 같이 제조된 H54/L28-IgG1 및 H54/L28-IgG1-F14를 사용하여, 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 계열 276을 사용하는 정상 상태 주입 모델에 의해 생체 내 시험을 수행하였다. 가용성 인간 IL-6 수용체를 함유하는 주입 펌프(MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004; 알젯)를 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 계열 276(B6.mFcRn-/-hFcRn Tg 계열 276 +/+ 마우스 (B6.mFcRn-/- hFCRN Tg276 B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr> Tg(FCGRT)276Dcr (잭슨(Jackson) #4919)), 잭슨 레보라토리즈(Jackson Laboratories); Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104)의 등 피부 아래에 이식하여 모델 동물(상기 동물에서 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도를 일정하게 유지시켰다)을 준비하였다. 항-인간 IL-6 수용체 항체를 상기 모델 동물에게 투여하여 가용성 인간 IL-6 수용체 투여 후의 생체 내 역학을 평가하였다. 단클론 항-마우스 CD4 항체(R&D)를 주입 펌프 이식 전 및 꼬리 정맥 내로 항체 투여 후 14 일째에 20 mg/kg으로 투여하여 가용성 인간 IL-6 수용체에 대한 중화 항체의 생성을 억제하였다. 이어서, 92.8 마이크로그램/ml의 가용성 인간 IL-6 수용체를 함유하는 주입 펌프를 상기 마우스의 등 피부 아래에 이식하였다. 주입 펌프 이식 3일 후에 항-인간 IL-6 수용체 항체(H54/L28-IgG1 및 H54/L28-IgG1-F14)를 꼬리 정맥에 1 mg/kg으로 1 회 투여하였다. 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 15 분, 7 시간, 1일, 2일, 3일, 4 일, 7일, 14일, 21일 및 28일째에 채혈하였다. 상기 채혈된 혈액을 즉시 15,000 rpm 및 4 °C에서 15 분간 원심 분리하여 혈장을 분리시켰다. 상기 분리된 혈장을 분석 전에 -20 °C 이하의 냉장고에 보관하였다.

[0672] 전기화학발광 분석에 의한 혈장 hsIL-6R 농도의 측정

[0673] 마우스 혈장 중 hsIL-6R의 농도를 전기화학발광에 의해 측정하였다. 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5 및 31.25 pg/ml의 농도로 조절된 hsIL-6R 검량선(calibration curve) 샘플, 및 50 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 상기 샘플들을, 설포-태그 NHS 이스터(Sulfo-Tag NHS Ester)(메소 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery)), 비오틴화된 항-인간 IL-6R 항체(R&D), 및 WT-IgG1을 갖는 루테늄-표지된 단클론 항-인간 IL-6R 항체(R&D) 용액과 혼합하고, 이어서 37 °C에서 밤새 반응시켰다. H(WT)(서열번호 4) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는, 항-인간 IL-6 수용체 항체로서 WT-IgG1의 최종 농도는 상기 샘플 중의 hsIL-6R 분자 거의 모두를 WT-IgG1에 결합시키기 위해서 333 마이크로그램/ml이었으며, 이는 상기 샘플 중에 함유된 항-인간 IL-6 수용체 항체의 농도를 초과한다. 후속적으로, 상기 샘플을 MA400 PR 스트렙트아비딘 플레이트(메소 스케일 디스커버리)에 분배(dispensed)하고, 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 세척을 수행하였다. 판독 완충제(Read Buffer) T(x4)(메소 스케일 디스커버리)를 분배한 직후에, 섹터(Sector) PR 400 판독기(메소 스케일 디스커버리)에 의해 측정을 수행하였다. 상기 hsIL-6R 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax RPO(몰레큘라 디바이시즈(Molecular Devices))를 사용하여 검량선의 반응을 근거로 계산하였다. 이 방법에 의해 측정된 바와 같은 H54/L28-IgG1 및 H54/L28-IgG1-F14의 정맥 내 투여 후 혈장 hsIL-6R 농도의 시간 과정을 도 1에 도시한다.

[0674] 도 1에 도시된 바와 같이, 항체 부재 하의 기준선 hsIL-6R 농도에 비해, H54/L28-IgG1의 투여는 혈장 hsIL-6R 농도의 현저한 상승을 생성시켰다. 다른 한편으로, H54/L28-IgG1-F14의 투여는 H54/L28-IgG1에 비해 혈장 hsIL-6R 농도의 상승을 감소시켰다. 이러한 상승의 감소는 H54/L28-IgG1에 비해 H54/L28-IgG1-F14에서 중성 pH에서의 증가된 인간 FcRn 결합으로부터 유래한다. 이는 중성 pH에서 FcRn에 대한 항체의 증가하는 결합 친화성이 항원의 제거를 증대시킬 수 있지만, 항원 제거 증대의 정도는 H54/L28-IgG1에 비해 H54/L28-IgG1-F14의 경우 작았다.

[0675] [실시예 2] pH-의존성 항원-결합 항체의 항원 제거-촉진 효과의 증대에 대한 연구(항체의 제조)

[0676] pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체에 관하여

[0677] WO 2009/125825에 개시된 H54(서열번호 1) 및 L28(서열번호 2)을 포함하는 H54/L28-IgG1은 인간화된 항-IL-6 수용체 항체이다. VH3-IgG1(서열번호 6) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-IgG1은, pH-의존적인 방식으로

가용성 인간 IL-6 수용체에 결합하는(pH 7.4에서 결합하지만 pH 5.8에서 해리되는) 성질을 H54/L28-IgG1에 부여하여 생성되는 인간화된 항-IL-6 수용체 항체이다. 마우스를 사용하는 WO 2009/125825에 개시된 생체 내 시험은 가용성 인간 IL-6 수용체의 제거가, 항원으로서 가용성 인간 IL-6 수용체 및 H54/L28-IgG1의 혼합물이 투여된 그룹에 비해, Fv4-IgG1 및 항원으로서 가용성 인간 IL-6 수용체의 혼합물이 투여된 그룹에서 대단히 촉진될 수 있음을 입증하였다.

[0678] 가용성 인간 IL-6 수용체에 결합하는 통상적인 항체에 결합된 가용성 인간 IL-6 수용체는 FcRn을 통해 항체와 함께 혈장으로 재순환된다. 한편, pH-의존적인 방식으로 가용성 인간 IL-6 수용체에 결합하는 항체는 엔도솜 중의 산성 조건 하에서 상기 항체에 결합된 가용성 인간 IL-6 수용체를 해리한다. 상기 해리된 가용성 인간 IL-6 수용체는 리소ーム 중에서 분해된다. 이는 가용성 인간 IL-6 수용체의 제거를 크게 촉진할 수 있다. 이어서, pH-의존적인 방식으로 가용성 인간 IL-6 수용체에 결합하는 항체는 FcRn을 통해 혈장으로 재순환된다. 상기 재순환된 항체는 다시 또 다른 가용성 인간 IL-6 수용체와 결합할 수 있다. 이러한 순환을 반복함으로써, 단일 항체 분자는 가용성 인간 IL-6 수용체에 수 회 반복적으로 결합할 수 있다(도 2).

[0679] pH-의존적인 방식으로 항원에 결합하는 항체는 가용성 항원의 제거를 촉진한다. 상기 항체는 가용성 항원에 수 회 반복적으로 결합함으로써 상기 효과를 생성시킨다. 따라서, 상기와 같은 항체는 매우 유용하다. 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합을 증대시키는 방법을 시험하여 상기 항원 제거-촉진 효과를 더욱 증대시켰다.

[0680] 중성 조건 하에서 FcRn-결합 활성을 갖는 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체의 제조

[0681] 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합을 증대시키기 위해 VH3-IgG1(서열번호 6) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-IgG1에 돌연변이를 도입시켰다. 구체적으로, VH3-IgG1-v1(서열번호 8)를, EU 넘버링에서 252 번 위치에서 Met 대신에 Tyr을 치환하고 254 번 위치에서 Ser 대신에 Thr을 치환하고, 256 번 위치에서 Thr 대신에 Glu를 치환하여 IgG1의 중쇄 불변 영역으로부터 제조한 반면, VH3-IgG1-v2(서열번호 9)는, EU 넘버링에서 434 번 위치에서 Asn 대신에 Trp를 치환하여 IgG1의 중쇄 불변 영역으로부터 제작하였다. 상기 아미노산 치환을 비교 실시 예 1에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 도입시켰다.

[0682] H54(서열번호 1) 및 L28(서열번호 2)을 포함하는 H54/L28-IgG1, VH3-IgG1(서열번호 6) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-IgG1, VH3-IgG1-v1(서열번호 8) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-IgG1-v1, 및 VH3-IgG1-v2(서열번호 9) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-IgG1-v2를 비교 실시 예 2에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현시키고 정제시켰다.

[0683] [실시예 3] pH-의존성 항원-결합 항체의 항원 제거-촉진 효과의 증대에 대한 연구(생체 내 시험)

[0684] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 및 정상 마우스를 사용하는 생체 내 시험

[0685] hsIL-6R(가용성 인간 IL-6 수용체: 비교 실시예 3에 개시된 바와 같이 제조됨) 및 항-인간 IL-6 수용체 항체의 생체 내 동역학을 hsIL-6R 단독 또는 hsIL-6R과 항-인간 IL-6 수용체 항체를 함께 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(B6.mFcRn/-hFcRn Tg 276 계열 +/+ 마우스, 잭슨 레보라토리즈; [Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104]) 및 정상 마우스(C57BL/6J 마우스; 찰스 리버 재팬(Charles River Japan)에게 투여한 후 평가하였다. hsIL-6R 용액(5 마이크로그램/ml) 또는 hsIL-6R 및 항-인간 IL-6 수용체 항체(각각 5 마이크로그램/ml 및 0.1 mg/ml)를 함유하는 혼합물의 용액을 꼬리 정맥 내로 10 ml/kg의 용량으로 1 회 투여하였다. 이 경우에, 상기 항-인간 IL-6 수용체 항체는 hsIL-6R에 의해 과잉으로 존재하며, 따라서 거의 모든 hsIL-6R이 상기 항체에 결합하는 것으로 추정된다. 투여 후 15 분, 7 시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 7일, 14일, 21일 및 28일째에 채혈하였다. 상기 채혈된 혈액을 즉시 15,000 rpm 및 4 °C에서 15 분간 원심분리하여 혈장을 분리시켰다. 상기 분리된 혈장을 분석 전에 -20 °C 이하의 냉장고에 보관하였다. 상기 사용된 항-인간 IL-6 수용체 항체는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스의 경우 상술한 H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, 및 Fv4-IgG1-v2이고, 정상 마우스의 경우 상술한 H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v1, 및 Fv4-IgG1-v2이다.

[0686] ELISA에 의한 항-인간 IL-6 수용체 항체 혈장 농도의 측정

[0687] 마우스 혈장 중의 항-인간 IL-6 수용체 항체의 농도를 ELISA에 의해 측정하였다. 항-인간 IgG(감마-쇄 특이성) F(ab')2 항체 단편(시그마(Sigma))을 능크-임무노플레이트 맥시솝(Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp)(날개 능크 인터내셔널(Nalge Nunc International)) 상에 분배하고 4 °C에서 밤새 정치시켜 항-인간 IgG-고정화된 플레이트를 제조하였다. 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 및 0.0125 마이크로그램/ml의 혈장 농도를 갖는 검량선 샘플, 및 100 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 200 마이크로리터(마이크로L)의 20 ng/ml hsIL-6R을 100 마이크로리터의 상기 검량선 샘플 및 혈장 샘플에 가하고, 이어서 상기 샘플들을 실온에서 1 시간 동안 정

치시켰다. 후속적으로, 상기 샘플들을 항-인간 IgG-고정화된 플레이트에 분배하고 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 이어서, 비오틴화된 항-인간 IL-6R 항체(R&D)를 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 후속적으로, 스트렙트아비딘-폴리HRP80(스테레오스페시픽 디텍션 테크놀로지스(Stereospecific Detection Technologies))을 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 기질로서 TMP 원 컴포넌트 HRP 마이크로웰 서브스트레이트(TMP One Component HRP Microwell Substrate)(BioFX 레보라토리즈)를 사용하여 발색 반응을 수행하였다. 1N 황산(쇼와 케미칼(Showa Chemical))으로 상기 반응을 정지시킨 후에, 450 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정하였다. 마우스 혈장 중의 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO(몰레큘라 디바이시즈)를 사용하여 상기 검량선의 흡광도로부터 계산하였다. 상기 방법에 의해 측정된 바와 같은 정맥 내 투여 후 혈장 농도의 시간 과정을 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스의 경우 도 3에, 정상 마우스의 경우 도 5에 나타낸다.

[0688] 전기화학발광 분석에 의한 hsIL-6R 혈장 농도의 측정

마우스 혈장 중의 hsIL-6R의 농도를 전기화학발광에 의해 측정하였다. 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5 및 31.25 pg/ml 농도로 조절된 hsIL-6R 검량선 샘플, 및 50 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 상기 샘플들을, 설포-태그 NHS 이스터(메소 스케일 디스커버리), 비오틴화된 항-인간 IL-6R 항체(R&D), 및 WT-IgG1을 갖는 루테늄-표지된 단클론 항-인간 IL-6R 항체(R&D) 용액과 혼합하고, 이어서 37 °C에서 밤새 반응시켰다. H(WT)(서열번호 4) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는, 항-인간 IL-6 수용체 항체로서 WT-IgG1의 최종 농도는 상기 샘플 중의 hsIL-6R 문자 거의 모두를 WT-IgG1에 결합시키기 위해서 333 마이크로그램/ml이었으며, 이는 상기 샘플 중에 함유된 항-인간 IL-6 수용체 항체의 농도를 초과한다. 후속적으로, 상기 샘플을 MA400 PR 스트렙트아비딘 플레이트(메소 스케일 디스커버리)에 분배하고, 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 세척을 수행하였다. 판독 완충제 T(x4)(메소 스케일 디스커버리)를 분배한 직후에, 섹터 PR 400 판독기(메소 스케일 디스커버리)에 의해 측정을 수행하였다. 상기 hsIL-6R 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax RPO(몰레큘라 디바이시즈)를 사용하여 검량선의 반응을 근거로 계산하였다. 이 방법에 의해 측정된 바와 같은 정맥 내 투여 후 혈장 hsIL-6R 농도의 시간 과정을 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스의 경우 도 4에, 정상 마우스의 경우 도 6에 나타낸다.

[0689] 전기화학발광 분석에 의한 혈장 중 유리 hsIL-6R 농도의 측정

혈장 중 가용성 인간 IL-6 수용체의 중화도를 평가하기 위해서, 마우스 혈장 중의 항-인간 IL-6 수용체 항체가 없는(상기 항체에 의해 중화되지 않은) 가용성 인간 IL-6 수용체의 농도(유리 hsIL-6R 농도)를 전기화학발광 분석에 의해 측정하였다. 혈장 중의 모든 IgG-유형 항체들(마우스 IgG, 항-인간 IL-6 수용체 항체, 및 항-인간 IL-6 수용체 항체-가용성 인간 IL-6 수용체 복합체)을, 10,000, 5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5, 또는 156.25 pg/ml로 제조된 hsIL-6R 표준 샘플 및 마우스 혈장 샘플 각각 12 마이크로리터를 0.22-마이크로미터 필터 컵(밀리포어(Millipore)) 상에서 건조된 적합한 양의 r프로테인 A 세파로스 패스트 플로우(rProtein A Sepharose Fast Flow)(GE 헬쓰케어) 수지상에 첨가함으로써 단백질 A 상에 흡착시켰다. 이어서, 컵 중의 용액을 고속 원심분리기를 사용하여 회전시켜 관통된 용액을 수거하였다. 상기 관통된 용액은 단백질 A-결합된 항-인간 IL-6 수용체 항체-가용성 인간 IL-6 수용체 복합체를 함유하지 않는다. 따라서, 혈장 중 유리 hsIL-6R의 농도를 상기 관통된 용액 중의 hsIL-6R의 농도를 측정함으로써 측정할 수 있다. 이어서, 상기 관통된 용액을 설포-태그 NHS 이스터(메소 스케일 디스커버리) 및 비오틴화된 항-인간 IL-6R 항체(R&D)를 갖는 루테늄-표지된 단클론 항-인간 IL-6R 항체(R&D)와 혼합하였다. 상기 생성 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 배양하고, 이어서 MA400 PR 스트렙트아비딘 플레이트(메소 스케일 디스커버리)에 분배하였다. 실온에서 추가로 1 시간 배양한 후에, 상기 플레이트를 세척하고 판독 완충제 T(x4)(메소 스케일 디스커버리)를 상기에 분배하였다. 바로, 상기 플레이트를 섹터 PR 400 판독기(메소 스케일 디스커버리)에서 측정하였다. 상기 hsIL-6R 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax RPO(몰레큘라 디바이시즈)를 사용하여 표준 곡선의 반응을 근거로 계산하였다. 상술한 방법에 의해 측정된 정맥 내 투여 후 정상 마우스의 혈장 중 유리 hsIL-6R 농도의 시간 과정을 도 7에 나타낸다.

[0690] 인간 IL-6 수용체에 대한 pH-의존적인 결합의 효과

pH-의존적인 방식으로 인간 IL-6 수용체에 결합하는 H54/L28-IgG1 및 Fv4-IgG1을 생체 내에서 시험하고, 결과를 이들 사이에서 비교하였다. 도 3 및 5에 나타낸 바와 같이, 혈장 중 항체 체류는 필적할만하였다. 한편, 도 4 및 6에 나타낸 바와 같이, pH-의존적인 방식으로 인간 IL-6 수용체에 결합하는 Fv4-IgG1과 동시에 투여된 hsIL-6R은 H54/L28-IgG1과 동시에 투여된 hsIL-6R에 비해 hsIL-6R의 제거를 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 상기 경향은 인간 FcRn 트랜스제닉 및 정상 마우스 모두에서 관찰되었으며; 따라서 pH-의존적인 인간 IL-6 수용체-결합 능력을 부여함으로써, 상기 투여의 4일 후에 상기 혈장 hsIL-6R 농도를 각각 약 17 배 및 34 배까지 감소시킬 수 있

음이 입증되었다.

[0694] 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합의 효과

본래의 인간 IgG1은 중성 조건(pH 7.4) 하에서 인간 FcRn에 거의 결합하지 않는(대단히 낮은 친화성을 갖는) 것으로 보고되었다. 중성 조건(pH 7.4) 하에서 상기 인간 FcRn 결합은 본래의 인간 IgG1에서 434 번 위치(EU 넘버링)의 Asn 대신에 Trp를 치환함으로써 증대되는 것으로 보고되었다(문헌[J Immunol. (2009) 182 (12): 7663-71]). 상기 아미노산 치환을 Fv4-IgG1에 도입시킴으로부터 생성되는 Fv4-IgG1-v2를 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스를 사용하는 생체 내 시험에 의해 시험하였다. 상기 시험 결과를 Fv4-IgG1의 결과와 비교하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 항체 혈장 체류는 상기 둘 간에 필적할만하였다. 한편, 도 4에 나타낸 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 증대된 인간 FcRn 결합을 나타내는 Fv4-IgG1-v2와 동시에 투여된 hsIL-6R은 Fv4-IgG1과 동시에 투여된 hsIL-6R에 비해 더 빨리 제거되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 인간 FcRn에 결합하는 능력을 부여함으로써, 상기 투여 후 4일째에 hsIL-6R의 혈장 농도를 약 4 배까지 감소시킬 수 있음이 입증되었다.

[0695] 인간 FcRn과 마우스 FcRn 간의 상동성을 근거로, EU 넘버링에서 434 번 위치의 Asn 대신에 Trp의 치환은 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대한 결합을 증대시키는 것으로 추정된다. 한편, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대한 결합은 EU 넘버링에서 252 번 위치의 Met 대신에 Tyr, 254 번 위치의 Ser 대신에 Thr, 및 256 번 위치의 Thr 대신에 Glu를 치환시킴으로써 증대되는 것으로 보고되었다(문헌[J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80]). Fv4-IgG1에 상술한 아미노산 치환의 도입으로부터 생성되는 Fv4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2를 정상 마우스를 사용하여 생체 내에서 시험하였다. 상기 시험 결과를 Fv4-IgG1의 결과와 비교하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대한 결합이 증가하도록 또한 개선시킨 Fv4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2의 혈장 체류 시간은 Fv4-IgG1에 비해 약간 단축되었다(상기 투여 후 하루 째에 혈장 중 중화 항체 농도가 각각 약 1.5 및 1.9 배까지 감소되었다).

도 6에 나타낸 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대한 결합이 증가하도록 개선시킨 Fv4-IgG1-v1 또는 Fv4-IgG1-v2와 동시에 투여된 hsIL-6R은 Fv4-IgG1과 동시에 투여된 hsIL-6R에 비해 현저하게 더 빠르게 제거되는 것으로 입증되었다. Fv4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2는 투여 후 하루 째에 혈장 hsIL-6R 농도를 각각 약 32 및 80 배까지 감소시켰다. 따라서, 상기 혈장 농도를, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력을 부여함으로써 감소시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 상술한 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력을 부여함으로써, 상기 혈장 항체 농도가 약간 감소되었으나; 항체 농도의 감소를 크게 초과하는 혈장 hsIL-6R 농도의 감소 효과가 생성되었다. 더욱 또한, Fv4-IgG1-v1 또는 Fv4-IgG1-v2와 동시에 투여된 hsIL-6R은 hsIL-6R 단독으로 투여된 그룹과 비교할 때 조차 더 빨리 제거되는 것으로 밝혀졌다. 도 6에 나타낸 바와 같이, Fv4-IgG1-v1 또는 Fv4-IgG1-v2와 동시에 투여된 hsIL-6R은 hsIL-6R 단독에 비해, 상기 투여 후 하루 째에 혈장 hsIL-6R 농도를 각각 약 4 또는 11 배까지 감소시킬 수 있는 것으로 입증되었다. 구체적으로, 이는 pH-의존적인 방식으로 가용성 IL-6 수용체에 결합하고 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력이 부여된 항체를 투여함으로써 가용성 IL-6 수용체의 제거를 촉진할 수 있음을 의미한다. 구체적으로, 신체에 상기와 같은 항체를 투여함으로써 생체 내에서 혈장 항원 농도를 감소시킬 수 있다.

[0696] 도 7에 나타낸 바와 같이, 유리 hsIL-6R은 H54/L28-IgG1 투여 후 7일 동안 검출 가능한 농도 범위에 있는 반면, 유리 hsIL-6R은 Fv4-IgG1 투여에 이어서 하루 후에 검출할 수 없었다. 한편으로, 유리 hsIL-6R을 Fv4-IgG1-v1 또는 Fv4-IgG1-v2의 투여에 이어서 7 시간 후에 검출할 수 없었다. 구체적으로, 상기 유리 hsIL-6R 농도는 H54/L28-IgG1에 비해 pH-의존적인 방식으로 hsIL-6R에 결합하는 Fv4-IgG1의 존재 하에서 더 낮으며, 이는 강한 hsIL-6R-중화 효과가 pH-의존적인 hsIL-6R-결합 능력을 부여함으로써 생성되었음을 암시한다. 더욱 또한, 상기 유리 hsIL-6R 농도는 Fv4-IgG1-v1 또는 Fv4-IgG1-v2의 존재 하에서 훨씬 더 낮으며, 이 둘은 모두 pH 7.4에서 상기 FcRn-결합 능력을 증가시키도록 Fv4-IgG1으로부터 변형되었다. 이는 훨씬 더 강한 hsIL-6R-중화 효과가 pH 7.4에서 상기 FcRn-결합 능력을 증가시킴으로써 생성될 수 있음을 입증한다.

[0697] H54/L28-IgG1과 같은 통상적인 중화 항체는 투여 시, 결합 항원의 제거를 감소시켜, 연장된 항원 혈장 체류를 생성시킨다. 투여된 항체가 상기 항체에 의해 중화하고자 하는 작용을 갖는 항원의 혈장 체류를 연장시키는 것은 바람직하지 않다. 상기 항원 혈장 체류를, 항원 결합에 대한 pH 의존성을 부여함으로써 단축할 수 있다(상기 항체는 중성 조건 하에서 결합하지만 산성 조건 하에서는 해리된다). 본 발명에서, 혈장 중 항원 체류 시간을 중성 조건(pH 7.4) 하에서 인간 FcRn-결합 능력을 추가로 부여함으로써 추가로 단축할 수 있었다. 더욱 또한, 항원 단독의 제거에 비해, pH 의존적인 방식으로 항원에 결합하고 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn-결합 능

력이 부여된 항체를 투여함으로써 항원 제거를 증가시킬 수 있음이 입증되었다. 지금까지, 항원 단독 제거에 비해 항체 투여에 의한 항원 제거의 증가에 이용할 수 있는 방법은 없었다. 따라서, 본 실시예에 개시된 바와 같이 확립된 방법은 항체 투여에 의해 혈장으로부터 항원을 제거하는 방법으로서 매우 유용하다. 더욱 또한, 본 발명자들은 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn-결합 능력을 증가시키는 이점을 최초로 발견하였다. 더욱 또한, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 상기 FcRn-결합 능력을 증가시키는 상이한 아미노산 치환을 갖는 v4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2 모두가 필적하는 효과를 생성시켰다. 이는 아미노산 치환의 유형에 관계없이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 인간 FcRn-결합 능력을 증가시키는 모든 아미노산 치환은 잠재적으로 항원 제거를 촉진하는 효과를 가짐을 암시한다. 구체적으로, 투여 시 혈장으로부터 항원을 제거하는 항체 분자를, 하기 아미노산 치환들을 단독으로 또는 함께 사용하여 생성시킬 수 있다:

[0700]

EU 넘버링에서 257 번 위치의 Pro 대신에 Ile의 아미노산 치환 및 311 번 위치의 Gln 대신에 Ile의 아미노산 치환(이 둘은 모두 문헌[J Biol Chem. 2007, 282(3): 1709-17]에 보고되었다); EU 넘버링에서 434 번 위치의 Asn 대신에 Ala, Tyr 또는 Trp의 아미노산 치환, 252 번 위치의 Met 대신에 Tyr의 아미노산 치환, 307 번 위치의 Thr 대신에 Gln의 아미노산 치환, 308 번 위치의 Val 대신에 Pro의 아미노산 치환, 250 번 위치의 Thr 대신에 Gln의 아미노산 치환, 428 번 위치의 Met 대신에 Leu의 아미노산 치환, 380 번 위치의 Glu 대신에 Ala의 아미노산 치환, 378 번 위치의 Ala 대신에 Val의 아미노산 치환, 및 436 번 위치의 Tyr 대신에 Ile의 아미노산 치환(이들은 모두 문헌[J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71]에 보고되었다); EU 넘버링에서 252 번 위치의 Met 대신에 Tyr의 아미노산 치환, 254 번 위치의 Ser 대신에 Thr의 아미노산 치환, 256 번 위치의 Thr 대신에 Glu의 아미노산 치환(이들은 모두 문헌[J Biol Chem. 2006 Aug. 18, 281(33): 23514-24]에 보고되었다); EU 넘버링에서 433 번 위치의 His 대신에 Lys의 아미노산 치환, 434 번 위치의 Asn 대신에 Phe의 아미노산 치환, 436 번 위치의 Tyr 대신에 His의 아미노산 치환(이들은 모두 문헌[Nat Biotechnol. 2005 Oct. 23(10): 1283-8]에 보고되었다) 등.

[0701]

[실시예 4] 인간 FcRn-결합 활성의 평가

[0702]

항체와 FcRn 간의 상호작용을 시험하기 위한 비아코어-기재 분석 시스템에 대해서, 센서 칩 상에 항체를 고정화하고 분석물로서 인간 FcRn을 사용하는 시스템이 문헌[J Immunol. (2009) 182(12): 7663-71]에 보고되어 있다. 이를 위해서, 인간 FcRn을 비교 실시예 4에 개시된 바와 같이 제조하였다. Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2를 상술한 시스템을 사용함으로써 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 인간 FcRn-결합 활성(해리 상수 (KD))에 대해 평가하였다. 상기 항체들을 시리즈 S 센서 칩 CM5 상에 직접적인 고정화 후에 시험 물질로서 시험하였다. 상기 공급자의 설명서에 따라 아미노-결합 키트를 사용하여, 500 RU의 고정화 양을 확보하기 위해서 항체들을 센서 칩 상에 고정화시켰다. 사용된 실행 완충제는 0.05%(v/v%) 계면활성제 P20(pH 6.0)을 함유하는 50 mmol/1 Na-포스페이트/150 mmol/1 NaCl이었다.

[0703]

상기 제조된 센서 칩을 사용하여, 실행 완충제, 0.05%(v/v%) 계면활성제 P20(pH 6.0)을 함유하는 50 mmol/1 Na-포스페이트/150 mmol/1 NaCl 또는 0.05%(v/v%) 계면활성제 P20(pH 7.4)을 함유하는 50 mmol/1 Na-포스페이트/150 mmol/1 NaCl을 사용하여 분석을 수행하였다. 분석을 오직 25 °C에서만 수행하였다. 상기 회석된 인간 FcRn 용액 및 비교 용액으로서 실행 완충제를 10 분 동안 5 마이크로리터/분의 유량으로 주사하여 인간 FcRn이 상기 칩 상의 항체와 상호작용하게 하였다. 이어서 상기 실행 완충제를 5 마이크로리터/분의 유량의 1 분 동안 주사하여 FcRn의 해리를 모니터하였다. 이어서, 상기 센서 칩을 15 초 동안 30 마이크로리터/분의 유량으로 20 mmol/1 트리스-HCl/150 mmol/1 NaCl(pH 8.1)의 2 라운드의 주사에 의해 재생시켰다.

[0704]

상기 분석 결과를 비아코어 T100 평가 소프트웨어(Ver. 2.0.1)를 사용하여 분석하였다. 정상 상태 친화성 방법에 의해, 해리 상수(KD)를 6 개의 상이한 FcRn 농도에서 상기 분석 결과로부터 계산하였다. pH 6.0 및 pH 7.4에서 Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2의 인간 FcRn-결합 활성(해리 상수(KD))에 대한 결과를 하기 표 5에 나타낸다.

[0705]

[표 5]

	KD(μ M)	
	pH6.0	pH7.4
Fv4-IgG1	1.99	NA
Fv4-IgG1-v1	0.32	36.55
Fv4-IgG1-v2	0.11	11.03

[0706]

[0707]

pH 7.4에서, Fv4-IgG1에 대한 인간 FcRn의 결합은 KD 값을 측정하기에 너무 약하였다(NA). 한편, Fv4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2는 pH 7.4에서 인간 FcRn에 결합하는 것으로 관찰되었고, KD 값은 각각 36.55 및 11.03 마이크로몰인 것으로 측정되었다. pH 6.0에서 인간 FcRn에 대한 KD 값은 1.99, 0.32 및 0.11 마이크로몰인 것으로 측정되었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, Fv4-IgG1에 비해, Fv4-IgG1-v2는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에서 hsIL-6R의 제거를 촉진하였다. 따라서, 항원 제거는, pH 7.4에서의 인간 FcRn 결합을 인간 IgG1의 변경에 의해 적어도 11.03 마이크로몰보다 더 강하게 증대시킴으로써 촉진되는 것으로 예견될 수 있다. 한편, 문헌[J Immunol. (2002) 169(9): 5171-80]에 개시된 바와 같이, 인간 IgG1은 인간 FcRn보다 마우스 FcRn에 대해 약 10 배 더 강하게 결합한다. 이러한 이유로 인해, Fv4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2는 또한 pH 7.4에서 인간 FcRn보다 마우스 FcRn에 약 10 배 더 강하게 결합하는 것으로 예견되었다. 도 6에 나타낸 정상 마우스에서 Fv4-IgG1-v1 또는 Fv4-IgG1-v2에 의한 hsIL-6R 제거의 촉진은 도 4에 나타낸 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에서 Fv4-IgG1-v2에 의한 제거의 촉진보다 더 현저하다. 이는 hsIL-6R 제거의 촉진 정도가 pH 7.4에서 FcRn 결합의 강도에 따라 증가함을 암시한다.

[0708]

[실시예 5] 중성 조건 하에서 증대된 인간 FcRn 결합을 갖는 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체의 제조

[0709]

중성 조건 하에서 인간 FcRn 결합을 증대시키기 위한 다양한 변경들을 Fv4-IgG1에 도입시켜 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에서 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체의 항원 제거 효과를 추가로 증대시켰다. 구체적으로, 표 6-1 및 6-2에 나타낸 아미노산 개변을 Fv4-IgG1의 중쇄 불변 영역에 도입시켜 다양한 돌연변이체(돌연변이 부위의 아미노산 번호는 EU 넘버링에 따라 나타낸다)를 생성시켰다. 상기 아미노산 치환을 비교 실시예 1에 개시된 바와 같이 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 도입시켰다.

[0710]

[표 6-1]

변이체 명칭	KD (M)	아미노산 개변
IgG1	ND	NONE
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H

[0711]

표 6-2는 표 6-1의 계속이다.

[0713]

[표 6-2]

IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H

[0714]

[0715]

제조된 중쇄 및 L(WT)(서열번호 5)를 각각 포함하는 변체들을 비교 실시에 2에 개시된 바와 같이 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현하고 정제시켰다.

[0716]

인간 FcRn 결합의 평가

[0717]

항체와 인간 FcRn 간의 결합을 비아코어 T100(GE 헬쓰케어)을 사용하여 동역학적으로 분석하였다. 이를 위해서, 인간 FcRn을 비교 실시에 4에 개시된 바와 같이 제조하였다. 적합한 양의 단백질 L(ACTIGEN)을 아미노 결합 방법에 의해 센서 칩 CM4(GE 헬쓰케어) 상에 고정화하고, 상기 칩이 관심 항체를 포획하게 하였다. 이어서, 희석된 FcRn 용액 및 실행 완충제(비교 용액으로서)를 주사하여 인간 FcRn이 상기 센서 칩 상에 포획된 항체와 상호작용하게 하였다. 상기 사용된 실행 완충제는 50 mmol/l 나트륨 포스페이트, 150 mmol/l NaCl, 및 0.05%(w/v) 트윈 20(pH 7.0)을 포함하였다. FcRn을 각각의 완충제를 사용하여 희석하였다. 상기 칩을 10 mmol/l 글리신-HCl(pH 1.5)을 사용하여 재생시켰다. 분석을 오직 25 °C에서만 수행하였다. 결합속도 상수 $k_a(1/Ms)$ 및 해리속도 상수 $k_d(1/s)$ (이 둘은 모두 동역학적 매개변수이다)를 상기 분석에서 획득한 센소그램을 근거로 계산하고, 인간 FcRn에 대한 각 항체의 KD(M)를 상기 값으로부터 측정하였다. 각각의 매개변수 (parameter)를 비아코어 T100 평가 소프트웨어(GE 헬쓰케어)를 사용하여 계산하였다.

[0718]

비아코어에 의한 중성 조건(pH 7.0) 하에서의 인간 FcRn 결합에 대한 평가 결과를 표 6-1 및 6-2에 나타낸다. 본래의 IgG1의 KD는 계산할 수 없었는데, 그 이유는 상기가 단지 매우 약한 결합만을 나타내었기 때문이다. 따라서, 상기 KD를 표 6-1에서 ND로서 표시한다.

[0719]

[실시예 6] 중성 조건 하에서 증대된 인간 FcRn 결합을 갖는 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체의 생체 내 시험

[0720]

중성 조건 하에서 인간 FcRn 결합 능력을 갖는 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체를 중성 조건 하에서 인간

FcRn 결합 능력을 갖도록 실시예 4에 개시된 바와 같이 제조된 중쇄를 사용하여 생성시켰다. 상기 항체를 그의 생체 내 항원 제거 효과에 대해 평가하였다. 구체적으로, 하기 열거된 항체들을 비교 실시예 2에 개시된 바와 같이 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현 및 정제시켰다:

- [0721] VH3-IgG1 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1;
- [0722] VH3-IgG1-v2 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-v2;
- [0723] VH3-IgG1-F14 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-F14;
- [0724] VH3-IgG1-F20 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-F20;
- [0725] VH3-IgG1-F21 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-F21;
- [0726] VH3-IgG1-F25 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-F25;
- [0727] VH3-IgG1-F29 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-F29;
- [0728] VH3-IgG1-F35 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-F35;
- [0729] VH3-IgG1-F48 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-F48;
- [0730] VH3-IgG1-F93 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-F93; 및
- [0731] VH3-IgG1-F94 및 VL3-CK을 포함하는 Fv4-IgG1-F94.
- [0732] 실시예 3에 개시된 동일한 방법에 의해, 상기 제조된 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체를 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스를 사용하여 생체 내에서 시험하였다(B6.mFcRn-/-, hFcRn Tg 276 계열 +/+ 마우스, 잭슨 레보라토리즈; 문헌[Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104]).
- [0733] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스에 정맥 내 투여 후 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도의 시간 과정을 도 8에 나타낸다. 시험 결과는 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도가, 중성 조건 하에서 인간 FcRn 결합 능력이 거의 없는 Fv4-IgG1의 존재 하에서의 경우에 비해, 중성 조건 하에서 증대된 인간 FcRn 결합을 갖는 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체들 중 임의의 항체의 존재 하에서 시간에 따라 낮게 유지됨을 보였다. 다른 것들 중에서도, 현저한 효과를 생성시킨 항체는 예를 들어 Fv4-IgG1-F14를 포함한다. Fv4-IgG1-F14와 동시에 투여된 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도는 Fv4-IgG1과 동시에 투여된 가용성 인간 IL-6 수용체의 경우에 비해 투여 후 하루 째에 약 54 배까지 감소되는 것으로 나타났다. 더욱 또한, Fv4-IgG1-F21과 동시에 투여된 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도는 Fv4-IgG1과 동시에 투여된 가용성 인간 IL-6 수용체의 경우에 비해 투여 후 7 시간째에 약 24 배까지 감소되는 것으로 나타났다. 또한, 투여 후 7 시간째에 Fv4-IgG1-F25와 동시에 투여된 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도는 검출 한계(1.56 ng/ml) 이하였다. 따라서, Fv4-IgG1-F25는 Fv4-IgG1과 동시에 투여된 가용성 인간 IL-6 수용체의 농도에 비해 상기 가용성 인간 IL-6 수용체의 농도를 200 배 이상 현저하게 감소시킬 수 있는 것으로 예상되었다. 상술한 발견들은 중성 조건 하에서 pH-의존성 항원-결합 항체의 인간 FcRn 결합의 증대가 항원 제거 효과를 증대시키기에 매우 유효함을 입증한다. 한편, 중성 조건 하에서 인간 FcRn 결합을 증대시키기 위한 아미노산 개변의 유형(상기 개변은 항원 제거 효과를 증대시키기 위해 도입된다)은 특별히 제한되지 않으며; 상기와 같은 개변은 표 6-1 및 6-2에 나타낸 것들을 포함한다. 상기 항원 제거 효과는 임의의 도입된 변경에 의해 생체 내에서 증대되는 것으로 예상될 수 있다.
- [0734] 더욱 또한, 4 가지 유형의 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체, Fv4-IgG1-F14, Fv4-IgG1-F21, Fv4-IgG1-F25, 및 Fv4-IgG1-F48 중 하나와 동시에 투여된 가용성 인간 IL-6 항체의 혈장 농도는 단독으로 투여된 가용성 인간 IL-6 수용체의 경우보다 시간에 따라 더 낮게 유지되었다. 상기와 같은 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체를, 상기 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도가 일정하게 유지되는(정상 상태) 신체에 투여하여 상기 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도를 혈장 중 정상 상태 농도보다 더 낮게 유지시킬 수 있다. 구체적으로, 혈장 중 생체 내 항원 농도를 상기와 같은 항체의 상기 신체에의 투여에 의해 감소시킬 수 있다.
- [0735] [실시예 7] 저-용량(0.01 mg/kg) Fv4-IgG1-F14의 유효성에 대한 평가
- [0736] 실시예 6에 개시된 바와 같이 제조된 Fv4-IgG1-F14를 실시예 6에 개시된 바와 동일한 생체 내 시험 방법에 의해 저 용량(0.01 mg/kg)으로 시험하였다. 상기 결과(도 9에 나타냄)를, Fv4-IgG1 및 Fv4-IgG1-F14를 1 mg/kg으로 투여함으로써 획득한 실시예 6에 개시된 결과와 비교하였다.
- [0737] 상기 결과는 Fv4-IgG1-F14를 0.01 mg/kg으로 투여한 그룹에서 혈장 항체 농도가 1 mg/kg으로 투여한 그룹에 비

해 약 100 배 더 낮았지만(도 10), 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도의 시간 과정은 서로 필적할만함을 보였다. 또한, Fv4-IgG1-F14를 0.01 mg/kg으로 투여한 그룹에서 투여 후 7시간째에 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도가 Fv4-IgG1을 1 mg/kg으로 투여한 그룹의 경우에 비해 약 3 배까지 감소된 것으로 나타났다. 더욱 또한, Fv4-IgG1-F14의 존재 하에서, 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도는 가용성 인간 IL-6 수용체를 단독으로 투여한 그룹에 비해 상이한 용량으로 투여된 두 그룹 모두에서 시간에 따라 더 낮았다.

[0738] 상기 발견은 Fv4-IgG1의 용량의 1/100의 용량으로 투여될 때조차, 중성 조건 하에서 인간 FcRn 결합을 증대시키기 위한 Fv4-IgG1의 변형으로부터 생성된 Fv4-IgG1-F14는 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도를 유효하게 감소시킴을 입증한다. 구체적으로, pH-의존성 항원-결합 항체를 중성 조건 하에서 그의 FcRn-결합 능력이 증대하도록 변형시키는 경우 더 낮은 용량에서조차 항원을 효율적으로 제거할 수 있음이 예견된다.

[0739] [실시예 8] 정상 마우스를 사용하는 정상 상태 모델에 근거한 생체 내 시험

[0740] 중성 조건 하에서 마우스 FcRn에 대한 결합의 평가

[0741] VH3-IgG1(서열번호 6) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는 VH3/L(WT)-IgG1, VH3-IgG1-v2(서열번호 9) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는 VH3/L(WT)-IgG1-v2, 및 VH3-IgG1-F20(서열번호 10) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는 VH3/L(WT)-IgG1-F20(이들을 모두 실시예 5에 개시된 바와 같이 제조하였다)을 하기 개시한 방법에 의해 중성 조건(pH 7.4) 하에서의 마우스 FcRn 결합에 대해 평가하였다.

[0742] 항체와 마우스 FcRn 간의 결합을 비아코어 T100(GE 헬쓰케어)을 사용하여 동역학적으로 분석하였다. 적합한 양의 단백질 L(ACTIGEN)을 아미노 결합 방법에 의해 센서 칩 CM4(GE 헬쓰케어) 상에 고정화하고, 상기 칩이 관심 항체를 포획하게 하였다. 이어서, 회석된 FcRn 용액 및 실행 완충제(비교 용액으로서)를 주사하여 마우스 FcRn 이 상기 센서 칩 상에 포획된 항체와 상호작용하게 하였다. 상기 사용된 실행 완충제는 50 mmol/l 나트륨 포스페이트, 150 mmol/l NaCl, 및 0.05%(w/v) 트윈 20(pH 7.4)을 함유하였다. FcRn을 각각의 완충제를 사용하여 회석하였다. 상기 칩을 10 mmol/l 글리신-HCl(pH 1.5)을 사용하여 재생시켰다. 분석을 오직 25 °C에서만 수행하였다. 결합속도 상수 k_a (1/Ms) 및 해리속도 상수 k_d (1/s)(이 둘은 모두 동역학적 매개변수이다)를 상기 분석에서 획득한 센소그램을 근거로 계산하고, 마우스 FcRn에 대한 각 항체의 KD(M)를 상기 값으로부터 측정하였다. 각각의 매개변수(parameter)를 비아코어 T100 평가 소프트웨어(GE 헬쓰케어)를 사용하여 계산하였다.

[0743] 결과를 표 7에 나타낸다(pH 7.4에서 마우스 FcRn에 대한 친화성). 불변 영역이 본래의 IgG1의 것인 VH3/L(WT)-IgG1(표 7에서 IgG1)은 마우스 FcRn에 대해 단지 매우 약한 결합을 나타내었다. 따라서, 상기 KD를 계산할 수 없었으며 이를 표 7에서 ND로 표시한다. 상기 분석 결과는 중성 조건 하에서 증대된 인간 FcRn 결합을 갖는 변경된 항체가 중성 조건 하에서 마우스 FcRn에 대해서도 또한 증대된 결합을 나타냄을 보였다.

[0744] [표 7]

	KD (M)
IgG1	ND
IgG1-v2	1.04E-06
IgG1-F20	1.17E-07

[0745]

[0746] 가용성 인간 IL-6 수용체의 일정한 혈장 농도를 갖는 정상 마우스를 사용하는 생체 내 시험

[0747] 실시예 1 및 5에 개시된 바와 같이 제조된 H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-v2 및 Fv4-IgG1-F20을 사용하여, 하기 개시된 방법에 의해 생체 내 시험을 수행하였다.

[0748] 정상 마우스를 사용하는 생체 내 주입 시험

[0749] 가용성 인간 IL-6 수용체를 함유하는 주입 펌프(MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004; 알젯)를 정상 마우스(C57BL/6J 마우스; 찰스 리버 채팬)의 등 피부 아래에 이식하여 모델 동물(가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도를 일정하게 유지시켰다)을 준비하였다. 항-인간 IL-6 수용체 항체를 상기 모델 동물에게 투여하여 가용성 인간 IL-6 수용체 투여 후의 생체 내 역학을 평가하였다. 단클론 항-마우스 CD4 항체(R&D)를 꼬리 정맥 내로 20 mg/kg으로 1 회 투여하여 가용성 인간 IL-6 수용체에 대한 중화 항체의 생성을 억제하였다. 이어서, 92.8 마이크로그램/㎖의 가용성 인간 IL-6 수용체를 함유하는 주입 펌프를 상기 마우스의 등 피부 아래에 이식하였다. 주입 펌프 이식 후 3일째에 항-인간 IL-6 수용체 항체를 꼬리 정맥에 1 mg/kg으로 1 회 투여하였다. 항-인간 IL-6 수용체 항체의 투여 후 15 분, 7 시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 7일, 14일, 21일 및 28일째에 채혈하였다. 상기 채혈된

혈액을 즉시 15,000 rpm 및 4 °C에서 15 분간 원심분리하여 혈장을 분리시켰다. 상기 분리된 혈장을 분석 전에 -20 °C 이하의 냉장고에 보관하였다.

[0750] ELISA에 의한 항-인간 IL-6 수용체 항체의 혈장 농도의 측정

[0751] 사용된 방법은 실시예 3에 개시된 바와 동일하였다.

[0752] 전기화학발광 분석에 의한 혈장 hsIL-6R 농도의 측정

[0753] 사용된 방법은 실시예 1에 개시된 바와 동일하였다.

[0754] 도 11에 나타낸 바와 같이, 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도는, 가용성 인간 IL-6 수용체에 대한 중화 항체인 H54/L28-IgG1을 정상 마우스(hsIL-6R 그룹)(상기 마우스에서 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도를 약 40 ng/ml에서 일관되게 유지시켰다)에게 투여한 경우 650 ng/ml(투여 전의 15 배)로 상승되었다. 다른 한편으로, 상기 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도는, H54/L28-IgG1에 pH-의존적인 항원 결합 능력을 부여함으로써 생성된 Fv4-IgG1이 투여된 그룹에서 약 70 ng/ml로 유지되었다. 이는 통상의 중화 항체인 H54/L28-IgG1의 투여에 의해 야기된 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도의 증가를 상기 pH-의존적인 결합 능력을 부여함으로써 약 1/10로 억제할 수 있음을 암시한다.

[0755] 더욱 또한, 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도는 Fv-IgG1-v2 또는 Fv-IgG1-F20(이 둘은 모두 중성 조건 하에서 FcRn 결합을 증대시키기 위해 pH-의존성 인간 IL-6 수용체-결합 항체에 변경을 도입시켜 생성되었다)을 투여 함으로써 정상 상태 농도의 1/10 이하로 유지되는 것으로 나타났다. Fv-IgG1-v2를 투여한 경우, 투여 후 14일 째의 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도는 약 2 ng/ml이었다. 따라서, Fv-IgG1-v2는 상기 농도를 투여 전 수준의 1/20으로 감소시킬 수 있었다. 한편, Fv-IgG1-F20을 투여한 경우, 투여 후 7 시간, 1일, 2일, 및 4일째의 가용성 인간 IL-6 수용체의 혈장 농도는 검출 한계(1.56 ng/ml) 이하였다. 이는 Fv-IgG1-F20이 상기 농도를 투여 전 수준의 1/25 이하까지 감소시켰음을 암시한다.

[0756] 상술한 발견들은 혈장 항원 농도를, 상기 혈장 중 항원 제거 속도의 증가, 혈장 항원 농도가 일정하게 유지되는 모델 동물에게 중성 조건 하에서 pH-의존적인 항원-결합 능력 및 FcRn-결합 능력을 모두 갖는 항체의 투여에 의해 현저하게 감소시킬 수 있음을 입증한다.

[0757] 예를 들어 H54/L28-IgG1 같은 전형적인 항체는 표적 항원에 결합함으로써 상기 표적 항원의 작용을 단지 중화시킬 수 있을 뿐이며, 더 나쁘게는 혈장 항원 농도를 증가시킬 수 있다. 대조적으로, 중성 조건 하에서 pH-의존적인 항원-결합 능력 및 FcRn-결합 능력을 모두 갖는 항체는 표적 항원을 중화시킬 수 있을 뿐만 아니라 상기 표적 항원의 혈장 농도를 감소시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 상기 혈장으로부터 항원 제거 효과는 중화보다 더 유리한 것으로 예상될 수 있다. 또한, 항원 제거는 중화만으로는 불충분하게 유효한 표적 항원에 대해서도 작용할 수 있다.

[0758] [실시예 9] 항원 제거를 증대시키는데 필요한 중성 pH에서의 인간 FcRn에 대한 결합 친화성의 한계(threshold)의 확인 및 중성 pH에서 항원 제거와 인간 FcRn에 대한 결합 친화성 간의 관계

[0759] 생체 내 연구를 위한 항체 제조

[0760] 중성 pH 하에서 증가된 FcRn 결합을 갖는, VH3-IgG1(서열번호 6) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-IgG1의 Fc 변체(variant)를 생성시켰다. 구체적으로, VH3-M73(서열번호 15) 및 VH3-IgG1-v1(서열번호 8)을 제조하였다. 상기 아미노산 치환을 비교 실시예 1에 개시된 바와 같이 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 도입시켰다.

[0761] H54(서열번호 1) 및 L28(서열번호 2)을 포함하는 H54/L28-IgG1, VH3-IgG1(서열번호 6) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-IgG1, VH3-M73(서열번호 15) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-M73, VH3-IgG1-v1(서열번호 8) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-IgG1-v1, 및 VH3-IgG1-v2(서열번호 9) 및 VL3-CK(서열번호 7)를 포함하는 Fv4-IgG1-v2를 비교 실시예 2에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현 및 정제시켰다.

[0762] 중성 pH 조건 하에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성의 평가

[0763] VH3-IgG1(서열번호 6) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는 VH3/L(WT)-IgG1, VH3-M73(서열번호 15) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는 VH3/L(WT)-M73, VH3-IgG1-v1(서열번호 8) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는 VH3/L(WT)-IgG1-v1, 및 VH3-IgG1-v2(서열번호 9) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는 VH3/L(WT)-IgG1-v2(이들을 모두 실시

예 2에 개시된 바와 같이 제조하였다)을 중성 pH(pH 7.0) 하에서 인간 FcRn 결합에 대해 평가하였다.

[0764] 인간 FcRn에 대한 VH3/L(WT)-IgG1-v1 및 VH3/L(WT)-IgG1-v2의 결합 활성을 실시예 5에 개시된 방법을 사용하여 측정하였다. 인간 FcRn에 대한 VH3/L(WT)-IgG1 및 VH3/L(WT)-M73의 낮은 결합 활성으로 인해, 인간 FcRn에 대한 결합 활성을 실시예 5에 개시된 방법을 사용하여 측정할 수 없었으며, 따라서 상기 항체를 하기 개시한 방법에 의해 평가하였다. 항체와 인간 FcRn 간의 결합을 비아코어 T100(GE 헬쓰케어)을 사용하여 동역학적으로 분석하였다. 적합한 양의 단백질 L(ACTIGEN)을 아민-결합 방법에 의해 센서 칩 CM4(GE 헬쓰케어) 상에 고정화하고, 상기 칩이 관심 항체를 포획하게 하였다. 이어서, 희석된 FcRn 용액 및 실행 완충제(비교 용액으로서)를 주사하여 인간 FcRn이 상기 센서 칩 상에 포획된 항체와 상호작용하게 하였다. 상기 사용된 실행 완충제는 50 mmol/l 나트륨 포스페이트, 150 mmol/l NaCl, 및 0.05%(w/v) 트윈 20(pH 7.0)을 포함하였다. FcRn을 각각의 완충제를 사용하여 희석하였다. 상기 칩을 10 mmol/l 글리신-HCl(pH 1.5)을 사용하여 재생시켰다. 분석을 오직 25 °C에서만 수행하였다.

[0765] 각 항체의 KD(M)는 비아코어 T100 평가 소프트웨어(GE 헬쓰케어)를 사용하여 센소그램 데이터로부터 유도되었으며, 상기 소프트웨어는 동시에 상기 센소그램의 결합 및 회합 위상들을 맞추고 작동 세트 중의 모든 곡선을 전체적으로 맞춘다. 센소그램은 비아코어 T100 평가 소프트웨어에 의해 공급된 1:1 결합 모델인 "랭듀어 결합" 모델에 적합하였다. 상기 결합 상호작용들 중 일부의 경우, KD는 평형에 근거한 접근법을 사용하여 분석물 농도의 로그에 대한, 평형 결합 반응 R_{eq} 의 플롯의 비선형 회귀 분석에 의해 유도되었다.

[0766] 비아코어에 의한 중성 조건(pH 7.0) 하에서의 인간 FcRn 결합에 대한 결과를 표 8에 나타낸다.

[표 8]

	KD (M)
IgG1	8.8E-05
M73	1.4E-05
IgG1-v1	3.2E-06
IgG1-v2	8.1E-07

[0768]

[0769] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 276 계열을 사용하는 동시-주사 모델에서 항원 제거에 대한 항체의 효과의 생체 내 연구

[0770] 동시-주사 모델을 사용하는 항체의 생체 내 연구를 실시예 3에 개시된 바와 같이 수행하였다. 본 연구에 사용된 항-인간 IL-6 수용체 항체는 상술한 H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2이다. 본 연구에 사용된 마우스는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스(B6.mFcRn/-hFcRn Tg 276 계열 +/+ 마우스, 잭슨 레보라토리즈; 문헌[Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104])이다.

[0771] 도 12에 나타낸 바와 같이, H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1 및 Fv4-IgG1-v2의 약동학은 필적할 만하였으며, 이들 항체는 상기 연구 기간 동안 유사한 혈장 농도를 유지하였다.

[0772] 혈장 hsIL-6R 농도의 시간 과정을 도 13에 나타내었다. Fv4-IgG1이 투여된 hsIL-6R에 비해, Fv4-IgG1-v2가 투여된 hsIL-6R은 증대된 제거를 나타낸 반면, Fv4-M73 및 Fv4-IgG1-v1이 투여된 hsIL-6R은 감소된 제거를 나타내었다. 모든 Fc 변체, M73, v1, 및 v2는 중성 pH 조건(pH 7.0)에서 인간 FcRn에 대해 증가된 결합 친화성을 갖지만, Fv4-M73 및 Fv4-IgG1-v1이 아닌, 오직 Fv4-IgG1-v2만이 증대된 hsIL-6R 제거를 나타낸 것으로 입증되었다. 이는 항원 제거를 증대시키기 위해서, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성이 IgG1-v1(pH 7.0에서 그의 인간 FcRn에 대한 결합 친화성은 KD 3.2 마이크로 몰이거나 또는 본래의 IgG1(인간 FcRn에 대한 결합 친화성은 KD 88 마이크로 몰이다)보다 28 배 더 강하다)보다 적어도 더 강할 필요가 있음을 가리킨다.

[0773] 도 14는 pH 7.0에서의 인간 FcRn에 대한 Fc 변체의 결합 친화성과 hsIL-6R 및 Fc 변체의 동시 주사 후 1일째의 혈장 hsIL-6R 농도 간의 관계를 개시한다. 본 실시예 및 실시예 6에 개시된 Fc 변체들(Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1, Fv4-IgG1-v2, Fv4-IgG1-F14, Fv4-IgG1-F20, Fv4-IgG1-F21, Fv4-IgG1-F25, Fv4-IgG1-F29, Fv4-IgG1-F35, Fv4-IgG1-F48, Fv4-IgG1-F93, 및 Fv4-IgG1-F94)을 플로팅한다. pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성을 증가시킴으로써, 항원의 제거를 반영하는 hsIL-6R의 혈장 농도는 처음에 증가하지만, 이어서 급격히 감소하였다. 이는 본래의 인간 IgG1에 비해 항원 제거를 증대시키기 위해서, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성이 바람직하게는 KD 2.3 마이크로 몰(도 14의 곡선 맞춤으로부터 획득한 값)보다 더 강할 필요가 있음을 입증한다. KD 88 마이크로 몰 내지 KD 2.3 마이크로 몰의 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친

화성은 상기 항원 제거를 오히려 감소시킬 것이다(더 높은 hsIL-6R 농도). 즉, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성은 항원 제거를 증대시키기 위해서 바람직하게는 본래의 인간 IgG1보다 38 배 더 강할 필요가 있으며, 그렇지 않으면 상기 항원 제거를 감소시킬 것이다.

[0774] 도 15는 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 Fc 변체의 결합 친화성과 hsIL-6R 및 Fc 변체의 동시 주사 후 1일째의 혈장 항체 농도 간의 관계를 개시한다. 본 실시예 및 실시예 6에 개시된 Fc 변체들(Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1, Fv4-IgG1-v2, Fv4-IgG1-F14, Fv4-IgG1-F20, Fv4-IgG1-F21, Fv4-IgG1-F25, Fv4-IgG1-F29, Fv4-IgG1-F35, Fv4-IgG1-F48, Fv4-IgG1-F93, 및 Fv4-IgG1-F94)을 플롯팅한다. pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성을 증가시킴으로써, 항체 약동학(제거)을 반영하는 항체의 혈장 농도는 처음에는 유지되지만, 이어서 급격히 감소하였다. 이는 본래의 인간 IgG1(인간 FcRn에 대한 결합 친화성은 KD 88 마이크로 몰이다)과 유사한 항체의 약동학을 유지시키기 위해서, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 친화성이 KD 0.2 마이크로 몰(도 15의 곡선 맞춤으로부터 획득한 값)보다 더 약할 필요가 있음을 입증한다. KD 0.2 마이크로 몰보다 더 강한 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성은 상기 항체 제거를 증가시켰다(즉 혈장으로부터 더 빠른 항체 제거). 즉, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성은 본래의 인간 IgG1과 유사한 항체 약동학을 나타내기 위해서 본래의 인간 IgG1보다 440 배 이내로 더 강할 필요가 있으며, 그렇지 않으면 혈장으로부터 빠른 항체 제거를 생성시킬 것이다.

[0775] 도 14 및 15 모두를 고려하여, IgG1에 비해 항원 제거를 증대시키기 위해서(즉 항원 혈장 농도를 감소시키기 위해서), 본래의 인간 IgG1과 유사한 항체 약동학을 유지하면서, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성은 2.3 마이크로 몰 내지 0.2 마이크로 몰일 필요가 있거나, 또는 환연하면, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성이 본래의 인간 IgG1보다 38 배 내지 440 배 범위 이내로 더 강할 필요가 있다. 장기적인 항원-제거 활성을 갖는 IgG1과 유사한 약동학을 갖는 상기와 같은 항체는 그의 오래 작용하는 성질로 인해 만성적인 질병과 같은 보다 긴 투여 간격을 요하는 항체 요법에 이로울 것이다.

[0776] 다른 한편으로, pH 7.0에서의 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성을 KD 0.2 마이크로 몰보다 더 강하게 증가시킴으로써, 또는 환연하면, pH 7.0에서의 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성을 본래의 인간 IgG1에 비해 440 배 더 증가시킴으로써, 항원 제거가 단기간 안에 큰 정도로 증대될 것이지만, 항체는 본래의 인간 IgG1보다 더 빠르게 혈장으로부터 제거된다. 항원 농도의 빠르고 강한 감소를 유도하는 능력을 갖는 상기와 같은 항체는 그의 빠르게 작용하는 성질로 인해 질병 관련된 항원을 혈장으로부터 제거할 필요가 있는 급성 질병과 같은 항체 요법에 이로울 것이다.

[0777] 항체당 혈장으로부터 제거되는 항원의 양은, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는 항체 Fc 변체를 투여함에 의해 항원 제거의 효율을 평가하는데 중요한 인자이다. 항체당 항원 제거 효율을 평가하기 위해서, 하기의 계산을 본 실시예 및 실시예 6에 개시된 생체 내 연구의 각각의 시점에서 수행하였다.

[0778] 값 A: 각 시점에서의 몰 항원 농도

[0779] 값 B: 각 시점에서의 몰 항체 농도

[0780] 값 C: 각 시점에서 몰 항체 농도에 따른 몰 항원 농도(항원/항체 몰 비)

[0781] $C = A/B$.

[0782] 각 항체에 대한 값 C(항원/항체 몰 비)의 시간 과정을 도 16에 개시하였다. 보다 작은 값 C는 항체당 더 높은 항원 제거 효율을 가리키는 반면, 보다 높은 값 C는 항체당 더 낮은 항원 제거 효율을 가리킨다. IgG1에 비해 더 낮은 값 C는 더 높은 항원 제거 효율이 Fc 변체에 의해 성취된 반면 IgG1에 비해 더 높은 값 C는 Fc 변체가 항원 제거 효율에 대해 음의 효과를 가짐을 가리킨다. Fv4-M73 및 Fv4-IgG1-v1을 제외한 모든 Fc 변체는 Fv4-IgG1에 비해 증대된 항원 제거 효율을 나타내었다. Fv4-M73 및 Fv4-IgG1-v1은 항원 제거 효율에 대해 음의 영향을 나타내었고, 이는 도 14와 일치하였다.

[0783] 도 17은 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 Fc 변체의 결합 친화성과 hsIL-6R 및 Fc 변체의 동시 주사 후 1일째의 값 C(항원/항체 몰 비) 간의 관계를 개시한다. 본 실시예 및 실시예 6에 개시된 Fc 변체들(Fv4-IgG1, Fv4-M73, Fv4-IgG1-v1, Fv4-IgG1-v2, Fv4-IgG1-F14, Fv4-IgG1-F20, Fv4-IgG1-F21, Fv4-IgG1-F25, Fv4-IgG1-F29, Fv4-IgG1-F35, Fv4-IgG1-F48, Fv4-IgG1-F93, 및 Fv4-IgG1-F94)을 플롯팅한다. 이는 본래의 인간 IgG1에 비해 더 높은 항원 제거 효율을 성취하기 위해서, pH 7.0에서의 인간 FcRn에 대한 항체의 친화성이 KD 3.0 마이크로 몰(도 17의 곡선 맞춤으로부터 획득된 값)보다 더 강할 필요가 있음을 입증한다. 즉, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 항체의 결합 친화성은, 본래의 인간 IgG1에 비해 더 높은 항원 제거 효율을 성취하기 위해서 본래의 인간

IgG1보다 29 배 이상 더 강할 필요가 있다.

[0784] 결론적으로, KD 3.0 마이크로 몰 내지 0.2 마이크로 몰의, pH 7.0에서의 FcRn에 대한 결합 친화성을 갖는 항체 변체의 그룹, 또는 환연하면, 본래의 인간 IgG1보다 29 배 내지 440 배 더 강한 범위 내의, pH 7.0에서의 FcRn에 대한 결합 친화성을 갖는 항체 변체의 그룹은 IgG1에 대해 유사한 항체 약동학을 갖지만, 혈장으로부터 상기 항체를 제거하는 증대된 능력을 갖는다. 따라서, 상기와 같은 항체는 IgG1에 비해 증대된 항원 제거 효율을 나타낸다. IgG1과 유사한 약동학은 혈장으로부터 항원의 장기적인 제거를 가능하게 할 것이며(오래 작용하는 항원 제거), 따라서 만성적인 질병을 위한 항체 요법에 바람직할 수 있는 긴 투여 간격을 가능하게 할 것이다. KD 0.2 마이크로 몰보다 더 강한, pH 7.0에서의 FcRn에 대한 결합 친화성을 갖는 항체 변체의 그룹, 또는 환연하면, 본래의 인간 IgG1보다 440 배 더 강한, pH 7.0에서의 FcRn에 대한 결합 친화성을 갖는 항체 변체의 그룹은 빠른 항체 제거를 갖는다(단기적인 항체 제거). 그럼에도 불구하고, 상기와 같은 항체는 훨씬 더 빠른 항원 제거(빠르게 작용하는 항원 제거)를 가능하게 하므로, 상기와 같은 항체는 또한 IgG1에 비해 증대된 항원 제거 효율을 나타낸다. 실시예 8에 나타낸 바와 같이, 정상 마우스에서 Fv4-IgG1-F20은 매우 짧은 기간 안에 혈장으로부터 항원의 광범위한 제거를 유도할 것이나, 상기 항원 제거 효과는 영구적이지 않다. 상기와 같은 프로파일은 질병 관련된 항원이 혈장으로부터 매우 짧은 기간 안에 빠르고 광범위하게 고갈될 필요가 있는 급성 질병의 경우 바람직할 것이다.

[0785] [실시예 10] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 276 계열을 사용하는 정상 상태 주입 모델에 의한 Fv4-IgG1-F14의 생체 내 연구

[0786] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 276 계열을 사용하는 정상 상태 주입 모델에 의한 Fv4-IgG1-F14의 생체 내 연구를 실시예 1에 개시한 바와 같이 수행하였다. 연구 그룹은 대조용 그룹(항체 부재), 1 mg/kg 용량의 Fv4-IgG1, 및 1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 및 0.01 mg/kg 용량의 Fv4-IgG1-F14로 이루어진다.

[0787] 도 18은 항체 투여 후 hsIL-6R 혈장 농도의 시간 프로파일을 개시한다. 항체 부재 하의 기준선 hsIL-6R 수준에 비해, 1 mg/kg의 Fv4-IgG1의 투여는 혈장 hsIL-6R 농도를 여러 배 증가시켰다. 다른 한편으로, 1 mg/kg의 Fv4-IgG1-F14의 투여는 Fv4-IgG1 그룹 및 기준선 그룹에 비해 혈장 농도를 현저하게 감소시켰다. 2일째에, 혈장 hsIL-6R 농도는 검출되지 않았으며(혈장 hsIL-6R 농도의 정량분석 한계는 본 측정 시스템에서 1.56 ng/ml이다), 이는 14일까지 지속되었다.

[0788] 실시예 1에 나타낸 바와 같이, H54/L28-IgG1-F14는 H54/L28-IgG1에 비해 혈장 hsIL-6R 농도의 감소를 나타내었으나, 상기 감소의 정도는 작았다. hsIL-6R에 대해 pH 의존적인 결합 성질을 갖는 Fv4 가변 영역의 경우 감소 정도가 훨씬 더 커졌다. 이는 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대해 증가하는 결합 친화성이 혈장 항원 농도를 감소시키기에 유효하지만, pH 의존적인 항원 결합 및 중성 pH에서 인간 FcRn에 대한 증가된 결합 친화성의 조합이 상기 항원 제거를 현저하게 증대시킴을 입증한다.

[0789] Fv4-IgG1-F14의 더 낮은 용량을 사용하는 연구는, 1 mg/kg의 1/100인 0.01 mg/kg에서 조차 상기 항원 혈장 농도를 상기 기준선 아래로 감소시킴을 나타내었으며, 이는 혈장으로부터 항원을 고갈시키는 상기 분자의 증대한 효율을 입증한다.

[0790] [실시예 11] 동시 주사 모델에서 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 276 계열 및 32 계열의 비교

[0791] 선행의 생체 내 연구는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 276 계열(잭슨 레보라토리즈)을 사용하여 수행되었다. 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 276 계열과 상이한 트랜스제닉 계열인 32 계열 간의 차이를 비교하기 위해서, 우리는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 32 계열(B6.mFcRn/- .hFcRn Tg 32 계열 +/+ 마우스 (B6.mFcRn/- hFCRN Tg32; B6.Cg-Fcgrt<tm1Dcr> Tg(FCGRT)32Dcr) (잭슨 #4915)), 잭슨 레보라토리즈; 문헌[Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104])을 사용하여 H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, 및 Fv4-IgG1-v2의 동시 주사 연구를 수행하였다. 연구 방법은 실시예 3의 방법과 동일하였으나 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 32 계열을 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 276 계열 대신에 사용하였다.

[0792] 도 19는 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 276 계열 및 32 계열 모두의 혈장 hsIL-6R 농도의 시간 과정을 개시한다. H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, 및 Fv4-IgG1-v2는 유사한 혈장 hsIL-6R 농도 시간 프로파일을 나타내었다. 상기 두 마우스 모두에서, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대해 증가하는 결합 친화성은 혈장으로부터의 항원 제거(Fv4-IgG1 및 Fv4-IgG1-v2에 비해)를 동일한 정도로 증대시켰다.

[0793] 도 20은 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 276 계열 및 32 계열 모두의 혈장 항체 농도의 시간 과정을 개시한다.

H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, 및 Fv4-IgG1-v2 는 유사한 혈장 항체 농도 시간 프로파일을 나타내었다.

[0794] 결론적으로, 276 계열과 32 계열 간에 현저한 차이는 관찰되지 않았으며, 이는 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 결합 친화성을 증가시키는 Fc 변체가 항원 혈장 농도의 제거(elimination)를 증대시키기 위해 인간 FcRn을 발현하는 2 개의 상이한 트랜스제닉 마우스 계열에서 유효함을 입증한다.

[0795] [실시예 12] 중성 pH에서 인간 FcRn에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는 다양한 항체 Fc 변체의 생성

Fc 변체의 생성

[0797] 중성 pH 하에서 인간 FcRn에 대한 결합 친화성을 증가시키는 다양한 돌연변이들을 Fv4-IgG1에 도입시켜 항원 제거 프로파일을 더욱 개선시켰다. 구체적으로, 표 9-1 내지 9-14에 나타낸 아미노산 돌연변이를 Fv4-IgG1의 중쇄 불변 영역에 도입시켜 Fc 변체를 생성시켰다(상기 돌연변이의 아미노산 번호는 EU 넘버링에 따라 개시된다). 상기 아미노산 치환을 비교 실시예 1에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 도입시켰다.

[0798] 제조된 중쇄 및 L(WT)(서열번호 5)를 각각 포함하는 추가적인 변체들(IgG1-F100 내지 IgG-F599)을 비교 실시예 2에 개시된 바와 같이 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현 및 정제시켰다.

인간 FcRn 결합의 평가

[0800] 항체와 인간 FcRn 간의 결합을 IgG1-v1, IgG1-v2 및 IgG1-F2 내지 IgG1-F599의 경우 실시예 5에, 또는 IgG1 및 M73의 경우 실시예 9에 개시된 바와 같이 동역학적으로 분석하였다. 비아코어에 의한 중성 조건(pH 7.0) 하에서의 인간 FcRn 결합에 대한 결과를 표 9-1 내지 9-14에 나타낸다.

[0801]

[표 9-1]

변체 명칭	KD (M)	아미노산 치환
IgG1	8.8E-05	None
M73	1.4E-05	(WO2009/125825)
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y

[0802]

[0803] 표 9-2는 표 9-1의 계속이다.

[0804]

[표 9-2]

IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H
IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y

[0805]

[0806] 표 9-3은 표 9-2의 계속이다.

[0807]

[표 9-3]

IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H
IgG1-F101	1.1E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
IgG1-F103	4.4E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F104	3.7E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
IgG1-F105	7.5E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
IgG1-F106	3.7E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y
IgG1-F107	3.4E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
IgG1-F108	4.1E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
IgG1-F109	3.2E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F111	3.2E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
IgG1-F112	6.4E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
IgG1-F113	3.2E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F114	3.8E-08	M252Y/V308P/S424A/N434Y
IgG1-F115	6.6E-06	T307A/N434A
IgG1-F116	8.7E-06	E380A/N434A
IgG1-F118	1.4E-05	M428L
IgG1-F119	5.4E-06	T250Q/M428L

[0808]

[0809] 표 9-4는 표 9-3의 계속이다.

[0810]

[표 9-4]

IgG1-F120	6.3E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F121	1.5E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F122	1.2E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
IgG1-F123	3.0E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
IgG1-F124	2.9E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F125	2.4E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F128	1.7E-07	P257L/M428L/N434W
IgG1-F129	2.2E-07	P257A/M428L/N434Y
IgG1-F131	3.0E-06	P257G/M428L/N434Y
IgG1-F132	2.1E-07	P257I/M428L/N434Y
IgG1-F133	4.1E-07	P257M/M428L/N434Y
IgG1-F134	2.7E-07	P257N/M428L/N434Y
IgG1-F135	7.5E-07	P257S/M428L/N434Y
IgG1-F136	3.8E-07	P257T/M428L/N434Y
IgG1-F137	4.6E-07	P257V/M428L/N434Y
IgG1-F139	1.5E-08	M252W/V308P/N434W
IgG1-F140	3.6E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F141	3.5E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
IgG1-F142	3.7E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
IgG1-F143	2.0E-07	M252Y/V308A/N434Y
IgG1-F145	5.3E-08	M252Y/V308F/N434Y
IgG1-F147	2.4E-07	M252Y/V308I/N434Y
IgG1-F149	1.9E-07	M252Y/V308L/N434Y
IgG1-F150	2.0E-07	M252Y/V308M/N434Y
IgG1-F152	2.7E-07	M252Y/V308Q/N434Y
IgG1-F154	1.8E-07	M252Y/V308T/N434Y
IgG1-F157	1.5E-07	P257A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F158	5.9E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F159	4.4E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F160	8.5E-07	M252W/M428I/N434Y
IgG1-F162	1.7E-07	M252W/M428Y/N434Y
IgG1-F163	3.5E-07	M252W/M428F/N434Y
IgG1-F164	3.7E-07	P238A/M252W/N434Y
IgG1-F165	2.9E-07	M252W/D265A/N434Y
IgG1-F166	1.5E-07	M252W/T307Q/N434Y

[0811]

[0812] 표 9-5는 표 9-4의 계속이다.

[0813]

[표 9-5]

IgG1-F167	2.9E-07	M252W/V303A/N434Y
IgG1-F168	3.2E-07	M252W/D376A/N434Y
IgG1-F169	2.9E-07	M252W/V305A/N434Y
IgG1-F170	1.7E-07	M252W/Q311A/N434Y
IgG1-F171	1.9E-07	M252W/D312A/N434Y
IgG1-F172	2.2E-07	M252W/K317A/N434Y
IgG1-F173	7.7E-07	M252W/E380A/N434Y
IgG1-F174	3.4E-07	M252W/E382A/N434Y
IgG1-F175	2.7E-07	M252W/S424A/N434Y
IgG1-F176	2.9E-07	S239K/M252W/N434Y
IgG1-F177	2.8E-07	M252W/S298G/N434Y
IgG1-F178	2.7E-07	M252W/D270F/N434Y
IgG1-F179	3.1E-07	M252W/N325G/N434Y
IgG1-F182	6.6E-08	P257A/M428L/N434W
IgG1-F183	2.2E-07	P257T/M428L/N434W
IgG1-F184	2.7E-07	P257V/M428L/N434W
IgG1-F185	2.6E-07	M252W/I332V/N434Y
IgG1-F188	3.0E-06	P257I/Q311I
IgG1-F189	1.9E-07	M252Y/T307A/N434Y
IgG1-F190	1.1E-07	M252Y/T307Q/N434Y
IgG1-F191	1.6E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F192	1.1E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F193	8.5E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F194	1.2E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F195	5.6E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F196	3.5E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F197	3.3E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F198	4.8E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F201	2.1E-07	M252Y/T307D/N434Y
IgG1-F203	2.4E-07	M252Y/T307F/N434Y
IgG1-F204	2.1E-07	M252Y/T307G/N434Y
IgG1-F205	2.0E-07	M252Y/T307H/N434Y
IgG1-F206	2.3E-07	M252Y/T307I/N434Y
IgG1-F207	9.4E-07	M252Y/T307K/N434Y
IgG1-F208	3.9E-07	M252Y/T307L/N434Y

[0814]

[0815] 표 9-6은 표 9-5의 계속이다.

[0816]

[표 9-6]

IgG1-F209	1.3E-07	M252Y/T307M/N434Y
IgG1-F210	2.9E-07	M252Y/T307N/N434Y
IgG1-F211	2.4E-07	M252Y/T307P/N434Y
IgG1-F212	6.8E-07	M252Y/T307R/N434Y
IgG1-F213	2.3E-07	M252Y/T307S/N434Y
IgG1-F214	1.7E-07	M252Y/T307V/N434Y
IgG1-F215	9.6E-08	M252Y/T307W/N434Y
IgG1-F216	2.3E-07	M252Y/T307Y/N434Y
IgG1-F217	2.3E-07	M252Y/K334L/N434Y
IgG1-F218	2.6E-07	M252Y/G385H/N434Y
IgG1-F219	2.5E-07	M252Y/T289H/N434Y
IgG1-F220	2.5E-07	M252Y/Q311H/N434Y
IgG1-F221	3.1E-07	M252Y/D312H/N434Y
IgG1-F222	3.4E-07	M252Y/N315H/N434Y
IgG1-F223	2.7E-07	M252Y/K360H/N434Y
IgG1-F225	1.5E-06	M252Y/L314R/N434Y
IgG1-F226	5.4E-07	M252Y/L314K/N434Y
IgG1-F227	1.2E-07	M252Y/N286E/N434Y
IgG1-F228	2.3E-07	M252Y/L309E/N434Y
IgG1-F229	5.1E-07	M252Y/R255E/N434Y
IgG1-F230	2.5E-07	M252Y/P387E/N434Y
IgG1-F236	8.9E-07	K248I/M428L/N434Y
IgG1-F237	2.3E-07	M252Y/M428A/N434Y
IgG1-F238	7.4E-07	M252Y/M428D/N434Y
IgG1-F240	7.2E-07	M252Y/M428F/N434Y
IgG1-F241	1.5E-06	M252Y/M428G/N434Y
IgG1-F242	8.5E-07	M252Y/M428H/N434Y
IgG1-F243	1.8E-07	M252Y/M428I/N434Y
IgG1-F244	1.3E-06	M252Y/M428K/N434Y
IgG1-F245	4.7E-07	M252Y/M428N/N434Y
IgG1-F246	1.1E-06	M252Y/M428P/N434Y
IgG1-F247	4.4E-07	M252Y/M428Q/N434Y
IgG1-F249	6.4E-07	M252Y/M428S/N434Y
IgG1-F250	2.9E-07	M252Y/M428T/N434Y
IgG1-F251	1.9E-07	M252Y/M428V/N434Y

[0817]

[0818] 표 9-7은 표 9-6의 계속이다.

[0819]

[표 9-7]

IgG1-F252	1.0E-06	M252Y/M428W/N434Y
IgG1-F253	7.1E-07	M252Y/M428Y/N434Y
IgG1-F254	7.5E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F255	1.1E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F256	5.4E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F257	5.0E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
IgG1-F258	3.2E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F259	2.8E-07	M252Y/D270F/N434Y
IgG1-F260	1.3E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
IgG1-F261	8.4E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F262	1.9E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F263	1.1E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
IgG1-F264	2.8E-07	M252Y/E382A/N434Y
IgG1-F265	6.8E-07	M252Y/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F266	4.7E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F267	3.2E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F268	6.3E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
IgG1-F269	5.2E-07	M252Y/V305A/M428F/N434Y
IgG1-F270	6.6E-07	M252Y/N325G/M428F/N434Y
IgG1-F271	6.9E-07	M252Y/D376A/M428F/N434Y
IgG1-F272	6.8E-07	M252Y/E380A/M428F/N434Y
IgG1-F273	6.5E-07	M252Y/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F274	7.6E-07	M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F275	4.2E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F276	4.1E-08	M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F277	1.3E-07	S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F278	3.0E-08	M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F279	6.1E-08	M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y
IgG1-F280	4.1E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N434Y
IgG1-F281	9.2E-08	M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F282	2.9E-08	M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F283	1.0E-07	M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F284	1.0E-07	M252Y/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F285	9.9E-08	M252Y/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F286	1.2E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y

[0820]

[0821] 표 9-8은 표 9-7의 계속이다.

[0822]

[표 9-8]

IgG1-F287	1.0E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F288	1.9E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
IgG1-F289	4.8E-07	M252Y/T256E/M428Y/N434Y
IgG1-F290	4.6E-07	M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F292	2.0E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F293	5.3E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F294	1.1E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F295	6.8E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F296	4.9E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F297	5.1E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F298	4.8E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F299	9.4E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F300	8.3E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F301	7.2E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F302	1.9E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
IgG1-F303	6.7E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F304	1.6E-08	M252W/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F305	2.7E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F306	3.6E-08	M252W/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F307	3.6E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
IgG1-F308	1.8E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F310	9.4E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F311	2.9E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
IgG1-F312	4.5E-07	S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y
IgG1-F313	6.5E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F314	3.2E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
IgG1-F315	6.8E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
IgG1-F316	7.0E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
IgG1-F317	1.1E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F318	1.8E-08	S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F320	2.0E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F321	3.2E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
IgG1-F322	9.2E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
IgG1-F323	2.7E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y
IgG1-F324	2.8E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y

[0823]

[0824] 표 9-9는 표 9-8의 계속이다.

[0825]

[표 9-9]

IgG1-F325	2.1E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F326	7.5E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F327	6.5E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F328	1.9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F329	1.2E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F330	3.6E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
IgG1-F331	3.0E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
IgG1-F333	7.4E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
IgG1-F334	1.9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
IgG1-F335	1.5E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F336	1.4E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F337	5.6E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F338	7.7E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F339	1.9E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y
IgG1-F343	3.2E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F344	3.0E-08	S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F349	1.5E-07	S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F350	1.7E-07	S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F352	6.0E-07	S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F353	1.1E-06	S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F354	2.8E-08	S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F356	3.4E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y
IgG1-F357	1.6E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
IgG1-F358	1.0E-07	S239K/M252Y/T307Q/N434Y
IgG1-F359	4.2E-07	P257V/T307Q/M428I/N434Y
IgG1-F360	1.3E-06	P257V/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F362	5.4E-08	P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F363	4.1E-08	P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F364	3.5E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F365	5.1E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F367	1.5E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
IgG1-F368	2.0E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
IgG1-F369	7.5E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y
IgG1-F372	1.3E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F373	1.1E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y

[0826]

표 9-10은 표 9-9의 계속이다.

[0828]

[표 9-10]

IgG1-F374	1.2E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F375	5.5E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F376	9.5E-09	S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F377	1.3E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y
IgG1-F379	1.0E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
IgG1-F380	5.6E-09	S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y
IgG1-F381	1.1E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F382	8.7E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F386	3.2E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y
IgG1-F387	1.5E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y
IgG1-F388	7.0E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y
IgG1-F389	1.7E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y
IgG1-F390	6.8E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y
IgG1-F391	3.6E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y
IgG1-F392	6.9E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F393	1.2E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y
IgG1-F394	5.3E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F395	2.4E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y
IgG1-F396	2.0E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F397	4.5E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y
IgG1-F398	4.4E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F399	6.5E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F400	6.1E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y
IgG1-F401	6.9E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
IgG1-F402	2.3E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W
IgG1-F403	5.1E-08	P257V/T307A/M428L/N434W
IgG1-F404	9.4E-08	P257A/T307Q/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F405	1.7E-07	P257V/T307Q/L309P/M428L/N434Y
IgG1-F406	1.5E-07	P257A/T307Q/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F407	1.6E-07	P257V/T307Q/L309R/M428L/N434Y
IgG1-F408	2.5E-07	P257V/N286E/M428L/N434Y
IgG1-F409	2.0E-07	P257V/P387E/M428I/N434Y
IgG1-F410	2.2E-07	P257V/T307H/M428L/N434Y
IgG1-F411	1.3E-07	P257V/T307N/M428L/N434Y

[0829]

[0830] 표 9-11은 표 9-10의 계속이다.

[0831]

[표 9-11]

IgG1-F412	8.8E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
IgG1-F413	1.2E-07	P257V/T307P/M428L/N434Y
IgG1-F414	1.1E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
IgG1-F415	5.6E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F416	9.4E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F418	6.2E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F419	1.6E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
IgG1-F420	1.5E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387E/N434Y
IgG1-F421	1.3E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
IgG1-F422	1.8E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
IgG1-F423	8.4E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
IgG1-F424	9.4E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F425	8.0E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
IgG1-F426	8.4E-08	P257V/T307Q/N434Y
IgG1-F427	1.1E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F428	8.0E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F429	3.7E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
IgG1-F430	8.1E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F431	6.5E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F432	9.2E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
IgG1-F433	6.0E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
IgG1-F434	2.0E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F435	2.5E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
IgG1-F436	2.5E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y
IgG1-F437	5.7E-08	P257A/T307Q/N434Y
IgG1-F438	3.6E-08	P257A/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F439	4.0E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F440	1.5E-08	P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F441	1.8E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F442	2.0E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F443	5.5E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F444	1.4E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
IgG1-F445	6.2E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F446	1.1E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F447	1.4E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y

[0832]

[0833] 표 9-12는 표 9-11의 계속이다.

[0834]

[표 9-12]

IgG1-F448	5.3E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F449	5.7E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F450	5.2E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F451	1.0E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F452	1.4E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F453	7.8E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F454	9.6E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
IgG1-F455	2.5E-08	P257V/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F456	3.4E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F457	4.0E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F458	1.5E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F459	1.3E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F460	4.7E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F462	8.5E-08	P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F463	1.3E-07	P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F464	5.5E-08	P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F465	2.1E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F466	3.5E-07	T256E/P257V/N434Y
IgG1-F467	5.7E-07	T256E/P257T/N434Y
IgG1-F468	5.7E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F469	5.6E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F470	5.4E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F471	6.6E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F472	5.4E-08	P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F473	4.5E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F474	3.5E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F475	4.3E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F476	5.5E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
IgG1-F477	4.3E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
IgG1-F480	3.9E-08	P257L/V308P/N434Y
IgG1-F481	5.6E-08	P257T/T307Q/N434Y
IgG1-F482	7.0E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
IgG1-F483	5.7E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F484	6.2E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
IgG1-F485	9.7E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y

[0835]

[0836] 표 9-13은 표 9-12의 계속이다.

[0837]

[표 9-13]

IgG1-F486	3.4E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F488	3.5E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F490	7.5E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y
IgG1-F492	9.8E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
IgG1-F493	4.9E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F497	3.1E-06	P257T/T307A/M428V/N434Y
IgG1-F498	1.3E-06	P257A/M428V/N434Y
IgG1-F499	5.2E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y
IgG1-F500	4.3E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F506	1.9E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F507	5.1E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F508	1.1E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
IgG1-F509	5.8E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
IgG1-F510	5.3E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
IgG1-F511	4.2E-07	P257V/N434Y
IgG1-F512	5.8E-07	P257T/N434Y
IgG1-F517	3.1E-07	P257V/N286E/N434Y
IgG1-F518	4.2E-07	P257T/N286E/N434Y
IgG1-F519	2.6E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
IgG1-F521	1.1E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F523	2.6E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F526	1.9E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F527	9.4E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
IgG1-F529	2.5E-08	P257T/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F533	1.2E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
IgG1-F534	1.2E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
IgG1-F535	3.9E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F538	9.9E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F541	6.0E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F544	3.1E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F549	5.4E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F550	5.9E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F551	1.2E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F552	1.1E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
IgG1-F553	1.7E-07	M252Y/Q311A/N434Y

[0838]

[0839] 표 9-14는 표 9-13의 계속이다.

[0840]

[표 9-14]

IgG1-F554	2.8E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
IgG1-F556	1.5E-06	M252Y/T307Q/Q311A
IgG1-F559	8.0E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
IgG1-F560	2.8E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
IgG1-F561	1.4E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
IgG1-F562	8.3E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
IgG1-F563	1.3E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
IgG1-F564	1.9E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
IgG1-F565	9.2E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
IgG1-F566	6.1E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y
IgG1-F567	2.2E-07	M252Y/S254T/M428I/N434Y
IgG1-F568	1.1E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F569	2.0E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F570	1.3E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F571	8.1E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
IgG1-F572	1.0E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428I/N434Y
IgG1-F576	1.6E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
IgG1-F577	1.3E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
IgG1-F578	5.7E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
IgG1-F580	8.6E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
IgG1-F581	7.2E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y
IgG1-F582	7.5E-07	S239K/M252Y/V308P
IgG1-F583	7.8E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
IgG1-F584	6.3E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
IgG1-F585	2.9E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P
IgG1-F586	1.4E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
IgG1-F587	1.9E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
IgG1-F592	2.0E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
IgG1-F593	3.1E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428I/N434Y
IgG1-F595	1.8E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
IgG1-F596	4.0E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
IgG1-F597	2.2E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
IgG1-F598	1.4E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
IgG1-F599	5.2E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y

[0841]

[0842] [실시예 13] 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 32 계열을 사용하는 정상 상태 주입 모델에 의한 다양한 Fc 변체 항체의 생체 내 연구

[0843]

실시예 12에서 생성된 Fc 변체를 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 32 계열을 사용하는 정상 상태 주입 모델에서 혈장으로부터 항원을 제거하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 정상 상태 주입 모델 생체 내 연구를 실시예 1에 개시된 바와 같이 수행하였으나, 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 32 계열을 276 계열 대신에 사용하였고, 단클론 항-마우스 CD4 항체를 2 회(주입 펌프를 이식하기 전 및 항체 주사 후 14일째) 또는 3 회(주입 펌프를 이식하기 전 및 항체 주사 후 10 및 20일째) 주사하였다.

[0844]

표 9-1 내지 9-14에 개시된 Fc 변체들로부터, 하기 열거된 선택된 항체 Fc 변체들을 비교 실시예 2에 개시된 바와 같이 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현 및 정제하였다:

[0845]

VH3-IgG1 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1;

[0846]

VH3-IgG1-F11 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F11;

- [0847] VH3-IgG1-F14 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F14;
- [0848] VH3-IgG1-F39 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F39;
- [0849] VH3-IgG1-F48 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F48;
- [0850] VH3-IgG1-F140 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F140;
- [0851] VH3-IgG1-F157 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F157;
- [0852] VH3-IgG1-F194 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F194;
- [0853] VH3-IgG1-F196 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F196;
- [0854] VH3-IgG1-F198 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F198;
- [0855] VH3-IgG1-F262 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-262;
- [0856] VH3-IgG1-F264 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F264;
- [0857] VH3-IgG1-F393 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F393;
- [0858] VH3-IgG1-F434 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F424; 및
- [0859] VH3-IgG1-F447 및 VL3-CK를 포함하는 Fv4-IgG1-F447.
- [0860] 상기 항체들을 1 mg/kg의 용량으로 상기 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스 32 계열에 투여하였다.
- [0861] 도 21은 마우스에서 혈장 hsIL-6R 농도의 시간 과정을 개시한다. Fv4-IgG1에 비해, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는 모든 Fc 변체들은 혈장 hsIL-6R 농도의 감소, 따라서 혈장으로부터 증대된 항원 제거를 나타내었다. 상기 항원 농도 감소의 정도 및 영속성은 Fc 변체들 간에 상이하지만, 상기 모든 변체는 IgG1에 비해 혈장 hsIL-6R 농도를 일관되게 감소시켰으며, 이는 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대해 증가된 결합 친화성이 혈장으로부터 항원 제거를 보편적으로 증대시킴을 입증한다. 도 22는 마우스에서 혈장 항체 농도의 시간 과정을 개시한다. 항체 약동학은 Fc 변체들 간에 상이하였다.
- [0862] 실시예 9에 개시된 바와 같이, 항체당 혈장으로부터 제거된 항원의 양은, pH 7.0에서 인간 FcRn에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는 항체 Fc 변체를 투여함에 의해 항원 제거의 효율을 평가하는데 중요한 인자이다. 따라서, 각 항체에 대한 값 C(항원/항체 몰 비)의 시간 과정을 도 23에 개시하였다. 도 24는 pH 7.0에서 인간 FcRn에 대한 Fc 변체의 결합 친화성과 항체 투여 후 1일째의 값 C(항원/항체 몰 비) 간의 관계를 개시한다. 이는 본 연구에서 시험된 모든 항체 Fc 변체가 Fv4-IgG1에 비해 더 낮은 값 C를 가짐을 입증한다. 본 연구에서 시험된 모든 Fc 변체는 KD 3.0 마이크로 몰보다 더 강한 pH 7.0에서의 인간 FcRn에 대한 결합 친화성을 갖기 때문에, 본래의 인간 IgG1에 비해 더 높은 항원 제거 효율을 성취하였다. 이는 실시예 9에서 획득된 결과와 일치하였다 (도 17).
- [0863] 도 25는 본 연구에서 시험된 Fc 변체들 간에, F11, F39, F48 및 F264의 Fc 변체를 갖는 항체들이 IgG1에 대해 유사한 약동학을 나타냄을 개시한다. 본 연구를 인간 FcRn 트랜스제닉 마우스를 사용하여 수행하므로, 상기 Fc 변체는 또한 인간에서 IgG1과 유사한 긴 반감기를 갖는 것으로 예상된다. 도 26은 본래의 인간 IgG1에 대해 유사한 약동학을 갖는 항체들(F11, F39, F48, 및 F264)이 주사된 마우스에서 혈장 hsIL-6R 농도의 시간 과정을 개시한다. 이들 변체는 IgG1에 비해 혈장 hsIL-6R 농도를 대략 10 배 감소시켰다. 더욱이, 이들 항체는 상기 hsIL-6R 농도를 기준선 hsIL-6R 농도(항체 부재 농도) 아래로 감소시켰다. 따라서, 이들 항체는 혈장으로부터 항원의 장기간 제거를 가능하게 할 것이며, 따라서 만성적인 질병에 대한 항체 요법에 바람직한 긴 투여 간격을 가능하게 할 것이다.
- [0864] 도 27 및 28은 각각 IgG1, 및 Fc 변체 F157, F196 및 F262에 대한 혈장 항체 농도와 혈장 hsIL-6R 농도의 시간 과정을 개시한다. 놀랍게도, F157 및 F262의 항체 약동학은 본래의 인간 IgG1에 비해 혈장으로부터 현저하게 더 빠른 제거를 보였지만, F157 및 F262는 혈장으로부터 hsIL-6R의 매우 광범위하고 영속적인 제거를 나타내었다. 구체적으로, F157의 혈장 hsIL-6R 농도는 1 내지 28일(14일째 제외) 동안 검출 한계(1.56 ng/ml) 이하였고, F262의 경우는 14일 내지 28일 동안 검출 한계(1.56 ng/ml) 이하였다. 다른 한편으로, F157에 비해 더 느린 항체 제거를 갖는 F196의 경우, 항원 농도는 14일째에 증가하기 시작하였고 28일째에 기준선으로 다시 복귀하였다. 본 연구에서 시험된 Fc 변체들 중에, F157 및 F262는 28일째에 1.56 ng/ml 이하로 혈장 hsIL-6R

농도를 감소시킬 수 있는 유일한 Fc 변체였다.

[0865] F157 및 F262의 상기와 같은 영속적인 장기간 효과는 항체의 약동학으로부터 예상되지 않는데, 그 이유는 항체들이 본래의 인간 IgG1에 비해 매우 빠르게 혈장으로부터 제거되었기 때문이다. 특히, F157의 혈장 항체 농도는 21일째에 검출되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 혈장 hsIL-6R 농도는 21일 및 28일째에 1.56 ng/ml의 검출 한계보다 더 낮은 수준으로 계속해서 감소되었다. 이러한 뜻밖의 효과는 FcRn 결합된 형태로서 혈관 내피 세포의 표면에서의 상기 항체의 존재에 기인하는 것으로 생각된다. 이들 항체는 혈장 중에서 낮은 농도를 나타냈지만, FcRn 결합된 형태(혈장 항체 농도로서 측정할 수 없다)로서 혈관 구획 중에 여전히 존재한다. 이들 FcRn 결합된 항체는 여전히 혈장 중에서 항원에 결합할 수 있으며, 항원/항체 복합체의 FcRn 매개된 흡수 후에, 항원은 엔도솜 내에서 방출되고 리소솜에 의해 분해되는 반면 항체는 FcRn 결합된 형태로서 상기 세포 표면으로 다시 재순환된다. 따라서 이들 FcRn 결합된 항체는 항원 제거에 기여한다. 이는 이들 항체가, 상기 항체 농도가 혈장 중에서 낮아진 후에 조차도 항원 제거 능력을 유지하는 이유를 설명한다.

[0866] [실시예 14] 통상적인 항체 및 항원 제거 항체에 대한 비교를 위한 인실리코 연구

[0867] 실시예 13은 항원에 대한 pH-의존성 결합 및 중성 pH에서 인간 FcRn에 대해 증가된 결합 친화성을 갖는 항체가 혈장으로부터 항원을 제거할 수 있음을 입증한다. 따라서, 상기와 같은 항원 제거 항체는, 간단한 결합 및 중화가 질병 치료에 충분하지 않고 혈장으로부터 항원의 고갈이 필요한, 항원을 표적화하는 항체에 유용하다.

[0868] 항원 제거 항체는 또한 간단한 결합 및 중화가 충분한 항원 표적화 항체에 유용하다. 상기 항원의 항체 결합 및 중화는 혈장 중 항원과 적어도 동일한 몰 량의 항체를 필요로 한다(상기 항체가 상기 항원에 대해 무한 친화성을 갖는 경우, 항원은 상기 항원과 동일한 몰 량의 항체에 의해 중화될 수 있다). 통상적인 항체(pH-의존적인 항원 결합 및 Fc 조작이 없는 항체)와 대조적으로, 항원 제거 항체는 혈장 중 항원의 농도를 감소시킬 수 있다. 이는 상기 항원의 중화에 필요한 항체 농도를 감소시킬 수 있음을 의미한다. 항원 제거 항체가 혈장 항원 농도를 통상적인 항체에 비해 10 배까지 감소시킬 수 있다면, 상기 항원 중화에 필요한 항체 농도도 또한 10 배까지 감소할 수 있다. 따라서, 치료 환경 하에서, 항원 제거 항체는 통상적인 항체에 비해 항체 투여량을 감소시키거나 또는 투여 간격을 증가시킬 수 있다.

[0869] F11, F39, F48 및 F264와 같은 Fc 변체는 IgG1에 비해 혈장 항원 농도를 대략 10 배 감소시킬 수 있다. 통상적인 항체에 비해 상기와 같은 항원 제거 항체의 효과를 평가하기 위해서, 우리는 통상적인 항체 및 항원 제거 항체 모두에 대해 치료 환경에서의 항원 중화 유지에 필요한 항체 투여량의 인실리코 평가를 수행하였다. 우리는 중화를 유지하는데 필요한 투여량을 매 3 개월의 투여 간격(즉 Q3M에 필요한 투여량)에 의해 측정하였다.

[0870] 약동학 모델의 제작

[0871] 우리는 PK 분석 소프트웨어 SAAM II(SAAM 인스티튜트 인코포레이티드)를 사용하여 약동학(PK) 모델을 제작하였다. PK 모델을 문헌[Pharmacokinetic Pharmacodyn. 2001 Dec; 28(6): 507-32] 및 [Br J Clin Pharmacol. 2007 May; 63(5): 548-61]에 개시된 바와 같이 제작한다. 상기 PK 모델의 개념을 도 29에 나타낸다. 각 구획의 양을 하기 미분 방정식에 의해 개시하였다.

[0872] [수학식 1]

$$\begin{aligned} \frac{dXsc}{dt} &= -ka \times Xsc \\ \frac{dXmab}{dt} &= ka \times Xsc - CLmab \times \frac{Xmab}{Vmab} - kon \times \frac{Xmab \times Xag}{Vmab} + koff \times Xcom + \left(\frac{CLcom}{Vcom} - \frac{CLmab}{Vmab} \right) \times Xcom \\ \frac{dXcom}{dt} &= -CLcom \times \frac{Xcom}{Vcom} + kon \times \frac{Xmab \times Xag}{Vmab} - koff \times Xcom \\ \frac{dXag}{dt} &= -CLag \times \frac{Xag}{Vag} - kon \times \frac{Xmab \times Xag}{Vmab} + koff \times Xcom + R \end{aligned}$$

[0873]

상기 식에서,

Xsc는 피하 조직 중의 항체의 양이고,

Xmab는 혈청 중의 유리 항체의 양이고,

Xcom은 항체 및 항원의 면역 복합체(=복합체)의 양이고,

[0878] X_{ag} 는 혈청 중의 유리 항원의 양이고,

[0879] ka 는 흡수율 상수이다.

[0880] 상기 모델에서, 생물학적 이용효능(F)을 모든 항체들에 대해 1인 것으로 가정하고, 항원의 생합성 속도(R)를 하기식에 의해 정한다.

[0881] [수학식 2]

$$R = CLag \times Cpre$$

[0883] 상기 식에서,

[0884] $Cpre$ 는 혈청 중의 정상 상태 항원 농도이다.

[0885] 본 인실리코 연구에 사용된 약동학적 매개변수 및 항원 결합 동역학적 매개변수를 표 10에 개시한다.

[0886] [표 10]

CLmab	L/day/kg	0.0025
CLag	L/day/kg	0.0243
CLcom	L/day/kg	0.0045
$V_{mab}=V_{ag}$	L/kg	0.0843
V_{com}	L/kg	0.0519
ka	1/day	0.4800
k_{off}	1/day	53.0496
k_{on}	1/nM/day	53.0496
	L/ug/day	0.353664

[0887]

항원 제거 항체 및 친화성 성숙의 효과를 계산하기 위한 시뮬레이션

[0889] 항체 투여 전 정상 상태 농도($Cpre$)를 2,400 ng/ml로 설정하였다. 제작된 PK 모델을 사용하여, 본 발명자들은 단일 피하 투여 84일 후의 유리 항원 농도를 35 ng/ml 이하에서 유지하기 위해서 항체의 최소 투여량을 추정하였다. 항원의 분자량을 190 kDa으로 정하고, 치료 항체의 분자량은 모두 150 kDa으로 정한다.

[0890] 항체로서, 다양한 결합 친화성(KD 1 nM을 갖는 모 항체로부터 친화성 성숙의 상이한 정도)을 갖는 통상적인 항체 및 항원 제거 항체를 본 인실리코 연구에 사용하였다. 항원 제거 항체의 효과는 통상적인 항체보다 더 빠른 항원-항체 복합체의 제거로서 반영된다. 항원-항체 복합체의 제거 매개변수(CLcom)를 표 11에 개시한다.

[0891] [표 11]

		통상적인 Ab	항원 제거 Ab
CLcom	L/일/kg	0.0045	0.0729

[0892]

[0893] 1 nM의 KD를 갖는 모 항체로부터의 친화성 성숙의 효과를 또한 고려한다(친화성은 100 배 범위에서 변한다). 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM 및 10 pM의 KD를 본 인실리코 연구에 사용한다. 친화성 성숙의 효과는 감소하는 k_{off} 로서 반영된다. 상기 k_{off} 값은 100 배 범위에서 변한다($k_{off} = 53.05, 17.68, 5.30, 1.77, 0.53$ [1/일]).

[0894] 단일 피하 투여 84일 후의 유리 항원 농도를 35 ng/ml 이하에서 유지시키기 위해서 신체당 항체의 투여량을 통상적인 항체 및 항원 제거 항체에 대해 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM 및 10 pM의 결합 친화성(KD)으로 획득하였다. 결과를 표 12에 개시하였다.

[0895] [표 12]

용량(mg/신체)	1 nM	333 pM	100 pM	33 pM	10 pM
통상적인 Ab	2868	1256	692	532	475
항원 제거 Ab	180	81	46	36	33

[0896]

[0897] 1 nM의 결합 친화성을 갖는 통상적인 모 항체는 Q3M 투여를 성취하기 위해서 2,868 mg을 필요로 한다. 항체 투여량을 상기 항원에 대한 결합 친화성을 개선시킴으로써 감소시킬 수 있지만, 상기 투여량의 감소는 최대 한계

에 달한다. 상기 최대 한계는 상기 항원의 항체 결합 및 중화가 혈장 중 항원과 적어도 동일한 몰 량의 항체를 필요로 한다는 사실로부터 유래한다. 10 pM의 결합 친화성조차도, 통상적인 항체는 Q3M 투여를 성취하기 위해서 475 mg을 요하며, 이는 제형 항체 농도 및 피하 주사 가능한 부피의 제한으로 인해 단일 주사에 의해 피하 주사될 수 없는 투여량이다.

[0898] 다른 한편으로, pH 의존성을 상기 항원 결합에 설계하고(또는 pH 의존적인 결합을 갖는 항체를 직접 생성시키고) Fc 영역이 중성 pH에서 FcRn에 대한 증가된 결합 친화성을 갖도록 설계하여 통상적인 항체를 항원 제거 항체로 설계함으로써, 항체 투여량을 현저하게 감소시킬 수 있다. 1 nM의 결합 친화성을 갖는 항원 제거 항체는 Q3M 투여를 성취하기 위해서 단지 180 mg만을 요한다. 이러한 투여량 수준은 심지어 무한 친화성을 갖는 통상적인 항체에 의해서도 성취될 수 없다. 항원 제거 항체의 결합 친화성을 10 pM로 개선함으로써, 투여량을 33 mg으로 감소시킬 수 있으며, 이는 피하로 쉽게 주사될 수 있는 투여량이다.

[0899] 따라서, 상기 인실리코 연구는 항원 제거 항체가 통상적인 항체에 비해 현저한 이점을 가짐을 입증하였다. 상기 항체의 투여량을 통상적인 항체가 무한 친화성으로도 도달할 수 없는 수준으로 낮출 수 있다. 투여 간격에 대해서, 항원 제거 항체를 통상적인 항체와 동일한 투여량으로 주사하는 경우, 항원 제거 항체는 보다 지속적인 효과를 가질 것이며, 따라서 현저하게 더 긴 투여 간격이 가능하다. 상기 항원 제거 항체에 의한 투여량의 감소 및 연장되는 투여 간격은 모두 통상적인 항체에 비해 현저한 이점을 제공할 것이다.

[0900] 실시예 1에 개시된 바와 같이, 항원 제거 항체는 항원에 대한 pH 의존적인 결합을 반드시 필요로 하는 것은 아님은 물론이다. 상기 항원에 대한 pH 의존적인 결합은 상기 항체의 항원 제거 활성을 현저하게 증대시킬 수 있다. 또한, pH 의존적인 결합 성질은 혈장 및 엔도솜 내에서 상이한 농도를 갖는 다른 인자들을 사용함으로써 대체될 수 있다. 상기와 같은 인자를 또한, 혈장 내에서 항원과 결합하지만 엔도솜 내에서는 항원과 해리되는 항체를 생성시키는데 사용할 수 있다.

[0901] [실시예 15] pH-의존성 항-인간 IL-6 항체의 인간 IL-6 제거-촉진 효과의 증대에 대한 연구

pH-의존성 인간 IL-6 결합 항체의 생성

[0903] WO 2009/125825에 개시된 CLB8H-IgG1(서열번호 16) 및 CLB8L-CK(서열번호 17)를 포함하는 CLB8-IgG1은 키메릭 항-IL-6 항체이다. H16-IgG1(서열번호 18) 및 L13-CK(서열번호 19)를 포함하는 H16/L13-IgG1은 pH-의존적인 방식으로(pH 7.4에서는 결합하지만 pH 5.8에서는 해리된다) 인간 IL-6에 결합하는 성질을 CLB8-IgG1에 부여함으로부터 생성되는 키메릭 항-IL-6 항체이다.

인간 IL-6에 대한 키메릭 항-IL-6 항체의 pH-의존적인 결합 활성의 평가

[0905] CLB8-IgG1 및 H16/L13-IgG1을 비아코어 T100(GE 헬쓰케어)을 사용하여 pH 5.5 및 pH 7.4에서 인간 IL-6 결합 활성(해리 상수(KD))에 대해 평가하였다. 분석을 실행 완충제로서 0.05% 계면활성제 P20(pH 7.4 및 pH 6.0)을 함유하는 10 mmol/l ACES/150 mmol/l NaCl을 사용하여 수행하였다. 항체를 아미노-결합 방법을 사용하여 센서 칩 상에 고정화된 재조합 단백질 A/G(씨모 사이언티픽(Thermo Scientific))에 결합시킨 후에, 분석물로서 적합한 농도의 인간 IL-6(TORAY)을 주사하였다. 분석을 37 °C에서 수행하였다. 상기 분석 결과를 비아코어 T100 평가 소프트웨어(GE 헬쓰케어)를 사용하여 분석하고, 결합속도 상수, ka (1/Ms), 및 해리속도 상수, k_d (1/s)를 상기 분석 결과로부터 계산하였다. 이어서 KD(M)를 ka 및 k_d 로부터 계산하였다(표 13). 더욱 또한, 상기 pH-의존적인 결합을 각각의 항체에 대해 pH 7.4와 pH 6.0 간의 KD 비를 계산하기 위해 평가하였다.

[0906] [표 13]

샘플	pH	ka (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$KD(pH5.5)/KD(pH7.4)$
CLB8-IgG1	pH7.4	3.6E+06	8.0E-04	2.2E-10	0.8
	pH5.5	3.7E+06	6.6E-04	1.8E-10	
H16/L13-IgG1	pH7.4	2.1E+06	4.6E-03	2.2E-09	7.4
	pH5.5	3.7E+05	5.9E-03	1.6E-08	

중성 조건 하에서 FcRn-결합 활성을 갖는 pH-의존성 항-인간 IL-6 항체의 제조

[0908] [0909] 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합을 증가시키기 위해서 H16-IgG1(서열번호 18) 및 L13-CK(서열번호 19)를 포함하는 H16/L13-IgG1에 돌연변이를 도입시켰다. 구체적으로, H16-IgG1-v2(서열번호 20)를, EU 넘버링에서

434 번 위치의 Asn 대신 Trp를 치환하여 IgG1의 중쇄 불변 영역으로부터 제조한 반면, H16-F14(서열번호 21)는 EU 넘버링에서 252 번 위치의 Met 대신에 Tyr을 치환하고, 434 번 위치의 Asn 대신에 Trp를 치환함으로써 IgG1의 중쇄 불변 영역으로부터 제작하였다. 상기 아미노산 치환을 비교 실시예 1에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 도입시켰다.

[0910] CLB8H-IgG1(서열번호 16) 및 CLB8L-CK(서열번호 17)를 포함하는 CLB8-IgG1, H16-IgG1(서열번호 18) 및 L13-CK(서열번호 19)를 포함하는 H16/L13-IgG1, H16-IgG1-v2(서열번호 20) 및 L13-CK(서열번호 19)를 포함하는 H16/L13-IgG1-v2, 및 H16-F14(서열번호 21) 및 L13-CK(서열번호 19)를 포함하는 H16/L13-F14를 비교 실시예 2에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현 및 정제시켰다.

중성 pH에서 Fc 변체의 마우스 FcRn 결합 활성의 평가

[0912] VH3-IgG1 및 L(WT)를 포함하는 VH3/L(WT)-IgG1, VH3-IgG1-v2 및 L(WT)를 포함하는 VH3/L(WT)-IgG1-v2, 및 VH3-IgG1-F14 및 L(WT)를 포함하는 VH3/L(WT)-IgG1-F14(이들은 모두 실시예 5에 개시된 바와 같이 제조되었다)를 실시예 8에 개시된 방법에 의해 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn 결합에 대해 평가하였다.

[0913] 결과를 표 14에 나타내었다. IgG1은 매우 약한 결합 활성을 나타낸 반면, IgG1-v2 및 IgG1-F14는 pH 7.4에서 마우스 FcRn에 대해 더 강한 결합 친화성을 나타내었다.

[표 14]

	KD
IgG1	ND
IgG1-v2	1.0E-06
IgG1-F14	1.3E-07

정상 마우스를 사용하는 생체 내 시험

[0917] 인간 IL-6(hIL-6; TORAY) 및 항-인간 IL-6 항체의 생체 내 동역학을 정상 마우스(C57BL/6J 마우스; 찰스 리버 재팬)에서 hIL-6 단독 또는 hIL-6과 항-인간 IL-6 항체를 투여한 후에 평가하였다. hIL-6 용액(5 마이크로그램/ml) 또는 hIL-6 및 항-인간 IL-6 항체를 함유하는 혼합물의 용액(각각 CLB8-IgG1 그룹; 5 마이크로그램/ml의 hIL-6 및 0.025 mg/ml의 CLB8-IgG1, H16/L13-IgG1, H16/L13-IgG1-v2 및 H16/L13-IgG1-F14 그룹; 5 마이크로그램/ml의 hIL-6 및 0.14 mg/ml의 H16/L13-IgG1, H16/L13-IgG1-v2 및 H16/L13-IgG1-F14)을 꼬리 정맥 내로 10 mg/kg의 용량으로 1 회 투여하였다. 항체의 용량을, 인간 IL-6이 99.8% 넘게 상기 투여 용액 중의 상기 항체에 결합하도록 설정하였다. hIL-6 단독 투여 후 5 분, 30 분, 2 시간, 4 시간, 7 시간, 1일째에 채혈하고, hIL-6 및 항-인간 IL-6 항체 혼합물의 투여 후 5 분, 7 시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 7일, 14일, 21일 및 30일째에 채혈하였다. 상기 채혈된 혈액을 즉시 15,000 rpm 및 4 °C에서 15 분간 원심분리시켜 혈장을 분리하였다. 상기 분리된 혈장을 분석 전에 냉장고에서 -20 °C 이하에서 보관하였다.

ELISA에 의한 인간 IL-6 혈장 농도의 측정

[0919] 마우스 혈장 중의 인간 IL-6의 농도를 인간 IL-6 콘티킨(Quantikine) HS ELISA 키트(R&D)를 사용하여 측정하였다. 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 및 0.3125 ng/ml의 혈장 농도를 갖는 검량선 샘플, 및 100 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 샘플 중의 모든 인간 IL-6이 CLB8-IgG1에 결합하도록 만들기 위해서, 150 마이크로리터의 5 마이크로그램/ml CLB8-IgG1을 150 마이크로리터의 상기 검량선 샘플 및 혈장 샘플에 가하고, 이어서 상기 샘플들을 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 후속적으로, 상기 샘플들을 ELISA 키트(R&D)에 제공된 플레이트에 분배하고 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 이어서, ELISA 키트(R&D)에 제공된 IL-6 접합체를 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시키고 ELISA 키트(R&D)에 제공된 기질 용액을 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 후속적으로, 발색 반응을, 기질로서 ELISA 키트(R&D)에 제공된 증폭제 용액을 사용하여 실온에서 30 분 동안 반응하도록 수행하였다. 상기 반응을 ELISA 키트(R&D)에 제공된 정지 용액으로 정지시킨 후에, 490 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정하였다. 마우스 혈장 중의 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO(볼레클라 디바이시즈)를 사용하여 상기 검량선의 흡광도로부터 계산하였다. 상기 방법에 의해 측정된 바와 같은 정맥 내 투여 후 혈장 hIL-6 농도의 시간 과정을 정상 마우스에 대해서 도 30에 나타낸다.

ELISA에 의한 항-인간 IL-6 항체 혈장 농도의 측정

- [0921] 마우스 혈장 중의 항-인간 IL-6 항체의 농도를 ELISA에 의해 측정하였다. 항-인간 IgG(감마-쇄 특이성) F(ab')2 항체 단편(시그마)을 농크-임무노플레이트 맥시숍(날개 농크 인터내셔널) 상에 분배하고 4 °C에서 밤새 정치시켜 항-인간 IgG-고정화된 플레이트를 제조하였다. 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 및 0.025 마이크로그램/ml의 혈장 농도를 갖는 검량선 샘플, 및 100 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 샘플 중의 모든 항-인간 IL-6 항체가 인간 IL-6에 결합하도록 만들기 위해서, 200 마이크로리터의 1 마이크로그램/ml 인간 IL-6을 100 마이크로리터의 상기 검량선 샘플 및 혈장 샘플에 가하고, 이어서 상기 샘플들을 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 후속적으로, 상기 샘플들을 항-인간 IgG-고정화된 플레이트에 분배하고 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 이어서, 염소 항-인간 IgG(감마 쇄 특이성) 비오틴(BIOT) 접합체(서던 바이오테크 어쓰시에이션(Southern Biotech Association)를 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 후속적으로, 스트렙트아비딘-폴리HRP80(스테레오스페시픽 디텍션 테크놀로지스)을 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 기질로서 TMB 원 커포넌트 HRP 마이크로웰 서브스트레이트(BioFX 레보라토리즈)를 사용하여 발색 반응을 수행하였다. 1N 황산(쇼와 케미칼)으로 상기 반응을 정지시킨 후에, 450 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정하였다. 마우스 혈장 중의 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO(몰레클라 디바이시즈)를 사용하여 상기 검량선의 흡광도로부터 계산하였다. 상기 방법에 의해 측정된 바와 같은 정맥 내 투여 후 혈장 항체 농도의 시간 과정을 정상 마우스에 대해 도 31에 나타낸다.
- [0922] 인간 IL-6에 대한 pH-의존적인 결합의 효과
- [0923] pH-의존적인 방식으로 인간 IL-6에 결합하는 CLB8-IgG1 및 H16/L13-IgG1을 생체 내에서 시험하고, 결과를 이들 간에 비교하였다. 도 31에 나타낸 바와 같이, 항체의 약동학은 선형 제거를 나타내었다. 한편, 도 30에 나타낸 바와 같이, pH-의존적인 방식으로 인간 IL-6에 결합하는 H16/L13-IgG1과 동시에 투여된 hIL-6은 CLB8-IgG1과 동시에 투여된 hIL-6에 의해 상기 hIL-6의 제거를 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, pH-의존적인 인간 IL-6 결합 능력을 부여함으로써, 투여 후 4일째에 상기 혈장 hIL-6 농도가 약 76 배까지 감소될 수 있었다.
- [0924] 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합의 효과
- [0925] H16/L13-IgG1 외에, H16/L13-IgG1 내로 상술한 아미노산 치환을 도입시켜 생성된 H16/L13-IgG1-v2 및 H16/L13-F14를 정상 마우스를 사용하여 생체 내에서 시험하였다. 시험 결과를 H16-L13-IgG1의 결과와 비교하였다. 도 31에 나타낸 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대해 추가로 증가된 결합을 갖는 H16/L13-IgG1-v2의 혈장 항체 농도는 투여 후 1일째에 H16/L13-IgG1보다 2.9 배 더 낮았다. 한편으로, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대해 증가된 결합을 갖는 H16/L13-F14의 혈장 항체 농도는 투여 후 7 시간째에 H16/L13-IgG1보다 21 배 더 낮았다.
- [0926] 도 30에 나타낸 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대해 증가된 결합을 갖는 H16/L13-IgG1-v2 또는 H16/L13-F14와 동시에 투여된 hIL-6은 H16/L13-IgG1과 동시에 투여된 hIL-6에 의해 현저하게 더 빨리 제거되는 것으로 나타났다. H16/L13-IgG1-v2는 1일째에 H16/L13-IgG1에 의해 hIL-6의 혈장 농도를 대략 10 배 감소시켰다. H16/L13-F14는 7 시간째에 H16/L13-IgG1에 의해 hIL-6의 혈장 농도를 대략 38 배 감소시켰다. 따라서, 상기 혈장 인간 IL-6 농도는 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력을 부여함으로써 감소될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 상술한 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력을 부여함으로써, 상기 혈장 항체 농도를 감소시켰지만; 항체 농도의 감소를 크게 초과하는 상기 혈장 hIL-6 농도의 감소 효과가 생성되었다. 구체적으로, 이는 인간 IL-6의 제거가, pH-의존적인 방식으로 인간 IL-6에 결합하고 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력이 부여되는 항체를 투여함으로써 촉진될 수 있음을 의미한다.
- [0927] 상술한 발견은 인간 가용성 IL-6 수용체뿐만 아니라 인간 IL-6과 같은 항원의 혈장 항원 농도가 또한, 중성 조건 하에서 pH-의존적인 항원-결합 능력 및 FcRn-결합 능력을 모두 갖는 항체를 투여함으로써 현저하게 감소될 수 있음을 입증한다.
- [0928] [실시예 16] pH 의존적인 방식으로 인간 IgA에 결합하는 수용체 Fc 융합 단백질의 인간 IgA 제거-촉진 효과의 증대에 대한 연구
- [0929] pH 의존적인 방식으로 인간 IgA에 결합하는 수용체 Fc 융합 단백질의 생성
- [0930] AOH-IgG1(서열번호 22)의 이량체를 포함하는 A0-IgG1은 인간 CD89-Fc 융합 단백질이다. 문헌[J. Mol. Biol. (2003) 324: 645-657]에 개시된 바와 같이, 인간 CD89(또한 인간 Fc 알파 수용체 I로서 공지됨)는 pH-의존적인 방식으로(즉 중성 pH에서는 인간 IgA에 강하게 결합하나 산성 pH에서는 인간 IgA에 약하게 결합한다) 인간 IgA에 결합한다.

- [0931] 인간 IgA에 대한 CD89-Fc 융합 단백질의 pH-의존적인 결합 활성의 평가
- [0932] A0-IgG1을 비아코어 T100(GE 헬쓰케어)을 사용하여 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 IgA 결합 활성(해리 상수(KD))에 대해 평가하였다. 분석을 실행 완충제로서 0.05% 계면활성제 P20(pH 7.4 및 pH 6.0)을 함유하는 10 mmol/1 ACES/150 mmol/1 NaCl을 사용하여 수행하였다. CD89-Fc 융합 단백질을 아미노-결합 방법을 사용하여 센서 침상에 고정화된 재조합 단백질 A/G(써모 사이언티픽)에 결합시킨 후에, 분석물로서 적합한 농도의 hIgA(인간 IgA: 비교 실시에 5에 개시된 바와 같이 제조됨)를 주사하였다. 분석을 37 °C에서 수행하였다. 상기 분석 결과를 비아코어 T100 평가 소프트웨어(GE 헬쓰케어)를 사용하여 분석하고, 획득된 센소그램을 도 32에 나타냈다. 상기는 CD89-Fc 융합 단백질이 pH-의존적인 인간 IgA 결합 활성(중성 pH에서는 인간 IgA에 강하게 결합하지만, 산성 pH에서는 인간 IgA에 약하게 결합한다)을 가짐을 명백히 입증한다.
- [0933] 중성 조건 하에서 FcRn-결합 활성을 갖는 pH-의존성 수용체 Fc 융합 단백질의 제조
- [0934] 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합을 증가시키기 위해 A0H-IgG1(서열번호 22)의 이량체를 포함하는 A0-IgG1 내로 돌연변이를 도입시켰다. 구체적으로, A0-IgG1-v2를, A0-IgG1에서 426 번 위치에서 Asn을 Trp로 치환함으로써 IgG1의 중쇄 불변 영역으로부터 제조하였다. 상기 아미노산 치환을 비교 실시에 1에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 도입시켰다.
- [0935] A0H-IgG1(서열번호 22)의 이량체를 포함하는 A0-IgG1, 및 A0H-IgG1-v2(서열번호 23)의 이량체를 포함하는 A0-IgG1-v2를 비교 실시에 2에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현시키고 정제시켰다.
- [0936] 정상 마우스를 사용하는 생체 내 시험
- [0937] 인간 IgA(hIgA) 및 CD89-Fc 융합 단백질의 생체 내 동역학을 정상 마우스(C57BL/6J 마우스; 찰스 리버 재팬)에서 hIgA 단독 또는 hIgA와 CD89-Fc 융합 단백질(A0H-IgG1 또는 A0H-IgG1-v2)을 투여한 후에 평가하였다. hIgA 용액(80 마이크로그램/ml) 또는 hIgA 및 CD89-Fc 융합 단백질을 함유하는 혼합물의 용액(각각 80 마이크로그램/ml 및 1.5 mg/ml, 여기에서 상기 hIgA의 대부분은 CD89-Fc 융합 단백질에 결합되었다)을 꼬리 정맥 내로 10 ml/kg의 용량으로 1 회 투여하였다. 투여 후 15 분, 7 시간, 1일, 2일, 4일 및 7일째에 채혈하였다. 상기 채혈된 혈액을 즉시 15,000 rpm 및 4 °C에서 15 분간 원심분리시켜 혈장을 분리하였다. 상기 분리된 혈장을 분석 전에 냉장고에서 -20 °C 이하에서 보관하였다.
- [0938] ELISA에 의한 인간 IgA 혈장 농도의 측정
- [0939] 마우스 혈장 중의 인간 IgA의 농도를, 재조합 인간 IgA가 hsIL-6R에 대한 가변 영역을 가지므로 hsIL-6R을 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. 염소 항-인간 IgA 항체(베틸 레보라토리즈(Bethyl Laboratories))를 농크-임유노플레이트 맥시숍(날개 농크 인터내셔널) 상에 분배하고 4 °C에서 밤새 정치시켜 항-인간 IgA-고정화된 플레이트를 제조하였다. 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 또는 0.00625 마이크로그램/ml의 혈장 농도를 갖는 검량선 샘플, 및 100 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 샘플 중의 모든 인간 IgA가 hsIL-6R에 결합하도록 만들기 위해서, 200 마이크로리터의 10 마이크로그램/ml hsIL-6R을 100 마이크로리터의 상기 검량선 샘플 및 혈장 샘플에 가하고, 이어서 상기 샘플들을 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 후속적으로, 상기 샘플들을 항-인간 IgA-고정화된 플레이트에 분배하고 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 이어서, 비오틴화된 항-인간 IL-6R 항체(R&D)를 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 후속적으로, 스트렙트아비딘-폴리HRP80(스테레오스페시픽 디텍션 테크놀로지스)을 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 기질로서 TMB 원 커포넌트 HRP 마이크로웰 서브스트레이트(BioFX 레보라토리즈)를 사용하여 발색 반응을 수행하였다. 1N 황산(쇼와 케미칼)으로 상기 반응을 정치시킨 후에, 450 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정하였다. 마우스 혈장 중의 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO(몰레큘라 디바이시즈)를 사용하여 상기 검량선의 흡광도로부터 계산하였다. 상기 방법에 의해 측정된 바와 같은 정맥 내 투여 후 혈장 hIgA 농도의 시간 과정을 정상 마우스에 대해 도 33에 나타낸다.
- [0940] ELISA에 의한 CD89-Fc 융합 단백질 혈장 농도의 측정
- [0941] 마우스 혈장 중의 CD89-Fc 융합 단백질의 농도를 ELISA에 의해 측정하였다. 항-인간 IgG(감마-쇄 특이성) F(ab')2 항체 단편(시그마)을 농크-임유노플레이트 맥시숍(날개 농크 인터내셔널) 상에 분배하고 4 °C에서 밤새 정치시켜 항-인간 IgG-고정화된 플레이트를 제조하였다. 25.6, 12.8, 6.4, 3.2, 1.6, 0.8 및 0.4 마이크로그램/ml의 혈장 농도를 갖는 검량선 샘플, 및 100 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 샘플 중의 모든 CD89-Fc 융합 단백질이 인간 IgA에 결합하도록 만들기 위해서, 200 마이크로리터의 5 마이크로그램/ml 인간

IgA를 100 마이크로리터의 상기 검량선 샘플 및 혈장 샘플에 가하고, 이어서 상기 샘플들을 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 후속적으로, 상기 샘플들을 항-인간 IgG-고정화된 플레이트에 분배하고 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 이어서, 염소 항-인간 IgG(Fc 특이성)-알칼리성 포스파타제 접합체(시그마)를 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 후속적으로, 기질로서 블루포스 마이크로웰(BluePhos Microwell) 포스파타제 기질 시스템(커크가드 & 페리 레보라토리즈(Kirkegaard & Perry Laboratories))을 사용하여 발색 반응을 수행하고, 650 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정하였다. 마우스 혈장 중의 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO(볼레큘라 디바이시즈)를 사용하여 상기 검량선의 흡광도로부터 계산하였다. 상기 방법에 의해 측정된 바와 같은 정맥 내 투여 후 CD89-Fc 융합 단백질의 혈장 농도의 시간 과정을 정상 마우스에 대해 도 34에 나타낸다.

[0942] 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합의 효과

[0943] A0-IgG1 외에, A0-IgG1 내로 상술한 아미노산 치환을 도입시켜 생성된 A0-IgG1-v2를 정상 마우스를 사용하여 생체 내에서 시험하였다. 상기 시험 결과를 A0-IgG1의 결과와 비교하였다. 도 34에 나타낸 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대해 증가된 결합을 갖는 A0-IgG1-v2의 혈장 농도는 투여 후 2일째에 A0-IgG1 보다 1.8 배 더 났다.

[0944] 도 33에 나타낸 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대해 증가된 결합을 갖는 A0-IgG1-v2와 동시에 투여된 hIgA는 A0-IgG1과 동시에 투여된 hIgA에 비해 현저하게 더 빨리 제거되는 것으로 나타났다. A0-IgG1-v2는 2일째에 A0-IgG1에 비해 hIgA의 혈장 농도를 대략 5.7 배 감소시켰다. 상술한 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력을 부여함으로써, 상기 혈장 항체 농도를 감소시켰지만; 항체 농도의 감소를 크게 초과하는 상기 혈장 hIgA 농도의 감소 효과가 생성되었다. 구체적으로, 이는 인간 IgA의 제거가, pH-의존적인 방식으로 인간 IgA에 결합하고 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력이 부여되는 수용체 Fc 융합 단백질을 투여함으로써 촉진될 수 있음을 의미한다.

[0945] 상술한 발견은 인간 IgA의 경우와 같은 혈장 항원 농도가 또한, 중성 조건 하에서 pH-의존적인 항원-결합 능력 및 FcRn-결합 능력을 모두 갖는 수용체 Fc 융합 단백질을 투여함으로써 현저하게 감소될 수 있음을 입증한다. 따라서, 수용체 Fc 융합 단백질을 또한 혈장으로부터 항원(또는 리간드) 혈장 농도를 감소시키는 능력을 갖도록 설계할 수 있다.

[0946] [실시예 17] pH-의존적인 항-인간 플렉신 A1 항체의 플렉신 A1 제거-촉진 효과의 증대에 대한 연구(항체의 제조)

[0947] pH-의존적인 인간 플렉신 A1-결합 항체에 관하여

[0948] PX268H-IgG1(서열번호 24) 및 PX268L-CK(서열번호 25)를 포함하는 PX268-IgG1은 키메릭 항-플렉신 A1 항체이다. PX141H-IgG1(서열번호 26) 및 PX141L-CK(서열번호 27)를 포함하는 PX141-IgG1은 pH-의존적인 방식으로(즉 중성 pH에서 가용성 인간 플렉신 A1에 강하게 결합하지만 산성 pH에서는 가용성 인간 플렉신 A1에 약하게 결합한다) 가용성 인간 플렉신 A1에 결합하는 키메릭 항-플렉신 A1 항체이다.

[0949] 인간 플렉신 A1에 대한 항-인간 플렉신 A1의 pH-의존적인 결합 활성의 평가

[0950] PX268-IgG1 및 PX141-IgG1을 비아코어 T100(GE 헬쓰케어)을 사용하여 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 플렉신 A1 결합 활성(해리 상수(KD))에 대해 평가하였다. 분석을 실행 완충제로서 0.05% 계면활성제 P20(pH 7.4 및 pH 6.0)을 함유하는 10 mmol/l ACES/150 mmol/l NaCl을 사용하여 수행하였다. 항체를 아미노-결합 방법을 사용하여 센서 침 상에 고정화된 제조함 단백질 A/G(써모 사이언티픽(Thermo Scientific))에 결합시킨 후에, 분석물로서 적합한 농도의 hs플렉신 A1(가용성 인간 플렉신 A1: 비교 실시에 5에 개시된 바와 같이 제조됨)을 주사하였다. 분석을 37 °C에서 수행하였다. 상기 분석 결과를 비아코어 T100 평가 소프트웨어(GE 헬쓰케어)를 사용하여 분석하고, 결합속도 상수, $ka(1/\text{Ms})$, 및 해리속도 상수, $k_d(1/\text{s})$ 를 상기 분석 결과로부터 계산하였다. 이어서 KD(M)를 ka 및 k_d 로부터 계산하였다(표 15). 더욱 또한, 상기 pH-의존적인 결합을 각각의 항체에 대해 pH 7.4와 pH 6.0 간의 KD 비를 계산하기 위해 평가하였다.

[0951]

[표 15]

리간드	샘플_pH	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD(pH6.0)/KD(pH7.4)
PX268-IgG1	pH7.4	5.2E+04	2.8E-04	5.4E-09	0.8
	pH6.0	6.3E+04	2.7E-04	4.4E-09	
PX141-IgG1	pH7.4	1.5E+05	6.4E-04	4.2E-09	14.9
	pH6.0	7.9E+04	4.9E-03	6.3E-08	

[0952]

증성 조건 하에서 FcRn-결합 활성을 갖는 pH-의존성 항-인간 플렉신 A1 항체의 제조

[0954]

증성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합을 증가시키기 위해서 PX141H-IgG1(서열번호 26) 및 PX141L-CK(서열번호 27)를 포함하는 PX141-IgG1에 돌연변이를 도입시켰다. 구체적으로, PX141H-IgG1-v2(서열번호 28)를, EU 넘버링에서 434 번 위치의 Asn 대신 Trp를 치환하여 IgG1의 중쇄 불변 영역으로부터 제조하였다. 상기 아미노산 치환을 비교 실시예 1에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 도입시켰다.

[0955]

PX268H-IgG1(서열번호 24) 및 PX268L-CK(서열번호 25)를 포함하는 PX268-IgG1, PX141H-IgG1(서열번호 26) 및 PX141L-CK(서열번호 27)를 포함하는 PX141-IgG1, 및 PX141H-IgG1-v2(서열번호 28) 및 PX141L-CK(서열번호 27)를 포함하는 PX141-IgG1-v2를 비교 실시예 2에 개시된 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현 및 정제시켰다.

[0956]

정상 마우스를 사용하는 생체 내 시험

[0957]

가용성 인간 플렉신 A1(hs 플렉신 A1) 및 항-인간 플렉신 A1 항체의 생체 내 동역학을 정상 마우스(C57BL/6J 마우스; 칼스 리버 재팬)에서 hs 플렉신 A1 단독 또는 hs 플렉신 A1 및 항-인간 플렉신 A1 항체를 투여한 후에 평가하였다. hs 플렉신 A1 용액(100 마이크로그램/ml) 또는 hs 플렉신 A1 및 항-인간 플렉신 A1 하항체를 함유하는 혼합물의 용액(각각 PX268-IgG1 그룹; 100 마이크로그램/ml의 hs 플렉신 A1 및 1.2 mg/ml의 PX268-IgG1, PX141-IgG1 및 PX141-IgG1-v2 그룹; 100 마이크로그램/ml의 hs 플렉신 A1 및 1.0 mg/ml의 PX141-IgG1 및 PX141-IgG1-v2)을 꼬리 정맥 내로 10 ml/kg의 용량으로 1 회 투여하였다.

[0958]

항체의 용량을, 가용성 인간 플렉신 A1이 99.9% 넘게 투여 용액 중의 항체에 결합하도록 설정하였다. hs 플렉신 A1 및 항-인간 플렉신 A1 항체 용액 혼합물의 투여 후 15 분, 7 시간, 1일, 2일, 4일, 7일째에 채혈하였다. 상기 채혈된 혈액을 즉시 15,000 rpm 및 4 °C에서 15 분간 원심분리시켜 혈장을 분리하였다. 상기 분리된 혈장을 분석 전에 냉장고에서 -20 °C 이하에서 보관하였다.

[0959]

hs 플렉신 A1 단독 투여 후 ELISA에 의한 인간 플렉신 A1 혈장 농도의 측정

[0960]

마우스 혈장 중의 인간 플렉신 A1의 농도를, 제조한 인간 플렉신 A1이 C 말단의 FLAG-태그 서열 단부를 가지므로 비오틴화된 항-FLAG M2 항체(시그마)를 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. 토끼에 대해 플렉신 A1을 면역시킴으로써 제조된 토끼 항-인간 플렉신 A1 다클론 항체를 농크-임무노플레이트 맥시숍(날개 농크 인터내셔널) 상에 분배하고 4 °C에서 밤새 정치시켜 항-인간 플렉신 A1-고정화된 플레이트를 제조하였다. 25.6, 12.8, 6.4, 3.2, 1.6 및 0.8 마이크로그램/ml의 혈장 농도를 갖는 검량선 샘플, 및 100 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 후속적으로, 상기 샘플들을 항-인간 플렉신 A1-고정화된 플레이트에 분배하고 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 이어서, 비오틴화된 항-FLAG M2 항체(시그마)를 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 후속적으로, 스트렙트아비딘-폴리HRP80(스테레오스페시픽 디텍션 테크놀로지스)을 가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 기질로서 TMB 원 콤포넌트 HRP 마이크로웰 기질(BioFX 레보라토리즈)을 사용하여 발색 반응을 수행하였다. 1N 황산(쇼와 케미칼)으로 상기 반응을 정지시킨 후에, 450 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정하였다. 마우스 혈장 중의 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO(몰레큘라 디바이시즈)를 사용하여 상기 검량선의 흡광도로부터 계산하였다. 상기 방법에 의해 측정된 바와 같은 정맥 내 투여 후 혈장 hs 플렉신 A1 농도의 시간 과정을 정상 마우스에 대해 도 35에 나타낸다.

[0961]

ELISA에 의한 PX268-IgG1 그룹 중의 인간 플렉신 A1 혈장 농도의 측정

[0962]

마우스 혈장 중의 인간 플렉신 A1의 농도를, 제조한 인간 플렉신 A1이 C 말단의 FLAG-태그 서열 단부를 가지므로 비오틴화된 항-FLAG M2 항체(시그마)를 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. 토끼에 대해 플렉신 A1을 면역시킴

으로써 제조된 토끼 항-인간 플렉신 A1 다클론 항체를 농크-임무노플레이트 맥시솝(날개 농크 인터내셔널) 상에 분배하고 4 °C에서 밤새 정치시켜 항-인간 플렉신 A1-고정화된 플레이트를 제조하였다. 25.6, 12.8, 6.4, 3.2, 1.6 및 0.8 마이크로그램/ml의 혈장 농도를 갖는 검량선 샘플, 및 50 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 샘플 중의 모든 인간 플렉신 A1이 PX268-IgG1에 결합하도록 하기 위해서, 150 마이크로리터의 40 마이크로그램/ml PX268-IgG1을 150 마이크로리터의 상기 검량선 샘플 및 혈장 샘플에 가하고, 이어서 상기 샘플들을 밤새 37 °C에서 정치시켰다. 후속적으로, 상기 샘플들을 항-인간 플렉신 A1-고정화된 플레이트에 분배하고 실온(또는 4 °C)에서 1 시간 동안 정치시켰다. 이어서, 비오틴화된 항-FLAG M2 항체(시그마)를 가하여 실온(또는 4 °C)에서 1 시간 동안 반응시켰다. 후속적으로, 스트렙트아비딘-폴리HRP80(스테레오스페시픽 디텍션 테크놀로지스)을 가하여 실온(또는 4 °C)에서 1 시간 동안 반응시키고, 기질로서 TMB 원 커포넌트 HRP 마이크로웰 기질(BioFX 레보라토리즈)을 사용하여 발색 반응을 수행하였다. 1N 황산(쇼와 케미칼)으로 상기 반응을 정지시킨 후에, 450 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정하였다. 마우스 혈장 중의 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO(몰레큘라 디바이시즈)를 사용하여 상기 검량선의 흡광도로부터 계산하였다. 상기 방법에 의해 측정된 바와 같은 정맥 내 투여 후 혈장 hs 플렉신 A1 농도의 시간 과정을 도 35에 나타낸다.

[0963] ELISA에 의한 PX141-IgG1 및 PX141-IgG1-v2 그룹 중의 인간 플렉신 A1 혈장 농도의 측정

마우스 혈장 중의 인간 플렉신 A1의 농도를, 제조합 인간 플렉신 A1이 C 말단의 FLAG-태그 서열 단부를 가지므로 비오틴화된 항-FLAG M2 항체(시그마)를 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. PX268-IgG1을 농크-임무노플레이트 맥시솝(날개 농크 인터내셔널) 상에 분배하고 4 °C에서 밤새 정치시켜 항-인간 플렉신 A1-고정화된 플레이트를 제조하였다. 25.6, 12.8, 6.4, 3.2, 1.6 및 0.8 마이크로그램/ml의 혈장 농도를 갖는 검량선 샘플, 및 50 배 이상 희석된 마우스 혈장 샘플을 제조하였다. 샘플 중의 모든 인간 플렉신 A1이 PX141-IgG1 또는 PX141-IgG1-v2에 결합하도록 하기 위해서, 150 마이크로리터의 40 마이크로그램/ml PX141-IgG1 또는 PX141-IgG1-v2를 150 마이크로리터의 상기 검량선 샘플 및 혈장 샘플에 가하고, 상기 샘플들을 밤새 37 °C에서 정치시켰다. 후속적으로, 상기 샘플들을 항-인간 플렉신 A1-고정화된 플레이트에 분배하고 실온(또는 4 °C)에서 1 시간 동안 정치시켰다. 이어서, 비오틴화된 항-FLAG M2 항체(시그마)를 가하여 실온(또는 4 °C)에서 1 시간 동안 반응시켰다. 후속적으로, 스트렙트아비딘-폴리HRP80(스테레오스페시픽 디텍션 테크놀로지스)을 가하여 실온(또는 4 °C)에서 1 시간 동안 반응시키고, 기질로서 TMB 원 커포넌트 HRP 마이크로웰 기질(BioFX 레보라토리즈)을 사용하여 발색 반응을 수행하였다. 1N 황산(쇼와 케미칼)으로 상기 반응을 정지시킨 후에, 450 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기에 의해 측정하였다. 마우스 혈장 중의 농도를 분석 소프트웨어 SOFTmax PRO(몰레큘라 디바이시즈)를 사용하여 상기 검량선의 흡광도로부터 계산하였다. 상기 방법에 의해 측정된 바와 같은 정맥 내 투여 후 7 시간째의 혈장 hs 플렉신 A1 농도를 도 35에 나타낸다.

[0965] 가용성 인간 플렉신 A1에 대한 pH-의존적인 결합의 효과

[0966] pH-의존적인 방식으로 인간 IL-6에 결합하는 PX268-IgG1 및 PX141-IgG1을 생체 내에서 시험하고, 결과를 이들 간에 비교하였다. 한편, 도 35에 나타낸 바와 같이, pH-의존적인 방식으로 가용성 인간 플렉신 A1에 결합하는 PX141-IgG1과 동시에 투여된 hs 플렉신 A1은 PX268-IgG1과 동시에 투여된 hs 플렉신 A1에 비해 hs 플렉신 A1의 총 혈장 농도를 감소시키는 것으로 밝혀졌다.

[0967] 중성 조건(pH 7.4) 하에서 FcRn 결합의 효과

[0968] PX141-IgG1 외에, PX141-IgG1 내로 상술한 아미노산 치환을 도입시켜 생성된 PX141-IgG1-v2를 정상 마우스를 사용하여 생체 내에서 시험하였다. 시험 결과를 PX141-IgG1의 결과와 비교하였다.

[0969] 도 35에 나타낸 바와 같이, 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn에 대해 증가된 결합을 갖는 PX141-IgG1-v2와 동시에 투여된 hs 플렉신 A1은 hs 플렉신 A1의 총 혈장 농도를 검출할 수 없는 수준(검출 한계는 0.8 마이크로그램/ml이다)으로 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서, 상기 가용성 인간 플렉신 A1 농도는 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력을 부여함으로써 감소될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 구체적으로, 이는 가용성 인간 플렉신 A1의 제거가, pH-의존적인 방식으로 인간 플렉신 A1에 결합하고 중성 조건(pH 7.4) 하에서 마우스 FcRn-결합 능력이 부여되는 항체를 투여함으로써 촉진될 수 있음을 의미한다.

[0970] 상술한 발견은 인간 가용성 IL-6 수용체뿐만 아니라 인간 IL-6, 인간 IgA 및 인간 가용성 플렉신 A1과 같은 항원의 혈장 항원 농도가 또한, 중성 조건 하에서 pH-의존적인 항원-결합 능력 및 FcRn-결합 능력을 모두 갖는 항체를 투여함으로써 현저하게 감소될 수 있음을 입증한다.

[0971] [비교 실시예 1] 아미노산 치환이 도입된 IgG 항체에 대한 발현 벡터의 제작

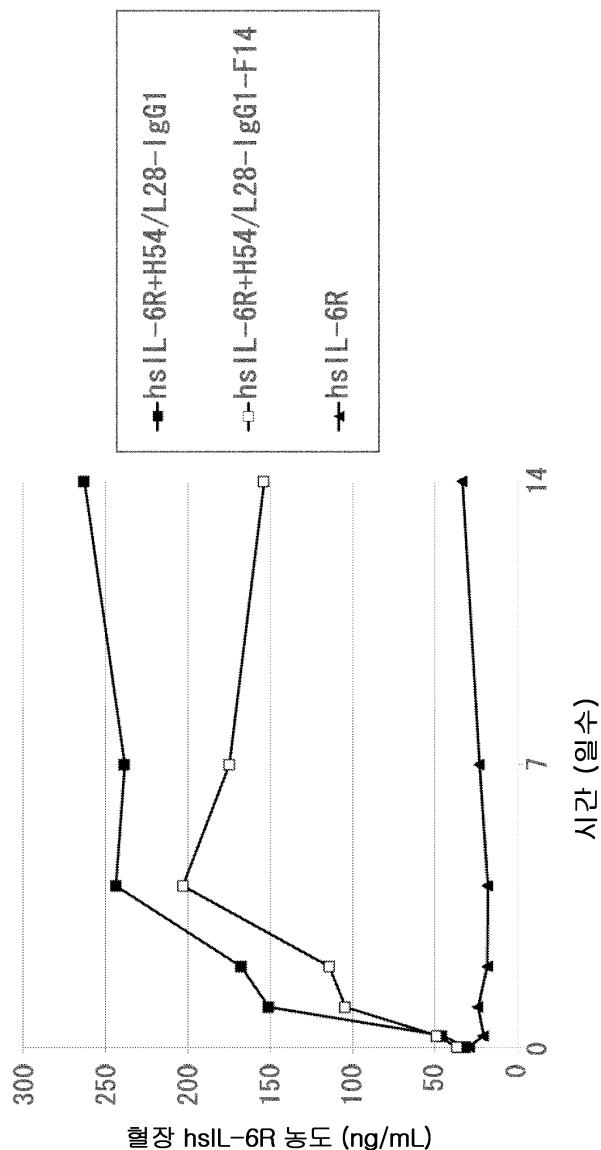
- [0972] 돌연변이체를 퀵체인저(QuikChange) 위치-지정 돌연변이 키트(스트라타진) 또는 인-퓨전(In-Fusion) HD 클로닝 키트(클론테크(Clontech))를 사용하여, 제공된 설명서에 개시된 방법에 따라 생성시켰으며, 생성된 플라스미드 단편을 포유동물 세포 발현 벡터에 삽입하여 목적하는 H 쇄 발현 벡터 및 L 쇄 발현 벡터를 생성시켰다. 상기 수득된 발현 벡터의 뉴클레오파이어 서열을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 측정하였다.
- [0973] [비교 실시예 2] IgG 항체의 발현 및 정제
- [0974] 항체를 하기에 개시된 방법에 의해 발현시켰다. 항체를 제조사에 의해 제공된 프로토콜에 의해 개시된 바와 같이 프리스타일(Freestyle)HEK293(인비트로젠(Invitrogen)) 또는 HEK293H 세포 주(인비트로젠)에 의해 발현시켰다. 인간 태아 신장암-유래된 HEK293H 세포 주(인비트로젠)를 10% 소 태아 혈청(인비트로젠)이 보충된 DMEM(인비트로젠)에 혼탁하였다. 상기 세포를 부착 세포용 접시(직경 10 cm; 코닝(CORNING))에서 5 내지 6×10^5 세포 /mL의 세포 밀도로 접시당 10 mL로 도말하고, 하루 종일 CO₂ 배양기(37 °C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 이어서 상기 배지를 흡출에 의해 제거하고, 6.9 mL의 CHO-S-SFM-II 배지(인비트로젠)를 가하였다. 상기 제조된 플라스미드를 리포택션 방법에 의해 상기 세포에 도입시켰다. 생성된 배양 상등액을 수거하고, 원심분리시켜(대략 2,000 x g, 5 분, 실온) 세포를 제거하고, 0.22-마이크로미터 필터 MILLEX(등록 상표)-GV(밀리포어)를 통해 여과함으로써 멀균하여 상등액을 수득하였다. 항체를 상기 수득된 배양 상등액으로부터 r프로테인 A 세파로스(상표) 패스트 플로우(애머샴 바이오사이언스(Amersham Biosciences))를 사용하여 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 정제시켰다. 상기 정제된 항체의 농도를 측정하기 위해서, 흡광도를 분광광도계를 사용하여 280 nm에서 측정하였다. 항체 농도를 문헌[Protein Science(1995) 4:2411-2423]에 개시된 방법에 의해 계산된 흡광도 계수를 사용하여 측정된 값으로부터 계산하였다.
- [0975] [비교 실시예 3] 가용성 인간 IL-6 수용체(hsIL-6R)의 제조
- [0976] 항원으로서 재조합 인간 IL-6 수용체를 하기와 같이 제조하였다. 문헌[J. Immunol. 152:4958-4968(1994)]에 보고된 바와 같이 N 말단으로부터 1 번 내지 357 번 위치의 아미노산 서열을 갖는 가용성 인간 IL-6 수용체(이후부터 hsIL-6R이라 칭한다)를 구조적으로 발현하는 세포 주를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 확립시켰다. 상기 세포를 hsIL-6R을 발현하도록 배양하였다. 상기 hsIL-6R을 2 단계, 즉 블루 세파로스 6 FF 컬럼 크로마토그래피 및 젤 여과 크로마토그래피에 의해 상기 배양 상등액으로부터 정제시켰다. 최종 단계에서 주요 피크로서 용출된 분획을 최종 정제 산물로서 사용하였다.
- [0977] [비교 실시예 4] 인간 FcRn의 제조
- [0978] FcRn은 FcRn과 베타2-마이크로글로불린의 복합체이다. 올리고-DNA 프라이머를 공개된 인간 FcRn 유전자 서열을 근거로 제조하였다(문헌[J. Exp. Med. 1994 Dec 1; 180(6): 2377-81]). 전체 유전자를 암호화하는 DNA 단편을 주형으로서 인간 cDNA(인간 태반 마라톤-레디(Marathon-Ready) cDNA, 클론테크) 및 상기 제조된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 제조하였다. 주형으로서 상기 수득된 DNA 단편을 사용하여, 신호 영역(Met1-Leu290)을 함유하는 세포 외 도메인을 암호화하는 DNA 단편을 PCR에 의해 증폭시키고, 포유동물 세포 발현 벡터 내에 삽입하였다. 마찬가지로, 올리고-DNA 프라이머를 공개된 인간 베타2-마이크로글로불린 유전자 서열을 근거로 제조하였다(문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26): 16899-16903 (2002)]). 전체 유전자를 암호화하는 DNA 단편을 주형으로서 인간 cDNA(인간 태반 마라톤-레디 cDNA, 클론테크) 및 상기 제조된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 제조하였다. 주형으로서 상기 수득된 DNA 단편을 사용하여, 신호 영역(Met1-Met119)을 함유하는 전체 단백질을 암호화하는 DNA 단편을 PCR에 의해 증폭시키고, 포유동물 세포 발현 벡터 내에 삽입하였다.
- [0979] 가용성 인간 FcRn을 하기 과정에 의해 발현시켰다. 인간 FcRn(서열번호 30) 및 베타2-마이크로글로불린(서열번호 31)을 발현시키기 위해 제작된 플라스미드를 PEI(폴리사이언스(Polyscience))를 사용하여 리포택션 방법에 의해 인간 태아 신장암-유래된 세포 주 HEK293H(인비트로젠)의 세포에 도입시켰다. 생성된 배양 상등액을 수거하고, FcRn을 IgG 세파로스 6 패스트 플로우(애머샴 바이오사이언스)를 사용하여 정제시킨 다음, 하이트랩(HiTrap) Q HP(GE 헬쓰케어)를 사용하여 추가로 정제시켰다(문헌[J. Immunol. 2002 Nov 1; 169(9): 5171-80]).
- [0980] [비교 실시예 5] 인간 IgA(hIgA)의 제조
- [0981] H(WT)-IgA1(서열번호 29) 및 L(WT)(서열번호 5)를 포함하는 hIgA를 r프로테인 L-아가로스(ACIgen)를 사용하여 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 의해 발현 및 정제시킨 다음 젤 여과 크로마토그래피를 수행하였다.
- [0982] [비교 실시예 6] 가용성 인간 플렉신 A1(hs 플렉신 A1)의 제조

[0983]

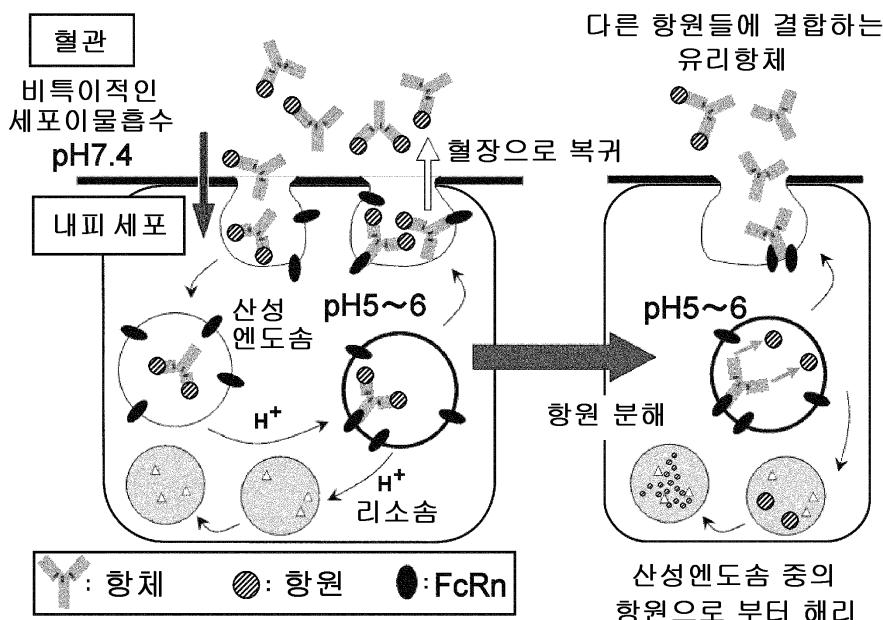
항원으로서 재조합 가용성 인간 플렉신 A1(이후부터 hs 플렉신 A1이라 칭함)을 하기와 같이 제조하였다. hs 플렉신 A1을 NCBI 비교 서열(NP_115618)을 참조하여 제작하였다. 특히, hs 플렉신 A1은 상기 언급한 NCBI 비교로부터 27 번 내지 1243 번 위치의 아미노산 서열로 구성되었다. FLAG-태그(DYKDDDDK)가 그의 C 말단에 연결되었다. hs 플렉신 A1을 프리스타일293(인비트로젠)을 사용하여 일시적으로 발현시키고 2 단계, 즉 항-FLAG 컬럼 크로마토그래피 및 젤 여과 크로마토그래피에 의해 배양 상등액으로부터 정제시켰다. 최종 단계에서 주요 피크로서 용출된 분획을 최종 정제 산물로서 사용하였다.]

도면

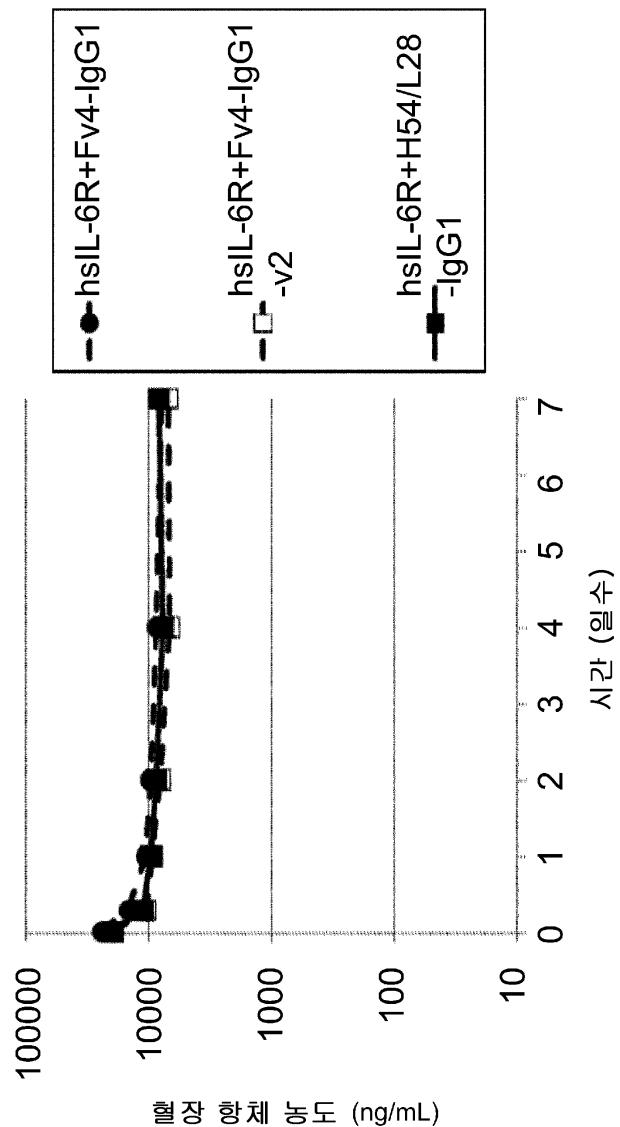
도면1



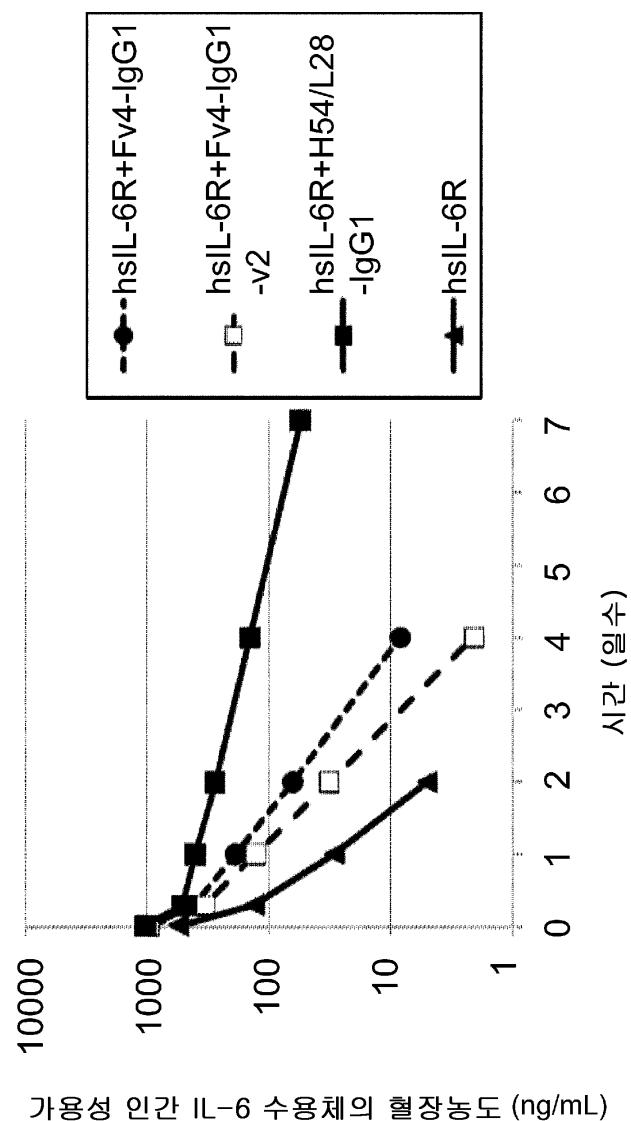
도면2



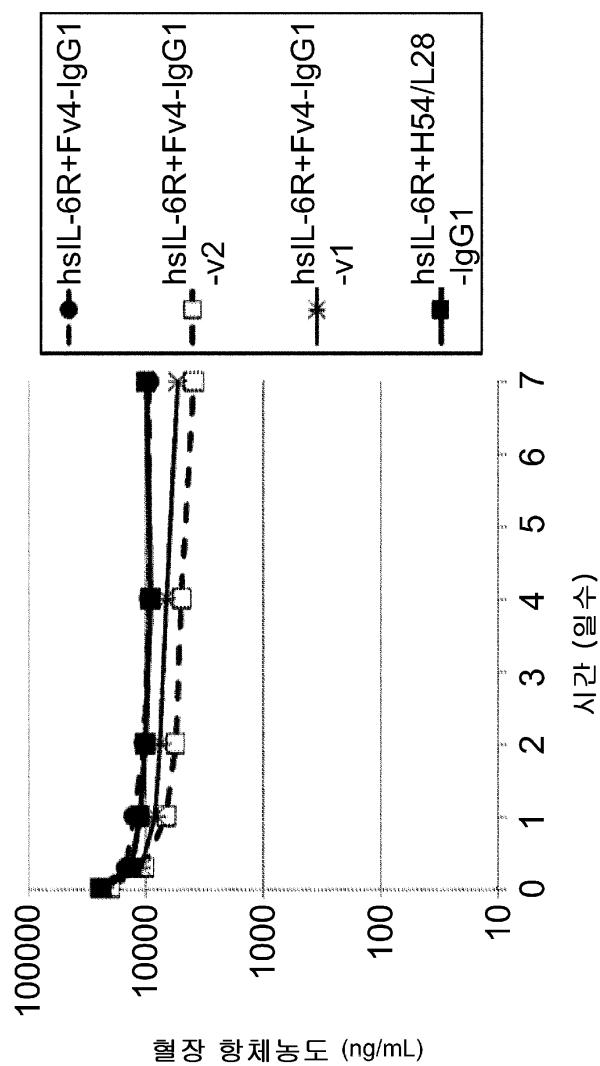
도면3



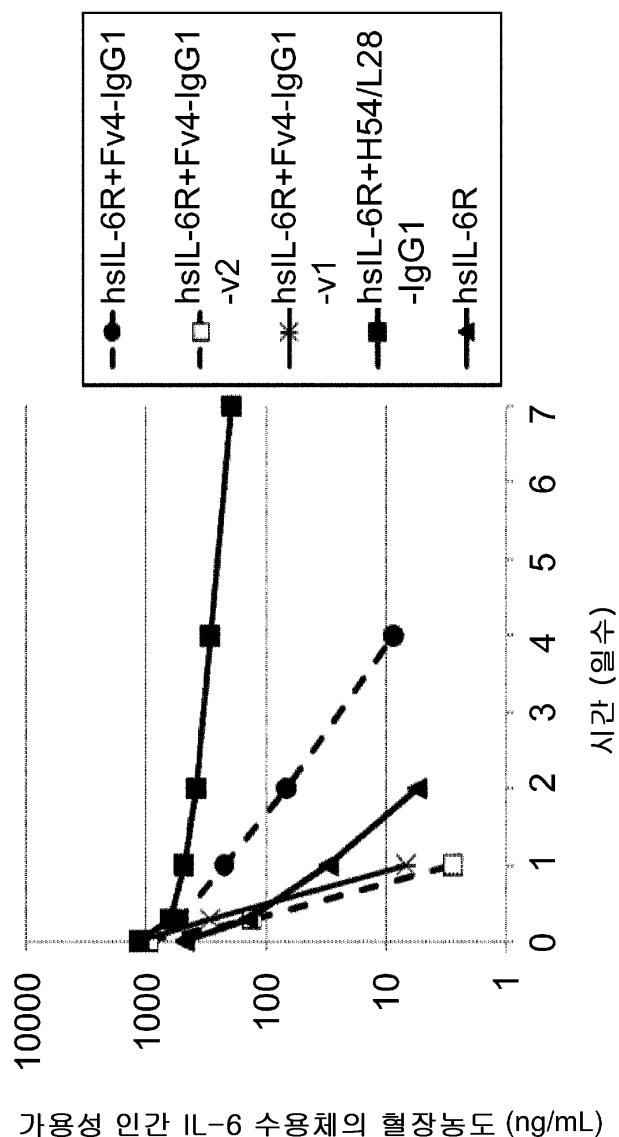
도면4



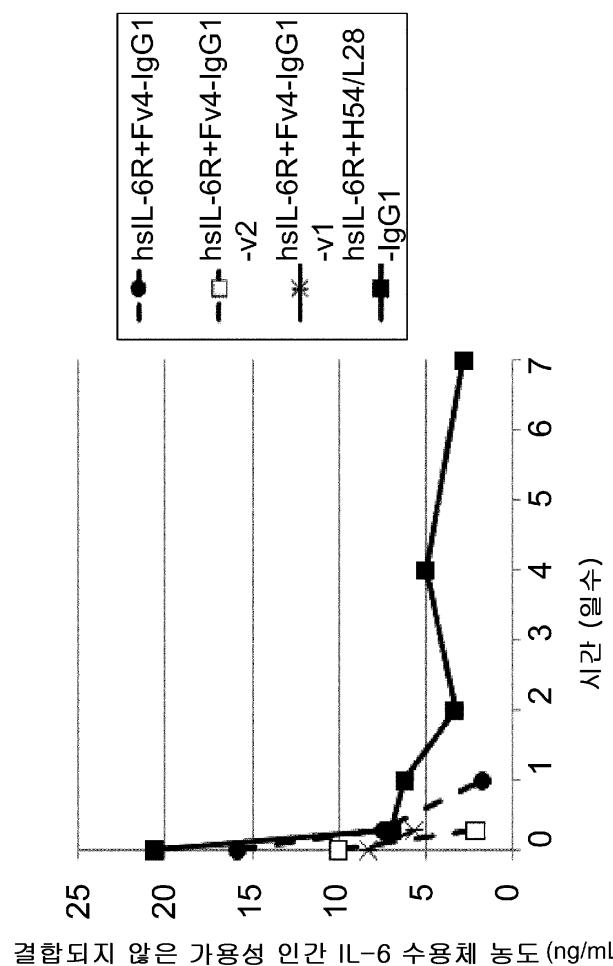
도면5



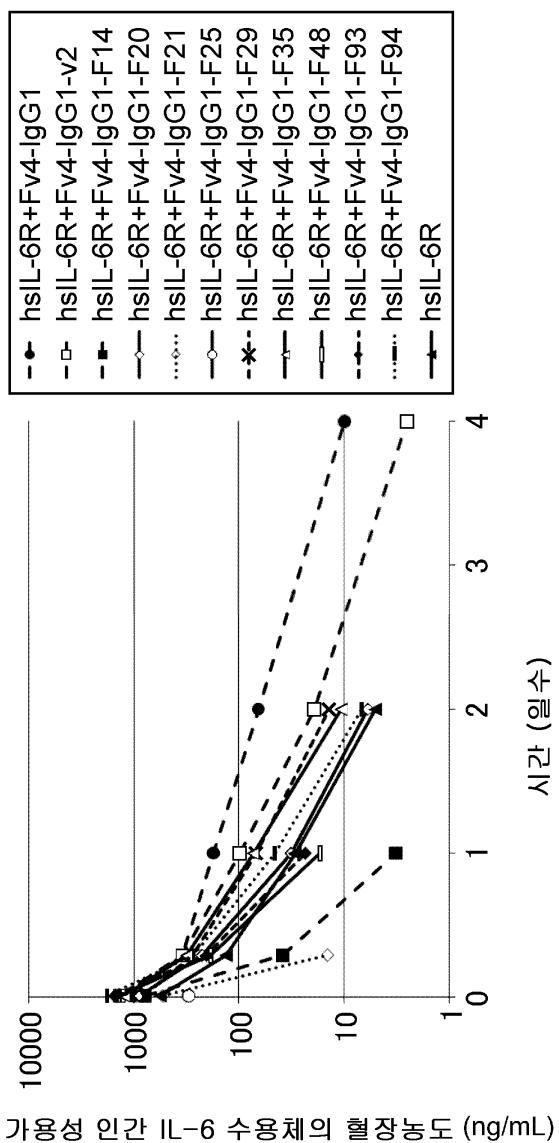
도면6



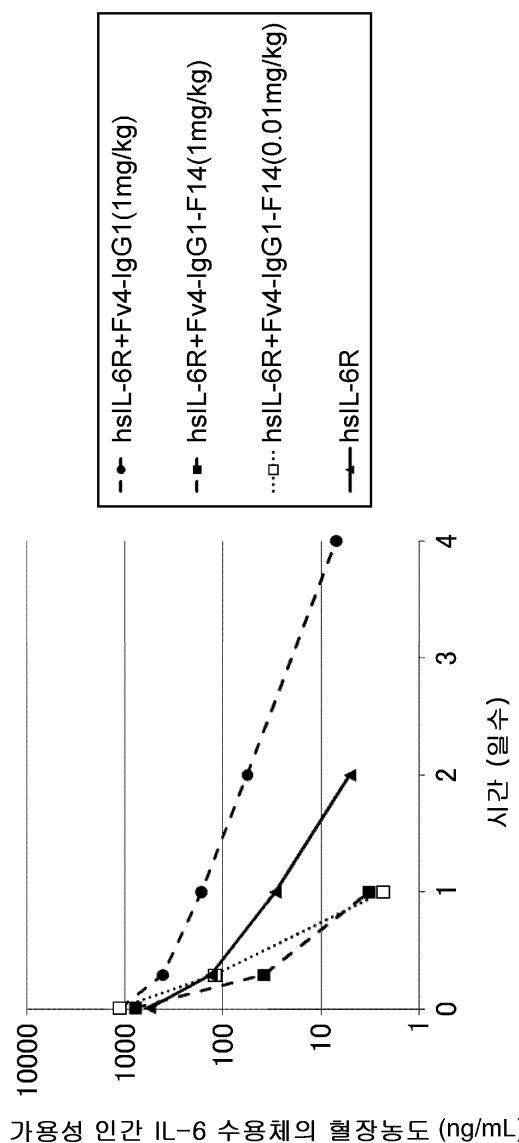
도면7



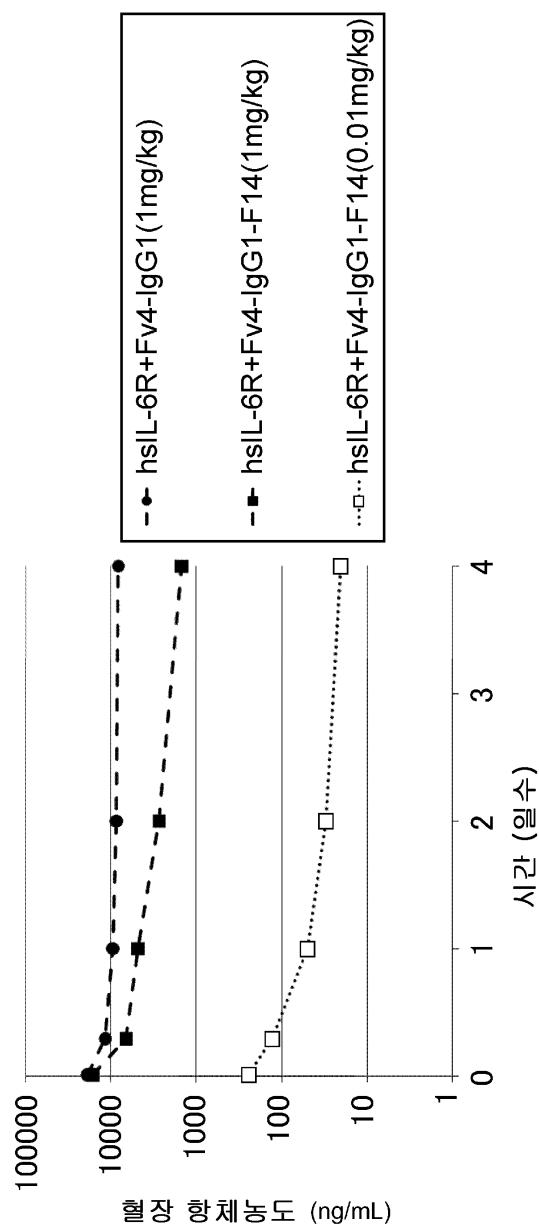
도면8



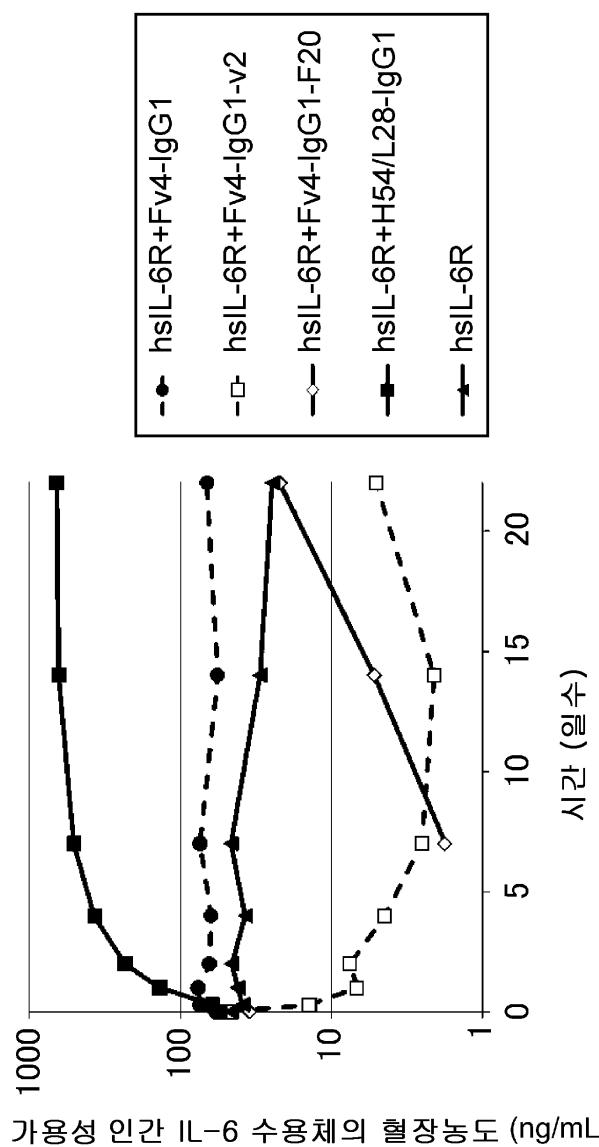
도면9



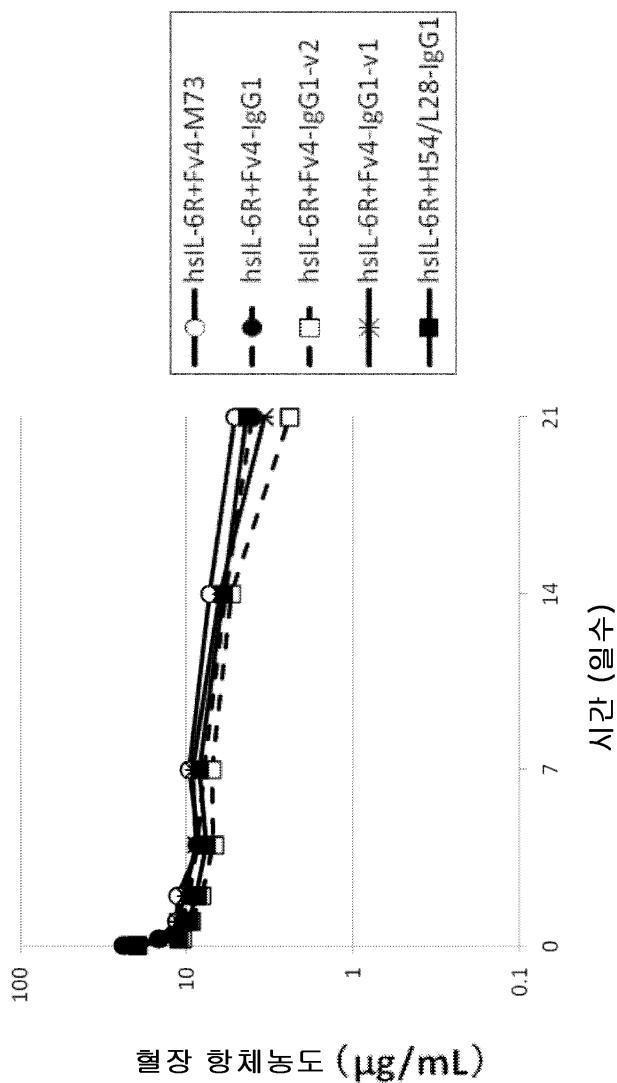
도면10



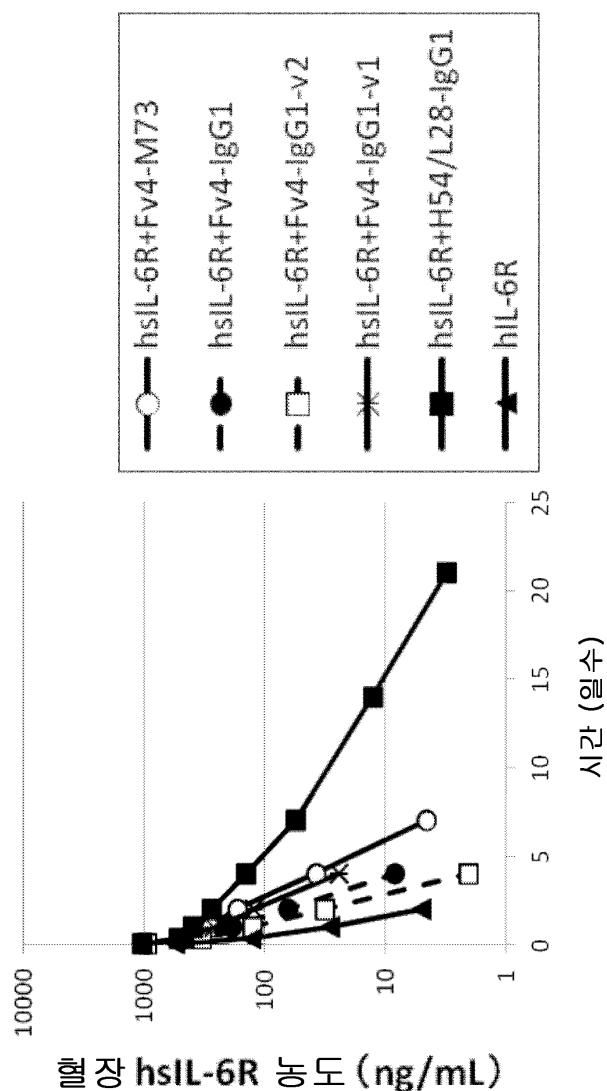
도면11



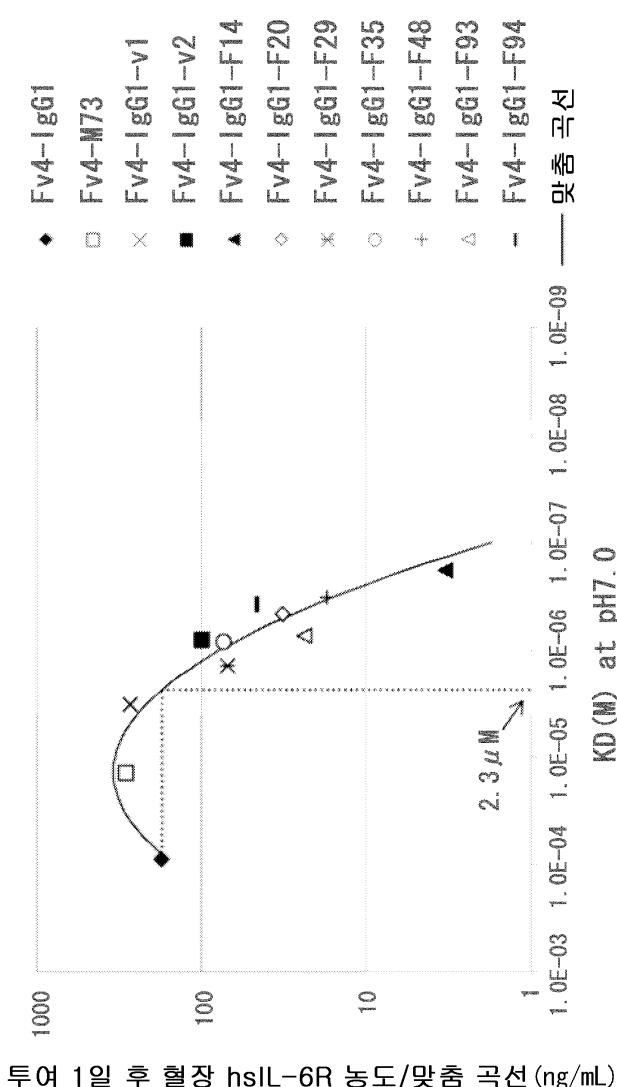
도면12



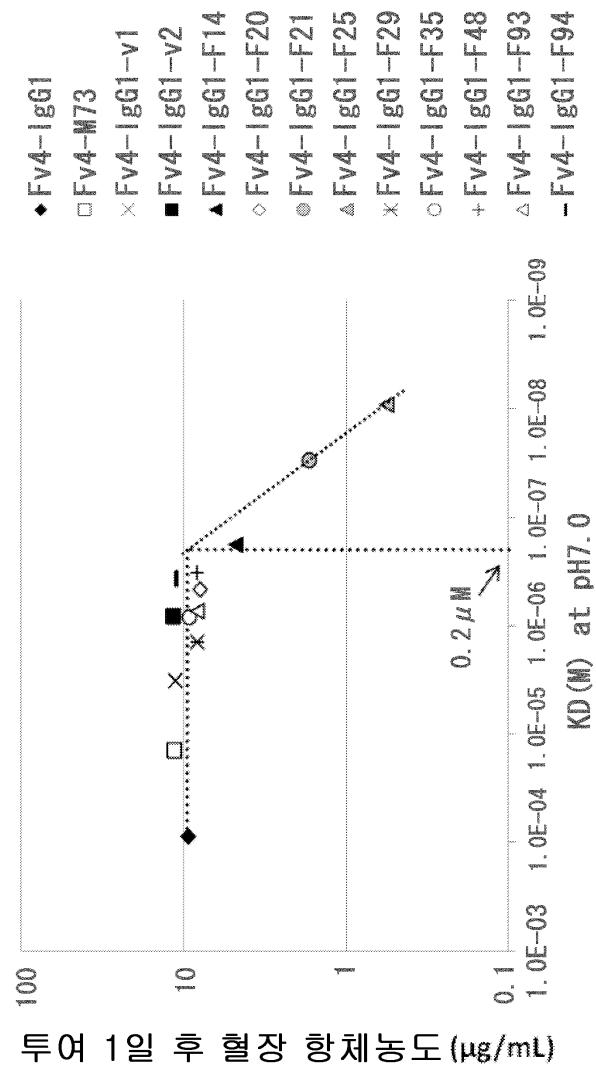
도면13



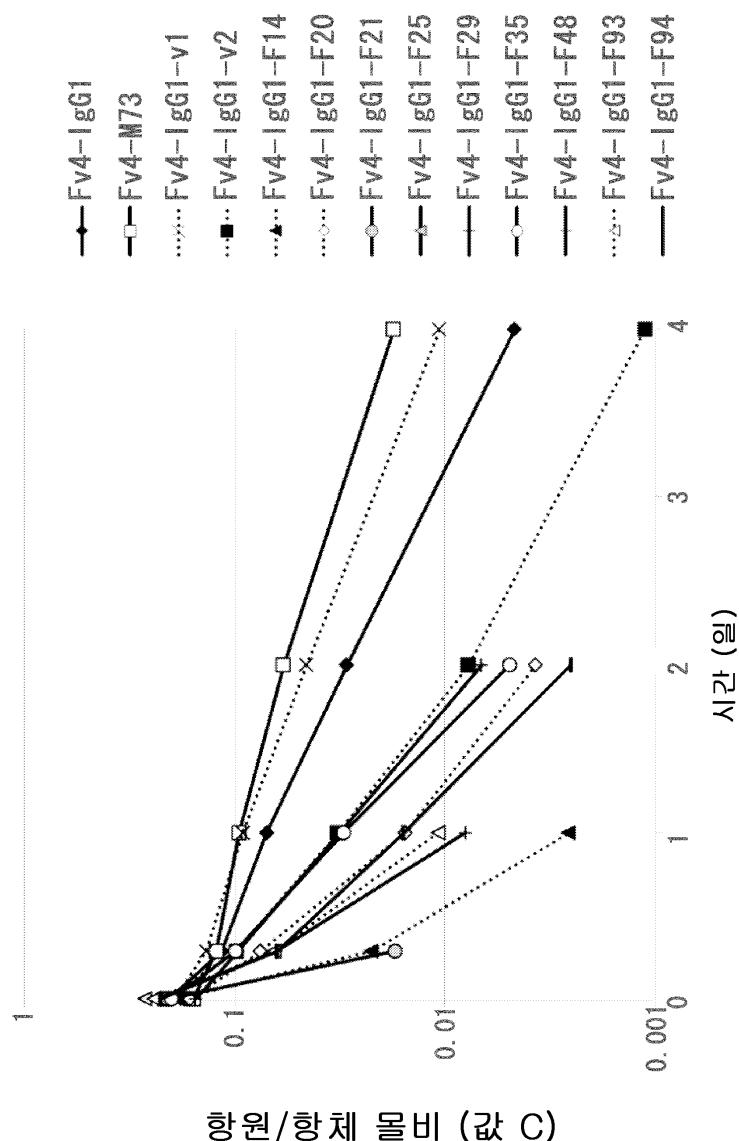
도면14



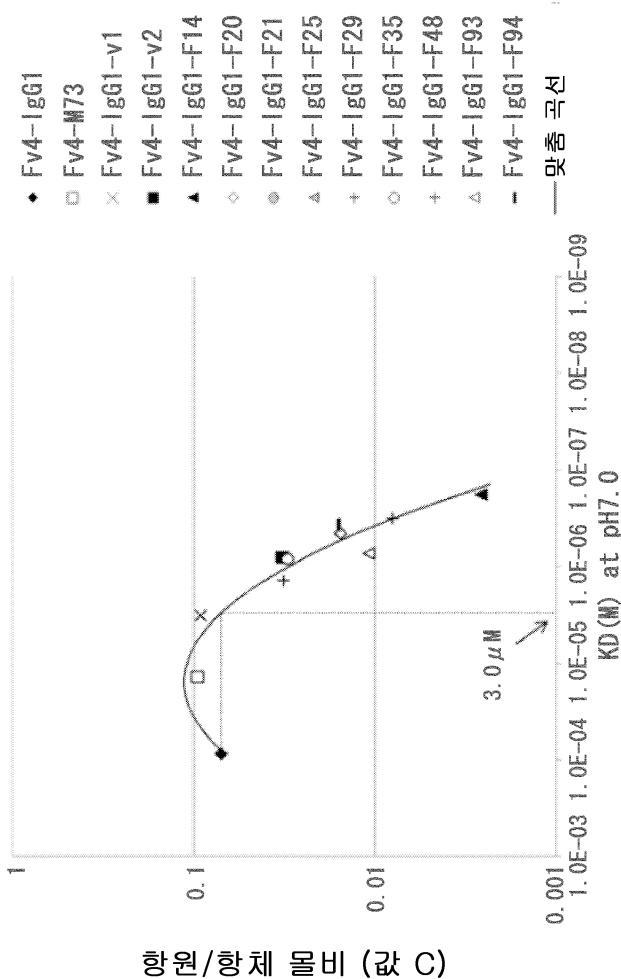
도면15



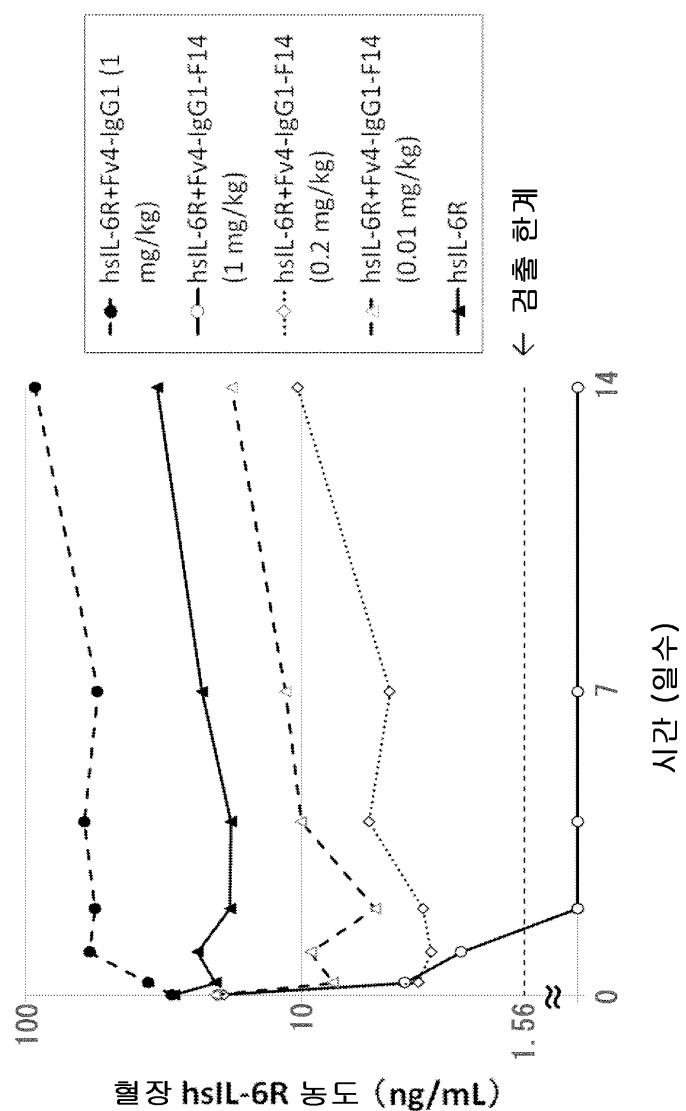
도면 16



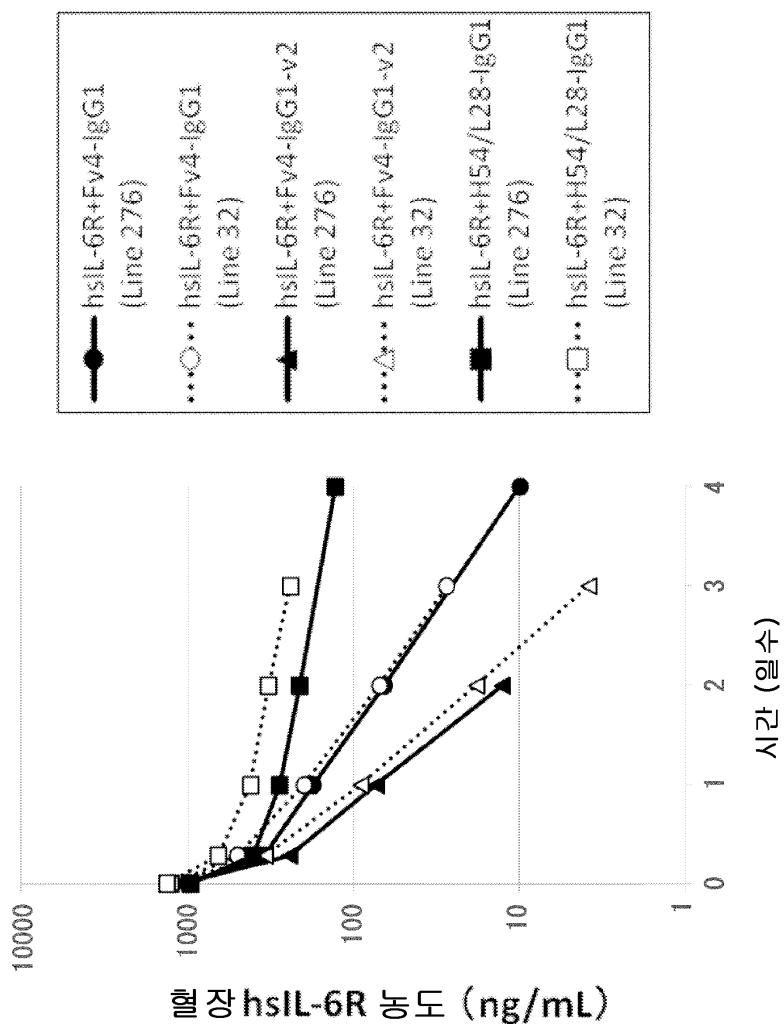
도면17



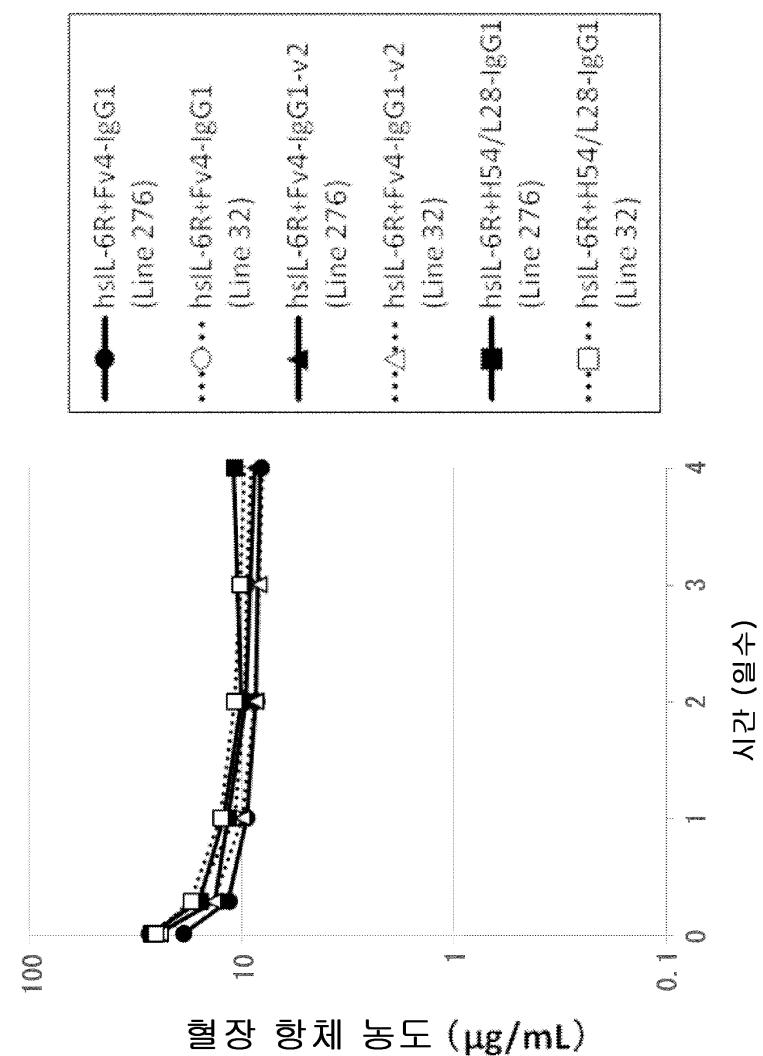
도면18



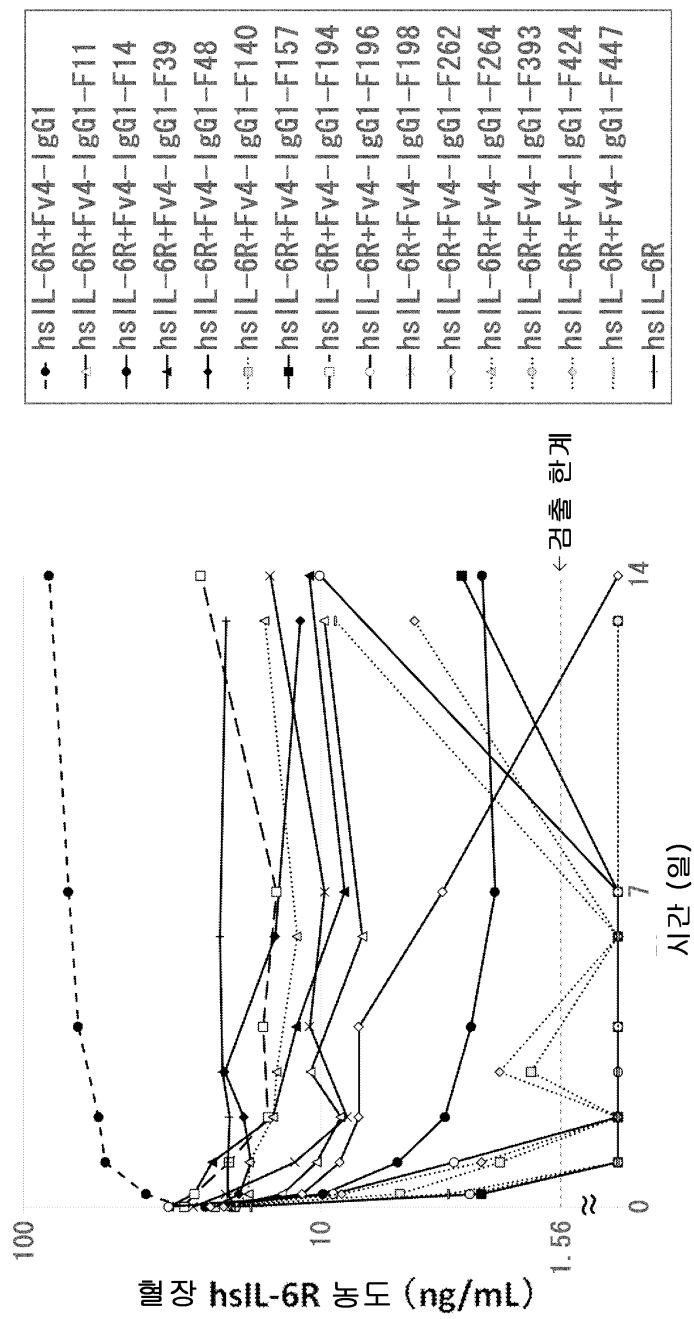
도면19



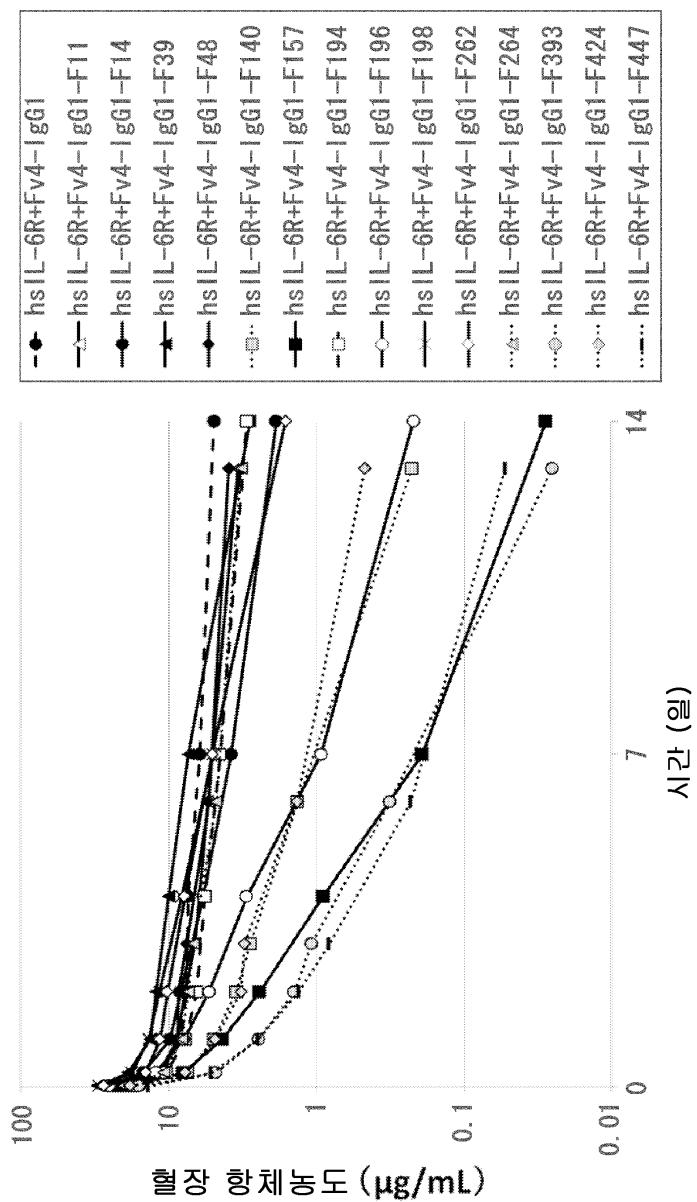
도면20



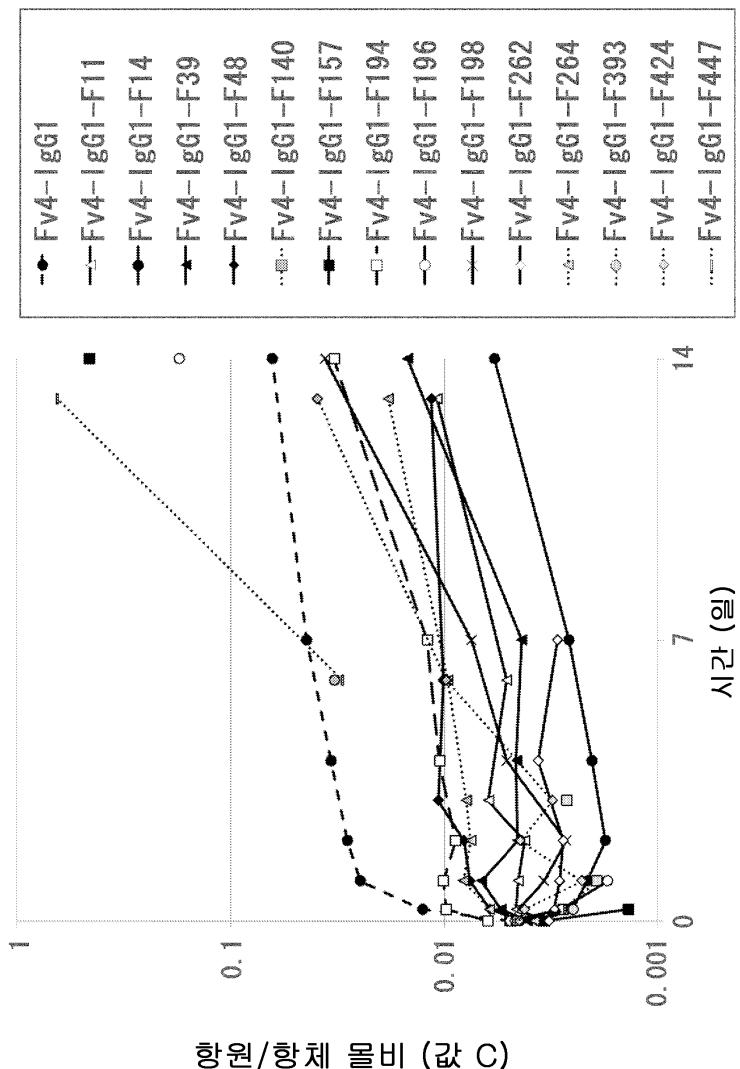
도면21



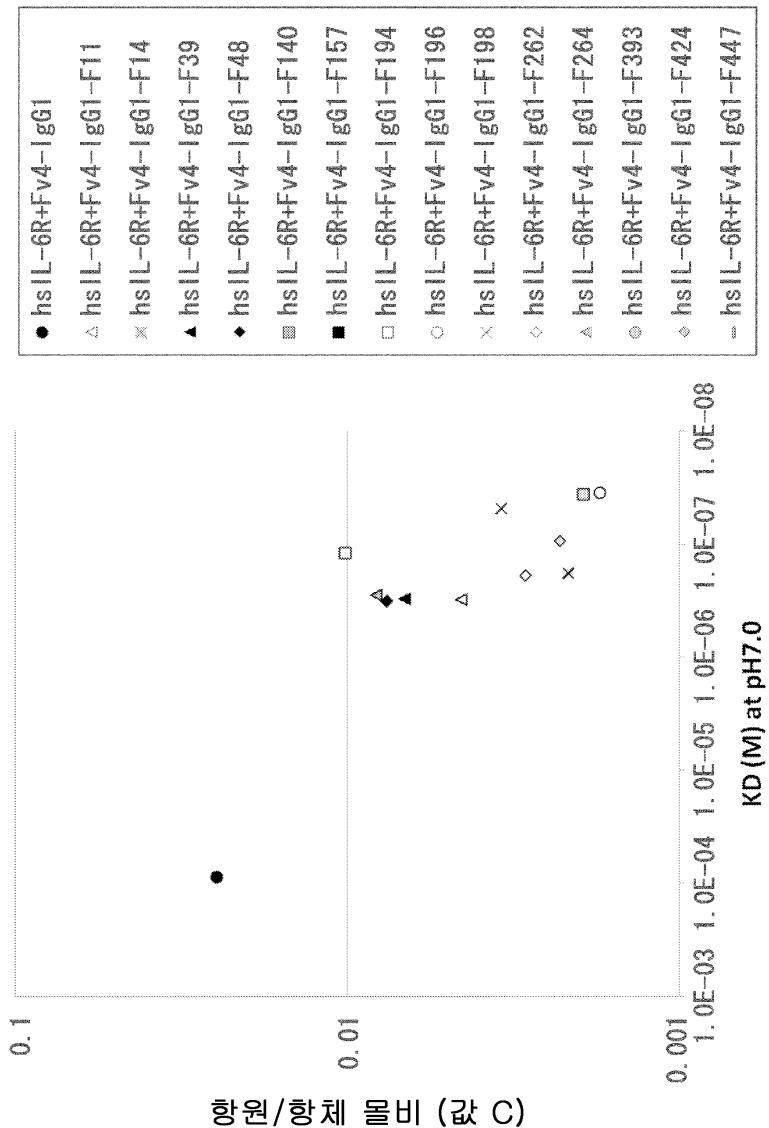
도면22



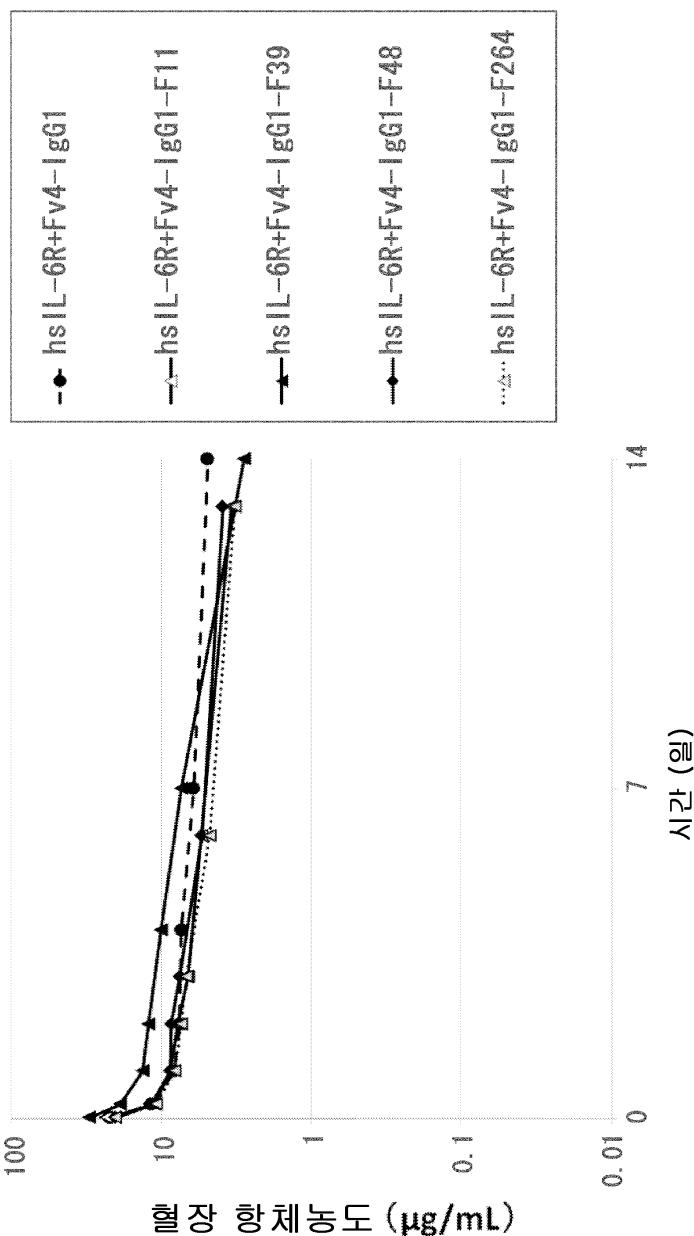
도면23



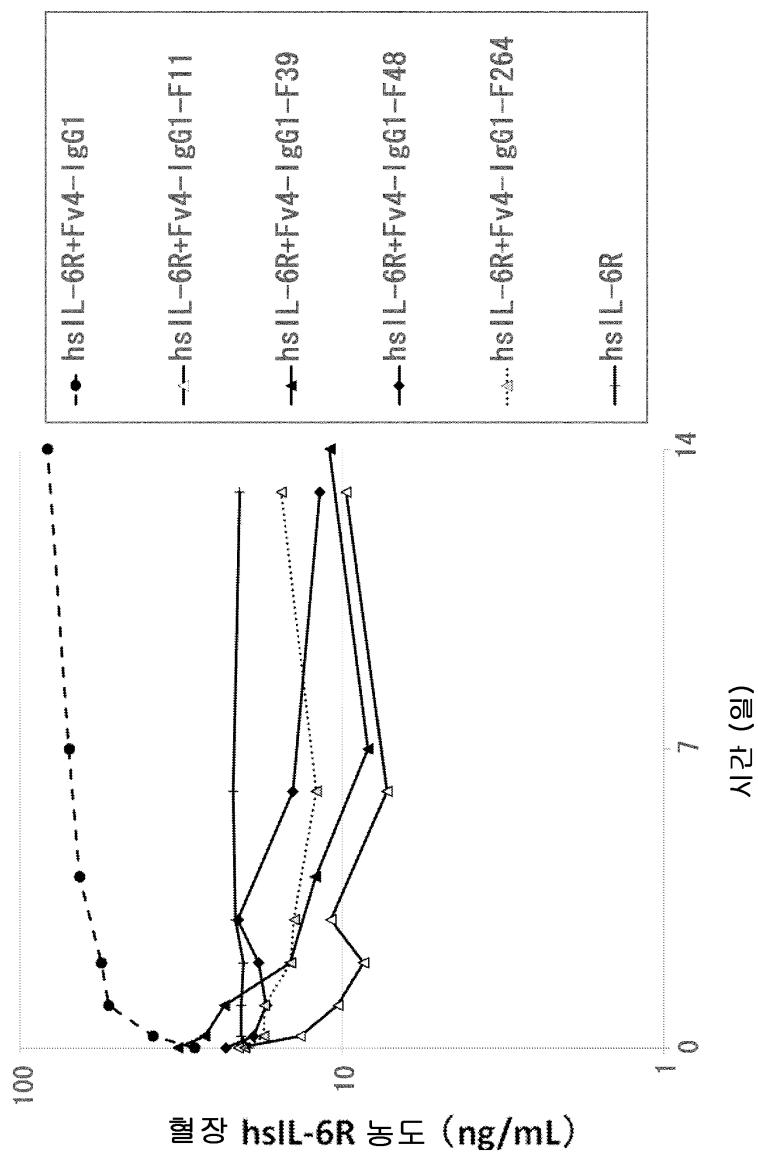
도면24



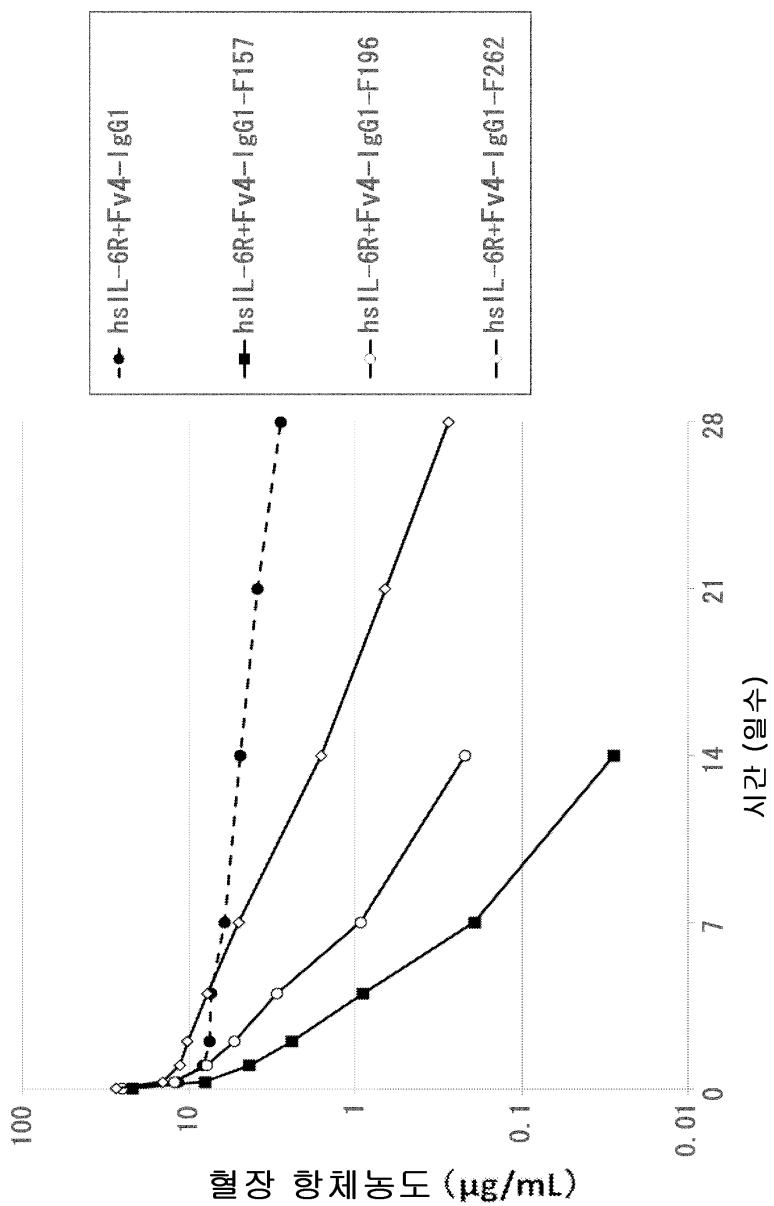
도면25



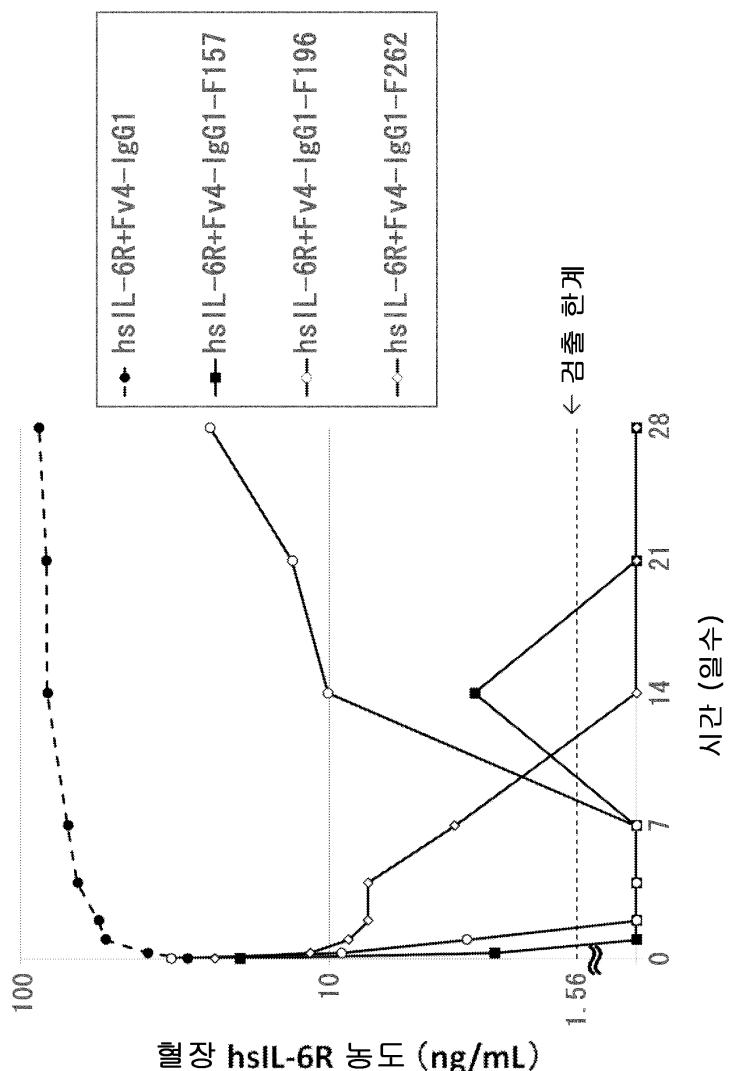
도면26



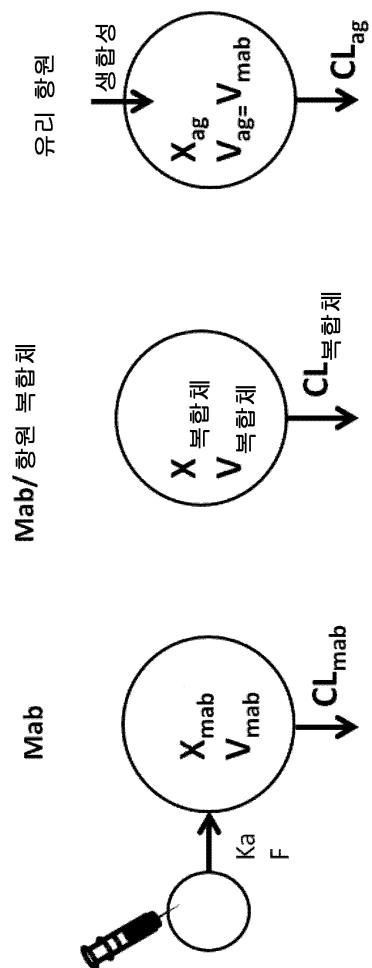
도면27



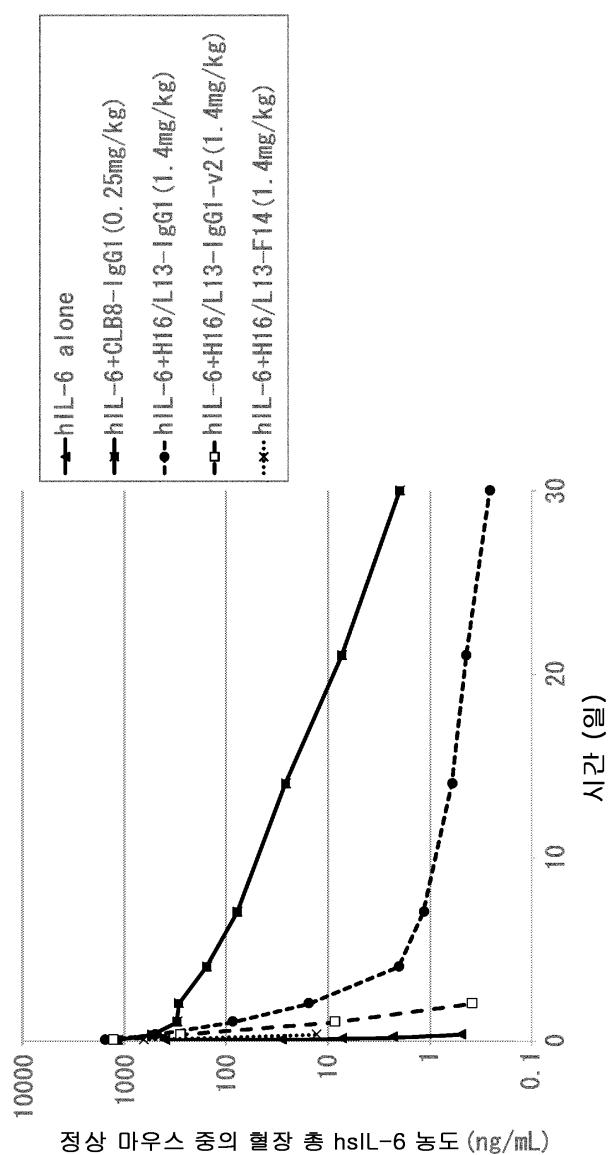
도면28



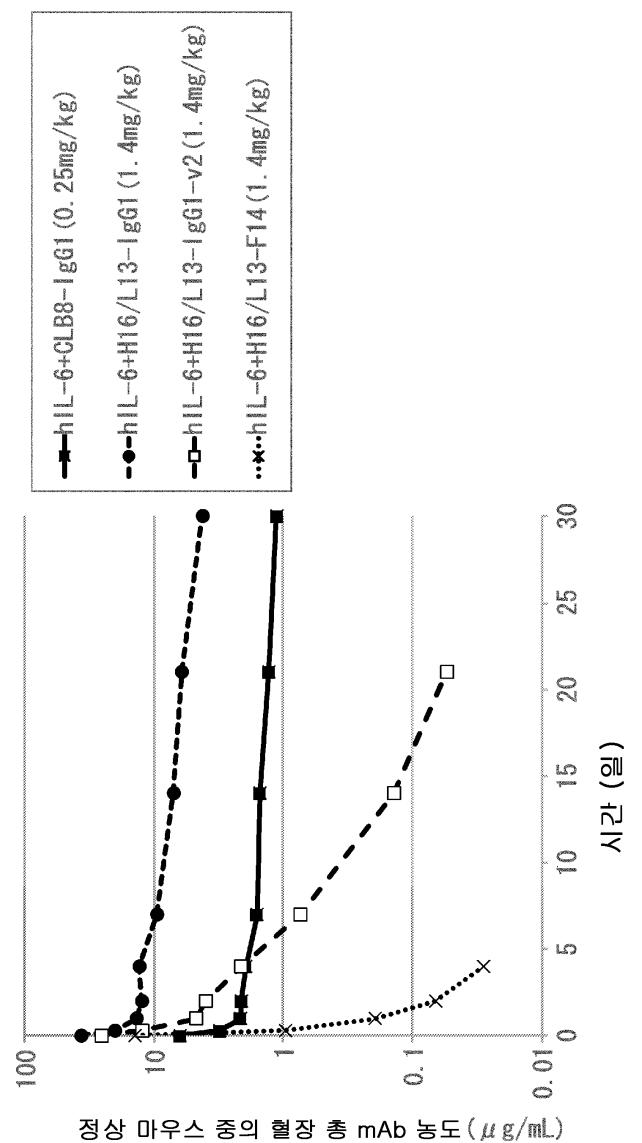
도면29



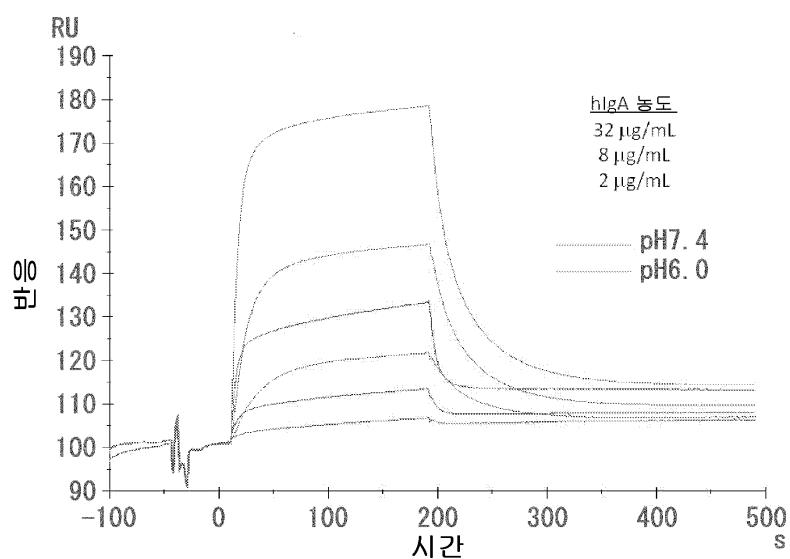
도면30



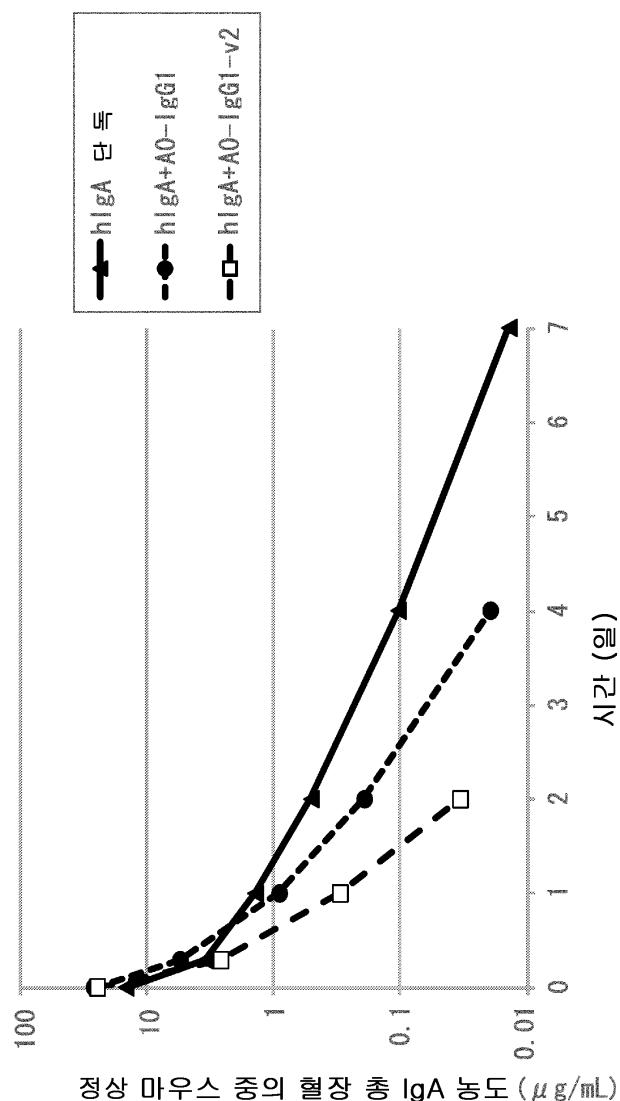
도면31



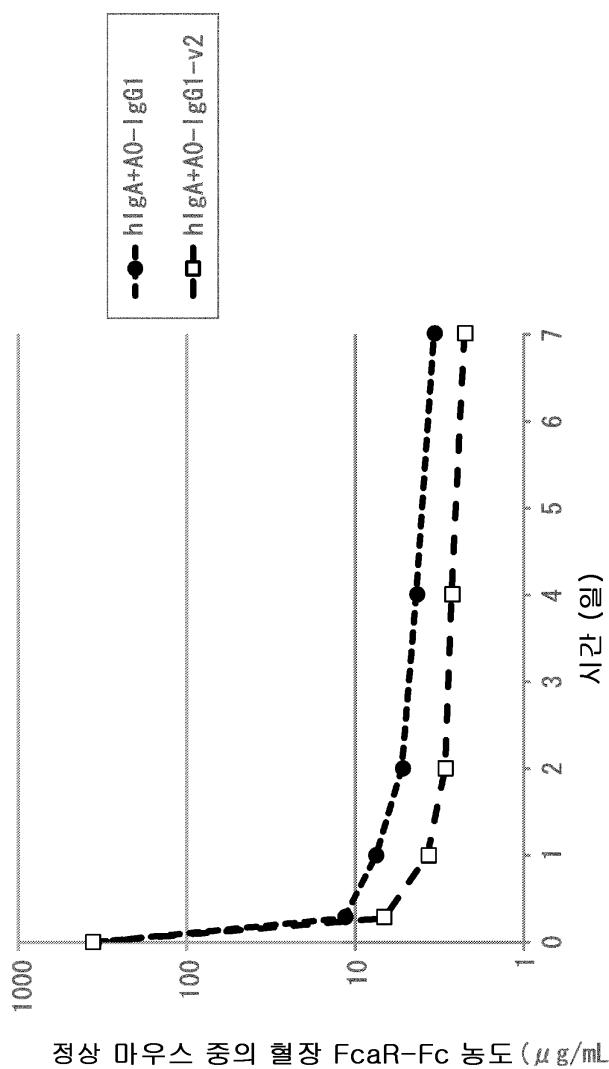
도면32



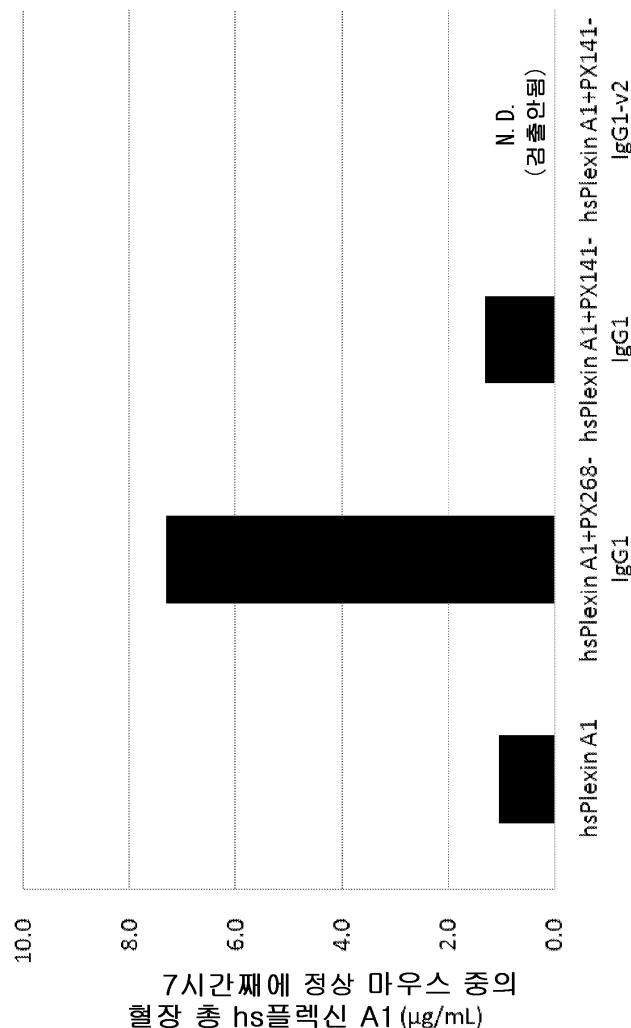
도면33



도면34

정상 마우스 종의 혈장 FcαR-Fc 농도 ($\mu\text{g/mL}$)

도면35



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> ANTIGEN-BINDING MOLECULES THAT PROMOTE ANTIGEN CLEARANCE

<130> C1-A1004Y1P

<150> JP 2010-079667

<151> 2010-03-30

<150> JP 2010-250830

<151> 2010-11-09

<160> 31

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 1

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

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala 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 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
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
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
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> 2		
<211> 214		
<212> PRT		

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 2

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> 3

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 3

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

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala 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 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 Trp 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 Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 4

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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
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
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
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> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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> 6

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 6

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 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
340		
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
345	350	355
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> 7

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 7

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 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> 8

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 8

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 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 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 Pro		
225	230	235
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr		
245 250 255		
Arg Glu 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
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> 9

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 9

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 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 Pro		
225	230	235
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
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
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 Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

<210> 10

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 10

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 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 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 Phe 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 Tyr His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435	440	445
<210> 11		
<211> 324		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> An artificially synthesized peptide sequence		
<400> 11		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg		
1	5	10
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Thr Val Glu Arg Lys Cys 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 His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
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 Arg 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 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

<210> 12

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 12

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
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 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro

<210> 13
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 13
 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 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 Cys 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 His 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 Arg 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 Gln 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 Gly Lys
 325

<210> 14
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized peptide sequence
 <400> 14

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> 15

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 15

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> 16

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 16

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser 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
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
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
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> 17

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 17

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165	170	175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
180	185	190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
195	200	205
Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210		
> 18		
<211> 447		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> An artificially synthesized peptide sequence		
<400> 18		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Lys Leu Leu Lys Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His		
20	25	30
Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Glu Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val		
50	55	60
Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Ser 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> 19

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 19

Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser His His Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

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

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

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 20

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His

20 25 30

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

35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

<210> 21		
<211> 447		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> An artificially synthesized peptide sequence		
<400> 21		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Lys Leu Leu Lys Pro Gly Gly		
1	5	10
15		
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His		
20	25	30
Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val		
50	55	60
Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
80		
Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Ser 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 Trp 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
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 Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435	440	445
-----	-----	-----

<210> 22

<211> 436

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 22

Gln Glu Gly Asp Phe Pro Met Pro Phe Ile Ser Ala Lys Ser Ser Pro

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Ile Pro Leu Asp Gly Ser Val Lys Ile Gln Cys Gln Ala Ile Arg

20	25	30
----	----	----

Glu Ala Tyr Leu Thr Gln Leu Met Ile Ile Lys Asn Ser Thr Tyr Arg

35	40	45
----	----	----

Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro Glu Phe

50	55	60
----	----	----

Val Ile Asp His Met Asp Ala Asn Lys Ala Gly Arg Tyr Gln Cys Gln

65	70	75	80
----	----	----	----

Tyr Arg Ile Gly His Tyr Arg Phe Arg Tyr Ser Asp Thr Leu Glu Leu

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Val Leu Met Pro Gly Glu Asn Ile Ser Leu Thr Cys Ser Ser Ala

115	120	125
-----	-----	-----

His Ile Pro Phe Asp Arg Phe Ser Leu Ala Lys Glu Gly Glu Leu Ser

130	135	140
Leu Pro Gln His Gln Ser Gly Glu His Pro Ala Asn Phe Ser Leu Gly		
145	150	155
160		
Pro Val Asp Leu Asn Val Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Tyr Gly Trp Tyr		
165	170	175
Asn Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Ser Phe Pro Ser Asn Ala Leu Glu Leu		
180	185	190
Val Val Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
195	200	205
Gly Ser Gly Gly Gly Ser His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro		
210	215	220
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
225	230	235
240		
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
245	250	255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
260	265	270
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
275	280	285
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
290	295	300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
305	310	315
320		
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
325	330	335
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys		
340	345	350
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
355	360	365
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
370	375	380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser
 435

<210> 23
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized peptide sequence
 <400> 23

Gln Glu Gly Asp Phe Pro Met Pro Phe Ile Ser Ala Lys Ser Ser Pro
 1 5 10 15
 Val Ile Pro Leu Asp Gly Ser Val Lys Ile Gln Cys Gln Ala Ile Arg
 20 25 30

Glu Ala Tyr Leu Thr Gln Leu Met Ile Ile Lys Asn Ser Thr Tyr Arg
 35 40 45

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

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

Leu Pro Gln His Gln Ser Gly Glu His Pro Ala Asn Phe Ser Leu Gly
 145 150 155 160

Pro Val Asp Leu Asn Val Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Tyr Gly Trp Tyr
 165 170 175

Asn Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Ser Phe Pro Ser Asn Ala Leu Glu Leu
 180 185 190

Val Val Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 195 200 205

Gly Ser Gly Gly Ser His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
 210 215 220

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Leu Ser Leu Ser

435

<210> 24

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 24

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

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Cys Ile Tyr Ile Gly Ser Asp Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu

65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Trp Asp Asn Ser Gly Arg Ala Leu Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195	200	205
-----	-----	-----

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210	215	220
-----	-----	-----

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245	250	255
-----	-----	-----

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260	265	270
-----	-----	-----

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275	280	285
-----	-----	-----

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290	295	300
-----	-----	-----

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

325	330	335
-----	-----	-----

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340	345	350
-----	-----	-----

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355	360	365
-----	-----	-----

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

370	375	380
-----	-----	-----

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

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

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

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

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

<210> 25

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 25

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

Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Ala Asp Asn Asn
 20 25 30

His Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys
 50 55 60

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Asn Tyr Asp Cys Gly
 85 90 95

Ser Ala Asp Cys His Ala Phe Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

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

145	150	155	160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
165	170	175	
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
180	185	190	
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
195	200	205	

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210	215	
-----	-----	--

<210> 26

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 26

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser Tyr

20	25	30	
----	----	----	--

Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35	40	45	
----	----	----	--

Ile Gly Cys Ile Val Thr Gly Ser Tyr Gly Arg Ser Trp Tyr Ala Ser

50	55	60	
----	----	----	--

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg Ser Thr Ser Leu Asn Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Val Thr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr

85	90	95	
----	----	----	--

Phe Cys Ala Arg Asp Pro Phe Val Ile Ala Ser Ser His Tyr Gln Asn

100	105	110	
-----	-----	-----	--

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

115	120	125	
-----	-----	-----	--

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

130	135	140	
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro			
145	150	155	160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr			
165	170	175	
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val			
180	185	190	
Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn			
195	200	205	
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro			
210	215	220	
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu			
225	230	235	240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
245	250	255	
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
260	265	270	
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
275	280	285	
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
290	295	300	
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
305	310	315	320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
325	330	335	
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
340	345	350	
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
355	360	365	
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
370	375	380	

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 27
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> An artificially synthesized peptide sequence
 <400> 27

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

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

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

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

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 28

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 28

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

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Trp

35 40 45

Ile Gly Cys Ile Val Thr Gly Ser Tyr Gly Arg Ser Trp Tyr Ala Ser

50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg Ser Thr Ser Leu Asn Thr

65 70 75 80

Val Thr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr

85 90 95

Phe Cys Ala Arg Asp Pro Phe Val Ile Ala Ser Ser His Tyr Gln Asn

100	105	110
Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
145	150	155
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
210	215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
225	230	235
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
325	330	335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
340	345	350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 29

<211> 472

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> An artificially synthesized peptide sequence

<400> 29

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 Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe		
115	120	125
Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala		
130	135	140
Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp		
145	150	155
Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln		
165	170	175
Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro		
180	185	190
Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His		
195	200	205
Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser		
210	215	220
Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser		
225	230	235
Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu		
245	250	255
Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg		
260	265	270
Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser		
275	280	285
Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val		
290	295	300
Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr		
305	310	315
Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala		
325	330	335

Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu
 340 345 350

Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
 370 375 380

Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
 385 390 395 400

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
 405 410 415

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
 420 425 430

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
 435 440 445

Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met
 450 455 460

Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr

465 470

<210> 30

<211> 365

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30

His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp
 35 40 45

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
 50 55 60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val

65	70	75	80
Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys			
85	90	95	
Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr			
100	105	110	
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val			
115	120	125	
Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp			
130	135	140	
Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile			
145	150	155	160
Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr			
165	170	175	
Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg			
180	185	190	
Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys			
195	200	205	
Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe			
210	215	220	
Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu			
225	230	235	240
Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser			
245	250	255	
Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His			
260	265	270	
Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val			
275	280	285	
Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val			
290	295	300	
Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu			
305	310	315	320

Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
 325 330 335
 Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
 340 345 350
 Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
 355 360 365
 <210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

50 55 60
 Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
 65 70 75 80
 Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
 85 90 95
 Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
 100 105 110
 Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
 115