



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월28일

(11) 등록번호 10-1514238

(24) 등록일자 2015년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0014076

(22) 출원일자 2013년02월07일

심사청구일자 2013년02월07일

(65) 공개번호 10-2013-0143484

(43) 공개일자 2013년12월31일

(30) 우선권주장

1020120066527 2012년06월21일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120027666 A*

US20090098136 A1*

WO2011049350 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한올바이오파마주식회사

대전광역시 대덕구 상서당1길 43 (상서동)

(72) 발명자

김성욱

경기도 성남시 분당구 구미로144번길 25, 102동 304호 (구미동, 삼환빌라)

박승국

서울특별시 강남구 일원로 120, 108동 801호 (일원동, 샘터마을극동현대아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 10 항

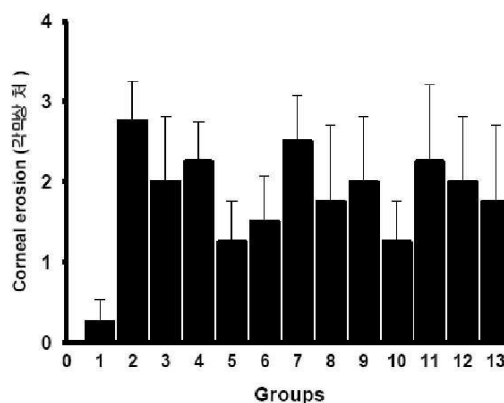
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드의 신규 용도

(57) 요약

본 발명은 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편을 유효성분으로 함유하는 안구건조증의 예방 및/또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 TNFRI 변이체는 TNF α 중화활성이 뛰어나며, 특히, 안구건조증의 예방 내지 치료에 탁월한 효과를 나타낸다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

송연정

경기도 수원시 팔달구 중부대로170번길 17, 102동 1603호 (인계동, 수원인계푸르지오)

김은선

서울특별시 강남구 도곡로37길 35-3 형제빌라 B동 103호 (역삼동)

안혜경

경기도 용인시 수지구 상현로 59, 153동 203호 (상현동, 금호베스트빌1차아파트)

정재갑

경기도 수원시 권선구 권중로 110, 610동 1204호 (권선동, 보성유원푸른마을아파트)

이형근

서울 강남구 도곡로78길 22, 107동 1503호 (대치동, 삼성1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10040233

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 산업기술평가원

연구사업명 산업융합원천기술개발사업

연구과제명 아미노산 치환기술을 통한 엔브렐 단편 분자개량 및 이를 이용한 국소염증질환 치료용 항체 바이오베터 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한올바이오파마(주)

연구기간 2011.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열에서 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N의 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열;

서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI171)에서 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N의 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열;

서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI126)에서 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N의 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열; 또는

서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 145번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI105)에서 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N의 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 1종 이상을 포함하는 안구 건조증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서

서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열에서 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N의 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열;

서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI171)에서 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N의 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열; 또는

서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI126)에서 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N의 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 1종 이상을 포함하는 안구 건조증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 서열번호 8, 10, 12, 16, 18, 20, 24 및 27로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 1종 이상을 포함하는 안구 건조증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편은 대장균 발현계에서의 생산을 위한 변형이 더욱 포함된 것을 특징으로 하는 안구건조증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 대장균 발현계에서의 생산을 위한 변형은 아미노산 서열의 아미노 말단에 신호서열 또는 메티오닌(Met)이 부가된 것임을 특징으로 하는 안구건조증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 두 개 이상이 공유 결합에 의해 연결된 형태의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편 복합체 1종 이상을 포함하는, 안구건조증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 10

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편은 추가로 당화, 아실화, 메틸화, 인산화, 해실화, 카르바밀화, 황화, 프레닐화, 산화, 구아니딜화, 아미딘화, 카르바밀화, 트리니트로페닐화, 질산화, 또는 페길화된 것을 특징으로 하는 안구건조증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 11

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편을 암호화하는 유전자를 포함하는 안구건조증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 12

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 국소 점안용 제제.

청구항 13

제12항에 있어서, 점안제 또는 안 연고인 것을 특징으로 하는 국소점안용 제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드(TNFR1)의 새로운 용도, 특히 안구건조증의 예방 및 치료에 사용하기 위한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

건조각막결막염(keratoconjunctivitis sicca)이라고도 불리는 안구건조증 ('안구건조(dry eye)'라고도 함)은

매년 수백만명의 사람들에게 영향을 미치는 안과질환이다. 특히 가임 정지에 따른 호르몬 변화에 따라 폐경 후 여성에게 많이 발생하는 것으로 알려져 있다. 안구건조는 사람에 따라 다양한 정도로 나타난다. 경증의 경우, 환자는 작열감, 건조한 느낌 및 이물감을 느끼게 되며, 중증의 경우는 시력이 크게 손상될 수도 있다. 쇼그렌증후군 및 반흔성 유선포창 같은 다른 질병들은 안구건조 복합증상을 나타내기도 한다.

[0003] 현재까지의 연구결과를 바탕으로 볼 때, 안구건조증은 여러 스트레스에 의해 안구 표면(ocular surface)에서 사이토카인과 항원표지세포 등이 관련된 자가 면역반응이 발생되어 각막조직으로 면역세포들이 집중되고, 이에 따라 조직이 손상을 받아 발생하는 질환으로 이해되고 있다.

[0004] 안구건조증의 대표적인 치료법은 인공눈물을 사용함으로써 안구의 눈물막을 보완하고, 눈물의 증발을 감소시켜 안정화하는 것이며, 그 외에 내부의 눈물생산의 자극을 제공하는 눈물 삽입물을 사용할 수 있다. 인공눈물의 주요 성분은 셀룰로오스 에테르, 카보머, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈 또는 히알루론산 나트륨 등으로, 완충액이나 등장성 식염수 용액에 포함되어 제조된다. 이들 성분은 용액을 점성으로 만들어 눈에서 쉽게 흘러내리지 않도록 하거나 눈물의 증발을 막으며 윤활제의 역할을 하게 된다. 하지만, 이러한 치료제들은 근본적인 치료가 아니라 대증요법이라는 한계를 가진다.

[0005] 한편, 안구건조를 발생시키는 원인이 안구 표면에서의 염증 반응과 관련되어있다는 사실이 밝혀지면서 다양한 종류의 항염증 물질을 치료에 적용하고자 하는 연구가 진행되고 있으며, 이에 대한 효과가 입증되었다.

[0006] 구체적으로, 안구건조 증상으로 고통받는 환자들의 눈물샘 및 마이봄선(Meibomian gland)과 같은 관련 안구조직에서 불균형적으로 과도한 염증 특성이 나타난다고 보고된 바 있으며, 다양한 화합물, 예를 들어 스테로이드, 사이토카인 유출 저해제, 사이클로스포린 A 및 15-HETE 등이 안구건조증에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor alpha, TNF α)는 염증 반응과 관련된 주요 인자로서 세포 표면에 존재하는 인간 종양 괴사 인자 수용체(TNF receptor, TNFR) I 또는 II와 결합하여 세포사멸과 염증 반응을 포함한 다양한 세포 반응을 일으킨다. TNF α 와 종양 괴사 인자 수용체(TNF receptor, TNFR)의 결합을 저해함으로써 다양한 자가면역 관련 염증 질환을 치료할 수 있음이 입증된 이후, 다양한 TNF α 저해제가 개발되어 왔는데, 대표적인 TNF α 저해제로서는 수용성(soluble) TNFR II에 Fc를 결합한 에타너셉트(Etanercept, 상품명 엔브렐(Enbrel))와 TNF α 에 대한 항체인 인플릭시맵(Infliximab, 상품명 레미케이드(Remicade)), 아달리무맵(Adalimumab, 상품명 휴미라(Humira)) 등이 있다. 이들은 주로 류마티스 관절염, 건선, 크론병 등의 치료제로 이용되고 있다.

[0008] 한편, TNF α 저해제는 안구건조의 치료효과도 제시된 바 있다(US 6,428,787B, US 6,379,666B, US 6,177,077B, US 6,204,270B, US 2004/0126372A, WO 00/27421A). 또한, US 2009/0098136A에는 동물모델에서 에타너셉트와 인플릭시맵의 안구건조증의 치료 효과가 기재되어 있으며, 두 물질의 점안 투여에 의해 눈물 발현시간(tear break up time)과 각막 염색 증상이 개선되는 경향이 나타났음이 기재되어 있다.

[0009] 하지만, 여전히 보다 높은 치료효능을 보이는 새로운 안구건조증의 치료제, 특히 새로운 TNF α 저해제를 유효성분으로 하는 안구건조증 치료제에 대한 수요가 절실한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제2005-0057175호 (2005. 6. 16. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기와 같은 요구에 부합되는 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드(TNFR I) 또는 그의 절편을 함유하는 안구건조증의 예방 및/또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 발명자들은 인간 종양 괴사 인자 수용체-1(TNFR1)의 변이체들 중 특정 변이체 및 이들의 절편들이 안구건조증에 임상적으로 탁월한 효과를 나타내는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다. 이에 따라 본 발명은 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편의 신규한 용도, 특히 안구건조증 치료를 위한 용도에 관한 것이다.
- [0013] 본 출원인의 특허출원인 대한민국 공개특허공보 제2011-0043485호에는 TNF α 저해제로서, 생체 내에 존재하는 단백질 분해효소에 대한 저항성이 향상된 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편이 개시되어 있으며, 대한민국 공개특허공보 제2012-0027666호에는 TNF α 저해제로서, TNF α 와의 결합력이 증가된 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편이 개시되어 있다.
- [0014] 본 발명자들은 신규의 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드에 관한 상기 특허출원 이후 각고의 연구를 계속하여, 상기 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드에 비해 보다 향상된 효능을 가지는 차세대 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 변이체를 개발하였으며(대한민국 공개특허공보 제2012-0072323호 참조), 이렇게 개발된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 변이체들 중 특정 변이체들이 안구건조증에 임상적으로 탁월한 효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0015] 특히, 본 발명자들은 동물모델에서 본 발명에 따른 특정 변이체들이 안구건조 치료에 탁월한 효과를 나타내는 반면, 놀랍게도 대표적인 TNF α 저해제인 에타너셉트(Etanercept)의 경우, 뚜렷한 증상 개선 효과가 없음을 확인하였다. 이러한 사실은 모든 TNF α 저해제가 안구건조증에 유의미한 효과를 나타내는 것은 아니라는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 특정 변이체만이 안구건조의 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있음을 입증하는 것이다.
- [0016] 본 발명에 따른 하나의 양태로서, 본 발명은 변형된 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 또는 그의 절편의 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 안구건조증의 예방 및/또는 치료용 조성물 및 이를 이용한 안구건조증의 예방 및/또는 치료방법을 제공한다.
- [0017] 이하 본 발명을 보다 상세하게 설명하기에 앞서, 본 발명의 기술적 특징을 보다 명확하게 설명하기 위하여 본 발명에서 사용된 용어의 정의를 살핀다. 별도로 정의하지 않는 한, 하기의 용어는 본 발명의 상세한 설명 및 특허 청구범위에서 다음에 정의된 의미를 가진다.
- [0018] 본 발명에서의 "전장 인간 종양 괴사 인자 수용체-1" 또는 "전장 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드"(이하 'TNFR1' 또는 'TNFR1 폴리펩티드'라 한다)는 인간 유래로 455개의 아미노산으로 구성되며, TNF α 와 결합하는 폴리펩티드를 의미한다. 특히 천연형(야생형, wild type) TNFR1은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가진다.
- [0019] 본 발명에서의 "인간 종양 괴사 인자 수용체-1 절편" 또는 "인간 종양 괴사 인자 수용체-1 폴리펩티드 절편"(이하 'TNFR1 절편' 또는 'TNFR1 폴리펩티드 절편'이라 한다)은 TNFR1의 서열과 서로 상응하는 아미노산의 서열이 100% 일치하며, 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실된 TNFR1의 일부분을 의미한다. TNFR1 절편에 있어, 아미노산 잔기(들)의 결실 위치는 TNFR1 N-말단 또는 C-말단 또는 내부를 포함하여 폴리펩티드 내의 어느 곳이라도 무방하다. 이러한 절편은 TNFR1과 하나 이상의 생물학적 특성, 예를 들어 TNF α 저해제로서의 기능이나 안구건조증 치료 효능 등을 공유한다. 대표적인 TNFR1 절편의 예는 TNFR1의 N-말단 41번째 아미노산으로부터 105개 또는 126개 또는 171개의 아미노산 잔기를 가지는 절편으로, 이들은 각각 본 발명에서 TNFR1105, TNFR1126, TNFR1171로 명명된다.
- [0020] 본 발명에서의 "TNFR1 (돌연)변이체", "TNFR1 (돌연)변이체 절편" 또는 "변형된 TNFR1 폴리펩티드", "변형된 TNFR1 폴리펩티드 절편"은 각각 하기 정의된 바와 같이 천연 또는 재조합 세포로부터 분리된 TNFR1 또는 TNFR1 절편과 100% 미만의 서열 동일성을 가지는 변형된 TNFR1 또는 변형된 TNFR1 절편을 의미하며, "TNFR1 (돌연)변이체 절편" 또는 "변형된 TNFR1 폴리펩티드 절편"은 "TNFR1 (돌연)변이체" 또는 "변형된 TNFR1 폴리펩티드"와 하나 이상의 생물학적 특성, 예를 들어 TNF α 저해제로서의 기능이나 안구건조증 치료 효능 등을 공유한다. 통상 TNFR1 변이체는 야생형 또는 천연형 TNFR1 또는 TNFR1 절편과 약 70% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가진다. 서열 동일성은 바람직하게는 약 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 한층 더 바람직하게는 약 85% 이상, 더더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상이다. 대표적인 TNFR1의 변형 형태는 특정 위치에서 다른 아미노산 잔기로의 치환이다.
- [0021] 본 발명에서의 "4중 변이체"는 종양 괴사 인자 수용체-1 또는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 절편의 아미노산 서열 중 4개 위치에 돌연변이가 일어난 변이체를 의미한다.

- [0022] 본 발명에서의 "5중 변이체"는 종양 괴사 인자 수용체-1 또는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 절편의 아미노산 서열 중 5개 위치에 돌연변이가 일어난 변이체를 의미한다.
- [0023] 본 발명에서의 "6중 변이체"는 종양 괴사 인자 수용체-1 또는 인간 종양 괴사 인자 수용체-1 절편의 아미노산 서열 중 6개 위치에 돌연변이가 일어난 변이체를 의미한다.
- [0024] 본 발명에서의 "TNFRIm"는 TNFRI의 아미노산 서열 중 N-말단의 41번째 아미노산으로부터 m개의 아미노산 서열로 이루어진 TNFRI 절편을 의미한다. 예를 들어 TNFRI105 절편은 TNFRI N-말단 41번째 아미노산부터 105개의 아미노산 서열을 갖는 TNFRI 절편을 의미하며, 다른 예로 TNFRI126은 TNFRI N-말단 41번째 아미노산부터 126개의 아미노산으로 이루어진 TNFRI 절편을 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 제공되는 아미노산의 다양한 서열 내에 존재하는 아미노산은 그들의 공지된 3-문자 또는 1-문자 약어에 의해 표시된다. 다양한 핵산 절편 내 존재하는 뉴클레오티드들은 당해 분야에서 일상적으로 사용되는 표준 단일-문자 명명법으로 명명된다.
- [0026] 본 발명에서의 "xAz"는 TNFRI 또는 TNFRI 절편의 아미노산 서열 N 말단(TNFRI의 아미노산 서열 기준으로)으로부터 A번째 아미노산 x가 z로 치환된 것을 의미한다. 예를 들어, K48Q는 서열번호 1에 따른 TNFRI의 아미노산 서열 N 말단으로부터 48번째 아미노산 잔기가 라이신(Lys)에서 글루타민(Gln)으로 치환된 것을 의미한다.
- [0027] 본 발명에 따른 안구건조증 예방 및/또는 치료용 조성물의 유효성분인 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편은 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열 또는 TNFRI 절편의 아미노산 서열에 있어서,
- [0028] 위치 92, 95, 97, 및 98의 4 개 아미노산 잔기 위치에서의 아미노산의 변형을 포함하는 아미노산 서열(4중 변이체);
- [0029] 위치 68, 92, 95, 97 및 98의 5 개 아미노산 잔기 위치에서의 아미노산의 변형을 포함하는 아미노산 서열(5중 변이체); 또는
- [0030] 위치 68, 92, 95, 97 및 98의 5 개 아미노산 잔기 위치, 및 추가적으로 위치 161 또는 207의 아미노산 잔기 위치에서의 아미노산의 변형을 포함하는 아미노산 서열(6중 변이체); 을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0031] 상기 아미노산 변형은 변형되지 않은 천연형 TNFRI 또는 TNFRI 절편과 비교하여, TNF α 와의 결합력을 유지 또는 증가시키거나, 단백질 분해효소에 대한 저항성을 유지 또는 증가시키기 위한 변형으로, 삽입, 치환, 결실 등의 모든 변형이 사용될 수 있으며, 대표적으로는 아미노산의 치환이 사용될 수 있다. 또한, 증가된 결합력을 제공하거나, 단백질 분해효소에 대한 저항성을 유지 또는 증가시키는 한, 단백질 번역-후 변형(post-translational modification)과 같은 특정 위치에서의 아미노산에 대한 다른 화학적인 변형, 예를 들어 탄수화물 부위에 의한 당화, 아실화(acylation) (예, 아세틸화(acetylation) 또는 숙신화(succinylation), 메틸화(methylation), 인산화(phosphorylation), 해실화(hasylation), 카르바밀화(carbamylation), 황화(sulfation), 프레닐화(prenylation), 산화(oxidation), 구아니딜화(guanidination), 아미딘화(amidination), 카르바밀화(carbamylation) (예, 카르바모일화(carbamoylation)), 트리니트로페닐화(trinitrophenylation), 질산화(nitration), 페길화(PEGylation) 등도 사용될 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자(이하 '통상의 기술자'라 한다)에게는 자명한 것이다.
- [0032] 본 발명에 따른 안구건조증 예방 및/또는 치료용 조성물의 유효성분인 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편은 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열 또는 TNFRI 절편의 아미노산 서열에 있어서,
- [0033] 92번 위치에서 S의 I 또는 M 으로의 치환;
- [0034] 95번 위치에서 H의 F로의 치환;
- [0035] 97번 위치에서 R의 P로의 치환; 및
- [0036] 98번 위치에서 H의 A 또는 G로의 치환;이 필수적으로 포함되고,
- [0037] 바람직하게는 추가적으로,

- [0038] 68번 위치에서 L의 V로의 치환;
- [0039] 161번 위치에서 K의 Q 또는 N으로의 치환; 및
- [0040] 207번 위치에서의 D의 N으로의 치환;에서 선택된 하나 이상의 치환이 더욱 포함되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 변형에서, 바람직하게는 상기 92번 위치의 S은 M으로 치환되고; 98번 위치의 H은 G로 치환되고; 161번 위치의 K는 N으로 치환된다.
- [0042] 즉, 92번 위치에서 S의 I 또는 M 으로의 치환, 95번 위치에서 H의 F로의 치환, 97번 위치에서 R의 P로의 치환 및 98번 위치에서 H의 A 또는 G로의 치환을 포함하는 4중 변이체,
- [0043] 상기 4중 변이체에서 추가적으로 68번 위치에서 L의 V로의 치환을 포함하는 5중 변이체, 또는
- [0044] 상기 5중 변이체에서 추가적으로 161번 위치에서 K의 Q 또는 N으로의 치환, 또는 207번 위치에서의 D의 N으로의 치환을 포함하는 6중 변이체가 본 발명에 따른 안구건조증 예방 및/또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용되는 것이 바람직하다.
- [0045] 또한, 본 발명에 따른 안구 건조증의 예방 및/또는 치료용 조성물은 상기 변형된 TNFRI 또는 TNFRI 절편의 1 종 이상을 함유할 수 있다.
- [0046] 이미 정의된 바와 같이, TNFRI 절편은 TNFRI와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는 TNFRI의 일부분을 의미하며, 특히 본 발명에서는 서열번호 1로 기재되는 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산 서열(서열번호 2; TNFRI171), 서열번호 1로 기재되는 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산 서열(서열번호 3; TNFRI126), 서열번호 1로 기재되는 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 145번으로 이루어진 아미노산 서열(서열번호 4; TNFRI105)이 바람직하게 이용될 수 있다. 참고로, TNFRI의 네 번째 도메인은 TNF α 와의 결합에 필수적이지 않으며, 두 번째와 세 번째 도메인을 결실시킬 경우 TNF α 와의 결합 활성을 상실한다고 알려져 있고 (Corcoran 등, Eur. J. Biochem. 233:831-840 1994), 또한 TNFRI과 TNF α 의 결합에 세 번째 도메인의 일정부위가 결손될 수 있으며, 천연형 TNFRI (서열번호 1)의 59번부터 143번 아미노산으로 이루어진 절편만으로도 TNFRI의 생물학적 활성이 나타난다는 것은 당 분야에 잘 알려져 있다(미국특허 제 6,989,147호 등 참조).
- [0047] 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 범주에는 상기 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편과 실질적으로 동일한 폴리펩티드도 포함됨은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다. 상기 "변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편과 실질적으로 동일한 폴리펩티드"는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 본질적인 특성이 유지되는 한, 변형이 일어난 아미노산 잔기의 개수 및 변형의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 아미노산 치환, 결실, 부가 또는 기타 변형을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0048] 특히, "변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편과 실질적으로 동일한 폴리펩티드"에는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 아미노산 서열과 서열 배열(sequence alignment)시, 기능적으로 불변인 것으로 파악되는 잔기를 가지는 위치에서, TNF α 와의 결합력 향상 및/또는 단백질 분해효소에 대한 저항성 유지/향상을 위한 아미노산 변형이 일어난 것이 바람직하며, 통상의 기술자는 보존적(conservative)이고 동일한 아미노산 잔기들을 가이드로 사용하여 TNFRI 폴리펩티드의 서열을 정렬함으로써 상응하는 잔기들을 동정해 낼 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 구체적인 변형 위치 등 본 발명에 따른 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 기능에 영향을 미칠 수 있는 잔기 위치에서라도, 보존적 치환 등 본 발명에서 목적하는 특성이 유지될 수 있는 한, 그러한 위치에서의 변형이 일어난 폴리펩티드도 포함될 수 있다.
- [0049] 바람직하게는, 서열번호 1에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드와, 본 발명원에서의 구체적인 위치에서의 아미노산 변형을 제외하고, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, TNFRI 의 대립유전자형 변이체 동종형, 조직-특이적인 동종형 그리고 그것들의 대립유전자형 변이체들, 하나 이상의 아미노산 돌연변이, 치환, 결실, 삽입, 또는 추가를 가진 합성 변이체들, 핵산을 번역함으로써 제조된 합성분자들, 인간 및 비인간 조직과 세포로부터 추출한 단백질들, 키메라 TNFRI 폴리펩티드 및 그것의 변형된 형태들을 포함할 수 있다.

- [0050] 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 범주에는 또한 상기 언급된 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편을 2개 이상 포함하는 다량체 폴리펩티드(또는 "폴리펩티드 복합체"라고도 한다)도 포함된다. 상기 폴리펩티드 복합체는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편 두 개 이상이 연결된 형태, 바람직하게는 공유 결합에 의해 연결된 형태를 가진다.
- [0051] 바람직한 본 발명의 구현형태로서, 본 발명의 조성물은 하기로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 1종 이상을 유효성분으로 함유한다:
- [0052] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열(TNFRI)에서 S92I/H95F/R97P/H98A, S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q, 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 중에서 선택되는 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열;
- [0053] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI171)에서 S92I/H95F/R97P/H98A, S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q, 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 중에서 선택되는 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열;
- [0054] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI126)에서 S92I/H95F/R97P/H98A, S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A, L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q, 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 중에서 선택되는 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0055] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 145번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI105)에서 S92I/H95F/R97P/H98A, S92M/H95F/R97P/H98A 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A 중에서 선택되는 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열.
- [0056] 본 발명의 보다 바람직한 구현형태로서, 본 발명의 조성물은 하기로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 1종 이상을 유효성분으로 함유한다:
- [0057] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열(TNFRI)에서 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 중에서 선택되는 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열;
- [0058] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI171)에서 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N, L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 중에서 선택되는 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0059] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI126)에서 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 중에서 선택되는 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열.
- [0060] 본 발명의 가장 바람직한 구현형태로서, 본 발명의 조성물은 하기로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 1종 이상을 유효성분으로 함유한다:
- [0061] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열(TNFRI)에서 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N 인 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열;
- [0062] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 211번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI171)에서 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 또는 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N 인 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열; 또는
- [0063] 서열번호 1에 기재된 천연형 TNFRI의 아미노산 서열의 41번 내지 166번으로 이루어진 아미노산 서열(TNFRI126)

에서 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N 인 아미노산 변형을 포함하는 아미노산 서열.

- [0064] 본 발명의 다른 바람직한 구현형태로서, 본 발명의 조성물은 서열번호 5 내지 30 으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 1종 이상을 유효성분으로 함유한다.
- [0065] 상기 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편은 대장균이나 효모 등의 미생물 또는 동물세포를 이용하여 제조가 가능하며, 이러한 폴리펩티드 및 그의 제조에 관한 기술은 당 분야에 공지되어 있으며, 특히 대한민국 공개특허공보 제2012-0027666호에도 상세히 기재되어 있다.
- [0066] 또한, 본 발명의 변형된 인간 TNFRI 또는 인간 TNFRI 절편의 범주에는 바람직하게는 대장균이나 효모 등의 미생물이나 동물세포에서의 생산을 위한 변형, 특히 인간 TNFRI 또는 인간 TNFRI 절편의 아미노산 서열 아미노 말단에 신호서열(signal sequence) 또는 메티오닌(Met)이 부가된 폴리펩티드가 포함될 수 있다.
- [0067] 본 발명은 또한 상기 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편을 암호화하는 유전자; 상기 유전자를 포함하는 벡터; 또는 상기 벡터로 형질전환된 미생물 또는 동물세포를 제공하며, 상기 유전자, 벡터 및 미생물 또는 동물세포를 이용한 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 생산방법을 또한 제공한다.
- [0068] 또한, 본 발명은 상기 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편을 암호화하는 유전자; 상기 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 안구건조증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0069] 본 명세서에서, 안구건조증은 건성각결막염(KCS), 나이에 따른 안구 건조를 비롯하여, 스티븐스-존슨 증후군, 쇼그렌 증후군, 안구 반흔 유착포창, 안검염, 각막 손상, 감염, 릴리-데이 증후군, 선천성 무치증, 영양 장애 또는 결핍(비타민 포함), 약물 부작용, 안구 스트레스와 선(腺) 및 세포 손상, 스모그, 담배, 매우 건조한 공기 등의 환경 노출, 풍매 분진, 자기 면역 및 다른 면역결핍 장애 등으로 인한 안구 건조를 포함하여 광범위하게 규정된다.
- [0070] 일반적으로 안구건조증의 치료 또는 예방을 사용되는 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 TNFRI 절편의 투여량은 투여 대상의 종류, 연령, 체중, 증상의 중증도, 원하는 치료 효과, 투여 방법, 치료기간 등에 따라 달라질 수 있으며, 안구 건조의 증상을 제거 또는 개선하는 약제학적 유효량이 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용되는, "약제학적 유효량"은 환자에서 안구 건조증 증상을 개선시키는 양을 의미한다. 일반적으로, 전신적으로 투여할 때, 투여량은 약 0.0001~1000 mg, 바람직하게는 0.001~500 mg이고, 이는 하루에 단일 투여량 또는 2 내지 4회의 분할 투여량으로 투여되거나 지연된 방법으로 투여된다. 특히 눈에 국소 적용시, 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편을 0.001~10.0 w/v%, 바람직하게는 0.01~10.0 w/v%의 비율로 함유하는 제제를 눈에 하루에 수회 적용하고, 바람직하게는 하루에 1 내지 6회 적하하거나 적용하는 것이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 통상의 기술자라면 다양한 요소를 감안하여 적절한 투여량이나 투여간격 등을 조절할 수 있음은 자명하다.
- [0071] 본 발명의 조성물에는 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편에 추가로 당 분야에서 통상적으로 선택하여 사용할 수 있는 생리적으로 적합한 부형제 및/또는 첨가제가 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물에는 이러한 부형제 및/또는 첨가제로 등장화제, 완충제, 계면활성제, 안정화 중합체, 보존제, 점도 증가제, 산화방지제 등이 추가로 포함될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 다른 성분이 추가적으로 포함될 수 있음은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다. 또한, 본 발명의 조성물에는 또한 계면활성제 및/또는 완화제 및/또는 안정화 중합체를 추가로 포함될 수 있다.
- [0072] 상기 등장화제는 조성물의 등장성(tonicity), 바람직하게는 안과용 조성물로 사용되는 천연 눈물의 등장성으로 조정하기 위하여 사용되는 것으로, 예컨대, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화마그네슘, 염화칼슘, 단순 당, 예컨대 텍스트로스, 프럭토스, 갈락토스, 및/또는 단순 폴리올, 예컨대 당 알콜, 만니톨, 솔비톨, 자일리톨, 락티톨, 이소말트, 말티톨, 및 수소화된 전분 가수분해물을 조성물에 첨가하여 생리적 등장성과 유사하게 조정할 수 있다. 이러한 등장화제의 양은 첨가되는 특정 시약에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0073] 상기 완충제는 당 분야에서 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대, 인산 나트륨, 아세트산 나트륨, 시트르산 나트

를, 붕산 나트륨 또는 붕산으로부터 선택되는 하나 이상이 사용될 수 있으며, 이를 저장 조건하에 조성물의 pH 변화를 방지하기 위하여 사용할 수 있다. 농도는 사용된 시약에 따라 다르지만, 바람직하게는 pH 5 내지 8, 보다 바람직하게는 5 내지 7로 유지하도록 선택된다.

- [0074] 상기 계면활성제는 유효성분을 용해하고 콜로이드 분산액, 예컨대 미셀 용액, 미세유탁액, 유탁액 및 현탁액을 안정화하기 위하여 사용되는 것으로, 예컨대, 폴리솔베이트, 폴록사머, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥실 피마자유, 킬록사폴, 트리톤 (예컨대, 트리톤 X114), 및 솔비탄 모노라우레이트가 사용될 수 있다.
- [0075] 상기 안정화 중합체는 가교 폴리아크릴레이트 계로부터 선택된 다가전해질, 예컨대 카보머 또는 페물렌 (Pemulen, 상품명), 구체적으로 카보머 974P(폴리아크릴산) 0.1% 내지 0.5%(w/w)가 사용될 수 있다.
- [0076] 상기 보존제는 사용 도중 미생물 오염을 방지하기 위해 사용되는 것으로, 예컨대, 벤즈알코늄 클로라이드, 클로로부탄올, 벤조도데실늄 브로마이드, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 페닐에틸 알콜, 에텐테이트 다이아트륨, 소르브산, 폴리쿼터늄-1 또는 당업계에 공지된 다른 제제가 사용될 수 있다.
- [0077] 상기 점도 증가제는 담체의 점도를 증가시키기 위하여 사용되는 것으로서, 예컨대, 다당류, 예컨대 히알루론산 및 그의 염, 콘드로이틴 설페이트 및 그의 염, 텍스트란, 셀룰로스 계의 다양한 중합체; 비닐 중합체; 및 아크릴산 중합체가 포함되나 이들로 한정되지 않는다.
- [0078] 산화방지제는 저장 동안에 활성 성분이 산화되는 것을 방지하기 위하여 본 발명의 조성물에 추가될 수 있다. 이러한 산화방지제의 예는 비타민 E 및 그의 유사체, 아스코르브산 및 유도체, 및 부틸화된 하이드록시아니솔 (BHA)을 포함한다.
- [0079] 본 발명에서 사용되는 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편은 인간 또는 동물에 적용을 위한 약제학적 제제로서 제형화되어, 경구 투여, 정맥내 투여, 피하투여, 직장 또는 질내 투여, 국소적 부위(눈)에의 투여에 의해 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 전신적 영향, 효과의 유의적인 발현 등을 고려하여, 바람직하게는, 눈에 국소적 투여 형태로 사용된다.
- [0080] 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편이 제형화되어 투여될 경우, 통상적인 방법에 의해 생성된 제제의 형태로 투여될 수 있다. 투여 형태는 예를 들어 점안제(eye drop), 안 연고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 주사제, 연고 등일 수 있으며, 바람직한 것은 점안제 및 안 연고이다. 이러한 제제는 당 분야의 일반적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 안과적 국소 투여 형태로서, 점적, 스프레이 또는 겔 형태가 가능하며, 또 다른 방법으로 리포솜을 이용하여 눈에 투여할 수 있다. 또한, 펌프-카테테르(pump-catheter) 시스템을 통해 눈물막에 주입될 수 있다. 다른 구현예로, 연속적 또는 선택적-방출 장치, 예를 들면 Ocusert(상품명) System(Alza Corp., Palo Alto, CA)제와 같은 시스템이 이용될 수 있다. 부가적인 구체예로서, TNFRI 변이체는 눈위의 콘택트렌즈에 포함될 수 있으며, 그에 의해 운반되거나 그에 부착될 수 있다. 다른 구현예로, 안구 표면에 가해질 수 있는 스펀지 또는 면봉에 함유된 형태가 이용될 수 있으며, 안구 표면에 가해질 수 있는 액체 스프레이도 이용될 수 있다. 또 다른 구체예로, 안구 표면위로 또는 눈물 조직으로 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편을 직접 주입할 수 있다.
- [0081] 상기 국소투여방법에 부가하여, 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편을 전신적으로 투여하는 다양한 방법이 사용될 수 있다. 일례로, 흡입가능한 입자의 에어로졸 현탁액이 있다. 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편을 폐를 통해 혈류로 흡수시키거나, 코눈물관을 통해 눈물 조직에 접촉시키거나, 약학적으로 유효한 양으로 누선에 접촉시킬 수 있다. 다른 방법으로는 흡입가능한 입자의 코 스프레이(nasal spray) 또는 액체 배합물의 코 점적 또는 눈 세척 또는 눈 점적 형태로 액체/액체 현탁액을 투여하는 형태가 가능하다. 코 스프레이 또는 코 또는 눈으로의 점적을 형성하기 위한 조성물은 당업자에 공지된 기술에 의해 멸균 식염수 또는 멸균 주사용 증류수와 같은 적절한 부형제와 배합하여 제조될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편의 조직 투여를 위한 다른 방법으로 경구 투여도 사용될 수 있으며, 정제, 함당정제, 수성 또는 유성 현탁액, 분산가능한 분말 또는 과립, 유탁액, 경질 또는 연질의 캡슐, 또는 시럽 또는 엘릭시르의 형태로 이용이 가능하며, 경구용 조성물은 약학적 조성물의 제조분야에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0083] 또 다른 수단은 본 발명의 변형된 TNFRI 폴리펩티드 또는 그의 절편을 겔, 크림, 또는 액체 현탁액 형태로 수중 직접 점적하는 것이 가능하다.
- [0084] 이상 기술된 내용뿐 아니라, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 명세서에 기재된 바로부터 발명의

구현 형태를 적절히 변경 내지 응용할 수 있으며, 이 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다.

발명의 효과

[0085]

본 발명의 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편은 TNF α 중화활성이 뛰어나며, 환자의 안구 표면에서 TNF α 의 활성을 저해하여 안구건조와 관련된 염증성 유발 효과를 억제하게 된다. 따라서, 본 발명에 따른 변형된 TNFRI 또는 변형된 TNFRI 절편은 안구건조증의 예방 내지 치료에 탁월한 효과를 나타내므로 안구건조증의 예방 및 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0086]

도 1은 TNFRI 변이체들의 각막 손상 회복 효과를 나타내는 도면

Lane 1 : 정상군, Lane 2 : 안구건조 유발 + Vehicle (국소투여), Lane 3 : 안구건조 유발 + 에타너셉트 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 4 : 안구건조 유발 + HL036335 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 5 : 안구건조 유발 + HL036337 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 6 : 안구건조 유발 + HL036326 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 7 : 안구건조 유발 + HL036222 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 8 : 안구건조 유발 + HL036329 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 9 : 안구건조 유발 + HL036304 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 10 : 안구건조 유발 + HL036330 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 11 : 안구건조 유발 + HL036229 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 12 : 안구건조 유발 + HL036402 (2.5 mg/ml, 국소투여), Lane 13 : 안구건조 유발 + 사이클로스포린 A (0.05%, 국소투여)

도 2는 TNFRI 변이체 농도에 따른 각막 손상 회복 효과를 나타내는 도면

Lane 1 : 정상군, Lane 2 : 안구건조 유발, Lane 3 : 안구건조 유발 + 에타너셉트 (5 mg/kg, 피하 투여), Lane 4 : 안구건조 유발 + HL036337 (0.5 mg/kg, 피하 투여), Lane 5 : 안구건조 유발 + HL036337 (5 mg/kg, 피하 투여), Lane 6 : 안구건조 유발 + HL036337 (0.625 mg/ml, 국소 투여), Lane 7 : 안구건조 유발 + HL036337 (6.25 mg/ml, 국소 투여)

도 3은 TNFRI 변이체의 눈물량 증가 효과를 나타내는 도면

Lane 1 : 정상군, Lane 2 : 안구건조 유발, Lane 3 : 안구건조 유발 + 에타너셉트 (5 mg/kg, 피하 투여), Lane 4 : 안구건조 유발 + HL036337 (0.5 mg/kg, 피하 투여), Lane 5 : 안구건조 유발 + HL036337 (5 mg/kg, 피하 투여), Lane 6 : 안구건조 유발 + HL036337 (0.625 mg/ml, 국소 투여), Lane 7 : 안구건조 유발 + HL036337 (6.25 mg/ml, 국소 투여)

도 4는 TNFRI 변이체의 각막에서의 항염증 효과를 나타내는 도면

Lane 1 : 정상군, Lane 2 : 안구건조 유발, Lane 3 : 안구건조 유발 + 에타너셉트 (5 mg/kg, 피하 투여), Lane 4 : 안구건조 유발 + HL036337 (5 mg/kg, 피하 투여), Lane 5 : 안구건조 유발 + HL036337 (6.25 mg/ml, 국소 투여)

도 5는 TNFRI 변이체의 안구 표면에서의 항염증 효과를 나타내는 도면

Lane 1 : 정상군, Lane 2 : 안구건조 유발, Lane 3 : 안구건조 유발 + 에타너셉트 (5 mg/kg, 피하 투여), Lane 4 : 안구건조 유발 + HL036337 (6.25 mg/ml, 국소 투여)

도 6은 TNFRI 변이체의 눈물샘에서의 항염증 효과를 나타내는 도면

Lane 1 : 정상군, Lane 2 : 안구건조 유발 + Vehicle(국소투여), Lane 3 : 안구건조 유발 + 에타너셉트 (0.25%, 국소투여), Lane 4 : 안구건조 유발 + HL036337 (0.25%, 국소 투여), Lane 5 : 안구건조 유발 + 사이클로스포린 A (0.05%, 국소 투여), Lane 6 : 안구건조 유발 + 메틸 프레드니손 (0.1%, 국소 투여)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0087]

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 후술하는 제조예, 실시예, 실험예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 이들은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에

한정되지 않는다.

[0088] [제조예] TNFRI 절편 변이체의 제조

[0089] (1) TNFRI 변이체의 설계

[0090] 본 출원인의 대한민국 특허출원 제2010-0089395호(공개특허공보 제2012-0027666호) 및 대한민국 특허출원 제2011-0138751호(공개특허공보 제2012-0072323호)로부터 하기 표 1의 아미노산 변형을 포함하는 변형된 TNFRI (“TNFRI 변이체”)를 후보로 선정하였다.

표 1

[0091] 본 발명에 따른 TNFRI 변이체

코드번호	TNFRI 변이체 식별기호	변이 내용
HL036222	TNFRI _m -A2	S92I, H95F, R97P, H98A
HL036229	TNFRI _m -A9	S92M, H95F, R97P, H98A
HL036304	TNFRI _m -S36	L68V, S92M, H95F, R97P, H98A
HL036326	TNFRI _m -S54	L68V, S92I, H95F, R97P, H98A, K161N
HL036329	TNFRI _m -S57	L68V, S92M, H95F, R97P, H98A, K161N
HL036330	TNFRI _m -S58	L68V, S92M, H95F, R97P, H98A, D207N
HL036335	TNFRI _m -S62	L68V, S92I, H95F, R97P, H98G, K161Q
HL036337	TNFRI _m -S63	L68V, S92M, H95F, R97P, H98G, K161N
HL036402	TNFRI _m -WT	없음(천연형)

[0092] (m 은 105, 126 또는 171임)

[0093] 상기 TNFRI 변이체를 제조하기 위하여 이미 공개되어 있는 인간 TNFRI 유전체 정보를 이용하였다. 상기 표 1의 변형을 적용한 TNFRI171, TNFRI126, TNFRI105 변이체 폴리펩티드의 아미노산 서열을 서열번호 13 내지 30 에 나타내었다(천연형 제외).

[0094] (2) TNFRI 변이체를 코딩하는 DNA의 제조

[0095] 위치 특이적 TNFRI 변이체를 제작하기 위해 위치 지정 돌연변이체 제작 (site-directed mutagenesis) 방법에 의해 TNFRI 변이체를 제작하였다. 상기 표 1에 기재된 아미노산 변형을 포함하는 TNFRI 변이체 제작에 사용한 프라이머 및 주형을 하기 표 2에 나타내었다.

[0096] 구체적으로는 TNFRI 플라스미드를 주형으로 하기 표 2의 프라이머 각 쌍을 20 pmole이 되도록 증류수에 녹인 후 Pfu 폴리머레이즈(polymerase)를 이용한 PCR 반응을 진행하여 위치 지정 돌연변이체를 제작하였다.

[0097] TNFRI 변이체 제작을 위한 TNFRI171 절편 유전자, 및 TNFRI 발현 벡터 제작 및 TNFRI105, TNFRI126 및 TNFRI171 발현 벡터는 대한민국 공개특허공보 제2012-0027666호에 기재된 바에 따라 제작하였다.

[0098] 제작된 pET44a-Met-TNFRI105 또는 pET44a-Met-TNFRI126 또는 pET44a-Met-TNFRI171 플라스미드를 주형으로 TNFRI105-A30, TNFRI-126-A30, TNFRI-171-A30을 암호화하는 플라스미드를 제작하기 위해 표 2의 A30에 해당하는 프라이머를 이용하여 각각 증폭 반응을 수행하였다(얻어진 플라스미드를 각각 pET-TNFRI105_A30, pET-TNFRI126_A30, pET-TNFRI171_A30이라 한다. 아미노산 서열의 길이는 기재 생략). 다음으로, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 상기 제작된 플라스미드를 주형으로 표 2의 A2, A9 에 해당하는 프라이머를 이용하여 동일한 방법으로 pET-TNFRI_A2, pET-TNFRI_A9를 제작하였다. 동일한 방법으로 앞서 제작된 플라스미드를 주형으로 표 2에 기재된 프라이머를 이용하여 나머지 플라스미드들을 제작하였다.

[0099]

표 2

[0100]

위치 특이 돌연변이 유도를 위한 프라이머 정보

변형 번호	프라이머	
	PCR 주형	프라이머 서열
A2 (pET-TNFRI_A2)	pET-TNFRI_A30	5'-GTCATTTACAGCGat tGAGAATTTTCTGCCGGC-3' 5'-GCCGGCAGAAAATTCTCAATCGCTGTAAATGAC-3'
A9 (pET-TNFRI_A9)	pET-TNFRI_A2	5'-GGGTCATTTACAGCGatgGAGAATTTTCTGC-3' 5'-GCAGAAAATTCTCcatCGCTGTAAATGACCC-3'
A21 (pET-TNFRI_A21)	pET-TNFRI_A2	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAgaacagctcaggcaccccgagaaaaattCTC-3'
A22 (pET-TNFRI_A22)	pET-TNFRI_A9	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAgaacagctcaggcaccccgagaaaaattCTC-3'
A30 (pET-TNFRI_A30)	pET44a-Met-TNFRI 105, pET44a-Met-TNFRI 126, 또는 pET44a-Met-TNFRI 171	5'- GAGTGGTCATTTACAGCGATTCCGAATTTTCTGCCGGCGTGCCTGAGCTGTTCTAAG- 3' 5'- cttagaacagctcaggcacgccggcagaaaaattcggaatcgctgtaaatgaccactc- 3'
S31 (pET-TNFRI_S31)	pET-TNFRI_A2	5'-cacaaaggacgtacgtgtataatgactgtccg-3' 5'-cggacagtcattatacacgtacgtccctttgtg-3'
S36 (pET-TNFRI_S36)	pET-TNFRI_A9	5'-cacaaaggacgtacgtgtataatgactgtccg-3' 5'-cggacagtcattatacacgtacgtccctttgtg-3'
S46 (pET-TNFRI_S46)	pET-TNFRI_A21	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAgaacagctcaggcaccccgagaaaaattCTC-3'
S47 (pET-TNFRI_S47)	pET-TNFRI_A22	5'-GAGAATTTTCTGCCGGGTGCCTGAGCTGTTCTA-3' 5'-TAgaacagctcaggcaccccgagaaaaattCTC-3'
S54 (pET-TNFRI_S54)	pET-TNFRI_S31	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttcta-3' 5'-tataaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
S57 (pET-TNFRI_S57)	pET-TNFRI_S36	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttcta-3' 5'-tataaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'
S58 (pET-TNFRI_S58)	pET-TNFRI_S36	5'-atgttaaggacactgagaactcaggcaccacata-3' 5'-tatgtggtgcctgagttctcagtgcccttaacat-3'
S62 (pET-TNFRI_S62)	pET-TNFRI_S46	5'-atctgtcctgtcaggagcagcagaatacagtttg-3' 5'-caaactgtattctgctgctcctgacaggacagat-3'
S63 (pET-TNFRI_S63)	pET-TNFRI_S47	5'-ctgtcctgtcaggagaaccagaatacagtttcta-3' 5'-tataaactgtattctggttctcctgacaggacag-3'

[0101]

각각의 주형 플라스미드 DNA 1.0 μl, 20 pmole N-프라이머 1.0 μl, 20 pmole C-프라이머 1.0 μl, 2X PrimeSTAR PCR buffer 25.0 μl, 200uM dNTP 4.0 μl, PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara, Cat. No: R044A) 0.5 μl 와 17.5 μl 증류수를 넣어 50.0 μl의 반응 용액을 만들어 위 증폭 반응에 사용하였다.

[0102]

PCR은 1차 변성 98℃에서 5분, 2차 변성 98℃에서 30초, 프라이머 접합 55℃에서 30초, 신장반응 72℃에서 9분 간 수행되었다. 상기 과정 중 2차 변성에서 신장반응까지를 17회 반복하여 진행시킨 다음 최종 효소 반응을 72℃에서 10분 수행하여 반응을 종료하였다.

[0103]

PCR 산물은 Dpn I 효소로 37℃에서 2시간 처리하여 대장균 유래의 DNA를 분해하고 PCR에 의해 증폭된 DNA를 확보하였다. DNA 용액 2 μl를 취하여 XL1-blue 컴피턴트 세포(competent cell)(RBC, Cat. No: RH119-J80)에 넣어 42℃에서 1분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고, 앰피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정치 배

양하여 콜로니를 얻었다. 이 콜로니를 앰피실린이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고, 염기서열 분석을 통해 위치 특이적 TNFRI 변이체가 완성되었음을 확인하였다.

[0104] (3) 대장균에서 생물학적 활성이 있는 TNFRI 및 TNFRI 변이체의 생산

[0105] (가) TNFRI 및 TNFRI 변이체의 발현

[0106] 상기 제조예에서 제작된 플라스미드 용액 1 μ l를 취하여 BL21Star(DE3)(Invitrogen, Cat. No: C6010-03) 컴피턴트 세포에 넣어 42°C에서 1분간 열 충격(heat shock)을 가하여 형질전환하고 앰피실린이 포함된 LB 고체 배지에서 정치 배양하여 콜로니를 얻었다. 발현 벡터를 포함하고 있는 대장균 BL21Star(DE3)를 100 μ g/ml 농도의 앰피실린이 들어 있는 50 ml YP 배지(yeast extract: Merck, Cat. No: 103753, peptone: BD, Cat. No: 243620, NaCl: Merck, Cat. No: 1064049025)에 접종하여 37°C에서 16시간 통기 배양하였다. 배양된 배지는 100 μ g/ml 농도의 앰피실린이 포함된 250ml YP 배지가 있는 1 L 플라스크에 600 nm의 흡광도가 0.1이 되게 접종하였다. 37°C에서 배양하여 600 nm의 흡광도가 3~4일 때, 최종 농도가 1.0 mM 농도가 되게 IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였다. 발현 유도 후 37°C에서 3시간 더 통기 배양을 계속한 후 세포를 6000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 세포를 수집하였다.

[0107] (나) 용해되지 않은 TNFRI 및 TNFRI 변이체의 회수

[0108] 수집한 세포를 재현탁 용액(50 mM 트리스, 0.5 mM EDTA (pH 8.5))으로 재현탁시켰다. 현탁된 세포는 sonicator(Sonics, Cat. No: VCX 750)를 사용하여 파쇄하였다. 세포 파쇄 후 8000xg, 10°C, 30분 동안 원심분리하고, 상층액을 버리고 침전된 펠릿을 세척용액 1 (50 mM 트리스, 10 mM EDTA, 0.5% 트리톤 X-100(Triton X-100) (pH 8.0))으로 현탁시키고 8000xg, 10°C, 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버리고 펠릿을 재현탁 용액으로 재현탁시키고, 8000xg, 10°C, 20분 동안 원심분리하였다. 상기 세척된 펠릿은 바로 사용하거나 -80°C에서 동결 저장하였다.

[0109] (다) TNFRI 및 TNFRI 변이체의 가용화 및 리폴딩

[0110] 상기에서 얻은 펠릿에 6 mL 변성 용액 (6~8 M 요소(Urea) 또는 6~8 M 염화구아니딘(Guanidine-HCl), 10 mM 디티오프레이톨(DTT), 2.0 mM EDTA, 0.2 M NaCl)을 첨가하여 용해하였다. 용해 후 0.45 μ m 실린지 필터를 사용하여 용해되지 않은 펠릿을 제거하였다. 가용화 시킨 펠릿 용액을 리폴딩(refolding) 용액 (50 mM 트리스, 1.0 mM EDTA, 0.5 M L-아르기닌(Arginine), 6.0 mM GSH, 4.0 mM GSSG, 240 mM NaCl, 10mM KCl (pH 9.0))에 20배 희석하여 4°C에서 12~24 시간 온화하게 교반하며 리폴딩을 유도하였다.

[0111] (라) 리폴딩된 TNFRI 및 TNFRI 변이체 정제

[0112] 리폴딩된 TNFRI 및 TNFRI 변이체를 정제하기 위해 리폴딩 용액을 3kD의 Amicon Ultra(Millipore, Cat. No:UFC900324)을 사용하여 20배 농축하였다. 농축 후 Superdex 75 prep grade(GE) 레진을 XK25/70(GE, Cat. No: 19-0146-01) 컬럼에 패키징한 겔여과 크로마토그래피(GPC: gel permeation chromatography)를 사용하여 정제하였다.

[0113] 구체적으로 리폴딩된 시료를 겔여과 로딩하기 전 4~5 컬럼 부피의 평형화 용액 (50 mM 소듐 포스페이트, 100 mM NaCl (pH 7.0))을 사용하여 컬럼을 평형화시켰다. 컬럼에 2 mL 시료를 로딩한 후, 5 mL/min의 유속으로 평형화 용액을 흘려주며 5 mL씩 분획하여 시료를 채취하였다. 채취한 시료를 SDS-PAGE로 분석한 후, 90% 이상의 순도를 보이는 분획만을 취하였다. 위 과정을 통해 아미노 말단에 Met이 부가된 변형되지 않은 TNFRI105, TNFRI126 및 TNFRI171 TNFRI105 변이체, TNFRI126 변이체 및 TNFRI171 변이체를 정제하였다.

[0114] [실시예]

[0115] 실시예 1. TNFRI 변이체들의 안구 건조증 치료 효과 확인

- [0116] 안구건조증 치료에서 TNF α 의 저해에 따른 치료효과를 확인하기 위하여 TNF α 저해제를 마우스를 이용한 안구건조증 동물모델에 투여하였다. TNF α 저해제로서 에타너셉트(Etanercept)와 TNFRI 변이체들을 사용하였으며, TNFRI 변이체들과 에타너셉트의 치료효과를 비교하였다. 양성대조군으로 사이클로스포린 A를 사용하였다.
- [0117] 안구건조증 동물모델은 기존에 알려진 방법을 참조하여 제작하였다.(*J Immunol* 2011;187:3653-3662) 구체적으로, C57BL/6 마우스에 14일 동안 40 %이하의 습도가 유지되는 Controlled environmental chamber를 사용하였으며, 부교감 신경 억제제인 스코폴라민(Scopolamine)을 5 mg/ml의 농도로 0.1 ml씩 1일 3회, 피하 적용하여 안구 건조증을 유발하였다. 이후 7일간 시험물질을 투여하고 증상 개선 정도를 관찰하였다.
- [0118] 안구건조증이 유발된 마우스에 각 TNFRI 변이체와 에타너셉트를 2.5 mg/mL의 농도로 4회/일, 7일간 점안 적용하였다. 또한 사이클로스포린 A 0.05%를 2회/일, 7일간 점안 투여하고 각막 상처에서의 개선도를 측정하였다.
- [0119] 각막상처는 눈으로 각막 상태를 관찰한 후 표 3과 같이 증상에 따라 스코어링하여 측정하였다. Grade 0의 경우는 각막에 병변이 없는 상태이며, Grade 1은 약 3분 1 정도의 병변이 관찰되고, Grade 2는 약 2분의 1, Grade 3은 약 3분의 2, Grade 4는 거의 전반적으로 병변이 관찰됨을 의미한다.
- [0120] 그 결과, TNFRI 변이체 중 HL036337, HL036326, HL036330 세가지 변이체가 에타너셉트, HL036402(천연형 TNFRI) 및 사이클로스포린 A에 비해 각막 상처 개선도에 있어 매우 효과적인 것으로 확인되었다(도 1 참조).

[0121]

표 3

[0122]

각막 침식 등급(Corneal erosion grade)

Corneal Erosion Grade	
Grade 0	no erosion
Grade 1	mild
Grade 2	mild to moderate
Grade 3	moderate
Grade 4	Severe

[0123] 실시예 2. 안구건조증 동물모델에서 HL036337의 치료 효과 확인

[0124] 실시예 2.1 각막 손상 회복 효과 확인

[0125] TNFRI 변이체인 HL036337을 버퍼를 이용하여 각각 0.625 mg/ml 와 6.25 mg/ml 농도로 조제하여, 점안 적용의 경우는 1회당 8 ml 씩, 1일 4회 적용하였으며, 피하투여의 경우는 0.5 mg/kg와 5 mg/kg으로 1일 1회 투여하였다. 또한 대조군인 에타너셉트는 5 mg/kg로 1일 1회 피하 적용하였다

[0126] 위 실시예 1과 같이 제조된 안구건조증 동물모델에 7일간 시험물질을 투여하고 증상 개선 정도를 관찰하였다. 에타너셉트는 피하 투여 방식으로 투여되었고, TNFRI 변이체는 피하와 점안 투여 방식으로 투여되었다.

[0127] 각막 손상 정도는 위 실시예 1과 동일하게 평가하였다.

[0128] 그 결과, 에타너셉트를 피하 투여한 경우에는 증상 개선 효과가 거의 없는 반면, TNFRI 변이체를 피하 및 점안 투여한 경우 모두에서 각막 상처의 회복효과를 나타내었으며, 특히 점안 투여시 각막 상처를 회복시키는 효과가 탁월한 것으로 나타났다(도 2 참조).

[0129] 또한, TNFRI 변이체인 HL036326 및 HL036330도 HL036337과 유사한 정도의 각막 상처 회복효과를 나타냄을 확인하였다.

[0130] 실시예 2.2 눈물량 증가 효과 확인

[0131] 시험물질 투여에 의한 눈물량의 증가 정도를 확인하고자 플루레신 용지를 아래 눈꺼풀에 넣어 눈물 양을 측정하

였다. 눈물의 양에 따른 등급은 표 4와 같다. Grade 0의 경우는 눈물이 거의 없는 상태를 의미하며, Grade 1은 3 mm, Grade 2는 4~5 mm, Grade 3은 6 mm만큼 용지가 젖는 것을 의미한다.

표 4

눈물 분비 등급(Tear secretion grade)

Tear Secretion Grade		
Grade 0	no tear lake	
Grade 1	severe	3mm
Grade 2	moderate	4~5mm
Grade 3	mild	6mm

각 물질의 투여 방법은 상기 실시예 2.1과 동일하였다. 그 결과, 동일한 투여량을 사용한 경우, TNFRI 변이체 HL036337은 에타너셉트에 비해 우수한 눈물 양 회복 정도를 나타내었으며, 특히 각막 상처 회복 효과와 유사하게 TNFRI 변이체의 점안 투여군에서 거의 정상수준까지 눈물의 양이 회복되는 탁월한 효과를 확인할 수 있었다(도 3 참조).

TNFRI 변이체인 HL036326 및 HL036330도 HL036337과 유사한 정도의 눈물 양 회복 효과를 나타냄을 확인하였다.

실시예 2.3 각막에서의 항염증 효능 확인

항염증 효능을 확인하기 위한 염증 관련 사이토카인 측정은 각막 조직으로부터 mRNA를 추출한 후 qPCR 방법으로 측정하였으며 IFN- γ , IL-1b, IL-4, IL-6, IL-21과 IL-22의 mRNA의 레벨을 확인하였다.

각 물질의 투여 방법은 상기 실시예 2.1과 동일하였다. 그 결과, 안구건조증 유발로 인해 염증과 관련된 사이토카인 (IFN- γ , IL-1b, IL-6, IL-4, IL-21, IL-22) 들이 각막에서 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, TNFRI 변이체인 HL036337을 피하로 적용한 경우에는 염증과 관련된 사이토카인들이 감소됨이 확인되었으며, 특히 점안으로 적용시에는 염증이 개선되어 거의 정상 수준으로 회복되는 탁월한 효과를 보였다. 반면, 에타너셉트를 피하로 적용할 시 거의 염증 감소효과가 관찰되지 않았다(도 4 참조).

TNFRI 변이체인 HL036326 및 HL036330도 HL036337과 유사한 정도로 각막에서의 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.

실시예 2.4 안구 표면에서의 항염증 효능 확인

안구 표면(ocular surfaces)에서의 염증 사이토카인들의 양을 측정하기 위하여 Luminex 100을 이용하여 측정하였으며, IFN- γ , IL-6, IL-21과 IL-22의 양을 측정하였다.

TNFRI 변이체인 HL036337을 버퍼를 이용하여 각각 6.25 mg/ml 농도로 조제하여, 점안적용의 경우는 1회당 8 ml 씩, 1일 4회 적용하였으며, 피하투여의 경우는 5 mg/kg으로 1일 1회 투여하였다. 또한 대조군인 에타너셉트는 5 mg/kg로 1일 1회 피하 적용하였다

위 실시예 1과 같이 제조된 안구건조증 동물모델에 7일간 시험물질을 투여하고 증상 개선 정도를 관찰하였다. 에타너셉트는 피하 투여 방식으로 투여되었고, TNFRI 변이체는 피하와 점안 투여 방식으로 투여되었다.

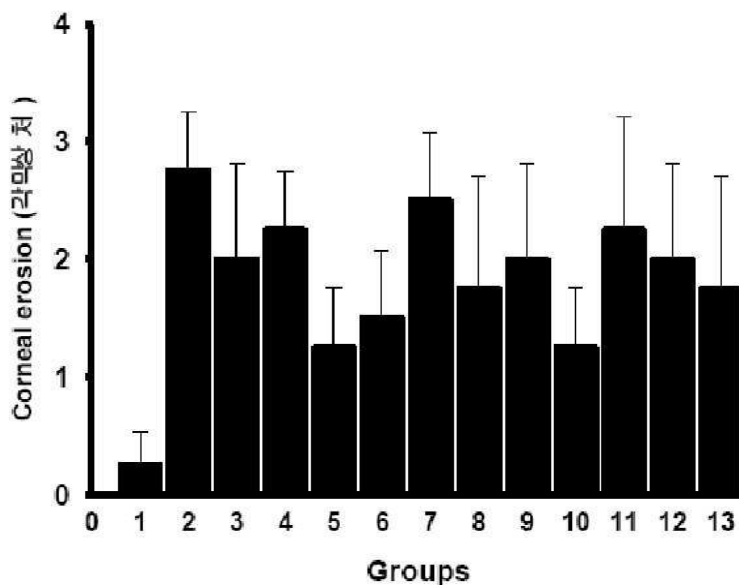
그 결과, 안구건조증 유발로 인해 염증과 관련된 사이토카인 (IFN- γ , IL-6, IL-21, IL-22)들이 안구 표면(ocular surface)에서 현저하게 증가되었다. 하지만, TNFRI 변이체인 HL036337을 점안으로 적용시 탁월한 염증 개선효과가 관찰된 반면, 에타너셉트를 피하로 적용할 시 염증 감소효과가 거의 관찰되지 않았다(도 5 참조).

TNFRI 변이체인 HL036326 및 HL036330도 HL036337과 유사한 정도로 안구 표면에서의 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.

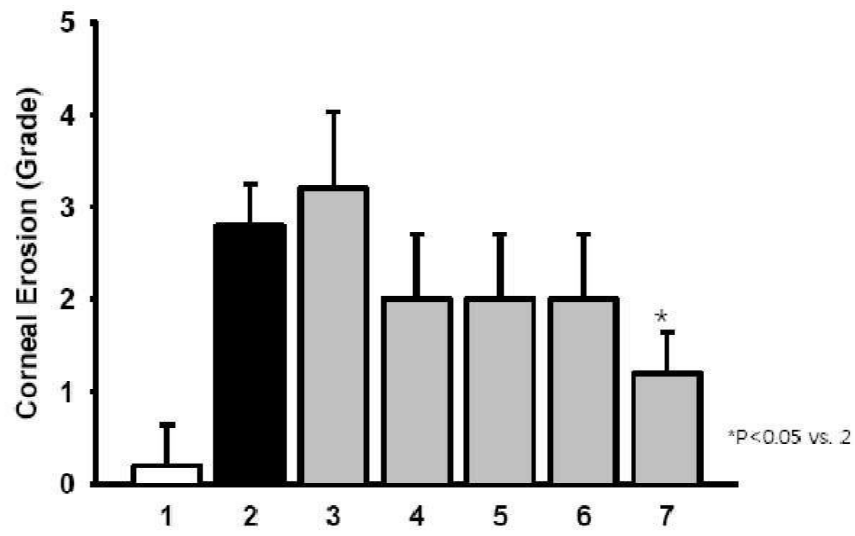
- [0145] 실시예 2.5 눈물샘에서의 항염증 효능 확인
- [0146] 안구건조증 치료제로 사용중인 0.05 %의 사이클로스포린 A 와 0.1 % 메틸 프레드니손(methyl prednisolone) 점안액과의 효과를 비교하기 위해서 눈물샘에서의 염증 사이토카인들의 양을 측정하였다. 염증 관련 사이토카인 측정은 눈물샘 조직으로부터 mRNA를 추출한 후 qPCR 방법으로 측정하였으며 IFN- γ , IL-6 mRNA의 레벨을 확인하였다.
- [0147] TNFRI 변이체인 HL036337을 버퍼를 이용하여 각각 6.25 mg/ml 농도로 조제하여, 점안적용의 경우는 1회당 8 ml 씩, 1일 4회 적용하였으며, 대조군인 에타너셉트는 5 mg/kg로 1일 1회 피하 적용하였다
- [0148] 위 실시예 1과 같이 제조된 안구건조증 동물모델에 7일간 시험물질을 투여하고 증상 개선 정도를 관찰하였다. 에타너셉트는 피하 투여 방식으로 투여되었고, TNFRI 변이체는 점안 투여 방식으로 투여되었다.
- [0149] 그 결과, 안구건조증 유발로 인해 염증과 관련된 사이토카인 (IFN- γ , IL-6) 들이 눈물샘에서 현저하게 증가되었으며 TNFRI 변이체인 HL036337을 점안으로 적용시 메틸 프레드니손과 동등한 개선효과가 관찰되었다. 그러나 사이클로스포린 A는 HL036337이나 메틸 프레드니손에 미치지 못하는 미미한 효과가 관찰되었다(도 6 참조).
- [0150] TNFRI 변이체인 HL036326 및 HL036330도 HL036337과 유사한 정도로 눈물샘에서의 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.

도면

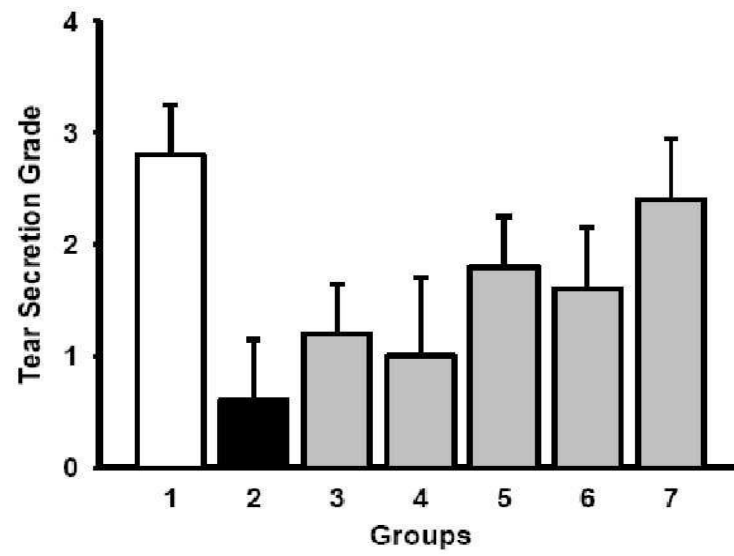
도면1



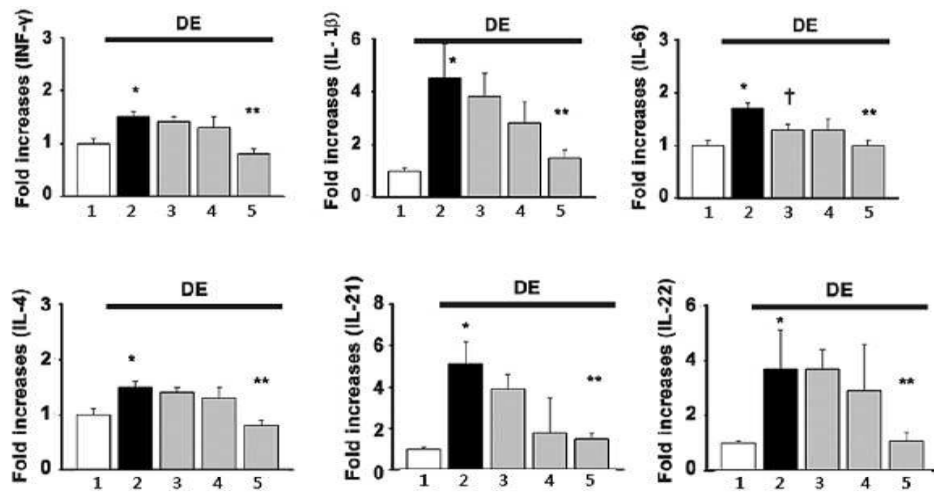
도면2



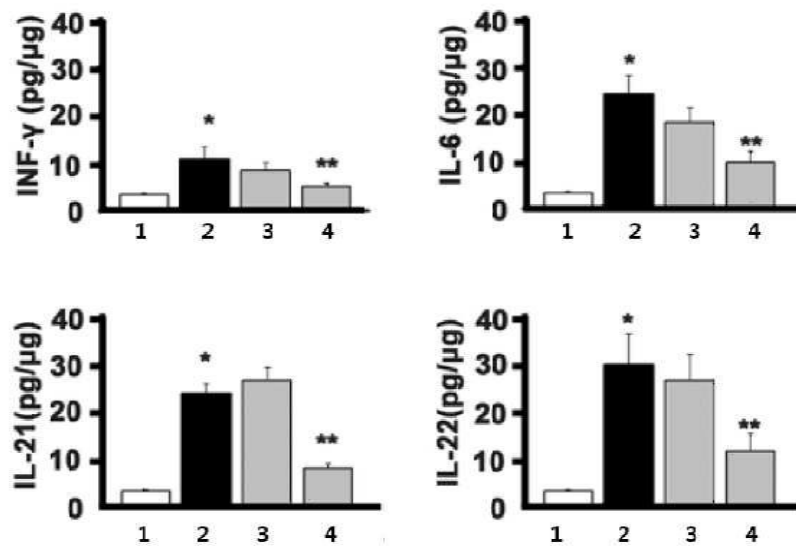
도면3



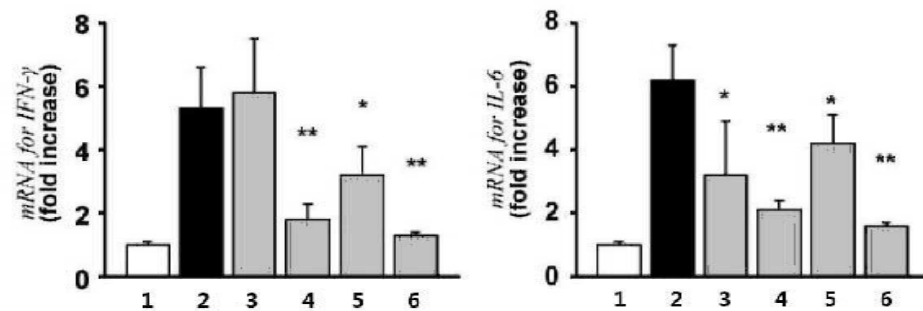
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110> Hanall Biopharma Co., Ltd.
 <120> A novel use of modified human tumor necrosis factor receptor-1
 <130> P12-B310
 <150> KR 10-2012-0066527
 <151> 2012-06-21
 <160> 30
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30

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

100 105 110
 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125
 Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140
 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu

165	170	175
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr		
180	185	190
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser		
195	200	205
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu		
210	215	220
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys		
225	230	235
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu		
245	250	255
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser		
260	265	270
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val		
275	280	285
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys		
290	295	300
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly		
305	310	315
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn		
325	330	335
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp		
340	345	350
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro		
355	360	365
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu		
370	375	380
Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln		
385	390	395
Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala		
405	410	415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
450 455

<210> 2

<211

> 171

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr

165 170

<210> 3

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys

20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45

Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys

50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly

100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys

115 120 125

<210> 4

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys

20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

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

100 105
<210> 5
<211> 455
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> TNFRI-A2 S92I/H95F/R97P/H98A
<400> 5
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
1 5 10 15
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
85 90 95
Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe

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

385 390 395 400
Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala

405 410 415
Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly

420 425 430
Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro

435 440 445
Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg

450 455

<210> 6

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI-A9 S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 6

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu

1 5 10 15
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro

20 25 30
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys

35 40 45
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys

50 55 60
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp

65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
85 90 95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe

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

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

435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg

450 455

<210> 7

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 7

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu

1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro

20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys

35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys

50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp

65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu

85 90 95

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

100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg

115 120 125

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

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
450 455

<210> 8

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> TNFRI-S54 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 8

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

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
20 25 30

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
50 55 60

Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
65 70 75 80

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
85 90 95

Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
100 105 110

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe

130	135	140	
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu			
145	150	155	160
Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu			
	165	170	175
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr			
	180	185	190
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser			
	195	200	205

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

275	280	285	
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys			
290	295	300	
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly			
305	310	315	320
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn			
	325	330	335
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp			
	340	345	350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro			
355	360	365	
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu			

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

 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455
 <210> 9
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNFRI-S57 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N
 <400> 9
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro

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

 Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110
 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg

115	120	125	
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe			
130	135	140	
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu			
145	150	155	160
Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu			
165	170	175	
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr			
180	185	190	
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser			
195	200	205	
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu			
210	215	220	
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys			
225	230	235	240
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu			
245	250	255	
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser			
260	265	270	
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val			
275	280	285	
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys			
290	295	300	
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly			
305	310	315	320
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn			
325	330	335	
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp			
340	345	350	
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro			
355	360	365	
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu			

370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg

 450 455
 <210> 10
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNFRI-S58 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N
 <400> 10
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30
 His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45

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

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg

115 120 125
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe

130 135 140
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
165 170 175

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser
195 200 205

Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
225 230 235 240

Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
245 250 255

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser

260 265 270
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val

275 280 285
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys

290 295 300
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly

305 310 315 320
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn

325 330 335

Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
340 345 350

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro

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

405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455

<210> 11

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI-S62 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 11

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu

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

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu
 85 90 95
 Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val

100	105	110	
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg			
115	120	125	
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe			
130	135	140	
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu			
145	150	155	160
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu			
165	170	175	
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr			
180	185	190	
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser			
195	200	205	
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu			
210	215	220	
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys			
225	230	235	240
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu			
245	250	255	
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser			
260	265	270	
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val			
275	280	285	
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys			
290	295	300	
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly			
305	310	315	320
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn			
325	330	335	
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp			
340	345	350	
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro			

355 360 365
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 370 375 380
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 385 390 395 400
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 420 425 430
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 435 440 445
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 450 455
 <210> 12
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNFRI-S63 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N
 <400> 12
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 20 25 30
 His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 35 40 45
 Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 50 55 60
 Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 65 70 75 80
 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu
 85 90 95
 Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val

100	105	110	
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg			
115	120	125	
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe			
130	135	140	
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu			
145	150	155	160
Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu			
165	170	175	
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr			
180	185	190	
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser			
195	200	205	
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu			
210	215	220	
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys			
225	230	235	240
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu			
245	250	255	
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser			
260	265	270	
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val			
275	280	285	
Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys			
290	295	300	
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly			
305	310	315	320
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn			
325	330	335	
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp			
340	345	350	

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
355 360 365

Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
370 375 380

Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
385 390 395 400

Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
405 410 415

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
420 425 430

Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
435 440 445

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
450 455

<210> 13

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> TNFRI171-A2 S92I/H95F/R97P/H98A

<400> 13

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn

130 135 140
Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
165 170

<210> 14

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI171-A9 S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 14

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr
165 170

<210> 15

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 171-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 15

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45
Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys

50 55 60
Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65 70 75 80
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly

100 105 110
Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys

115 120 125
His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn

130 135 140
Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu

145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr

165

170

<210> 16

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 171-S54 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 16

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1

5

10

15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys

20

25

30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35

40

45

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

50

55

60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65

70

75

80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85

90

95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly

100

105

110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys

115

120

125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn

130

135

140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu

145

150

155

160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr

165

170

<210> 17

<211> 170

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 171-S57 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 17

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15
Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys

20 25 30
Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45
Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys

50 55 60
Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly

100 105 110
Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys

115 120 125
His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn

130 135 140
Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu

145 150 155 160
Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr

165 170

<210> 18

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 171-S58 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/D207N

<400> 18

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly

100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys
115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn
130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asn Ser Gly Thr Thr
165 170

<210> 19

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 171-S62 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 19

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Ile Glu Asn Phe Leu Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys

115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn

130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu

145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr

165 170

<210> 20

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 171-S63 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 20

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys

20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys

50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly

100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys

115 120 125

His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn

130 135 140

Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu

145 150 155 160

Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr

165 170

<210> 21

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI126-A2 S92I/H95F/R97P/H98A

<400> 21

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys

20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45

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

50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys
115 120 125

<210> 22
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> TNFRI126-A9 S92M/H95F/R97P/H98A
<400> 22

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys
50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys
115 120 125

<210> 23
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> TNFRI 126-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 23

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys

20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys

50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly

100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys

115 120 125

<210> 24

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 126-S54 L68V/S92I/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 24

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys

20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45

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

50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65 70 75 80
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly

100 105 110
Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys

115 120 125

<210> 25

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 126-S57 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A/K161N

<400> 25

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15
Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys

20 25 30
Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45
Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys

50 55 60
Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95
Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly

100 105 110
Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys

115 120 125

<210> 26

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 126-S62 L68V/S92I/H95F/R97P/H98G/K161Q

<400> 26

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

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

<210> 27

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> TNFRI 126-S63 L68V/S92M/H95F/R97P/H98G/K161N

<400> 27

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

50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly
100 105 110

Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Asn Gln Asn Thr Val Cys
115 120 125

<210> 28

<211

> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI105-A2 S92I/H95F/R97P/H98A

<400> 28

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser
1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys
20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser
35 40 45

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

50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp
85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn

100 105

<210> 29

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI105-A9 S92M/H95F/R97P/H98A

<400>

> 29

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys

20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys

50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

65 70 75 80

Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

85 90 95

Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn

100 105

<210> 30

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFRI 105-S36 L68V/S92M/H95F/R97P/H98A

<400> 30

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser

1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Val Tyr Asn Asp Cys

20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser

35 40 45

Phe Thr Ala Met Glu Asn Phe Leu Pro Ala Cys Leu Ser Cys Ser Lys

50 55 60

Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp

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