



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0024748
 (43) 공개일자 2009년03월09일

(51) Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-7031918
 (22) 출원일자 2008년12월30일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2008년12월30일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2007/061026
 국제출원일자 2007년05월30일
 (87) 국제공개번호 WO 2007/139164
 국제공개일자 2007년12월06일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2006-152892 2006년05월31일 일본(JP)

(71) 출원인
아스텔라스세이야쿠 가부시카가이사
 일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시혼초 2초메 3반 11고
자이단호진 가가쿠오요비겟세이료호젠쿠쇼
 일본국 구마모토겐 860-8568 구마모토시 오쿠보
 1-쫄메 6-1
 (72) 발명자
야마모토 노부치카
 일본 도쿄도 1038411 츄오쿠 니혼바시혼초 2초메
 3반 11고 아스텔라스세이야쿠 가부시카가이사
사카이 후미히코
 일본 도쿄도 1038411 츄오쿠 니혼바시혼초 2초메
 3반 11고 아스텔라스세이야쿠 가부시카가이사
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
이은선, 최규팔

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체

(57) 요약

본 발명은 종래의 항인간 오스테오폰틴 항체보다 활성(항원 결합 활성, 백혈구 유주 저해 활성 등) 및/또는 안정성(열, 저산성 조건, 변성제에 대한 내성 등)이 우수한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 제공한다.

(72) 발명자

히구치 히로후미

일본 구마모토켄 8691298 키쿠치시 교쿠시카와베
1314-1 자이단호진 가가쿠오요비겟세이료호겐쿠쇼
키쿠치겐쿠쇼

토리카이 마사하루

일본 구마모토켄 8691298 키쿠치시 교쿠시카와베
1314-1 자이단호진 가가쿠오요비겟세이료호겐쿠쇼
키쿠치겐쿠쇼

나카시마 토시히로

일본 구마모토켄 8691298 키쿠치시 교쿠시카와베
1314-1 자이단호진 가가쿠오요비겟세이료호겐쿠쇼
키쿠치겐쿠쇼

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1에 나타낸 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 3에 나타낸 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 항체의 중쇄 불변 영역이 인간 Ig γ 1임을 특징으로 하는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 항체의 경쇄 불변 영역이 인간 Ig κ 임을 특징으로 하는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 항체의 중쇄 불변 영역이 인간 Ig γ 1이며, 항체의 경쇄 불변 영역이 인간 Ig κ 임을 특징으로 하는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체.

청구항 5

서열번호 25에 나타낸 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 및 서열번호 27에 나타낸 아미노산 서열로 구성되는 경쇄를 포함하는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체.

청구항 6

제 1항의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

제 1항의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

제 6항 및/또는 7항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 9

제 8항의 발현 벡터가 도입된 숙주 세포.

청구항 10

제 9항의 발현 숙주 세포를 배양하여, 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 발현시키는 단계를 포함하는, 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 생산하는 방법.

청구항 11

제 1항 내지 5항 중 어느 한 항의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 포함하는, 자가면역 질환, 류머티즘, 류머티스성 관절염 또는 골관절염의 치료약.

청구항 12

제 1항 내지 5항 중 어느 한 항의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역 질환, 류머티즘, 류머티스성 관절염 또는 골관절염을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 13

자가면역 질환, 류머티즘, 류머티스성 관절염 또는 골관절염을 예방 또는 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서,

제 1항 내지 5항 중 어느 한 항의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 용도.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 활성 및 안정성이 우수한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체 및 상기 항체를 사용하여 질환을 치료하고 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 오스테오폰틴(이하, "OPN"이라 한다)은 뼈에 많이 포함되는 산성의 칼슘 결합성의 당단백질이며, 인간의 경우, mRNA의 스플리싱(splicing)의 차이로 인하여, 오스테오폰틴-a(이하, "OPN-a"이라 한다), 오스테오폰틴-b(이하, "OPN-b"라고 한다) 및 오스테오폰틴-c(이하, "OPN-c"라고 한다)의 적어도 3개의 아형이 생길 수 있는 것으로 공지되어 있다(비특허 문헌 1). 이 가운데, OPN-a의 전구체는 후기한 서열목록의 서열번호 23으로 나타낸 아미노산 서열을 가지며, 분비에 의해 시그널 펩티드가 절단되고, I17-N314의 성숙체 OPN-a가 만들어진다고 생각되고 있다. 또한 성숙체 OPN은 생체 내의 트롬빈에 의해 168번째(OPN-a의 경우)의 아르기닌 잔기의 C 말단측에서 절단되어 N 말단 단편 및 C 말단 단편의 2개가 된다.

<3> 상기의 OPN은 다종의 생리학적·병리학적으로 중요한 기능을 담당하고 있다. 예를 들면, 세포 부착, 세포 유주, 종양형성, 면역 반응 및 보체 매개 세포 용해의 저해 등의 기능을 가지고 있다. 이 다양한 기능은 다종의 세포 표면 수용체에 의해 매개되고 있다. OPN은 내부에 RGD 서열을 가지며(예를 들면, OPN-a는 159번째 잔기 ~ 161번째 잔기의 서열을 갖는다), 이 RGD 서열을 인식하는 $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 1$ 및 $\alpha V\beta 5$ 등의 인테그린은 주된 OPN 수용체이며, 이 중, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 1$ 및 $\alpha V\beta 5$ 인테그린은 혈관의 평활근 세포에 있어서 세포 부착을 매개하고, 더욱이 $\alpha V\beta 3$ 은 대식세포, 림프구, 내피세포 및 평활근 세포 등의 유주에 관여하고 있다.

<4> 그리고, 지금까지의 연구에서 OPN은 SVVYGLR 서열(서열번호 10)을 개입시켜 $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ 및 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린과 결합하는 것도 밝혀졌지만, 이들 중 $\alpha 4\beta 1$ 은 트롬빈으로 절단되지 않는 OPN(비절단형 OPN)과 트롬빈으로 절단된 N 말단 단편(절단형 OPN)의 양쪽 모두에 결합하고, $\alpha 9\beta 1$ 은 트롬빈 절단형 OPN에만 결합한다는 양식의 차이도 발견되었다(비특허 문헌 2 ~ 4). 이들 $\alpha 9$ 및 $\alpha 4$, $\beta 1$ 및 $\beta 7$ 의 인테그린 서브유닛은 서로 아미노산 서열간의 유사성이 높다. 그리고 $\alpha 4\beta 1$ 및 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린은 주로 림프구와 단구에서 발견되지만, 호중구에서는 극히 적게 발현되고 있는 것에 지나지 않는다. 한편, $\alpha 9\beta 1$ 은 호중구에서 선택적으로 고발현하며, VCAM-1 및 Tenascin-C 등을 매개로 호중구 유주에 필수적인 기능을 담당하고 있다. 또한 근육 세포나 상피세포, 간 세포 등에서 널리 발현한다. 이와 같이 인테그린 서브유닛 $\alpha 4$ 및 $\alpha 9$ 의 세포질 도메인은 각각 미묘하게 상이한 세포 내 시그널 전달 경로를 통해서 서로 협동하여 염증 부위로 백혈구의 유주 및 응집을 촉진시키고, 그것들의 침윤 활성을 증강시킴으로써 다양한 염증 반응에 관여하고 있는 것으로 생각된다.

<5> 이와 같이 여러 종류의 인테그린이 백혈구의 유주를 촉진시키고, 염증 반응에 관여하고 있다는 점에서 이들의 인테그린 활성을 저해하는 약제는 잠재적으로 항염증제로서의 가능성을 갖고 있다고 생각된다. 예를 들면, 인테그린 $\alpha V\beta 3$ 은 과골세포, 혈관내피세포 및 평활근 세포 등에서 발현되고, $\alpha V\beta 3$ 인테그린과 그의 여러 가지 결합 리간드와의 결합을 저해함으로써, 예를 들면, 관절에서는 관절 파괴 억제 작용을 기대할 수 있다는 점에서 항 $\alpha V\beta 3$ 항체의 개발이 실제로 이루어지고 있다.

<6> 그러나 인테그린 패밀리에 속하는 수용체는 광범위한 조직에서 보편적으로 발현하여 생명 활동 유지에 필수적인 기능을 담당하고 있기 때문에, 류머티스성 관절염 및 골관절염의 치료에 인테그린에 대한 항체를 사용하면, 다른 부위에서도 동일한 저해가 발생할 가능성이 있고, 부작용의 발생도 우려된다.

<7> 이러한 관점으로부터, 현재까지, 류머티스성 관절염, 골관절염 등의 병인을 명확하게 하여 보다 우수한 치료 방법을 제공하는 시도가 있었다.

<8> 예를 들면, W002/081522(특허 문헌 1)에서는 류머티즘 환자 및 골관절염 환자에서 관절강액의 OPN 농도가 높은 값을 나타내고, 류머티즘 환자에 있어서 전체 OPN에 차지하는 트롬빈 절단형 N 말단 단편의 비율이 증대하는 것을 발견하고, OPN이 이러한 질병의 발병에 깊게 관여하고 있다는 것을 확인하였다. 특허 문헌 1에서는 OPN을 트롬빈으로 절단한 N 말단 단편 및 C 말단 단편에 대해서, 각각의 단편을 구별해서 인식하는 항체를 제조하고, 그것들을 사용한 시험에 의해 류머티스성 관절염 환자에서는 특히 트롬빈에 의해 절단된 N 말단 단편이 관절강 내에서 고농도를 나타내고 있는 것을 발견하였다. 이 N 말단 단편에는 인간형 인테그린이 인식하는 RGD 서열과

SVVYGLR 서열(서열번호 10)이 모두 존재하고 있고, 이들 양자의 서열을 동시에 차단하는 항체가 OPN과 인테그린의 결합을 광범위하게 저해하여 류머티스성 관절염이나 골관절염등의 치료에 효과가 있는 것으로 확인되었다.

- <9> 구체적으로 특허 문헌 1에서는 인간 OPN의 RGD 서열과 인테그린의 결합 및 인간 OPN의 SVVYGLR 서열(서열번호 10)과 인테그린의 결합을 저해하는 항체를 제조하고, 세포 부착 및 세포 유주 등의 실험으로 그 효과를 확인하였다. 또한 마우스 OPN의 해당 내부 서열에 상응하는 합성 펩티드에 대한 항체를 수득하고, 마우스의 관절염 질환 모델을 사용하여 이 항체의 치료약으로서의 효과를 확인하였다.
- <10> 즉, 마우스 OPN은 인간 OPN과 아미노산 서열 상에서 상동한 위치에 마우스의 인테그린에 의해서 인식되는 RGD 서열 및 SLAYGLR 서열(서열번호 12)을 가지고 있으므로, 이들 서열을 동시에 차단하는 항체로서 M5 항체를 수득하였다. 이 M5 항체와 마우스 OPN 및 그의 트롬빈 분해 산물의 결합은 RGD 서열을 포함하는 GRGDSP 펩티드로 저해되며, 또한 이 M5 항체는 마우스 지라로부터의 유래된 TNF- α -활성화 단구의 유주를 저해하는 것이 확인되었다. 이 M5 항체를 마우스의 두개관 기관배양계로 조사하였더니 뼈 파괴 억제 작용이 관찰되었다. 또한 마우스의 콜라겐 관절염 모델에 상기 항체를 투여해 본 바, 확실하게 치료 효과를 나타내는 것이 확인되었다(특허 문헌 1 및 비특허 문헌 5).
- <11> 이상의 결과는 RGD 서열, SVVYGLR 서열(서열번호 10)과 인간형 인테그린의 결합을 동시에 차단할 수 있는 항체가 OPN과 인테그린의 결합을 저해하여 류머티스성 관절염 등의 치료에 유효하다는 것을 강하게 시사하고 있다. 추가로, 상기 결과는 소아 류머티스성 관절염이나 만성 류머티즘 등의 류머티즘뿐만 아니라 건선성 관절염이나 건선 치료에 효과가 기대되는 것을 나타내고 있다. 또한 장기 이식 후의 만성 거부는 혈관이나 기관지의 폐색성 병변을 특징으로 하고 있지만, 그 조직학적 검토에서 T 세포 및 대식세포의 활성화가 사이토카인, 증식 인자의 생산, 혈관내피세포 장해를 유발하고, 더 나아가 혈관 평활근의 증식이 섬유화 등을 유발시키기 때문에 혈관 폐색으로 진전되어 간다고 생각된다(비특허 문헌 6 ~ 8).
- <12> 그리고 이들의 대식세포의 활성화나 혈관 평활근의 섬유화에는 OPN이 필수적인 단백질로서 기능을 하고 있는 것으로 보고 되었고(비특허 문헌 9), OPN 저해 항체는 단구나 호중구의 유주를 억제함으로써, 이러한 섬유화를 향한 과정을 억제할 가능성이 있다. 따라서 장기 이식 후의 만성 거부를 억제하고, 장기 유착에 기여하거나, 전신성 자가면역 질환, 에리테마토데스(erythematosus), 포도막염, 베체트병, 다발성 근염, 사상체 증식성 신염, 유육종증 등의 자가면역 질환의 치료에 대한 효과가 기대된다. 또한, 여러 가지의 암에 있어서도 OPN의 발현량이 증가하고, OPN이 암의 진행 및 전이를 촉진하고(비특허 문헌 10 ~ 12), 항OPN 항체에 의해 암 세포의 증식이나 전이가 억제되는 것도 확인되었다(특허 문헌 3, 비특허 문헌 13). 따라서, 항OPN 항체는 여러 가지의 암의 치료에서도 효과가 기대된다.
- <13> 또한, W003/027151(특허 문헌 2)에서는 특허 문헌 1에서 기재한 마우스 항인간 오스테오폰틴 항체 2K1의 가변 영역과 인간 항체의 불변 영역을 갖는 키메라 항인간 오스테오폰틴 항체 및 2K1 항체의 상보성 결정 영역과 인간 항체의 프레임워크 영역 및 불변 영역을 갖는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체가 개시되고 있다.
- <14> 한편, 암치료용 항체(예를 들면, 리톡시맵, 트라스트즈맵, 베바시즈맵), 류머티즘 치료용 항체(예를 들면, 인플릭시맵, 아달리무맵), 이식편 거부를 억제하기 위한 치료용 항체(예를 들면, 무로모나브, 바실릭시맵) 등의 많은 치료용 단일 클론 항체가 이미 시판되고 있다.
- <15> 그의 높은 특이성 및 안정성이라는 기본적인 특성 때문에 향후에도 단일 클론 항체 제제는 특히 저분자의 치료약 개발이 곤란한 다양한 질환을 표적으로 하는 연구 개발이 가속화될 것으로 생각된다.
- <16> 한편, 이러한 항체 의약의 개발에 있어서 최대의 문제점은 항체의 생산성이다. 지금까지 시판되고 있는 단일 클론 항체의 임상 투여량은 대체로 수 mg/kg의 레벨이므로, 상당한 제조 비용이 요구된다.
- <17> 그 때문에, 우수한 활성을 나타내는 항체 및 동일한 활성을 나타내는 항체 중에서도 발현량이 높고, 단백질로서의 안정성이 높은 항체를 선택하는 것은 항체 의약으로서 실용화하는데 지극히 중요한 요건이다.
- <18> 특허 문헌 1: 국제 공개 제W002/081522 팜플렛
- <19> 특허 문헌 2: 국제 공개 제W003/027151 팜플렛
- <20> 특허 문헌 3: 국제 공개 제W006/043954 팜플렛
- <21> 비특허 문헌 1: Y. Saitoh et al., (1995): Laboratory Investigation, 72, 55-63
- <22> 비특허 문헌 2: Y. Yokosaki et al., (1999): The Journal of Biological Chemistry 274, 36328-36334

- <23> 비특허 문헌 3: P.M. Green et al., (2001): FEBS Letters 503, 75-79
- <24> 비특허 문헌 4: S.T. Barry et al., (2000): Experimental Cell Research 258, 342-351
- <25> 비특허 문헌 5: Yamamoto et al., (2003): The Journal of Clinical Investigation, 112, 181-188
- <26> 비특허 문헌 6: P. Freese et al., (2001): Nephrology, dialysis, transplantation, 16, 2401-2406
- <27> 비특허 문헌 7: J.R. Waller et al., (2001): British Journal of Surgery, 88, 1429-1441
- <28> 비특허 문헌 8: S.R. Lehtonen et al., (2001): Transplantation, 72, 1138-1144
- <29> 비특허 문헌 9: A. O' Regan et al., (2000): International Journal of Experimental Pathology, 81, 373-390
- <30> 비특허 문헌 10: G. F. Weber, (2001): Biochimica et Biophysica Acta, 1552, 61-85
- <31> 비특허 문헌 11: H. Rangaswami et al., (2006): TRENDS in Cell Biology 16, 79-87
- <32> 비특허 문헌 12: S.S. Forootan et al., (2006): Int. J. Cancer: 118, 2255-2261
- <33> 비특허 문헌 13: Z. Hu et al., (2005): Clin. Cancer Res. 11 4646-4652
- <34> **발명의 개시**
- <35> **발명이 해결하려고 하는 과제**
- <36> 본 발명은 상기의 상황을 발전시킨 것이고, 그 해결하려고 하는 과제는 종래의 항인간 오스테오폰틴 항체보다 활성(항원 결합 활성, 백혈구 유주 저해 활성 등) 및/또는 안정성(열, 저산성 조건, 변성제에 대한 내성 등)이 우수한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 제공하는 것이다. 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 광범위한 연구를 거듭한 결과, 이러한 특성을 갖는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 생산하는데 성공하였다.
- <37> **과제를 해결하기 위한 수단**
- <38> 따라서, 본 발명은 하기의 특징을 갖는다.
- <39> (1) 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체.
- <40> (2) 상기 (1)에 기재한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 중쇄 불변 영역은 인간 Ig γ 1이다.
- <41> (3) 상기 (1)에 기재한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 경쇄 불변 영역은 인간 Ig κ 이다.
- <42> (4) 상기 (1)에 기재한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 중쇄 불변 영역은 인간 Ig γ 1이며, 항체의 경쇄 불변 영역은 인간 Ig κ 이다.
- <43> (5) 서열번호 25에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 및 서열번호 27에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 경쇄를 포함하는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체.
- <44> (6) 상기 (1)에 기재한 인간 항인간 오스테오폰틴 항체의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- <45> (7) 상기 (1)에 기재한 인간 항인간 오스테오폰틴 항체의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- <46> (8) 상기 (6) 및/또는 (7)에 기재한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.
- <47> (9) 상기 (8)에 기재한 발현 벡터가 도입된 숙주 세포.
- <48> (10) 상기 (9)에 기재한 숙주 세포를 배양하여, 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 발현시키는 단계를 포함하는, 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 생산하는 방법.
- <49> (11) 상기 (1) - (5) 중 어느 하나에 기재한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 포함하는, 자가면역 질환, 류머티즘, 류머티스성 관절염 또는 골관절염의 치료약.

<50> (12) 상기 (1) - (5) 중 어느 하나에 기재한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역 질환, 류머티즘, 류머티스성 관절염 또는 골관절염을 예방 또는 치료하는 방법.

<51> (13) 자가면역 질환, 류머티즘, 류머티스성 관절염 또는 골관절염을 예방 또는 치료하기 위한 의학의 제조에 있어서, 상기 (1) - (5) 중 어느 하나에 기재한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 용도.

<52> **발명의 효과**

<53> 본 발명에 의해 종래의 항인간 오스테오폰틴 항체보다 활성(항원 결합 활성, 백혈구 유주 저해 활성 등) 및/또는 안정성(열, 저산성 조건, 변성체에 대한 내성 등)이 우수한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체가 제공된다. 이러한 특징을 갖는 본 발명의 항체는 자가면역 질환, 류머티즘, 류머티스성 관절염, 골관절염을 포함하는, 여러 가지의 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하다.

발명의 상세한 설명

<70> **발명을 실시하기 위한 최선의 형태**

<71> 하기에, 본 발명에 대해 상세히 기술한다.

<72> 본 발명자들은 상기 종래의 항인간 오스테오폰틴 항체에 관한 과제를 극복하기 위해서 광범위하게 검토를 거듭한 결과, W003/027151(특허 문헌 2)에 기재된 키메라 2K1 항체 및 인간화 2K1 항체에 비하여 활성 및/또는 안정성이 모두 우수한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 수득하는데에 성공하였다.

<73> 모든 클래스에 공통되는 항체 분자의 기본 구조는 분자량 5만 ~ 7만개의 중쇄 및 2 ~ 3만개의 경쇄로 구성된다. 중쇄는 일반적으로 약 440개의 아미노산을 함유하는 폴리펩티드 쇄로 구성되고, 중쇄는 여러가지 클래스의 특징적인 구조를 가지며, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE에 상응하는 γ , μ , α , δ 및 ϵ 쇄로 불린다. 또한 IgG에는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4가 존재하고, 각각 $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$ 로 불린다. 경쇄는 일반적으로 약 220개의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드 쇄로 구성되고, L형과 K형의 2종이 알려져 있으며, 각각 λ , κ 쇄라고 불린다. 항체 분자의 기본 구조의 펩티드 구성에 있어서, 각각 상동인 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄는 이황화 결합(S-S결합) 및 비공유결합에 의해 결합되고, 분자량은 15만 ~ 19만이다. 2종의 경쇄는 임의의 중쇄와 쌍을 이룰 수 있다. 개개의 항체 분자는 항상 동일한 경쇄 2개 및 동일한 중쇄 2개로 구성된다.

<74> 쇄내 s-s결합은 중쇄에는 4개(μ , ϵ 쇄에는 5개), 경쇄에는 2개가 있고, 아미노산 100 ~ 110개의 잔기 마다 1개의 루프를 형성하는 이 입체 구조는 각 루프 사이에서 유사하여 구조 단위 또는 도메인이라고 불린다. 중쇄 및 경쇄 모두에 있어서, N 말단에 위치하는 도메인은 동종 동물 종의 동일 클래스(서브 클래스)의 참조 표준이어도, 아미노산 서열이 일정하지 않아 가변 영역(V 영역, variable region, 가변부)이라고 불린다(각 도메인은 각각, V_H 및 V_L 로 나타낸다). 이로부터 C 말단측의 아미노산 서열은 각각의 클래스 또는 서브 클래스에서 거의 일정하고, 불변 영역(C 영역, constant region, 불변부)이라고 불린다(각 도메인은 각각, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} 또는 C_L 로 나타낸다).

<75> 항체의 항원 결정 부위는 V_H 및 V_L 에 의해 구성되고, 결합의 특이성은 이 부위의 아미노산 서열에 달려 있다. 한편, 보체 또는 각종 세포와의 결합과 같은 생물학적 활성은 각 클래스 Ig의 C 영역의 구조의 차이를 반영하고 있다. 경쇄와 중쇄의 가변 영역의 가변성은 둘 모두의 쇄에도 존재하는 3개의 작은 초가변 영역에서의 한정되는 것으로 밝혀졌고, 이러한 영역을 상보성 결정 영역(CDR, complementarity determining region)이라 부른다. 가변 영역의 나머지의 부분은 프레임워크 영역(framework region)이라 불리고 비교적 일정하다. 일반적으로, 각 가변 영역의 상보성 결정 영역의 5 ~ 10개의 아미노산만이 항원 결합 부위를 형성한다.

<76> 본 명세서에서, 항원과 반응하는 가변 영역에 대해서는 마우스 항체(기증자 이종 항체라고도 칭한다) 유래의 가변 영역을 가지고, 불변 영역에 대해서는 인간 항체 유래의 불변 영역을 갖는 항체를 키메라 항체라고 칭하고, 오스테오폰틴 및 그의 단편을 인식하는 키메라 항체를 키메라 항오스테오폰틴 항체라고 칭한다. 또한, 항원 특이적인 비인간 포유동물(예를 들면, 마우스) 항체 분자의 상보성 결정 영역(항원 결합 부위)을 제외한 모든 영역을 인간 항체의 아미노산에 도입한 재조합 항체를 인간화 항체라고 칭한다. 인간화 항체에는, 본 발명의 항체와 같은 프레임워크 영역에 아미노산의 변형(치환, 삽입, 결실, 부가)을 가한 것도 포함된다.

<77> 일반적으로, 인간화 항체의 작제에 있어서, 상보성 결정 영역의 아미노산 서열만을 주형의 인간 항체 프레임워크에 이식한 경우에는 대다수가 기원의 마우스 항체보다 항원 결합 활성이 감소하는 것으로 알려져 있다. 상기

인간화 2K1 항체도 OPN 펩티드에 대한 결합성은 가지지만, OPN에 대한 세포 부착 저해 활성이 지극히 낮아 항체의약으로서의 사용에는 적합하지 않은 것으로 확인되었다(하기 실시예 9).

- <78> 본 발명자들은 이러한 인간화 항체의 활성 저하를 개선하여, 항체 의약으로서 사용하기 위해서 보다 우수한 안정성을 갖는 인간화 항체를 수득하기 위하여 광범위한 검토를 거듭한 결과, 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체가 종래의 키메라 및 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체와 비교하여 유의하게 개선된 활성 및/또는 여러 가지의 안정성 지표에 대하여 우수한 안정성을 갖는 것을 밝혔다. 이러한 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 주형의 인간 항체의 중쇄 및 경쇄의 프레임워크 영역에 대하여 몇개의 아미노산에 변형을 가하여 작제된 것이므로, 상보성 결정 영역만을 이식해 작제된 종래의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체(특허 문헌 2)와는 프레임워크 영역의 서열이 상이하다.
- <79> 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 본 명세서에 개시된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열 정보에 근거하여, 당업계에서 공지된 방법을 사용하여 당업자에 의해 용이하게 작제될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 항체의 중쇄 가변 영역 아미노산(서열번호 1)을 코딩하는 염기 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 유전자 단편 및 본 발명의 항체의 경쇄 가변 영역 아미노산(서열번호 3)을 코딩하는 염기 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 유전자 단편을 작제한다. 그리고, 이 가변 영역 유전자를 인간 항체의 적당한 클래스의 불변 영역 유전자와 결합시켜 인간화 항체 유전자를 작제한 다음, 이 인간화 항체 유전자를 적당한 발현 벡터에 결합시키고, 배양 세포로 도입한다. 마지막으로 이 배양된 세포를 수확하여 배양 상청액으로부터 인간화 항체를 수득할 수 있다.
- <80> 상기 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산(서열번호 1 및 서열번호 3)을 코딩하는 각각의 가변 영역 유전자 단편은, 예를 들면, W003/027151에 기재되어 있는 방법에 따라, 인간화 2K1 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 각각을 코딩하는 유전자 단편을 제조하고, 인간화 2K1 항체의 프레임워크 영역을 코딩하는 유전자 단편의 특정 부위에 변이를 도입함으로써 작제할 수 있다. 프레임워크 영역의 특정 부위에 변이를 도입하는 방법으로서, 부위 특이적 변이 유발법(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5) 등의 당업자에게 공지된 여러 가지의 방법이 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 유전자 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 1 및 서열번호 3)에 근거해 설계된 염기 서열 또는 서열번호 5 및 서열번호 7에 나타난 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 염기 서열에 근거해, 당업계에서 공지된 유전자 합성 방법을 이용하여 합성하는 일도 가능하다. 이러한 유전자 합성 방법으로서 W090/07861에 기재된 항체 유전자의 합성 방법 등으로 당업자에게 공지된 여러 가지의 방법이 사용될 수 있다.
- <81> 이어서, 상기의 가변 영역 유전자 단편과 인간 항체의 불변 영역 유전자를 결합시켜 인간화 항체 유전자를 작제한다. 사용되는 인간 항체의 불변 영역은 임의의 서브 클래스의 불변 영역이 선택될 수 있지만, 바람직하게 중쇄 불변 영역으로서 인간 Ig γ 1이 사용될 수 있고, 경쇄 불변 영역으로서 인간 Ig κ 가 사용될 수 있다.
- <82> 이 인간화 항체 유전자를 작제한 후, 인간화 항체 유전자의 발현 벡터로의 도입, 발현 벡터의 배양 세포로의 도입, 배양 세포의 배양, 항체의 정제 등은 당업계에 공지된 여러 가지의 방법을 사용하여 수행될 수 있고, W002/081522 또는 W003/027151에 기재된 키메라 항인간 오스테오폰틴 항체 또는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 작제 방법을 참조하여 수행할 수 있다. 상기와 같이 하여 수득한 인간화 항체 유전자와 결합되는 발현 벡터로서는, 국제 공개 공보 W094/20632에 기재된 AG γ 1 또는 AG κ 등의 발현 벡터를 사용할 수 있지만, 인간화 항체 유전자를 발현할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 또한 발현 벡터로서 AG γ 1 또는 AG κ 등의 인간 Ig 불변 영역 유전자를 이미 갖는 것을 이용하면, 이에 인간화 항체 가변 영역 유전자를 삽입하는 것만으로도 인간화 항체 유전자를 갖는 발현 벡터가 되기 때문에 바람직하다.
- <83> 상기의 발현 벡터는, 예를 들면, 인산 칼슘법 등에 의해, 배양 세포로 도입된다.
- <84> 발현 벡터를 도입하는 배양 세포로서는, 예를 들면, CHO-DG44 세포 등의 배양 세포를 사용할 수 있고, 이들은 통상의 방법에 의해 배양될 수 있다.
- <85> 상기 배양 후, 배양 상청액 중에 축적된 항체는, 예를 들면, 프로테인 A 컬럼을 이용한 각종 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.
- <86> 이렇게 하여 수득한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 항원 활성은, 예를 들면, 하기 실시예에 기재되는 것과 같이 오스테오폰틴 펩티드 등을 이용한 ELISA 또는 BIAcore(BIAcore 사) 등에 의해 측정가능하다. 또한, 인간

화 항인간 오스테오폰틴 항체의 백혈구 유주 저해 활성은, 예를 들면, 하기 실시예에 기재된 것과 같이, 검사 항체 및 OPN 또는 트롬빈 절단형 OPN의 존재 하에서, 인간 말초 혈액 단핵구를 배양함으로써 측정할 수 있다. 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 사이토카인(예를 들면, TNF α)으로 활성화된 인간 말초 혈액 단핵구의 트롬빈 절단형 OPN으로의 유주를 저해하는 생물 활성을 갖는다.

<87> 이어서, 이와 같이 하여 작제된 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 각종 안정성 지표에 대해 시험하였다. 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 이하의 안정성 지표(A) ~ D))를 나타낸다:

<88> A) PBS 중에서 70°C로 2 시간 가열 처리한 후 SVVYGLR 서열(서열번호 10)을 포함하는 펩티드에 대한 결합 활성이, 가열 처리하지 않는 경우의 90% 이상으로 열 안정성을 나타낸다.

<89> B) 기증자 이종 항체 유래의 가변 영역 및 인간 항체 유래의 불변 영역을 갖는 키메라 항체와 비교하여, 변이 온도 중점(T_m)이 적어도 5°C 높다.

<90> c) 기증자 이종 항체 유래의 가변 영역 및 인간 항체 유래의 불변 영역을 갖는 키메라 항체보다 적어도 0.5 M 높은 농도의 구아니딘 염산에까지 내성을 갖는다.

<91> D) 기증자 이종 항체 유래의 가변 영역 및 인간 항체 유래의 불변 영역을 갖는 키메라 항체보다 적어도 0.3보다 낮은 레벨의 pH에까지 내성을 갖는다.

<92> 여기에서, 상기 지표 A) 및 B)는 모두 열에 대한 안정성의 지표이며, 이들 지표에서 항체는 더 나은 특성을 가지므로, 이는 장기의 보존 안정성 및 제형에 대해 이점을 갖는다. 즉, 항체 제제는 단백질이기 때문에 보존 안정성이 문제가 되는 것이 많으므로 동결건조 제제(이는 사용 시에 녹이지 않으면 안 되기 때문에, 의료 현장에서는 편리성의 면에서 문제가 되고, 특히, 단백질 제제는 용해하는데에 30초 이상 걸리는 것이 많아 의료 현장에서 부담이 되는 것이 많다)가 되는 경우가 있다. 그러나, 양호한 온도 안정성을 갖는 임의의 항체는 용액 상태에서 냉장 하에 2년 이상 동안 장기 안정성을 보장할 수 있다. 실제로, 하기 실시예에서 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체, R2K1v1.7은 실온(25°C)에서도 약 1년 동안 안정성이 확보되었다. 또한, 용액 제제가 가능하다면 선충전 시린지 등의 보다 편리성이 높은 제제화가 가능하다. 상기의 지표를 만족시키는 높은 온도 안정성의 항체는 제제화의 광범위한 변화를 제공하고 의료 요구를 보다 만족시키는 제제화가 가능해져서 선택 사항이 증가한다.

<93> 상기 지표 c)는 열 내성에 관한 지표이지만, 이러한 열 내성을 갖는 항체는 약제학적 제제를 제조하는데 있어서 보다 유리한 제제 검토를 실시하는 것이 가능해진다. 특히 선충전 시린지에 있어서, 100 내지 200 $\mu\text{g/mL}$ 와 같은 고농도의 단백질 제제를 설계하는데 고농도의 염을 사용하는 경우가 많기 때문에 이 지표는 유용하다.

<94> 상기 지표 D)는 pH 내성에 관한 지표이고, 이러한 pH 내성을 갖는 항체는 항체의 제조 정제 과정에서 바이러스 불활성 단계에서 더 낮은 pH로 처리가 가능하므로 유용하다. 이 때문에, 통상의 항체보다 약 0.3 정도의 저-pH 내성을 가짐으로써 큰 이점이 된다.

<95> 지표 A)의 시험 방법은 하기와 같다. 우선, 검사 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 PBS 중에 희석(바람직하게는 50 $\mu\text{g/mL}$)하고, 70°C에서 2 시간 동안 가열 처리한다. 그 후, 희석액을 실온으로 되돌리고, SVVYGLR 서열(서열번호 10)을 포함하는 펩티드에 대한 항체의 결합 활성을, 예를 들면, Kon 등의 ELISA 방법(Journal of Cellular Biology, 88: 420-432 (2002))에 의해 측정한다. 이 열처리한 항체의 결합 활성을 열처리하지 않은 동일한 항체에 대해 측정한 결합 활성과 비교한다. 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 이러한 가열 처리를 하였을 경우, SVVYGLR 서열(서열번호 10)을 포함하는 펩티드에 대한 비처리된 동일한 항체의 결합 활성의 90% 이상의 결합 활성을 갖는다. 바람직하게, 이 지표 시험에 사용되는 SVVYGLR 서열(서열번호 10)을 포함하는 펩티드는 CVDTYDGRGDSVVYGLRS 서열(서열번호 13)을 갖는 오스테오폰틴 펩티드이다.

<96> 지표 B)의 시험 방법은 하기와 같다. 우선, 검사 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체 및 W003/027151에 기재된 키메라 2K1 항체(C2K1)를 적절한 완충액(바람직하게는 20 mM 구연산 버퍼 + 120 mM NaCl(pH 6.0))로 조정하고, 시차 주사 열량계(바람직하게는 VP 캐필러리 DSC 플랫폼(MicroCal Company)를 사용하여 열에 대한 안정성을 평가할 수 있다. 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 변성 온도를 나타내는 전이 온도 중점(T_m)은 C2K1의 전이 온도 중점보다 적어도 5°C 높다.

<97> 지표 C)의 시험 방법은 하기와 같다. 우선, 검사 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체 및 상술한 키메라 2K1 항체(C2K1)를 0 내지 5 M의 다양한 농도의 구아니딘 염산을 포함하는 버퍼 용액(바람직하게는 20 mM 인산 나트륨 + 120 mM NaCl 용액(pH 7.0))에 용해시키고, 용액을 적당한 농도로(바람직하게는 50 $\mu\text{g/mL}$)로 조정한다. 이어서,

각각의 용액 샘플을 10℃에서 하룻밤 동안 방치한 후, 각 샘플의 형광 스펙트럼을 측정한다. 특히, 280 nm의 여기광 하에 트립토판에 의해 방출된 형광을 320 nm 내지 370 nm 범위의 파장에 걸쳐 스캐닝한다. 피크 파장의 쉬프트는 구아니딘 염산에 의해 항체의 입체 구조가 느슨해짐으로서 발생한다. 피크 파장의 쉬프트에 대한 구아니딘 염산의 농도는 검사 항체 및 키메라 항체 각각에 대하여 측정된다. 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체에 있어서, 상술한 피크 파장의 쉬프트에 대한 구아니딘 염산의 농도는 C2K1보다 적어도 약 0.5 M 높다.

<98> 지표 D)의 시험 방법은 하기와 같다. 우선, 검사 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체 및 상술한 키메라 2K1 항체(C2K1)를 적절한 완충액(바람직하게는 20 mM 구연산 버퍼 + 120 mM NaCl(pH 6.0))으로 조절(바람직하게는 2 mg/mL)하고, 여기에 산성 용액(바람직하게는, 0.1 N HCl) 및 물을 첨가하면서, 소정의 농도(1 mg/mL)의 각각의 낮은 pH 레벨의 샘플을 제조한다. 샘플을 실온에서 1 간 처리한 후, 원편광 이색성(CD) 스펙트럼을 측정한다. CD 스펙트럼을 파장 205 nm 내지 260 nm의 파장 범위에 걸쳐 측정하고, Yang 등의 CD 스펙트럼 분석법(Methods in Enzymology, 130, 208-269(1986))에 근거해, 각 항체의 각각의 pH로 처리된 샘플에 대하여 랜덤 구조의 함유율을 측정한다. 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체에 대한 랜덤 구조의 함유율이 상승하기 시작하는 pH는 C2K1의 그것과 비교하여 적어도 약 0.3 낮다.

<99> 본 발명자들은 W003/027151에 기재된 인간화 항체를 기본으로 하여, 부위 특이적 변이 유발 등에 의한 프레임워크 영역 유전자의 변형 및 상술의 A) ~ D)의 안정성 지표를 이용한 안정성 시험을 조합하여 광범위한 검토를 거듭한 결과, 인간 항체 프레임워크 부분(FR1 ~ 4)을 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열(각각 아미노산 번호 1 ~ 30, 36 ~ 49, 67 ~ 98 및 106 ~ 116) 및 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열(각각 아미노산 번호 1 ~ 23, 40 ~ 54, 62 ~ 93 및 103 ~ 113)이 되도록 하여, 종래의 항인간 오스테오폰틴 항체보다 활성(항원 결합 활성, 백혈구 유주 저해 활성 등) 및/또는 안정성(열, 저산성 조건, 변성제에 대한 내성 등)이 우수한 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 획득하는 것을 처음으로 성공하였다. 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 상술의 항원 결합 활성, 백혈구 유주 저해 활성 및 각종 안정성 지표에 대해 시험한 결과, 활성을 가지고, 지표 A) ~ D)를 모두 특성으로서 나타낸다.

<100> 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 당업계에서 공지된 방법을 이용하여 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 및 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 DNA를 합성하고, 이들을 적당한 클래스의 인간 항체 불변 영역 유전자, 바람직하게 중쇄에 대해서는 인간 Ig γ 1 불변 영역 유전자, 경쇄에 대해서는 인간 Ig κ 불변 영역 유전자와 결합시켜 인간화 항체 유전자를 작제하고, 당업계에 공지된 여러 가지 방법 또는 W002/081522 또는 W003/027151에 기재된 방법 등을 이용하여, 인간화 항체 유전자를 발현 벡터에 도입하고, 이 발현 벡터를 배양 세포에 도입하고, 이 배양 세포를 배양하여 획득할 수 있는 배양물로부터 항체를 정제함으로써 용이하게 획득할 수 있다. 서열번호 1에 나타난 중쇄 가변 영역 유전자 및 인간 Ig γ 1 중쇄 불변 영역 유전자를 결합하여 획득할 수 있는 본 발명의 바람직한 인간화 항체 중쇄 유전자로서는 서열번호 25에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 유전자, 보다 바람직하게는 서열번호 24에 나타난 염기 서열을 포함하는 유전자를 들 수 있다. 또한, 서열번호 3에 나타난 경쇄 가변 영역 유전자 및 인간 Ig κ 경쇄 불변 영역 유전자를 결합하여 획득할 수 있는 본 발명의 바람직한 인간화 항체 경쇄 유전자로서는 서열번호 27에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 유전자, 보다 바람직하게는 서열번호 26에 나타난 염기 서열을 포함하는 유전자를 들 수 있다. 서열번호 24에 나타난 염기 서열을 포함하는 중쇄 유전자 및 서열번호 26에 나타난 염기 서열을 포함하는 경쇄 유전자로 코딩되는 본 발명의 인간화 항 오스테오폰틴 항체로서는 하기 실시예에서 나타난 R2K1v1.7을 들 수 있다.

<101> 또한, 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 본 발명의 인간화 항오스테오폰틴 항체는 상기 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 DNA와 인간 항체중쇄 불변 영역 유전자 및 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 및 인간 항체 경쇄 불변 영역 유전자를 주형으로서 무세포 전사/번역계를 이용하여 합성할 수도 있다. 무세포 전사/번역계는 시판되는 것을 이용할 수도 있고, 기존의 방법 그 자체, 구체적으로, 대장균 추출액은 Pratt J. M. 등의 "Transcription and Translation", Hames B.D. 및 Higgins S.J. 편집, IRL Press, Oxford 179-209 (1984)에 기재된 방법 등에 따라 제조할 수도 있다. 시판되는 세포 용해물로서는 대장균 유래의 E. coli S30 extract system(Promega 사) 또는 RTS 500 Rapid Translation System(Roche 사) 등을 들 수 있고, 토끼 망상 적혈구 유래의 Rabbit Reticulocyte Lysate System(Promega 사) 등이 있고, 맥아 유래의 PROTEIOS™(TOYOBO 사) 등을 들 수 있다. 이 중 맥아 용해물을 이용하는 것이 매우 적합하다. 맥아 용해물의

작제법은, 예를 들면, Johnston F.B. et al., Nature, 179, 160-161 (1957) 또는 Erickson A.H. et al., Meth. Enzymol., 96, 38-50 (1996) 등에 기재된 방법을 이용할 수 있다.

- <102> 본 발명은 서열번호 1에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 3에 나타난 아미노산 서열로 구성되는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 활성을 보유한 한개의 쇠 가변 영역 단편(scFv), Fab, Fab', F(ab')₂ 등의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체 단편(항체 단편)을 포함한다.
- <103> scFv의 작제에 이용되는 중쇄 가변 영역(VH)과 경쇄 가변 영역(VL)을 결합하기 위한 링커로서는, 본 발명의 항체 단편이 상술한 것과 같은 특성을 가질 수 있는 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 14)로 나타난 아미노산 서열로 구성되는 펩티드를 들 수 있다. 또한 당업자라면, 본 발명에 근거해, 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체 또는 항체 단편 및 다른 펩티드 또는 단백질과의 융합 항체를 작제하고 변형체를 결합시킨 변형 항체를 작제하는 일도 가능하다. 융합에 이용되는 다른 펩티드 또는 단백질은 항체의 결합 활성을 저하시키지 않는다면 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 인간 혈청 알부민, 각종 태그 펩티드, 인공 헬릭스 모티프 펩티드, 말토스 결합 단백질, 글루타티온 S 트랜스퍼라아제, 각종 독소, 다량체화를 촉진시키는 펩티드 또는 단백질 등을 들 수 있다. 변형에 이용되는 변형체는 항체의 결합 활성을 저하시키지 않는 한 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 폴리에틸렌글리콜, 당쇄, 인지질, 리포솜, 저분자 화합물 등을 들 수 있다.
- <104> 이와 같이 하여 수득한 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체 또는 항체에 기인하는 활성을 보유하는 항체 단편, 상기 항체 또는 항체 단편을 펩티드 또는 다른 단백질과 융합시킨 융합 항체 또는 상기 항체 또는 항체 단편에 변형체가 결합된 변형 항체는 필요에 따라 더욱 정제된 후, 통상의 방법에 따라 제제화되어 류머티스성 관절염, 소아 류머티스성 관절염 및 만성 류머티즘 등의 류머티즘, 건선성 관절염, 건선 등의 치료, 암, 장기 이식 후의 만성 이식 거부 억제, 골관절염, 전신성 자가면역 질환, 에리테마토데스, 포도막염, 베체트병, 다발성 근염, 사상체 증식성 신염, 유육종증 등의 자가면역 질환의 치료에 이용할 수 있다.
- <105> 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 바람직하게는, 류머티즘 치료제, 자가면역 질환 치료제, 골관절염 치료제 또는 류머티스성 관절염 치료제로서, 보다 바람직하게는, 류머티스성 관절염 치료제로서 이용할 수 있다. 이들 류머티즘 치료제 등의 제형의 예로서는, 주사제, 링겔용제 등의 비경구제로 하는 것이 가능하고, 정맥내 투여, 피하 투여 등에 의해 투여하는 것이 바람직하다(자가면역 질환 치료제의 경우에도 동일하게 적용된다). 또한, 제제화에 있어서, 약제학적으로 허용되는 범위에서, 이들 제형에 매치되는 담체 또는 첨가제를 사용할 수 있다.
- <106> 상기 제제화에 해당하는 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체의 첨가량은 환자의 증상의 정도, 연령 또는 사용하는 제제의 제형 또는 재조합 OPN 저해 항체의 결합 역가 등에 의해 좌우되지만, 예를 들면, 약 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg이 사용될 수 있다.
- <107> 이와 같이 하여 수득한 본 발명의 치료제는 유효 성분인 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체가 OPN의 RGD 서열과 SVVYGLR 서열(서열번호 10)에 강하게 결합하여, OPN의 이 부분과 인테그린과의 결합을 저해함으로써, 결과적으로 류머티즘 및 류머티스성 관절염 및 다른 자가면역 질환의 증상의 악화를 억제할 수 있다.
- <108> 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 인테그린 측이 아니고 OPN 측에 특이적으로 결합하는 것이기 때문에, 인테그린의 다른 중요한 기능을 저해할 우려는 적고, 부작용의 문제는 피해질 것이라고 기대된다.
- <109> 또한, 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 류머티스성 관절염의 진단제로서 이용할 수 있다. 상술한 바와 같이, 류머티스성 관절염 환자의 관절에서, 트롬빈에 의해 절단된 OPN의 N 말단 단편이 고농도로 발견되는 것으로 판명되었다. 따라서, 이 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 이용해 샘플 중의 OPN 또는 그의 N 말단 단편의 양을 측정하는 것은 류머티스성 관절염의 진단에 유용하다. 그 기법으로서, 방사성 동위 원소 면역 측정법(RIA법), ELISA법(E. Engvall et al., (1980): Methods in Enzymol., 70,419-439), 형광 항체법, 플라크법, 스포트법, 응집법, 2중 2차원 확산법(Ouchterlony method, "Hybridoma Method and Monoclonal Antibodies", published by R&D Planning, pages 30-53, March 5, 1982)을 이용할 수 있다.
- <110> 상기 기법은 여러 가지의 관점으로부터 적당히 선택할 수 있지만, 감도, 간편성 등의 점으로부터는 ELISA법이 바람직하다. 보다 바람직한 방법의 예로서는, 예를 들면, 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체를 담체 상에 고정화시켜, 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체와는 다른 OPN 상의 부위를 인식하는 항체를 표지 화함으로써 OPN 또는 그의 N 말단 단편을 검출하여 이를 류머티스성 관절염의 진단약으로 사용할 수 있다.
- <111> 상기 항체를 표지하기 위하여 사용되는 표지 물질로서는, 융합 단백질/펩티드를 형성하기 위한 글루타티온 S-트

랜스퍼라아제 등의 단백질/펩티드, 양고추냉이 페록시다아제(이하 "HRP"로 칭함), 알카라인 포스파타제(이하 "AP"로 칭함) 등의 효소, 플루오레세인 이소시아네이트 및 로다민 등의 형광 물질, ³²P 및 ¹²⁵I 등의 방사성 물질, 화학 발광 물질 등의 변형제를 들 수 있다.

- <112> OPN 아형의 검출 방법에 관하여, 예를 들면, 샌드위치법 등의 당업계에서 공지된 방법을 사용하거나, 보다 구체적으로는, W002/081522(특허 문헌 2) 또는 W003/027151(특허 문헌 3)에 기재된 검출 방법과 같은 방법을 사용하여 수행할 수 있다.
- <113> 본 발명은 또한, 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 유전자 및 이를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 발현 벡터는 원핵세포 및/또는 진핵세포의 각종 숙주 세포 중에서 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 유전자를 발현하여, 이들 폴리펩티드를 생산할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, 핵 외 유전자 벡터, 바이러스 벡터(예를 들면, 아데노바이러스, 레트로바이러스) 등을 들 수 있다.
- <114> 본 발명의 발현 벡터는 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 유전자 및 상기 유전자에 작동가능하게 결합된 프로모터를 포함할 수 있다. 박테리아 중에서 본 발명의 폴리펩티드를 발현시키기 위한 프로모터로서는, 숙주가 에시리키아(Escherichia) 속의 박테리아인 경우, 예를 들면, Trp 프로모터, lac 프로모터, recA 프로모터, λPL 프로모터, lpp 프로모터, tac 프로모터 등을 들 수 있다. 효모 중에서 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 발현시키기 위한 프로모터로서는, 예를 들면, PHO5 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터를 들 수 있다. 숙주가 바실러스 속의 박테리아인 경우는, SLO1 프로모터, SP02 프로모터, penP 프로모터 등을 들 수 있다. 또한, 숙주가 포유 동물 세포 등의 진핵 세포인 경우, SV40 유래의 프로모터, 레트로바이러스의 프로모터, 열 충격 프로모터 등을 들 수 있다.
- <115> 숙주 세포로서 박테리아, 특히 대장균을 이용하는 경우, 본 발명의 발현 벡터는 개시 코돈, 정지 코돈, 종결 영역 및 복제 가능 단위를 추가로 포함할 수 있다. 숙주로서 효모, 동물 세포 또는 곤충 세포를 이용하는 경우, 본 발명의 발현 벡터는 개시 코돈 및 정지 코돈을 포함할 수 있다. 이 경우, 인헨서 서열, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 5' 및 3'의 비번역 영역, 스플라이싱 접합부, 폴리아데닐화 부위 또는 복제가능 단위 등을 포함할 수 있다. 또한, 목적에 따라 통상적으로 이용되는 선택 마커(예를 들면, 테트라사이클린, 암피실린, 카나마이신)를 포함할 수 있다.
- <116> 본 발명은 또한, 본 발명의 유전자가 도입된 형질전환체를 제공한다. 이러한 형질전환체는, 예를 들면, 본 발명의 발현 벡터로 숙주 세포를 형질전환함으로써 작제할 수 있다. 형질전환체의 작제에 이용되는 숙주 세포로서는, 상술한 발현 벡터와 매치되고, 형질전환될 수 있는 것이라면 특별히 한정되지 않고, 본 발명의 기술 분야에 있어 통상적으로 사용되는 천연 세포 또는 인공적으로 확립된 세포 등의 여러 가지 세포(예를 들면, 박테리아(에시리키아 속의 박테리아, 바실러스 속의 박테리아), 효모(사카로마이세스 속, 피키아 속 등), 동물 세포 또는 곤충 세포(예를 들면, SF9 등)가 예시된다. 형질전환은 자체 공지의 방법에 의해 수행될 수 있다.
- <117> 본 발명은 또한, 본 발명의 유전자를 숙주 세포에 발현시키는 것, 즉, 이러한 형질전환체를 이용하는 것을 포함하는, 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 생산하는 방법을 제공한다.
- <118> 본 발명의 항체 또는 그의 단편의 생산에서, 형질전환체는 영양 배지에서 배양될 수 있다. 영양 배지는 형질전환체의 생육에 필요한 탄소원, 무기 질소원 또는 유기 질소원을 포함하는 것이 바람직하다. 탄소원으로서, 예를 들면, 글루코오스, 텍스트란, 가용성 전분, 자당 등이 있고, 무기 질소원 또는 유기 질소원으로서, 예를 들면, 암모늄염류, 질산염류, 아미노산, 콘 스틱 리커(corn steep liquor), 펩톤, 카제인, 고기 추출물, 콩 케이크, 감자 추출물 등이 언급될 수 있다. 필요에 따라, 다른 영양소[예를 들면, 무기 염류(예를 들면, 염화 칼슘, 인산 이수소나트륨, 염화 마그네슘), 비타민류, 향생 물질(예를 들면, 테트라사이클린, 네오마이신, 암피실린, 카나마이신 등) 등]를 포함할 수 있다.
- <119> 형질전환체의 배양은 자체 공지의 방법에 의해 수행된다. 배양 조건, 예를 들면, 온도, 배지의 pH 및 배양 시간은 적절하게 선택된다. 예를 들면, 숙주가 동물 세포인 경우, 배지로서는 약 5 ~ 20%의 우태아혈청을 포함하는 MEM 배지(Science, Vol. 122, p. 501, 1952), DMEM 배지(Virology, Vol. 8, p. 396, 1959), RPMI1640 배지(J. Am. Med. Assoc., Vol. 199, p.519, 1967), 199 배지(proc. Soc. Exp. Biol. Med., Vol. 73, p.1, 1950) 등을 이용할 수 있다. 배지의 pH는 약 6 ~ 8인 것이 바람직하고, 배양은 통상 약 30 ~ 40°C에서 약 15 ~ 72 시간 동안 수행되고, 필요하다면 환기 또는 교반을 실시할 수도 있다. 숙주가 곤충 세포인 경우, 배지로서는 예를 들면, 우태아혈청을 포함한 Grace's 배지(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p.8404, 1985) 등을 들 수 있고 그 pH는 약 5 ~ 8인 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 20 ~ 40°C에서 15 ~ 100 시간 동안

수행되고, 필요하다면 환기 또는 교반을 실시할 수도 있다. 숙주가 박테리아, 방선균, 효모 또는 사상균인 경우, 배지는 예를 들면, 상기 영양원을 함유하는 액체 배지가 적당하다. pH가 5 ~ 8인 것이 바람직하다. 숙주가 E. coli인 경우, 바람직한 배지로서 LB 배지, M9 배지(Miller et al., Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, p.431, 1972) 등이 예시된다. 이 경우, 배양은 필요에 따라, 환기 또는 교반하면서, 통상 14 ~ 43°C에서 약 3 ~ 24 시간 동안 실시할 수 있다. 숙주가 바실러스 속의 박테리아인 경우, 배양은 필요에 따라, 환기 또는 교반하면서, 통상 30 ~ 40°C에서 약 16 ~ 96 시간 동안 실시할 수 있다. 숙주가 효모인 경우, 배지로서 예를 들면, Burkholder's 최소 배지(Bastian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, p.4505, 1980)를 들 수 있고, pH는 5 ~ 8인 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 20 ~ 35°C에서 약 14 ~ 144 시간 동안 행해지고, 필요에 따라, 환기 또는 교반을 실시할 수 있다.

<120> 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 상술한 것과 같이 형질전환체를 배양하고, 상기 형질전환체로부터 회수하여, 바람직하게는 분리, 정제할 수 있다. 분리, 정제 방법으로서, 예를 들면, 염석, 용매 침전법 등의 용해도를 이용하는 방법, 투석, 한외 여과, 겔 여과 및 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 등의 분자량의 차이를 이용하는 방법, 이온 교환 크로마토그래피 및 하이드록실 아파타이트하드 크로마토그래피 등의 전하의 차이를 이용하는 방법, 친화성 크로마토그래피 등의 특이적 친화성을 이용하는 방법, 역상 고성능 액체 크로마토그래피 등의 소수성의 차이를 이용하는 방법, 등전 집중 등의 등전점의 차이를 이용하는 방법 등을 들 수 있다.

<121> 본 발명을 상기에서 전반적으로 기재하였지만, 이의 이해를 더욱 용이하게 위하여 참조되는 특정의 실시예를 하기에 제공한다. 그러나, 이들은 단지 예시적인 목적이며, 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

실시예

<122> 하기에 실시예를 나타낸다. 키트 등을 사용한 부분에서는 달리 언급이 없는 한, 첨부된 프로토콜에 따라 수행하였다.

<123> (1. 인간화 2K1 항체의 작제)

<124> 본 발명에서는 국제 공개 공보 W02003/027151에 기재된 마우스 유래의 항인간 오스테오펀틴 항체인 2K1 항체를 인간화한, 인간화 항인간 오스테오펀틴 항체(이하, 인간화 2K1 항체 또는 R2K1 항체라고도 칭함)를 2종류 작제하였다.

<125> 각각의 인간화 2K1 항체의 작제는 일반적으로 상기 공보에 기재된 방법에 따라 작제하였으므로, 하기에 개략적으로 기재하였다.

<126> 우선, 합성 올리고 DNA를 이용한 PCR에 의해, 도 1 및 도 2에 나타낸 염기 서열을 갖는 2종류의 인간화 항OPN 항체의 중쇄 가변 영역(VH)을 코딩하는 DNA와 도 3 및 도 4에 나타낸 염기 서열을 갖는 2종류의 인간화 항OPN 항체의 경쇄 가변 영역(VL)을 코딩하는 DNA를 작제하였다. 하기의 기술에 있어서, 그들을 구별하기 위하여, 도 1 및 도 2에 기재한 인간화 항인간 OPN 항체 VH를 각각, R2K1-VH1.7 및 R2K1-VH1.8로 칭한다. 유사하게, 도 3 및 도 4에 기재한 인간화 항인간 OPN 항체 VL을 각각, R2K1-VL1.7 및 R2K1-VL1.8로 칭한다.

<127> 이어서, 상기 인간화 항인간 OPN 항체 VH를 코딩하는 DNA의 각각을 제한 효소 HindIII 인식 부위 및 BamHI 인식 부위를 이용하여, 인간 면역글로블린 불변 영역 $\gamma 1$ 쇠의 유전자를 포함하는 발현 벡터인 AG- $\gamma 1$ 에 삽입함으로써, R2K1-VH1.7을 갖는 중쇄의 발현 플라스미드 및 R2K1-VH1.8을 갖는 중쇄의 발현 플라스미드를 작제하였다. 유사하게 상기 인간화 항인간 OPN 항체 VL을 코딩하는 DNA의 각각을, 인간 면역글로블린 불변 영역 κ 쇠의 유전자를 포함하는 발현 벡터인 AG- κ 에 삽입함으로써, R2K1-VL1.8을 갖는 경쇄의 발현 플라스미드 및 R2K1-VL1.7을 갖는 경쇄의 발현 플라스미드를 작제하였다. 이 발현 플라스미드를 대장균에 도입하고 증식시키고, 상업적으로 이용가능한 플라스미드 정제 키트(QIAGEN 사)에 의해 정제하였다.

<128> 마지막으로, 상기의 정제 발현 플라스미드의 다양한 배합물을 인산 칼슘법에 의해 CHO-DG44 세포로 트랜스펙션하고, 제네티신(Invitrogen 사) 및 투석된 FCS(Invitrogen 사)를 포함하는 MEM 배지(Invitrogen 사)에서 선별하여, 2종류의 인간화 2K1항체의 발현 세포를 수득하였다. 즉, R2K1-VH1.8을 갖는 중쇄와 R2K1-VL1.8을 갖는 경쇄로 구성되는 인간화 2K1항체인 R2K1v1.8 항체 및 R2K1-VH1.7을 갖는 중쇄와 R2K1-VL1.7을 갖는 경쇄로 구성되는 인간화 2K1항체인 R2K1v1.7 항체를 발현시켰다.

<129> 상기의 순서로 수득한 각각의 R2K1 항체의 생산 세포를 10% 투석된 FCS를 첨가한 MEM 배지에서 충분히 증식시켜, 롤러 병(BD Biosciences 사)에 파종하고, 37°C에서, 1 rpm의 회전 속도의 조건으로 배양하였다. 및

일 후, 세포가 용기 벽에 부착하여 증식하고 있는 것을 확인한 다음, 배양액을 버리고, 혈청-무함유 MEM 배지 500 mL로 교환하고, 상기 조건으로 세포의 배양을 실시하였다. 약 2주일 후, 많은 세포가 용기의 벽으로부터 박리되어 부유되는 시점에서 배양을 종료하고, 배양 상청액을 0.22 μm의 필터로 여과하고 회수하여, 각각의 R2K1 항체를 포함하는 배양 상청액을 수득하였다.

<130> 출발 물질로서 이들 배양 상청액과 함께 프로테인 A 컬럼(MILLIPORE 사) 및 양이온 교환 컬럼(Amersham 사)을 이용하여, 2종류의 정제 인간화 항체, 즉 R2K1v1.8 항체 및 R2K1v1.7 항체를 각각 수 mg 수득하였다.

<131> 하기에 기재한 각종의 실험에는 상기와 같이하여 수득한 정제 항체를 사용하였다. 또한, 키메라 2K1 항체(이하 C2K1 항체라고도 언급한다)는 전술한 국제 공개 공보 W02003/027151에 기재된 방법으로 수득된 것을 사용하였다.

<132> **(2. ELISA법에 의한 인간 오스테오폰틴 펩티드와의 결합성 확인)**

<133> 각각의 R2K1 항체 및 C2K1 항체의 인간 오스테오폰틴 펩티드(CVPTYDGRGDSVVYGLRS: 서열번호 13)에 대한 결합 활성을 Kon 등(Journal of Cellular Biology, 88:420-432 (2002))의 ELISA법을 참고로 하여 비교하였다. 하기에 개략적으로 기재한다.

<134> 상기의 서열을 갖는 펩티드(이하 hOPN5 펩티드라고도 언급함)를, Sulfo-EMCS(Dojindo Laboratories)를 사용하여 말레이미드기를 도입한 BSA와 반응시켜, hOPN5-BSA 접합체를 제조하였다. hOPN5-BSA 접합체를 200 ng/100 μL/웰로 ELISA 플레이트(Nunc 사) 상에 4°C에서 하룻밤 동안 고정화시키고, 플레이트를 세정한 후, 1% BSA가 첨가된 PBS로, 4°C에서 하룻밤 동안 차단을 실시하였다. 1% BSA가 첨가된 PBS로 희석한 항체 샘플을 상기 플레이트에 웰 당 100 μL 첨가하고, 이를 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 검출은 페록시다아제(HRP) 표지 항인간 IgG(H+L) 항체(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)를 이용하여 수행하였다. 파장 450 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices 사)를 사용하여 측정하였다.

<135> 그 결과, hOPN5 펩티드에 대한 R2K1v1.7 항체 및 R2K1v1.8 항체의 결합성은 C2K1 항체와 동등한 것으로 확인되었다(도 5).

<136> **(3. 인간 말초 혈액 단핵구 유주에 대한 R2K1 항체의 저해 활성)**

<137> 사이토카인 활성화 말초 혈액 단핵구 유주에 대한 정제된 항체의 저해 활성을 하기와 같이 조사하였다.

<138> 우선, 정상인으로부터 채혈한 헤파린 혈액을 RPMI1640 배지로 2배 희석하였다. 희석된 혈액을 피콜-파큐(Ficoll-Paque; Pharmacia K.K.) 상에 중층하고, 400 X g으로 실온에서 30분 동안 원심분리하였다. 혈액과 피콜-파큐의 경계로 보이는 흰 층을 회수하고 단핵구로서 사용하였다. 이와 같이 하여 수득한 단핵구를 인간 TNF-α (20 ng/mL)로 하룻밤 동안 배양하고, 활성화시킨 것을 유주 실험에 사용하였다.

<139> 유주 실험을 48-웰 마이크로케모타시스 챔버(microchemotaxis chamber)(Neuro Probe Inc. 제)를 사용하여 실시하였다. 인간 OPN을 37°C에서 2 시간 동안의 소 트롬빈(Sigma)에 의한 작용으로 절단시켰다. 각각의 R2K1 항체 및 C2K1 항체를 다양한 농도로 첨가하고, 혼합물을 37°C에서 15분간 방치한 후, 하부 챔버(Lower chamber)에 첨가하였다(인간 OPN 최종농도는 10 μg/mL). 그 위에 폴리카보네이트 필터(구멍 직경 5 μm)를 넣고, 상부 챔버(Upper chamber)에 50 μL의 세포 현탁액(2×10⁶ 세포/mL)을 첨가하였다.

<140> 37°C, 5% CO₂ 존재 하에서 2 시간 동안 배양한 후, 폴리카보네이트 필터를 제거하고, 필터 상층 표면의 세포를 제거한 후, 세포를 Diff-Quick(Baxter 사)으로 염색하였다. 필터 상층 표면의 세포 수를 40배의 배율 하에서 계측하고, 결과를 6웰의 평균 세포수(cells/mm³)±SD로 나타내었다(표 1). 이의 결과로부터 R2K1v1.7 항체 및 R2K1v1.8 항체 모두는 C2K1 항체와 유사한 양상으로 TNF-α 활성화 인간 말초 혈액 단핵구의 트롬빈 절단형 인간 오스테오폰틴에 대한 유주를 저해하는 것으로 나타났다.

<141> 표 1.

<142> R2K1v1.7 및 R2K1v1.8

<143>

	평균 세포수	SEM
배지	701.7	24.8
Thr-OPN	881.7	24.0

R2K1v1.7 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	723.3	43.0
R2K1v1.8 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	688.3	16.6

C2K1

	평균 세포수	SEM
배지	686.7	15.9
Thr-OPN	860.0	30.7
C2K1 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	671.7	48.5

(4. ELISA에 의한 열안정성의 평가)

C2K1 항체 및 2종류의 항체를 PBS로 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하고, 2 시간 동안 70°C의 수조에서 처리하였다. 그 후 각각의 희석액을 실온으로 되돌리고, 상술한 ELISA에 의해 취득된 흡광도 대 미처리 샘플의 흡광도의 비율을 잔존 활성으로서 그래프에 나타내었다. 잔존 활성을 직선성을 갖는 0.2 내지 2.0의 범위에 있는 흡광도의 값을 이용하여 산출하였다(하기는 동일하게 적용). 그 결과, 상기 처리 후의 잔존 활성은 C2K1 항체보다 R2K1v1.7 항체 및 R2K1v1.8 항체가 더 높은 것으로 발견되었다(도 6). 특히, R2K1v1.7 항체는 90%를 넘는 잔존 활성을 나타내었다. 이는 R2K1v1.7 항체 및 R2K1v1.8 항체가 C2K 항체와 비교하여 열안정성이 개선되었음을 증명한다.

(5. ELISA에 의한 저-pH 내성의 평가)

C2K1 항체 및 2종류의 항체의 정제 형태를 PBS로 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하였다. 각각의 희석액을 pH 미터(HORIBA 사)를 이용해 1 N HCl로 pH 5로 조정하고, 25°C에서 2 시간 동안 처리하였다. 그 후, 희석액을 1 M 트리스-HCl(pH 9.5)로 pH 7로 조정하고, 상술한 ELISA에 의해 취득된 흡광도 대 미처리 샘플의 흡광도의 비율을 잔존 활성으로서 그래프에 나타내었다. 그 결과, 상기 처리 후의 잔존 활성은 C2K1 항체 및 R2K1v1.8 항체보다 R2K1v1.7 항체가 유의하게 더 높은 것으로 발견되었다(도 7). 이는 R2K1v1.7 항체가 R2K1v1.8 항체 및 C2K 항체와 비교하여 저-pH에 대한 내성이 개선되었음을 증명한다.

(6. 형광 스펙트럼 측정에 의한 구아니딘 염산 내성의 평가)

C2K1 항체 및 2종류의 R2K1 항체를 각각 다양한 농도의 구아니딘 염산을 포함하는 20 mM 인산 나트륨 버퍼 + 120 mM NaCl(pH 7)로 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 조정(대조군은 구아니딘 염산 미첨가)하고, 10°C에서 하룻밤 동안 정지 한 후, 각 샘플의 형광 스펙트럼을 측정하였다. 형광 스펙트럼의 측정은 FP-6500 Spectrofluorometer(JASCO 사)를 이용해 수행하였다. 3 mm의 광경로 길이를 갖는 셀을 이용하여, 280 nm의 여기 빛에 의해 트립토판이 방사하는 형광을 320 nm 내지 370 nm의 파장 범위에서 스캔하였다. 구아니딘 염산 농도와 피크 파장의 관계를 항체 사이에서 비교하였다. 그 결과, C2K1에서는 구아니딘 염산 농도가 1 M을 넘은 시점으로부터, R2K1v1.8에서는 2 M을 넘은 시점으로부터, 단백질의 입체 구조가 느슨해짐으로서 나타나는 피크 파장의 쉬프트가 관찰된 반면, R2K1v1.7에서는 3.8 M까지 피크 파장이 쉬프트하지 않았다(도 8). 이는 R2K1v1.7 항체가 R2K1v1.8 항체 및 C2K 항체와 비교하여 구아니딘 염산에 대한 내성이 개선되었음을 증명한다.

(7. CD에 의한 저-pH의 평가)

각각의 C2K1 항체 및 R2K1v1.7 항체를 20 mM 구연산 버퍼 + 120 mM NaCl(pH 6)로 2 mg/mL로 조정하였다. 여기에, 0.1 N HCl 및 증류수를 첨가하여 1 mg/mL의 항체 농도를 갖는 다양한 pH의 샘플을 제조하였다. 이를 실온으로 1 시간 동안 처리한 후, 각각의 샘플의 CD 스펙트럼을 측정하였다.

CD(원편광 이색성)의 측정을 J-820 Spectropolarimeter(JASCO 사)를 이용해 수행하였다. 광경로 길이 0.1 mm의 셀을 이용해, 205 nm 내지 260 nm의 범위의 파장을 통하여 CD 스펙트럼을 측정하였다. 스펙트럼의 분석은 Yang 등의 CD 스펙트럼의 분석법(Methods in Enzymology, 130,208-269 (1986))에 근거한 JWSSE-480형 단백질 2차 구조 분석 프로그램(JASCO 사)을 사용하였다. 이 방법으로 산출된 랜덤 구조의 함유율과 처리 pH의 관계를 항체 사이에서 비교하였다. 그 결과, C2K1 항체에서는 pH 3으로부터 랜덤 구조의 함유율이 상승한 반면, R2K1v1.7에서는 pH 2.7까지 랜덤 구조의 상승은 관찰할 수 없었다(도 9). 이로써 R2K1v1.7 항체는 C2K 항체와 비교하여 pH 레벨 저하에 대한 내성을 가지는 것으로 확인되었다.

(8. 시차 주사 열량계에 의한 열안정성의 평가)

C2K1 항체 및 R2K1v1.7 항체를 각각 20 mM 구연산 버퍼 + 120 mM NaCl(pH 6.0) 버퍼에 1 mg/mL의 농도로 용해시키고, 마이크로칼 사의 초고감도 시차 주사 열량계(VP 모세관 DSC 플랫폼)를 사용하여 이의 열안정성을 조사하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다. 고차 구조의 변성 온도를 나타내는 전이 온도 중점(Tm)은, C2K1 항체에서는 76.0°C인데 반해, R2K1v1.7 항체에서는 82.8°C로서 약 6°C의 상승이 확인되었다. 이로써 R2K1v1.7 항체는 열안정성이 현저하게 개선되었음을 확인하였다.

(9. OPN에 대한 R2K1v1.7의 세포 부착 저해 효과)

본 발명의 R2K1v1.7 및 공지인 인간화 항OPN 항체(W003/027151 참조, 이하, R2K1v0라고 칭함)와의 약리 효과를 비교하기 위하여, 인간 OPN에 대한 이들 2개의 항체의 세포 부착 저해 효과를 조사하였다.

1. 세포의 배양 및 계대

Jurkat E6.1 세포를 다이니혼 제약(주)에서 구입하고, RPMI1640(10% FCS, 페니실린-스트렙토마이신)를 이용해 계대 및 배양을 실시하였다.

2. 시약 제조

접착 버퍼(L-15 배지, 1% BSA, 50 mM HEPES, pH 7.4)

PMA 용액(접착 버퍼 중 40 ng/mL PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate) [SIGMA])

CV 염색액(0.5% 크리스탈 바이올렛, 1% 포르미아미드, 20% 메탄올)

GST 용액(PBS(-) 중 5 µg/mL 글루타티온 S 트랜스퍼라아제(GST) [SIGMA])

인간 IgG₁ 용액(PBS(-) 중 400 µg/mL) [CALBIOCHEM]

3. 트롬빈 절단형 인간 N 말단 오스테오폰틴(OPN)의 제조

GST 융합 트롬빈 절단형 인간 N 말단 OPN(GST 인간 N-OPN, 1.6 mg/mL)을 W002/081522에 기재된 바와 같이 제조하고, PBS(-)를 사용하여 5 µg/mL로 희석한 후, 실험에 사용하였다.

4. 검사 약물의 제조

R2K1v1.7(18.6 mg/mL) 및 R2K1v0(4.39 mg/mL)을 각각 PBS(-)를 사용하여 4, 12, 40, 120 및 400(µg/mL)으로 희석하고, 이들 모두에 총 단백질의 농도가 400 µg/mL이 되도록 인간 IgG₁을 첨가하였다.

5. 균 구성

블랭크균(GST)

대조균

검사 약물균 R2K1v1.7(1, 3, 10, 30, 100 µg/mL)

R2K1v0(1, 3, 10, 30, 100 µg/mL)

6. 세포 부착 실험

96-웰 마이크로플레이트의 블랭크를 제외한 모든 웰에 GST 인간 N-OPN 용액 25 µL를 첨가하거나, 블랭크균에 대해서는 GST 용액 25 µL를 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, PBS(-)로 2회 세정하였다. PMA 용액 50 µL를 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 검사 약물 용액(검사 약물균) 또는 인간 IgG₁ 용액(블랭크균 및 대조균)을 첨가하였다. Jurkat E6.1 세포를 2 x 10⁶ 세포/mL이 되도록 접착 버퍼에 현탁시키고, 모든 웰에 25 µL를 첨가하였다. 현탁액을 15 X g로 1분 동안 원심분리하여 세포를 플레이트의 바닥에 침전시킨 후, 플레이트를 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 반응 종료 후, 플레이트를 거꾸로하고, 47 X g로 2분 동안 원심분리하여 상청액(비접착 세포)을 제거하였다. 접착 세포 수의 정량

을 위하여, CV 염색액 25 μ L를 첨가하고, 플레이트를 10분 동안 실온에 방치하여 세포를 염색 및 고정한 후, 플레이트를 순수한 물로 3회 세정하고, 모든 웰에 1% 트리톤-X100 용액 25 μ L를 첨가하고, 세포가 가용화된 것을 확인한 후, 마이크로 플레이트 리더(SPECTRAMax250, Molecular Devices)를 사용하여 흡광도(측정 파장 595 nm)를 측정하였다.

<181> 7. 분석

<182> 실험은 군 당 5웰을 사용하였다. 각 군의 흡광도의 평균값 및 억제율을 산출하고, IC50값(억제율이 50%가 되는 검사 약물 농도)을 산출하였다. 억제율은 블랭크군을 100%, 대조군을 0%로 정의하였다. IC50값은, X축 상에서는 대수로 검사 약물 농도를, Y축 상에서는 억제율을 플롯하고, 최소 이승법에 의해 직선 회귀의 식에 데이터를 적용시켜 산출하였다. IC50값의 산출은 용량 반응에 직선성을 나타내는 검사 약물 농도에서 수득한 데이터를 사용하였다.

<183> 도 11에 나타난 결과로부터, 공지의 인간화 항인간 OPN 항체의 세포 부착 저해 효과는 지극히 낮은데 반해, R2K1v1.71은 우수한 세포 부착 저해 효과(IC50값: 6.4)를 갖는 것이 이해될 것이다.

<184> (10. 시아노물구스 원숭이에서 콜라겐-유도 관절염에 대한 R2K1v1.7의 효과)

<185> 프로인트 완전 애쥬먼트(Becton Dickinson and Company)로 에멀전화한 소 타입 II 콜라겐(Collagen Gijyutsu Kenshukai)을 투약 36일 전에 암컷 시아노물구스 원숭이의 등 및 꼬리 부분에 면역화하고, 투약 15일 전에 부스트하였다. 동물을 면역 전 레벨과 비교한 체중 및 근위지관절 타원 면적의 변화율에 근거하여, 무작위로 3개의 투약 처치군(n=10)으로 나누었다. 25 mg/kg 또는 50 mg/kg 용량의 R2K1v1.7 또는 용매 대조군에 1주 동안 1회, 총 8회, 정맥내 주입에 의해 투여하였다. 최초의 투약일을 0일로 규정하였다. 투여 기간 중의 0, 6, 13, 20, 27, 34, 41, 48 및 55 일째에, 관절 부종의 징조로서 근위지관절 타원 면적을 모니터링하였다. 전후지 근위지관절을 노기스를 이용해 짧은 축 및 타원에 있어 가장 긴 직경을 측정하여 타원 면적을 산출하고, 16 손가락의 타원 면적의 평균값은 근위지관절 타원 면적으로 사용하였다. 근위지관절 타원 면적의 변화율을 투약전의 값을 100으로서 산출하였다. 0 일째 및 6, 13, 20, 27, 34, 41, 48 및 55 일째(투약 6일 후)에, 혈장을 채취하고, R2K1v1.7 및 항R2K1v1.7 항체를 측정하였다. 이 측정한 R2K1v1.7의 혈장중 농도가 최저 레벨에 대응하였다. 데이터 분석은 항R2K1v1.7 항체 양성 동물 및 시험 기간 중에 사망한 동물의 데이터를 삭제하여 수행하였다.

<186> 25 mg/kg 용량 R2K1v1.7군의 1마리의 동물 및 50 mg/kg 용량 R2K1v1.7군의 4마리의 동물에서 항R2K1v1.7 항체가 생성되었다. 용매 대조군의 2마리의 동물, 25 mg/kg 용량 R2K1v1.7군의 2마리의 동물 및 50 mg/kg 용량 R2K1v1.7군의 1마리의 동물이 투약 후에 사망하였다. 사망의 경우는 고도의 염증에 기인한 쇠약사인 것으로 추측되었다. 50 mg/kg의 R2K1v1.7에서의 처리는 대조 용매군과 비교하여 27일째 ~ 55일째 사이에 근위지관절 타원 면적의 변화율로 측정한 발 부종을 유의하게 감소시켰다(도 12). 25 mg/kg 용량의 R2K1v1.71은 근위지관절 타원 면적의 변화에 대해서 유의한 효과를 나타내지 않았다. 25 mg/kg 용량 및 50 mg/kg 용량에서, 혈장의 R2K1v1.7 최저 농도는 각각 38.41 ~ 76.13 μ g/mL 및 73.91 ~ 125.3 μ g/mL이었다. 인간 OPN의 SVVYGLR 서열은 원숭이 OPN의 상응 서열(SVAYGLR)(서열번호 11)과는 달리, 이 인간 OPN펩티드에 대한 R2K1v1.7의 결합 친화성은 상응하는 원숭이 OPN 펩티드에 대한 결합 친화성보다 100배 이상 높다. 이러한 점을 고려하면, 관절염 치료에 있어서의 R2K1v1.7의 유효한 혈장 농도는 100 μ g/mL이하로 추정된다.

<187> (11. R2K1v1.7의 scFv의 작제)

<188> R2K1-VH1.7을 갖는 상술한 증쇄 발현 플라스미드 및 R2K1-VL1.7을 갖는 경쇄 발현 플라스미드를 주형으로 한 PCR에 의해, VH1.7 링커 VL1.7(링커는 GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 14)로 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이다)의 구조를 갖는 단일 가닥 가변 영역 단편(scFv)을 코딩하는 DNA 단편을 작제하였다. 이 DNA 단편의 말단에는 제한 효소 SfiI 및 NotI의 인식 서열이 부가되어 있다. 이 DNA 단편을 제한 효소 SfiI 및 NotI로 제한하고, 동일한 SfiI 및 NotI로 제한한 pCANTAB5E 벡터(Marks, J.D., et. al, J. Mol. Biol., vol.222, p581-97, 1991)의 SfiI 부위 및 NotI 부위에 삽입함으로써, R2K1-VH1.7 S cFv의 발현 플라스미드를 작제하였다. 또한 이 발현 플라스미드에는 scFv의 코딩 영역의 하류에 E-Tag를 코딩하는 염기 서열이 부가되어 있다. 이 플라스미드를 통상의 방법에 따라 대장균 HB2151주에 도입하고, SOBAG 한천 플레이트(2% 글루코오스 및 100 μ g/mL의 암피실린을 함유한 SOB 플레이트)에 파종하여 형질전환 클론을 수득하였다. 수득한 클론으로부터 플라스미드 DNA를 추출하고, 이를 주형으로 한 DNA 염기 서열 분석에 의해 scFv를 코딩하는 영역의 서열을 확인하였다. DNA 염기 서열 분석에는 DTCS-Quick Start Kit 및 CEQ2000XL DNA Analysis System(둘 모두 Beckman Coulter,

K.K.)을 사용하였다. 수득한 염기 서열을 서열번호 9에 나타내었다.

<189> 염기 서열을 확인한 대장균 클론을 2% 글루코오스 및 100 µg/mL의 암피실린을 포함한 2 x YT 배지에서 배양한 후, 그 일부를 1 mM의 IPTG 및 100 µg/mL의 암피실린이 보충된 2 x YT 배지에 현탁시키고, 하룻밤 더 배양하여 scFv의 발현을 유도하였다. 배양 종료 후, 세포를 원심분리로 회수하고, 1 mM의 EDTA를 포함한 PBS 중에 현탁시키고, 아이스에서 30분 동안 방치하였다. 이어서, 10,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하고, 상청액을 회수하고 0.45 µm의 필터를 통하여 여과하여, scFv를 포함하는 주변세포질 분획을 수득하였다. 이 주변세포질 분획으로부터, 항E-Tag 항체를 이용한 친화성 크로마토그래피에 의해 R2k1v1.7의 scFv(이하 R2K1v1.7-scFv라고 기재한다)를 정제하였다.

<190> 이와 같이 하여 제조된 R2K1v1.7-scFv를 겔 여과 크로마토그래피에 적용시킨 결과, 도 13에 나타낸 분리 패턴으로부터 거의 모두가 모노머인 것으로 확인되었다.

<191>

<192> **(12. 인간 오스테오폰틴 펩티드에 대한 R2K1v1.7-scFv의 결합성 확인)**

<193> hOPN5 펩티드에 대한 정제한 R2K1v1.7-scFv의 결합 활성을 ELISA로 측정하였다. 방법은 일반적으로 진술한 것과 같다. 이 측정에서, 표지 항체로서 HRP 표지항E-Tag 항체를 사용하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다. 정제한 R2K1v1.7-scFv는 음성 대조의 BSA에 대해서는 결합하지 않고, hOPN5 펩티드에 대해서 특이적으로 결합하는 것이 확인되었다.

<194> **(13. 폴리에틸렌 글리콜 변형 항체 단편의 제조)**

<195> R2K1v1.7 항체를 표준 방법에 의해 펩신화한 후, Protein G HP 컬럼(둘 모두 Amersham Biosciences K.K.) 및 Hi prep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution 컬럼(Amersham Biosciences K.K.)을 이용하여 정제한 F(ab')₂를 수득하였다. 이어서, 정제한 F(ab')₂를 0.1 M의 DTT로 환원시켜 티올기를 활성화시킨 후, Sephadex G-25 컬럼(Amersham Biosciences K.K.)을 이용한 겔 여과를 수행하여 DTT를 제거하였다. 이렇게 하여 수득한 Fab'를 말레이미드화 폴리에틸렌 글리콜 SUNBRIGHT ME-120MA(일본 유지)와 물비 1:10으로 혼합하고, 4℃에서 하룻밤 정지하여 커플링 반응을 시켰다. 요오드아세트미드(Nacalai Tesque)를 첨가하여 커플링 반응을 정지시킨 후, Hi prep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution 컬럼을 이용한 겔 여과에 의해 폴리에틸렌 글리콜 변형 F(ab')₂(이하 F(ab')₂-PEG라고 기재하는 일이 있다)를 수득하였다. SDS-PAGE의 결과를 도 15에 나타내었다. 비교 대조로서 전기영동된 비변형의 F(ab')₂와의 비교에 의해, 폴리에틸렌 글리콜 변형에 의한 분자량의 증가가 확인되었다.

<196> **(14. 오스테오폰틴 펩티드에 대한 F(ab')₂-PEG의 결합 활성 확인)**

<197> hOPN5 펩티드에 대한 정제한 R2K1v1.7의 F(ab')₂-PEG의 결합 활성을 표면 플라즈몬 공명 측정법을 이용해 확인하였다. 비오틴화 hOPN5 펩티드를 Sensor Chip SA(BIAcore 사)에 고정하고, HBS-EP 버퍼(BIAcore 사)를 사용하여 5 µg/mL로 희석한 F(ab')₂-PEG를 이용해 결합 활성을 확인한 결과를 도 16에 나타내었다. 시그날의 상승으로부터 이 F(ab')₂-PEG는 hOPN5 펩티드에 대한 결합 활성이 R2K1v1.7이 갖는 결합 활성과 동일한 것으로 확인되었다.

산업상 이용 가능성

<198> 본 발명의 인간화 항인간 오스테오폰틴 항체는 활성(항원 결합 활성, 백혈구 유주 저해 활성 등) 및/또는 안정성(열, 저산성 조건, 변성제에 대한 내성 등)이 우수하므로, 자가면역 질환, 류머티즘, 류머티스성 관절염, 골관절염을 포함하는, 여러 가지의 염증성 질환의 예방 또는 치료에 있어서, 종래의 항인간 오스테오폰틴 항체보다 한층 더 유효한 약제로서 유용하다.

<199> 본 발명을 바람직한 구체예로서 강조해 설명하였지만, 바람직한 구체예가 변경될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다. 본 발명은, 본 명세서에 상세하게 기재된 이외 방법으로 실시될 수 있는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 하기의 「청구의 범위」의 정신 및 범위에 포함되는 모든 변경을 포함한다.

<200> 본 출원은 일본에서 출원된 특원 번호 2006-152892를 기초로 하고 있고, 여기에 개시되어 있는 내용은 본 명세서에 모두 포함된다. 또한, 본원에서 진술된 특허 및 특허 출원 명세서를 포함한 모든 간행물에 기재된 내용은

본원에 인용된 것으로 그 모두가 명시된 것과 동일하게 본 명세서에 포함된다.

<201>

도면의 간단한 설명

- <54> 도 1은 벡터에 도입된 R2K1-VH1.7 코딩 영역을 포함하는 DNA의 염기 서열(상단: 서열번호 15)과 아미노산 서열(하단: 서열번호 16)을 나타낸 도(밑줄친 부분은 분비 발현을 위한 리더 서열)이다.
- <55> 도 2는 벡터에 도입된 R2K1-VH1.8 코딩 영역을 포함하는 DNA의 염기 서열(상단: 서열번호 17)과 아미노산 서열(하단: 서열번호 18)을 나타낸 도(밑줄친 부분은 분비 발현을 위한 리더 서열)이다.
- <56> 도 3은 벡터에 도입된 R2K1-VL1.7 코딩 영역을 포함하는 DNA의 염기 서열(상단: 서열번호 19)과 아미노산 서열(하단: 서열번호 20)을 나타낸 도(밑줄친 부분은 분비 발현을 위한 리더 서열)이다.
- <57> 도 4는 벡터에 도입된 R2K1-VL1.8 코딩 영역을 포함하는 DNA의 염기 서열(상단: 서열번호 21)과 아미노산 서열(하단: 서열번호 22)을 나타낸 도(밑줄친 부분은 분비 발현을 위한 리더 서열)이다.
- <58> 도 5는 hOPN5 펩티드에 대한 키메라 2K1 항체 및 인간화 2K1 항체의 결합성을 ELISA로 조사한 결과를 나타낸 도이다.
- <59> 도 6은 70℃로 hOPN5 펩티드에 대한 가열 처리한 키메라 2K1 항체 및 인간화 2K1 항체의 결합성을 ELISA로 조사한 결과를 나타낸 도이다. 가열 처리하지 않은 경우의 결합성을 100%로 했을 경우의 비율을 나타내었다.
- <60> 도 7은 hOPN5 펩티드에 대한 pH 5의 버퍼로 처리한 키메라 2K1 항체 및 인간화 2K1 항체의 결합성을 ELISA로 조사한 결과를 나타낸 도이다. pH 5의 버퍼로 처리하지 않은 경우의 결합성을 100%로 했을 경우의 비율을 나타내었다.
- <61> 도 8은 다양한 농도의 구아니딘 염산을 함유하는 버퍼로 처리한 키메라 2K1 항체 및 인간화 2K1 항체의 형광 스펙트럼에 있어서의 피크 파장을 플로트한 결과를 나타낸 도이다.
- <62> 도 9는 각각의 pH의 버퍼로 처리한 키메라 2K1 항체 및 인간화 2K1 항체에 있어서의 랜덤 구조의 함량을 CD로 측정된 결과를 나타낸 도이다.
- <63> 도 10은 키메라 2K1 항체 및 인간화 2K1 항체의 열안정성을 초고감도 시차주사 열량계로 조사한 결과를 나타낸 도이다. 파선 화살표와 실선 화살표는 각각, 키메라 2K1 항체와 R2K1v1.7 항체의 T_m를 나타낸 도이다.
- <64> 도 11은 R2K1v1.7 및 R2K1v0에 의한 인간 OPN에 대한 세포 부착 저해 효과를 나타낸 도이다.
- <65> 도 12는 원숭이 콜라겐-유도 관절염에 있어서의 관절 부종에 대한 R2K1v1.7의 효과를 나타낸 도이다. 데이터는 대조군, 25 mg/kg군 및 50 mg/kg군에서 각각, 8마리, 7마리 및 5마리의 평균 ± SE로서 나타내었다. *p<0.05, **p<0.01: Dunnet형 다중 비교 검정에 의해 대조군과는 유의하게 상이하다.
- <66> 도 13은 정제된 R2K1v1.7-scFv의 HPLC에 의한 분석 결과를 나타낸 도이다.
- <67> 도 14는 hOPN5 펩티드에 대한 정제된 R2K1v1.7-scFv의 결합성을 ELISA로 조사한 결과를 나타낸 도이다.
- <68> 도 15는 완전 분자형 R2K1v1.7 항체, R2K1v1.7 항체의 F(ab')₂ 및 정제된 F(ab')₂-PEG의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 도이다.
- <69> 도 16은 hOPN5 펩티드에 대한 R2K1v1.7의 F(ab')₂-PEG의 결합성을 BIAcore에 의해 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도면

도면1

```

      10      20      30      40      50      60
CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCCTCTGTCAGTAAC
HindIII      M E W S W I F L F L L S V T

      70      80      90      100     110     120
TGCAGGTGTCCAATCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG
A G V Q S Q V Q L Q Q S G A E V K K P G

      130     140     150     160     170     180
GGCCTCCGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTTGGGGTATACCTTCACTGACTATGAAATGCA
A S V K V S C K A L G Y T F T D Y E M H

      190     200     210     220     230     240
CTGGGTGAAGCAGACCCCTGTACATGGGCTTGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAG
W V K Q T P V H G L E W I G A I H P G R

      250     260     270     280     290     300
AGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGCTGACCGCGGACAAATC
G G T A Y N Q K F K G K A T L T A D K S

      310     320     330     340     350     360
CACTAGTACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACACGGCCGTGTATTA
T S T A Y M E L S S L T S E D T A V Y Y

      370     380     390     400     410     420
CTGTACAAGAATTACTGGGTACTTCGATGTCTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
C T R I T G Y F D V W G Q G T T V T V S

      430     440
CTCAGGTGAGTGGATCCGCGA
S      BamHI
    
```

도면2

10 20 30 40 50 60
 CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGATCTTTCTTCTCCTCCTGTGAGTAAC
 HindIII M E W S W I F L F L L S V T

 70 80 90 100 110 120
TGCAGGTGTCCAATCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGG
 A G V Q S Q V Q L V Q S G A E L V R P G

 130 140 150 160 170 180
 GTCCTCCGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACTGACTATGAAATGCA
 S S V K V S C K A S G Y T F T D Y E M H

 190 200 210 220 230 240
 CTGGGTGAAGCAGACCCCTGTACATGGGCTTGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAG
 W V K Q T P V H G L E W I G A I H P G R

 250 260 270 280 290 300
 AGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGCTGACCGCGGACAAATC
 G G T A Y N Q K F K G K A T L T A D K S

 310 320 330 340 350 360
 CACTAGTACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACACGGCCGTGTATTA
 T S T A Y M E L S S L T S E D T A V Y Y

 370 380 390 400 410 420
 CTGTACAAGAATTACTGGGTACTTCGATGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 C T R I T G Y F D V W G Q G T T V T V S

 430 440 450
 CTCAGGTGAGTGGATCCGCGA
 S BamHI

도면3

10 20 30 40 50 60
CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGAT
 HindIII M K L P V R L L V L M F W I

70 80 90 100 110 120
TCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGAGCGTCACCCT
 P A S S S D V V M T Q S P L S L S V T L

130 140 150 160 170 180
TGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGAGCTCTCAAAGCATTGTACATAGTAATGGAAA
 G Q P A S I S C R S S Q S I V H S N G N

190 200 210 220 230 240
CACCTATTGGAAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAA
 T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K

250 260 270 280 290 300
AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTGAGGCACTGA
 V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D

310 320 330 340 350 360
TTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTTGAAGCTGAAGACGTCGGAGTTTATTACTGCTTTCA
 F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q

370 380 390 400 410 420
AGGTTACATGTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTA
 G S H V P L T F G Q G T K L E I K R

430 440 450
GAATTTAACTTTGCTTCCTCAGTTGGATCCGCGA
 BamHI

도면4

```

      10      20      30      40      50      60
CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGAT
      HindIII      M K L P V R L L V L M F W I

      70      80      90      100     110     120
TCCTGCCTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCT
      P A S S S D V V M T Q S P L S L P V T L

      130     140     150     160     170     180
TGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGAGCTCTCAAAGCATTGTACATAGTAATGGAAA
      G Q P A S I S C R S S Q S I V H S N G N

      190     200     210     220     230     240
CACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAA
      T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K

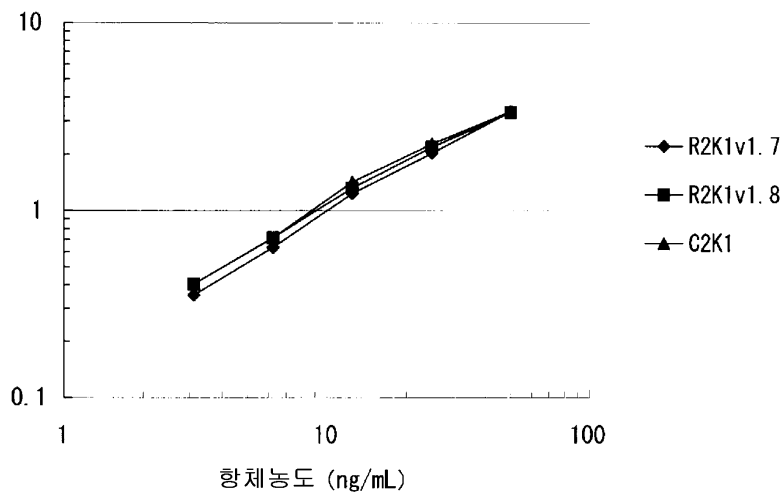
      250     260     270     280     290     300
AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTGAGGCACTGA
      V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D

      310     320     330     340     350     360
TTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTTGAAGCTGAAGACGTCGGAGTTTATTACTGCTTTCA
      F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q

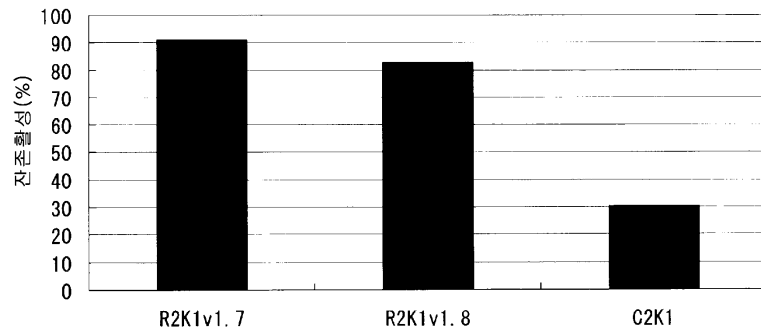
      370     380     390     400     410     420
AGGTTTCACATGTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTA
      G S H V P L T F G Q G T K L E I K R

      430     440     450
GAATTTAAACTTTGCTTCCTCAGTTGGATCCGCGA
      BamHI
    
```

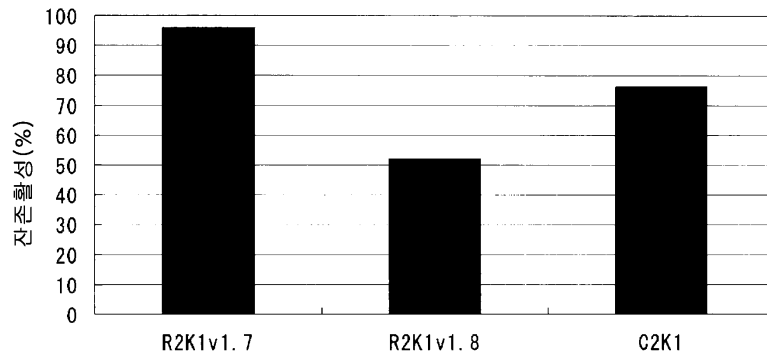
도면5



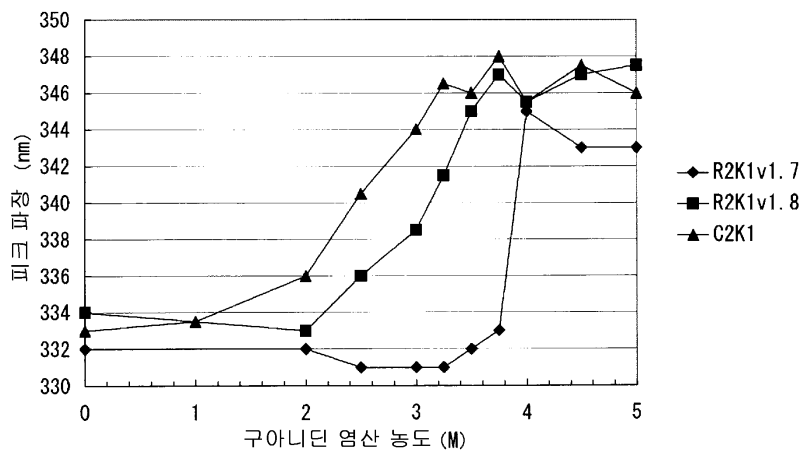
도면6



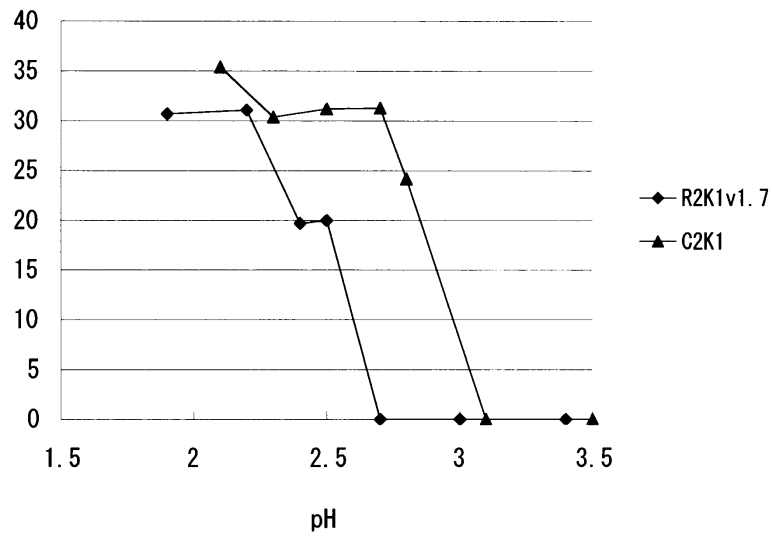
도면7



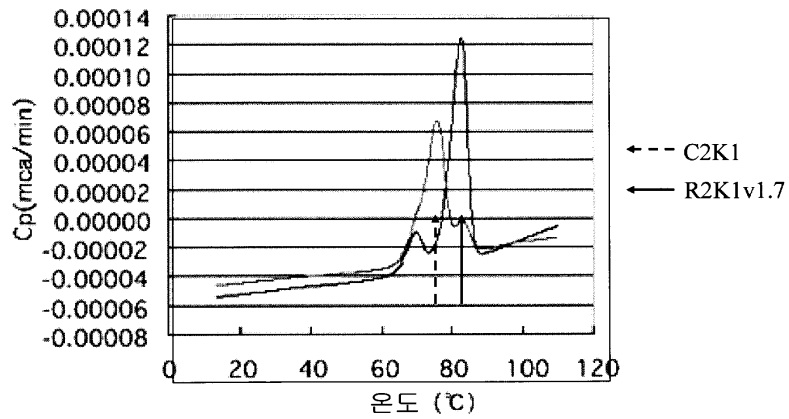
도면8



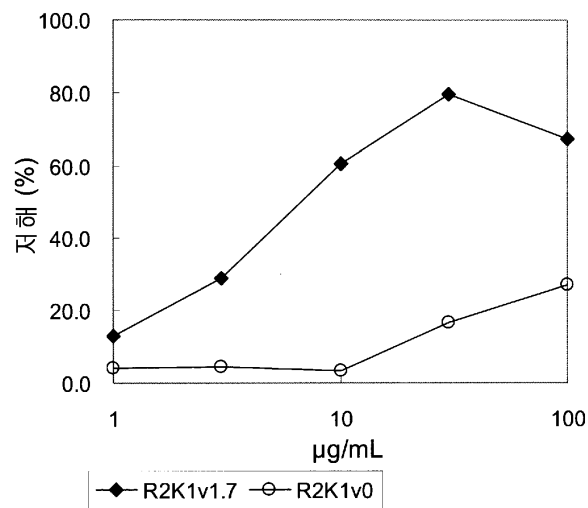
도면9



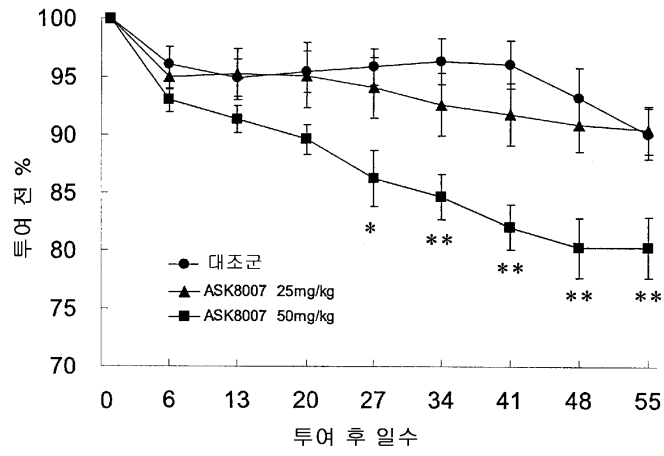
도면10



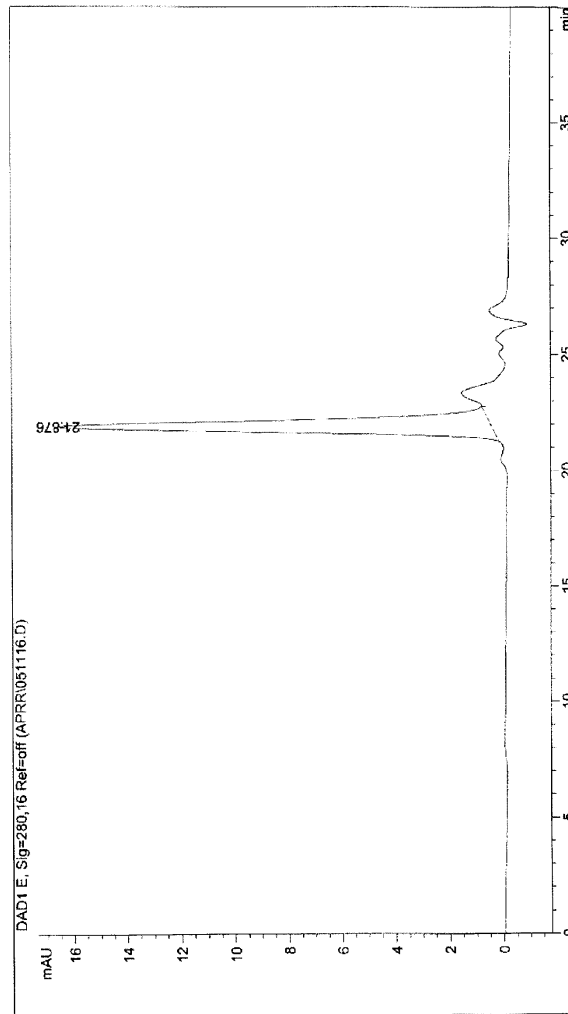
도면11



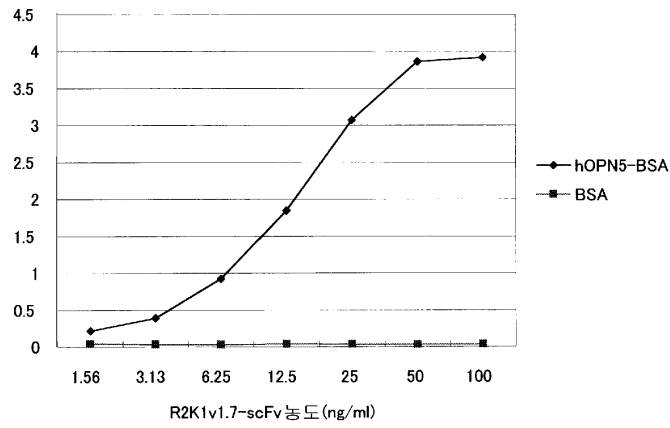
도면12



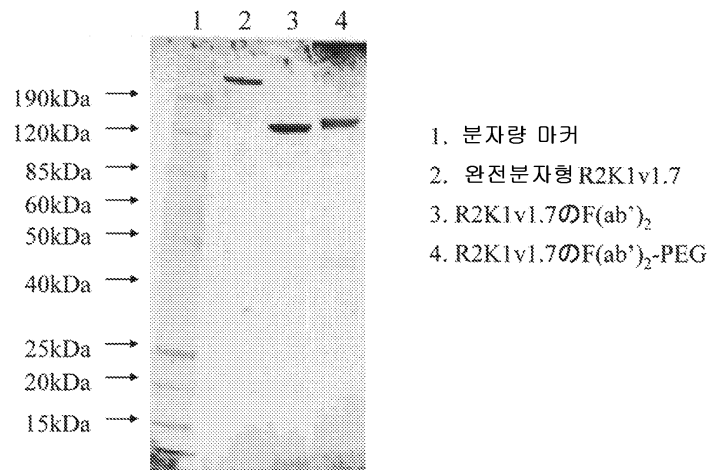
도면13



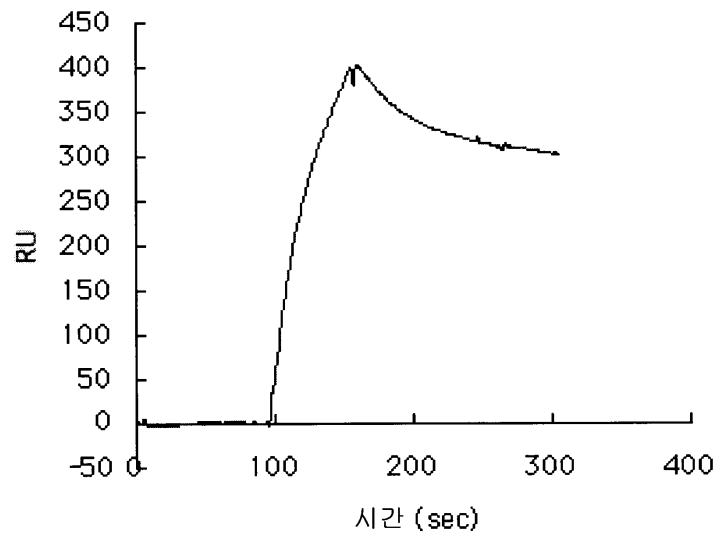
도면14



도면15



도면16



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Astellas Pharma Inc.
Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

<120> HUMANIZED ANTI-HUMAN OSTEOPONTIN ANTIBODY

<130> 091084

<150> JP 2006-152892

<151> 2006-05-31

<160> 27

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 113

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 3
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 4
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 5
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> R2K1-VH1.7 region

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 5
 cag gtg cag ctg cag cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct ttg ggg tat acc ttc act gac tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

gaa atg cac tgg gtg aag cag acc cct gta cat ggg ctt gag tgg att 144

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga gct att cat cca gga aga ggt ggt act gcc tac aat cag aag ttc 192
 Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg gac aaa tcc act agt aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

aca aga att act ggg tac ttc gat gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc 336
 Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

acc gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> R2K1-VH1.8 region

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 6
 cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag ctg gtg agg cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
 1 5 10 15

tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc act gac tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

gaa atg cac tgg gtg aag cag acc cct gta cat ggg ctt gag tgg att 144

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga gct att cat cca gga aga ggt ggt act gcc tac aat cag aag ttc 192
 Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg gac aaa tcc act agt aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

aca aga att act ggg tac ttc gat gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc 336
 Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

acc gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> R2K1-VL1.7 region

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 7
 gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg agc gtc acc ctt gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg agc tct caa agc att gta cat agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 336
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

cgt 339
 Arg

<210> 8
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> R2K1-VL1.8 region

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 8
 gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg agc tct caa agc att gta cat agt 96

aatcagaagt tcaagggcaa ggccacgctg accgcggaca aatccactag tacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagaattact 300
 gggctacttcg atgtctgggg gcaagggacc acggtcaccg tctcctcagg tggaggcgg 360
 tcaggcggag gtggctctgg cgggtggcga tcggatgttg tgatgacca gtctccactc 420
 tccttgagcg tcacccttgg acagccggcc tccatctct gcaggagctc tcaaagcatt 480
 gtacatagta atggaaacac ctatttggaa tggtagctgc agaagccagg gcagtctcca 540
 cagctcctga tctataaagt ttccaaccga ttttctgggg tcccagacag attcagcggc 600
 agtgggtcag gcactgattt cactgaaa atcagcaggg ttgaagctga agacgtcgga 660
 gtttattact gctttcaagg ttacatggt cgcctcact ttggccaggg gaccaagctg 720
 gagatcaaac gt 732

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Partial peptide of human or pig osteopontin

<400> 10
 Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1 5

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Partial peptide of monkey osteopontin

<400> 11
Ser Val Ala Tyr Gly Leu Arg

1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Partial peptide of mouse or rat osteopontin

<400> 12
Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg

1 5

<210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Partial peptide of osteopontin

<400> 13
Cys Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Linker

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 441
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> R2K1-VH1.7 depicted in Fig.1

<220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(424)

<400> 15
 cagcaagctt gccgccacc atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg 52
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu
 1 5 10

tca gta act gca ggt gtc caa tcc cag gtg cag ctg cag cag tct ggg 100
 Ser Val Thr Ala Gly Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
 15 20 25

gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct 148
 Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 30 35 40

ttg ggg tat acc ttc act gac tat gaa atg cac tgg gtg aag cag acc 196
 Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr
 45 50 55

cct gta cat ggg ctt gag tgg att gga gct att cat cca gga aga ggt 244
 Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly
 60 65 70 75

ggt act gcc tac aat cag aag ttc aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg 292
 Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
 80 85 90

gac aaa tcc act agt aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aca tct 340
 Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 95 100 105

gag gac acg gcc gtg tat tac tgt aca aga att act ggg tac ttc gat 388
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp
 110 115 120

gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 434
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 125 130 135

tccgcga 441

<210> 16
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 16
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 17
<211> 441
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> R2K1-VH1.8 depicted in Fig.2

<220>
<221> CDS
<222> (20)..(424)

<400> 17
cagcaagctt gccgccacc atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg 52
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu
1 5 10

tca gta act gca ggt gtc caa tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg 100
Ser Val Thr Ala Gly Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
15 20 25

gct gag ctg gtg agg cct ggg tcc tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct 148
Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
30 35 40

tct ggg tat acc ttc act gac tat gaa atg cac tgg gtg aag cag acc 196
Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr
45 50 55

cct gta cat ggg ctt gag tgg att gga gct att cat cca gga aga ggt 244
Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly
60 65 70 75

ggt act gcc tac aat cag aag ttc aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg 292
Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
80 85 90

gac aaa tcc act agt aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aca tct 340
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser
95 100 105

gag gac acg gcc gtg tat tac tgt aca aga att act ggg tac ttc gat 388

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp
 110 115 120

gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 434
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 125 130 135

tccgcga 441

<210> 18
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 18
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly
 110 115 120

cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gagtagaatt taaactttgc 435
 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 125 130

ttcctcagtt ggatccgcga 455

<210> 22
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 22
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg

130

<210> 23
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala

1 5 10 15

Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
 20 25 30

Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro
 35 40 45

Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu
 50 55 60

Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu
 65 70 75 80

Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His
 85 90 95

Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp
 100 105 110

Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu
 115 120 125

Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr Glu
 130 135 140

Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly
 145 150 155 160

Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg
 165 170 175

Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His
 180 185 190

Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala
 195 200 205

Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser
 210 215 220

Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His
 225 230 235 240

Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu
 245 250 255

His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu
 260 265 270

Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp
 275 280 285

Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His
 290 295 300

Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn
 305 310

<210> 24
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> R2K1v1.7 H chain

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)

<400> 24
 cag gtg cag ctg cag cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct ttg ggg tat acc ttc act gac tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

gaa atg cac tgg gtg aag cag acc cct gta cat ggg ctt gag tgg att 144
 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga gct att cat cca gga aga ggt ggt act gcc tac aat cag aag ttc 192
 Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg gac aaa tcc act agt aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

aca aga att act ggg tac ttc gat gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc 336
 Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca 384
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg 432
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc 480
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca 528
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg 576
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc 624
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca 672

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc 720
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct 768
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc 816
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca 864
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc 912
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc 960
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc 1008
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca 1056
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1104
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 1152
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac 1200
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

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

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

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

<210> 26
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> R2K1v1.7 L chain

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(657)

<400> 26
 gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg agc gtc acc ctt gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg agc tct caa agc att gta cat agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 336
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

cga act gtg get gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 384
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc 432
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa 480
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc 528
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag 576
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg 624
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 657
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 27
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 27
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

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