



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0090484
(43) 공개일자 2008년10월08일

(51) Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7018721

(22) 출원일자 2008년07월29일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년07월29일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/012236

국제출원일자 2006년12월19일

(87) 국제공개번호 WO 2007/076927

국제공개일자 2007년07월12일

(30) 우선권주장

60/755,383 2005년12월30일 미국(US)

(71) 출원인

메르크 파텐트 게엠베하

독일 64293 다틈스타트 프랑크푸르터 스트라세
250

(72) 발명자

웨이 제프리 씨

미국 02138 매사추세츠주 캠브리지 페어웨더 스트
리트 108 유니트2

길리즈 스티븐 디

미국 01741 매사추세츠주 칼리슬 스완슨 레인 47
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) G P 130 에 대한, I L-6R a 와 복합체를 형성한 I L-6의 결합을 방해하는 항- I L-6 항체

(57) 요 약

본 발명은 IL-6 이 gp130 에 결합하는 것을 방해하는 항체 가변 영역을 포함하는 항-IL-6 항체를 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 IL-6 결합제에 근거한 IL-6 관련 질환의 치료 조성물 및 방법을 제공한다.

(72) 발명자
로 친밍
미국 02420 매사추세츠주 렉싱턴 캐럴 레인 6

류 유안
미국 01821 매사추세츠주 빌러리카 피스 스트리트
54

특허청구의 범위

청구항 1

항체 가변 영역이, 결합이 질환 세포의 표면 상에서 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하는 방식으로 IL-6 상의 에피토프에 결합하는, 항체 가변 영역을 포함하는 항-IL6 항체 또는 그의 조각.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 결합이 IL-6R α 와 복합체를 형성한 IL-6 이 gp130 에 결합하는 것을 방해하나, IL-6 과 IL-6R α 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하지는 않는 항-IL6 항체.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 IL-6 상의 에피토프가 Leu19, Arg24, Lys27, Arg30, Tyr31, Asp34 및 Trp157 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 을 포함하는 항-IL6 항체:

FTFSNYWMN (SEQ ID NO:2),
FSFSNYWMN (SEQ ID NO:3), 및
FTFSDAWMD (SEQ ID NO:4).

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 를 포함하는 항-IL6 항체:

EIRLKSNNYATHYAESVKG (SEQ ID NO:6),
EIRLKSNGTHYAESVKG (SEQ ID NO:7),
EIRLTSNKQAIYYAESVKG (SEQ ID NO:8), 및
EIRSKANNHATYYAESVKG (SEQ ID NO:9).

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 을 포함하는 항-IL6 항체:

EDYYGYPDY (SEQ ID NO:11),
LLYDGYLH (SEQ ID NO:12),
LFYDGYLH (SEQ ID NO:13), 및
PTLYGAMDY (SEQ ID NO:14).

청구항 7

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 을 포함하는 항-IL6 항체:

**RASESVDNFGISFM (SEQ ID NO:16),
RASESVGNFGISFM (SEQ ID NO:17),
RASESVHNFGISFM (SEQ ID NO:18), 및
RASESVDNYGISFM (SEQ ID NO:19).**

청구항 8

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 를 포함하는 항-IL6 항체:

**TASNQGS (SEQ ID NO:21),
VASNQGS (SEQ ID NO:22), 및
AASNQGS (SEQ ID NO:23).**

청구항 9

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 을 포함하는 항-IL6 항체:

**QQSKEVPWT (SEQ ID NO:25),
QQSKEVPYPT (SEQ ID NO:26),
QQSKEIPWT (SEQ ID NO:27), 및
QQGKEVPWT (SEQ ID NO:28).**

청구항 10

제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,
SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:4 의 중쇄 CDR1 및
SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:8; 또는 SEQ ID NO:9 의 중쇄 CDR2; 및
SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:14 의 중쇄 CDR3 을 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 11

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, 또는 SEQ ID NO:19 의 경쇄 CDR1, 및
SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, 또는 SEQ ID NO:23 의 경쇄 CDR2, 및
SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 또는 SEQ ID NO:28 의 경쇄 CDR3 을 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 12

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서,
SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:4 의 중쇄 CDR1, 및
SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:8; 또는 SEQ ID NO:9 의 중쇄 CDR2; 및
SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:14 의 중쇄 CDR3, 및
SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, 또는 SEQ ID NO:19 의 경쇄 CDR1, 및
SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, 또는 SEQ ID NO:23 의 경쇄 CDR2, 및
SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 또는 SEQ ID NO:28 의 경쇄 CDR3 을 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 불변 영역을 추가로 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 14

제 13 항에 있어서, Fc 부분을 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 15

제 14 항에 있어서, Fc 부분이 인간인 항-IL6 항체.

청구항 16

제 13 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 항체가 SEQ ID NO:31의 경쇄 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:31과 90% 이상 일치하는 서열을 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 18

제 13 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, 및 SEQ ID NO:36으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 항체가 SEQ ID NO:35의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:35와 90% 이상 일치하는 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 20

제 16 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO:35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 21

제 16 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO:34의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 22

제 16 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO:36의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:32의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 23

제 16 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:29의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-IL6 항체.

청구항 24

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 핵산 분자.

청구항 25

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 항-IL6 항체를, 임의로 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 약물학적 유효량으로 포함하는, IL6 촉발 질환의 치료에 적합한 약학 조성물.

청구항 26

암 또는 자가면역 질환의 치료용 의약의 제조를 위한 제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 항-IL6 항체의 용도.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 질환이 IL6 또는 IL-6R α 와 복합체를 형성한 IL6에 의해 촉발되는 용도.

청구항 28

(i) 항체의 Fc 부분,

(ii) IL6R α 및

(iii) IL6

을 포함하는 융합 단백질.

청구항 29

제 28 항에 있어서, IL6R α 가 Fc 부분의 C-말단에 융합되고, IL6 이 IL6R α 의 C-말단에 융합된 융합 단백질.

청구항 30

제 28 항 또는 제 29 항에 있어서, Fc 부분이 젖파이고, IL6R α 및 IL6 이 인간인 융합 단백질.

청구항 31

스크리닝된 항체가 하기 특성을 갖는, 포유류를 제 28 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항의 융합 단백질로 면역화하여 수득된 항-IL6 항체의 제조를 위한 제 28 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항의 융합 단백질의 용도:

(i) 상기 항체의 가변 영역이 IL-6 상의 에피토프에 결합하고,

(ii) 질환 세포의 표면 상의 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하고,

(iii) IL-6R α 와 복합체를 형성한 IL-6 이 gp130에 결합하는 것을 방해하나, IL-6 과 IL-6R α 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하지는 않는 특성.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 스크리닝된 항체가 제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항의 항체인 용도.

명세서**기술 분야**

<1>

본 발명은 IL-6 신호 경로의 억제 및 IL-6 관련 질환의 치료에 유용한 인터루킨-6 (IL-6) 의 길항제에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 차단하고, IL6-촉발 질환, 바람직하게는 암 및 자가면역 질환의 치료에 성공적으로 사용될 수 있는 항-IL-6 항체에 관한 것이다.

배경 기술

<2>

인터루킨-6 (IL-6) 은 암 및 자가면역 질환을 포함하는 여러 질환에 관련된다. 인터루킨-6은 호르몬-의존 성 전립선 암과 같은 많은 진행된 암에 의해 분비되며, 이러한 암에 대한 성장 인자인 것으로 여겨진다. 또한, 암 세포에 의한 IL-6의 분비는 진행된 암의 특징적인 소모 증후군인, 카ხ시아를 야기하는 것으로 여겨진다. 그러므로, IL-6 작용의 억제는 이러한 암의 치료에 유용할 것이다.

<3>

IL-6은 또한 B 세포 발달에 중요한 역할을 담당한다. 유의한 항체 성분이 있는 자가면역 질환, 예컨대 류마티스 관절염은, IL-6의 억제에 의해 치료될 수 있을 것이다. B 세포의 증식 관련 질환, 예컨대 다발 골수종 및 B 세포 럼프종은 또한, IL-6 활성의 억제에 의해 치료될 수 있을 것이다.

<4>

또한, IL-6은 뼈 흡수를 촉진하여 뼈 리모델링에 중요한 역할을 한다. IL-6 활성의 억제제는 뼈 흡수 감소

의 효과를 가질 것이고, 골다공증 치료에 사용할 수 있을 것이다.

<5> IL-6 이 질환 또는 장애의 일부로서 생성되는 경우, 이것은 종종 가용성 IL-6R α 서브유닛과 복합체를 형성하고, 종종 이러한 복합체의 형태로 세포로부터 분비된다. 그 결과, 항체 또는 억제제가 미리 형성된 복합체에 아무런 영향을 줄 수 없기 때문에, IL-6 과 IL-6R α 사이의 상호작용을 차단하는 항체 또는 기타 억제제로 환자를 치료하는 것이 종종 유용하지 않다. 그러므로, IL-6-매개 질환의 개선된 치료를 위한 당업계에서의 필요성이 있다.

<6> 발명의 요약

<7> 본 발명은 IL-6-매개 질환, 특히, 활성화시 IL-6 과 관련된 암 및 자가면역 질환의 치료를 위한 개선된 조성물 및 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 효과적으로 차단하는 신규 IL-6 길항체, 특히, 미리 형성된 IL-6 과 IL-6R α 복합체가 gp130에 결합하는 것을 방해하는 IL-6 길항체를 제공한다. 또한, 본 발명은 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 차단하는 신규 IL-6 길항체의 생성 방법을 제공한다.

<8> 그러므로, 하나의 양상에서, 본 발명은 IL-6R α 와 복합체를 형성한 IL-6 이 gp130에 결합하는 것을 방해하는 단리된 IL-6 길항체를 제공한다. 하나의 구현예에서, 단리된 IL-6 길항체는 항체 가변 영역 및 인간 항체 유래의 Fc 영역을 함유한다. 대안적인 구현예에서, 본 발명에 적합한 Fc 영역은 마우스, 래트, 소, 개, 닭, 말, 어류, 원숭이, 또는 기타 비-인간 종으로부터 수득된 항체 유래일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항체 가변 영역은 결합이 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하는 식으로, IL-6 상의 영역에 결합한다.

<9> 일부 구현예에서, 본 발명은 아미노산 서열 FX₁FSX₂X₃WMX₄ (SEQ ID NO:1) 를 함유하는 중쇄 CDR1 이 포함되는 항체 가변 영역을 포함하는 단리된 IL-6 길항체를 제공한다. X₁, X₂, X₃ 또는 X₄ 는 임의의 아미노산일 수 있다. 바람직하게는, X₁ 은 Thr, Ser, Ala 또는 Cys 이고; X₂ 는 Asn 또는 Asp 이고; X₃ 은 Tyr 또는 Ala 이고; X₄ 는 Asn 또는 Asp 이다. 특히, 중쇄 CDR1 은 하기 아미노산 서열 중 하나를 함유할 수 있다: FTFSNYWMN (SEQ ID NO:2), FSFSNYWMN (SEQ ID NO:3), 또는 FTFSDAWMD (SEQ ID NO:4).

<10> 일부 구현예에서, 아미노산 서열 EIRX₁X₂X₃NX₄X₅AX₆X₇YAESVKG (SEQ ID NO:5) 를 함유하는 중쇄 CDR2 가 포함되는 항체 가변 영역을 포함하는 단리된 IL-6 길항체를 제공한다. X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆ 또는 X₇ 은 임의의 아미노산일 수 있다. 바람직하게는, X₁ 은 Leu 또는 Ser 이고; X₂ 는 Lys 또는 Thr 이고; X₃ 은 Ser 또는 Ala 이고; X₄ 는 Asn 또는 Lys 이고; X₅ 는 Tyr, Gly, Gln 또는 His 이고; X₆ 은 Thr 또는 Ile 이고; X₇ 은 His 또는 Tyr 이다. 특히, 항체 가변 영역에는 하기 아미노산 서열 중 하나를 함유하는 중쇄 CDR2 가 포함된다: EIRLKSNNYATHYAESVKG (SEQ ID NO:6), EIRLSNKGATHYAESVKG (SEQ ID NO:7), EIRLTSNKQAIYYAESVKG (SEQ ID NO:8), 또는 EIRSKANNHATYYAESVKG (SEQ ID NO:9).

<11> 일부 구현예에서, 본 발명은 아미노산 서열 X₁X₂X₃X₄GX₅X₆X₇X₈ (SEQ ID NO: 10) 를 함유하는 중쇄 CDR3 이 포함되는 항체 가변 영역을 포함하는 단리된 IL-6 길항체를 제공한다. X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇ 또는 X₈ 은 임의의 아미노산 또는 웨티드 결합일 수 있다. 바람직하게는, X₁ 은 Glu, Leu 또는 Pro 이고; X₂ 는 Asp, Leu, Phe 또는 Thr 이고; X₃ 은 Tyr 또는 Leu 이고; X₄ 는 Tyr 또는 Asp 이고; X₅ 는 Tyr 또는 Ala 이고; X₆ 은 Pro, Met 또는 웨티드 결합이고; X₇ 은 Asp 또는 Leu 이고; X₈ 은 Tyr 또는 His 이다. 특히, 항체 가변 영역에는 하기 아미노산 서열 중 하나를 함유하는 중쇄 CDR3 이 포함된다: EDYYGYPDY (SEQ ID NO:11), LLYDGYLH (SEQ ID NO:12), LFYDGYLH (SEQ ID NO:13), 또는 PTLYGAMDY (SEQ ID NO:14).

<12> 일부 구현예에서, 본 발명은 아미노산 서열 RASESVX₁NX₂GISFM (SEQ ID NO: 15) 를 함유하는 경쇄 CDR1 이 포함되는 항체 가변 영역을 포함하는 단리된 IL-6 길항체를 제공한다. X₁ 또는 X₂ 는 임의의 아미노산일 수 있다. 바람직하게는, X₁ 은 Asp, Gly 또는 His 이고; X₂ 는 Phe 또는 Tyr 이다. 특히, 항체 가변 영역에는 하기 아미노산 서열 중 하나를 함유하는 경쇄 CDR1 이 포함된다: RASESVDNFGISFM (SEQ ID NO:16), RASESVGNFGISFM (SEQ ID NO:17), RASESVHNFGISFM (SEQ ID NO:18), 또는 RASESVDNYGISFM (SEQ ID NO:19).

<13> 일부 구현예에서, 본 발명은 아미노산 서열 XASNQGS (SEQ ID NO:20) 를 함유하는 경쇄 CDR2 가 포함되는 항체 가변 영역을 포함하는 단리된 IL-6 길항체를 제공한다. X 는 임의의 아미노산일 수 있다.

바람직하게는, X 는 Ala, Val 또는 Thr 이다. 특히, 항체 가변 영역에는 하기 아미노산 서열 중 하나를 함유하는 경쇄 CDR2 가 포함된다: TASNQGS (SEQ ID NO:21), VASNQGS (SEQ ID NO:22), 또는 AASNQGS (SEQ ID NO:23).

<14> 일부 구현예에서, 본 발명은 아미노산 서열 QQX₁KEX₂PX₃T (SEQ ID NO:24) 를 함유하는 경쇄 CDR3 이 포함되는 항체 가변 영역을 포함하는 단리된 IL-6 길항제를 제공한다. X₁, X₂ 또는 X₃ 은 임의의 아미노산일 수 있다.

바람직하게는, X₁ 은 Ser 또는 Gly 이고; X₂ 는 Val 또는 Ile 이고; X₃ 은 Trp 또는 Tyr 이다. 특히 항체 가변 영역에는 하기 아미노산 서열 중 하나를 함유하는 경쇄 CDR3 이 포함된다: QQSKEVPWT (SEQ ID NO:25), QQSKEVPYT (SEQ ID NO:26), QQSKEIPWT (SEQ ID NO:27), 또는 QQGKEVPWT (SEQ ID NO:28).

<15> 바람직한 구현예에서, 본 발명의 IL-6 길항제는 항체 또는 그의 조각이다.

<16> 일부 구현예에서, 항체에는 하기 아미노산 서열 중 하나를 함유하는 경쇄가 포함된다: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, 또는 SEQ ID NO:32. 대안적으로는, 항체에는 상기 확인된 서열 중 임의의 하나, 예를 들어, SEQ ID NO:31 (Mab#471) 와 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 일치하는 아미노산 서열을 함유하는 경쇄가 포함된다.

<17> 다른 구현예에서, 항체에는 하기 아미노산 서열 중 하나를 함유하는 중쇄가 포함된다: SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, 또는 SEQ ID NO:36. 대안적으로는, 항체에는 상기 확인된 서열 중 임의의 하나, 예를 들어, SEQ ID NO:35 (Mab#471) 와 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 일치하는 아미노산 서열을 함유하는 중쇄가 포함된다.

<18> 본 발명은 또한 상기 다양한 구현예에서 기재된 바와 같은 IL-6 길항제를 코딩하는 핵산을 제공한다. 특히, 본 발명은 상기 기재된 항-IL-6 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 코딩하는 핵산을 제공한다.

<19> 또다른 양상에서, 본 발명은 Leu 19, Arg24, Lys27, Arg30, Tyr31, Asp34 및 Trp157 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 함유하는 IL-6 상의 에피토프에, 결합이 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하는 식으로 결합하는 항체 가변 영역을 포함하는 단리된 IL-6 길항제를 제공한다.

<20> 전형적으로는, IL-6 길항제에는 Fc 부분이 포함된다. 바람직하게는, Fc 부분은 인간 항체 유래이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 본 발명의 IL-6 길항제 중의 모든 불변 영역은 인간 항체 유래이다. 대안적인 구현예에서, 본 발명에 적합한 Fc 영역은 마우스, 래트, 소, 개, 닭, 말, 어류, 원숭이, 또는 기타 비-인간 종으로부터 수득된 항체 유래일 수 있다.

<21> 또다른 양상에서, 본 발명은 대상에게 상기 기재된 본 발명의 단리된 IL-6 길항제를 투여하여 대상에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 구체적으로는, 본 발명은 IL-6 와 결합하고, gp130 과의 상호작용을 입체적으로 차단하는 항체 V 영역을 포함하는 단백질을 투여하여 대상에서 질환 또는 증상을 치료하는 방법을 제공한다.

이러한 단백질에는 항체, 다양한 불변 영역이 결여된 항체 조각, 미니체, scFv 단백질, 항체 융합 단백질이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, IL-6 에 결합하고, gp130 과의 상호작용을 입체적으로 차단하는 항체 V 영역은 IL-6 과 IL-6 수용체 α 서브유닛 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하지 않는다. 본 발명의 방법은 특히 IL-6 이 관련된 질환, 장애 및 부작용, 예컨대, 예를 들어, 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 전신 홍반 루푸스, 그레이브스 질환, 하시모토 질환, 및 캐슬멘 (Castleman's) 질환을 포함하나 이에 제한되지 않는 자가면역 질환, 습성 및 만성 염증, 및 골다공증 및 골 질량 손실을 포함하는 기타 장애, 및 호르몬-의존성 전립선 암을 포함하나 이에 제한되지 않는 암, B-세포 증식성 장애, 예컨대 B 세포 비-호지킨 림프종, 및 신장, 유방, 결장, 폐, 뇌, 및 기타 조직의 진행된 암의 치료에 유용하다.

<22> 또다른 양상에서, 본 발명은 상기 다양한 구현예에 기재된 IL-6 길항제를 발생시키는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 (a) 먼저 동물을 IL-6 및 IL-6R α 를 포함하는 조성물로 면역화시켜, IL-6 과 IL-6R α 의 복합체에 대항하는 항체를 발생시키고, (b) gp130 과 IL-6 사이의 상호작용을 억제하는 항체를 확인하여 IL-6 길항제를 발생시키는 방법을 제공한다. IL-6 및 IL-6R α 는 IL-6/IL-6R α 복합체의 형성을 용이하게 하는 융합 단백질 배열로 있을 수 있다. 바람직한 구현예에서, 조성물에는 또한 항원 제시를 용이하게 하는 부가적인 부분, 예컨대 Fc 부분이 포함된다.

<23> 또다른 양상에서, 본 발명은 IL-6 과 IL-6R α 의 복합체에 특이적이고, gp130 에 대한 IL-6 결합을 방해할 수 있는 항체를 제공한다.

<24> 본 발명의 다른 특징, 대상 및 장점은 이하 상세한 설명에서 명백하다. 그러나, 본 발명의 구현예에서 표시되는 동안 상세한 설명은 제한이 아닌, 단지 예증의 방식으로 제공되는 것임이 이해되어야만 한다. 발명의 범주 내의 다양한 변경 및 변형이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이다.

발명의 상세한 설명

<25> 요약하면, 본 발명은 하기에 관한 것이다:

<26> · 항체 가변 영역이, 결합이 질환 세포의 표면 상에서 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하는 방식으로 IL-6 상의 에피토프에 결합하는, 항체 가변 영역을 포함하는 상응하는 항-IL6 항체 또는 그의 조각.

<27> · 결합이 IL-6R α 와 복합체를 형성한 IL-6 이 gp130 에 결합하는 것을 방해하나, IL-6 과 IL-6R α 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하지는 않는, 상응하는 항-IL6 항체.

<28> · 상기 IL-6 상의 에피토프가 Leu19, Arg24, Lys27, Arg30, Tyr31, Asp34 및 Trp157 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<29> · 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 을 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체:

FTFSNYWMN (SEQ ID NO:2),

FSFSNYWMN (SEQ ID NO:3), 및

FTFSDAWMD (SEQ ID NO:4).

<30>

<31> · 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2 를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체:

EIRLKSNNYATHYAESVKG (SEQ ID NO:6),

EIRLKSNKGATHYAESVKG (SEQ ID NO:7),

EIRLTSNKQAIYYAESVKG (SEQ ID NO:8), 및

EIRSKANNHATYYAESVKG (SEQ ID NO:9).

<32>

<33> · 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체:

EDYYGYPDY (SEQ ID NO:11),

LLYDGYLH (SEQ ID NO:12),

LFYDGYLH (SEQ ID NO:13), 및

PTLYGAMDY (SEQ ID NO:14).

<34>

<35> · 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 을 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체:

RASESVDNFGISFM (SEQ ID NO:16),

RASESVGNFGISFM (SEQ ID NO:17),

RASESVHNFGISFM (SEQ ID NO:18), 및

RASESVDNYGISFM (SEQ ID NO:19).

<36>

<37> · 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체:

TASNQGS (SEQ ID NO:21),

VASNQGS (SEQ ID NO:22), 및

AASNQGS (SEQ ID NO:23).

<38>

· 항체 가변 영역이 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 을 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체:

QQSKEVPWT (SEQ ID NO:25),

QQSKEVPYT (SEQ ID NO:26),

QQSKEIPWT (SEQ ID NO:27), 및

QQGKEVPWT (SEQ ID NO:28).

<40>

· SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:4 의 중쇄 CDR1 및

<42>

SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:8; 또는 SEQ ID NO:9 의 중쇄 CDR2; 및

<43>

SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:14 의 중쇄 CDR3 을 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<44>

· SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, 또는 SEQ ID NO:19 의 경쇄 CDR1, 및

<45>

SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, 또는 SEQ ID NO:23 의 경쇄 CDR2, 및

<46>

SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 또는 SEQ ID NO:28 의 경쇄 CDR3 을 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<47>

· SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 또는 SEQ ID NO:4 의 중쇄 CDR1, 및

<48>

SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7; SEQ ID NO:8; 또는 SEQ ID NO:9 의 중쇄 CDR2; 및

<49>

SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:13 또는 SEQ ID NO:14 의 중쇄 CDR3, 및

<50>

SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, 또는 SEQ ID NO:19 의 경쇄 CDR1, 및

<51>

SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, 또는 SEQ ID NO:23 의 경쇄 CDR2, 및

<52>

SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 또는 SEQ ID NO:28 의 경쇄 CDR3 을 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<53>

· 항체 불변 영역을 임의로 추가로 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<54>

· Fc 부분을 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<55>

· Fc 부분이 인간인, 상응하는 항-IL6 항체.

<56>

· 항체가 SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<57>

· 항체가 SEQ ID NO:31 의 경쇄 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:31 과 90% 이상 일치하는 서열을 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<58>

· 항체가 SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, 및 SEQ ID NO:36 으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<59>

· 항체가 SEQ ID NO:35 의 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO:35 와 90% 이상 일치하는 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<60>

· SEQ ID NO:35 의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:31 의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

<61>

· SEQ ID NO:34 의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:30 의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.

하는, 상응하는 항-IL6 항체.

- <62> · SEQ ID NO:36 의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:32 의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.
- <63> · SEQ ID NO:33 의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO:29 의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 상응하는 항-IL6 항체.
- <64> · 상기 및 하기에 열거된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산 분자.
- <65> · 상기 및 하기에 열거된 바와 같은 항-IL6 항체를, 임의로 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 약물학적 유효량으로 포함하는, IL6 촉발 질환의 치료에 적합한 약학 조성물.
- <66> · 암 또는 자가면역 질환의 치료용 의약의 제조를 위한 상기 및 하기에 열거된 바와 같은 항-IL6 항체의 용도.
- <67> · 질환이 IL6 또는 IL-6R α 와 복합체를 형성한 IL6 에 의해 촉발되는, 상응하는 용도.
- <68> · 바람직하게는 Fc 가 비-인간 포유류, 예컨대 마우스 유래이고, IL-6R α 및 IL6 가 인간 기원 유래인, 항체의 Fc 부분, IL6R α 및 IL6 를 포함하는 융합 단백질.
- <69> · IL6R α 가 Fc 부분의 C-말단에 융합되고, IL6 이 IL6R α 의 C-말단에 융합된, 상응하는 융합 단백질.
- <70> · 스크리닝된 항체가 하기 특성을 갖는, 포유류를 열거된 바와 같은 융합 단백질로 면역화하여 수득된 항-IL6 항체의 제조를 위한 열거된 바와 같은 융합 단백질의 용도:
 - (i) 상기 항체의 가변 영역이 IL-6 상의 에피토프에 결합하고,
 - (ii) 질환 세포의 표면 상의 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하고,
 - (iii) IL-6R α 와 복합체를 형성한 IL-6 이 gp130 에 결합하는 것을 방해하나, IL-6 과 IL-6R α 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하지는 않는 특성.
- <74> · 스크리닝된 항체가 상기 및 하기에 열거된 바와 같은 항체인, 상응하는 용도.

실시예

<122> 실시예 1. 항원으로 사용하기 위한 IL-6/IL-6R α 복합체의 발현

IL-6 의 표면에 결합하고 gp130 에 대한 결합을 방해하고 IL-6/IL-6R α 복합체에 접근하기 쉬운 항체를 생성하기 위해, Fc 도메인, IL-6R α 의 세포외 도메인, 및 IL-6 을 포함하는 융합 단백질을 pdCs-Fc-IL6R α -IL6 이라고 불리는 플라스미드로부터 발현시켰다. 이제부터 융합 단백질을 Fc-IL6R α -IL6 이라고 부른다. Fc 도메인은 마우스 IgG_{Y2a} 유래였고, IL-6R α 및 IL-6 은 인간 서열에 기초하였다. 상기 단백질의 서열 및 상기 단백질을 코딩하는 DNA 는 하기 제시된다.

<124> Fc-IL6R α -IL6 의 단백질 서열 (SEQ ID NO:37):

```

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIGPPKIKDVLMISSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQ
ISWFVNNVEVHTAQTOQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPPAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEMTKKQVTLCTMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT
EPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGSgddddd
1PPEEPQLSCFRKSPLSNVVCEWGRPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPCQYSQES
QKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQGCGILQPDPPANITVTAVARNP
RWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDASGLRHVVQ
LRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAArgggggggggsvevpvpppgEDSKDVAAPH
RQPLTSRERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCFQ
SGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLD
ITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLOSSLRALRQM

```

<126> 밀줄쳐진 서열: 젖과 Fc IgG γ

<127> 소문자: 엔테로키아나제 분할 부위를 함유하는 연결자

<128> 굵은 글씨체 서열: 인간 IL6R α

<129> 밀줄쳐진 소문자 서열: 연결자

<130> 이태리체 서열: 인간 IL6

<131> 성숙 Fc-IL6R α -IL6 을 코딩하는 DNA 서열 (SEQ ID NO:38):

GAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTC
 TTGGGTGGACCCTCCGTCTTCATCTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCC
 CTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAG
 ATCAGCTGGTTGTGAACAAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAG
 GATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCTCCACAGCACCAGGACTGGATG
 AGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCAGCGCCATCGAGAGA
 ACCATCTAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCA
 GAAGAAGAGATGACTAAGAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCT
 GAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACT
 GAACCAGTCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAG
 AAGAACTGGTGGAAAGAAAATAGCTACTCCTGTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAAT
 CACCAACACGACTAAGAGCTCTCCGGACCCCGGGTTCAAGGGATGACGATGACGATAAG
 CTTCCCCCGAGGAGCCCCAGCTCCTGCTCCGGAAAGAGCCCCCTCAGCAATGTTGTT
 TGTGAGTGGGTCTCGGAGCACCCATCCCTGACGACAAAGGCTGTGCTTGGTGGAG
 AAGTTTCAGAACAGTCCGGCGAAGACTTCCAGGAGCCGTGCCAGTATCCCAGGAGTCC
 CAGAAGTTCTCCTGCCAGTTAGCAGTCCGGAGGGAGACAGCTCTTCTACATAGTGTCC
 ATGTGCGTCGCCAGTAGTGTGGAGCAAGTTCAGCAAAACTCAAACCTTCAGGGTTGT
 GGAATCTTGAGCCTGATCCGCTGCCAACATCACAGTCAGCCGTGCCAGAAACCCC
 CGCTGGTCAGTGTCACTGGCAAGACCCCCACTCCTGGAACACTTACAGACTA
 CGGTTTGAGCTCAGATATCGGCTGAACGGTCAAAGACATTACAACATGGATGGTCAAG
 GACCTCCAGCAGTCACTGTGTCATCCACGACGCCCTGGAGCGAGCTGGAGGCCAG
 CTTCGTGCCAGGAGGAGTTGGCAAGGCAGTGGAGCGAGTGGAGGCCAG
 GGCACGCCCTGGACAGAATCCAGGAGTCCTCCAGCTAGAGGGGGGGGGGGAG
 GGGGGCAGTGTAGAACCGTACCCCCAGGAGAAAGATTCAAAGATGTAGCTGCCACAC
 AGACAGCCACTCACCTTCAAGAACATTGACAACAAATTGGTACATCCTCGACGGC
 ATCTCAGCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGTAACATGTGTGAAAGCAGCAAAGAG
 GCACGGCAGAAACAAACCTGAACCTCCAAAGATGGCTGAAAAGATGGATGCTTCAA
 TCTGGATTCAATGAGGAGACTTGCTGGTAAAATCATCACTGGTCTTTGGAGTTGAG
 GTATACCTAGAGTACCTCCAGAACAGATTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCCAGAGCTGT
 CAGATGAGTACAAAGTCTGATCCAGTTCCAGGAAAGCAAAAGATCTAGATGCA
 ATAACCACCCCTGACCCAAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCTGCAGGCACAGAAC

<132> CAGTGGCTGCAGGACATGACAACCTCATCTCATTCTGCGCAGCTTAAGGAGTTCTGCAG
 TCCAGCCTGAGGGCTTCTGGCAAATGTAG

<133> Fc-IL6R α -IL6 융합 단백질 생성물을 특징화하기 위한 단백질 발현의 신속한 분석을 위해, 플라스미드 pdCs-Fc-IL6R α -IL6 을 리포펙타민 (Invitrogen) 을 사용하는 일시적 트랜스펙션에 의해 인간 배아 신장 HEK 293 세포 (ATCC# CRL-1573) 내에 도입하였다.

<135> Fc-IL6R α -IL6 을 발현하는 안정하게 트랜스펙션된 클론을 수득하기 위해, 적합한 플라스미드 DNA 를 전기천공에 의해 마우스 골수종 NS/0 세포 내로 도입하였다. NS/0 세포를 10% 열-불활성화 우태혈청, 2 mM 글루타민 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 둘베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium) 에서 성장시켰다. 약 5×10^6 세포를 PBS 로 1 회 세정하고, 0.5 ml PBS 에 재현탁하였다. 그 다음 10 μg 의 선형화된 플라스미드 DNA 를 빙상에서 10 분 동안 Gene Pulser[®] Cuvette (0.4 cm 전극 캡, BioRad) 중에서 세포와 인큐베이션시켰다. 0.25 V 및 500 μF 의 설정으로 Gene Pulser[®] (BioRad, Hercules, CA) 을 사용하여 전기천공을 수행하였다. 세포를 빙상에서 10 분 동안 회복시키고, 그 후 이들을 성장 배지에 재현탁하고, 2 개의 96 웰 플레이트 상에 깔았다. 트랜스펙션-후 2 일에 성장 배지에 첨가된 100 nM 메토트렉세이트 (MTX) 의 존재하에서의 성장에 의해 안정하게 트랜스펙션된 클론을 선별하였다. 세포에 매 3 일 2 내지 3 회 이상 영양공급하고, MTX-저항성 클론은 2 내지 3 주에 나타났다. 클론으로부터의 상청액을 항-Fc ELISA 로 검정하여 고 생산자를 확인하였다. 고 생산 클론을 단리하고, 100 nM MTX 를 함유하는 성장 배지에서 증식시켰다. 전형적으로 사용된 성장 배지는 H-SFM 또는 CD 배지 (Life Technologies) 였다.

<136> 그 다음 Fc-IL6R α -IL6 융합 단백질을 추가 분석을 위해 매질로부터 포획하였다. 젤 전기영동에 의한 정규적 특징화를 위해, 배지 내로 분비된 Fc-IL6R α -IL6 융합 단백질을 단백질 A Sepharose[®] 비이드 (Repligen, Cambridge, MA) 에 포획한 다음, β -메르캅토에탄올과 같은 환원제의 유무하에서, 단백질 샘플 완충액에서 샘플을 끓여 용리하였다. 샘플을 SDS-PAGE 로 분석하고, 단백질 뱀드를 코마시 (Coomassie) 염색으로 가시화하였다.

<137> 다양한 단백질 중 임의의 것이 상기 기재된 Fc-IL6R α -IL6 단백질에 대한 대안으로 사용될 수 있을 것임이 당업자에게 인지될 것이다. 예를 들어, IL-6R α 및 IL-6 의 다른 배열이 사용될 수 있다. 예컨대 IL-6R α -IL-6-Fc, 알부민-IL-6R α -IL-6, 사이토카인-IL-6R α -IL-6, 여기서 사이토카인은 IL-6/IL-6R α 복합체에 대항해 면역반응을 자극하기 위해 선택된다. 사이토카인, Fc 부분, 및 IL-6R α /IL-6 복합체를 포함하는 단백질이 또한 예를 들어, Gillies et al. 의 방법에 따라 사용될 수 있다 (W001/07081, 이의 교시는 본원에 참조로서 인용됨). 마지막으로, IL-6 및 IL-6R α 는 개별적으로 생성되고, 화학적으로 가교되고, 항원으로 사용될 수 있다. Fc 부분 및/또는 2 차 사이토카인 부분이 사용되는 경우, 동물로부터의 이러한 부분이 면역화되는 것이 일반적으로 유리하다 (예컨대 마우스).

<138> 하기 기재된 항체의 특징화를 위한 제조시, Fc-IL6 및 Fc-IL6R α 를 코딩하는 DNA 는 상기 기재된 바와 유사하게 구축되었다. 해당하는 단백질을 상기 기재된 바와 유사하게 정제하였다. 또한, 인간 IL-6, 인간 IL-6R α , 및 인간 gp130-Fc 는 하기 특정 실험에서 사용하기 위해 R&D Systems, Inc. 에서 구입하였다. 실험에서 사용된 상기 단백질의 도식이 도 3 에 제시된다. 단백질 및 관련 구조물의 DNA 서열은 하기 제시된다.

<139> 성숙 Fc-IL6R α (SEQ ID NO:39)

```

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVIFPPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQ
ISWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNNGKTELNYKNT
EPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFRTPGSGDDDDDK
LPPEEPQLSCFRKSPLSNVVCEWGPRTSPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPCQYSQES
QKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQGCGILQPDPPANITVTAVARNP
RWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQ
LRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPA

```

<140>

<141>

성숙 Fc-IL6R α 를 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:40)

GAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTC
 TTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCC
 CTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAG
 ATCAGCTGGTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAG
 GATTACAACAGTACTCTCCGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATG
 AGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCATCGAGAGA
 ACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCA
 GAAGAAGAGATGACTAAGAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCT
 GAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACT
 GAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTCTACTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAG
 AAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAAAT
 CACCACACGACTAAGAGCTCTCCGGACCCCGGGTCAGGGATGACGATGACGATAAG
 CTTCCCCCGAGGAGCCCCAGCTCTGCTTCCGAAGAGCCCCCTCAGCAATGTTGTT
 TGTGAGTGGGGTCCCTCGGAGCACCCATCCCTGACGACAAGGCTGTGCTTGGTGAGG
 AAGTTTCAGAACAGTCCGGCGAAGACTCCAGGAGCCGTGCCAGTATTCCCAGGAGTCC
 CAGAAGTTCTCCTGCCAGTTAGCAGTCCGGAGGGAGACAGCTCTTCTACATAGTGTCC
 ATGTGCGTCGCCAGTAGTGTGGAGCAAGTTCAAGCAAAACTCAAACCTTCAGGGTTGT
 GGAATCTTGCAGCCTGATCCGCTGCCAACATCACAGTCACTGCCGTGGCCAGAAACCC
 CGCTGGCTCAGTGTACCTGGCAAGACCCCCACTCCTGGAACTCATTTCTACAGACTA
 CGGTTGAGCTCAGATATCGGGCTGAACGGTCAAAGACATTACAACATGGATGGTCAAG
 GACCTCCAGCATCACTGTGTCACTCCACGACGCCCTGGAGCGGCCCTGAGGCACGTGGTGAG
 CTTCGTGCCAGGAGGAGTTGGCAAGGCAGTGGAGCAGTGGAGGCCGGAGGCCATG
 GGCACGCCCTGGACAGAACCCAGGAGTCCTCCAGCTTAG

<142>

성숙 Fc-IL6 (SEQ ID NO:41)

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQ
 ISWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPIER
 TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTTNGKTELNYKNT
 EPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNVERNSYCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKEDSKDVA
 APHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLLPKMAEKDG

CFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKN
 LDAITTDPPTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

<143>

<146>

성숙 Fc-IL6 을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:42)

GAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCCTCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTC
 TTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCC
 CTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAG
 ATCAGCTGGTTGTGAACAAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAG
 GATTACAACAGTACTCTCCGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATG
 AGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGA
 ACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCA
 GAAGAAGAGATGACTAAGAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCT
 GAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACACGGGAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACT
 GAACCACTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAG
 AAGAACTGGGTGGAAAGAAAATAGCTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACAAT
 CACCAACAGACTAAGAGCTTCTCCGGACCCGGTAAAGAAGATTCAAAGATGTAGCT
 GCCCCACACAGACAGCCACTCACCTCTCAGAACGAATTGACAAACAAATTCGGTACATC
 CTCGACGGCATCTCAGCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAAGAGTAACATGTGTGAAAGC
 AGCAAAGAGGCACTGGCAGAAAACAACCTGAACCTTCAAAGATGGCTGAAAAAGATGGA
 TGCTTCCAATCTGGATTCAATGAGGAGACTTGCTGGTAAAATCATCACTGGTCTTTG
 GAGTTTGAGGTATACTAGAGTACCTCCAGAACAGATTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCC
 AGAGCTGTGAGATGAGTACAAAAGCCTGATCCAGTTCCTGCAGAAAAAGGCAAAGAAT
 CTAGATGCAATAACCACCCCTGACCCAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCTGCAG
 GCACAGAACCACTGGCTGCAGGACATGACAACCTCATCTCATTCTGCGCAGCTTAAGGAG
 TTCCTGCAGTCCAGCCTGAGGGCTCTCGGCAAATGTAG

<147>

<148>

실시예 2. IL-6/IL-6R α 복합체로의 면역화.

<149>

20 마리 마우스 (Balb/C) 를 실시예 1 에 기재된 바와 같이 제조된 Fc-IL6R α -IL6 단백질로 면역화하고, 상기 단백질에 대한 단일클론 항체를 Kohler and Milstein 법 (1975) (*Nature*, 256:495-7) 의 변형에 따라 제조하였다. 구체적으로, 1 μ g 의 Fc-IL6R α -IL6 를 100 μ l 의 완전 프로인트 (Freund's) 면역보강제로 피하 주사하였다. 100 μ l 의 불완전 프로인트 면역보강제로 복막내 주사된 1 μ g 의 단백질을 사용하여, 주사를 14 일 후에 반복하였다. 첫번째 주사 24 일 후, 마우스를 100 μ l 의 PBS 중에 1 μ g 의 Fc-IL6R α -IL6 단백질로 정맥내 추가접종하였다. 3 일 후 마우스를 희생시키고, 비장을 절개하고, 비장 세포를 표준 절차에 따라 배양하였다. 강한 폴리클론 항-IL6R α /IL6 반응을 보이는 2 마리 마우스로부터의 435×10^6 비장 세포를 175×10^6 NS/0 세포와 2.4 비장 세포 대 1 NS/0 세포의 비율로 융합하였다. 불멸화된 B 세포/NS/0 세포 잡종을 표준 절차에 따라 제조한 다음, 하이브리도마를 ELISA 기술을 사용하는 Fc-IL6R α -IL6 융합 단백질에 대한 항체의 제조에 대해 스크리닝하였다.

<150>

실시예 3. IL-6/IL-6R α 복합체와 gp130 사이의 상호작용을 차단하는 항체의 스크리닝

<151>

결합

<152>

실시예 2로부터의 양성 클론을 하기와 같이 추가로 시험하였다. 항체의 동종형을 결정하고, IgM-기재 클론은 추가로 특징화하지 않았다. IgG-기재 단일클론 항체를 표준 절차에 따라 면역화된 Fc-IL6 및 Fc-IL6R α 를 사용하여 IL-6 또는 IL-6R α 에 결합하는 능력에 대해 시험하였다. 일부 클론은 IL-6 에 결합되고, 일부는 IL-6R α 에 결합되고, 일부는 어느 단백질에도 결합되지 않는 것은, 단일클론이 연결자의 일부분을 인지할 수 있거나, IL-6 및 IL-6R α 부분으로 모두 이루어진 복합체에 피토프를 인지할 수 있을 것임을 암시된다.

<153>

본 발명의 전형적인 항체의 결합 특성의 예시적 결과는 도 4 (Fc-IL6R α -IL6 에 대한 결합), 도 5 (IL-6 에 대한 결합), 도 6 (비-공유적으로 복합체를 형성한 IL-6 및 IL-6R α 에 대한 결합), 및 도 7 (IL-6R α 단독)에 제시된다. 결과는, 상기 세트의 항체에 대해, IL-6 및 공유 결합된 IL-6 및 IL-6R α 에 대한 결합이 유사하고, 비-공유 IL-6/IL-6R α 복합체에 대한 결과는 덜 강한 신호를 제공하고 (가능하게는 세정 단계 중의 IL-6R로부터의 IL-6 의 해리때문), IL-6R α 단독에 대한 결합이 검출될 수 없었다는 것을 나타낸다.

<154>

경쟁 시험

<155>

IL-6 을 인지하는 항체를 더욱 특징화하기 위해, 하기 경쟁 시험을 수행하였다. 첫번째로, Fc-IL6R α -IL6 과 gp130-Fc 사이의 상호작용을 억제하기 위한 단일클론 항체의 능력을 시험하였다. 억제 검정법을 [Scheller et al. *J. Immuno. Methods*, 291:93-100 (2004), 이의 교시는 본원에 참조로서 인용됨]에 기재된 방법에 근거해 수행하였다. Mab#195, Mab#309, Mab#471, 및 Mab#476 으로 명명된 4 개의 항체는 상기 상호작용을 차단한 것으로 확인되었다. 두번째로, 항체에 의한 Fc-IL6 과 Fc-IL6R α 사이의 상호작용의 억제를 시험하였다. 항체 중 어느 것도 상기 상호작용을 억제하는 것으로 발견되지 않았으며, 이것은 항체가 Fc-IL6R α -IL6 으로의 면역화로부터 유래하고, Fc-IL6R α -IL6 에 대한 결합에 대한 초기 스크리닝을 한다는 사실에 근거해 예상되었다.

<156>

Fc-IL6R α -IL6 과 gp130-Fc 사이의 상호작용의 억제를 예증하는 전형적인 결과는 도 8 에 제시된다.

<157>

세포-기재 검정법

<158>

항체 Mab#195, Mab#309, Mab#471, 및 Mab#476 을 Fc-IL6R α -IL6 복합체로 자극받은 HepG2 세포로부터의 합토글로빈 방출을 차단하는 능력에 대해 시험하였다. 합토글로빈은 염증 상태 동안 간 세포에 의해 분비되는 단백질이다. HepG2 세포는 간 세포주이다. HepG2 세포로부터의 합토글로빈의 방출은 IL-6R α / IL-6 복합체의 활성에 대한 편리한 생물학적 검정법을 제공한다.

<159>

검정법을 하기와 같이 수행하였다. HepG2 세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 0.1×10^6 세포로 깔고, 10% 우태 혈청 (FBS) 이 보충된 DMEM 배지에서 밤새 성장시켰다. 그 다음 세포를 PBS 로 세정하고, 단식 배지 (starving medium), FBS 가 없는 DMEM 에서 37°C 에서 1 시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 다음 세포를 8 ng/ml Fc-IL6R α -IL6 복합체의 존재하의 자극 배지, DMEM (FBS 없음) 에서 인큐베이션시키고, 다양한 농도의 시험 항체를 22 시간 동안 보충하였다. 상청액을 제거하고, 합토글로빈의 수준을 합토글로빈 검출을 위해 ELISA 에 의해 측정하였다. 포획을 위해 염소 항-인간 합토글로빈 항체 (Sigma #H5015), 마우스 항-인간 합토글로빈 항체 (US Biological #H1820-05) 를 1 차 항체로서, 항-마우스 IgG-HRP 항체 (Promega #W402B) 를 2 차 항체로서 사용하여, 표준 ELISA 절차를 뒤따라 수행하였다. 전형적인 결과를 도 9 에 제시한다.

<160>

Biacore 분석

<161>

IL-6 에 대한 항체 Mab#195, Mab#309, Mab#471, 및 Mab#476 의 결합을 Biacore 기계를 사용하여 정량적으로 특징화하였다. 항체를 침에 고정하고; IL-6 단백질을 침에 통과시키고, 온-비율 및 오프-비율을 측정하였다. 하기 결과를 수득하였다.

파라미터	mAb#195	mAb#309	mAb#471	mAb#476
k_a (1/Ms)	2.4×10^6	8×10^5	1.8×10^6	$2.5-2.6 \times 10^6$
k_d (1/s)	4.8×10^{-3}	1.1×10^{-4}	1.4×10^{-5}	$1.2-2.6 \times 10^{-4}$
KD (pM)	2000	135	7.5	47-106

<162>

암 세포주의 증식의 억제.

<164>

본 발명의 항체를 A431 세포 및 LP-1 세포의 증식을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. LP-1 세포의 증식의 억제는 실시예 8 에 기재되어 있다. A431 의 증식의 억제는 하기와 같이 측정되었다. 세포를 96-웰 플레이트에 10% FBS 함유 DMEM 중 25,000 세포/웰로, 웰 당 200 μ l 로 깔았다. 제 3 일에, 세포를 200 μ l 의 PBS 로 1 회 세정하였다. 세포를 37 °C 에서 100 μ l 의 DMEM 중 1 시간 동안 단식시켰다.

<165>

제 3 일에, 항-IL-6 항체의 희석액을 IL6R α -IL6-His6 함유 DMEM (33 ng/ml) 중 96 U-바탁 플레이트에서 제조하였고, 모든 단백질은 후에 세포를 함유하는 플레이트에 옮기기 때문에 2X 희석액으로 제조하였다. 대조군에는 DMEM, DMEM-1 % FBS, 및 0% FBS 중 IL6R α -IL6-His6 이 포함되었다. 플레이트를 37 °C 에서 1 시간 동안 단백질의 희석액으로 인큐베이션하고, 그 후 100 μ l 의 단백질 혼합물을 단식된 세포로 옮겼다.

<166>

제 5 일에, 각 웰 중의 세포를 200 μ l 의 PBS 로 2 회 그 다음, 산 포스파타아제를 측정하기 위한 100 μ l 의 용액으로 세정한다. 용액은 0.1 M 나트륨 아세테이트 pH 5.5, 0.1 % Triton X-100, 2.5 mg/ml 파라니트로페

닐포스페이트였다. 플레이트를 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 반응을 100 μl의 0.1 N NaOH로 중지시키고, 플레이트를 410 nm에서 편독하였다.

<167> 전형적인 결과를 도 10A, 10B1 및 10B2에 예증하였다. 도 10B-1 및 10B-2에 제시된 바와 같이, 본 발명의 항체는 IL-6/IL-6R α 융합 단백질에 의한 자극으로 나타나는 A431 인간 상피 암종 세포의 증식을 억제한다. IL-6/IL-6R α 융합 단백질에 의해 자극된 A431 세포의 증식의 전형적인 결과는 도 10A에 제시된다.

<168> 실시예 4. IL-6에 결합하고 gp130과의 상호작용을 차단하는 항체의 V 영역 서열.

<169> 단일클론 항체 Mab#195, Mab#309, Mab#471, 및 Mab#476의 V 영역 서열을 표준 절차에 따라 측정하였다. 각 하이브리도마 클론의 mRNA를 제조사의 지침에 따라 Dynabeads Direct mRNA 키트 (Dynal)를 사용하여 정제하였다. 역-전사 PCR (RT-PCR)을 수행하여 제조사의 매뉴얼에 따라 BD SMART™ cDNA 합성 키트 (BD Clontech)를 사용하여 cDNA를 수득하였다. 주형으로 cDNA, 포개진 올리고뉴클레오티드 및 제조사에 의해 지시된 폴리미라아제 KOD (EMD Biosciences)를 사용하여 2회의 연속 PCR을 수행하였다. 3' 올리고뉴클레오티드는 마우스 IgG γ1 항체의 VH 및 Vk를 증폭하기에 특이적인 반면, 5' 올리고뉴클레오티드는 BD SMART™ cDNA 합성 키트 (RT-PCR 동안 5'에 침가된 서열)로부터 포개진 올리고뉴클레오티드였다.

<170> 예를 들어, 중쇄 및 경쇄 V 영역은 올리고뉴클레오티드 서열을 가진 불변 영역 프라이머 및 V 영역 프라이머 및 하기 지시된 조건을 사용하여 PCR 증폭에 의해 수득되었다.

<171> VH 증폭:

PCR#1

5' 올리고뉴클레오티드 #1: 5' ACAACGCAGAGTACGCCG 3' (SEQ ID NO:43)
3' 올리고뉴클레오티드 #1: 5' AGGAGAGCTGGGAAGGTGTG 3' (SEQ ID NO:44)

PCR#2

5' 올리고뉴클레오티드 #2: 5' ACAACGCAGAGTACGCCG 3' (SEQ ID NO:45)
3' 올리고뉴클레오티드 #2: 5' TAGCCCTTGACCAGGCATCCC 3' (SEQ ID NO:46)

<172>

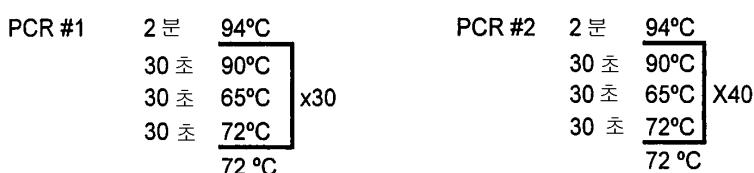
<173> Vk 증폭:

PCR#1

5' 올리고뉴클레오티드 #1: 5' ACAACGCAGAGTACGCCG 3' (SEQ ID NO:47)
3' 올리고뉴클레오티드 #1: 5' CTGCCATCAATCTTCCACTTGAC 3' (SEQ ID NO:48)

PCR#2

5' 올리고뉴클레오티드 #2: 5' CATCCTCTCTTCCAGCTCTC 3' (SEQ ID NO:49)
3' 올리고뉴클레오티드 #2: 5' CTGAGGCACCTCCAGATG 3' (SEQ ID NO:50)



<174>

<175> PCR 생성물을 QIAquick 젤 추출 키트 (QIAGEN)를 사용하여 아가로오스 젤로부터 정제하고, 서열분석을 위해 TOPO 블런트 pCR4 벡터 (Invitrogen)내로 서브클로닝하였다. 서열을 프라이머 T7 및 T3 및 표준 서열분석 절차를 사용하여 수득하였다.

<176> Mab#195, Mab#309, Mab#471, 및 Mab#476의 V 영역 서열을 포함하는 경쇄 및 중쇄 서열을 하기에 제시한다.

<177> MAb #195 VH 성숙 영역 (SEQ ID NO:33)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLCVASFVTSNYWMNWRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYAT

<178> HYAESVKGRFTISRDDS KSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTREDYYGYPDYWGQGTTLVSS

<179> MAb #195 VK 성숙 영역 (SEQ ID NO:29)

DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDNFGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYV ASNQGS

<180> GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEV PWT FGGGT KLEIK

<181> MAb #309 VH 성숙 영역 (SEQ ID NO:34)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLCVASFVTSNYWMNWRQSPEKGLEWVAEIRLKSNGAT

<182> HYAESVKGRFTISRDDS KSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCASLLYDGYLHWGQGTLTVSA

<183> MAb #309 VK 성숙 영역 (SEQ ID NO:30)

DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVGNFGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYT ASNQGS

<184> GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDSAMYFCQQSKEV PWT FGGGT KLEIK

<185> MAb #471 VH 성숙 영역 (SEQ ID NO:35)

EVKFEESGGGLVQPGGSMKLCVASFVTSNYWMNWRQSPEKGLEWVAEIRLTSNKQAI

<186> YYAESVKGRFTISRDDS KSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCASLFYDGYLHWGQGTLTVSA

<187> MAb #471 VK 성숙 영역 (SEQ ID NO:31)

DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVGNFGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYT ASNQGS

<188> GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDSAMYFCQQSKEI PWT FGGGT KLEIK

<189> MAb #476 VH 성숙 영역 (SEQ ID NO:36)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHAT

<190> YYAESVKGRFTISRDDS KSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCTTPTLYGAMDYWGQGTSVTVSA

<191> MAb #476 VK 성숙 영역 (SEQ ID NO:32)

DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVHNFGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYT ASNQGS

<192> GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDTAMYFCQQGKEV PWT FGGGT KLEIK

<193> mAb #195 VH 성숙 영역을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:51)

GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCACCTGGAGGATCCATGAAACTC

TCCTGTGTTGCCCTCTGGATTCACTT CAGTA ACTACTGGATGA ACTGGGTCCGCCAGTCT

CCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATTGAAATCTAATAATTATGCAACA

CATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGTAGT

GTCTACCTGCAAATGAACAACTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTTATTACTGTACCAGG

<194> GAGGACTACTACGGCTACCCCTGACTACTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

<195> mAb #195 VK 성숙 영역을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:52)

GACATTGTGCTGACCCAGCTCCAGCTTCTGGCTGTCTCTAGGTCAAGAGGCCACC
 ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGATAATTTCGGCATTAGTTTATGAACGGTTC
 CAACAGAAACCTGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGTCATCCAACCAAGGATCC
 GGGGTCCCTGCCAGGTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
 CCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGG
 ACGTCGGTGGAGGCACCAAGCTGAAATCAAA

<196>

<197> mAb #309 VH 성숙 영역을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:53)

GAAGTGAAACTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTGGTTCAACCTGGAGGATCCATGAAACTC
 TCCTGTGTTGCCCTCTGGATTCACTTCAGTAACACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGTCT
 CCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTGCTGAAATTAGACTGAAATCTAATAAGGGTCAACA
 CATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTACCCATCTCAAGGGATGATTCCAAAAGTAGT
 GTCTACCTGCAAATGAACAACCTAACAGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTGCCAGC
 CTTTGATGATGGTTACATTACATTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

<198>

<199> mAb #309 VK 성숙 영역을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:54)

GACATTGTGCTGACCCAACTCCAGCTTCTGGCTGTCTCTAGGGCAAGAGGCCACC
 ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGTAATTTCGGCATTAGTTTATGAATTGGTTC
 CAACAGAAACCAAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATACTGCATCCAACCAAGGATCC
 GGGGTCCCTGCCAGGTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
 CCTATGGAGGAGGATGATTCTGCAATGTATTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGG
 ACGTCGGTGGAGGCACCAACTGAAATCAAA

<200>

<201> mAb #471 VH 성숙 영역을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:55)

GAAGTGAAAGTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTGGTGCAACCGGGAGGATCCATGAAACTC
 TCCTGTGTTGCCCTCTGGATTCACTTCAGTAACACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGTCT
 CCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTGCTGAAATTAGATTGACATCTAATAAGCAGGCAATA
 TATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGATTACCCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGT
 GTCTACCTGCAAATGAACAACCTAACAGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTGCCAGC
 CTTTCTATGATGGTTACATTACATTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

<202>

<203> mAb #471 VK 성숙 영역을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:56)

GACATTGTGCTGACCCAACTCCAGCTTCTGGCTGTCTCTAGGGCAAGAGGCCACC
 ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGTAATTTCGGCATTAGTTTATGAACGGTTC
 CAACAGAAACCAAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATACTGCATCCAACCAAGGATCC
 GGGGTCCCTGCCAGGTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
 CCTATGGAGGAGGATGATTCTGCAATGTATTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGATTCCGTGG
 ACGTCGGTGGAGGCACCAACTGAAATCAAA

<204>

<205> mAb #476 VH 성숙 영역을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:57)

GAAGTGAAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTC
 TCTGTGCTGCCCTCTGGATTCACTTTAGTGACGCCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCT
 CCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTGCTGAAATTAGAAGTAAAGCTAATAATCATGCAACA

<206>

TACTATGCTGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGT
 GTCTACCTGCAAATGAACAGCCTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTACGACC
 CCTACTCTCTATGGCGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTGCA

<207>

<208>

mAb #476 Vκ 성숙 영역을 코딩하는 DNA (SEQ ID NO:58)

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTGGCTGTCTCTGGCAGAGGGCCACC
 ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTTCATAATTGGCATTAGCTTATGAACGGTTC
 CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATACTGCATCCAACCAAGGATCC
 GGGGTCCCTGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTAACATCCAT
 CCTGTGGAAGAGGATGATACTGCAATGTATTCTGTCAACAAGGTAAGGAGGTTCCGTGG
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC

<209>

<210>

V 영역의 서열을 도 2에 제시된 바와 같이 정렬하였다. 서열 중의 위치 변화는 화살표로 표시한다. CDR 영역은 박스로 되어 있다. 정렬에 근거해서, 각 항체는 독립된 단리물로 표현되고, 항체는 서로 유사한 것으로 나타난다. 항체 309 및 471은 가깝게 관련되어 있고, 경쇄 중에 오직 하나의 치환, 위치 98에서 I1e/Va1 치환; 및 중쇄 중에 오직 6개의 치환이 있다. 이러한 항체는 체세포 돌연변이를 통해 변화되어, 진정으로 독립적일 수 없는 기원 IgM 클론으로부터 유래될 수 있다.

<211>

항체 195 및 476은 항체 309 및 471보다 서로 더욱 유사하다. 항체 195 및 476은 경쇄 중의 5 위치 및 중쇄 중의 18 위치가 상이하다. 항체 195 및 476의 중쇄 중의 CDR3의 분석은 이러한 사슬이 독립적인 V-D-J 연결화 사건에 의해 형성되어, 독립적인 IgM 부모로부터 유래된 항체를 나타낸다는 것을 암시하였다. 그러므로, 도 2 중의 항체 서열은 인간 IL-6에 결합하고 gp130과의 상호작용을 차단하는 항체의 3개 이상의 독립적인 선별을 나타낸다.

<212>

실시예 5. IL-6에 결합하고 gp130과의 상호작용을 차단하는 항체의 약동학적 특성.

<213>

마우스의 항체 195 및 476의 혈청 반감기를 측정하였다. 항체 195 및 476을 표준 절차에 따라 ¹²⁵I로 표지하였다. 약 25 μg의 표지된 항체 단백질을 Balb/C 마우스에 정맥 주사하고, 주사 후 12, 24, 48, 및 72시간을 포함하는 다양한 시간에 혈액 샘플을 채취하였다. 총 혈액 샘플 중의 방서능활성의 수준을 측정하였다. 상기 분석에 근거하여, 반감기의 제거는 각 항체에 대해 약 5일이었다. 예시적 데이터를 도 11에 제시한다.

<214>

실시예 6. 합토글로빈 분비의 생체 내 억제

<215>

본 발명의 항체를 수용체 서브유닛 gp130에 대한 IL-6의 결합을 억제하는 능력에 대해 특이적으로 선별하였다. 상기 실험에서, 가용성 IL-6Rα/IL-6 복합체의 투여에 의해 유도된 합토글로빈 분비를 측정하는 검정법을 사용하여, gp130-의존적 경로의 활성화를 생체 내 차단하는 시판 항 IL-6 항체 및 항체 Mab#471의 능력을 비교하였다.

<216>

제 0일에, 9주령 암컷 Balb/C 마우스 (치료군 당 n=3)에 항체 Mab#471 또는 R&D Systems로부터의 항-IL-6 시판 항체 (R&D Systems MAb #206) 100 μg을 200 μl 부피로 복막내 주사하였다. 양성 및 음성 대조군의 마우스에 200 μl PBS를 수여하였다. 24시간 후, 실험군 및 양성 대조군의 마우스에 4 μg muFc-IL6Rα-IL6을 200 μl 부피로 복막내 투여하여 합토글로빈 분비를 유도하고, 음성 대조군의 마우스에 200 μl PBS를 투여하였다. 처리 후 0, 8, 및 24시간에, 대략 100 μl의 혈액을 각 마우스로부터 후와 (retro-orbital) 출혈에 의해 수득하고, 혈장 분획을 단리하였다. 혈장 분획 중의 합토글로빈 농도를 제조자의 지침에 따라, 젖과 합토글로빈 ELISA 키트 (Immunology Consultants Laboratory, Inc., Newberg, OR, Cat # E90HPT)를 사용하여 측정하였다.

<217>

도 12에서 제시되는 바와 같이, 항체 Mab#471-처리된 마우스 중의 합토글로빈 수준은 유의하게 더 적은, 24시간에 양성 대조군에서 나타난 수준의 약 30% 이었고, 또한 시판 항체 MAb #206으로 처리된 마우스에서보다 유의하게 낮았다. 음성 대조군의 마우스에서 나타난 합토글로빈의 증가된 수준은 반복된 후와 출혈 절차에 의해 야기된 자극 때문인 것 같다. 그러므로, Fc-IL6Rα-IL6에 의해 유의하게 야기된 합토글로빈 분비의 실제 억제는 대조군 마우스에서 나타난 합토글로빈 분비의 배경을 뺀 때, 심지어 70% 초과이다. 상기 결과는 IL-6에 결합하고, gp130 수용체 서브유닛과의 그의 상호작용을 차단하는 본 발명의 항체, 예를 들어, 항체

#471 가, 미리 형성된 IL-6R α / IL-6 복합체에 의해 활성화될 수 있는 gp130-의존적 신호 경로를 억제하는데 유효하다는 것을 나타낸다.

<218> 실시예 7. 생체 내 항-종양 활성.

항체 Mab#195, Mab#309, Mab#471 및 Mab#476 을 생체 내 항-종양 활성에 대해 시험하였다. IL-6 을 분비하고, IL-6 가 성장 인자인 PC3-MM2 세포를 사용하여 SCID 마우스에서 폐 전이 모델을 설정하였다. 약 2.0 x 10⁶ PC3-MM2 세포를 각 마우스에 i.v. 주사하였다. 11 일 후, 마우스를 단일클론 항체 Mab#195, Mab#309, Mab#471 및 Mab#476 의 5 μ g/ml 의 5 회 1 일 투여량으로 처리하였다. 전형적인 결과를 도 13 에 제시한다. 도 13 에 예증된 바와 같이, 항체 Mab#195, Mab#309, Mab#471 및 Mab#476 은 마우스에서 폐 전이를 억제한다.

<220> 또다른 실험을 통상 10 일 대신, 후 세포 주사 오직 5 일 후에 항체 처리를 사용하여 수행하였다. 유사한 결과가 수득되었다.

<221> 실시예 8. 인간 불변 영역을 가진 항-IL-6 항체의 구축.

<222> 항체 Mab#471로부터의 V 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 IL-6에 대항하는 키메라성 항체를 미국 특허 제 6,969,517 호 (Gillies et al., 이의 교시는 본원에 참조로서 인용됨)에 기재된 기술에 의해 구축하였다. Mab#471의 V 영역을 코딩하는 DNA 서열을 하기 올리고뉴클레오티드를 사용하는 PCR 증폭에 의해 수득하였다. 소문자 영역은 어댑터에, 대문자 영역은 V 영역에 특이적이다.

VL 정방향 (Afl II 부위를 가짐): cttaagcGACATTGTGCTGACCCAATC
(SEQ ID NO:59)

VL 역방향 (Bgl II 부위를 가짐): agatctacttacgTTTGATTCCAGTTGGTGCC
(SEQ ID NO:60)

VH 정방향 (Afl II 부위를 가짐): cttaagcGAAGTGAAGTTGAGGAGTC
(SEQ ID NO:61)

VH 역방향 (Hind III 부위를 가짐): aagcttacttaccTGCAGAGACAGTGACCAAG
(SEQ ID NO:62)

<223> 수득된 마우스-유래 서열을 미국 특허 제 6,969,517 호, 실시예 3에 기재된 바와 같이 항체 발현 벡터에 삽입하여, 인간 카파 경쇄 및 인간 IgG1 중쇄를 갖는 키메라성 항체를 코딩하는 발현 플라스미드를 발생시켰다.

<224> 안정하게 트랜스펙션된 인간 세포 클론을 수득하기 위해, 플라스미드 DNA를 하기 기재되는 바와 같이 전기천공에 의해 마우스 골수종 NS/0 세포 내에 도입하였다. NS/0 세포를 10% 우태 혈청이 보충된 둘베코 변형 이글 배지에서 성장시켰다. 약 5x10⁶ 세포를 PBS로 1 회 세정하고, 0.5 ml 인산염 완충용액 (PBS)에 재현탁하였다. 그 다음 10 μ g의 선형화 플라스미드 DNA를 냉상에서 10 분 동안 Gene Pulser[®] Cuvette (0.4 cm 전극 캡, BioRad) 중에서 세포와 인큐베이션하였다. 0.25 V로 설정된 Gene Pulser[®] (BioRad)를 사용해서 전기천공을 수행하고, 500 μ F 세포를 냉상에서 10 분 동안 회복시키고, 그 후 이들을 성장 배지에 재현탁시킨 다음 2 개의 96-웰 플레이트에 깔았다. 안정하게 트랜스펙션된 클론을 트랜스펙션-후 2 일에 도입된, 100 nM 메토트렉세이트 (MTX)의 존재하의 성장에 의해 선별하였다. 세포에 매 3 일 동안 2 내지 3 회 이상으로 영양을 공급하고, MTX-저항성 클론은 2 내지 3 주에 나타났다. 클론으로부터의 상청액을 항-인간 Fc ELISA로 검정하여, 고 생산자를 확인하였다 (Gillies et al. (1989) *J. Immunol. Methods*, 125:191). 고 생산 클론을 단리하고, 100 nM MTX 함유 성장 배지에서 증식시켰다.

<225> 키메라성 471 항체가 원하는 특성을 보유하는지를 확인하기 위해, 상기 분자를 상기 실시예 6에 기재된 바와 같이, 시험관 내 합토글로빈 생성 억제에 대해; LP-1 골수종 세포의 증식 억제에 대해; 및 상기 실시예 6에 기재된 바와 같이, 생체 내 합토글로빈 생성 억제에 대해 시험하였다. 대조군으로, 항-IL-6 항체 Mab 206 (R&D Systems; Minneapolis, Minnesota) 및 CNTO-328 (Zaki M. H. et al., *Int. J. Cancer*, (2004) 111:592-5)을 사용하였다.

<226> 안정하게 트랜스펙션된 세포주로부터 생성된 키메라성 471 항체 (Ch 항 IL-6 #471)의 합토글로빈 분비에 대한

효과는 하기 표에 나타난다. 일시적으로 트랜스펙션된 세포로부터 생성된 키메라성 471 항체에서 유사한 결과가 수득되었다.

	합토글로빈 억제		
	IC50(ng/ml)	AVG	SD
			반복
Ch 항 IL-6 # 471 + IL-6	1.89	0.42	2
MAb 206+ IL-6	16.08	12.48	2
Ch 항 IL-6 CNTO-328 + IL-6	5.19	0.88	2
Ch 항 IL-6 # 471 + IL-6Ra-IL-6	1.31	0.57	3
MAb 206+ IL-6Ra-IL-6	4.80	2.64	3
Ch 항 IL-6 CNTO-328 + IL-6Ra-IL-6	>333	0.00	3

<228>

<229> 결과는 키메라성 항체 471 이 IL-6 및 IL-6/IL-6R α 융합 단백질 모두의 작용을 억제하는데 효과적이라는 것을 나타낸다. 대조적으로, Mab#206 은 IL-6 또는 IL-6/IL-6R α 융합 단백질에 의해 자극받은 합토글로빈 분비를 억제하는데 비교적 효과가 없고, CNTO-328 은 IL-6/IL-6R α 융합 단백질에 의해 자극받은 합토글로빈의 억제에 큰 부족함을 보인다.

<230>

키메라성 항체 471 은 또한 LP-1 골수종 세포의 증식을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. LP-1 은 증식이 IL-6 에 의해 자극될 수 있는 인간 골수종 세포주이다.

<231>

LP-1 세포 증식 검정법을 하기와 같이 수행하였다. LP-1 세포를 DSMZ (cat # ACC 41) (Georgii-Hemming P. et al. *Blood* (1996) 88:2250)로부터 구입하였다. 세포를 20% FBS 에 배양한 다음, 증식 검정법 전에 1% FBS 배지에서 3 일 동안 단식시켰다. 단식 후, 세포를 3 회 세정하고, 0.5% FBS 함유 배지 내로 회석시켰다. 항-IL-6 항체를 회석하고 37 °C 5% CO₂ 에서 1 시간 동안 0.005 ng/ml IL-6 또는 0.05 ng/ml Fc-IL6R α -IL6 융합 단백질 자극으로 플레이트에서 인큐베이션시켰다. 그 다음 100 μ l 중의 약 100,000 세포를 100 μ l 의 회석된 단백질 및 자극으로 96 웰 플레이트의 웰에 첨가하고, 56 시간 동안 인큐베이션한 다음, ³H 티미딘을 마지막 16 시간 동안 첨가하였다. 그 다음 세포를 유리 미세섬유 필터 플레이트 위에서 물로 웰로부터 수화하고, 방사능활성을 액체 섬광 계수기에 의해 측정하였다.

<232>

하기 표는 안정적으로 트랜스펙션된 세포주로부터 생성된 키메라성 471 항체로의 전형적인 결과를 보여준다. 일시적으로 트랜스펙션된 세포로부터 생성된 키메라성 471 항체로부터 유사한 결과가 수득된다.

	LP-1 증식		
	IC50(ng/ml)	AVG	SD
			반복
Ch 항 IL-6 # 471 + IL-6	5.15	2.27	3
MAb 206+ IL-6	341.87	234.58	3
Ch 항 IL-6 CNTO-328 + IL-6	10.07	1.42	3
Ch 항 IL-6 # 471 + IL-6Ra-IL-6	0.39	0.36	3
MAb 206+ IL-6Ra-IL-6	7.77	8.08	3
Ch 항 IL-6 CNTO-328 + IL-6Ra-IL-6	1608	539	3

<233>

<234> 결과는 키메라성 471 항체가 IL-6 및 IL-6/IL-6R α 융합 단백질 모두에 의해 자극된 LP-1 증식을 억제하는데 유효하다는 것을 나타낸다. 대조적으로, Mab#206 은 IL-6 에 의해 자극된 LP-1 증식을 억제하는데에는 효과가 없고, CNTO-328 은 IL-6/IL-6R α 융합 단백질에 의해 자극된 LP-1 증식의 억제에 큰 부족함을 보인다.

<235> 키메라성 471 항체 및 다양한 대조 항체의 생체 내 합토글로빈 분비에 대한 억제 효과를 또한 실시예 6에 기재된 바와 같이 시험하였다.

<236> 하기 결과가 수득되었다.

	0 시간 ug/ml 합토글로빈		8 시간 ug/ml 합토글로빈		24 시간 ug/ml 합토글로빈		8 시간 % 억제	24 시간 % 억제	TTEST VS PBS
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD			
비-처리	0.8	0.1	0.8	0.9	4.2	4.7			
PBS	0.6	0.1	24	17	113	170			
Fc-IL6R α -IL6	0.8	0.1	463	128	994	125			
Ch 471	1.0	0.2	83	61	214	176	82	78	0.01 0.00
CNTO 328	0.8	0.2	406	58	1027	91	12	-3	0.52 0.73
R&O									
MAB206	0.6	0.3	297	71	672	58	36	32	0.12 0.02
항-CD19 chB4	0.8	0.1	487	138	1335	346	-5	-34	0.86 0.18

<237>

<238> 상기 결과는 키메라성 471 항체 (상기 표에서 Ch 471로 언급됨) 가 IL-6/IL-R α 복합체에 의해 자극된 합토글로빈 분비를 강하게 차단하는 반면, Mab#206 및 CNTO-328와 같은 대조 항체는 합토글로빈 분비의 억제가 덜 유효하거나 효과가 없다는 것을 나타낸다.

<239> 실시예 9. 본 발명의 항체 및 방법으로의 인간 환자의 치료

<240> 본 발명의 항-IL-6 항체는 인간 질환 및 장애를 치료하기 위해 하기와 같이 사용된다. 일반적으로, 바람직한 투여 방법은 i.v. 주입 또는 i.v. 주사이나, 피하 주사, 흡입, 경구 전달, 및 기타 방법이 또한 가능하다. 매 2, 3 또는 4 주에 약 1 회 투여가 사용되나, 투여 빈도는 환자의 필요에 따라 달라질 수 있다. 전형적인 투여량은 성인에 대해 약 100 내지 800 mg 이다. 치료된 환자는 면역억제로부터 야기될 수 있는 감염정후에 대해 모니터된다.

<241> 예를 들어, 캐슬맨 질환 환자를 본 발명의 키메라성 471 항체로 매 2 주에 약 1 회 약 8 mg/kg 의 투여량으로, 적가 주입에 의해 투여하여 치료한다.

<242> 류마티스 관절염 환자를 키메라성 471 항체로 매 4 주에 약 1 회 약 8 mg/kg 의 투여량으로, 적가 주입에 의해 투여하여 치료한다. 관절 과과 진행은 심지어 질환-변형 항-류마티스성 약물과 비교시에도, 단일요법 (monotherapy)에 의해 유의하게 억제되는 것으로 밝혀졌다.

<243> 크론 질환 환자를 본 발명의 키메라성 471 항체로 매 4 주에 약 1 회 약 8 mg/kg 의 투여량으로, 적가 주입에 의해 투여하여 치료한다.

<244> 다발성 골수종 환자를 키메라성 471 항체로 매 3 주에 약 1 회 약 8 mg/kg 의 투여량으로, 적가 주입에 의해 투여하여 치료한다. 키메라성 471로의 치료는 의사가 환자에 적합한 것으로 결정한대로 다발성 골수종에 대한 표준-관리-치료와 조합된다.

<245> 통상의 화학요법으로 치료된 이력을 가진, 진행된 전이성 전립선 암 환자를 키메라성 471 항체로 매 3 주에 약 1 회 약 8 mg/kg 의 투여량으로, 적가 주입에 의해 투여하여 치료한다. 키메라성 471 항체로의 치료는 의사가 환자에 적합한 것으로 결정한대로 전립선 암에 대한 표준-관리-치료와 조합된다. 비-스테로이드성 항-염증 약물, 예를 들어 NaproxenTM 가 또한 처방된다. 전 화학요법의 결과로서, 환자는 백혈구가 저하되고 나이브 (naive) T 세포 수준이 낮아진다. 환자를 면역억제로부터 야기되는 감염에 대해 특히 밀접하게 모니터하고, 예방 항생제를 제공한다. 치료가 카女性朋友-유형 증상, 예컨대 골 감소에 긍정적인 효과가 있음이 밝혀졌다.

<246> 호르몬-불응성 유방암 환자를 키메라성 471 항체로 매 3 주에 약 1 회 약 8 mg/kg 의 투여량으로, 적가 주입에 의해 투여하여 치료한다. 키메라성 471 항체로의 치료는 의사가 환자에 적합한 것으로 결정한대로 진행된

유방암에 대한 표준-관리-치료와 조합된다. 비-스테로이드성 항-염증 약물, 예를 들어 Naproxen™ 가 또한 처방된다.

<247> 대안적인 치료 전량에서, 진행된 호르몬-불응성 전립선 암 또는 진행된 호르몬-불응성 유방암 환자를 키메라성 471 항체로 매 3 주에 약 1 회 약 8 mg/kg 의 투여량으로, KS-IL2 와 같은 면역사이토카인과 조합으로 치료한다.

<248> 이러한 2 가지 작용제는 적가 주입에 의해 함께 투여될 수 있다. 치료 전, 환자는 면역자극 양의 시클로포스파미드를 투여받는다. 비-스테로이드성 항-염증 약물, 예를 들어 Naproxen™ 가 또한 처방된다. 이론에 구애됨 없이, 부분적으로 IL-6 이 IL-12 신호 및 TH1 응답의 억제를 야기하여, 본 발명의 항체가 상기 억제를 반대로 하기 때문에, 본 발명의 항-IL6 항체와 KS-IL2 과 같은 면역사이토카인의 조합이 특히 유효하다.

<249> B 세포 림프종 환자를 키메라성 471 항체로 매 3 주에 약 1 회 약 8 mg/kg 의 투여량으로, 임의로 매주 투여되는, Rituxan™ 과 같은 항체로, 체표면적 m^2 당 약 375 mg 과 조합으로 치료한다. 대안적으로는, 불응성 림프종 환자의 경우, 키메라성 471 항체로의 치료는 Bexxar™ 또는 Zevalin™ 과 같은 방사능면역컨쥬게이트와 조합된다.

도면의 간단한 설명

<75> 도 1A 는 질환 세포 또는 IL-6 과생산을 야기하는 다른 표적 세포에 대한 gp130 의 바람직하지 않은 활성화를 묘사한다.

<76> 도 1B 는 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하고, IL-6 에 대한 그의 결합이 미리-결합된 sIL-6R α 에 의해 영향을 받지 않는 IL-6 길항체를 묘사한다.

<77> 도 2 는 본 발명의 예시적 항체 V 영역 서열의 정렬을 나타낸다. 서열 중의 변이의 위치는 화살표로 표시된다. CDR 은 박스로 되어 있다.

<78> 도 3 은 본 발명에서 사용된 예시적 단백질 구현예의 구조도이다.

<79> 도 4 는 Fc-IL6R α -IL6 에 대한 본 발명의 예시적 항체의 결합을 반영한 실험 결과를 나타낸다.

<80> 도 5 는 IL-6 에 대한 본 발명의 예시적 항체의 결합을 반영한 실험 결과를 나타낸다.

<81> 도 6 은 비-공유적으로 복합체를 형성한 IL-6 과 IL-6R α 에 대한 본 발명의 예시적 항체의 결합을 반영한 실험 결과를 나타낸다.

<82> 도 7 은 IL-6R α 단독에 대한 본 발명의 예시적 항체의 결합을 반영한 실험 결과를 나타낸다.

<83> 도 8 은 본 발명의 예시적 항체가 Fc-IL6R α -IL6 과 gp130 사이의 상호작용을 억제하는 것을 예증하는 실험 결과를 보여준다.

<84> 도 9 는 본 발명의 예시적 항체에 의해 Fc-IL6R α -IL6 복합체로 자극받은 HepG2 세포로부터 합토글로빈 방출을 차단하는 능력을 예증하는 실험 결과를 보여준다.

<85> 도 10A 는 Fc-IL6R α -IL6 융합 단백질이 A431 인간 상피 암종 세포의 증식을 자극한다는 것을 반영하는 실험 결과를 묘사한다.

<86> 도 10B1 및 10B2 는 본 발명의 예시적 항체가 Fc-IL6R α -IL6 융합 단백질에 의해 자극된 A431 인간 상피 암종 세포의 증식을 억제한다는 것을 반영하는 실험 결과를 묘사한다.

<87> 도 11 은 본 발명의 예시적 항체의 약동학적 특성을 예증한다.

<88> 도 12 는 실시예 6 에 기재된 절차를 사용하여, 본 발명의 예시적 항체에 의한 합토글로빈 분비의 생체 내 억제를 반영하는 실험 결과를 나타낸다.

<89> 도 13 은 본 발명의 예시적 항체에 의한 폐 전이의 억제를 반영하는 실험 결과를 나타낸다.

발명의 상세한 설명

<91> 본 발명은 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 효과적으로 차단하여, 미리 형성된 IL-6/IL-6R α 복합체의 존재에서 IL-6 신호를 억제하는 신규 IL-6 길항체를 제공한다. 상기 논의한 바와 같이, IL-6 이 질환 또는 장애의 일부로서 생성되는 경우 IL-6R α 와 전형적으로 복합체를 형성하므로, 본 발명은 IL-6 과 IL-6R α 사이의 상

호작용을 차단하는 현존 항체와 비교해 더욱 양호한 치료 효과를 달성한다 (van Zaanen et al., (1996) J. Clin. Invest., 98(6): 1441-8).

<92> 하나의 특정 구현예에서, 본 발명은 결합이 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하는 식으로 IL-6 상의 영역에 결합하는 항체 가변 영역을 함유하는 IL-6 길항체를 제공한다. "입체적으로 차단하는" 이라는 것은 제 1 단백질에 대한 제 3 단백질의 결합에 의한 제 1 및 제 2 단백질 사이의 상호작용의 차단의 의미를 의미한다. 제 1 및 제 3 단백질 사이의 결합은 제 2 단백질을 제 2 및 제 3 단백질 사이의 비호의적인 반데르발스 (van der Waals) 또는 정전기적 상호작용으로 인한 제 1 단백질에 대한 결합으로부터 방해한다.

<93> 본 발명은 또한 본 발명의 IL-6 길항체에 근거한 IL-6 이 관여되는 질환, 장애 및 부작용의 치료용 조성물 및 방법을 제공한다.

<94> 본 발명의 다양한 양상은 하기 부차 섹션에서 더욱 상세히 기재된다. 부차 섹션의 용도는 본 발명을 제한하는 것을 의미하지 않는다. 각 부차 섹션은 임의의 본 발명의 양상에 적용할 수 있을 것이다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 다르게 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "포함하다" 및 용어의 변형, 예컨대 "포함하는" 및 "포함"은 기타 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하는 것으로 의도되지 않는다.

IL-6 및 IL-6R α 와 gp130 과의 상호작용

<95> IL-6 신호는 IL-6 수용체 α (IL-6R α) 서브유닛 및 gp130, IL-6 에서 STAT3 으로의 신호를 전달하는 막통과 수용체 단백질과의 상호작용에 의해 일어나고, 그 다음 이것은 다양한 유전자의 전사를 활성화시키는 것으로 이해된다. 신호 복합체의 세포외 부분의 구조는 결정되었다 (Boulanger et al., (2003), Science, 300:2101, 이의 교시는 본원에 참조로서 인용됨). 상기 구조는 신호 복합체가 IL-6 2 카페, IL-6R α 서브유닛 2 카페, 및 gp130 2 카페를 함유하는 것을 나타낸다. 또한 구조 분석은 부위 I, II 및 III 으로 공지된 3 개의 보존된 에피토프를 통해 IL-6 이 gp130 수용체에 결합하는 것을 나타낸다. IL-6 은 먼저 부위 I 을 통해 IL-6R α 와 복합체를 형성해야만 한다. 부위 II 는 IL-6 및 IL-6R α 의 2원 복합체에 의해 형성된 복합 에피토프이고, 이것은 gp130 의 사이토킨 결합 영역 CHR 및 D2D3 과 상호작용한다. 이어서, 부위 III 은 gp130 면 역글로불린-유사 활성화 도메인 (D1 또는 IGD) 과 상호작용하여 적격 (competent) 신호 6량체 복합체를 형성한다 (Boulanger et al., (2003) Science, 300:2101, 이의 교시는 본원에 참조로서 인용됨). IL-6 의 부위 I 결합 에피토프는 A 및 D 나선에 위치하고 IL-6R α 와 반응한다. 6량체 중에 남아있는 4 개의 독특한 단백질-단백질 경계면은 2 개의 복합 부위, 부위 II 및 III 내로 분리될 수 있다. 6량체 복합체의 3차원 구조의 연구는 다수의 IL-6 의 잔기가 IL-6 과 gp130 사이의 상호작용에 참여하고, 이에 중요하다는 것을 밝혔다. 이러한 잔기에는 Leu19, Arg24, Lys27, Arg30, Tyr31, Asp34 및 Trp157 이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

<96> 그러므로, 6량체 복합체 형성의 효과는 gp130 를 이량체화하고, 그의 세포내 도메인을 병렬시켜, 신호가 세포내 수준에서 지속된다. IL-6R α 서브유닛은 세포내 도메인을 가지지 않으며, 오직 복합체를 안정화시키는 것만 담당한다. 포유류 IL-6 은 IL-6R α 의 부재하에서 gp130 에 결합할 수 없다. 정규의 IL-6R α 서브유닛은 3 개의 세포외 도메인 및 IL-6R α 서브유닛을 발현 세포의 막에 고정시키는 막통과 영역을 갖는다. "가용성 IL-6R α " 또는 "sIL-6R α " 는 IL-6R α 서브유닛의 세포외 부분을 가지나, 막통과 분절은 결핍된 단백질을 의미한다. 막통과 분절이 결핍된 sIL-6R α 변이체 단백질은 IL-6R α 를 코딩하는 대안적으로 스플라이싱된 mRNA 의 번역에 의해, 또는 IL-6R α 의 막-결합 형태의 단백질 가수분해 분할에 의해 발생될 수 있다.

<97> sIL-6R α 는 혈청에 존재하고, 또한 IL-6 을 발현하는 동일한 세포에 의해 분비될 수 있다. IL-6 은 sIL-6R α 와 복합체를 형성한다. 일단 IL-6/sIL-6R α 복합체가 형성되면, 이것은 상당히 안정하고, IL-6/sIL-6R α 상호작용과 경쟁하는 항체에 의해 결합될 수 있다. IL-6/sIL-6R α 복합체는 IL-6 단독과 비교해 유의하게 확장된 혈청 반감기를 갖는다. 체내의 특정 세포, 예컨대 B 세포만이, IL-6R α 및 gp130 모두를 갖는 반면, 많은 부가적인 세포는 오직 gp130 만을 갖는다. IL-6/sIL-6R α 복합체는 오직 gp130 만을 갖는 세포에 결합할 수 있고 신호 전달을 자극할 수 있다. 그 결과, 많은 세포에 대한 gp130 의 바람직하지 않은 활성화는 IL-6 과생산을 산출할 수 있다 (도 1A). 그러므로, IL-6 과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하는 항체 또는 기타 분자는 바람직하지 않은 IL-6 신호를 억제하는데 특히 유용할 수 있다 (도 1B 참조).

IL-6 길항체는 gp130 과의 상호작용을 입체적으로 차단함

<98> 그러므로, 도 1B 에서 제시된 바와 같이, 본 발명은 gp130 과의 상호작용을 입체적으로 차단하고 IL-6 에 대한

그의 결합이 미리 결합된 sIL-6R α 에 의해 영향을 받지 않는, IL-6 길항제를 고려한다. 본 발명의 "IL-6 길항제"에는 항체 또는 그의 조각; 항체의 기능적 등가물; 변형 항체, 예컨대, 단일 사슬 항체, 키메라성 항체; 또는 gp130에 대한 결합을 입체적으로 방해하기 위해 IL-6 또는 IL-6/IL-6R α 복합체와 결합 또는 회합할 수 있는 기타 단백질 또는 분자가 포함된다.

<101> 바람직한 구현예에서, 본 발명의 IL-6 길항제는 IL-6 또는 IL-6/IL-6R α 복합체 상의 영역 또는 에피토프에, 결합이 IL-6과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하는 식으로 결합하는 항체 가변 영역을 함유한다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 IL-6 길항제는 항체이다. 예를 들어, IL-6/IL-6R α 복합체와 gp130 사이의 상호작용에 직접적으로 참여하는 임의의 영역 또는 에피토프에 대한 항체 가변 영역의 결합은 gp130에 대한 결합을 입체적으로 방해하기에 충분하다. 또한, 상호작용에 직접적으로 참여하는 것들에 인접한 임의의 영역 또는 에피토프에 대한 결합은 또한 IL-6/IL-6R α 와 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단하기에 충분할 수 있다. 이러한 영역 또는 에피토프는 IL-6, IL-6R α 상에, 또는 IL-6과 IL-6R α 의 복합체에 의해 오직 형성된 복합 부위로서 존재할 수 있다. 특히, 결합이 IL-6과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단할 수 있기에 적합한 에피토프에는 하기 아미노산: 인간 IL-6의 Leu19, Arg24, Lys27, Arg30, Tyr31, Asp34 및 Trp157 중 하나 이상을 포함하는 임의의 에피토프가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

항체의 발생은 IL-6과 gp130 사이의 상호작용을 입체적으로 차단함

<103> 그러므로, 본 발명의 하나의 중요한 특성은 IL-6/IL-6R α 복합체에 결합하고, IL-6/gp130 상호작용을 입체적으로 차단하는 항체의 단리이다. 이러한 항체는 폴리클론 또는 단일클론일 수 있다. 본 발명에 따르면, 이러한 항체는 하기 방법에 의해 발생될 수 있다. 제 1 단계에서, 마우스, 래트, 래빗, 또는 기타 포유류를 IL-6 및 IL-6R α 를 포함하는 단백질 조성물로 면역화시킨다. IL-6 및 IL-6R α 가 복합체를 형성하게 하는 것이 바람직하다. 복합체의 형성을 용이하게 하기 위해, IL-6 및 IL-6R α 는 예를 들어, 화학적 가교 또는 폴리펩티드 연결자를 통한 연결에 의해 공유결합될 수 있다. 이론에 구애됨 없이, 이러한 면역화의 목표는 IL-6의 오직 노출된 표면만이 gp130에 결합된 표면 또는 비-중화 표면이 되는 것이다. IL-6R α 에 의해 입체적으로 차단되는 항체가 발생되지 않아야 한다. 특히 바람직한 면역원에는 공유 결합된 IL-6 및 가용성 IL-6R α 가 포함되고, 이것은 IL-6 및 IL-6R α 시험관 내 결합시킨 다음, 표준 절차에 따른 화학적 가교제로 처리하거나, 또는 바람직하게는 예를 들어 Peters et al. (*J. Immunol.*, (1998) 161:3575-81, 이의 교시는 본 원에 참조로서 인용됨)에 기재된 바와 같은 연결자에 의해 부착된, 융합 단백질로서 IL-6 및 가용성 IL-6R α 를 발현시켜 만들어질 수 있다. 본 발명에 따르면, 전형적으로, IL-6 및 IL-6R α 를 포함하는 면역원 융합 단백질에는 또한 항원 제시를 용이하게 하는 부가적인 부분, 예컨대 Fc 영역이 포함된다. 단백질 조성물은 또한 다양한 표준 방법 중 임의의 것에 따른 면역보강제의 유무하에서 포유류에 투여될 수 있다. 조성물은 오직 1회 투여될 수 있으나, 바람직하게는 표준 추가접종 스케줄에 따라 1회 초과로 투여된다.

<104> 제 2 단계로서, 폴리클론 항혈청을 면역화된 포유류로부터 수확한다. 폴리클론 혈청은 직접적으로 사용될 수 있거나, 표준 방법에 따라 친화성-정제될 수 있다. 대안적으로는, 단일클론 항체의 발생 방법이 개시된다. 항체-생성 세포는 면역화된 동물로부터, 예를 들어 비장의 수술적 제거 또는 PBMC의 회수 및 연이은 분류에 의해 제거된다. 그 다음 잠재적인 항체-생성 세포는 표준 절차에 따라 불멸화 세포주와의 융합에 의해 불멸화되고, 마이크로터터 웰 내에 클로닝하고, 면역원에 결합하는 항체의 생성에 대해 스크리닝된다.

<105> 제 2 단계로서, 또다른 구현예에서, 디스플레이 라이브러리는 비-면역화 또는 면역화 동물로부터 적합한 세포의 단리 후 항체 V 영역을 코딩하는 핵산의 단리, V 영역-코딩 핵산의 파지, 효모, 박테리아, 또는 기타 복제가능한 유전적 디스플레이 시스템 내로의 삽입에 의해 발생된다. 그 다음 라이브러리 일원은 IL-6/IL-6R α 복합체에 결합하는 그들의 역량에 대해 스크리닝된다.

<106> 제 3 단계로서, 일부 구현예에서, 단일클론 세포주에 의해 생성되는 항체 또는 라이브러리로부터 선택된 항체 V 영역은 임의로 하기와 같이 제 2 차 스크리닝에 적용된다. 구체적으로, 항체 클론 또는 항체 V 영역은 IL-6 단독에 결합하는 능력, IL-6R α 단독에 결합하는 능력, IL-6/IL-6R α 복합체 단독에 결합하는 능력, 및 IL-6/IL-6R α 복합체와 gp130 사이의 상호작용을 억제하는 능력에 대해 시험된다. 이러한 시험 결과로부터, 항체 또는 항체 V 영역은 여러 군으로 분류될 수 있다: IL-6에 결합하고 gp130과의 상호작용을 차단하는 중화 항체, IL-6R α 에 결합하는 항체, IL-6에 결합하는 비-중화 항체, IL-6/IL-6R α 복합체에 결합하나 IL-6 또는 IL-6R α 단독에 결합하지 않고 gp130과의 상호작용을 차단하는 중화 항체, 및 IL-6에 결합하고 IL-6R α 와의 상호작용을 차단하는 중화 항체. 마지막을 제외한 각 계열의 항체가 예상된다. 이러한 결합 및 신호 검정법은 단백질 생화학 및 신호 전달 분야에서 잘 공지되어 있으며, 특정 구현예가 실시예에서 추가로 상세화된

다.

항체의 동정은 IL-6 의 혈청 반감기를 유의하게 확장하지 않음

<107> 항-IL-6 항체의 하나의 바람직하지 않은 효과는 이들이 종종 IL-6 의 혈청 반감기를 연장한다는 것이다. IL-6 의 분자량은 약 25,000 달톤이고, 이것은 50,000 달톤의 콩팥 제거율 역치의 상당히 미만인 반면, 항체-IL-6 복합체의 분자량은 150,000 달톤 초파이다. 항-IL-6 항체/항원 복합체의 형성은 복합체의 분자량이 콩팥 제거율 역치보다 훨씬 더 크기 때문에 일반적으로 IL-6 의 혈청 반감기를 연장하는 효과를 갖는다. 그러므로, 본 발명은 또한 IL-6 또는 IL-6/IL-6R α 복합체에 결합하나 IL-6 의 혈청 반감기를 유의하게 확장하지 않는 항체를 확인하는 방법을 제공한다.

<108> 제 1 단계로서, 방법에는 항-IL-6 항체의 패널 단리가 포함된다. 제 2 단계로서, 그 다음 항체를 예를 들어 하기와 같이, IL-6 혈청 반감기에 대한 효과에 대해 시험한다. IL-6 을 설치류와 같은 동물에게 투여한다. 방사능 IL-6 과 같은, 표지된 형태의 IL-6 을 사용하는 것이 편리하다. 시험되는 항체는 또한 바람직하게는 상이한 경로의 투여에 의해, 동일한 동물에게 투여된다. 음성 대조군으로서, PBS 는 항체 또는 IL-6 대신에 투여된다. 혈청 샘플을 단백질 투여 후 다양한 시간에 수득하고, 표준 기술에 따라 IL-6 및 항체 수준에 대해 시험하였다. 예를 들어, 방사능표지, 요오드화된 IL-6 은 방사능 계수기를 사용하여 정량화될 수 있고, 항체는 IL-6 포획에 근거한 ELISA 법에 의해 검출될 수 있다.

<109> 일부 항체는 다른 것과 비교해 확장된 약동학적 프로파일을 가지며, 일부 항체는 IL-6 의 약동학을 향상시키는 반면, 다른 항체는 적당한 확장 또는 본질적으로 전혀 확장시키지 않는다는 것으로 고려된다. 특정 적용에 따라, 본 발명의 바람직한 항체의 하나의 계열은 호의적인 약동학적 프로파일을 가지나, IL-6 의 약동학적 프로파일을 유의하게 확장하지 않는 것들이다.

항체 가변 영역의 서열

<110> 상기 기재된 방법에 따라 확인된 항체 V 영역의 서열은 당업계에 공지된 표준 서열분석 방법을 사용하여 특징화된다. 예시적 방법은 실시예 4 에 상세히 기재되어 있다. IL-6 에 결합하고 gp130 과의 상호작용을 차단하는 항체 중쇄 및 경쇄 V 영역의 예시적 서열은 도 2 에 제시된다. 도 2 는 또한 본 발명의 방법에 따라 확인된 항체 V 영역 서열의 정렬을 예증한다. 서열 중의 위치 변화는 화살표로 표시된다. CDR 영역은 박스로 되어 있다.

<111> 본 발명의 V 영역은 인간 불변 영역과 배열되어 키메라성 항체를 형성할 수 있다. 예시적 키메라성 항체에는 도 2 에 기재된 VH 및 VL 영역 및 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, 또는 IgM 유래의 불변 영역이 포함될 수 있다. 대안적으로는, 본 발명의 항체는 PCT 공개 WO 02/072605 (이의 개시는 본원에 참조로서 인용됨)에 기재된 바와 같이, 잡종 동종형 불변 영역과 함께 발현될 수 있다. 본 발명의 V 영역은 또한 Fab 부분, CH2 도메인이 결핍된 "미니체"로서, 또는 단일-사슬 Fv 부분으로서 배열될 수 있다. 상기 후자의 배열은 전체 항체보다 작고, 향상된 확산 특성을 가지며, 이것은 효과적인 조직 침투가 필요한 상황, 예컨대 IL-6 을 분비하는 종양의 치료에 유용할 수 있다.

발현

<112> 본 발명의 항체 가변 영역을 함유하는 항체 및 단백질은 바람직하게는 포유류 세포, 예컨대 NS/0 세포, CHO 세포, SP2/0 세포, BHK 세포, 또는 기타 포유류 세포에서 발현된다. 포유류 세포 중의 항체의 발현은 단백질 공학 분야에서 잘 알려져 있다. 항체는 또한 식물 세포, 예컨대 옥수수 또는 담배, 곤충 세포, 예컨대 배풀로바이러스 벡터를 통해, 진균 세포, 예컨대 S. 세레비지아에 (*S. cerevisiae*) 또는 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 또는 더 작은 배열, 예컨대 단일-사슬 Fv 분자를 발현하는데 가장 유용한 박테리아 세포에서 발현될 수 있다.

투여

<113> 본 발명의 IL-6 길항체는 IL-6 의 발현이 관여되는 다양한 질환 및 장애의 치료에 사용된다. 이러한 질환 및 장애에는 암, 예컨대 호르몬-비의존적 전립선 암, B-세포 증식성 장애, 예컨대 B 세포 비-호지킨 림프종, 및 신장, 유방, 결장, 폐, 뇌, 및 기타 조직의 진행된 암; 항체-유래 자가면역 장애, 예컨대 류마티스 관절염, 중증근육 무력증, 전신 홍반 루프스, 및 기타 자가면역 질환; 또는 골다공증이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 분자는 또한 종종 종양에 의한 IL-6 및 IL-6R α 의 과생산을 산출하는, 암환자에서의 카켁시아를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

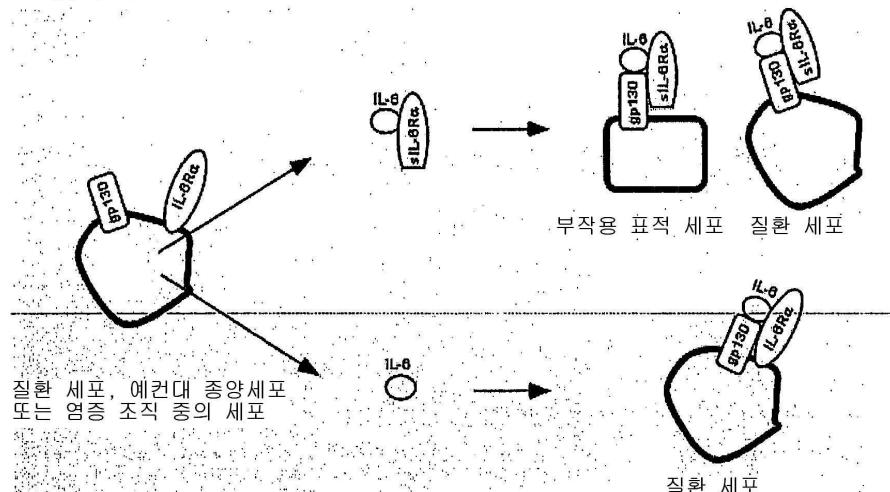
- <118> 본 발명의 길항제는 면역억제의 표적-관련 부작용, 특히 항체 형성의 억제를 야기할 수 있다. 환자가 본 발명의 항체를 수여받는 경우, 종종 예방 항-감염제로의 치료를 보충하는 것이 유용하다. 이러한 예방 치료는 면역억제 환자 치료의 분야에 잘 알려져 있다.
- <119> 본 발명의 길항제는 전형적으로 주입에 의해 투여되나, 또한 피하, 피내, 근육내, 또는 복막내 주사, 흡입, 또는 경구 투여에 의해 투여될 수 있다. 70 kg 성인에 대해, 투여량은 약 50 내지 2000 mg 범위가 바람직하고, 100 내지 800 mg 의 범위의 투여량이 더욱 바람직하고, 약 300 내지 600 mg 의 투여량이 가장 바람직하다.
- <120> 정확한 투여량은 개별 환자에 근거해서 조정될 것이다. 예를 들어, 고체 종양 환자를 치료하는 경우, 제시된 투여량의 유효성은 하기와 같이 평가될 수 있다. 본 발명의 항체 투여 후 다양한 지점에서, 종양의 생검을 채취하여, 예를 들어 적합한 항-포스포티로신 항체로 면역염색하여 gp130 활성화를 시험한다. 목표는 종양 중의 gp130 활성화의 지속적인, 본질적으로 완전한 억제를 갖는 것이다. gp130 활성화의 억제가 완전하지 않은 경우, 투여량이 증가될 수 있거나, 투여 빈도가 증가될 수 있다.
- <121> 상기 기재된 구현예 및 하기 실시예가 제한이 아닌, 예증의 방식으로 제시된 것임을 이해해야만 한다. 본 발명의 범주 내에서 다양한 변화 및 변형이 본 기재로부터 당업자에게 명백해질 것이다.

도면

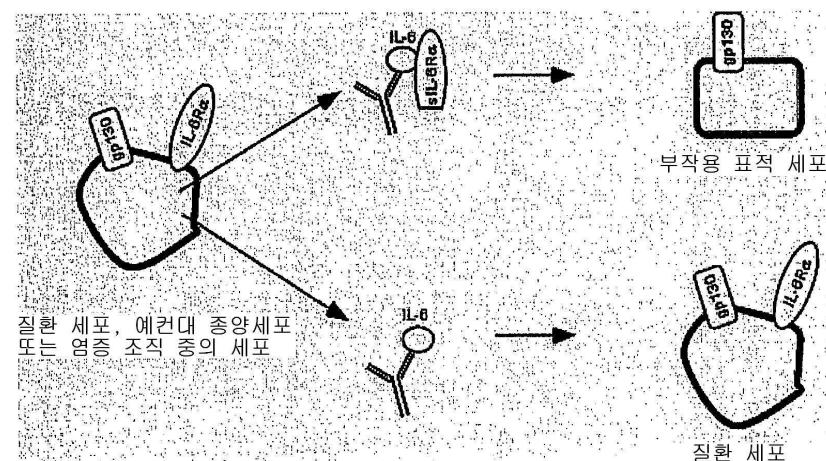
도면1

본 발명의 치료 방법

A. 비-치료



B. 본 발명의 항체로의 치료



도면2

IL-6 과 결합하고 gp130 과의 상호작용을 차단하는 항체 V 영역 서열의 정렬.
서열 중의 변이의 위치는 화살표로 표시된다. CDR은 박스로 되어 있다.

경쇄

Mab#195 Vk (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGISFMNWFQQKPGQPPKL (SEQ ID NO:29)
 Mab#309 Vk (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVGNGFISFMNWFQQKPGQPPKL (SEQ ID NO:30)
 Mab#471 Vk (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVGNFGISFMNWFQQKPGQPPKL (SEQ ID NO:31)
 Mab#476 Vk (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVHNGFISFMNWFQQKPGQPPKL (SEQ ID NO:32)

Mab#195 Vk (51) LIVASNQGSGPPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPW (SEQ ID NO:29)
 Mab#309 Vk (51) LIVTASNQGSGPPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDSAMYFCQQSKEVPW (SEQ ID NO:30)
 Mab#471 Vk (51) LIVTASNQGSGPPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDSAMYFCQQSKEIPW (SEQ ID NO:31)
 Mab#476 Vk (51) LIVTASNQGSGPPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDTAMYFCQQGKEVPW (SEQ ID NO:32)

Mab#195 Vk (101) TFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:29)
 Mab#309 Vk (101) TFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:30)
 Mab#471 Vk (101) TFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:31)
 Mab#476 Vk (101) TFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:32)

중쇄

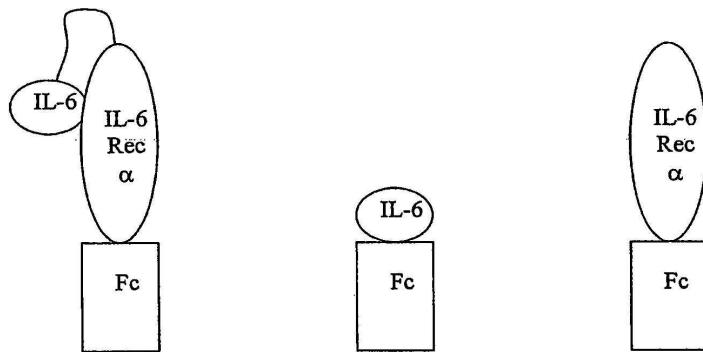
Mab#195 VH (1) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAE (SEQ ID NO:33)
 Mab#309 VH (1) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAE (SEQ ID NO:34)
 Mab#471 VH (1) EVKFEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFSFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAE (SEQ ID NO:35)
 Mab#476 VH (1) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDNWVRQSPEKGLEWVAE (SEQ ID NO:36)

Mab#195 VH (51) IRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNNLRAEDTGIYYCTR (SEQ ID NO:33)
 Mab#309 VH (51) IRLKSNKGATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNNLRAEDTGIYYCAS (SEQ ID NO:34)
 Mab#471 VH (51) IRLTSNKQAIYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNNLRAEDTGIYYCAS (SEQ ID NO:35)
 Mab#476 VH (51) IRSKANNHATYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNSLRAEDTGIYYCTT (SEQ ID NO:36)

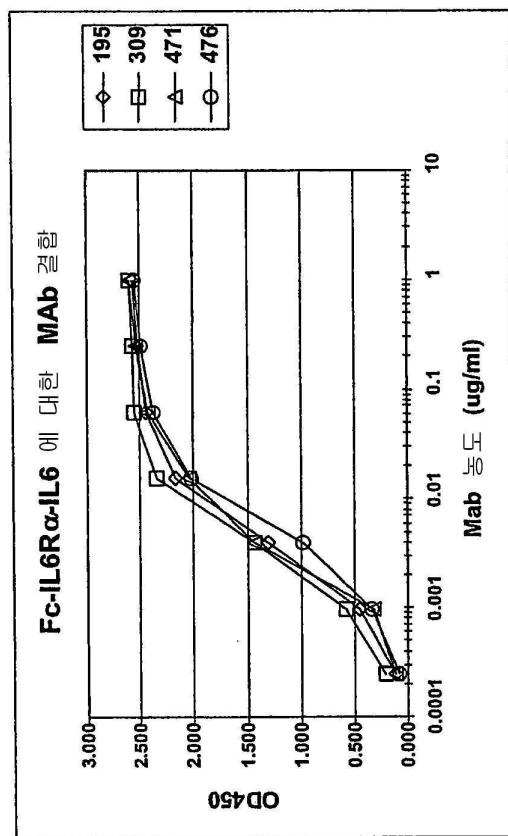
Mab#195 VH (101) EDYYGYPDWQQGTTLTVSS (SEQ ID NO:33)
 Mab#309 VH (101) LLYDGY-LWQQGTLVTVSA (SEQ ID NO:34)
 Mab#471 VH (101) LFYDGY-LWQQGTLVTVSA (SEQ ID NO:35)
 Mab#476 VH (101) PTLYGAMDYWQGTSVTVSA (SEQ ID NO:36)

도면3

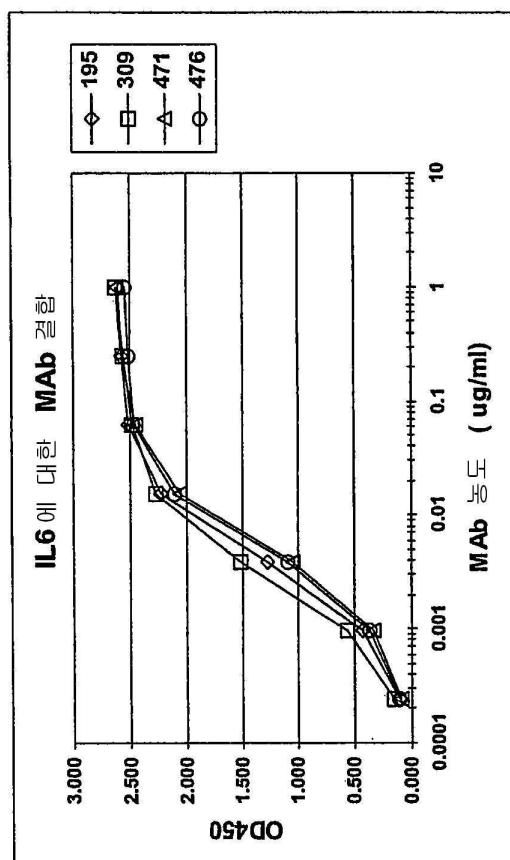
분원에 사용된 단백질의 구조도

A. Fc-IL6R α -IL6 B. Fc-IL6 C. Fc-IL6R α 

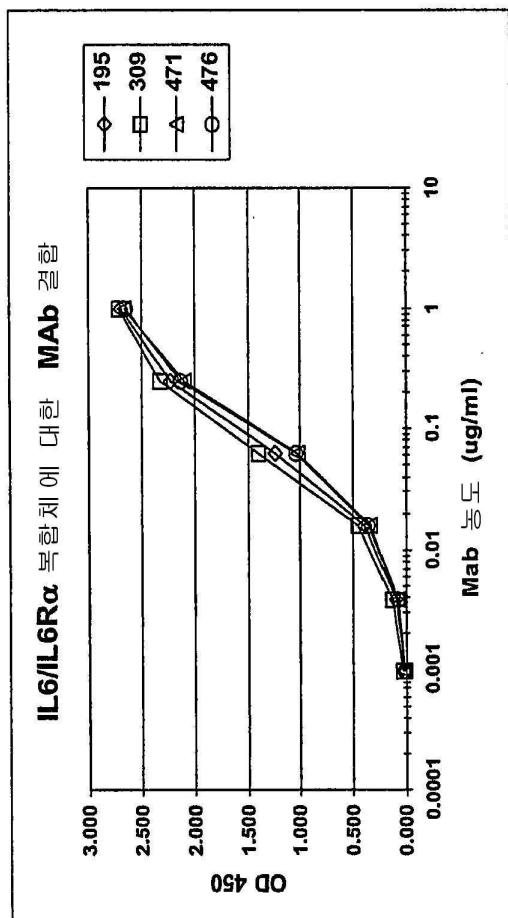
도면4



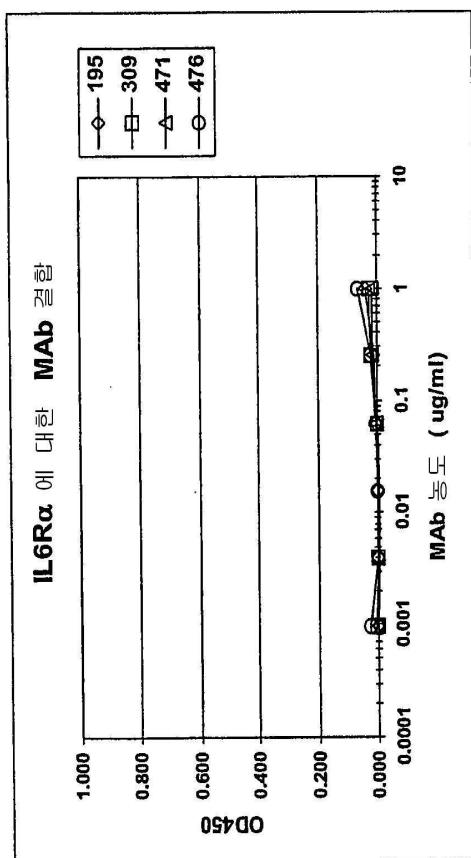
도면5



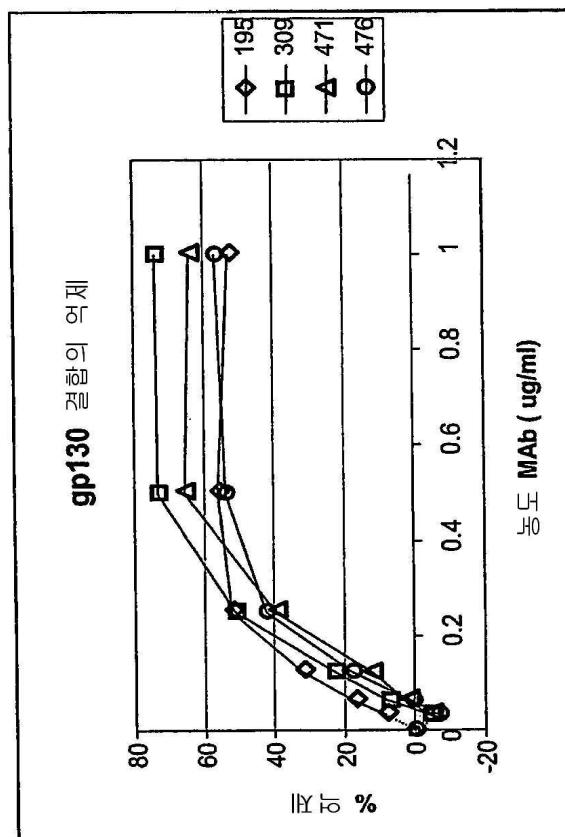
도면6



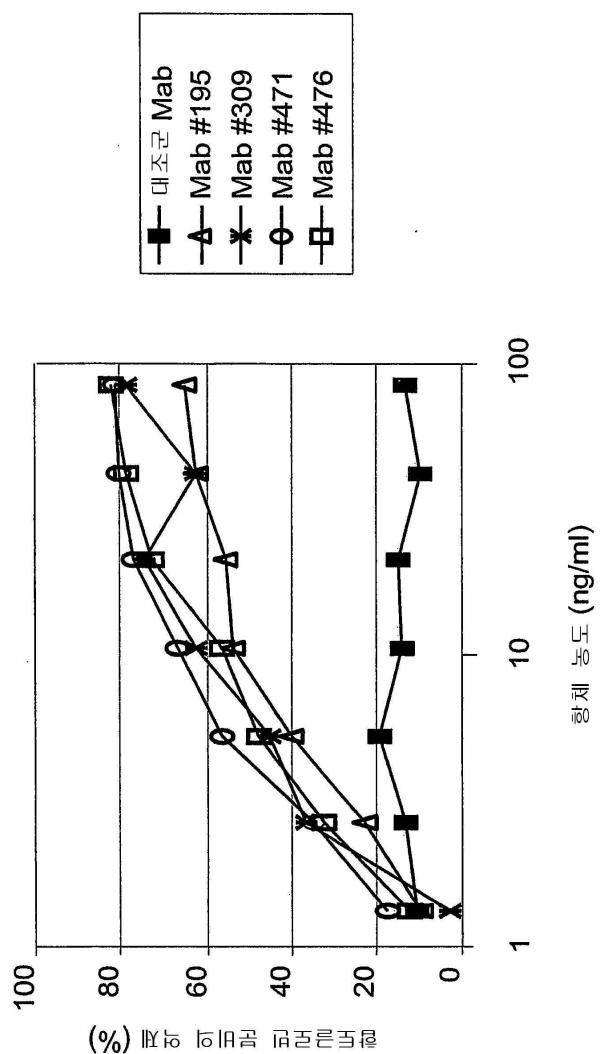
도면7



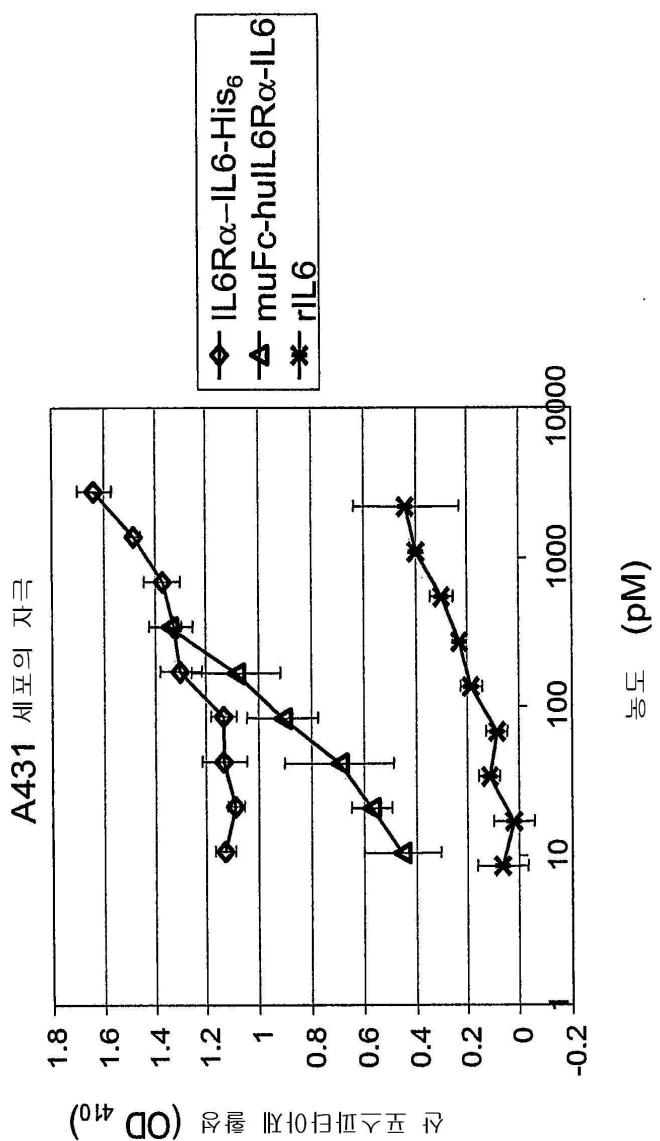
도면8



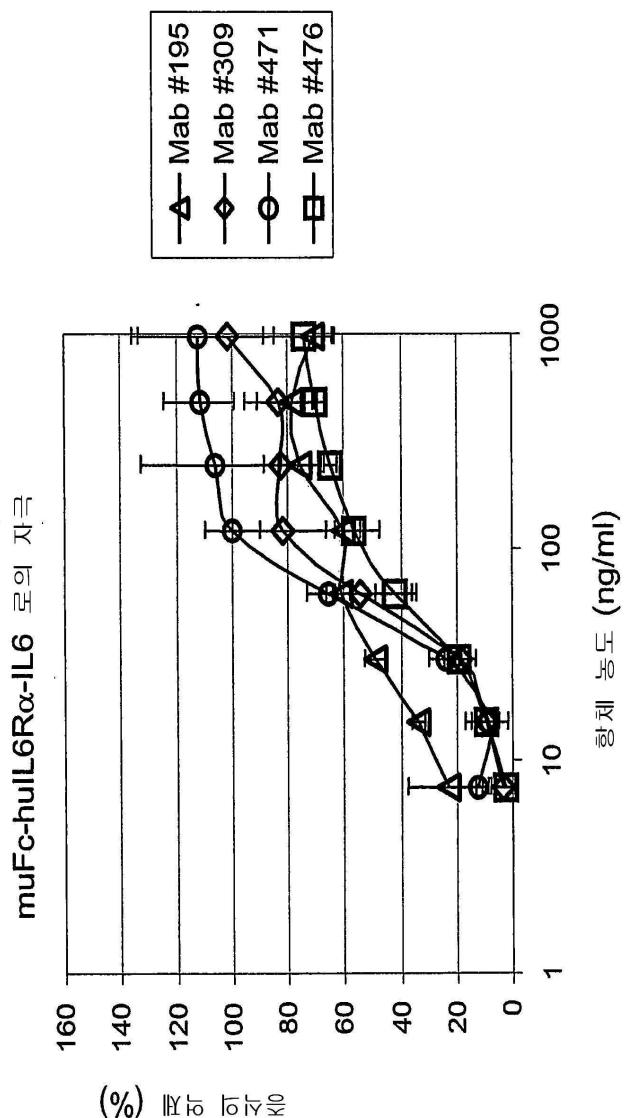
도면9



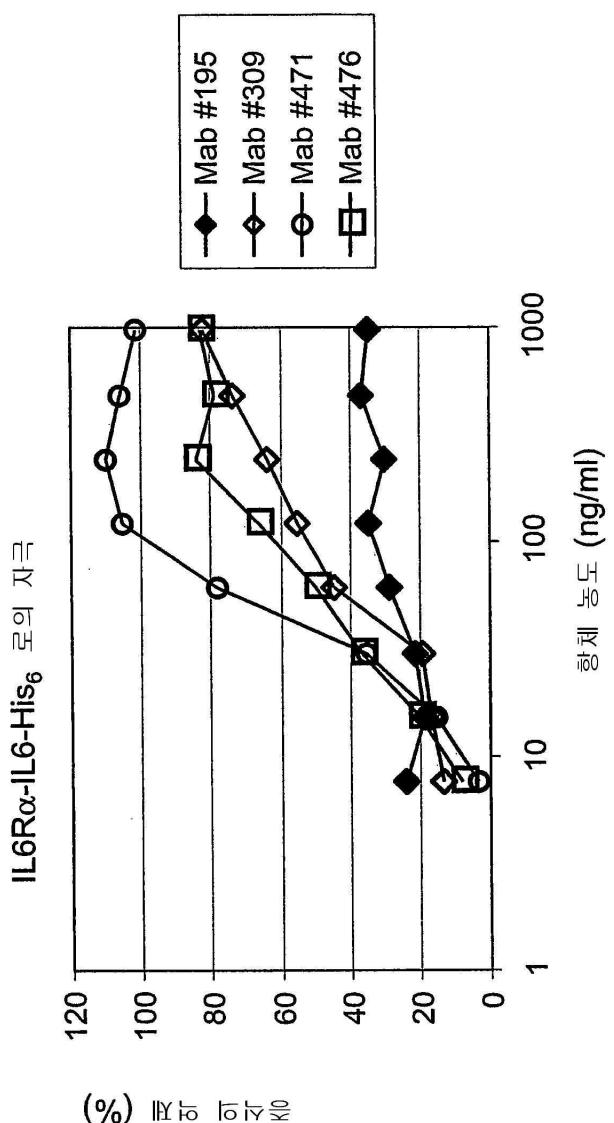
도면10A



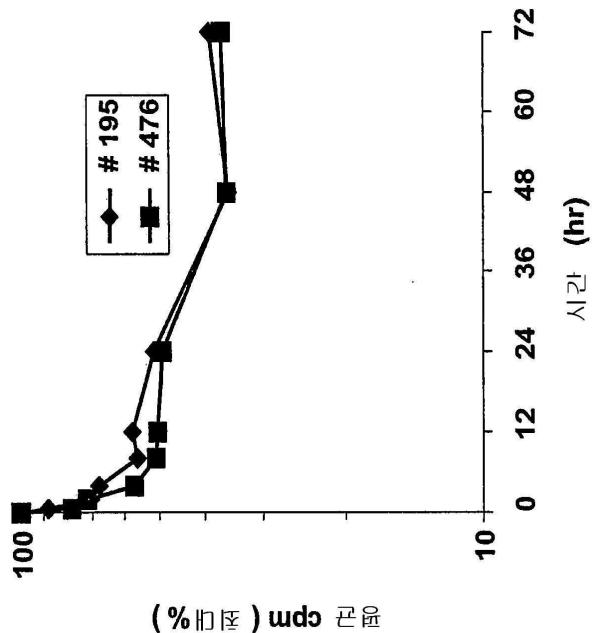
도면10B1



도면10B2

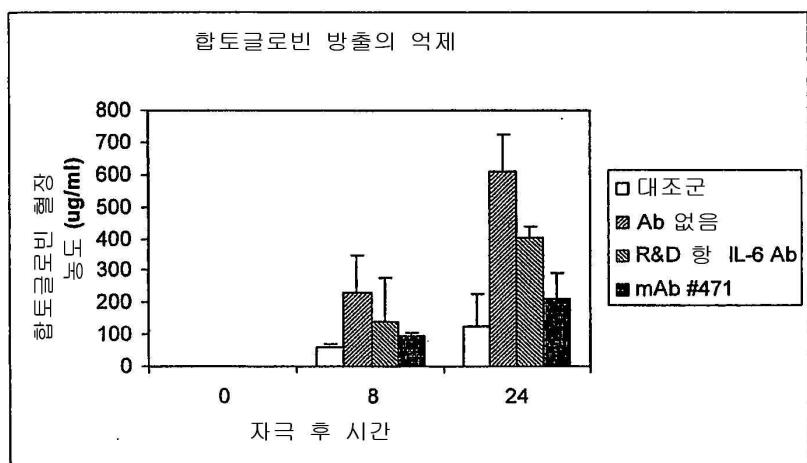


도면11

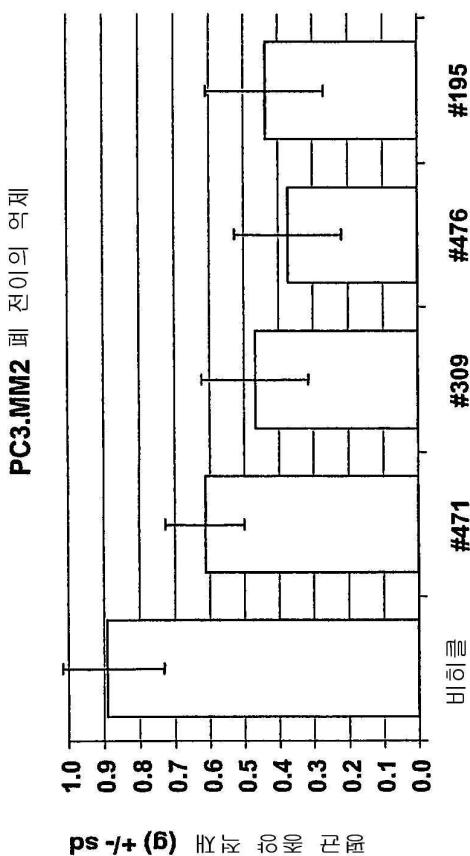


도면12

합토글로빈 분비 생체 내 억제



도면13



서 열 목 록

<110> Merck Patent GmbH
 <120> Interleukin-6 Antagonists

<130> LEX-036PC, P05/228

<150> PCT/EP2006/012236
 <151> 2006-12-19

<160> 62

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic: designed sequence

<220>
 <221> SITE
 <222> (2)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> SITE
 <222> (5)..(6)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> SITE
 <222> (9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 1
 Phe Xaa Phe Ser Xaa Xaa Trp Met Xaa
 1 5

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 2
 Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 3
 Phe Ser Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 4
 Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp
 1 5

<210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<220>
 <221> SITE
 <222> (4)..(6)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> SITE
 <222> (11)..(12)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 5
 Glu Ile Arg Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Ala Xaa Xaa Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 6
 Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 7
 Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Lys Gly Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 8
 <211> 19

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 8
 Glu Ile Arg Leu Thr Ser Asn Lys Gln Ala Ile Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 9
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 9
 Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)..(4)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> SITE
 <222> (6)..(9)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 10
 Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 11
 Glu Asp Tyr Tyr Gly Tyr Pro Asp Tyr
 1 5

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 12
 Leu Leu Tyr Asp Gly Tyr Leu His
 1 5

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic: designed sequence

<400> 13
Leu Phe Tyr Asp Gly Tyr Leu His
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic: designed sequence

<400> 14
Pro Thr Leu Tyr Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

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

<220>
<223> synthetic: designed sequence

<220>
<221> SITE
<222> (7)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> SITE
<222> (9)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 15
Arg Ala Ser Glu Ser Val Xaa Asn Xaa Gly Ile Ser Phe Met
1 5 10

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 16
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Ile Ser Phe Met
 1 5 10

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 17
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Gly Asn Phe Gly Ile Ser Phe Met
 1 5 10

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 18
 Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Phe Gly Ile Ser Phe Met
 1 5 10

<210> 19
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic: designed sequence

<400> 19

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met
1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic: designed sequence

<220>

<221> SITE

<222> (1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 20

Xaa Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic: designed sequence

<400> 21

Thr Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic: designed sequence

<400> 22
Val Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic: designed sequence

<400> 23
Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic: designed sequence

<220>
<221> SITE
<222> (3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> SITE
<222> (6)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> SITE
 <222> (8)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 24
 Gln Gln Xaa Lys Glu Xaa Pro Xaa Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 25
 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 26
 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 27
 Gln Gln Ser Lys Glu Ile Pro Trp Thr
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: designed sequence

<400> 28
 Gln Gln Gly Lys Glu Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 29
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 29
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 30
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 30
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Gly Asn Phe
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

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

<210> 31
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 31
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Gly Asn Phe
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

Glu Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 32
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 32
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val His Asn Phe
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 33
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 33
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Glu Asp Tyr Tyr Gly Tyr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 34
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Lys Gly Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Ser Leu Leu Tyr Asp Gly Tyr Leu His Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 35
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 35
 Glu Val Lys Phe Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Glu Ile Arg Leu Thr Ser Asn Lys Gln Ala Ile Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85

90

95

Tyr Cys Ala Ser Leu Phe Tyr Asp Gly Tyr Leu His Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 36
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Pro Thr Leu Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 37
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic: (murine)Fc-(human)sIL6Ralpha-IL6

<400> 37

Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro
1															

Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys
20															30

Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val
35															45

Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe
50															60

Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu
65															80

Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His
85															95

Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys
100															110

Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser
115															125

Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Met	
130															140

Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro
145															160

Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn
165															175

Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met
180															190

Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser

195

200

205

Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr
 210 215 220

Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys
 225 230 235 240

Leu Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu
 245 250 255

Ser Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr
 260 265 270

Thr Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu
 275 280 285

Asp Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser
 290 295 300

Cys Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser
 305 310 315 320

Met Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr
 325 330 335

Phe Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr
 340 345 350

Val Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln
 355 360 365

Asp Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu
 370 375 380

Arg Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys
 385 390 395 400

Asp Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg
 405 410 415

His Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp
 420 425 430

Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg
 435 440 445

Ser Pro Pro Ala Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Val
 450 455 460

Glu Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His
 465 470 475 480

Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr
 485 490 495

Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser
 500 505 510

Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn
 515 520 525

Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn
 530 535 540

Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu
 545 550 555 560

Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln
 565 570 575

Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln
 580 585 590

Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr
 595 600 605

Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln
 610 615 620

Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln
 625 630 635 640

Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 645

<210> 38
 <211> 1950

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic: DNA encoding mature (murine)Fc-(human)sIL6Ralpha-IL6

<400> 38

gagcccagag ggcccacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagc acctaacctc 60

ttgggtggac catccgtctt catcttcct ccaaagatca aggtatgtact catgatctcc 120

ctgagcccc tagtcacatg tgtggtggtg gatgtgagcg aggtgaccc agatgtccag 180

atcagctggc ttgtgaacaa cgtggaagta cacacagctc agacacaac ccatagagag 240

gattacaaca gtactctcg ggtggcagt gcccctccca tccagcacca ggactggatg 300

agtggcaagg agttcaaatg caaggtcaac aacaagacc tcccagcgcc catcgagaga 360

accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga gctccacagg tatatgtctt gcctccacca 420

gaagaagaga tgactaagaa acaggtcaact ctgacctgca tggcacacaga cttcatgcct 480

gaagacattt acgtggagtg gaccaacaac gggaaaacag agctaaacta caagaacact 540

gaaccagtcc tggactctga tggttttac ttcatgtaca gcaagctgag agtgaaaag 600

aagaactggg tgaaaagaaa tagctactcc tggcagtggtt tccacgaggg tctgcacaat 660

caccacacga ctaagagctt ctccggacc ccgggttcag gggatgacga tgacgataag 720

cttccccccg aggagccccca gctctcctgc ttccggaga gccccctcag caatgtgtt 780

tgtgagtggg gtcctcgag cacccatcc ctgacgacaa aggctgtgtcttgggtgagg 840

aagtttcaga acagtccggc cgaagacttc caggagccgt gccagtattc ccaggagtcc 900

cagaagttctt cctgccagtt agcagtcccg gagggagaca gctttcta catagtgtcc 960

atgtgcgtcg ccagtagtgt cgggagcaag ttcagcaaaa ctcacaccc ttcaaccc ttcaaccc	1020
ggaatcttgc agcctgatcc gcctgccaac atcacagtca ctgcgtggc cagaaacccc	1080
cgctggctca gtgtcacctg gcaagacccc cactcctgga actcatctt ctacagacta	1140
cggtttgagc tcagatatcg ggctgaacgg tcaaagacat tcacaacatg gatggtcaag	1200
gacctccagc atcactgtgt catccacgac gcctggagcg gcctgaggca cgtggtgcag	1260
cttcgtgccc aggaggagtt cgggcaaggc gagtgagcg agtggagccc ggaggccatg	1320
ggcacgcctt ggacagaatc caggagtct ccagctagag gggcgaaaa cagtggggc	1380
gggggcagtg tagaaccggt acccccagga gaagattcca aagatgttagc tgccccacac	1440
agacagccac tcacctttc agaacgaatt gacaaacaaa ttcggtacat cctcgacggc	1500
atctcagccc tgagaaagga gacatgtaac aagagtaaca tgtgtgaaag cagcaaagag	1560
gcactggcag aaaacaacct gaaccttcca aagatggctg aaaaagatgg atgcttcaa	1620
tctggattca atgaggagac ttgcctggtg aaaatcatca ctggctttt ggagttttag	1680
gtatacctag agtaccccca gaacagattt gagagttagt aggaacaagc cagagctgt	1740
cagatgagta caaaagtctt gatccagttc ctgcagaaaa aggcaaaagaa tctagatgca	1800
ataaccaccc ctgacccaaac cacaatgcc agcctgctga cgaagctgca ggcacagaac	1860
cagtggctgc aggacatgac aactcatctc attctgcgca gcttaagga gttcctgcag	1920
tccagcctga gggctttcg gcaaatgtag	1950

<210> 39
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic: mature (murine)Fc-(human)sIL6Ralpha

<400> 39

Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro
1															
															15

Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys
															30
20															

Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val
															45
35															

Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe
															60
50															

Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu
															80
65															

Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His
															95
85															

Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys
															110
100															

Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser
															125
115															

Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met
															140
130															

Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro
															160
145															

Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn
															175
165															

Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met
															190
180															

Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser
															205
195															

Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr

210	215	220	
Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Asp Lys			
225	230	235	240
Leu Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu			
245	250	255	
Ser Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr			
260	265	270	
Thr Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu			
275	280	285	
Asp Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser			
290	295	300	
Cys Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser			
305	310	315	320
Met Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr			
325	330	335	
Phe Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr			
340	345	350	
Val Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln			
355	360	365	
Asp Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu			
370	375	380	
Arg Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys			
385	390	395	400
Asp Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg			
405	410	415	
His Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp			
420	425	430	
Ser Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg			
435	440	445	

Ser Pro Pro Ala

450

<210> 40
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: DNA encoding mature (murine)Fc-(human)sIL6Ralpha

<400> 40	
gagcccagag gccccacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagc acctaacctc	60
ttgggtggac catccgtctt catcttcctt ccaaagatca aggtatgtact catgatctcc	120
ctgagccccca tagtcacatg tgtgggtgt gatgtgagcg aggtatgaccc agatgtccag	180
atcagctggc ttgtgaacaa cgtggaagta cacacagctc agacacaaac ccatagagag	240
gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt gccctccccca tccagcacca ggactggatg	300
agtggcaagg agttcaaattg caaggtcaac aacaaagacc tccagcgcc catcgagaga	360
accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga gctccacagg tatatgtctt gcctccacca	420
gaagaagaga tgactaagaa acaggtcaact ctgacctgca tggcacaga cttcatgcct	480
gaagacattt acgtggagtg gaccaacaac gggaaaacag agctaaacta caagaacact	540
gaaccagtcc tggactctga tggttttac ttcatgtaca gcaagctgag agtggaaaag	600
aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc tggcagttgg tccacgaggg tctgcacaat	660
caccacacga ctaagagctt ctccggacc ccgggttcag gggatgacga tgacgataag	720
cttccccccg aggagccccca gctctcctgc ttccggaga gccccctcag caatgttgg	780
tgtgagtggtt gtcctcgag cacccatcc ctgacgacaa aggctgtgct cttgggtgagg	840

aagttcaga acagtccggc cgaagacttc caggagccgt gccagtattc ccaggagtcc	900
cagaagtctt ccgtccaggtt agcagtcccg gagggagaca gctcttcttta catagtgcc	960
atgtgcgtcg ccagtagtgtt cgggagcaag tttagcaaaa ctcaaacctt tcagggttgt	1020
ggaatcttgc agcctgatcc gcctgccaac atcacagtca ctgccgtggc cagaaacccc	1080
cgctggctca gtgtcacctg gcaagacccc cactcctgga actcatctt ctacagacta	1140
cggtttgagc tcagatatcg ggctgaacgg tcaaagacat tcacaacatg gatggtaag	1200
gacctccagc atcactgtgt catccacgac gcctggagcg gcctgaggca cgtggcag	1260
cttcgtgccc aggaggagtt cggcaaggc gagtgagcg agtggagccc ggaggccatg	1320
ggcacgcctt ggacagaatc caggagtctt ccagcttag	1359

<210> 41
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: mature (murine)Fc-(human)IL6

<400> 41
 Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 20 25 30

Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val
 35 40 45

Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe
 50 55 60

Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu
65 70 75 80

Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
85 90 95

Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
100 105 110

Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser
115 120 125

Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met
130 135 140

Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro
145 150 155 160

Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn
165 170 175

Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser
195 200 205

Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala
225 230 235 240

Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln
245 250 255

Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys
260 265 270

Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn
275 280 285

Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser
290 295 300

Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu
 305 310 315 320

Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser
 325 330 335

Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln
 340 345 350

Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp
 355 360 365

Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln
 370 375 380

Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu
 385 390 395 400

Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 405 410

<210> 42
 <211> 1239
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: DNA encoding mature (murine)Fc-(human)IL6

<400> 42
 gagcccaagag gccccacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagc acctaacctc 60

ttgggtggac catccgtctt catttccct ccaaagatca aggtgtact catgatctcc 120

ctgagccccat tagtcacatg tgggtggat gatgtgacgc aggatgaccc agatgtccag 180

atcagctggat ttgtgaacaa cgtgaaatg cacacagctc agacacaaac ccatagagag 240

gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt gccctccccat tccagcacca ggactggatg 300

agtggcaagg agttcaaatg caaggtcaac aacaaagacc tcccagcgcc catcgagaga	360
accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga gctccacagg tatatgtctt gcctccacca	420
gaagaagaga tgactaagaa acaggtcact ctgacctgca tggcacaga cttcatgcct	480
gaagacatt acgtggagtg gaccaacaac gggaaaacag agctaaacta caagaacact	540
gaaccagtcc tggactctga tggttttac ttcatgtaca gcaagctgag agtggaaaag	600
aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc tggtagtgg tccacgaggg tctgcacaat	660
caccacacga ctaagagctt ctccggacc cgggtaaag aagattccaa agatgttagct	720
gccccacaca gacagccact cacctttca gaacgaattg acaaacaat tcggtagatc	780
ctcgacggca tctcagccct gagaaaggag acatgtaca agatgtacat gtgtgaaagc	840
agcaaagagg cactggcaga aaacaacctg aacccctaa agatggctga aaaagatgga	900
tgcttcaat ctggattcaa tgaggagact tgcctggtaaa aatcatcac tggtttttg	960
gagtttggg tatacctaga gtacccctccag aacagatttgg agatgtgtga ggaacaagcc	1020
agagctgtgc agatgagtac aaaagtccctg atccaggatcc tgcagaaaaa ggcaaaagaat	1080
ctagatgcaa taaccacccc tgacccaaacc acaaattgcca gcctgctgac gaagctgcag	1140
gcacagaacc agtggctgca ggacatgaca actcatctca ttctgctgcag cttaaggag	1200
ttcctgcagt ccagcctgag ggctttcgaaatgttag	1239

<210> 43
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: VH amplification PCR#1 5' oligonucleotide #1

<400> 43
acaacgcaga gtacgcgg 18

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic: VH amplification PCR#1 3' oligonucleotide #1

<400> 44
aggagagctg ggaaggtgtg 20

<210> 45
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic: VH amplification PCR#2 5' oligonucleotide #2

<400> 45
acaacgcaga gtacgcgg 18

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic: VH amplification PCR#2 3' oligonucleotide #2

<400> 46
tagcccttga ccaggcatcc c 21

<210> 47
<211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: VK amplification PCR#1 5' oligonucleotide #1

<400> 47
 acaacgcaga gtacgcgg 18

<210> 48
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: VK amplification PCR#1 3' oligonucleotide #1

<400> 48
 ctgccatcaa tcttccactt gac 23

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: VK amplification PCR#2 5' oligonucleotide #2

<400> 49
 catcctctct tccagctctc 20

<210> 50
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: VK amplification PCR#2 3' oligonucleotide #2

<400> 50
ctgaggcacc tccagatg 18

<210> 51
<211> 360
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 51
gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttgggtcaac ctggaggatc catgaaactc 60

tcctgtgttgc cctctggatt cacttcagt aactactgga tgaactgggt ccgcgcgtct 120

ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagattga aatctaataa ttatgcaaca 180

cattatgcgg agtctgtgaa agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagttagt 240

gtctacctgc aaatgaacaa ctttaagagct gaagacactg gcatttatttta ctgtaccagg 300

gaggactact acggctaccc tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctccctca 360

360

<210> 52
<211> 333
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 52
gacattgtgc tgaccaggc tccagttct ttggctgtt ctctaggtca gagggccacc 60

atctccctgca gagccagcga aagtgttcat aattttggca ttagttttttaa gaactggttc 120

caacagaaac ctggacagcc acccaaactc ctcatctatg ttgcattccaa ccaaggatcc 180

ggggtccctg ccaggttttag tggcagtggg tctggacag acttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg 300

acgttcgtg gaggcacaa gctggaaatc aaa 333

<210> 53
<211> 357
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 53
gaagtgaac ttgaggagtc tggaggaggc ttgggtcaac ctggaggatc catgaaactc 60

tcctgtttg cctctggatt cacttcagt aactactgga tgaactgggt ccgcaggct 120

ccagagaagg ggcttgagtg gtttgctgaa attagactga aatctaataa gggtgcaaca 180

cattatgcgg agtctgtgaa agggaggttc accatctcaa gggatgattc caaaagtatg 240

gtctacctgc aaatgaacaa cttaaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtgccagc 300

cttttgtatg atggttactt acattgggc caagggactc tggtaactgt ctctgca 357

<210> 54
<211> 333
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 54
gacatttgcc tgacccaatc tccagttct ttggctgtt ctctaggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccagcga aagtgttggt aattttggca ttagtttat gaattggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctgcattcaa ccaaggatcc 180

gggtccctg ccaggttag tggcagtggg tctggacag acttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggtgattc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga gttccgtgg 300

acgttcgtg gaggcacaa actggaaatc aaa 333

<210> 55
<211> 357

<212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 55
 gaagtgaagt ttgaggagtc tggaggaggc ttgggtgcaac cgggaggatc catgaaactc 60
 tcctgtgttgc cctctggatt cagttcagt aactactgga tgaactgggt ccgcgcgtct 120
 ccagagaagg ggcttgagtg gggtgctgaa attagattga catctaataa gcaggcaata 180
 tattatgcgg agtctgtgaa agggagatc accatctcaa gagatgattc caaaagtatg 240
 gtctacctgc aaatgaacaa cctaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtgccagc 300
 cttttctatg atggttactt acattgggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 56
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 56
 gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca gagccagcga aagtgttggta aattttggca ttagtttat gaactggttc 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctgcattccaa ccaaggatcc 180
 ggggtccctg ccaggttttag tggcagtggg tctggacag acttcagcct caacatccat 240
 cctatggagg aggtatgttgc tgcattgtat ttctgtcagc aaagtaagga gattccgtgg 300
 acgttcgtg gaggcaccaa actggaaatc aaa 333

<210> 57
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 57

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggagc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc	60
tcttgtctg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgcagtc	120
ccagagaagg ggcttgagtg gtttgctgaa attagaagta aagctaataa tcatgcaaca	180
tactatgctg agtctgtgaa agggaggttc accatctcaa gagatgattc caaaagtatg	240
gtctacactgc aaatgaacag cctaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtacgacc	300
cctactctct atggcgctat ggactactgg ggtcaaggaa ctcagtcac cgtctctgca	360
	360

<210> 58
 <211> 334
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 58	
gacatttgtc tgacccaatc tccagttct ttggctgtt ctcttggca gagggccacc	60
atctcctgca gagccagcga aagtgttcat aattttggca ttagctttat gaactggttc	120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctgcattccaa ccaaggatcc	180
gggtccctg ccaggttag tggcagtggg tctggacag acttcagcct caacatccat	240
cctgtggaag aggtgatac tgcaatgtat ttctgtcaac aaggtaagga gttccgtgg	300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaac	334

<210> 59
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: VL forward primer (with Afl II site): 4447s

<400> 59
 cttaagcgac atttgctga cccaaatc 27

<210> 60
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: VL reverse primer (with Bgl II site): 5225a

<400> 60
 agatctactt acgtttgatt tccagtttgg tgcc 34

<210> 61
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: VH forward primer (with Afl II site): 5226s

<400> 61
 cttaagcgaa gtgaagtttgg aggagtc 27

<210> 62
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic: VH reverse primer (with Hind III site): 5227a

<400> 62
 aagcttactt acctgcagag acagtgcacca g 31