



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0132749
(43) 공개일자 2017년12월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/1282 (2013.01)
C07K 16/241 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7026731
- (22) 출원일자(국제) 2016년03월31일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년09월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/057024
- (87) 국제공개번호 WO 2016/156468
국제공개일자 2016년10월06일
- (30) 우선권주장
15162115.8 2015년03월31일
유럽특허청(EPO)(EP)
16152320.4 2016년01월21일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
브이에이치스퀘어드 리미티드
영국, 캠브리지셔 씨비22 3지엔, 캠브리지, 바브
라햄, 캠브리지 로드, 코플리 힐 비즈니스 파크,
1 로어 코트
- (72) 발명자
크로, 스콧
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3지엔, 코플리
힐 비즈니스 파크 캠브리지 로드, 1 로어 코트,
브이에이치스퀘어드 리미티드
- 웨스트, 마이크
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3지엔, 코플리
힐 비즈니스 파크 캠브리지 로드, 1 로어 코트,
브이에이치스퀘어드 리미티드
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
손민

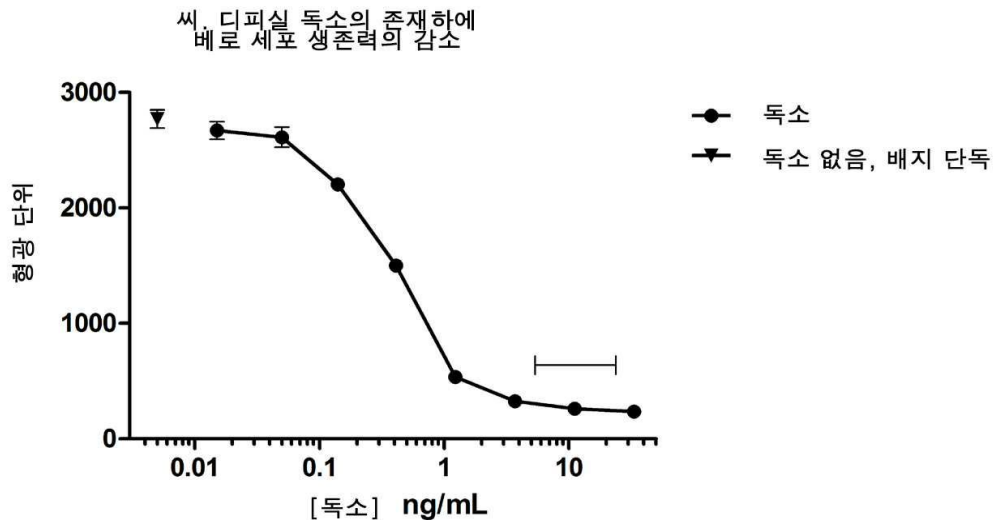
전체 청구항 수 : 총 63 항

(54) 발명의 명칭 **폴리펩티드**

(57) 요약

3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하는 면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기가 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되어 있고/있거나, (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기가 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되어 있고; 상기 폴리펩티드가, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 증가된 장내 안정성을 갖는, 펩티드가 특히 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/542 (2013.01)

C07K 2317/22 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

로버츠, 케빈

영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3지엔, 코플리
힐 비즈니스 파크 캠브리지 로드, 1 로어 코트, 브
이에이치스퀘어드 리미티드

칼튼, 팀

영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3지엔, 코플리
힐 비즈니스 파크 캠브리지 로드, 1 로어 코트, 브
이에이치스퀘어드 리미티드

명세서

청구범위

청구항 1

3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하는 면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서,

(a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되고/되거나,

(b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되며,

상기 폴리펩티드는 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 폴리펩티드.

청구항 2

면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법으로서,

상기 면역글로불린쇄 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하고,

상기 방법은, (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환 및/또는

(b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제조하는 방법으로서,

상기 면역글로불린쇄 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하고,

상기 방법은, (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환 및/또는

(b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계를 포함하고,

상기 폴리펩티드는 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 치환체가, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 장관, 예를 들면, 소장 및/또는 대장, 예를 들면, 십이지장, 공장, 회맹장, 결장, 직장 및/또는 항문관에서 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 치환체가, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 장관, 예를 들면, 소장 및/또는 대장, 예를 들면, 십이지장, 공장, 회맹장, 결장, 직장 및/또는 항문관의 모델에서 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 장관의 모델이 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델(Standard Human Faecal Supernatant Intestinal Tract Model)인, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 안정성이, 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에서 1시간 인큐베이션 후, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 적어도 5%, 보다 적합하게는 30%, 보다 적합하게는 50% 증가되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 안정성 증가는, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-TNF- α 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정에 의해 측정되거나, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-독소 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 독소 ELISA 검정에 의해 측정되거나,

상기 안정성 증가는, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-IL-6R 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 gp130 ELISA 검정에 의해 측정되거나, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-TNF- α 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정에 의해 측정되거나, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-독소 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 독소 ELISA 검정에 의해 측정되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 안정성은, 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에서 16시간 인큐베이션 후, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 적어도 1%, 보다 적합하게는 5%, 보다 적합하게는 10% 증가되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 안정성 증가는, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-TNF- α 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정에 의해 측정되거나, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-독소 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 독소 ELISA 검정에 의해 측정되거나,

상기 안정성 증가는, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-IL-6R 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 gp130 ELISA 검정에 의해 측정되거나, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-TNF- α 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정에 의해 측정되거나, 상기 면역글로불린쇄 가변 도메인이 항-독소 면역글로불린쇄 가변 도메인인 경우에 표준 독소 ELISA 검정에 의해 측정되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 치환체가, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 소장 또는 대장에서 생성된 하나 이상의 프로테아제에 대한 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 하나 이상의 프로테아제가, 트립신, 키모트립신, MMP, 카텝신, 엔테로펩티다제, 숙주 염증 프로테아제, 장내 공생 미생물총 및/또는 미생물 세포의 용해에 의해 활성적으로 분비 및/또는 방출된 병원성 세균으로부터 기원하는 프로테아제, 및 병원성 세균으로부터 기원하는 프로테아제, 예를 들면, 씨. 디피실

(*C. difficile*)-특이적 프로테아제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 효력이, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드의 효력과 실질적으로 동일한, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 EC50이, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 400% 이하, 보다 적합하게는 100% 이하, 보다 적합하게는 20% 이하까지 증가되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 치환체가 합성적으로 도입되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 치환체가, 에러-프론(error-prone) PCR, 셔플링, 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이유발, 어셈블리 PCR, PCR 돌연변이유발, 생체내 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발, 재귀적 앙상블 돌연변이유발 (recursive ensemble mutagenesis), 지수관수적 앙상블 돌연변이유발, 부위-특이적 돌연변이유발, 유전자 제어 샘플리, 유전자 부위 포화 돌연변이유발(GSSM), 합성 연결 제어샘플리(SLR), 재조합, 재귀적 서열 재조합, 포스포티오에이트-변형된 DNA 돌연변이유발, 우라실-함유 주형 돌연변이유발, 갭 이본쇄 돌연변이유발, 포인트 미스매치 수복 돌연변이유발, 수복-결손 숙주 균주 돌연변이유발, 화학적 돌연변이유발, 방사기원 돌연변이유발, 결실 돌연변이유발, 제한-선택 돌연변이유발, 제한-정제 돌연변이유발, 앙상블 돌연변이유발, 키메라 핵산 다량체 생성 또는 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방법에 의해 도입되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 치환체가 V(D)J 재조합 또는 체세포 돌연변이에 의해 도입되지 않는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중의 어느 한 항에 있어서, 치환을 포함하는 각각의 CDR이 5개 아미노산보다 짧지 않은, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중의 어느 한 항에 있어서, 치환을 포함하는 각각의 CDR이 25개 아미노산보다 길지 않은, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 700개 아미노산보다 길지 않은, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리신 잔기가, CDR1의 2/3 및/또는 CDR2의 2/3 및/또는 CDR3의 2/3으로 정의된 윈도우에 존재하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리신 잔기가, CDR1의 3/5 및/또는 CDR2의 3/5 및/또는 CDR3의 3/5로서 정의된 윈도우에 존재하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리신 잔기가, CDR1의 4/7 및/또는 CDR2의 4/7 및/또는 CDR3의 4/7으로 정의된 윈도우에 존재하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아르기닌 잔기가, CDR1의 2/3 및/또는 CDR2의 2/3 및/또는 CDR3의 2/3으로 정의된 윈도우에 존재하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아르기닌 잔기가, CDR1의 3/5 및/또는 CDR2의 3/5 및/또는 CDR3의 3/5로 정의된 윈도우에 존재하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아르기닌 잔기가, CDR1의 4/7 및/또는 CDR2의 4/7 및/또는 CDR3의 4/7로서 정의된 윈도우에 존재하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중의 어느 한 항에 있어서, 적어도 2개의 리신 및/또는 아르기닌 잔기가 치환되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 적어도 3개의 리신 및/또는 아르기닌 잔기가 치환되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중의 어느 한 항에 있어서, 3개 이하의 리신 및/또는 아르기닌 잔기가 치환되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 2개 이하의 리신 및/또는 아르기닌 잔기가 치환되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 1개의 리신 및/또는 1개의 아르기닌 잔기가 치환되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 32

제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 있어서, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 각 리신 및/또는 아르기닌 잔기가 각각 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 각 리신 및/또는 아르기닌 잔기가 각각 하나의 히스티딘 잔기로 치환되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 면역글로불린 쇠 가변 도메인으로 이루어지는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 항체, 추가의 항체 결합 영역을 함유하는 변형된 항체 또는 항체 단편, 예를 들면, scFv, Fab 단편, F(ab')₂ 단편 또는 면역글로불린 쇠 가변 도메인, 예를 들면, VHh, VH, VL, V-NAR인, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 VHh인, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 VH인, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중의 어느 한 항에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 친화성이 pH 3 내지 9의 임의의 pH에서 실질적으로 동일한, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 장관을 통해 접근가능한 표적에 결합하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 장관 내의 표적에 결합하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 표적이 장관 상주 병원성 미생물로부터 기원하는 유해제인, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 42

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 표적이, 병인을 유도할 수 있는 숙주 미생물, 숙주 세포, 숙주 유래 염증 매개인자 또는 질환 병인에 수반되는 단백질로부터 기원하는 표적인, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가, TNF- α , β , 디피실 독소 A 또는 β . 디피실 독소 B로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적에 결합하거나;

제1항 내지 제45항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 IL-6R, TNF- α , β . 디피실 독소 A 또는 β .

디피실 독소 B로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적에 결합하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중의 어느 한 항에 따르는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 작제물.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중의 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드 또는 작제물 또는 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 희석제 또는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 적어도 하나의 추가 활성제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중의 어느 한 항에 있어서, 기능적 또는 약용 식품으로서 사용하기 위한, 폴리펩티드 또는 약제학적 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제46항 중의 어느 한 항에 있어서, 경구 투여용 의약으로서 사용하기 위한, 폴리펩티드 또는 약제학적 조성물.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 조성물이 장용 코팅된 형태로 제공되는, 약제학적 조성물.

청구항 50

제1항 내지 제44항 중의 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드 또는 작제물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 51

제50항에 따르는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 cDNA.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 따르는 폴리뉴클레오티드 또는 cDNA를 포함하는 벡터.

청구항 53

제52항에 따르는 벡터로 형질전환되고 제1항 내지 제47항 중의 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드 또는 작제물을 발현할 수 있는 숙주 세포, 예를 들면, 포유동물 세포, 식물 세포, 효모 세포, 예를 들면, 아스퍼길루스 (*Aspergillus*) 속, 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 속, 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) 속, 한세놀라 (*Hansenula*) 속 또는 피키아 (*Pichia*) 속 또는 세균 세포, 예를 들면, 이. 콜라이 (*E. coli*).

청구항 54

제1항 내지 제49항 중의 어느 한 항에 있어서, 경구 투여에 의한 위장관 질환의 치료에 사용하기 위한, 폴리펩티드, 작제물 또는 약제학적 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, 자가면역 및/또는 염증 질환의 치료에 사용하기 위한, 폴리펩티드, 작제물 또는 약제학적 조성물.

청구항 56

제55항에 있어서, 셀리악병 (coeliac disease), 방사선-유도된 점막염 또는 장염 질환, 예를 들면, 크론병 또는

궤양성 대장염의 치료에 사용하기 위한, 폴리펩티드, 작제물 또는 약제학적 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, 크론병 또는 궤양성 대장염의 치료에 사용하기 위한, 폴리펩티드, 작제물 또는 약제학적 조성물.

청구항 58

제54항에 있어서, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*), 시겔라(*Shigella*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*), 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 또는 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 감염의 치료에 사용하기 위한, 폴리펩티드, 작제물 또는 약제학적 조성물.

청구항 59

제58항에 있어서, 클로스트리디움 디피실 감염의 치료에 사용하기 위한, 폴리펩티드, 작제물 또는 약제학적 조성물.

청구항 60

치료학적 유효량의 제1항 내지 제46항 중의 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드, 작제물 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 인간에게 경구 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 및/또는 염증 질환의 치료 방법.

청구항 61

치료학적 유효량의 제1항 내지 제46항 중의 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드, 작제물 또는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 인간에게 경구 투여하는 것을 포함하는, 에스케리키아 콜라이, 살모넬라 티피, 캄필로박터, 비브리오 콜레라에, 시겔라, 클로스트리디움 퍼프린젠스, 클로스트리디움 디피실, 바실루스 세레우스, 비브리오 파라헤모리티쿠스 또는 예르시니아 엔테로콜리티카에 의한 감염의 치료 방법.

청구항 62

제1항 내지 제46항 중의 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드 또는 작제물을 포함하는 생성물을 제조하는 방법으로서, 상기 폴리펩티드는

- (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환 및/또는
- (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성되는, 방법.

청구항 63

3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하는 면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서,

- (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기 대신에 적어도 하나의 히스티딘 잔기 및/또는
- (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기 대신에 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 갖고, 상기 폴리펩티드는, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 전구체 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 폴리펩티드.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 높은 친화성으로 표적에 결합할 수 있는 영역을 포함하는 폴리펩티드, 특히 면역글로불린쇄 가변 도

[0001]

메인(ICVD)을 포함하는 것들, 및 상기 폴리펩티드를 포함하는 작제물 및 이러한 폴리펩티드와 작제물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드, 작제물 및 약제학적 조성물은 모두 경구 투여에 적합하다. 본 발명은 또한 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 장내 안정성(intestinal stability)을 증가시키는 방법, 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제조하는 방법, 및 이러한 폴리펩티드, 이러한 폴리펩티드를 포함하는 작제물, 이러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, cDNA 및 이러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 이러한 폴리펩티드를 발현하거나 발현할 수 있는 숙주 세포, 이러한 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물 및 이러한 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 의약품의 연구 및 개발은 점차 생물의약품, 예를 들면, 항체를 포함하는 치료용 폴리펩티드에 초점을 맞추고 있다. 전형적으로, 치료용 폴리펩티드는 전신 경로를 통해 순환에 직접 또는 간접적으로 투여된다. 그러나, 다수의 의료용 폴리펩티드는 이상적으로는 경구 경로를 통해 전달된다. 치료용 폴리펩티드를 경구적으로 전달하는 것은 이하의 이점을 제공할 수 있다: (a) 위장관 질환의 국소 치료를 위한 위장관(GIT)으로의 직접 표적화 [참조: Jones and Martino 2015 *Crit Rev Biotechnol* 20:1-15], (b) 유해한 면역 반응의 위험을, 치료용 폴리펩티드 재료를 반복적으로 섭취하는 장기간 안정성을 보장하는 GIT의 자연 면역 관용 성질에 기인하여 감소시킬 수 있는 것, (c) 주사가 가능한 치료용 폴리펩티드를 제조하는 엄격한 규제 요건 없이, 제조 비용을 감소시킬 수 있는 것 및 (d) 보다 높은 수준의 환자 수용성 및 장기간 준수를 달성할 수 있는 것[참조: Shaji and Patole *Indian J Pharm Sci* 2008 70(3):269-277].
- [0003] 그러나, 다수의 치료용 폴리펩티드는 장관에서 불안정하고, 따라서 경구 투여로부터 수득된 유리한 효과는 일반적으로 제한된다[참조: Bruno et al 2013 *Ther Deliv* 4(11):1443-1467]. 결과적으로, 통상의 소분자 약물에 사용된 경구 용량형이 경구 폴리펩티드 전달을 위해 사용되어 왔다. 현재 조사 중의 다양한 전략은 제형 비히클, 효소 억제제의 사용, 흡수 증강제 및 점막접착성 중합체를 포함한다[참조: Shaji and Patole, *ibid*].
- [0004] (추가) 시스템 브릿지의 도입 등과 같이 치료용 폴리펩티드 자체에 대한 변형을 수반하는 대체 전략이 또한 사용되어 왔다. 문헌[참조: Hussack et al 2011 *PLoS ONE* 6(11):e28218]은 항-TcdA VHH 내로 추가 시스템 브릿지의 도입을 기재한다. 단백질분해 안정성을 증가시키는 이들 추가 시스템 브릿지의 유효성은 관련된 특정 프로테아제에 매우 의존적이고, 일부 상황에서는 이들 추가의 시스템 브릿지가 재조합 생성 수준에 유해했다. 유사하게는, 문헌[참조: Kim et al 2014 *mAbs* 6:1 219-235]은 혼합 결과와 함께 디설파이드 브릿지를 갖는 인간 VL 도메인을 조작했다.
- [0005] 이론적으로, 장관 내의 안정성을 증강시키기 위해, 치료용 폴리펩티드의 낮은 장내 안정성에 관여하는 것으로 생각되는 치료용 폴리펩티드에서 특정 아미노산을 치환하는 것을 고려할 수 있다. 그러나, 면역글로불린 쇠 가변 도메인과 관련하여, 아미노산 서열 중의 단일 치환은 결합 능력에 유해한 영향을 줄 수 있다. 이는, 표적 항원의 결합에 관여할 수 있는, 면역글로불린 쇠 가변 도메인의 상보성 결정 영역(CDR)과 특히 관련된다. 예를 들면, 특히 VHH의 CDR3과 관련하여, "CDR 아미노산이 항원과 직접 접촉하거나, 항원과 직접 접촉하는 CDR3 아미노산의 형태를 유지하고 영향을 미치는 한, 감소된 안정성에 관여하는 CDR3 아미노산은 친화성의 심각한 손실 없이 치환될 수 없다"고 공지되어 있다[참조: Muylldermans *Annu Rev Biochem* 2013 82:775-797]. 이러한 관점은, 예를 들면, 특히 CDR2에서 R의 G로의 치환을 포함하는, 씨. 제주니(*C. jejuni*) 편모를 표적화하는 VHH로의 치환이 VHH(접근 조절)의 결합 성능에서 거대한 감소를 유발했다는 발견에 의해 보장된다[참조: Hussack et al 2014 *Protein Engineering, Design & Selection* 27(6):191-198].
- [0006] 따라서, 증가된 장내 안정성을 갖는 폴리펩티드, 및 이러한 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법에 대한 장기간의 요구가 있다.
- [0007] 본 발명의 폴리펩티드는, 적어도 일부 실시형태에서, 선행 기술의 물질과 비교하여 하나 이상의 하기 이점을 가질 수 있다:
- [0008] (i) 경구 투여를 위한 증가된 적합성;
- [0009] (ii) 경구 투여후 국소 전달을 위한 증가된 적합성;
- [0010] (iii) 결합 친화성 및/또는 효력을 실질적으로 유지하면서, 증가된 장내 안정성;
- [0011] (iv) 결합 친화성 및/또는 효력을 유지하면서, 장관의 모델, 예를 들면, 표준 트립신 장관 모델, 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델 또는 표준 인간 배설물 상청액 모델의 증가된 안정성;

- [0012] (v) 프로테아제의 존재하에, 예를 들면, (a) 소장 및/또는 대장에서 발견되는 프로테아제 및/또는 IBD 염증 프로테아제, 예를 들면, 트립신, 키모트립신, MMP, 카텡신, 엔테로펩티다제, 숙주 염증 프로테아제의 존재하에 및/또는 (b) 소장 및/또는 대장에서 발견된 미생물 세포의 용해에 의해 활성적으로 분비되고/되거나 방출된, 장내 공생 미생물총 및/또는 병원균으로부터의 프로테아제의 존재하에 증가된 안정성;
- [0013] (vi) 이중성 숙주, 효모, 예를 들면, 아스퍼길루스(*Aspergillus*) 속, 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속, 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 속, 한세눌라(*Hansenula*) 속 또는 키피아(*Pichia*) 속(효모 프로테아제에 대한 증가된 내성의 측면에서)에 속하는 효모에서 발현되는 경우에 증가된 안정성;
- [0014] (vii) 유해한 면역 반응의 감소된 위험;
- [0015] (viii) 감소된 제조 비용;
- [0016] (ix) 장내 감염 또는 면역 및/또는 염증 질환의 개선된 치료 및/또는 예방;
- [0017] (x) 개선된 환자 수용성 및 장기간 순응성;
- [0018] (xi) 재조합 생산 동안의 개선된 수율;
- [0019] (xii) 개선된 생물활성 및/또는 생물분포;
- [0020] (xiii) 감소된 용량 요구;
- [0021] (xiv) 의약품에서 사용하기 위한 적합성 및 개선된 특성;
- [0022] (xv) 기능성 식품에서 사용하기 위한 적합성 및 개선된 특성.

발명의 내용

- [0023] 본 발명자들은, 놀랍게도, 경구 투여에 적합한, 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 유리한 폴리펩티드를 생산했다. 이들 폴리펩티드는 이들의 증가된 장내 안정성(즉, 장관에서의 증가된 안정성)으로 인해 특히 유리하다. 이들 폴리펩티드는 자가면역 및/또는 염증 질환, 예를 들면, 염증성 장 질환의 예방 또는 치료, 또는 장관 상주 병원성 미생물로부터의 감염의 예방 또는 치료에서 특히 유용하다. 또한, 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법, 및 증가된 안정성을 갖는 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제조하는 방법이 제공된다.
- [0024] 따라서, 본 발명은, 3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하는 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되고/되거나, (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되며, 상기 폴리펩티드는 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 폴리펩티드를 제공한다.
- [0025] 또한, 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법으로서, 상기 면역글로불린 쇠 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하고, 상기 방법은, (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계 및/또는 (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0026] 또한, 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제조하는 방법으로서, 상기 면역글로불린 쇠 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하고, 상기 방법은, (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계 및/또는 (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 방법이 제공된다.
- [0027] 또한, 높은 친화성으로 표적에 결합할 수 있는 영역을 포함하는 폴리펩티드로서, (a) 상기 영역 중의 적어도 하나의 리신 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되고/되거나, (b) 상기 영역 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되고; 상기 폴리펩티드는 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 폴리펩티드가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0028]

도 1은 베토 세포에 대한 TcdA 용량-반응 곡선의 예이다.

도 2A는 TNFR2/TNF 간섭 ELISA에서 인간 TNF에 대한 항-TNF ICVD Q65B1, ID8F-EV, ID43F 및 ID44F(실험 1)의 효력이다.

도 2B는 TNFR2/TNF 간섭 ELISA에서 인간 TNF에 대한 항-TNF ICVD Q65B1 및 ID8F-EV(실험 2)의 효력이다.

도 3A는 6시간 인큐베이션후 마우스 소장 상청액에서 항-TNF ICVD Q65B1, ID8F-EV, ID43F 및 ID44F의 안정성이다.

도 3B는 16시간 인큐베이션후 인간 배설물 및 마우스 소장 상청액에서 항-TNF ICVD Q65B1 및 ID8F-EV의 안정성이다.

도 4는 TNFR2/TNF 간섭 ELISA에서 인간 TNF에 대한 ICVD ID32F 및 ID34F의 효력이다.

도 5A는 16시간 인큐베이션후 마우스 소장 상청액에서 항-TNF ICVD ID32F 및 ID34F의 안정성이다.

도 5B는 16시간 인큐베이션후 인간 배설물 상청액 풀 4에서 항-TNF ICVD ID32F 및 ID34F의 안정성이다.

도 6A는 베토 세포 세포독성 검정에서 ID45B-ID50B에 의한 TcdB 027 중화이다.

도 6B는, 웨스턴 블롯에 의해 분석된, 30분 인큐베이션후 인간 배설물 상청액 풀 4에서 항-TcdB ID45B-ID50B의 안정성이다.

도 7은 베토 세포 세포독성 검정에서 ID2B, ID20B, ID21B 및 ID22B에 의한 TcdB 027 중화이다.

도 8A는 ID2B 트립신 검정-염색된 폴리아크릴아미드이다.

도 8B는 ID20B 및 ID21B 트립신 검정 - 염색된 폴리아크릴아미드 겔이다.

도 8C는 ID22B 트립신 검정 - 염색된 폴리아크릴아미드 겔이다.

도 9는 1시간 인큐베이션후 인간 배설물 상청액에서 항-TcdB ICVD ID2B 및 ID21B의 안정성이다.

도 10A는 베토 세포 세포독성 검정에서 ID1B, ID24B, ID25B 및 ID27B에 의한 TcdB 027 중화이다.

도 10B는 1시간 인큐베이션후 인간 배설물 상청액 풀 2에서 항-TcdB ICVD ID1B, ID24B, ID25B 및 ID27B의 안정성이다.

도 11A는 ID1B 트립신 검정 - 염색된 폴리아크릴아미드 겔이다.

도 11B는 ID24B 및 25B 트립신 검정 - 염색된 폴리아크릴아미드 겔이다.

도 11C는 ID27B 트립신 검정 - 염색된 폴리아크릴아미드 겔이다.

도 12A는 베토 세포 세포독성 검정에서 바이헤드 작제물 ID41B 및 ID43B에 의한 TcdB 017 중화이다.

도 12B는 4시간 인큐베이션후 씨. 디피실(C. difficile) 음성 인간 배설물 상청액 풀 2(3회 반복 ELISA)에서 항-TcdB 바이헤드 작제물 ID41B 및 ID43B의 안정성이다.

도 12C는 4시간 인큐베이션후 씨. 디피실 음성 인간 배설물 상청액 풀 3(3회 반복 ELISA)에서 항-TcdB 바이헤드 작제물 ID41B 및 ID43B의 안정성이다.

도 12D는 4시간 인큐베이션후 씨. 디피실 음성 인간 배설물 상청액 풀 4(3회 반복 ELISA)에서 항-TcdB 바이헤드 작제물 ID41B 및 ID43B의 안정성이다.

도 13A는 베토 세포 세포독성 검정에서 ID17A 및 ID29A에 의한 TcdA 087 중화이다.

도 13B는 1시간 인큐베이션후 인간 배설물 상청액에서 항-TcdA 바이헤드 작제물 ID17A 및 ID29A의 안정성이다.

서열의 설명

서열번호 1: 항-TNF- α ICVD Q65B1의 폴리펩티드 서열

서열번호 2: 항-TNF- α ICVD ID8F-EV(ID32F)의 폴리펩티드 서열

- 서열번호 3: 항-TNF- α ICVD ID43F의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 4: 항-TNF- α ICVD ID44F의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 5: 항-TNF- α ICVD ID34F의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 6: 항-TcdB ICVD B10F1의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 7: 항-TcdB ICVD Q31B1의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 8: 항-TcdB ICVD ID1B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 9: 항-TcdB ICVD ID2B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 10: 항-TcdB ICVD ID20B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 11: 항-TcdB ICVD ID21B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 12: 항-TcdB ICVD ID22B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 13: 항-TcdB ICVD ID24B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 14: 항-TcdB ICVD ID25B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 15: 항-TcdB ICVD ID27B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 16: 항-TcdB 작제물 ID41B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 17: 항-TcdB 작제물 ID43B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 18: 항-TcdB ICVD ID45B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 19: 항-TcdB ICVD ID46B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 20: 항-TcdB ICVD ID47B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 21: 항-TcdB ICVD ID48B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 22: 항-TcdB ICVD ID49B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 23: 항-TcdB ICVD ID50B의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 24: 항-TcdA 작제물 ID17A의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 25: 항-TcdA 작제물 ID29A의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 26: 예시적 CDR A
- 서열번호 27: 예시적 CDR A의 1/3
- 서열번호 28: 예시적 CDR A의 2/3
- 서열번호 29: 예시적 CDR A의 3/3
- 서열번호 30: 예시적 CDR B
- 서열번호 31: 예시적 CDR B의 2/3
- 서열번호 32: 항-IL-6R ICVD 7F6의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 33: 항-IL-6R ICVD ID-3V의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 34: 항-IL-6R ICVD 5G9의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 35: 항-IL-6R ICVD ID-54V의 폴리펩티드 서열

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 폴리펩티드, 항원-결합 폴리펩티드, VH 및 VHH 등의 면역글로불린쇄 가변 도메인(ICVD)를 포함하는 항체 및 항체 단편

- [0030] 폴리펩티드는 쇠에서 함께 결합된 다수의 아미노산 잔기로 이루어진 유기 고분자이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "폴리펩티드"는 "단백질" 및 "펩티드"와 호환적으로 사용된다. 폴리펩티드는 이들이, 친화성(적합하게는, 본원에서 추가로 기재된 바와 같이, Kd 값, Ka 값, kon-속도 및/또는 koff-속도로서 표시됨)으로 표적 항원 상의 에피토프에 결합할 수 있는, 항원-결합 부위를 형성하는 아미노산 잔기의 하나 이상의 스트레치를 함유할 때에 항원-결합인 것으로 한다. 항원-결합 폴리펩티드는 폴리펩티드, 예를 들면, 항체, 추가의 결합 영역 및 항원-결합 단편을 포함하도록 변형된 항체를 포함한다.
- [0031] 폴리펩티드는 높은 친화성(적합하게는, 본원에서 추가로 기재된 바와 같이, Kd 값, Ka 값, kon-속도 및/또는 koff-속도로서 표시됨)으로 표적에 결합할 수 있는 영역을 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 DARPin[참조: Binz et al. *Journal of Molecular Biology* 332(2):489-503], Affimers™, Fynomers™, Centyrins, Nanofitins® 및 사이클릭 펩티드를 포함한다.
- [0032] 종래의 항체 또는 면역글로불린(Ig)은 4개의 폴리펩티드 쇠: 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 단백질이다. 각 쇠는 불변 영역 및 가변 영역으로 분할된다. 중쇄 가변 도메인은 본원에서 VHC로 약칭되고, 경쇄(L) 가변 도메인은 본원에서 VLC로 약칭된다. 이들 도메인인, 이와 관련된 도메인 및 이로부터 유래된 도메인은 본원에서 면역글로불린 쇠 가변 도메인으로 지칭된다. VHC 및 VLC 도메인은, "프레임워크 영역"("FR")으로 명명되는, 보다 보존된 영역으로 산재된, "상보성 결정 영역"("CDR")으로 명명되는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 프레임워크 및 상보성 결정 영역은 정확하게 정의되어 있다[참조: Kabat et al 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication Number 91-3242*, 본원에서 이의 전체가 참조로서 도입됨]. 통상의 항체에서, 각각의 VHC 및 VLC는 하기 순서로 아미노-말단에서 카복시-말단까지 정렬된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 2개의 중쇄 면역글로불린 쇠 및 2개의 경쇄 면역글로불린 쇠의 통상의 항체 사량체는, 예를 들면, 디설파이드 결합 및 결합된 중쇄 유사성에 의해 상호-연결된 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 쇠로 형성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, CL로 이루어진다. 중쇄의 가변 도메인 및 경쇄의 가변 도메인은 항원과 상호작용하는 결합 도메인이다. 항체의 불변 영역은 전형적으로, 면역계의 다양한 세포(예: 효과기 세포) 및 고전적 상보성 시스템의 제1 성분(C1q)을 포함하는, 숙주 조직 또는 인자에 대한 항체의 결합을 매개한다. 용어 항체는 타입 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (뿐만 아니라 이의 서브타입)의 면역글로불린을 포함하고, 여기서 면역글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다 타입일 수 있다. 2개의 동일한 중쇄(H) 및 2개의 동일한 경쇄(L) 폴리펩티드로부터 조립된 면역글로불린-감마(IgG) 항체의 전체 구조는 충분히 확립되어 있고 포유동물에서 고도로 보존되어 있다[참조: Padlan 1994 *Mol Immunol* 31:169-217].
- [0033] 종래의 항체 구조에 대한 예외는 낙타과의 혈청에서 발견된다. 종래의 항체에 추가하여, 이들 혈청은 특별한 IgG 항체를 보유한다. 중쇄 항체(HCAB)로서 공지된 이들 항체는 L 쇠 폴리펩티드를 결여하고 제1 불변 도메인(CH1)을 결여한다. 이의 N-말단 영역에서, 호모이량체 단백질의 H 쇠는, 이의 동족 항원과 회합하도록 작용하는, VHHL로서 지칭되는 전용 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 함유한다[참조: Muyldermans 2013 *Annu Rev Biochem* 82:775-797, Hamers-Casterman et al 1993 *Nature* 363(6428):446-448, Muyldermans et al 1994 *Protein Eng* 7(9):1129-1135, 본원에서 이의 전체 내용이 참조로서 도입됨].
- [0034] VHH 또는 VH에서 아미노산 잔기의 총수는 105 내지 140, 적합하게는 108 내지 130, 및 가장 적합하게는 110 내지 125의 영역에 존재할 수 있다.
- [0035] 본원에서 사용된 항원-결합 단편(또는 "항체 단편", "면역글로불린 단편" 또는 "항원-결합 폴리펩티드")은 표적(예를 들면, 하나 이상의 면역글로불린 쇠가 전장은 아니지만 표적에 특이적으로 결합하는 분자)에 특이적으로 결합하는 항체의 부분을 지칭한다. 항원-결합 단편은 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함한다. 용어 항원-결합 단편에 포함되는 결합 단편의 예는
- [0036] (i) Fab 단편(VLC, VHC, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 일가 단편);
- [0037] (ii) F(ab')₂ 단편(힌지 영역에서 디설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편);
- [0038] (iii) Fd 단편(VHC 및 CH1 도메인으로 이루어짐);
- [0039] (iv) Fv 단편(항체의 단일 암(arm)의 VLC 및 VHC 도메인으로 이루어짐);
- [0040] (v) scFv 단편(VLC 및 VHC 영역이 쌍을 이루어 일가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇠로서 제조될 수 있게 하는

- [0051] ICVD 및 ICVD 작제물 서열에 적용된 카뱃 특성화
- [0052] CDR 1, 2 및 3은 각 ICVD 또는 작제물의 제1, 제2 및 제3 밀줄친 부분이다. FR 1, 2, 3 및 4는 각 ICVD의 CDR을 연결하는 제1, 제2, 제3 및 제4 부분이다. 링커는 또한 바이헤드의 경우에 제시되어 있다. 비변형된 경쟁 인자에 대한 치환은 이탤릭체 및 볼드체로 제시되어 있다. 괄호 안의 치환 기제는 N-대-C-말단 넘버링에 의해 지칭된다(카뱃 넘버링과 반대).
- [0053] 항-*TNF*-알파
- [0054] (서열번호 1)
- [0055] Q65B1 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITKYGDSVKG
RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR NQKGLN KGQGTQVTVSS
- [0056] (서열번호 2)
- [0057] ID32F/ID8F-EV
- [0058] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLIT#YGDSVKG
RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR NQKGLN KGQGTQVTVSS
- [0059] (서열번호 3)
- [0060] ID43F EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITAYGDSVKG
RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR NQKGLN KGQGTQVTVSS
- [0061] (서열번호 4)
- [0062] ID44F EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITQYGDSVKG
RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR NQKGLN KGQGTQVTVSS
- [0063] (서열번호 5)
- [0064] ID34F EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLIT#YGDSVKG
RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPEDTALYYCAR NQKGLN KGQGTQVTVSS
- [0065] 항-*TcdB*
- [0066] B10F1 (비변형) (서열번호 6)
- [0067] QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTS SYIMG WFRQAPGKEREFVA AINGSGGNRISADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQNSLKPEDTAVYYCAA SLTYYGSRARYDY WGQGTQVTVSS
- [0068] Q31B1 (비변형) (서열번호 7)
- [0069] EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTLS SYTMG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA HTTSGVPVRERSYAY WGQGTQVTVSS
- [0070] ID1B (Q1D 및 R27A를 갖는 B10F1) (서열번호 8)
- [0071] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGATFS SYIMG WFRQAPGKEREFVA AINGSGGNRISADSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQNSLKPEDTAVYYCAA SLTYYGSRARYDY WGQGTQVTVSS
- [0072] ID2B (E1D, V5Q 및 R27A를 갖는 Q31B1) (서열번호 9)
- [0073] DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTMG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA HTTSGVPVRERSYAY WGQGTQVTVSS
- [0074] ID20B (M34I, R53H, R56H를 갖는 ID2B) (서열번호 10)
- [0075] DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTIG WFRQAPEKEREFVA GSS#DG#TNYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA HTTSGVPVRERSYAY WGQGTQVTVSS
- [0076] ID21B (M34I, R107H를 갖는 ID2B) (서열번호 11)
- [0077] DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTIG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNYYANSVKG

RFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA HTTSGVPV/ERSYAY WGQGTQVTVSS

- [0078] ID22B (M34I, R109H을 갖는 ID2B) (서열번호 12)
- [0079] DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTIG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNTYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA HTTSGVPVRE/RSYAY WGQGTQVTVSS
- [0080] ID24B (M34I, R58H을 갖는 ID1B) (서열번호 13)
- [0081] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGATFS SYIIG WFRQAPGKEREFVA AINGSGGN/ISADSVKG
RFTISRDNAKNTVYQLNSLKPEDTAVYYCAA SLTYYG/SARYDY WGQGTQVTVSS
- [0082] ID25B (M34I, R108H을 갖는 ID1B) (서열번호 14)
- [0083] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGATFS SYIIG WFRQAPGKEREFVA AINGSGGN/ISADSVKG
RFTISRDNAKNTVYQLNSLKPEDTAVYYCAA SLTYYG/RSAR/IDY WGQGTQVTVSS
- [0084] ID27B (M34I, R105H을 갖는 ID1B) (서열번호 15)
- [0085] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGATFS SYIIG WFRQAPGKEREFVA AINGSGGN/ISADSVKG
RFTISRDNAKNTVYQLNSLKPEDTAVYYCAA SLTYYG/SARYDY WGQGTQVTVSS
- [0086] ID41B ((R107H을 갖는 ID2B) × (R105H을 갖는 ID1B), [G₄S]₄ 링커와 함께)(서열번호 16)
- [0087] DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTMG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNTYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA HTTSGVPV/ERSYAY WGQGTQVTVSS GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
- [0088] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGATFS SYYMG WFRQAPGKEREFVA AINGSGGN/ISADSVKG
RFTISRDNAKNTVYQLNSLKPEDTAVYYCAA SLTYYG/SARYDY WGQGTQVTVSS
- [0089] ID43B ((R108H을 갖는 ID2B) × (R105H을 갖는 ID1B), [G₄S]₄ 링커와 함께)(서열번호 17)
- [0090] DVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTMG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNTYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA HTTSGVPV/ERSYAY WGQGTQVTVSS GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
- [0091] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGATFS SYYMG WFRQAPGKEREFVA AINGSGGN/ISADSVKG
RFTISRDNAKNTVYQLNSLKPEDTAVYYCAA SLTYYG/SA/IDY WGQGTQVTVSS
- [0092] ID45B (D1E 및 Q5V를 갖는 ID2B, 야생형 R107) (서열번호 18)
- [0093] EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTMG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNTYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA HTTSGVPV/ERSYAY WGQGTQVTVSS
- [0094] ID46B (R107H을 갖는 ID45B) (서열번호 19)
- [0095] EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTMG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNTYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA HTTSGVPV/ERSYAY WGQGTQVTVSS
- [0096] ID47B (R107A을 갖는 ID45B) (서열번호 20)
- [0097] EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTMG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNTYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA HTTSGVPV/ERSYAY WGQGTQVTVSS
- [0098] ID48B (R107Q을 갖는 ID45B) (서열번호 21)
- [0099] EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTMG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNTYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA HTTSGVPV/ERSYAY WGQGTQVTVSS
- [0100] ID49B (R107F를 갖는 ID45B) (서열번호 22)
- [0101] EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTMG WFRQAPEKEREFVA GSSRDGRNTYYANSVKG
RFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAA HTTSGVPV/ERSYAY WGQGTQVTVSS
- [0102] ID50B (R107W를 갖는 ID45B) (서열번호 23)

- [0103] EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGATLS SYTMG WFRQAPEKEREVFA GSSRDGRNYYANSVKG
RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA HTTSGVPV#ERSYAY WGQGTQVTVSS
- [0104] 항-TcdA
- [0105] ID17A (서열번호 24)
- [0106] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGATSD VYAMG WFRQVPGKEREVFA TINRSGSDSYADSVKG
RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEETAVYYCAA SRSDCIGYGCRVSQDY WGQGTQVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
- [0107] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVISGMDFS HKPAG WFRQAPGKEREVFA SITTRASTHYADSVKG
RFTISRDNKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCNS EYY WGQGTQVTVSS
- [0108] ID29A (R109H을 갖는 ID17A) (서열번호 25)
- [0109] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGATSD VYAMG WFRQVPGKEREVFA TINRSGSDSYADSVKG
RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEETAVYYCAA SRSDCIGYGC#RVSQDY WGQGTQVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
- [0110] DVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVISG MDFS HKPAG WFRQAPGKEREVFA SITTRASTHYADSVKG
RFTISRDNKNTVYLEMNSLKPEDTAVYYCNS EYY WGQGTQVTVSS
- [0111] 항-IL-6R
- [0112] 7F6 (서열번호 32)
- [0113] EVQLVESGGGLVQAGGSTRLTCLASGSISS INVIQ WYRQAPGKQRELVA MIGRGEANYGDFAKG
RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYA DYEDRDSPFNGS WGQGTQVTVSS
- [0114] ID-3V (R102H을 갖는 7F6) (서열번호 33)
- [0115] EVQLVESGGGLVQAGGSTRLTCLASGSISS INVIQ WYRQAPGKQRELVA MIGRGEANYGDFAKG
RFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYA DYEDHDSPFNGS WGQGTQVTVSS
- [0116] 5G9 (서열번호 34)
- [0117] EVQLVESGGGLVQAGGSTRLTCKASGSIFNINS INVMA WYRQAPGKQRELVA IIGKGGGTNYADFVKG
RFTISRDAKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCYA DYEDRDSPFNAS WGQGTQVTVSS
- [0118] ID-54V (R105H을 갖는 5G9) (서열번호 35)
- [0119] EVQLVESGGGLVQAGGSTRLTCKASGSIFNINS INVMA WYRQAPGKQRELVA IIGKGGGTNYADFVKG
RFTISRDAKNTVNLQMNSLKPEDTAVYYCYA DYEDHDSPFNAS WGQGTQVTVSS
- [0120] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR에서 적어도 1개, 예를 들면, 2개, 예를 들면, 3개의 아르기닌 및/또는 리신 잔기는 히스티딘 잔기로 치환된다. 적합하게는, 1개의 아르기닌 및/또는 리신 잔기가 치환된다. 적합하게는, 치환은 적어도 1개, 예를 들면, 적어도 2개, 예를 들면, 3개의 CDR에서 이루어진다. 적합하게는, 1 내지 3개, 예를 들면, 1 내지 2개, 예를 들면, 1개의 치환(들)이 본 발명의 폴리펩티드의 모든 3개, 2개 또는 1개의 CDR(들)에서 이루어진다. 적합하게는, 3개 이하, 예를 들면, 2개 이하의 리신 및/또는 아르기닌 잔기가 치환된다.
- [0121] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3에서 각각의 리신 및/또는 아르기닌 잔기는 각각 적어도 1개, 보다 적합하게는 1개의 히스티딘 잔기로 치환되어 있다.
- [0122] 적합하게는, 치환을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드의 각각의 CDR은 3보다 짧은, 보다 적합하게는 4보다 짧은, 보다 적합하게는 5보다 짧은, 보다 적합하게는 6보다 짧은, 보다 적합하게는 7보다 짧은, 보다 적합하게는 8보다 짧은, 보다 적합하게는 9보다 짧은, 보다 적합하게는 10보다 짧은, 보다 적합하게는 11보다 짧은, 보다 적합하게는 12보다 짧은, 보다 적합하게는 13보다 짧은 아미노산이다.
- [0123] 적합하게는, 치환을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드의 각각의 CDR은 35보다 길지 않은, 보다 적합하게는 30보다 길지 않은, 보다 적합하게는 25보다 길지 않은, 보다 적합하게는 23보다 길지 않은, 보다 적합하게는 21보다 길지 않은, 보다 적합하게는 20보다 길지 않은, 보다 적합하게는 19보다 길지 않은, 보다 적합하게는 18보다 길지 않은, 보다 적합하게는 17보다 길지 않은 아미노산이다.

- [0124] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 2000보다 길지 않은, 보다 적합하게는 1500보다 길지 않은, 보다 적합하게는 1200보다 길지 않은, 보다 적합하게는 900보다 길지 않은, 보다 적합하게는 700보다 길지 않은, 보다 적합하게는 600보다 길지 않은, 보다 적합하게는 500보다 길지 않은, 보다 적합하게는 400보다 길지 않은, 보다 적합하게는 300보다 길지 않은, 보다 적합하게는 150보다 길지 않은, 보다 적합하게는 200보다 길지 않은, 보다 적합하게는 150보다 길지 않은 아미노산이다.
- [0125] CDR 내에 정의된 윈도우
- [0126] CDR 내의 잔기는 당해 CDR의 특정 분수에 속하는 것으로 생각될 수 있다. 예를 들면, 15개 아미노산 (ARNECDQGHILKMFP, 서열번호 26)으로 이루어진 CDR은 3/4: 1/3(ARNEC로 이루어진 윈도우, 서열번호 27), 2/3(DQGHI로 이루어진 윈도우, 서열번호 28) 및 3/3(LKMFP로 이루어진 윈도우, 서열번호 29)로 이루어진 것으로 생각될 수 있다. 유사하게는, 이러한 CDR은 5/5: 1/5(ARN으로 이루어진 윈도우), 2/5(ECD로 이루어진 윈도우), 3/5(QGH로 이루어진 윈도우), 4/5(ILK로 이루어진 윈도우) 및 5/5(MFP로 이루어진 윈도우)로 이루어진 것으로 생각될 수 있다. CDR의 분수의 넘버링은 N-말단으로부터 C-말단이다. 분수로의 분할이 각 분수에 존재하는 잔기의 비-정수(예를 들면, ARNECDQGHILKMFP로 이루어진 CDR의 7번째, 서열번호 26)를 제공하도록 CDR이 다수의 잔기로 이루어지는 경우, (a) CDR이 홀수의 잔기로 이루어지는 경우, 중앙 분수(예: 2/3 또는 3/4 등) 중의 잔기의 수는 가장 가까운 홀수로 반올림되거나, (b) CDR이 짝수의 잔기로 이루어지는 경우, 중앙 분수 중의 잔기의 수는 가장 가까운 짝수로 반올림된다. 예를 들면, ARNECDQGHILKMFP로 이루어지는 CDR의 4/7은 QGH로 이루어지는 윈도우이고, ARNECDQG(서열번호 30)으로 이루어지는 CDR의 2/3은 NECD(서열번호 31)로 이루어지는 윈도우이다.
- [0127] 적합하게는, 적어도 하나의 리신 및/또는 아르기닌 잔기는 CDR1의 2/3 및/또는 CDR2의 2/3 및/또는 CDR3의 2/3 및/또는 CDR의 3/5 및/또는 CDR2의 3/5 및/또는 CDR3의 3/5 및/또는 CDR1의 4/7 및/또는 CDR2의 4/7 및/또는 CDR3의 4/7로서 정의된 윈도우에 존재한다.
- [0128] 특정 실시형태에 따라, 본 발명의 폴리펩티드는 천연 존재 폴리펩티드의 아미노산 사열과 정확하게 동일한(100% 서열 동일성을 공유하는) 아미노산 서열을 갖지 않는다.
- [0129] 한 가지 실시형태에서, 3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하는 면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기 대신에 적어도 하나의 히스티딘 잔기, 및/또는 (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기 대신에 적어도 하나의 히스티딘 잔기를 갖고, 상기 폴리펩티드가, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 전구체 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 폴리펩티드가 제공된다.
- [0130] 전구체 폴리펩티드는 적합하게는 본원에 개시된 본 발명의 히스티딘 치환을 받지 않은 폴리펩티드이다. 적합하게는, 상응하는 전구체 폴리펩티드는, 동물에 의해, 예를 들면, V(D)J 재조합 및 체세포 돌연변이(예를 들면, 라마, 예를 들면, 하기 면역화)에 의해 직접 생산되고, 본원에 개시된 본 발명의 히스티딘 치환을 겪기 전에 추가의 합성 변형을 임의로 겪을 수 있는, "야생형" 폴리펩티드(예를 들면, 항체)이다.
- [0131] **특이성, 친화성 및 결합활성**
- [0132] 특이성은 특정 항원-결합 폴리펩티드가 결합할 수 있는 다수의 상이한 타입의 항원 또는 항원 결정기를 지칭한다. 항원-결합 폴리펩티드의 특이성은 특유의 분자 속성으로서 특정 항원을 인식하고 이를 또 다른 항원으로부터 구별하는 항원-결합 폴리펩티드의 능력이다.
- [0133] 항원-결합 폴리펩티드(Kd)를 갖는 항원의 해리에 대한 평형 상수에 의해 표시되는 친화성은 항원-결합 폴리펩티드 상의 항원성 결정소 및 항원-결합 부위 사이의 결합 강도의 척도이다: Kd의 값이 보다 낮으면, 항원성 결정소와 항원-결합 폴리펩티드 사이의 결합 강도는 보다 강하다(또는, 친화성은 1/Kd인 친화성 상수(Ka)로서 또한 표시될 수 있다). 친화성은 목적하는 특정 항원에 따라 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0134] 결합활성은 항원-결합 폴리펩티드 및 관련 항원 사이의 결합 강도의 척도이다. 결합활성은 항원-결합 폴리펩티드 상의 항원성 결정소 및 이의 항원-결합 부위 사이의 친화성 및 항원-결합 폴리펩티드 상에 존재하는 관련 결합 부위의 수 둘 다와 관련된다.
- [0135] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 10^{-6} 내지 10^{-12} M, 보다 적합하게는 10^{-7} 내지 10^{-12} M, 보다 적합하게는 10^{-8} 내지 10^{-12} M 및 보다 적합하게는 10^{-9} 내지 10^{-12} M의 해리 상수(Kd)를 갖는 이들의 표적에 결합한다.

- [0136] 10^{-6} 미만의 임의의 Kd 값은 특이적 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 항원 또는 항원성 결정기에 대한 항원-결합 폴리펩티드의 특이적 결합은, 예를 들면, 스캐자드 분석 및/또는 경쟁 결합 검정, 예를 들면, 방사선면역 검정(RIA), 효소 면역검정(EIA) 및 샌드위치 경쟁 검정, 및 당해 기술분야에 공지된 이의 상이한 변이체를 포함하는 임의의 적합한 공지된 방식으로 결정될 수 있다.
- [0137] **효력, 억제 및 중화**
- [0138] 효력은 소정 강도의 효과를 생성하는데 요구된 양으로 표현된 치료제의 활성의 척도이다. 매우 강력한 약제는, 낮은 농도에서 보다 적은 반응을 유발하는 보다 낮은 효력의 약제와 비교하여 낮은 농도에서 보다 큰 반응을 유발한다. 효력은 친화성과 유효성의 함수이다. 유효성은 표적 리간드에 결합시에 생물학적 반응을 생성하는 치료제의 능력 및 이러한 반응의 정량적 크기를 지칭한다. 용어 절반 최대 유효 농도(EC50)는 기준선과 명시된 노출 시간 후의 최대치 사이의 중간 반응을 유발하는 치료제의 농도를 지칭한다. 치료제는 억제 또는 자극을 유발할 수 있다. 이는 통상적으로 사용되고, 본원에서 효력의 척도로서 사용된다.
- [0139] 본 발명의 목적을 위한 중화 폴리펩티드는, ELISA에 의해 측정할 때, 하나 이상의 이의 동족 수용체(예: TNFR1 및 TNFR2)에 대한 약제의 결합을 억제하는 약제(예: TNF- α)에 결합하는 폴리펩티드이다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 목적을 위한 중화 폴리펩티드는, 예를 들면, 약제의 생물학적 효과를 억제함으로써 약제(예: TNF- α)의 효과로부터 세포를 방어하는 폴리펩티드이다. 예를 들면, 본 발명을 위한 중화 폴리펩티드는, 예를 들면, 독소의 생물학적 효과를 억제함으로써 독소(예: 클로스트리디움 디피실 독소 A 또는 B - "TcdA/TcdB")의 효과로부터 세포를 방어하는 폴리펩티드이다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 목적을 위한 중화 폴리펩티드는, ELISA에 의해 측정할 때, gp130에 대한 IL-6R/IL-6 복합체의 결합을 억제하는, IL-6R(및 따라서 IL-6R/IL-6 복합체)에 결합하는 폴리펩티드이다.
- [0140] 치료제의 효과(예: 중화 능력)는 효력 검정을 사용하여 확인할 수 있다. 특히 적합한 효력 검정은 알라마르 블루(Alamar Blue)를 사용한 배로 세포 생존율의 측정이다[참조: Fields and Lancaster *American Biotechnology Laboratory* 1993 11(4):48-50]. 공지된 농도 범위의 독소를 사용하여, 이러한 검정은, 용량-반응 곡선을 생성하고/생성하거나 치료학적 폴리펩티드의 절반 최대 유효 농도(EC50)를 확인함으로써 독소의 효과를 중화하는 치료학적 폴리펩티드의 능력을 확인하기 위해 수행할 수 있다. 이러한 배로 세포 세포독성 표준 검정은 본원에서 사용되고, 하기 실시예 부분에서 추가로 상세된다.
- [0141] 또 다른 특히 적합한 효력 검정은, 공지된 농도 범위의 약제와 관련하여, 용량-반응 곡선을 생성하고/하거나 치료학적 폴리펩티드의 절반 최대 유효 농도(EC50)를 확인함으로써 TNFR2에 대한 TNF- α 결합을 차단하는 치료제의 유효성을 시험하는, 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정(하기 실시예 부분에 추가로 상세됨)이다.
- [0142] 또 다른 특히 적합한 효력 검정은, 공지된 농도 범위의 약제와 관련하여, 용량-반응 곡선을 생성하고/하거나 치료학적 폴리펩티드의 절반 최대 유효 농도(EC50)를 확인함으로써 gp130에 대한 sIL-6/IL-6R 복합체 결합을 차단하는 치료제의 유효성을 시험하는, 표준 gp130 ELISA 검정(하기 실시예 부분에서 추가로 상세됨)이다.
- [0143] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드의 효력은, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드의 효력과 실질적으로 동일하다.
- [0144] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드는, 300nM 이하, 보다 적합하게는 200nM 이하, 보다 적합하게는 100nM 이하, 보다 적합하게는 80nM 이하, 보다 적합하게는 60nM 이하, 보다 적합하게는 40nM 이하, 보다 적합하게는 20nM 이하, 보다 적합하게는 10nM 이하, 보다 적합하게는 5nM 이하의 EC50으로, 결합 파트너에 대한 결합제, 예를 들면, 표준 TNF/TNFR2 간섭 ELISA 검정에서 TNFR2에 대한 TNF- α 의 결합을 억제한다.
- [0145] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 EC50은, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 예를 들면, 표준 TNF/TNFR2 간섭 ELISA 검정에서 TNFR2에 대한 TNF- α 의 결합을 억제하는데 있어서 300pM 이하, 보다 적합하게는 200pM 이하, 보다 적합하게는 100pM 이하, 보다 적합하게는 50pM 이하, 보다 적합하게는 25pM 이하, 보다 적합하게는 10pM 이하, 보다 적합하게는 5pM 이하 까지 증가된다.
- [0146] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 EC50은, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 예를 들면, 표준 TNF/TNFR2 간섭 ELISA 검정에서 TNFR2에 대한 TNF- α 의 결합을 억제하는데 있어서 500% 이하, 보다 적합하게는 400%, 보다 적합하게는 300%, 보다 적합하게는

200%, 보다 적합하게는 100%, 보다 적합하게는 70%, 보다 적합하게는 60%, 보다 적합하게는 50%, 보다 적합하게는 40%, 보다 적합하게는 30%, 보다 적합하게는 25%, 보다 적합하게는 20%, 보다 적합하게는 15%, 보다 적합하게는 10%, 보다 적합하게는 5%, 보다 적합하게는 2%, 보다 적합하게는 1%까지 증가된다.

[0147] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드는, 베로 세포 세포독성 표준 검정에서 100nM 이하, 보다 적합하게는 80nM 이하, 보다 적합하게는 60nM 이하, 보다 적합하게는 40nM 이하, 보다 적합하게는 30nM 이하, 보다 적합하게는 20nM 이하, 보다 적합하게는 10nM 이하, 보다 적합하게는 9nM 이하, 보다 적합하게는 8nM 이하, 보다 적합하게는 7nM 이하, 보다 적합하게는 6nM 이하, 보다 적합하게는 5nM 이하, 보다 적합하게는 4nM 이하, 보다 적합하게는 3nM 이하, 보다 적합하게는 2nM 이하, 보다 적합하게는 1nM 이하의 EC50으로 독소, 예를 들면, TcdA 또는 TcdB의 세포독성을 중화시킨다.

[0148] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 EC50은, 베로 세포 세포독성 표준 검정에서, TcdA 또는 TcdB 등의 독소의 세포독성을 중화시키는데 있어서, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 200nM 이하, 보다 적합하게는 150nM, 보다 적합하게는 100nM, 보다 적합하게는 80nM, 보다 적합하게는 60nM, 보다 적합하게는 40nM, 보다 적합하게는 20nM, 보다 적합하게는 10nM, 보다 적합하게는 5nM까지 증가된다.

[0149] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 EC50은, 베로 세포 세포독성 표준 검정에서, TcdA 또는 TcdB 등의 독소의 세포독성을 중화시키는데 있어서, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 500% 이하, 보다 적합하게는 400%, 보다 적합하게는 300%, 보다 적합하게는 200%, 보다 적합하게는 100%, 보다 적합하게는 70%, 보다 적합하게는 60%, 보다 적합하게는 50%, 보다 적합하게는 40%, 보다 적합하게는 30%, 보다 적합하게는 25%, 보다 적합하게는 20%, 보다 적합하게는 15%, 보다 적합하게는 10%, 보다 적합하게는 5%, 보다 적합하게는 2%, 보다 적합하게는 1%까지 증가된다.

[0150] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드는, 표준 gp130 ELISA 검정에서, 300nM 이하, 보다 적합하게는 200nM 이하, 보다 적합하게는 100nM 이하, 보다 적합하게는 80nM 이하, 보다 적합하게는 60nM 이하, 보다 적합하게는 40nM 이하, 보다 적합하게는 20nM 이하, 보다 적합하게는 10nM 이하, 보다 적합하게는 5nM 이하, 보다 적합하게는 1nM 이하, 보다 적합하게는 0.5nM 이하, 보다 적합하게는 0.3nM 이하, 보다 적합하게는 0.2nM 이하, 보다 적합하게는 0.15nM 이하의 EC50으로 결합 파트너에 대한 결합제의 결합, 예를 들면, gp130에 대한 sIL-6/IL-6R 복합체 결합을 억제시킨다.

[0151] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 EC50은, 표준 sp130 ELISA 검정에서 gp130에 대한 sIL-6/IL-6R 복합체 결합 등과 같이 결합 파트너에 대한 결합제의 결합을 억제시키는데 있어서, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 300pM 이하, 보다 적합하게는 200pM 이하, 보다 적합하게는 100pM 이하, 보다 적합하게는 80pM 이하, 보다 적합하게는 70pM 이하, 보다 적합하게는 60pM 이하, 보다 적합하게는 50pM 이하, 보다 적합하게는 25pM 이하, 보다 적합하게는 20pM 이하, 보다 적합하게는 15pM 이하, 보다 적합하게는 10pM 이하, 보다 적합하게는 5pM 이하까지 증가된다.

[0152] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 EC50은, 표준 sp130 ELISA 검정에서 gp130에 대한 sIL-6/IL-6R 복합체 결합 등과 같이 결합 파트너에 대한 결합제의 결합을 억제시키는데 있어서, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 600% 이하, 보다 적합하게는 500% 이하, 보다 적합하게는 400%, 보다 적합하게는 300%, 보다 적합하게는 200%, 보다 적합하게는 100%, 보다 적합하게는 70%, 보다 적합하게는 60%, 보다 적합하게는 50%, 보다 적합하게는 40%, 보다 적합하게는 30%, 보다 적합하게는 25%, 보다 적합하게는 20%, 보다 적합하게는 15%, 보다 적합하게는 10%, 보다 적합하게는 5%, 보다 적합하게는 2%, 보다 적합하게는 1%까지 증가된다.

[0153] 치환은, 예를 들면, 산성 엔도솜 내로 항체의 도입시에 항원에 대한 항체의 친화성을 현저히 감소시키기 위해, pH 감수성을 도입시킬 목적으로 폴리펩티드에 대해 이루어질 수 있다. 그러나, 본 발명의 치환은 적합하게는 실질적인 pH 감수성을 유발하지 않는다. 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드에 대한 치환은 표적 결합의 pH 의존성을 조작하기 위한 것은 아니다. 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 친화성은 pH 3 내지 9의 임의의 pH, 보다 적합하게는 pH 4 내지 8의 임의의 pH에서 실질적으로 동일하게 유지된다.

[0154] **위장관(GIT) 및 소화 효소**

[0155] GIT는 식품을 소비 및 소화시키고 영양소를 흡수하고 폐기물을 배출하는데 관여하는 기관계이다. 인간 및 기타

포유동물에서, GIT는 입, 식도, 위, 소장(십이지장, 공장 및 회장) 및 대장(맹장, 결장, 직장 및 항문관)으로 이루어진다. 위장관과 대조적으로, 장관은 단지 소장 및 대장으로 이루어진다. 다양한 병원체는 콜로니를 형성할 수 있고, 다양한 질환의 위장관의 상이한 영역에서 명백할 수 있다.

- [0156] 위장관의 상이한 부분은 각각 소화 효소의 복잡한 혼합물을 함유한다. 이들 소화 효소는 프로테아제, 리파제, 아밀라제 및 뉴클레아제를 포함한다. 프로테아제는 세린 프로테아제, 트레오닌 프로테아제, 시스테인 프로테아제, 아스파르테이트 프로테아제, 글루탐산 프로테아제 및 메탈로프로테아제를 포함한다. 프로테아제는 아미노산 잔기를 연결하는 펩티드 결합을 분할함으로써(단백질분해) 폴리펩티드 쇄의 보다 짧은 단편으로의 소화에 관여한다. 일부는 단백질 쇄로부터 말단 아미노산을 떼어내고(엑소펩티다제); 다른 것들은 단백질의 내부 펩티드 결합을 공격한다(엔도펩티다제). 장관은 상이한 프로테아제의 광범위한 어레이를 포함한다.
- [0157] 장관에서의 단백질분해는, 광범위한 단백질 기질이 존재하는 광범위한 프로테아제에 의해 가수분해되도록 고도로 무차별적일 수 있다. 이는 장관 내에서 보다 작은 폴리펩티드 단편으로 소화된 폴리펩티드의 광범위한 어레이를 절단하는 프로테아제의 경우이다.
- [0158] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드에 대해 이루어진 치환은, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 소장 및 대장에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대한 폴리펩티드의 안정성을 증가시킨다. 적합하게는, 프로테아제는 장내 미생물총 또는 병원성 세균으로부터 유래하는 프로테아제를 포함하고, 여기서 프로테아제는 세포 막-부착형 프로테아제, 분비된 프로테아제 및/또는 세포 용해로 방출된 프로테아제이다. 적합하게는, 하나 이상의 프로테아제는 트립신, 키모트립신, 숙주 염증 프로테아제, 미생물총으로부터 유래하는 프로테아제 및 병원성 세균으로부터 유래하는 프로테아제, 예를 들면, 씨. 디피실-특이적 프로테아제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 적합하게는, 장관은 포유동물 장관, 예를 들면, 인간, 유인원, 무린, 소, 양, 고양이, 개, 말 또는 돼지 장관이다.
- [0159] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드에 대해 이루어진 치환 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드에 대해 이루어진 치환은, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 장관 또는 장관 모델, 예를 들면, 소장 및/또는 대장, 예를 들면, 십이지장, 공장, 회장, 결장, 직장 및/또는 항문관에서 폴리펩티드의 안정성을 증가시킨다. 적합하게는, 장관의 모델은 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델, 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델 또는 표준 트립신 장관 모델이다.
- [0160] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 적어도 20%, 보다 적합하게는 적어도 25%, 보다 적합하게는 적어도 30%, 보다 적합하게는 적어도 35%, 보다 적합하게는 적어도 40%, 보다 적합하게는 적어도 50%, 보다 적합하게는 적어도 60%는, 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델에서 6 또는 16시간 인큐베이션 후에, 예를 들면, ICVD가 항-TNF- α ICVD인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정에 의해 또는 ICVD가 항-독소 ICVD인 경우에 표준 독소 ELISA 검정에 의해 측정될 때, 생존가능한 상태로 존재한다.
- [0161] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 안정성은, 예를 들면, ICVD가 항-TNF- α ICVD인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정에 의해 또는 ICVD가 항-독소 ICVD인 경우에 표준 독소 ELISA 검정에 의해 측정할 때, 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델에서 6 또는 16시간 인큐베이션 후에, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 적어도 1%, 보다 적합하게는 2%, 보다 적합하게는 3%, 보다 적합하게는 5%, 보다 적합하게는 7%, 보다 적합하게는 10%, 보다 적합하게는 15%, 보다 적합하게는 20%, 보다 적합하게는 30%, 보다 적합하게는 40%, 보다 적합하게는 50%, 보다 적합하게는 60%, 보다 적합하게는 70% 증가된다.
- [0162] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 적어도 20%, 보다 적합하게는 적어도 25%, 보다 적합하게는 적어도 30%, 보다 적합하게는 적어도 35%, 보다 적합하게는 적어도 40%, 보다 적합하게는 적어도 50%, 보다 적합하게는 적어도 60%, 보다 적합하게는 적어도 70%, 보다 적합하게는 적어도 80%, 보다 적합하게는 적어도 90%는, 예를 들면, ICVD가 항-TNF- α ICVD인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정에 의해 또는 ICVD가 항-독소 ICVD인 경우에 표준 독소 ELISA 검정에 의해 측정할 때, 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에서 30분, 1시간, 4시간 또는 16시간 인큐베이션 후, 생존가능한 상태로 존재한다.
- [0163] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드는, 예를 들면, ICVD가 항-TNF- α ICVD인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정에 의해 또는 ICVD가 항-독소 ICVD인 경우에 표준 독소 ELISA 검정에 의해 측정할 때, 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에서 30분, 1시간, 4시간 또는 16시간 인큐베이션 후, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 적어도 1%, 보다 적합하게는 2%, 보다

적합하게는 3%, 보다 적합하게는 5%, 보다 적합하게는 7%, 보다 적합하게는 10%, 보다 적합하게는 15%, 보다 적합하게는 20%, 보다 적합하게는 25%, 보다 적합하게는 30%, 보다 적합하게는 40%, 보다 적합하게는 50%, 보다 적합하게는 60%, 보다 적합하게는 70% 증가된다.

[0164] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 적어도 5%, 보다 적합하게는 적어도 10%, 보다 적합하게는 적어도 20%, 보다 적합하게는 적어도 25%, 보다 적합하게는 적어도 30%, 보다 적합하게는 적어도 35%, 보다 적합하게는 적어도 40%, 보다 적합하게는 적어도 50%, 보다 적합하게는 적어도 60%는, 예를 들면, ICVD가 항-IL-6R ICVD인 경우에 표준 gp130 ELISA 검정에 의해 측정할 때, 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델에서 4시간 인큐베이션한 후에, 생존가능한 상태로 존재한다.

[0165] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 안정성은, 예를 들면, ICVD가 항-IL-6R ICVD인 경우에 표준 gp130 ELISA 검정에 의해 측정할 때, 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델에서 4시간 인큐베이션한 후에, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 적어도 1%, 보다 적합하게는 2%, 보다 적합하게는 3%, 보다 적합하게는 5%, 보다 적합하게는 7%, 보다 적합하게는 10%, 보다 적합하게는 15%, 보다 적합하게는 20%, 보다 적합하게는 30%, 보다 적합하게는 40%, 보다 적합하게는 50%, 보다 적합하게는 60%, 보다 적합하게는 70% 증가된다.

[0166] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 적어도 20%, 보다 적합하게는 적어도 25%, 보다 적합하게는 적어도 30%, 보다 적합하게는 적어도 35%, 보다 적합하게는 적어도 40%, 보다 적합하게는 적어도 50%, 보다 적합하게는 적어도 60%, 보다 적합하게는 적어도 70%, 보다 적합하게는 적어도 80%, 보다 적합하게는 적어도 90%는, 예를 들면, ICVD가 항-IL-6R ICVD인 경우에 표준 gp130 ELISA 검정에 의해 측정할 때, 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에서 16시간 인큐베이션한 후에, 생존가능한 상태로 존재한다.

[0167] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드의 안정성은, ICVD가 항-IL-6R ICVD인 경우에 표준 gp130 ELISA 검정에 의해 측정할 때, 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에서 16시간 인큐베이션한 후에, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 적어도 1%, 보다 적합하게는 2%, 보다 적합하게는 3%, 보다 적합하게는 5%, 보다 적합하게는 7%, 보다 적합하게는 10%, 보다 적합하게는 15%, 보다 적합하게는 20%, 보다 적합하게는 25%, 보다 적합하게는 30%, 보다 적합하게는 40%, 보다 적합하게는 50%, 보다 적합하게는 60%, 보다 적합하게는 70% 증가된다.

[0168] 인큐베이션 후에 잔류하는 "생존가능한" ICVD의 비율은 무손상 ICVD의 비율(예를 들면, 표준 웨스턴 블롯 안정성 검정) 또는 기능적 ICVD의 비율(예를 들면, ICVD가 항-TNF- α ICVD인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정, 또는 ICVD가 항-독소 ICVD인 경우에 표준 독소 ELISA 검정)을 지칭한다. 대안적으로 또는 추가로, 인큐베이션 후에 잔류하는 "생존가능한" ICVD의 비율은 무손상 ICVD의 비율(예를 들면, 표준 웨스턴 블롯 안정성 검정), 또는 기능적 ICVD의 비율(예를 들면, ICVD가 항-IL-6R ICVD인 경우에 표준 gp130 ELISA 검정)을 지칭한다.

[0169] **위장관의 질환**

[0170] 위장관의 질환은 위장관, 즉 식도, 위, 소장(십이지장, 공장 및 회장) 및 대장(맹장, 결장, 직장 및 항문관)이 관여하는 질환을 지칭한다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드는 이러한 질환의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드는 이러한 질환의 국소적 및/또는 국소 치료 또는 예방에 사용된다.

[0171] 위장관의 예시적 질환은 하기에 기재되어 있다.

[0172] 위장관의 자가면역 질환 및/또는 염증 질환

[0173] 자가면역 질환은 면역계가 정상 신체 조직에 대해 역으로 반응할 때에 발달한다. 자가면역 장애는 신체 조직에 대한 손상, 비정상 기관 성장 및/또는 기관 기능의 변화를 가져올 수 있다. 장애는 하나의 기관 또는 조직에만 영향을 미칠 수 있거나 복수의 기관 및 조직에 영향을 미칠 수 있다. 자가면역 장애에 의해 통상 영향을 받는 기관 및 조직은 혈액 성분, 예를 들면, 적혈구 세포, 혈관, 결합 조직, 내분비선, 예를 들면, 갑상선 또는 췌장, 근육, 결합조직 및 피부를 포함한다. 염증 질환은 염증을 특징으로 하는 질환이다. 다수의 염증 질환은 자가면역 질환이고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다.

[0174] 소아 및 성인 모두를 괴롭히는, 만성 장염 질환(IBD) 크론병 및 궤양성 대장염은 위장관의 자가면역 및 염증 질환의 예이다[참조: Hendrickson et al 2002 *Clin Microbiol Rev* 15(1):79-94, 본원에서 이의 전체가 참조로서

도입됨]. 췌양성 대장염은 염증 반응 및 형태학적 변화가 결장으로 한정된 상태로 존재하는 상태로 정의된다. 직장은 환자의 95%에 관여한다. 염증은 대부분 점막으로 제한되고, 췌양, 부종 및 결장 길이를 따르는 출혈과 함께 가변 증증도의 연속적 관여로 이루어진다[참조: Hendrickson et al 2002 *Clin. Microbiol Rev* 15(1):79-94, 본원에서 이의 전체가 참조로서 도입됨]. 췌양성 대장염은 통상 배설물의 통과 동안 가장 심각한 하복부를 따라 대변과 혼합된 혈액 및 점액의 존재에 의해 명백해진다. 임상적으로, 혈액 및 점막과 함께 설사의 존재는, 혈액이 부재하는 과민성 장 증후군으로부터 췌양성 대장염을 구별한다. 췌양성 대장염과 달리, 크론병의 표시는, 이후의 진단을 유도하는, 통상은 미묘하다. 이러한 위치, 범위 및 관여의 증증도 등의 요인은 증상의 정도를 결정한다. 회장염 관여를 갖는 환자는, 우하 사분원에서의 유연함 및 경우에 따라 염증 매쓰와 함께, 통상적으로 식후 복통을 갖는다.

[0175] 적합하게는, 본 발명의 조성물은, 적합하게는 크론병, 췌양성 대장염, 과민성 장 증후군, 당뇨병 타입 II, 사구체신염, 자가면역 간염, 호그렌 증후군, 헬리코박터 및 약물- 또는 방사선-유도된 점막염(가장 적합하게는 크론병)으로 이루어진 목록으로부터 선택된, 위장관의 자가면역 및/또는 염증 질환의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0176] 위장관의 감염

[0177] 바이러스, 세균, 기생충 및 기타 병원성 감염이 위장관에서 발생할 수 있다. 이들은 위장관으로 한정되거나, 신체의 다른 부분으로 확산 전에 위장관에서 개시될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*), 시겔라(*Shigella*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*), 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 또는 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)를 포함하는 통상의 세균 위장관 병원체에 의한 감염을 포함하는 세균 감염의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 로타 바이러스, 노로바이러스 및 작은 환상 바이러스를 포함하는 통상의 바이러스 위장관 병원체를 포함하는 바이러스 감염의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 병원체 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다. 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 씨. 디피실 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다.

[0178] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 장관을 통해 접근가능한 표적, 예를 들면, 장관 내의 표적에 결합한다. 적합하게는, 표적은 장관 상주 병원성 미생물로부터 유래하는 유해 물질이다. 적합하게는, 표적은 병원, 숙주 세포, 숙주 유래된 염증성 매개인자 또는 질환 병인에 관여하는 단백질을 유도할 수 있는 숙주 미생물총으로부터 유래하는 표적이다. 적합하게는, 표적은 TNF- α , 씨. 디피실 독소 A 또는 씨. 디피실 독소 B로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또는, 표적은 IL-6R, TNF- α , 씨. 디피실 독소 A 또는 씨. 디피실 독소 B로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0179] 링커 및 다량체

[0180] 본 발명에 따르는 작제물은 복수의 폴리펩티드를 포함하고, 따라서 적합하게는 다가일 수 있다. 이러한 작제물은 본 발명에 따르는 적어도 2개의 동일한 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본 발명에 따르는 2개의 동일한 폴리펩티드로 이루어진 작제물은 "호모바이헤드(homobihead)"이다. 본 발명의 한 가지 양태에서, 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 작제물이 제공된다. 추가의 양태에서, 본 발명의 2개 이상의 (가능하게는 동일한) 폴리펩티드를 포함하는 작제물이 제공된다.

[0181] 또는, 작제물은 상이한 적어도 2개의 폴리펩티드를 포함할 수 있지만, 여전히 본 발명의 폴리펩티드이다("헤테로바이헤드(heterobihead)").

[0182] 또는, 이러한 작제물은 (a) 본 발명에 따르는 적어도 하나의 폴리펩티드 및 (b) 본 발명의 폴리펩티드가 아닌 (또한 "헤테로바이헤드"), 항체 또는 이의 항원-결합 단편 등의 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. (b)의 적어도 하나의 폴리펩티드는 TNF- α , TcdA 또는 TcdB에 결합할 수 있거나(예를 들면, (a)의 것과 상이한 에피토프를 통해), 달리는 함께 또 다른 표적에 결합할 수 있다. 적합하게는, 상이한 폴리펩티드(b)는, 예를 들면, 또 다른 프로 염증성 사이토킨 또는 케모카인 또는 이들의 각각의 수용체, 다른 염증성 매개인자 또는 인간 병리학적 프로세스에 관여하는 면역학적 관련 리간드에 결합한다.

[0183] 작제물은 다가 및/또는 다중특이적일 수 있다. 다가 작제물(예를 들면, 이가 작제물)은 2개 이상의 결합 폴리펩티드를 포함하고, 따라서 하나 이상의 항원에 대한 부착이 발생할 수 있는 2개 이상의 부위를 제공한다. 다

가 작제물의 예는 호모바이헤드 또는 헤테로바이헤드일 수 있다. 다중특이적 작제물(예를 들면, 이중특이적 작제물)은, (a) 2개 이상의 상이한 항원에 대한 부착이 발생할 수 있거나 (b) 동일한 항원 상의 2개 이상의 상이한 에피토프에 대한 부착이 발생할 수 있는, 2개 이상의 부위를 제공하는 2개 이상의 상이한 결합 폴리펩티드를 포함한다. 다중특이적 작제물의 예는 헤테로바이헤드일 수 있다. 다중특이적 작제물은 다가이다.

[0184] 적합하게는, 작제물 내에 포함된 폴리펩티드는 항체 단편이다. 보다 적합하게는, 작제물 내에 포함된 폴리펩티드는 VHH, VH, VL, V-NAR, scFv, Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편으로 이루어진 목록으로부터 선택된다. 보다 적합하게는, 작제물 내에 포함된 폴리펩티드는 VHH이다.

[0185] 본 발명의 폴리펩티드는 직접(즉, 링커의 사용 없이) 또는 링커를 통해 서로 연결될 수 있다. 링커는 적합하게는 폴리펩티드이고, 이들의 에피토프에 대한 폴리펩티드의 결합을 가능하게 하도록 선택될 것이다. 치료 목적을 위해 사용되는 경우, 링커는 적합하게는 폴리펩티드가 투여되는 대상체에서 비-면역원성이다. 적합하게는, 폴리펩티드는 모두 링커에 의해 결합된다. 적합하게는, 링커는 포맷 (G₄S)_x의 것이다. 가장 적합하게는, x는 6이다.

[0186] **치료학적 용도 및 전달**

[0187] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드는, 경구 투여에 의해 전달되는 의약으로서 사용하기 위한, 적합하게는 위장관 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이다(상기 참조). 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드는 또한, 예를 들면, 비만 등의 대사 장애와 같이 경구 투여에 의해 다른 의학적 병태의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 장관에서 국소 효과를 갖는 것으로 의도된다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 방법의 폴리펩티드는 치료학적 유효량으로 순환으로의 전달에 의한 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것이 아니다.

[0188] 본 발명의 한 가지 양태에서, 치료학적 유효량의 본 발명의 폴리펩티드를 이를 필요로 하는 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 위장관 질환의 치료 방법이 제공된다.

[0189] 폴리펩티드의 치료학적 유효량은, 대상체에게 단일 또는 복수 용량 투여시, 대상체에서 선택된 표적의 생물학적 효과를 유의한 정도로 중화시키는데 효과적인 양이다. 치료학적 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 폴리펩티드의 능력 등의 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 폴리펩티드의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 치료학적으로 유리한 효과가 상회하는 것이다. 본 발명의 폴리펩티드는 대상체에게 경구 투여에 적합한 약제학적 조성물로 도입될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 약제학적으로 허용되는 염의 형태로 존재할 수 있다.

[0190] 본 발명의 한 가지 양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0191] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 전달을 위해 제형화될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 다양한 형태로 존재할 수 있다. 이들은, 예를 들면, 액체, 반고체 및 고체 용량형, 예를 들면, 액제 용액, 분산제 또는 현탁제, 정제, 환제 및 산제를 포함한다. 고체 용량형이 바람직하다. 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있고, 적합하게는 섭취가능한 정제, 버겔정, 트로키제, 캡슐제, 엘릭시르, 현탁제, 시럽제, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.

[0192] 전형적으로, 본 발명의 조성물 또는 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용되는 부형제, 예를 들면, 담체를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 하나 이상의 물, 식염수, 인산염 완충 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등, 및 이들의 조합을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 미량의 보조 물질, 예를 들면, 습윤 또는 유화제, 방부제 또는 완충제를 추가로 포함할 수 있고, 이들은 본 발명의 폴리펩티드의 저장 수명 또는 유효성을 증강시킨다. 약제학적 조성물은 부착방지제, 결합제, 코팅제, 봉해제, 풍미제, 착색제, 윤활제, 흡착제, 방부제, 감미료, 동결 건조 부형제(동결건조보호제 포함) 또는 압축 보조제를 포함할 수 있다. 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 약제학적 조성물로 도입되기 전에 동결건조된다.

[0193] 본 발명의 폴리펩티드는 또한 장용 코팅으로 제공될 수 있다. 장용 코팅은 위장의 낮은 pH로부터 폴리펩티드를 보호하는 경우 의약에 적용되는 중합체 장벽이다. 장용 코팅에 사용된 재료는 지방산, 왁스, 셀락, 플라스틱 및 식물 섬유를 포함한다. 적합한 장용 코팅 성분은 메틸 아크릴레이트-메타크릴산 공중합체, 셀룰로즈 아세테이트 석시네이트, 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로즈 프탈레이트, 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로즈 아세테이트 석시네이트(하이드로멜로즈 아세테이트 석시네이트), 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(PVAP), 메틸 메타크릴레

이트-메타크릴산 공중합체, 나트륨 알기네이트 및 스테아르산을 포함한다. 적합한 장용 코팅은 pH-의존성 방출 중합체를 포함한다. 이들은, 위장에서 발견된 높은 산성 pH에서 불용성이지만 보다 낮은 산성 pH에서 신속하게 용해하는 중합체이다. 따라서, 적합하게는, 장용 코팅은 위장의 산성 주스(pH 약 3)에서 용해하지 않지만, 소장(pH 6 초과) 또는 결장(pH 7.0 초과)에 존재하는 보다 높은 pH 환경에서 용해할 것이다. pH-의존성 방출 중합체는, 용량이 장관의 표적 영역에 도달하는 시간에서 본 발명의 폴리펩티드가 방출되도록 선택된다.

- [0194] 본 발명의 조성물은, 조성물의 pH를 안정화하기 위해, 5 내지 50, 또는 보다 적합하게는 15 내지 40 또는 보다 적합하게는 25 내지 30g/L의 농도로 완충액에서 제형화될 수 있다. 적합한 완충액 성분의 예는 생리학적 염, 예를 들면, 나트륨 시트레이트 및/또는 시트르산을 포함한다. 적합하게는, 완충액은 100 내지 200, 보다 적합하게는 125 내지 175mM 생리학적 염, 예를 들면, 염화나트륨을 함유한다. 적합하게는, 완충액은 조성물의 pH 또는 환자의 생리학적 pH에 근접하는 pKa를 갖도록 선택된다.
- [0195] 약제학적 조성물 중의 예시적 폴리펩티드 농도는 약 10ng/mL 내지 약 200mg/mL, 예를 들면, 약 50ng/mL 내지 약 100mg/mL, 예를 들면, 약 1ug/mL 내지 약 80mg/mL, 예를 들면, 약 10ug/mL 내지 약 50mg/mL, 예를 들면, 약 50ug/mL 내지 약 30mg/mL, 예를 들면, 약 100ug/mL 내지 약 20mg/mL, 또는 약 1mg/mL 내지 약 200mg/mL, 또는 약 50mg/mL 내지 약 200mg/mL, 또는 약 150mg/mL 내지 약 200mg/mL의 범위일 수 있다.
- [0196] 본 발명의 폴리펩티드의 수성 제형은 pH-완충된 용액에서, 예를 들면, 약 4.0 내지 약 7.0, 또는 약 5.0 내지 약 6.0, 또는 달리는 약 5.5 범위의 pH에서 제조될 수 있다. 적합한 완충액의 예는 인산염-, 히스티딘-, 시트레이트-, 석시네이트-, 아세테이트-완충액 및 기타 유기 산 완충액을 포함한다. 완충액 농도는, 예를 들면, 완충액 및 제형의 목적하는 장성(tonicity)에 따라 약 1mM 내지 약 100mM, 또는 약 5mM 내지 약 50mM일 수 있다.
- [0197] 약제학적 조성물의 장성은 장성 조절제를 포함시킴으로써 변경시킬 수 있다. 이러한 장성 조절제는 하전되거나 비하전된 화학종일 수 있다. 전형적인 비하전된 장성 조절제는 당 또는 당 알콜 또는 기타 폴리올, 바람직하게는 트레할로즈, 슈크로즈, 만니톨, 글리세롤, 1,2-프로판디올, 라피노즈, 솔비톨 또는 락티톨(특히, 트레할로즈, 만니톨, 글리세롤 또는 1,2-프로판디올)을 포함한다. 전형적인 하전된 장성 조절제는 염, 예를 들면, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 이온과 클로라이드, 설페이트, 카보네이트, 설파이트, 니트레이트, 락테이트, 석시네이트, 아세테이트 또는 말레에이트 이온(특히, 염화나트륨 또는 황산나트륨)과의 조합물; 또는 아르기닌 또는 히스티딘 등의 아미노산을 포함한다. 적합하게는, 수성 제형은, 고장성 또는 저장성 용액이 적합할 수도 있지만, 등장성이다. 용어 "등장성"은 비교되는 일부 다른 용액, 예를 들면, 생리식염수 용액 또는 혈청과 동일한 장성을 갖는 용액을 나타낸다. 등장제는 약 5mM 내지 약 350mM의 양, 예를 들면, 1mM 내지 500mM의 양으로 사용될 수 있다. 적합하게는, 적어도 하나의 등장제가 조성물에 포함된다.
- [0198] 계면활성제는 제형화된 폴리펩티드의 응집을 감소시키고/시키거나 제형 중의 미립자의 형성을 최소화시키고/시키거나 흡착을 감소시키기 위해 약제학적 조성물에 또한 첨가될 수 있다. 예시적 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스테르(Tween), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르(Brij), 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에테르(Triton-X), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체(Poloxamer, Pluronic) 및 나트륨 도데실 설페이트(SDS)를 포함한다. 적합한 폴리옥시에틸렌솔비탄-지방산 에스테르의 예는 폴리솔베이트 20 및 폴리솔베이트 80이다. 계면활성제의 예시적 농도는 약 0.001% 내지 약 10% w/v의 범위일 수 있다.
- [0199] 동결보호제는 또한 동결건조 프로세스 동안 불안정화 조건에 대해 본 발명의 폴리펩티드를 보호하기 위해 첨가될 수 있다. 예를 들면, 공지된 동결보호제는 당(글루코즈, 슈크로즈, 만노즈 및 트레할로즈 포함); 폴리올(만니톨, 솔비톨 및 글리세롤 포함); 및 아미노산(알라닌, 글리신 및 글루탐산 포함)을 포함한다. 동결보호제는 약 10mM 내지 500mM의 양으로 포함될 수 있다.
- [0200] 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하기 위한 용량 범위는 목적하는 치료 효과를 생성하는 것들이다. 요구된 용량 범위는 약제학적 조성물의 정확한 성질, 장관의 표적 영역, 제형의 성질, 환자의 연령, 환자 병태의 성질, 정도 또는 중증도, 필요한 경우, 금기 사항, 및 주치의의 판단에 의존한다. 이들 용량 수준의 변화는 최적화를 위한 표준 경험적 루틴을 사용하여 조정할 수 있다.
- [0201] 본 발명의 폴리펩티드의 증가된 장내 안정성은, 본 발명의 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드의 경우에 경구 전달될 필요가 있는 것보다 낮은 용량이 경구 전달될 수 있음을 의미한다.
- [0202] 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 일일 용량은 체중 kg당 50ng 내지 50mg, 예를 들면, 체중 kg당 50 μ g 내지 40mg, 예를 들면, (예: 인간) 체중 kg당 5 내지 30mg, 예를 들면, 체중 kg당 25mg 미만, 예를 들면, 20mg 미만, 예를 들면 15mg 미만, 예를 들면, 10mg 미만, 예를 들면, 50 μ g 미만, 예를 들면,

50ng의 범위일 수 있다. 단위 용량은 전형적으로 용량당 250 내지 2000mg의 영역, 예를 들면, 1000mg 미만, 예를 들면, 700mg 미만, 예를 들면, 400mg 미만, 예를 들면, 100mg 미만, 예를 들면, 100 μ g 미만, 예를 들면, 50 μ g 미만, 예를 들면, 10 μ g 미만, 예를 들면, 100ng 미만, 예를 들면, 50ng 미만일 수 있다.

- [0203] 용량은 매일 또는 보다 빈번하게, 예를 들면, 1일 2, 3 또는 4회, 또는 보다 덜 빈번하게, 예를 들면, 격일로, 1주당 1회, 4일당 1회 또는 1개월당 1회 투여될 수 있다.
- [0204] 질환의 치료는 또한 이의 악화의 치료를 포함하고, 또한 질환 증상의 재발을 예방하기 위해 질환 증상의 관해에서 환자의 치료를 포함한다.
- [0205] **병용 요법**
- [0206] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 하나 이상의 활성제(예를 들면, 본원에 언급된 것들과 같은 질환 치료에 적합한 활성제)를 포함할 수 있다. 세균, 자가면역 및/또는 염증 질환의 치료에 통상 사용되는 다른 확립된 요법의 보조로서 또는 이와 결합하여 세균 감염, 자가면역 및/또는 염증 질환의 치료를 위한 치료 방법에서 본 발명의 약제학적 조성물을 사용하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0207] 염증성 장 질환(예를 들면, 크론병 또는 궤양성 대장염)의 치료를 위해, 가능한 조합은, 예를 들면, 5-아미노살리실산 또는 이의 프로드럭(예를 들면, 설파살라진, 올살라진 또는 비살라지드); 코르티코스테로이드(예: 프로드니솔론, 메틸프로드니솔론 또는 부테소니드); 면역억제제(예: 사이클로스포린, 타크로리무스, 메토트렉세이트, 아자티오프린 또는 6-머캅토피린); 항-TNF- α 항체(예: 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골 또는 콜리무맵); 항-IL12/IL23 억제제(예: 아피리모드); 항- α -4-베타-7 항체(예: 베들리주맵); MAdCAM-1 차단제(예: PF-00547659); 세포 부착 분자 알파-4-인테그린에 대한 항체(예: 나탈리주맵); IL2 수용체 알파 아단위에 대한 항체(예: 다클리주맵 또는 바실릭시맵); JAK3 억제제(예: 토파시티닙 또는 R348); Syk 억제제 및 이의 프로드럭(예: 포스타마티닙 및 R-406); 포스포디에스테라제-4 억제제(예: 테토밀라스트); HMPL-004; 프로바이오틱스; 테르살라진; 세마피모드/CPSI-2364; 및 단백질 키나제 C 억제제(예: AEB-071)를 포함하는 목록으로부터 선택된 하나 이상의 활성제와의 조합을 포함한다. 가장 적합한 배합 약물은 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골 또는 콜리무맵이다.
- [0208] 세균 감염, 예를 들면, 클로스트리디움 디피실 감염의 치료를 위해, 가능한 조합은, 예를 들면, 씨. 디피실 독소이드 백신, 암피실린, 아목시실린, 반코마이신, 메트로니다졸, 피다소미신, 리네졸리드, 니타족사니드, 리팍시민, 라모플라닌, 디피미신, 클린다마이신, 세팔로스포린(예: 제2 및 제3 세대 세팔로스포린), 플루오로퀴놀론(예: 가티플록사신 또는 목시플록사신), 마크롤리드(예: 에리트로마이신, 클라리트로마이신, 아지트로마이신), 페니실린, 아미노글리코사이드, 트리메토프림-설파메톡사졸, 클로람페니콜, 테트라사이클린, 이미페넴, 메로페넴, 항균제, 살균제 또는 정균제를 포함하는 목록으로부터 선택된 하나 이상의 활성제와의 조합을 포함한다. 가능한 조합은 또한 프로바이오틱스, 예를 들면, 사카로마이세스 보울라르디이(*Saccharomyces boulardii*) 또는 락토바실러스 람노수스 GG(*Lactobacillus rhamnosus GG*)인 하나 이상의 활성제와의 조합을 포함한다.
- [0209] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 하나 이상의 추가의 활성제, 예를 들면, 상기 기재된 하나 이상의 활성제와 조합하여 본 발명의 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 추가의 양태에서, 약제학적 조성물 또는 폴리펩티드는 상기 목록으로부터 선택된 적어도 하나의 활성제와 순차로, 동시에 또는 별도로 투여된다.
- [0210] 유사하게는, 본 발명의 또 다른 양태는,
- [0211] (A) 본 발명의 약제학적 조성물 및
- [0212] (B) 하나 이상의 활성제를 포함하는 조합 제품으로서,
- [0213] 상기 성분(A) 및 (B) 각각은 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합하여 제형화되는, 조합 제품을 제공한다. 본 발명의 이러한 양태에서, 조합 제품은 단일 (조합) 제형 또는 부품 키트일 수 있다. 따라서, 본 발명의 이러한 양태는, 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합하여, 본 발명의 약제학적 조성물 및 또 다른 치료제를 포함하는 조합 제형을 포함한다.
- [0214] 본 발명은 또한 하기 성분:
- [0215] (i) 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합하여 본 발명의 약제학적 조성물; 및
- [0216] (ii) 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합하여 하나 이상의 기타 활성제를 포함하는 제형을 포함하는 부품 키트로서,

- [0217] 성분(i) 및 (ii)가 각각 다른 것들과 결합하여 투여에 적합한 형태로 제공되는, 부품 키트를 포함한다.
- [0218] 따라서, 부품 키트의 성분(i)은 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합된 상기 성분(A)이다. 유사하게는, 성분(ii)는 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합된 상기 성분(B)이다. 하나 이상의 활성제(즉, 상기 성분(B))는, 예를 들면, 세균 감염, 예를 들면, 클로스트리디움 디피실 감염, 자가면역 및/또는 염증 질환, 예를 들면, IBD(예: 크론병 및/또는 궤양성 대장염)의 치료와 관련하여 상기 언급된 임의의 약제일 수 있다. 성분(B)가 하나 이상의 추가의 활성제인 경우, 이들 추가의 활성제는 서로 제형화되거나 성분(A)와 함께 제형화되거나, 이들은 개별적으로 제형화될 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 성분(B)는 하나의 다른 치료제이다. 또 다른 실시형태에서, 성분(B)는 2개의 다른 치료제이다. 본 발명의 이러한 양태의 조합 생성물(조합 제제 또는 부품 키트)은 자가면역 질환(예: 본원에 언급된 자가면역 질환)의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0219] **백터 및 숙주**
- [0220] 본원에 사용된 용어 "백터"는, 연결되어 있는 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 한 가지 타입의 백터는, 추가의 DNA 세그먼트가 결합되어 있는 환상 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 플라스미드이다. 또 다른 타입의 백터는, 추가의 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈 내로 결합될 수 있는 바이러스 백터이다. 특정 백터는 이들이 도입되는 숙주 세포 내에서 자가 복제가 가능하다(예를 들면, 세균 복제 기원을 갖는 세균 백터 및 에피솜 포유동물 및 효모 백터). 또 다른 백터(예를 들면, 비-에피솜 포유동물 백터)는 숙주 세포 내로의 도입시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 백터는 이들이 작동적으로 연결되는 유전자의 발현을 지지할 수 있다. 이러한 백터는 본원에서 "재조합 발현 백터"(또는 간단히 "발현 백터")로서 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 백터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "백터"는, 플라스미드가 백터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이기 때문에, 호환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 다른 형태의 발현 백터, 예를 들면, 동등한 기능을 나타내는 바이러스 백터(예: 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스), 및 또한 박테리오파지 및 파지미드 시스템을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다. 본원에 사용된 용어 "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")는 재조합 발현 백터가 도입되는 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 용어는 특정 대상 세포를 지칭할 뿐만 아니라 이러한 세포의 자손을 지칭하는 것으로 의도된다.
- [0221] 본 발명의 한 가지 양태에서, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 본 발명의 추가의 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 cDNA가 제공된다. 본 발명의 추가의 양태에서, 본 발명의 폴리펩티드를 발현할 수 있는, 상기 백터로 형질전환된 숙주 세포가 제공된다. 적합하게는, 숙주 세포는 포유동물 세포, 식물 세포, 효모 세포, 예를 들면, 아스퍼길루스 (*Aspergillus*) 속, 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속, 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 속, 한세놀라(*Hansenula*) 속 또는 피키아(*Pichia*) 속 또는 세균 세포, 예를 들면, 이. 콜라이(*E. coli*)이다.
- [0222] **제조 방법**
- [0223] 본 발명의 폴리펩티드는, 예를 들면, 문헌[참조: Green and Sambrook 2012 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 개시된 기술을 사용하여 수득하고 조작할 수 있다. 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드에 대해 이루어진 치환체 또는 본 발명의 방법에서 이루어진 치환체는 합성적으로 도입된다. 적합하게는, 치환체는 V(D)J 재조합 또는 체세포 돌연변이에 의해 도입되지 않는다.
- [0224] 특히, 본 발명에 따르는 폴리펩티드를 생성하기 위해 인공 유전자 합성을 사용할 수 있다[참조: Nambiar et al 1984 *Science* 223:1299-1301, Sakamar and Khorana 1988 *Nucl. Acids Res* 14:6361-6372, Wells et al 1985 *Gene* 34:315-323 and Grundstrom et al 1985 *Nucl. Acids Res* 13:3305-3316, 본원에서 이의 전체 내용이 참조로서 도입됨]. 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는, 예를 들면, 고상 DNA 합성에 의해 합성적으로 제조될 수 있다. 전체 유전자는, 전구체 주형 DNA를 필요로 하지 않고서, 드 노보 합성될 수 있다. 목적하는 올리고뉴클레오티드를 수득하기 위해, 빌딩 블록은 생성물의 서열에 의해 요구되는 순서로 성장하는 올리고뉴클레오티드 쉘에 순차 커플링된다. 쉘 어셈블리의 완료 후, 생성물을 고상으로부터 용액으로 방출시키고, 탈보호하고, 회수한다. 생성물은 목적하는 올리고뉴클레오티드를 고순도로 수득하기 위해 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 분리할 수 있다[참조: Verma and Eckstein 1998 *Annu Rev Biochem* 67:99-134].
- [0225] 본 발명의 작제물, 즉 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 완전한 작제물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 작제물

은 DNA 수준에서 유전적으로 융합될 수 있다. 유전적 경로를 통해 복수의 폴리펩티드를 연결하는 한 가지 방법은 서열을 코딩하는 불안정한 펩티드 링커를 통해 서열을 코딩하는 폴리펩티드를 연결하는 것이다. 예를 들면, 제1 폴리펩티드의 카복시-말단 단부는 서열을 코딩하는 불안정한 펩티드 링커를 통해 후속 폴리펩티드의 아미노-말단 단부에 연결시킬 수 있다. 이러한 연결 모드는 삼, 사 등의 기능적 작제물의 작제를 위한 폴리펩티드를 연결하기 위해 확장시킬 수 있다. 다가(예: 이가) VHH 폴리펩티드 작제물을 제조하는 방법은 국제공개공보 제 W096/34103호에 개시되어 있다(본원에서 이의 전체가 참조로서 도입됨).

[0226] 돌연변이는, 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대해서는 침묵하지만 특정 숙주에서 번역을 위한 바람직한 코돈을 제공하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 cDNA에 대해 이루어질 수 있다. 예를 들면, 이. 콜라이(*E. coli*) 및 에스. 세레비지애(*S. cerevisiae*)에서 핵산의 번역을 위한 바람직한 코돈은 공지되어 있다.

[0227] 폴리펩티드의 돌연변이는, 예를 들면, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 대한 치환, 부가 또는 결실에 의해 달성할 수 있다. 치환은 동일한 상응하는 위치에서 상이한 잔기로의 잔기의 치환이다. 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 대한 치환, 부가 또는 결실은, 예를 들면, 에러-프론(error-prone) PCR, 서플링, 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이유발, 어셈블리 PCR, PCR 돌연변이유발, 생체내 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발, 재귀적 앙상블 돌연변이유발(recursive ensemble mutagenesis), 지수관수적 앙상블 돌연변이유발, 부위-특이적 돌연변이유발[참조: Ling et al 1997 *Anal Biochem* 254(2):157-178, 본원에서 이의 전체가 참조로서 도입됨], 유전자 제어셈블리, 유전자 부위 포화 돌연변이유발(GSSM), 합성 연결 제어셈블리(SLR) 또는 이들 방법의 조합을 포함하는 다수의 합성 방법에 의해 도입할 수 있다. 핵산에 대한 변형, 부가 또는 결실은 또한 재조합, 재귀적 서열 재조합, 포스포티오에이트-변형된 DNA 돌연변이유발, 우라실-함유 주형 돌연변이유발, 갭 이본쇄 돌연변이유발(gapped duplex mutagenesis), 포인트 미스매치 수복 돌연변이유발, 수복-결손 숙주 균주 돌연변이유발, 화학적 돌연변이유발, 방사기원 돌연변이유발(radiogenic mutagenesis), 결실 돌연변이유발, 제한-선택 돌연변이유발, 제한-정제 돌연변이유발, 앙상블 돌연변이유발, 키메라 핵산 다량체 생성 또는 이의 조합을 포함하는 방법에 의해 도입할 수 있다.

[0228] VH 및 VHH 등의 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 발현은 적합한 발현 벡터, 예를 들면, 원핵생물 세포, 예를 들면, 세균, 예를 들면, 이. 콜라이(*E. coli*)를 사용하여 달성할 수 있다(예를 들면, 국제공개공보 제W094/04678호 및 제W096/34103호에 개시된 프로토콜에 따라, 이는 본원에서 참조로서 도입됨). VH 및 VHH 등의 면역글로불린 쇠 가변 도메인의 발현은 또한 진핵생물 세포, 예를 들면, 곤충 세포, CHO 세포, 배로 세포 또는 적합하게는 효모 세포, 예를 들면, 아스퍼길루스(*Aspergillus*) 속, 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속, 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 속, 한세놀라(*Hansenula*) 속 또는 피키아(*Pichia*) 속 에 속하는 효모를 사용하여 달성할 수 있다. 적합하게는, 에스. 세레비지애(*S. cerevisiae*)가 사용된다(예를 들면, 국제공개공보 제W094/025591호에 개시된 프로토콜에 따라, 이는 본원에서 참조로서 도입됨).

[0229] 적합하게는, 본 발명의 폴리펩티드는, 국제공개공보 제W002/48382호에 개시된 방법에 따라, 탄소원(여기서, 상기 탄소원의 50 내지 100중량%는 에탄올이다)을 포함하는 배지 상에서 진균의 성장을 포함하는 효모(예를 들면, 에스. 세레비지애(*S. cerevisiae*)) 등의 진균에서 제조할 수 있다.

[0230] **조항**

[0231] 본 발명 및 이의 바람직한 양태를 정의한 조항의 세트는 다음과 같다:

[0232] 1. 3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하는 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서,

[0233] (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되고/되거나,

[0234] (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되며,

[0235] 상기 폴리펩티드는 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 폴리펩티드.

[0236] 2. 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법으로서,

[0237] 상기 면역글로불린 쇠 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하고,

- [0238] 상기 방법은, (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계 및/또는
- [0239] (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0240] 3. 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제조하는 방법으로서,
- [0241] 상기 면역글로불린 쇠 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역(CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함하고,
- [0242] 상기 방법은, (a) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 리신 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계 및/또는
- [0243] (b) CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계를 포함하고,
- [0244] 상기 폴리펩티드는 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 방법.
- [0245] 4. 제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 치환체가, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 장관, 예를 들면, 소장 및/또는 대장, 예를 들면, 십이지장, 공장, 회맹장, 결장, 직장 및/또는 항문관에서 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0246] 5. 제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 치환체가, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 장관, 예를 들면, 소장 및/또는 대장, 예를 들면, 십이지장, 공장, 회맹장, 결장, 직장 및/또는 항문관의 모델에서 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0247] 6. 제5항에 있어서, 상기 장관의 모델이 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델(Standard Human Faecal Supernatant Intestinal Tract Model)인, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0248] 7. 제6항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 안정성이, 상기 면역글로불린 쇠 가변 도메인이 항-TNF- α 면역글로불린 쇠 가변 도메인인 경우에 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정에 의해 측정되거나, 상기 면역글로불린 쇠 가변 도메인이 항-IL-6R 면역글로불린 쇠 가변 도메인인 경우에 표준 gp130 ELISA 검정에 의해 측정할 때, 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에서 16시간 인큐베이션 후, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 적어도 1%, 보다 적합하게는 5%, 보다 적합하게는 10% 증가되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0249] 8. 제1항 내지 제7항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 치환체가, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 소장 또는 대장에서 생성된 하나 이상의 프로테아제에 대한 폴리펩티드의 안정성을 증가시키는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0250] 9. 제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 효력이, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드의 효력과 실질적으로 동일한, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0251] 10. 제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 리신 및/또는 아르기닌 잔기가, CDR1의 2/3 및/또는 CDR2의 2/3 및/또는 CDR3의 2/3으로 정의된 윈도우에 존재하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0252] 11. 제11항에 있어서, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 중의 각각의 리신 및/또는 아르기닌 잔기가 각각 하나의 히스티딘 잔기로 치환되는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.
- [0253] 12. 제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 항체, 추가의 항체 결합 영역을 함유하는 변형된 항체 또는 항체 단편, 예를 들면, scFv, Fab 단편, F(ab')₂ 단편 또는 면역글로불린 쇠 가변 도메인, 예

를 들면, VHH, VH, VL, V-NAR인, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

[0254] 13. 제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 장관을 통해 접근가능한 표적에 결합하는, 폴리펩티드, 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법 또는 폴리펩티드를 제조하는 방법.

[0255] 14. 경구 투여용 의약으로 사용하기 위한, 제1항 내지 제13항 중의 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드 또는 작제물을 포함하는 약제학적 조성물.

[0256] 15. 제14항에 있어서, 상기 조성물이 장용 코팅된 형태로 제공되는, 약제학적 조성물.

[0257] **추가 조항**

[0258] 본 발명 및 이의 바람직한 양태를 정의하는 추가 조항의 세트는 다음과 같다. 하기 인용된 청구항 제4항 내지 제61항에 인용된 특징은 임의로 이들 추가 조항 제1항 내지 제3항을 준용한다.

[0259] 1. 높은 친화성으로 표적에 결합할 수 있는 영역을 포함하는 폴리펩티드로서, (a) 상기 영역 중의 적어도 하나의 리신 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되고/되거나, (b) 상기 영역 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기는 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환되고; 상기 폴리펩티드는 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 증가된 장내 안정성을 갖는, 폴리펩티드.

[0260] 2. 높은 친화성으로 표적에 결합할 수 있는 영역을 포함하는 폴리펩티드의 장내 안정성을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은

[0261] (a) 상기 영역 중의 적어도 하나의 리신 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계 및/또는

[0262] (b) 상기 영역 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계를 포함하는, 방법.

[0263] 3. 높은 친화성으로 표적에 결합할 수 있는 영역을 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법으로서, 상기 방법은

[0264] (a) 상기 영역 중의 적어도 하나의 리신 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계 및/또는

[0265] (b) 상기 영역 중의 적어도 하나의 아르기닌 잔기를 적어도 하나의 히스티딘 잔기로 치환하는 단계를 포함하고,

[0266] 상기 폴리펩티드는, 상기 히스티딘 치환체를 갖지 않는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여, 증가된 장내 안정성을 갖는, 방법.

[0267] 본 발명은 이제 하기 비제한적 실시예에 의해 추가로 기재될 것이다.

[0268] **실시예**

[0269] **실시예 1: 표준 장관 모델, 표준 장내 안정성 검정 및 표준 효력 검정**

[0270] 번역글로블린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 장내 안정성 및 효력은 하기 방법을 사용하여 검정할 수 있다. 하기 방법은 ICVD를 참조하지만, 항체 등의 ICVD를 포함하는 임의의 폴리펩티드에 동등하게 적용가능하다.

[0271] **1.1 표준 장관 모델**

[0272] 인간 배설물 및 마우스 소장 샘플로부터의 생체의 샘플은 인간 장관에서 안정성을 추정하기 위한 높은 관련성의 매트릭스이다. 이러한 샘플은, 프로테아제의 존재하에 ICVD 안정성에 영향을 미칠 수 있는 임의의 카오트로픽제 또는 계면활성제와 함께, 천연 숙주-생성된 및 연관 미생물-생성된 프로테아제를 함유한다. 뮤린 및 인간 기원으로부터의 소장에 존재하는 적어도 일부 프로테아제의 효소적 절단 부위는 충분히 특성화되어 있고, 2개 중 사이에 보존되어 있다. 뮤린 소장 상청액은, 돼지로부터의 소장 샘플 및 소장의 임상적으로-유래된 인간 폐포 샘플과 비교하여 전체 프로테아제 활성의 점에서 특히 엄격한 도전인 것으로 밝혀졌다.

[0273] 따라서, 인간 배설물 및 마우스 소장으로부터의 생체의 샘플을 이용하는 하기 상세된 장관 모델은 장관 조건의 가장 대표적 환경에서 ICVD를 포함하는 폴리펩티드의 안정성을 검정하는 것을 가능하게 한다. 인큐베이션 후에 잔류하는 생존가능한 ICVD의 비율은, 표준 웨스턴 블롯 안정성 검정(무손상 ICVD의 비율을 검정하기 위해) 또는 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정 또는 표준 독소 ELISA 검정(둘 다 기능적 ICVD의 비율을 검정하기 위해) 등의 적절한 검정을 사용하여 장관 모델에서 인큐베이션후 평가된다.

[0274] 마우스 또는 인간으로부터의 샘플링 시점부터 ICVD 안정성 검정에서 사용하는 시점까지, 모든 배설물/장 샘플, 슬러리 및 상청액은 아이스 또는 4℃에서 수행되는 원심분리 등의 조작으로 냉각 상태로 유지되어야 하는 것에 유의한다. 생성되면, 상청액 샘플은 -80℃로 동결시키고, 사용 전에 1회(또는 2회) 해동시킬 수 있다. 반복 동결-해동은 프로테아제 안정성의 손실을 가져올 가능성이 있다. -80℃에서 장기 저장(>1년)은 전체 프로테아제 활성을 감소시키지 않는다. 그러나, 슬러리 및 상청액은 시간 경과에 따라 케이스-바이-케이스 기준으로 모니터링해야 한다.

[0275] 1.1.1 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델

[0276] 배설물 상청액 풀 생성

[0277] 안정성 시험을 위한 상청액을 생성하기 위해, 1×PBS를 배설물 g당 1 또는 2mL 1×PBS의 비율로 배설물 샘플에 첨가한다. 이어서, 샘플을 균일하게 와동시킨다. 수득되는 물질은 배설물 슬러리로 지칭된다(하기 실시예에 사용된 매우 제한된 수의 특히 확고한 샘플의 경우, 균질한 배설물 슬러리를 생성하기 위해 배설물 g당 3mL 1×PBS를 첨가할 필요가 있다). 시험을 위한 상청액을 생성하기 위해, 슬러리를 1 내지 5분 동안 4.5k rpm 또는 13.5k rpm(4℃)에서 원심분리하여 고체 물질의 벌크 및 모든 세포 물질을 제거한다. 이어서, 제1 스핀으로부터의 상청액을 5분 동안 13.5k rpm(4℃)에서 재-원심분리하여, 프로테아제를 포함하는 가용성 분획만을 잔류시킨다. 복수 개체로부터의 상청액은, 각각의 풀이 복수 개체의 배설물로부터 조합 프로테아제 산물을 나타내도록 함께 풀링한다.

[0278] 하기 실시예의 목적을 위해, 상청액 풀을 상기 기재된 바와 같이 생성하기 전에, 병원-유래 인간 배설물 샘플을 수득했다(및 샘플 중의 씨. 디피실의 존재가 확립됨). 풀은 하기 표 1에 따라 특성화했다.

표 1

ID	풀당 개체	클로스트리디움 디피실 상태
풀 2	2	베로 세포 세포독성 검정에 의해 독소 음성
풀 3	5	베로 세포 세포독성 검정에 의해 독소 양성
풀 4	5	베로 세포 세포독성 검정에 의해 독소 음성

[0280] 검정 수행

[0281] 1탭의 시그마패스트(Sigmafast) 프로테아제 억제제 카테일(Sigma S8830, AEBSF(4-(2-아미노에틸)벤젠설포닐 플루오라이드), 베스타틴, E-64, 펩스타틴 A, 포스포르아미돈, 류렙틴, 아프로티닌을 함유)을 5mL 프로테아제 정지 완충액(1×PBS, 2% BSA, 5mM EDTA)에 첨가하여 20× 프로테아제 억제제 용액을 제조한다. 이 용액은 2주 동안 2 내지 8℃에서 저장할 수 있다. 검정일에, 상청액 매트릭스를 간단히 와동시켜 균질성을 확보한다. 모든 반응물을 아이스 상에서 제조하고, 검정물이 처음 배양될 때까지 냉각 상태로 유지한다.

[0282] 20× 프로테아제 억제제 용액을 프로테아제 정지 완충액에서 희석시키고 pMSF를 2× 정지 완충액에서 1mM의 농도(0.1M 용액 Sigma 93482의 1/100 희석)로 첨가하여 2× 프로테아제 정지 용액을 제조한다. 이 용액을 사용전 모든 시간에서 아이스 상에서 냉각 상태로 유지한다.

[0283] ICVD(또는 항체) 용액을 0.1% BSA 중의 250µg/mL로 제조한다. 아이스 상에서, 얇은-벽 PCR 튜브 또는 플레이트에서, 250µg/mL ICVD를 상청액 매트릭스로 희석시켜 20µg/mL의 최종 ICVD 농도(시간 0에서)를 수득한다. 피펫팅하여 수득되는 용액을 아이스 상에서 혼합하고, 용액이 가온되지 않도록 보장한다. 균질화되면, 1용적의 샘플 매트릭스 + 20µg/mL ICVD를 즉시 제거하고, 동일 용적의 2× 프로테아제 정지 용액과 혼합한다. 아이스 상에서 정지 매트릭스 용액을 혼합하고, -80℃에서 즉시 동결시킨다. 이는 시간 0 샘플이다. 잔류하는 시험 매트릭스 샘플 + 20µg/mL ICVD를 PCR 기계 또는 유사한 장치에서 37℃로 인큐베이션한다. 요구된 시점에서, 상기 공정을 반복하여 시간 0 샘플과 비교하기 위한 정지 상청액 샘플을 생성한다. 또한, 시간 0으로부터 1용적의 매트릭스 샘플(ICVD를 함유하지 않음)을 동일 용적으로 2× 프로테아제 정지 용액과 함께 첨가하여 ICVD를 함유하지 않는 프로테아제-정지 매트릭스 대조군을 생성한다. 이는, 예를 들면, ELISA 또는 웨스턴 블롯팅 프로파일로 매트릭스의 효과를 평가하기 위한 하류 분석에서 대조군으로 사용될 것이다.

[0284] 표준 웨스턴 블롯 안정성 검정, 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정 또는 표준 독소 ELISA 검정을 사용한 측정에서, 소정 시점에서 매트릭스 샘플에서 인큐베이션한 후에 잔류하는 생존가능한 ICVD의 양을 0 시점에 존재하는 양으로 나눈다. 이어서, 수득되는 수에 100을 곱하여 안정성(%)을 수득한다. 표준 웨스턴 블롯 안정성 검

정의 경우에, 이는 무손상 ICVD의 비율을 제공한다. 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정 또는 표준 독소 ELISA 검정의 경우에, 이는 기능적 ICVD의 비율을 제공한다.

- [0285] 1.1.2 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델
- [0286] 배설물 상청액 풀 생성
- [0287] C57BL/6("블랙 6") 마우스를 희생시킨다. 십이지장 전체, 공장 및 회장을 포함하는 소장을 마우스의 체강으로부터 주의깊게 소화시켜 불필요한 조직 손상을 최소화한다. 소장의 고형분을 수집하고, 소장의 내부 표면을 1mL 0.9% 염수로 씻어 낸다(장 내용물의 천연 pH를 보존하기 위해). 이어서, 1mL 장 세척액 및 장 내용물 샘플을 함께 혼합하고, 소장 슬러리를 생성하기 위해 와동시킴으로써 충분히 균질화시킨다. 시험용 상청액을 생성하기 위해, 슬러리를 2분 동안 13.5k rpm(4°C)에서 원심분리하여 고형 물질의 벌크 및 모든 세포 물질을 제거한다. 이어서, 1차 스핀으로부터의 상청액을 5분 동안 13.5k rpm(4°C)에서 재-원심분리하여, 프로테아제를 포함하는 가용성 분획만을 잔류시킨다. 복수 마우스(풀당 평균 5마리)로부터의 상청액은, 각각의 풀이 복수 마우스의 소장으로부터 조합 프로테아제 산물을 나타내도록 함께 혼합한다.
- [0288] 하기 실시예에서, 시간 경과에 따라 사용된 상이한 풀의 마우스 소장 상청액은 유사한 단백질분해 활성을 입증하는 것으로 밝혀졌다.
- [0289] 검정 수행
- [0290] 상청액은 "검정 수행"하에 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델로 상기 기재된 것과 동일한 방식으로 사용된다.
- [0291] 1.2 표준 웨스턴 블롯 안정성 검정
- [0292] 장관 모델에서 인큐베이션 후에 잔류하는 생존가능한 ICVD 비율의 평가
- [0293] SDS-PAGE용 샘플의 제조(환원 조건하):
- [0294] 1) 환원 SDS-PAGE용 샘플 완충액을 제조한다: 환원제 0.5M 디티오프레이톨(DTT)(Novex NP0004)를 1:9의 비율로 Novex 4× LDS 샘플 완충액(NP0007)에 첨가한다. 예를 들면, 10 μL 0.5M DTT를 90 μL의 4× 샘플 완충액에 첨가한다. 수득되는 용액은 이 시점으로부터 "4× 부하 염료"로서 지칭한다.
- [0295] 2) 4× 부하 염료 스톱을 멸균 H₂O와 1:3으로 희석하여 1× 부하 염료를 제조할 수 있다.
- [0296] 3) 시간 0 또는 30분으로부터 소화 매트릭스 중의 15 μL의 각 ICVD-함유 실험 샘플을 15 μL 4× 부하 염료에 첨가한다. 정지된 0 시점으로부터 100-200ng ICVD의 최종 양을 부하하는 것을 목표로 한다. 30분 시점으로부터의 샘플 용적을 0 시점에 첨가된 용적과 일치시켜, 시간 경과에 따른 ICVD의 임의의 손실/열화를 최종 블롯 상에서 눈으로 증명한다(동일한 것을 다른 시점, 예를 들면, 또한 사용될 수 있는 15분, 1시간, 2시간 등에 대해 적용한다). 가능하다면, 전달 및 검출 시스템이 정확하게 수행되고 있는지를 확인하기 위해 시험 ICVD의 무처리 표준(100 및 10ng으로)을 포함시킨다.
- [0297] 4) ICVD를 함유하는 모든 샘플을 5 내지 10분 동안 95°C까지 가열(모든 샘플을 동일하게 처리)하여 단백질을 변성시키고, 이들을 부하 염료에 존재하는 LDS로 코팅한다. 샘플을 냉각시키고, 이들을 단시간 원심분리기에서 스핀 다운시켜 모든 액체를 수집한다.
- [0298] 5) 블롯팅 후에 가시화할 수 있는 적합한 기준 래더(ladder)(Super Signal MW 단백질 래더(Pierce))를 제조한다. 6.5 μL의 단백질 래더 + 13 μL 1× 부하 염료를 첨가한다. 기준 래더는 겔 부하 전에 가열할 필요가 없음에 유의한다(공급업자 설명서 참조).
- [0299] 전기영동
- [0300] SDS-PAGE에 의해 ICVD를 가시화하기 위해 1× SDS-MES 작동 완충액(Novex NP0002-02)과 조합하여 Novex 10% 비스-트리스 겔(NP0302Box)을 사용한다.
- [0301] 1) 1× SDS-MEX 용액(Novex NP0002-02로부터, 20× 스톱)을 제조하고, Novex 10% 비스-트리스 겔을 적절한 전기영동 탱크에서 조립한다.
- [0302] 2) 겔 부하 피펫 팁을 사용하여 겔의 레인당 상기 제조된 샘플 15 μL를 부하한다.
- [0303] 3) 염료 전면이 겔의 말단에 도달할 때까지 200V에서 겔을 작동시키지만, 추가로 작동시키지는 않는다.

- [0304] 블롯팅
- [0305] 1) 전기영동 후, 아이블롯(iblot) 반건조 전달 장치(Invitrogen, 7분 반건조 전달 프로그램 3)을 사용하여 단백질을 니트로셀룰로즈 막(IB3010, Invitrogen)에 전달한다.
- [0306] 2) 실온에서 온화하게 흔들면서 2시간 동안 25mL 차단 용액(1% BSA, 2% Marvel, 0.05% 트윈 20, 1× PBS pH 7.4)와 함께 인큐베이션하여 막을 차단시킨다.
- [0307] 3) 일차 검출 항체를 위해, 차단 용액(1% BSA, 2% Marvel, 0.05% 트윈 20, 1× PBS pH 7.4)에서 pAb 1952 래빗 α-VHH(VHH 면역원을 사용하여 Eurogentech에서 생성함, pAb 래빗 α-VH 등의 또 다른 pAb 래빗 α-ICVD도 또한 사용할 수 있음)의 1/1000 희석물을 제조한다. 블롯을 4°C에서 밤새 온화하게 흔들면서 25mL의 이 용액과 함께 인큐베이션한다.
- [0308] 4) 다음 날, 블롯을 25mL PBST(1× PBS, 0.1% 트윈 20)에 위치시키고, 실온에서 5분 동안 로커(rocker) 상에서 인큐베이션한다. 이 공정을 5회 반복하고, 매회 새로운 용적의 PBST를 사용하여 비-특이적으로 결합된 임의의 일차 항체를 세척한다. 총 6회의 세척을 완료한다.
- [0309] 5) 이차 검출 항체를 위해, 차단 용액에서 1/1000의 희석으로 HRP-접합된 pAb 돼지 α-래빗(Dako, P0217)을 제조한다. 정상 염소 혈청(Dako)을 1%의 최종 농도로 이 용액에 첨가한다(예를 들면, 50mL의 이차 항체 용액 중의 500 μL 염소 혈청). 블롯을 실온에서 온화하게 흔들면서 2시간 동안 25mL의 이 용액과 함께 인큐베이션한다.
- [0310] 6) 블롯을 25mL PBST(1× PBS, 0.1% 트윈 20)에 위치시키고, 5분 동안 로커 상에서 인큐베이션한다. 이 공정을 5회 반복하고, 매회 새로운 용적의 PBST를 사용하여 비-특이적으로 결합된 임의의 이차 항체를 세척한다. 총 6회의 세척을 완료한다.
- [0311] 7) 블롯을 전개하기 위해, 2mL SuperSignal 웨스트 피코 화학발광제(ECL, Pierce 34087)로 1 내지 2분 동안 인큐베이션하여, 블롯의 전체 표면이 기질에 피복되는 것을 보장한다.
- [0312] 8) ImageQuant LAS4000 기계 또는 등가물, 5 내지 10분 노출을 사용하여 블롯 상에 존재하는 ICVD를 가시화한다. 최고 ICVD 신호를 획득하기 위해 사용된 노출 시간을 변화시킨다. 밴드 밀도는 ImageQuant TL 소프트웨어 또는 등가물을 사용하여 측정한다.
- [0313] 소정 시점에서 매트릭스 샘플 중의 생존가능한 ICVD의 양은 0 시점에서 존재하는 양으로 나눈다. 이어서, 획득되는 수에 100을 곱하여 안정성(%)을 획득한다.
- [0314] 1.3 표준 독소 ELISA 검정
- [0315] *항-TcdA 또는 항-TcdB ICVL의 효력을 평가하고 장관 모델에서 인큐베이션한 후에 잔류하는 생존가능한 항-TcdA 또는 항-TcdB ICVL 비율을 평가하기 위해*
- [0316] 재료:
- [0317] • 96-웰, 평저, 눈크 맥시소프 이뮤노플레이트(Nunc Maxisorp Immunoplates)
- [0318] • 1× PBS 중의 균주 R20291(리보타입 027)로부터 재조합, N-말단 His10-태그된, 클로스트리디움 디피실 TcdB 세포 결합 도메인(CBD-B).
- [0319] • 균주 VPI10463(리보타입 087)로부터 정제된, 전장 클로스트리디움 디피실 독소 A. 세균은 정적 혐기성 배양으로 성장시키고, FPLC 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제된 TcdA를 분비했다.
- [0320] • 항-VHH 폴리클로날 래빗 항체: 6CP(등가물 항-ICVD, 예를 들면, 항-VH 폴리클로날 래빗 항체도 또한 사용할 수 있음).
- [0321] • 돼지 항-래빗 폴리클로날 면역글로불린-HRP 접합됨(Dako, P0217)
- [0322] • ELISA를 위한 초감도 TMB: Sigma(T4444)
- [0323] • 0.5M 황산
- [0324] • 차단 완충액: 1× PBS 중의 1% BSA(pH 7.2-7.5).
- [0325] • 차단 완충액 + 1× 프로테아제 억제제(1× PBS 중의 1% BSA, pH 7.3-7.5, 2× 프로테아제 억제제 각테일,

2.5mM EDTA, 0.5mM pMSF).

- [0326] · PBST: 1× PBS + 0.05% 트윈 20.
- [0327] 차단 완충액 + 1× 프로테아제 억제제를 검정 희석물로서 사용하여, ICVD 샘플이 ELISA의 성능을 달리 간섭할 수 있는 마우스 소장 상청액 또는 인간 배설물 상청액 등의 소화 매트릭스에 존재하는 경우, ELISA 플레이트로 첨가 전에 ICVD 용액을 제조한다. 0.1M MSF 용액 Sigma 93482의 1/200 희석물을 사용하여 0.5mM pMSF를 달성할 수 있다. EDTA는 또한 2.5mM의 최종 농도로 첨가되어야 한다. 시그마패스트(Sigmafast) 프로테아제 억제제 콕테일(Sigma S8830, AEBSF(4-(2-아미노에틸) 벤젠설포닐 플루오라이드, 베스타틴, E-64, 펩스타틴 A, 포스포르아미돈, 류펩틴, 아프로티닌을 함유)을 이 완충액에 사용한다. 20× 프로테아제 억제제 용액의 스톱은 1탭의 시그마패스트 프로테아제 억제제 콕테일(Sigma S8830)을 5mM 프로테아제 정지 완충액(1× PBS, 2% BSA, 5mM EDTA)에 첨가하여 제조할 수 있다. 이 용액을 2 내지 8°C에서 2주 동안 저장할 수 있고, ELISA의 수행일에 차단 완충액으로 희석할 수 있다.
- [0328]
- [0329] *ELISA에 의한 항-TcdA ICVD 검출*
- [0330] 본 검정은, ELISA 플레이트에 결합된 클로스트리디움 디피실 독소 A에 결합하는 이들의 능력에 대해 항-TcdA 특이적 ICVD를 시험하기 위해 설계된다. 이 검정을 위한 플레이트 코팅 독소는 전장 TcdA VPI10463(087)이다.
- [0331] 방법:
- [0332] 1. 씨. 디피실 TcdA를 1× PBS에서 희석하여 2µg/mL 코팅 용액을 제조한다. 닌크 맥시소프(Nunc Maxisorp) 플레이트의 50 µL/웰의 이것을 첨가하고, 플레이트를 밀봉하고, 2 내지 8°C에서 밤새 배양한다. 2µg/mL 용액 TcdA의 동일한 스톱과 함께 다수의 플레이트(3 이상)를 제조하지 않는다.
- [0333] 2. 플레이트를 플레이트 세척기에 의해 380 µL PBST로 4회 세척한다. 최소 잔류물이 잔류하는 것을 보장하기 위해 플레이트를 두드린다.
- [0334] 3. 차단 완충액의 200 µL/웰을 첨가하고, 밀봉하고, 적어도 1시간 진탕용으로 실온에서 배양하기 위해 정치시킨다. 또한, 플레이트는, 필요한 경우, 2 내지 8°C에서 밤새 차단시키기 위해 정치시킨다.
- [0335] 4. 희석제로서 차단 완충액, 또는 주요 검정 샘플이 소화 매트릭스로부터 유래하는 경우에 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제를 사용하여 ICVD 참조 표준의 일련의 희석 시리즈를 제조한다. 희석 범위는, 이것이 전체 검정 신호 범위를 피복하도록, 배경 신호로부터 포화 신호까지, 명확하게 정의된 선형 범위로, 시험된 각 ICVD의 결합에 기초하여 조정되어야 한다. 플레이트 50 µL에 대해 충분한 용적의 각 희석물을 삼중으로 제조한다.
- [0336] 5. 희석제로서 차단 완충액, 또는 샘플이 소화 매트릭스로부터 유래하는 경우에 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제에서 시험되는 ICVD-함유 샘플의 적절한 희석물을 제조한다. 이들의 평가된 농도가 검정 검출의 선형 범위에 속하도록 희석물을 제조한다. 희석 범위는 시험되는 각 ICVD의 결합에 기초하여 조정되어야 한다. 이들 희석물은 또한, 최종 ELISA 플레이트 상에 삼중 50 µL 복제물의 충분한 용적이 존재하도록 마이크로플레이트에서 연속으로 이루어져야 한다. 검정 블랭크(ICVD 없음)를 포함시킨다. 소화 분석 ELISA를 위해, 프로테아제 억제제-정지된 시간 0 매트릭스 대조군(ICVD를 함유하지 않음)을 포함시켜 검정에 배경 신호를 검사한다. 이는 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제에서 희석되어야 하고, 플레이트 상에서 시험된 ICVD 샘플을 함유하는 매트릭스의 최고 농도에 일치시켜야 한다. 이들이 소화 매트릭스로부터 제조되는 경우, 제조 동안 샘플을 냉각 상태로 유지한다. 충분한 각 샘플을 제조하여, 플레이트에 삼중으로 50 µL/웰로 첨가한다.
- [0337] 6. ELISA 플레이트 상의 차단 완충액을 제거하여 폐기하고, 임의의 잔류물을 종이 타월에 두드려 제거하고, 각 웰에 50 µL 희석 샘플을 첨가한다. 1) 매트릭스 없음, ICVD 없음(블랭크 웰) 및 2) 매트릭스 단독(ICVD 없음) 웰을 포함시킨다. 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 배양하고, 2시간 동안 진탕시킨다.
- [0338] 7. 단계 2에 대해 4회 세척한다.
- [0339] 8. 차단 완충액에서 1/2000으로 희석시킨 래빗 항-VHH PAb 50 µL/웰을 첨가하고, 플레이트를 밀봉시키고, 1시간 동안 진탕시키면서 실온에서 배양한다.
- [0340] 9. 단계 2에 대해 4회 세척한다.
- [0341] 10. TMB 50 µL/웰을 첨가하고, 플레이트를 밀봉하고, 진탕시키면서 30분 이내 동안 실온에서 배양한다.

- [0342] 11. 단계 2에 대해 4회 세척한다.
- [0343] 12. TMB 100 μ L/웰을 첨가하고, 플레이트를 밀봉하고, 진탕시키면서 30분 이내 동안 실온에서 배양한다. 플레이트는 TMB가 광 감수성이기 때문에 은 포일로 피복되어야 한다.
- [0344] 13. 50 μ L의 0.5M 황산을 각 웰에 첨가하고, 450nm에서 플레이트를 판독한다.
- [0345] 14. ICVD 표준 보정 곡선을 사용하여, 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어(또는 등가물)을 사용하여 미지 샘플 농도를 보간한다.
- [0346] *ELISA에 의한 항-TcdB ICVD 검출*
- [0347] 본 검정은, ELISA 플레이트에 결합된 클로스트리디움 디피실 독소 B에 결합하는 이들의 능력에 대해 항-TcdB 특이적 ICVD를 시험하기 위해 설계된다. 시험되는 ICVD가 달리 TcdB 상에서 결합하지 않거나, 달리는 어떠한 신호도 관찰되지 않는 것을 본 검정의 작동 전에 검사하는 것이 중요하다.
- [0348] 방법:
- [0349] 1. 씨. 디피실 CBD-B(O27)를 PBS에 희석시켜 0.5 내지 1 μ g/mL의 코팅 용액을 제조한다. 눈크 맥시소프 플레이트의 50 μ L/웰의 이것을 첨가하고, 필름으로 밀봉하고, 밤새 2 내지 8 $^{\circ}$ C에서 배양한다. 0.5 내지 1 μ g/mL CBD-B 용액의 동일한 스톱과 함께 다수의 플레이트(3 이상)를 제조하지 않는다.
- [0350] 2. 차단 완충액의 200 μ L/웰을 첨가하고, 밀봉하고, 적어도 1시간 진탕용으로 실온에서 배양하기 위해 정치시킨다. 또한, 플레이트는, 필요한 경우, 2 내지 8 $^{\circ}$ C에서 밤새 차단시키기 위해 정치시킬 수 있다.
- [0351] 3. 희석액으로서 차단 완충액, 또는 주요 검정 샘플이 소화 매트릭스로부터 유래하는 경우에 차단 완충액 + 2 \times 프로테아제 억제제를 사용하여 ICVD 참조 표준의 일련의 희석 시리즈를 제조한다. 희석 범위는, 이것이 전체 검정 신호 범위를 피복하도록, 배경 신호로부터 포화 신호까지, 명확하게 정의된 선형 범위로, 시험된 각 ICVD의 결합에 기초하여 조정되어야 한다. 플레이트 50 μ L에 대해 충분한 용적의 각 희석물을 삼중으로 제조한다.
- [0352] 4. 희석액으로서 차단 완충액, 또는 샘플이 소화 매트릭스로부터 유래하는 경우에 차단 완충액 + 2 \times 프로테아제 억제제에서 시험되는 ICVD-함유 샘플의 적절한 희석물을 제조한다. 이들의 평가된 농도가 검정 검출의 선형 범위에 속하도록 희석물을 제조한다. 희석 범위는 시험된 각 ICVD의 결합에 기초하여 조정되어야 한다. 이들 희석물은 또한, 최종 ELISA 플레이트 상에 삼중 50 μ L 복제물의 충분한 용적이 존재하도록 마이크로플레이트에서 연속으로 이루어져야 한다. 검정 블랭크(ICVD 없음)를 포함시킨다. 소화 분석 ELISA를 위해, 프로테아제-정지된 시간 0 매트릭스 대조군(ICVD를 함유하지 않음)을 포함시켜 검정에서 배경 신호를 검사한다. 이는 차단 완충액 + 2 \times 프로테아제 억제제에서 희석되어야 하고, 플레이트 상에서 시험된 ICVD 샘플을 함유하는 매트릭스의 최고 농도에 일치시켜야 한다. 이들이 소화 매트릭스로부터 제조되는 경우, 제조 동안 샘플을 냉각 상태로 유지한다. 충분한 각 샘플을 제조하여, 플레이트에 삼중으로 50 μ L/웰로 첨가한다.
- [0353] 5. ELISA 플레이트 상의 차단 완충액을 제거하여 폐기하고, 임의의 잔류물을 종이 타월에 두드려 제거하고, 각 웰에 50 μ L 샘플 희석물을 첨가한다. 1) 매트릭스 없음, ICVD 없음(블랭크 웰) 및 2) 매트릭스 단독(ICVD 없음) 웰을 포함시킨다. 플레이트를 밀봉하고, 실온에서 배양하고, 2시간 동안 진탕시킨다.
- [0354] 6. 단계 2에 대해 4회 세척한다.
- [0355] 7. 차단 완충액에서 1/2000으로 희석시킨 래빗 항-VHH pAb(또는 기타 ICVD 등가물) 50 μ L/웰을 첨가하고, 플레이트를 밀봉하고, 1시간 동안 진탕시키면서 실온에서 배양한다.
- [0356] 8. 단계 2에 대해 4회 세척한다.
- [0357] 9. 차단 완충액을 사용하여 1/2000으로 희석시킨 돼지 항-래빗-HRP 50 μ L/웰을 첨가하고, 플레이트를 밀봉하고, 1시간 동안 진탕시키면서 실온에서 배양한다.
- [0358] 10. 단계 2에 대해 4회 세척한다.
- [0359] 11. TMB 100 μ L/웰을 첨가하고, 플레이트를 밀봉하고, 진탕시키면서 30분 이내 동안 실온에서 배양한다. 플레이트는 TMB가 광 감수성이기 때문에 은 포일로 피복되어야 한다.
- [0360] 12. 50 μ L의 0.5M 황산을 각 웰에 첨가하고, 450nm에서 플레이트를 판독한다.
- [0361] 13. ICVD 표준 보정 곡선을 사용하여, 그래프패드 프리즘 소프트웨어(또는 등가물)를 사용하여 미지 샘플 농도

를 보관한다.

[0362] 1.4 표준 TNFR2/TNF 간접 ELISA 검정

[0363] 항-TNF ICVD의 효력을 평가하고 장관 모델에서 배양한 후에 잔류하는 생존가능한 항-TNF ICVD 비율을 평가하기 위해

[0364] 1. 원리

[0365] 이 검정은 용합 단백질, 엔브렐(Enbrel)(etanercept)에 대한 재조합 인간 TNF의 결합을 검출한다. 이 단백질은 인간 IgG의 Fc 영역에 결합된 가용성 TNFR2로 구성되어 있고, TNF α의 포획에 사용될 수 있다. 이 상호작용은 항-TNF ICVD에 의해 경쟁하여, 엔브렐에 대한 TNF α의 감소된 결합을 유발한다. 이어서, 결합된 TNF는 항-hTNF α 항체에 의해 검출할 수 있다. 따라서, 이 ELISA에서 높은 신호는 낮은 농도의 항-TNF ICVD를 나타내고, 그 반대의 경우도 그러하다. 일차 검출 항체를 사용한 밤새 배양 단계에 기인하여, 이 검정은 통상 완료하는 데까지 약 1일 반이 걸린다.

[0366] 2. 재료

[0367] 필요한 용액:

[0368] · 0.5M 황산(H₂SO₄)

[0369] · 1× PBS

[0370] · PBST(1× PBS, 0.05% 트윈 20)

[0371] · 차단 완충액(1× PBS 중의 1% BSA, pH 7.3-7.5)

[0372] · 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제(1× PBS 중의 1% BSA, pH 7.3-7.5, 2× 프로테아제 억제제 각테일, 2.5mM EDTA, 0.5mM pMSF).

[0373] 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제는, 달리는 ELISA의 성능을 간접할 수 있는 마우스 소장 상청액 또는 인간 배설물 상청액 등의 소화 매트릭스에 ICVD 샘플이 존재하는 경우, 혼합 및 EILSA 플레이트로의 첨가 전에, ICVD 및 TNF 용액을 제조하기 위한 검정 희석제로서 사용된다. 0.1M pMSF 용액 Sigma 93482의 1/200 희석물을 사용하여 0.5mM pMSF를 달성할 수 있다. EDTA는 또한 2.5mM의 최종 농도로 첨가되어야 한다. 시그마패스트 프로테아제 억제제 각테일(Sigma S8830, AEBSF(4-(2-아미노에틸) 벤젠설포닐 플루오라이드, 베스타틴, E-64, 펩스타틴 A, 포스포라미돈, 류펩틴, 아프로티닌을 함유)을 이 완충액에 사용한다. 20× 프로테아제 억제제 용액의 스톡은 1탭의 시그마패스트 프로테아제 억제제 각테일(Sigma S8830)을 5mL 프로테아제 정지 완충액(1× PBS, 2% BSA, 5mM EDTA)에 첨가하여 제조할 수 있다. 이 용액을 2 내지 8℃에서 2주 동안 저장할 수 있고, ELISA의 날에 차단 완충액으로 희석시킬 수 있다.

[0374] 필요한 시약:

[0375] · 공지된 농도의 엔브렐 스톡(예를 들면, PBS 중의 2mg/mL)

[0376] · PBS 중의 1% BSA에서 10μg/ml로 구성되고 작은(≤20 μL) 분획으로 -80℃에서 유지된 공지된 농도의 재조합 인간 TNF 스톡(Life Technologies, 카탈로그 번호 PHC 3015)

[0377] · 미지 농도의 항-TNF α ICVD 표준

[0378] · 래빗 항-인간 TNF α 항체(Peprotech, 500-P31ABt, 300μg/ml)

[0379] · ExtrAvidin HRP(Sigma, E2886)

[0380] · TMB 기질 (마이크로웰 퍼옥시다제 기질 시스템 2-C, KPL, 50-70-00)

[0381] 3. 공정

[0382] 제조:

[0383] 검정에 필요한 플레이트의 수를 결정한다. 맥시소브 96-웰 ELISA 플레이트(Nunc)를 1× PBS 중의 50 μl/웰, 1 μg/ml 엔브렐로 코팅한다. 플레이트를 간단히 진탕시키고, 밀봉하고, 4℃에서 밤새 배양한다.

[0384] 검정:

- [0385] 1. 플레이트 세척기(4× 약 380 μL PBST)를 사용하여 ELISA 플레이트를 세척한다. 플레이트를 타월로 두드려 잔류 액체를 제거한다.
- [0386] 2. 200 μL/웰 차단 완충액을 적용한다. 밀봉하고, ≥1시간 동안 회전 플레이트 진탕기 상에서 배양한다.
- [0387] 3. 희석제로서 차단 완충액, 또는 주요 검정 샘플이 소화 매트릭스로부터 유래하는 경우에 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제를 사용하여 100 μL의 최소 최종 용적으로 0.04nM 내지 10nM의 ICVD 참조 기준의 일련의 희석 시리즈를 제조한다. 희석 범위는 시험된 각 ICVD의 효력에 기초하여 조정되어야 한다. 예는 표 2에 제시되어 있다.

표 2

[0388]

희석 계수	필요한 10nM ICVD의 최소 용적(ul)	희석 번호	[최종 용액], (pM)	전달되는 용적, (ul)	각 웰 중의 용적 희석제(ul)
2.545	280	1	10000.0	110	170
		2	3928.571		
		3	1543.367		
		4	606.323		
		5	238.198		
		6	93.578		
		7	36.763		

- [0389] 4. 희석제로서 차단 완충액, 또는 샘플이 소화 매트릭스로부터 유래하는 경우에 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제에서 시험되는 ICVD-함유 샘플의 적절한 희석물을 제조한다. 일련의 희석 시리즈를 제조한다. 희석 범위는, 이것이 전체 검정 신호 범위를 피복하도록, 배경 신호로부터 포화 신호까지, 명확하게 정의된 선형 범위로, 시험된 각 ICVD의 효력에 기초하여 조정되어야 한다. 이들 희석물은 또한, 최종 ELISA 플레이트 상에 삼중 50 μL 복제물의 충분한 용적이 존재하도록 마이크로플레이트에서 연속으로 이루어져야 한다. 소화 분석 ELISA를 위해, 프로테아제-정지된 시간 0 매트릭스 대조군(ICVD를 함유하지 않음)을 포함시킨다. 이는 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제에서 희석되어야 하고, 플레이트 상에서 시험된 ICVD 샘플을 함유하는 매트릭스 최고 농도에 일치시켜야 한다. 이들이 소화 매트릭스로부터 제조되는 경우, 제조 동안 샘플을 냉각 상태로 유지한다.
- [0390] 5. 검정 샘플이 소화 매트릭스로부터 유래하는 경우, hrTNF α의 5ng/mL 용액을 차단 완충액, 또는 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제에서 제조한다.
- [0391] 6. 별도의 96-웰 플레이트에서, 블랭크 웰(예를 들면, 웰 H1)을 차단 완충액 또는 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제로 충전시킨다. 나머지 관련 웰을 85 μL TNF 용액으로 충전한다.
- [0392] 7. 제조 플레이트로부터의 85 μL의 각 ICVD 희석물을 제2 플레이트 중의 85 μL hrTNF α 용액과 혼합한다. 차단 완충액, 또는 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제 단독(블랭크 웰)을 함유하는 하나의 웰을 포함시킨다. hrTNF α가 차단 완충액, 또는 차단 완충액 + 2× 프로테아제 억제제 단독(TNF 단독 대조군 웰)로 희석된 또 다른 웰을 포함시킨다. 상기 기재된 바와 같이 hrTNF α가 "정지된" 소화 매트릭스로 희석된 웰을 포함시킨다. 밀봉하고, 1시간 동안 회전 플레이트 진탕기에서 배양한다.
- [0393] 8. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0394] 9. 50 μL ICVD-TNF 혼합물(+ 적절한 대조군; 1) TNF 없음, ICVD 없음, 2) TNF, 그러나 ICVD 없음, 3) TNF + "정지된" 소화 매트릭스, ICVD 없음)을 세척된 ELISA 플레이트에 삼중으로 전달한다. 밀봉하고, 2시간 동안 회전 플레이트 진탕기에서 배양한다.
- [0395] 10. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0396] 11. 차단 완충액으로 구성된 항-인간 TNF α 항체(Peprotech, P31A)의 5ml/플레이트 1/1000 희석물을 제조한다. 50 μL/웰을 첨가하고, 밀봉하고, 회전 플레이트 진탕기에서 간단히 진탕시킨 다음, 냉각 실온/냉장고(4℃)에서 밤새 배양한다. 주: 이 단계는 실온에서 플레이트 진탕기 상에서 2시간으로 감소시킬 수 있지만, 신호는 감소 감소의 결과로 감소될 것이다.
- [0397] 12. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.

- [0398] 13. ExtrAvidin-연결된 HRP(Sigma, E2886)의 5mL/플레이트 1/1000 희석물을 제조한다. 50 μL/웰을 첨가하고, 밀봉하고, 회전 플레이트 진탕기에서 ≥30분 동안 배양한다.
- [0399] 14. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0400] 15. 10mL/플레이트 TMB 기질(기질 A 및 B의 1:1 비율)을 제조한다. 100 μL/웰을 첨가하고, 밀봉하고, 회전 플레이트 진탕기에서 ≤30분 동안 배양한다. 광으로부터 차단한다.
- [0401] 16. 반응을 50 μL/웰 0.5M H₂SO₄로 정지시킨다.
- [0402] 17. 플레이트를 450nm에서 판독한다.
- [0403] 18. ICVD 표준 보정 곡선을 사용하여, 그래프패드 프리즘 소프트웨어(또는 등가물)를 사용하여 미지 샘플 농도를 보간한다.
- [0404] 단계 6에서, 동일 용적의 희석된 ICVD 및 TNF α는 ELISA 플레이트로의 첨가 전에 혼합한다. 이 단계는 ICVD 및 TNF α 농도의 2배까지 효과적으로 희석시킨다. 따라서, 플레이트 상의 TNF α의 최종 농도는 2.5ng/mL일 것이고, ICVD 표준 곡선의 최종 농도는 0.02nM 내지 5nM일 것이다. 이 희석은 적절한 샘플 희석 계수를 평가할 때에 고려되어야 한다. TMB 기질 반응은 신속하게 진행할 수도 있다. 플레이트의 색은 주기적으로 검사해야 하고, 매우 밝은 청색이 30분 이내에 나타나는 경우, 매우 높은 흡광도가 높은 배경을 유도할 수 있기 때문에 반응을 정지시켜야 한다. 적절한 대조군은 삼중 웰을 포함해야 한다: BSA 단독, ICVD 없음(즉, 2.5ng/mL TNF α 단독), 및 필요한 경우, TNF α 없음(즉, 5nM ICVD 단독). 소화 분석 ELISA를 위해, 2× 프로테아제 정지 용액의 첨가에 의해 정지된 ICVD-비함유 매트릭스 샘플이 TNF에 첨가되어야 한다. 대조군에서 배경 매트릭스의 최저 희석(또는 최고 농도)은 TNF와 혼합된/플레이트에 적용된 최고 ICVD 농도에서 소화 매트릭스의 최저 희석(또는 최고 농도)과 일치시켜야 한다.
- [0405] 1.5 배로 세포 세포독성 표준 검정
- [0406] *항-독소 ICVL의 효력을 평가하기 위해*
- [0407] *사용 전에 배로 세포의 배양 및 유지*
- [0408] 배로 세포의 통상의 계대배양은 다음과 같이 달성할 수 있다:
- [0409] 1. 세포의 플라스크를 완전 컨플루언스로 성장시킨 후, 모든 세포 배양 배지를 흡인시키고, 2mL 1× 트립신 (0.02% EDTA에 용해시킴, Sigma E8008)을 적용한다. 트립신이 적용되면, 세척 동안 세포의 손실을 방지하도록 신속하게 작동한다.
- [0410] 2. 세포의 표면 상에 제1 트립신 도포를 세척한 다음, 완전히 흡인하여 모든 미량의 세포 배양 배지를 제거한다 (배지로부터 임의의 미량의 혈청은 트립신 활성을 억제시킬 것이다).
- [0411] 3. 2mL의 트립신을 적용하고, 세포의 표면 상에서 세척한다.
- [0412] 4. 대략 1.5 내지 1.7mL의 트립신을 플라스크로부터 제거한다.
- [0413] 5. 잔류하는 300 내지 500 μL가 플레이트의 표면 상의 배로 세포를 피복하도록 플라스크를 경사시킨다.
- [0414] 6. 세포를 10 내지 12분 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양한다.
- [0415] 7. 트립신 활성을 정지시키기 위해, 10mL 배로 세포 배지를 첨가한다.
- [0416] 8. 배지가 혼탁해질 때까지(세포 클럼프의 손실을 나타냄), 피펫으로 플라스크의 하부에 대해 현탁액을 온화하게 분사함으로써 세포를 재현탁시킨다. 3 내지 4회가 충분하다. 세포에 유해할 수 있기 때문에, 과량의 피펫팅을 피한다.
- [0417] 9. 0.2 내지 0.5mL의 세포 현탁액을 75cm² 세포 배양 플라스크(Corning) 중의 25 내지 30mL 신선한 배로 세포 배지에 첨가한다. 플라스크를 37°C, 5% CO₂에서 배양하여 세포를 완전 컨플루언스로 성장시킨다. 이는, 접종 용적 및 세포 계수에 따라 3 내지 5일내에 발생해야 한다. 프로세스에 걸쳐 미세한 제어를 수득하기 위해, 세포는 하기 개략된 바와 같이 혈구계를 사용하여 계수하고, 고착 접종물을 배지에 첨가한다. 컨플루언트 상태에서, 세포 단층은 배지 교환 없이 별도의 1 내지 2일 동안 건강을 유지해야 한다. 사용하기 위한 컨플루언트 단

층의 수명을 연장하기 위해, 배양 배지의 1/3 내지 1/2를 새로운 것으로 하는 것이 종종 편리하다(성장하는 배로 세포로부터 사이토키인으로 조절되기 때문에 모든 배지를 교환하지 않는다). 세포는 환화 및 박리가 발생하기 시작하기 전에 분할되어야 한다.

[0418] *검정을 위한 플레이트 제조(-1일차)*

[0419] 이상적으로, 플레이트는 세포독성 검정에서 사용하기 전일에 제조해야 한다. 그러나, 플레이트는 또한, 필요한 경우, 사용일에 제조될 수도 있다. 후자의 경우, 플레이트를 아침(오후에 사용하기 위해)에 제조하고, 사용 전에 마이크로플레이트에 대한 세포 부착을 위해 적어도 3시간이 허용되도록 보장한다. 배로 세포의 완전 컨플루언트 플라스크를 사용하여 플레이팅용 세포 현탁액을 제조한다.

[0420] 1. 150 μ L 멸균 H₂O를 웰 사이 공간에 첨가하고, 300 μ L를 96-웰 평저 마이크로플레이트의 상부 및 하부 열에 첨가한다. 이는 배양된 세포가 마이크로플레이트에서 성장 동안 수화되는 것을 보장한다.

[0421] 2. 배로 세포의 컨플루언트 플라스크를 상기 기재된 바와 같이 트립신화 및 재현탁시킨다(10mL 배로 세포 배양 배지에서).

[0422] 3. 혈구계 및 광학 현미경을 사용하여 세포를 계수한다(4회의 독립적 계수를 취하고, 예를 들면, 단일 혈구계 슬라이드의 4개 그리드 코너를 사용한 평균치를 사용한다). 트립신화 후에 세포 생존성에 대해 관심이 있는 경우, 계수 전에 트리판 블루 염료를 세포에 첨가하고(1:1 v/v), 생존 세포 계수 $\times 2$ 를 곱한다.

[0423] 4. 세포를 배로 세포 배양 배지의 요구된 용적(검정 플레이트당 8ml 가능)으로 5×10^4 세포/mL로 희석한다.

[0424] 5. 멀티채널 피펫을 사용하여, 100 μ L의 세포 현탁액을 각 웰에 분배한다. 이는 5000 세포/웰과 동등하다. 복수의 플레이트가 제조되는 경우, 세포가 균일하게 분포되는 것을 보장하기 위해, 연속 플레이팅 사이에 세포 현탁액의 와동 및/또는 피펫팅을 유지한다.

[0425] 6. 마이크로플레이트를 1,000rpm에서 2분 동안 실온에서 원심분리하여 플레이트의 하부를 횡단하는 위치에서 세포를 균일하게 고정시킨다. 원심분리의 각 암에서 최대 2개 플레이트를 회전시켜, 암이 내측으로 향하고 웰 간 물이 유출되는 것을 방지한다.

[0426] 7. 광학 현미경을 사용하여 세포 분포 및 수가 예상된 바와 같은지를 시각적으로 확인한다.

[0427] 8. 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 배양한다.

[0428] *검정 설정(0일차)*

[0429] 주: 이 섹션에 기재된 모든 용액은 배로 세포 배양 배지에서 제조한다. 검정 개시 전에 플레이트/조합물의 수를 커버하기 위해 필요한 최종 용적의 독소 및 ICVD를 계산해야 한다. 모든 용액을 희석 단계 사이에 충분히 혼합한다(와동 및/또는 복수의 반전에 의해).

[0430] 1. 필요한 용적의 독소를 최종 검정 농도의 2배(2 \times)로 제조한다. 필요한 검정 농도는 사전에 결정되어야 한다(하기의 예비 작업 참조).

[0431] 2. 시험 ICVD를 검정에서 시험되는 최고 농도의 2배(2 \times)로 제조한다. 검정에서 명백한 용량-반응 독소 중화 관계를 입증하는 ICVD의 최고 농도를 목적으로 한다(하기 예시적 그래프 참조).

[0432] 3. 희석 수조에서 2 \times ICVD 스톱의 10개 단계적 희석물(비희석된 최고 농도 포함)을 제조한다. 전형적으로, 1/3 희석은 유용한 데이터 범위를 생성한다.

[0433] 4. 96-웰 환저 마이크로플레이트를 사용하여, 배로 세포를 함유하는 플레이트에 대한 첨가 전에 혼합 용액을 제조한다.

[0434] 5. 삼중으로, 배지 단독, 독소 단독(1 \times 희석) 및 트리톤-X100(0.01%) 대조군의 용액을 제조하고, 각각을 공 플레이트 웰에 첨가한다.

[0435] 6. 10 μ L 피펫 팁을 8-채널 흡인기의 중앙 6개 열에 부착시킨다. 0일차에 제조된 배로 세포 마이크로플레이트로부터 모든 배지(웰당 대략 100 μ L)를 주의깊게 제거한다.

[0436] 7. 멀티채널 피펫을 사용하여, 제조 플레이트의 하나의 열로부터의 100 μ L를 검정 플레이트 상의 세포에 첨가한다. 이를 1회 반복하여, 검정 플레이트 상의 2개 인접한 열을 충전시킨다(합계 3개 복제 열):

- [0437] 8. 플레이트 공급이 완료되면, 3일 동안 37°C에서 배양한다.
- [0438] *검정의 프로세스(3일차)*
- [0439] 1. 플레이트를 광학 현미경하에 관찰한다. 배지 단독 대조군 웰에서 컨플루언트 성장 및 독소-단독 대조군 웰에서 양호한 독소 반응을 검사한다.
- [0440] 2. 멀티채널 피펫을 사용하여, 압 상태에서, 각 웰에 10 µL 알라마(Alamar) 블루 시약(광 감수성)을 첨가한다.
- [0441] 3. 플레이트를 30초 동안 진탕시켜 알라마 블루와 배양 배지와의 혼합을 보장한다.
- [0442] 4. 플레이트를 1시간 30분 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양한다.
- [0443] 5. 배양 후, 압 상태에서, 50 µL 3% SDS를 첨가한다.
- [0444] 6. 플레이트 판독기(예: Fluostar Omega), 여기 필터 544, 방사 필터 590, 하부 광학계를 사용하여 플레이트를 판독한다. 트리톤 X100으로 처리된 3개 플레이트 웰로 블랭크(데이터가 수정되는 것)를 설정한다.
- [0445] 7. 플레이트 상의 각 처리에 대해 3회 반복의 평균치를 계산한다. 하기 식을 사용하여 독소 중화 값(%)을 계산한다: $\text{중화}(\%) = (\text{ICVD 처리} - \text{독소 대조군}) * 100 / (\text{배지 대조군} - \text{독소 대조군})$.
- [0446] *예비 작업: 주요 중화 검정에 사용하기 위한 독소의 최적 양의 결정*
- [0447] 주요 검정에서 해석의 용이성을 위해, 사용하기 위한 적절한 농도의 독소는 배로 세포 상에서 독소 용량-반응 실험을 수행하여 사전에 결정되어야 한다. 12개 웰 희석 수조에서 독소의 10개 연속 희석물을 제조한다. 0.01% 트리톤 및 배지 단독 대조군에 대해 나머지 2개 웰을 사용한다. 희석 수조에서 최소 330 µL의 각 용액을 제조한다(이는 각각 100 µL에서 3회 반복을 가능하게 한다). 독소 제제가 사전에 어떠한 효력이 있는지에 대한 징후가 없는 경우, 예비 실험을 위해 광범위한 희석 범위를 선택한다. 이는, 필요한 경우, 보다 미세한 농도 범위에 걸쳐 반복할 수 있다. 이들 용액을 평저 마이크로플레이트에서 배로 세포에 적용하고, 배양하고, 상기 기재된 바와 같이 플레이트를 처리한다.
- [0448] 소정 농도의 독소에 대한 활성을 중화시키는 ICVD 또는 완전 항체를 검정하기 위해, 세포 생존율에서 최대 감소를 유도할 수 있는 최소 농도의 각 독소 제제를 선택한다. 배로 세포에 대한 예시적 독소 용량-반응 곡선은 도 1에 제공되어 있다. 수평 막대는 주요 중화 검정에서 사용하기에 적합한 독소 농도를 나타낸다.
- [0449] 1.6 표준 gp130 ELISA 검정
- [0450] *항-IL-6R ICVD의 효력을 평가하기 위해*
- [0451] 본 검정의 목적은 sIL-6/IL-6R 복합체의 gp130에 대한 결합에서 간섭을 측정함으로써 항-IL-6R ICVD의 효력을 측정하는 것이다. 이 검정은 재조합 인간 gp130에 대한 hIL-6R/hIL-6 복합체의 결합을 검출한다. 이러한 상호작용은, gp130에 대한 hIL-6R-hIL-6 복합체의 감소된 결합을 유발하는, 항-IL-6R ICVD에 의해 경쟁적으로 억제될 수 있다. 따라서, ELISA에서 높은 신호는 항-IL-6R ICVD의 낮은 농도를 나타내고, 그 반대의 경우도 그러하다.
- [0452] *재료*
- [0453] 필요한 용액:
- [0454] 1× PBS
- [0455] PBST(1× PBS, 0.05% 트윈 20)
- [0456] 차단 완충액(1× PBS 중의 1% BSA, pH 7.3-7.5)
- [0457] 0.5M 황산(H₂SO₄)
- [0458] 필요한 시약:
- [0459] 공지된 농도의 재조합 가용성 인간 gp130
- [0460] 공지된 농도의 ICVD 스톱
- [0461] 공지된 농도의 재조합 가용성 인간 IL-6

- [0462] 공지된 농도의 재조합 가용성 인간 IL-6R
- [0463] 비오틴화된 염소 항-IL-6R 폴리클로날 항체(R&D 시스템즈 BAF227); 멸균 PBS에 250 μ g/ml로 재현탁시킴.
- [0464] 엑스트라비딘(ExtrAvidin)-퍼옥시다제(Sigma E2886)
- [0465] TMB 기질(마이크로웰 퍼옥시다제 기질 시스템 2-C, KPL, 50-70-00)
- [0466] 공정
- [0467] 제조:
- [0468] 1. 검정에 필요한 플레이트 수를 결정한다.
- [0469] 2. 1 \times PBS 중의 5 μ g/mL BSA와 함께 PBS 중의 0.2 μ g/mL 재조합 가용성 인간 gp130의 관련 용적(시간에서 최대 3개 플레이트)을 제조한다.
- [0470] 3. 신속하게 작업하고, 50 μ L/웰을 맥시소프(Mzxisorp) 96-웰 ELISA 플레이트(Nunc)에 분배하여 3개 플레이트의 최대치를 각 배치에 부하한다.
- [0471] 4. 플레이트를 간단하게 진탕시키고, 밀봉하고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양한다.
- [0472] 검정:
- [0473] 1. 플레이트 세척기(4 \times 약 380 μ L PBST)를 사용하여 ELISA 플레이트를 세척한다. 플레이트를 타월로 두드려 잔류 액체를 제거한다.
- [0474] 2. 200 μ L/웰 차단 완충액을 적용한다. 밀봉하고, 회전 플레이트 진탕기에서 \geq 1시간 동안 배양한다.
- [0475] 3. 희석제로서 차단 완충액을 사용하여 70 μ L의 최소 최종 용적으로 0.004nM 내지 80nM의 ICVD 표준의 희석 시리즈를 제조한다.
- [0476] 4. 플레이트 상의 이들의 평가된 최종 농도가 0.001nM 내지 250nM ICVD 범위에 속하도록, 차단 완충액에서 시험 되는 샘플의 적절한 희석물을 제조한다.
- [0477] 5. 차단 완충액에서 40ng/mL IL-6R 용액을 제조한다.
- [0478] 6. 별도의 96-웰 플레이트에서, 50 μ L의 각 ICVD 희석물을 50 μ L의 IL-6R 용액과 함께 혼합한다. 각각의 희석 시리즈에서, ICVD가 부재하는 하나의 웰을 포함시킨다. 회전 플레이트 진탕기로 1시간 동안 배양한다.
- [0479] 7. 차단 완충액에서 100ng/mL IL-6 용액을 제조한다.
- [0480] 8. 추가의 부가 96-웰 플레이트에서, 단계 6으로부터의 85 μ L ICVD-IL-6R 혼합물을 단계 7에서 제조한 85 μ L IL-6 용액과 함께 혼합한다. 하기 제어가 각 플레이트에 적용되도록, 차단 완충액 단독을 함유하는 웰을 포함 시킨다: IL-6 단독, 및 ICVD 없음(IL-6+IL-6R 단독). 회전 플레이트 진탕기로 10분 동안 배양한다.
- [0481] 9. 차단된 ELISA를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0482] 10. 단계 8에서 제조된 혼합물 50 μ L를 세척된 ELISA 플레이트에 삼중으로 전달한다. 밀봉하고, 회전 플레이트 진탕기로 2시간 동안 배양한다.
- [0483] 11. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0484] 12. 차단 완충액에서 구성된 5.2mL/플레이트 125 μ g/mL의 BAF227 항-hIL-6R 항체를 제조한다. 50 μ L/웰을 첨가 하고, 밀봉하고, 간단하게 진탕시키고, 실온에서 1시간 동안 또는 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양한다.
- [0485] 13. 차단된 ELISA를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0486] 14. 차단 완충액에서 엑스트라비딘의 1/1,000 내지 1/3,000 희석의 5.2mL/플레이트를 제조한다. 50 μ L/웰을 첨 가하고, 밀봉하고, 회전 진탕기로 30분 동안 배양한다.
- [0487] 15. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0488] 16. 10mL/플레이트 TMB 기질(기질 A 및 B의 1:1 비율)을 제조한다. 100 μ L/웰을 첨가하고, 밀봉하고, 중간 청 색이 최저 희석 웰에서 또는 최대 30분까지 전개할 때까지 회전 플레이트 진탕기로 배양한다. 광으로부터 차폐

한다.

- [0489] 17. 반응을 50 μ L/웰 0.5M H₂SO₄로 정지시킨다.
- [0490] 18. 플레이트를 450nm에서 판독한다.
- [0491] 19. 표준 곡선을 사용하여 활성 ICVD의 농도를 보간한다. 생 OD450 값은 블랭크 대조군 웰로부터 채취한 판독치로 조정한다. 표준 곡선은 적절한 소프트웨어(예: 로그(억제제) 대 반응 가변 구배(4개 파라미터)를 사용하는 그래프패드 프리즘)를 사용하여 플롯팅한다. 시험 샘플에서 ICVD 농도는 표준 곡선을 사용하여 소프트웨어에서 계산한다.
- [0492] *장관 모델에서 배양한 후에 잔류하는 생존가능한 항-IL-6R ICVD 비율의 평가를 위해*
- [0493] 본 검정의 목적은, 마우스 소장 상청액 또는 인간 배설물 추출물 등의 단백질분해 물질의 존재하에 사전에 배양된 활성 항-IL-6R ICVD의 잔류 농도를 측정하고, 이에 의해 배양 동안 발생할 수 있는 임의의 단백질분해의 ICVD에 대한 영향, 따라서 항-IL-6R ICVD의 단백질분해 안정성을 명료하게 하는 것이다. 본 검정은 재조합 인간 gp130에 대한 hIL-6R/hIL-6 복합체의 결합을 검출한다. 이 상호작용은, gp130에 대한 hIL-6R-hIL-6 복합체의 감소된 결합을 유발하는 항-IL-6R ICVD에 의해 경쟁적으로 억제될 수 있다. 따라서, 이러한 ELISA에서 높은 신호는 활성 상태로 잔류하는 항-IL-6R ICVD의 낮은 농도 또는 낮은 친화성을 나타내고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 생존율(%)은 활성 ICVD의 퍼센트 농도이고, 소화 전후에 샘플 사이에 유지된 표준 곡선을 사용하여 보간한다.
- [0494] *재료*
- [0495] 필요한 용액:
- [0496] 1× PBS
- [0497] PBS 중의 1% BSA
- [0498] PBST(1× PBS, 0.05% 트윈 20)
- [0499] 차단 완충액(1× PBS 중의 1% BSA, pH 7.3-7.5)
- [0500] 검정 완충액(1% BSA, 1× PBS 중의 2× 프로테아제 억제제*)
- [0501] 0.5M 황산(H₂SO₄)
- [0502] *2× 프로테아제 억제제 = 50mL 완충액당 1개 정제
- [0503] 필요한 시약:
- [0504] 공지된 농도의 재조합 가용성 인간 gp130
- [0505] 시그마패스트(SigmaFast) 프로테아제 억제제 정제(S8820)
- [0506] 공지된 농도의 ICVD 스톱
- [0507] 공지된 농도의 가용성 인간 IL-6
- [0508] 공지된 농도의 가용성 인간 IL-6R
- [0509] 비오틴화된 염소 항-IL-6R 폴리클로날 항체(R&D 시스템즈 BAF227); 멸균 PBS에서 250 μ g/mL로 재현탁시킴.
- [0510] 엑스트라비딘(ExtrAvidin)-퍼옥시다제(Sigma E2886)
- [0511] TMB 기질(마이크로웰 퍼옥시다제 기질 시스템 2-C, KPL, 50-70-00)
- [0512] 공정
- [0513] 제조:
- [0514] 1. 검정에 필요한 플레이트의 수를 결정한다.
- [0515] 2. PBS + 5 μ g/mL BSA 중의 0.2 μ g/mL 재조합 가용성 인간 gp130의 관련 용적(시간에서 최대 3개 플레이트)을 제조한다.

- [0516] 3. 신속하게 작업하고, 50 μ L/웰을 맥시소프 96-웰 ELISA 플레이트(Nunc)에 분배하여 4개 플레이트의 최대치를 하나의 배치에 부하한다.
- [0517] 4. 플레이트를 간단하게 진탕시키고, 밀봉하고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양한다.
- [0518] **검정:**
- [0519] 1. 플레이트 세척기(4 \times 약 380 μ L PBST)를 사용하여 ELISA 플레이트를 세척한다. 플레이트를 타월로 두드려 잔류 액체를 제거한다.
- [0520] 2. 200 μ L/웰 차단 완충액을 적용한다. 밀봉하고, 회전 플레이트 진탕기로 \geq 1시간 동안 배양한다.
- [0521] 3. 희석제로서 검정 완충액을 사용하여 70 μ L의 최소 최종 용적으로 0.004nM 내지 1000nM의 ICVD 표준의 희석 시리즈를 제조한다.
- [0522] 4. 플레이트 상의 이들의 평가된 최종 농도가 0.001nM 내지 250nM ICVD 범위에 속하도록, 검정 완충액에서 시험 되는 샘플의 적절한 희석물을 제조한다. GI/배설물 물질을 함유하는 샘플이 가능한 한 아이스 상에 유지되도록 한다.
- [0523] 5. 검정 완충액에서 400ng/mL IL-6 용액을 제조한다.
- [0524] 6. 검정 완충액에서 40ng/mL IL-6R 용액을 제조한다.
- [0525] 7. 별도의 96-웰 플레이트에서, 50 μ L의 각 ICVD 희석물을 50 μ L의 IL-6 용액과 함께 혼합한다. 각각의 희석 시리즈에서, ICVD를 갖지 않는 하나의 웰을 포함시킨다.
- [0526] 8. 추가의 부가 96-웰 플레이트에서, 단계 7로부터의 85 μ L ICVD-IL-6 혼합물을 단계 6에서 제조한 85 μ L IL-6R 용액과 함께 혼합한다. 하기 제어가 각 플레이트에 적용되도록, 검정 완충액 단독을 함유하는 웰을 포함시킨다: IL-6 단독, 및 ICVD 없음(IL-6+IL-6R 단독). 5분 동안 회전 플레이트 진탕기로 배양한다.
- [0527] 9. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0528] 10. 단계 8에서 제조된 혼합물 50 μ L를 세척된 ELISA 플레이트에 삼중으로 전달한다. 밀봉하고, 회전 플레이트 진탕기로 2시간 동안 배양한다.
- [0529] 11. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0530] 12. 차단 완충액에서 제조한 BAF227 항-hIL-6R 항체의 5mL/플레이트 125ng/mL를 제조한다. 50 μ L/웰을 첨가하고, 밀봉하고, 간단히 진탕시키고, 실온에서 1시간 동안 또는 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양한다.
- [0531] 13. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0532] 14. 차단 완충액 중의 엑스트라비딘의 5mL/플레이트 1/1000 내지 1/3000 희석물을 제조한다. 50 μ L/웰을 첨가하고, 밀봉하고, 회전 진탕기로 \leq 30분 동안 배양한다.
- [0533] 15. 차단된 ELISA 플레이트를 단계 1에서와 같이 세척한다.
- [0534] 16. 10mL/플레이트 TMB 기질(기질 A 및 B의 1:1 비율)을 제조한다. 100 μ L/웰을 첨가하고, 밀봉하고, 중간 청색이 최저 희석 웰에서 또는 최대 30분까지 전개할 때까지 회전 플레이트 진탕기로 배양한다. 광으로부터 차폐한다.
- [0535] 17. 반응을 50 μ L/웰 0.5M H₂SO₄로 정지시킨다.
- [0536] 18. 플레이트를 450nm에서 판독한다.
- [0537] 19. 표준 곡선을 사용하여 활성 ICVD의 농도를 보간한다. 생 OD450 값은 블랭크 대조군 웰로부터 채취한 판독치로 조정한다. 표준 곡선은 적절한 소프트웨어(예: 로그(역제제) 대 반응 가변 구배(4개 파라미터)를 사용하는 그래프패드 프리즘)를 사용하여 플롯팅한다. 시험 샘플에서 ICVD 농도는 표준 곡선을 사용하는 소프트웨어에서 계산한다. 시험 샘플 중의 활성 ICVD 농도는 생존율(%)을 제공하기 위해 0시간 샘플에서의 것의 %로서 표시된다.
- [0538] **실시예 2: 항-TNF- α ICVD의 CDR2에서 리신 잔기의 알라닌, 히스티딘 또는 글루타민으로의 치환**
- [0539] Q65B1는 가용성 재조합 TNF- α 로 면역화시킨 라마로부터 단리, 클로닝 및 정제한 항-TNF- α ICVD이다. Q65B1 폴

리펩티드 서열의 잔기 K59를 알라닌, 히스티딘 또는 글루타민으로 치환하고, 장관 안정성 및 효력에 대한 각 치환의 영향을 시험했다.

[0540] 각 ICVD를 코딩하는 DNA를 벡터 pMEK222에 클로닝시키고, 발현시키고, 이. 콜라이(*E. coli*)의 주변세포질(탈론 또는 니켈 NTA 컬럼에 의해)로부터 정제한다. 여기서 시험된 모든 ICVD는 동일한 C-말단 Flag-His6 태그를 포함한다.

[0541] 잔기 K59는 Q65B1의 CDR2에 존재한다. K59A 치환을 갖는 Q65B1을 "ID43F"로 표지하고, K59H 치환을 갖는 Q65B1을 "ID8F-EV"로 표지하고, K59Q 치환을 갖는 Q65B1을 "ID44F"로 표지한다.

[0542] 2.1.1 효력 - 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정 - 실험 1

[0543] 각 ICVD의 용량-반응 곡선은, EC50 값을 생성하기 위해 사용된 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정을 사용하여 생성했다(도 2A 및 표 3).

표 3

작제물	치환	EC50 (pM)
Q65B1	없음(K59)	98.4
ID8F-EV	K59H	139.3
ID43F	K59A	602.6
ID44F	K59Q	245.47

[0545] 2.1.2 효력 - 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정 - 실험 2

[0546] 반복 실험에서, Q65B1 및 ID8F-EV의 용량-반응 곡선은 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정을 사용하여 다시 생성했다(도 2B).

[0547] 2.2.1 장내 안정성 - 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델 - 시험 1

[0548] ICVD는 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델에 따라 6시간 동안 마우스 소장 재료로부터 소화시켰다. ICVD의 안정성(%)은 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 도 3A에 제시되어 있다.

[0549] 2.2.2 장내 안정성 - 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델 - 실험 2

[0550] Q65B1 및 ID8F-EV는 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델에 따라 16시간 동안 마우스 소장 재료에서 소화시켰다. ICVD의 안정성(%)은 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 도 3B의 우측에 제시되어 있다.

[0551] 2.2.3 장내 안정성 - 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델

[0552] Q65B1 및 ID8F-EV는 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에 따라 인간 배설물 상청액에서 16시간 동안 소화시켰다. ICVD의 안정성(%)은 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 도 3B의 좌측에 제시되어 있다.

[0553] 2.3 결론

[0554] K59A 및 K59Q는 K59 및 K59H와 비교하여 효력을 감소시켰다(각각 도 2A, ID43F 및 ID44F 대 Q65B1 및 ID8F-EV 참조). 도 2A 및 2B로부터, Q65B1(K59)와 비교하여 ID8F-EV(K59H)의 효력에서 임의의 관찰된 변화는 실험적 변동으로 저하될 수 있고 이들 ICVD는 실질적으로 동일한 효력을 갖는 것을 알 수 있다.

[0555] K59A 및 K59Q는, K59와 비교하여(각각 도 3A, ID43F 및 ID44F 대 Q65B1) 및 K59H와 비교하여(도 3A, ID8F-EV 참조), 6시간 배양 후에 마우스 소장 재료에서 안정성을 감소시켰다.

[0556] K59H는, K59와 비교하여(도 3A 및 도 3B, ID8F-EV 대 Q65B1 참조), 6시간 배양 및 16시간 배양 후에 마우스 소장 재료에서 안정성을 증가시켰다. ID8F-EV 및 Q65B1은 이러한 인간 배설물 상청액 검정에서 16시간 배양 후에 안정성에 차이가 없었다(도 3B).

[0557] K59H의 안정성 증가는 현저한 효력 손실 없이 달성되었다.

[0558] **실시예 3: 항-TNF- α ICVD의 CDR2 및 CDR3 둘 다에서 리신 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환**

- [0559] Q65B1의 잔기 K59 및 K101 둘 다를 히스티딘으로 치환했다("ID34F"라 함). 잔기 K59는 Q65B1의 CDR2에 존재하고, 잔기 K101은 Q65B1의 CDR3에 존재한다. ID34F를 코딩하는 DNA를 효모에서 클로닝하고 발현시켰다.
- [0560] 상기 기재된 ID8F-EV와 동일한 서열을 갖는, K59H 잔기로 치환된 Q65B1(실시예 2에서와 같이)를 다시 제조했다. 그러나, 이 경우에, 이러한 ICVD를 코딩하는 DNA를 클로닝하고 효모에서 발현시키고(따라서 C-말단 Flag-His6 태그를 결여함), 따라서 본 실시예에서 "ID32F"로 표지한다.
- [0561] 3.1 효력 - 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정
- [0562] 각 ICVD의 용량-반응 곡선은 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정을 사용하여 생성했다. 0 내지 3nM의 농도 범위를 사용했다(도 4).
- [0563] 3.2.1 장내 안정성 - 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델
- [0564] ICVD를 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델에 따라 마우스 소장 재료에서 16시간 동안 소화시켰다. ICVD의 안정성(%)은 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 도 5A에 제시되어 있다.
- [0565] 3.2.2 장내 안정성 - 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델
- [0566] ICVD를 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에 따라 인간 배설물 상청액에서 16시간 동안 소화시켰다. ICVD의 안정성(%)은 표준 TNFR2/TNF 간섭 ELISA 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 도 5B에 제시되어 있다.
- [0567] 3.3 결론
- [0568] ID34F의 CDR3에서 추가의 K101H 치환은, 효력에 현저한 영향 없이(도 4), 표준 마우스 소장 상청액 모델(도 5A) 및 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델(도 5B) 둘 다에 따라 ICVD의 장내 안정성을 추가로 증가시켰다.
- [0569] **실시예 4: 항-TcdB ICVD의 CDR3에서 아르기닌 잔기의 알라닌, 히스티딘, 글루타민, 페닐알라닌 또는 트립토판으로의 치환**
- [0570] ID45B는 전구체 ICVD(Q31B1)으로부터 유래된 변형된 항-TcdB ICVD이다. Q31B1은 정제된 TcdB의 포르말린 불활성화에 의해 제조된 TcdB 독소이드로 면역화시킨 라마로부터 단리, 클로닝 및 정제했다. ID45B 폴리펩티드 서열의 잔기 R107을 알라닌, 히스티딘, 글루타민, 페닐알라닌 또는 트립토판으로 치환하고, 장내 안정성 및 효력에 대한 각 치환의 효력을 시험했다.
- [0571] 각 ICVD를 코딩하는 DNA를 벡터 pMEK222에 클로닝시키고, 이. 콜라이의 주변세포질로부터 발현 및 정제했다(탈론 또는 니켈 NTA 컬럼에 의해). 여기서 시험된 모든 ICVD는 동일한 C-말단 Flag-His6 태그를 포함한다.
- [0572] 잔기 R107은 ID45B의 CDR3에 존재한다. 치환된 ICVD는 표 4에 따라 표지했다.

표 4

ICVD	치환
ID45B	없음(R107)
ID46B	R107H
ID47B	R107A
ID48B	R107Q
ID49B	R107F
ID50B	R107W

- [0574] 4.1 효력 - 배로 세포 세포독성 표준 검정
- [0575] 각 ICVD의 용량-반응 곡선은 배로 세포 세포독성 표준 검정을 사용하여 생성했다(도 6A).
- [0576] 4.2 장내 안정성 - 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델
- [0577] ICVD는 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에 따라 인간 배설물 상청액 풀 4에서 30분 동안 소화시켰다. ICVD의 생존율(%)은 표준 웨스턴 블롯 안정성 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 도 6B에 제시되어 있다.
- [0578] 4.3 결론
- [0579] 모든 치환은 "비치환된" ID45B와 비교하여 효력을 감소시켰다. 그러나, R107H 및 R107F 치환(ID46B 및 ID49

B)은 경미한 효력 감소만을 제공한 반면, R107A, R107Q 및 R107W 치환(ID47B, ID48B 및 ID50B)은 실질적 효력 감소를 제공했다(도 6A).

[0580] R107H 및 R107F 치환 둘 다는 유사한 경미한 효력 감소를 제공한 반면, R107H는 시험된 모든 치환의 최고 장내 안정성 증가를 제공했다(도 6B, ID46B 참조 - 0분과 비교하고 ID45B R107과 비교하여 회수율의 대략 35% 증가). 대조적으로, R107F 치환은 R107과 비교하여 대략 10% 감소를 제공했다(도 6B, ID49B).

[0581] R107H는, 효력에 대한 경미한 효력과 함께, 안정성의 최대 증가를 제공했다.

[0582] **실시예 5: 항-TcdB ICVD ID2B에서 복수 아르기닌 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환, 및 ID2B의 CDR3 내에서 치환 위치의 영향**

[0583] ID2B는 전구체 ICVD(Q31B1)로부터 유래된 변형된 항-TcdB ICVD이다. ID2B 폴리펩티드 서열의 CDR2에서 잔기 R53 및 R56을 둘 다 히스티딘 잔기로 치환했다("ID20B"라 함). 독립적으로, ID2B 폴리펩티드 서열의 CDR3에서 잔기 R107 및 R109를 각각 히스티딘 잔기로 치환했다(단독 R107H 치환은 "ID21B"라 하고, 단독 R109H 치환은 "ID22B"라 함). 이들 ICVD는 표 5에 요약되어 있다. 트립신 안정성, 장내 안정성 및 효력에 대한 이들 치환의 효력을 시험했다.

표 5

ICVD	치환(들)
ID2B	없음
ID20B	R53H 및 R56H (둘 다 CDR2에서) M34I
ID21B	R107H (CDR3에서) M34I
ID22B	R109H (CDR3에서) M34I

[0585] ID2B를 코딩하는 DNA를 벡터 pMEK222에 클로닝시키고, 이. 콜라이의 주변세포질로부터 발현 및 정제했다. ID2B는 C-말단 Flag-His6 태그를 포함한다. ID20B, ID21B 및 ID22B를 코딩하는 DNA는 효모에서 클로닝 및 발현시켰다.

[0586] 5.1 효력 - 배로 세포 세포독성 표준 검정

[0587] 각 ICVD의 용량-반응은 배로 세포 세포독성 표준 검정에서 027 씨. 디피실 리보타입으로부터 TcdB를 사용하여 생성했다(도 7).

[0588] 5.2.1 표준 트립신 장관 모델

[0589] ICVD를 트립신 안정성에 대해 검정했다. TPCK-처리된 트립신-아가로스 비드(소 체장으로부터의 트립신; T4019; Sigma Aldrich)의 완충된(10mM 아세트산, pH 3.2, 0.01% 티메로살 함유) 수성 현탁액을 검정에 사용한다. 비드를 물(250 µL 비드 + 1.25mL 물)로 3회 세척한 다음, 트립신 완충액(TRYP 완충액; 1mM Tris-HCl, 20mM CaCl₂[pH 8.0])으로 5회 세척한다. 마지막으로, 수지를 50%(v/v) 현탁액으로서 TRYP 완충액에 재현탁시킨다.

[0590] 100 µL의 2mg/mL 작제물 용액을 TRYP 완충액 중의 225 µL 50%(v/v) 고정화 TPCK-처리된 트립신과 혼합한다. 진탕기에서 37°C에서의 배양의 0, 10, 15, 30, 45 및 60분의 시간 간격 후, 샘플을 다음과 같이 채취한다: 수지를 500×g에서 1분 원심분리 단계에 의해 펠렛화하고, 40 µL 샘플을 상청액으로부터 채취하고, 2× 샘플 부하 완충액(라엠리(Laemmli) 완충액)과 혼합한다. 잔류 현탁액을 다시 혼합하고, 진탕기에서 37°C로 반환한다.

[0591] 분석을 위해, 15 µL의 각 샘플을 5 µL 4× 부하 염료와 혼합하고, 10분 동안 비등시키고, 15 µL를 폴리아크릴아미드 겔(예: NuPAGE 10% 아크릴아미드 비스-트리스 겔) 상에 레인당 부하한다. 겔을 35분 동안 200V에서 SDS-MES 완충액에서 작동시킨다. 겔을 30분 동안 40% 메탄올, 7% 아세트산에서 고정시키고, 밤새 콜로이드성 쿠마시에 브릴리언트 블루 염색으로 염색한다. 겔은 영상화(예: 7초 노출을 갖는 ImageQuant LAS4000 사용) 전에 물에서 탈염색한다(도 8A-C). 절단된 구성 폴리펩티드와 비교하여 완전 작제물의 양은 각 시점 레인에서 상응하는 밴드를 비교함으로써 평가할 수 있다. 전기영동 겔 도면에서 별표 및 #은 절단된 단편을 함유하는 밴드를 나타낸다.

- [0592] 5.2.2 장내 안정성 - 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델
- [0593] ID2B 및 ID21B는 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에 따라 배설물 풀 3 및 4에서 1시간 동안 소화시켰다(도 9). ICVD의 안정성(%)은 표준 독소 ELISA 검정을 사용하여 계산했다.
- [0594] 5.3 결론
- [0595] 단일 CDR 치환은 효력에서 경미한 감소를 제공한 반면(도 7, ID21B 및 ID22B), 이중 CDR2 치환은 효력에서 보다 현저한 감소를 제공했다(도 7, ID20B).
- [0596] ID2B에서 His-태그의 존재에 기인하여, 도 8A에서 전기영동 겔로부터의 결과는 불명확하다. 보다 중앙 R107H 치환(도 8B, ID21B)은 보다 주변 R109H 치환(도 8C, ID22B)보다 큰 트립신 안정성 증가를 제공했다. 이는, CDR의 중앙 "윈도우"에서 이루어질 때, 이러한 치환이 더욱 안정화할 수 있음을 나타낸다.
- [0597] ID21B(R107H)의 배설물 상청액 안정성은, 비치환된 ID2B(도 9)와 비교하여, 풀 3(씨. 디피실 양성 환자 배설물) 및 풀 4(씨. 디피실 음성 환자 배설물) 둘 다에서 실질적으로 증가했다.
- [0598] **실시예 6: 항-TcdB ICVD ID1B의 CDR2에서 아르기닌 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환, 및 ID1B의 CDR3 내의 치환 위치의 영향**
- [0599] ID1B는 전구체 ICVD(B10F1)으로부터 유래된 변형된 항-TcdB ICVD이다. B10F1은, 정제된 TcdB의 포르말린 불활성화에 의해 제조된 100 μ g의 TcdB 독소이드로 면역화시킨 라마로부터 단리, 클로닝 및 정제했다.
- [0600] ID1B 폴리펩티드 서열의 CDR2에서 잔기 R58을 히스티딘 잔기로 치환했다("ID24B"라 함). 독립적으로, ID1B 폴리펩티드 서열의 CDR3에서 잔기 R105 및 R108을 각각 히스티딘 잔기로 치환했다(R105H 치환은 "ID27B"라 하고, R108H 치환은 "ID25B"라 함). 이들 ICVD는 표 6에 요약되어 있다. 장내 안정성 및 효력에 대한 이들 치환의 효력을 시험했다.

표 6

ICVD	치환(들)
ID1B	없음
ID24B	R58H (CDR2에서) M34I
ID25B	R108H (CDR3에서) M34I
ID27B	R105H (CDR3에서) M34I

- [0601] ID1B, ID24B, ID25B 및 ID27B를 코딩하는 DNA는 효모에서 클로닝하고 발현시켰다.
- [0602] 6.1 효력 - 베로 세포 세포독성 표준 검정
- [0603] 각 ICVD의 용량-반응 곡선은 베로 세포 세포독성 표준 검정에서 027 씨. 디피실 리보타입으로부터 TcdB를 사용하여 생성했다(도 10A).
- [0604] 6.2.1 장내 안정성 - 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델
- [0605] ID1B, ID24B, ID25B 및 ID27B를 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에 따라 배설물 풀 2(도 10B)에서 1시간 동안 소화시켰다. ICVD의 생존율(%)는 표준 독소 ELISA 검정을 사용하여 계산했다.
- [0606] 6.2.2 장내 안정성 - 표준 트립신 장관 모델
- [0607] ICVD는 상기 실시예 5에 기재된 방식으로 트립신 안정성에 대해 검정했다(도 11A 내지 C).
- [0608] 6.3 결론
- [0609] 단일 CDR3 치환은 효력의 경미한 감소를 제공했다(도 10A).
- [0610] IB1B 겔에서 주요 밴드의 밀도(도 11A)는 치환된 ICVD의 것(도 11B 내지 11C)보다 시험 기간에 걸쳐 보다 큰 정도로 감소하는 것으로 나타나고, 따라서 치환된 ICVD는 이러한 트립신 검정에서 치환된 ID1B보다 더욱 안정한

것으로 나타난다.

- [0612] 모든 치환된 ICVD의 배설물 상청액 안정성은 증가했다(도 10B). 보다 중앙 R105H CDR3 치환(도 10B, ID27B)는 보다 주변 R108H CDR3 치환(도 10B, ID25B)보다 큰 배설물 상청액 안정성 증가를 제공했다. 이는 이러한 치환이 CDR의 중앙 "윈도우"에서 이루어지는 경우에 보다 안정화할 수 있음을 나타낸다.
- [0613] **실시예 7: 항-TcdB 이가 작제물의 하나의 암의 CDR3에서 아르기닌 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환**
- [0614] ID41B는 야생형 ICVD Q31B1 및 B10F1의 변형된 버전으로 이루어진 항-TcdB 이가 작제물이다. R108H(CDR3) 치환은 ID41B의 B10F1 암에서 수행했다("ID43B"라 함). 효력 및 장내 안정성에 대한 이러한 치환의 영향을 시험했다. ID41B 및 ID43B를 코딩하는 DNA를 효모에서 클로닝하고 발현시켰다.
- [0615] 7.1 효력 - 배로 세포 세포독성 표준 검정
- [0616] 각 작제물의 용량-반응 곡선은 배로 세포 세포독성 표준 검정에서 017 씨. 디피실 리보타입으로부터 TcdB를 사용하여 생성했다(도 12A).
- [0617] 7.2 장내 안정성 - 표준 독소 ELISA 검정
- [0618] 작제물은 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에 따라 배설물 풀 2, 3 및 4에서 4시간 동안 소화시켰다. 3회의 반복 ELISA를 각 배설물 풀에 대해 실행했다. 생존율(%)은 표준 독소 ELISA 검정을 사용하여 계산했다(도 12B 내지 12D).
- [0619] 7.3 결론
- [0620] R108H 치환(ID43B)은 효력에 대해 매우 경미한 영향을 가졌다(도 12A). 대다수의 배설물 상청액 검정(모든 배설물 풀에 대해 9개중 6개)에서, ID43B에서 R108H 치환은 증가된 안정성을 제공했다(도 12B 내지 12D).
- [0621] **실시예 8: 항-TcdA 이가 ICVD의 CDR3에서 아르기닌 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환**
- [0622] ID17A는 야생형 ICVD B4F10 및 Q34A3의 변형된 버전으로 이루어진 항-TcdA 이가 작제물이다(B4F10 및 Q34A3은 정제된 TcdA의 포르말린 불활성화에 의해 제조된 TcdA 특소이드로 면역화시킨 라마로부터 단리, 클로닝 및 정제했다).
- [0623] R109H(CDR3) 치환은 ID17A의 B4F10 암에서 수행했다("ID29A"라 함). 효력 및 장내 안정성에 대한 이러한 치환의 영향을 시험했다. ID17A 및 ID29A를 코딩하는 DNA를 효모에서 클로닝시키고 발현시켰다.
- [0624] 8.1 효력 - 배로 세포 세포독성 표준 검정
- [0625] 각 작제물의 용량-반응 곡선은 배로 세포 세포독성 표준 검정에서 TcdA를 사용하여 생성했다(도 13A).
- [0626] 8.2 장내 안정성 - 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델
- [0627] 작제물을 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에 따라 배설물 풀 2, 3 및 4에서 1시간 동안 소화시켰다. 생존율(%)은 표준 독소 ELISA 검정을 사용하여 계산했다(도 13B).
- [0628] 8.3 결론
- [0629] 이러한 항-TcdA 바이헤드의 하나의 암에서 R109H(CDR3) 치환은 효력에 대해 경미한 영향을 가졌다(도 13A). 시험된 모든 배설물 풀에서, 이러한 치환은 고도의 증가된 안정성을 제공했다(도 13B).
- [0630] **실시예 9: 항-IL-6R ICVD 7F6의 CDR3에서 아르기닌 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환**
- [0631] 7F6은 항-IL-6R ICVD이다. 7F6은 가용성 인간 재조합 IL-6R로 면역화시킨 라마로부터 단리, 클로닝 및 정제했다.
- [0632] 7F6 폴리펩티드 서열의 CDR3에서 잔기 R102를 히스티딘 잔기로 치환하고("ID-3V"라 함), 효력 및 장내 안정성에 대한 이러한 치환의 영향을 시험했다. 7F6 및 ID-3V를 코딩하는 DNA를 이. 콜라이에서 클로닝하고 발현시켰다.
- [0633] 9.1 효력 - 표준 gp130 ELISA 검정
- [0634] 용량-반응 곡선은 표준 gp130 ELISA 검정을 사용하여 생성하고, 이들을 사용하여 EC50 값을 생성했다(표 7, 그 래프는 제시하지 않음).

표 7

작제물	치환	EC50(nM)
7F6	없음(R102)	0.15
ID-3V	R102H(CDR3에서)	0.16

[0635]

[0636]

9.2 장내 안정성 - 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델

[0637]

ICVD는 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델에 따라 마우스 소장 재료에서 4시간 동안 소화시켰다. ICVD의 안정성(%)은 표준 gp130 ELISA 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 표 8에 제시되어 있다.

표 8

작제물	치환	안정성(%)
7F6	없음(R102)	1%
ID-3V	R102H(CDR3에서)	12%

[0638]

[0639]

9.3 장내 안정성 - 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델

[0640]

ICVD는 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에 따라 인간 배설물 상청액에서 16시간 동안 소화시켰다. ICVD의 안정성(%)은 표준 gp130 ELISA 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 표 9에 제시되어 있다.

표 9

작제물	치환	안정성(%)
7F6	없음(R102)	28%
ID-3V	R102H(CDR3에서)	41%

[0641]

[0642]

9.4 결론

[0643]

7F6의 CDR3에서 이러한 R102H 치환은, 효력에 현저한 영향 없이(표 7), 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델 둘다에 따라 ICVD의 장내 안정성을 추가로 증가시켰다(표 8 및 9 참조).

[0644]

실시예 10: 항-IL-6R ICVD 5G9의 CDR3에서 아르기닌 잔기의 히스티딘 잔기로의 치환

[0645]

5G9는 항-IL-6R ICVD이다. 5G9는 가용성 인간 재조합 IL-6R로 번역화시킨 라마로부터 단리, 클로닝 및 정제했다.

[0646]

5G9 폴리펩티드 서열의 CDR3에서 잔기 R105를 히스티딘 잔기로 치환하고("ID-54V"라 함), 효력 및 장내 안정성에 대한 이러한 치환의 영향을 시험했다. 5G9 및 ID-54V를 코딩하는 DNA는 이. 콜라이에서 클로닝하고 발현시켰다.

[0647]

10.1 효력 - 표준 gp130 ELISA 검정

[0648]

용량-반응 곡선은 표준 gp130 ELISA 검정을 사용하여 생성하고, 이들을 사용하여 EC50 값을 생성했다(표 10, 그래프는 제시하지 않음).

표 10

작제물	치환	EC50(nM)
5G9	없음(R105)	0.09
ID-54V	R105H(CDR3에서)	0.15

[0649]

[0650]

10.2 장내 안정성 - 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델

[0651]

ICVD는 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델에 따라 마우스 소장 재료에서 4시간 동안 소화시켰다. ICVD의 안정성(%)은 표준 gp130 ELISA 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 표 11에 제시되어 있다.

표 11

[0652]

작제물	치환	안정성(%)
5G9	없음(R105)	5%
ID-54V	R105H(CDR3에서)	36%

[0653]

10.3 장내 안정성 - 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델

[0654]

ICVD는 표준 인간 배설물 상청액 장관 모델에 따라 인간 배설물 상청액에서 16시간 동안 소화시켰다. ICVD의 안정성(%)은 표준 gp130 ELISA 검정을 사용하여 계산했다. 결과는 표 12에 제시되어 있다.

표 12

[0655]

작제물	치환	안정성(%)
5G9	없음(R105)	40%
ID-54V	R105H(CDR3에서)	48%

[0656]

10.4 결론

[0657]

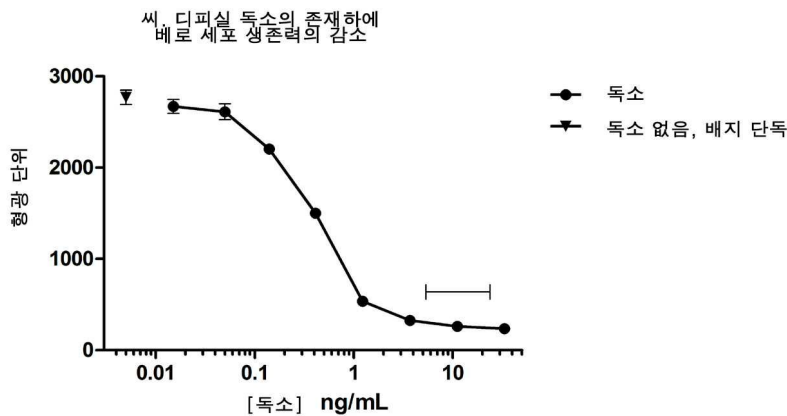
5G9의 CDR3에서 이러한 R105H 치환은, 효력에 대한 경미한 영향과 함께(표 10), 표준 마우스 소장 상청액 장관 모델 둘 다에 따라 ICVD의 장내 안정성을 추가로 증가시켰다(표 11 및 12 참조).

[0658]

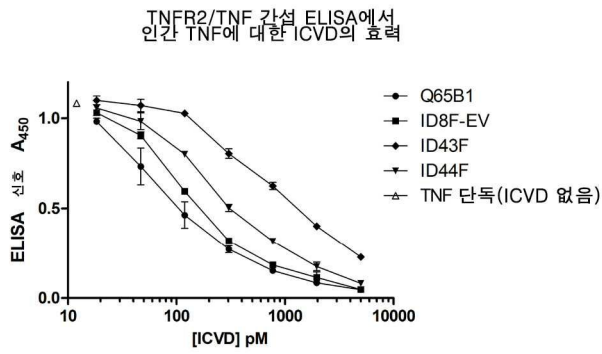
명세서 및 하기 특허청구범위 전체에 걸쳐, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다", 및 "포함한다" 및 "포함하는" 등의 이의 변형은 언급된 정수, 단계, 정수의 그룹 또는 단계의 그룹의 포함을 의미하는 것으로 이해되지만, 임의의 기타 정수, 단계, 정수의 그룹 또는 단계의 그룹의 배제를 의미하는 것은 아니다. 본 발명의 명세서 전체에 걸쳐 언급된 모든 특허 및 특허 출원은 이의 전체가 참조로서 본원에 도입된다. 본 발명은 상기 언급된 바람직한 및 보다 바람직한 그룹 및 적합한 및 보다 적합한 그룹의 모든 조합을 포함한다.

도면

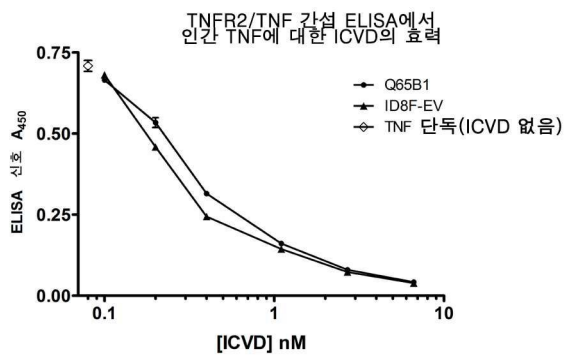
도면1



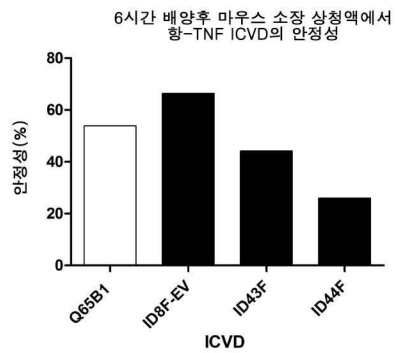
도면2a



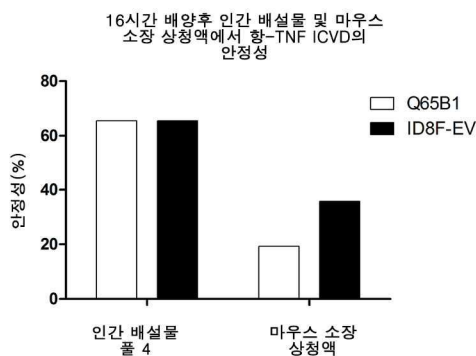
도면2b



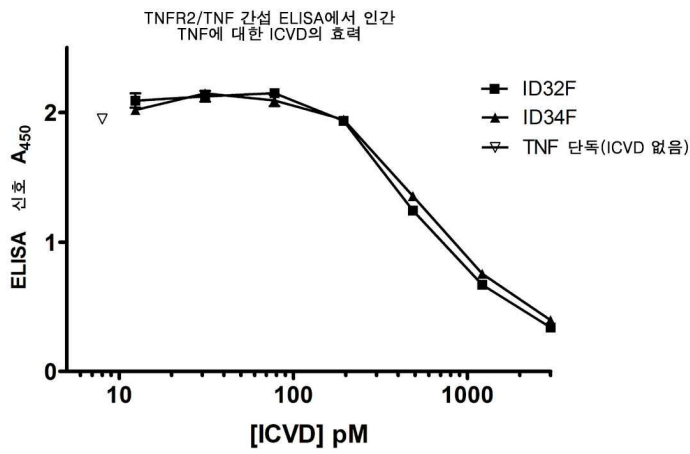
도면3a



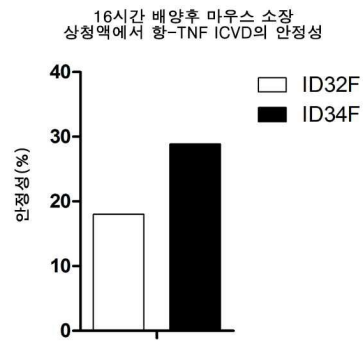
도면3b



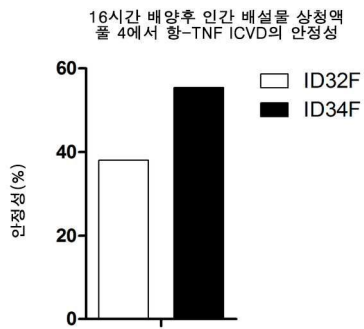
도면4



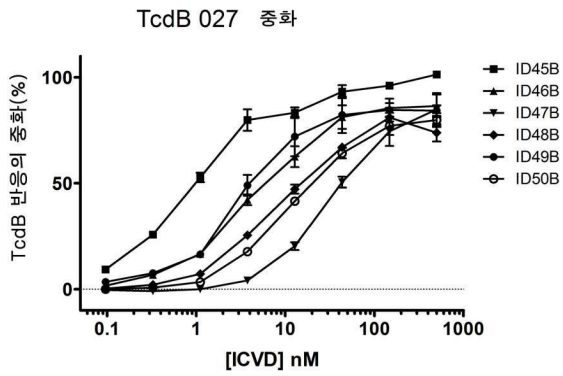
도면5a



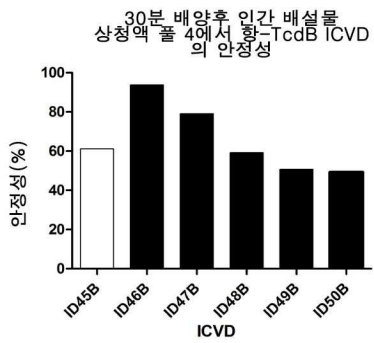
도면5b



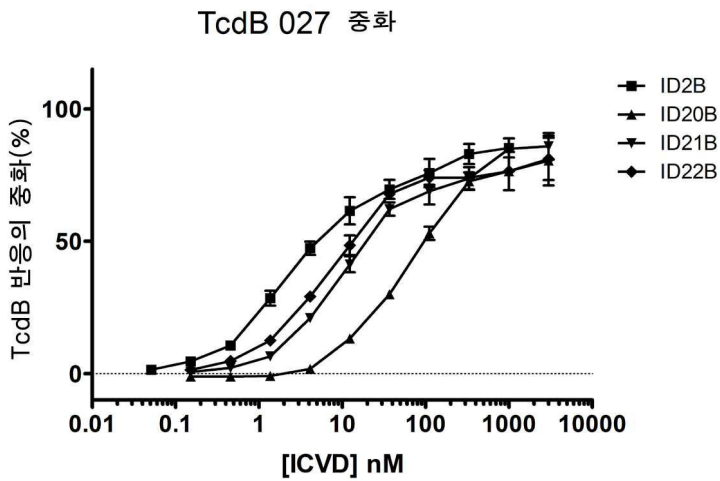
도면6a



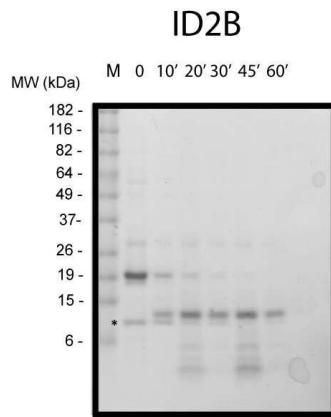
도면6b



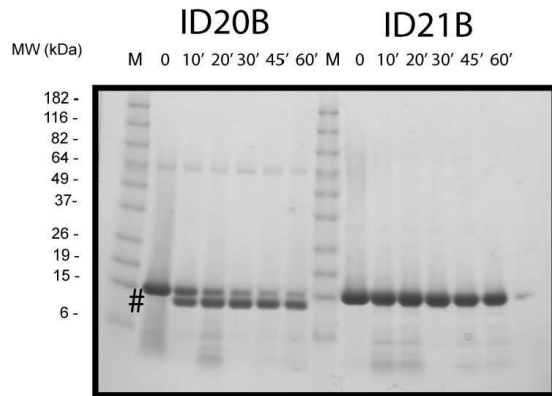
도면7



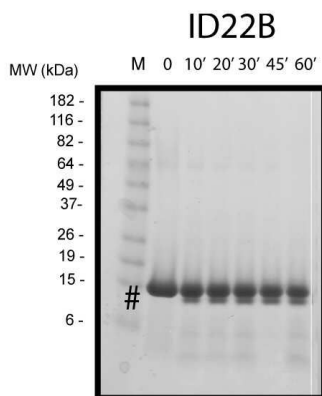
도면8a



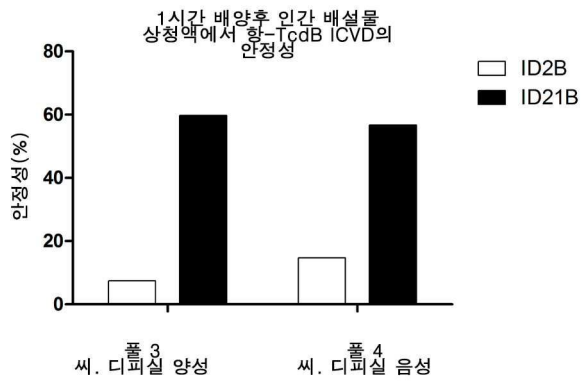
도면8b



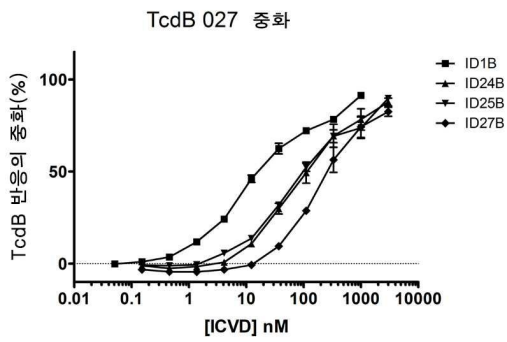
도면8c



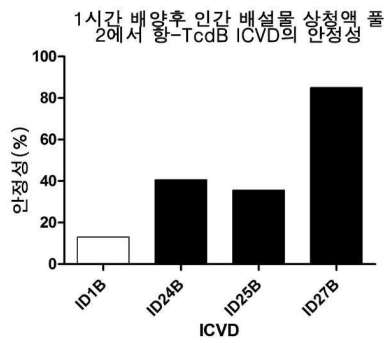
도면9



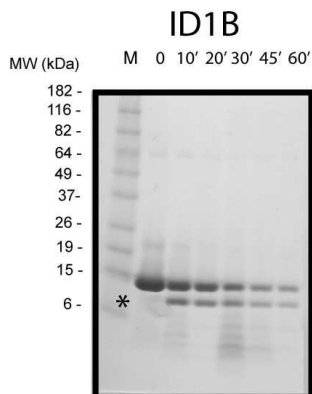
도면10a



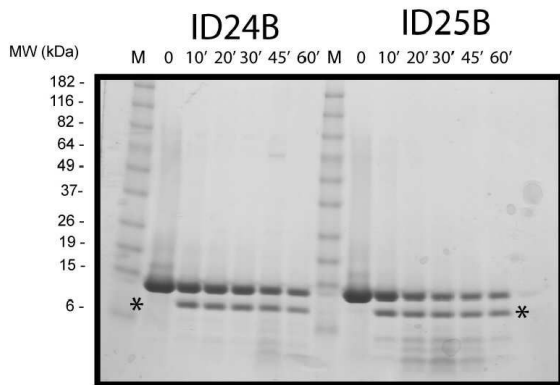
도면10b



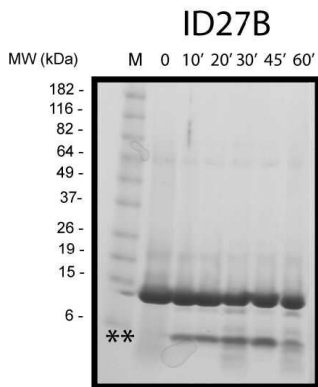
도면11a



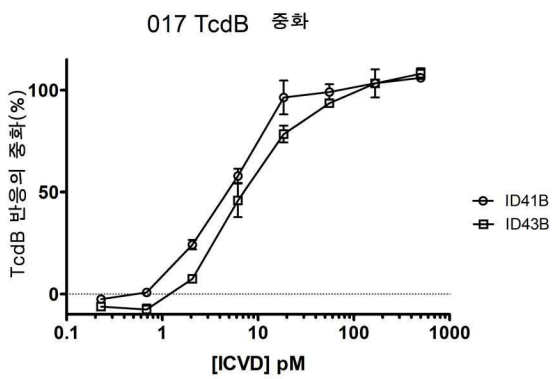
도면11b



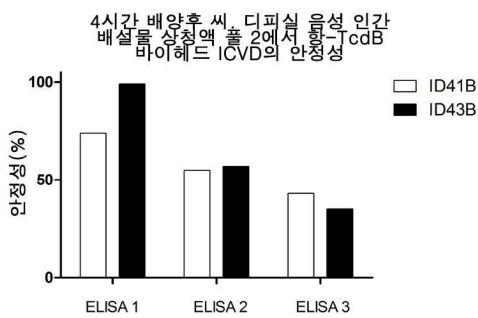
도면11c



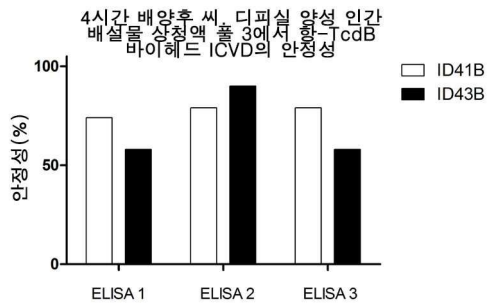
도면12a



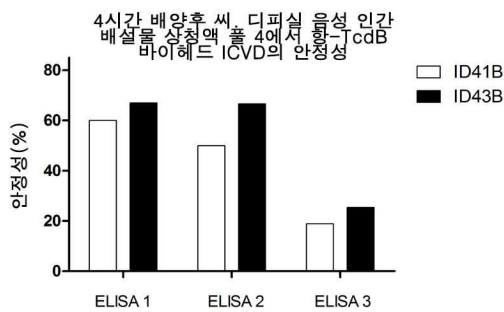
도면12b



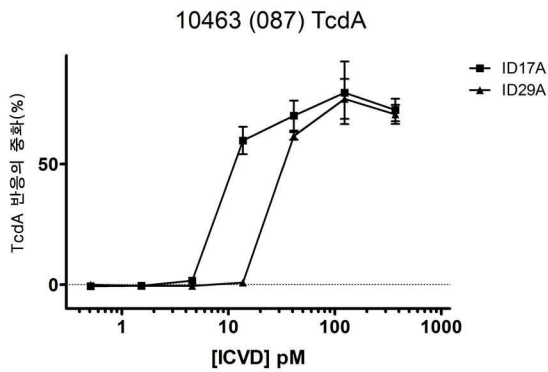
도면12c



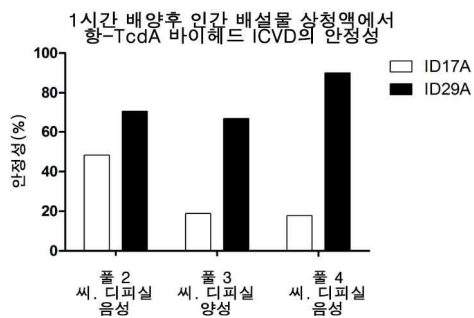
도면12d



도면13a



도면13b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TNF-alpha ICVD ID8F-EV (ID32F)

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TNF-alpha ICVD ID43F

<400> 3

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

1 5 10 15

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

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

85 90 95
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TNF-alpha ICVD ID44F

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His

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

85 90 95

Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TNF-alpha ICVD ID34F

<400> 5

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

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

20 25 30

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

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD B10F1

<400> 6

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Asn Gly Ser Gly Gly Asn Arg Ile Ser Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Leu Thr Tyr Tyr Gly Arg Ser Ala Arg Tyr Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD Q31B1

<400> 7

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

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID2B

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Leu Ser Ser Tyr

 20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Phe Val

 35 40 45

Ala Gly Ser Ser Arg Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val

 50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

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

 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 10

<211>

> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID20B

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Leu Ser Ser Tyr

20 25 30
 Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Gly Ser Ser His Asp Gly His Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala His Thr Thr Ser Gly Val Pro Val Arg Glu Arg Ser Tyr Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID21B

<400> 11

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Gly Ser Ser Arg Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 12

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID22B

<400> 12

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Gly Ser Ser Arg Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 13

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID24B

<400> 13

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Phe Ser Ser Tyr

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

 85 90 95
 Ala Ala Ser Leu Thr Tyr Tyr Gly Arg Ser Ala Arg Tyr Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID25B

<400> 14

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 16

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB construct ID41B

<400> 16

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Gly Ser Ser Arg Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

180 185 190

Ala Ala Ile Asn Gly Ser Gly Gly Asn Arg Ile Ser Ala Asp Ser Val
 195 200 205
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 210 215 220
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Leu Thr Tyr Tyr Gly His Ser Ala Arg Tyr Asp Tyr Trp
 245 250 255

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 260 265

<210> 17

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB construct ID43B

<400> 17

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Gly Ser Ser Arg Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala His Thr Thr Ser Gly Val Pro Val His Glu Arg Ser Tyr Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

Ala Gly Ser Ser Arg Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala His Thr Thr Ser Gly Val Pro Val Arg Glu Arg Ser Tyr Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID46B

<400> 19

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Gly Ser Ser Arg Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala His Thr Thr Ser Gly Val Pro Val His Glu Arg Ser Tyr Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID47B

<400> 20

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

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

115 120

<210> 21

<211>

> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID48B

<400> 21

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

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

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 22

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID49B

<400> 22

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

 35 40 45
 Ala Gly Ser Ser Arg Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala His Thr Thr Ser Gly Val Pro Val Phe Glu Arg Ser Tyr Ala

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdB ICVD ID50B

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Gly Ser Ser Arg Asp Gly Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala His Thr Thr Ser Gly Val Pro Val Trp Glu Arg Ser Tyr Ala
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 24

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-TcdA construct ID17A

<400> 24

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Ser Asp Val Tyr

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

 85 90 95
 Ala Ala Ser Arg Ser Asp Cys Ile Gly Tyr Gly Cys Arg Arg Val Ser
 100 105 110
 Gln Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala

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

Gly Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ile Ser Gly Met Asp Phe Ser
 165 170 175
 His Lys Pro Ala Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 180 185 190
 Phe Val Ala Ser Ile Thr Thr Arg Ala Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser
 195 200 205
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val
 210 215 220
 Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Asn Ser Glu Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
 245 250 255
 Ser

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220>

<223> Example CDR A

<400> 26

Ala Arg Asn Glu Cys Asp Gln Gly His Ile Leu Lys Met Phe Pro

1 5 10 15

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First third of Example CDR A

<400> 27

Ala Arg Asn Glu Cys

1 5
<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Second third of Example CDR A
<400> 28
Asp Gln Gly His Ile

1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Third third of Example CDR A
<400> 29
Leu Lys Met Phe Pro

1 5
<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Example CDR B
<400> 30
Ala Arg Asn Glu Cys Asp Gln Gly

1 5
<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Second third of Example CDR B

<400> 31

Asn Glu Cys Asp

1

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-IL6R ICVD 7F6

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Thr Arg Leu Thr Cys Leu Ala Ser Gly Ser Ile Ser Ser Ile Asn

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Met Ile Gly Arg Gly Glu Gly Ala Asn Tyr Gly Asp Phe Ala Lys

 50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr

 85 90 95

Ala Asp Tyr Glu Asp Arg Asp Ser Pro Phe Asn Gly Ser Trp Gly Gln

 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-IL6R ICVD ID-3V

<400> 33

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

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

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 34

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of anti-IL6R ICVD 5G9

<400> 34

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

