



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0106201
(43) 공개일자 2008년12월04일

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7020710

(22) 출원일자 2008년08월22일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년08월22일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2007/000258

국제출원일자 2007년01월25일

(87) 국제공개번호 WO 2007/085837

국제공개일자 2007년08월02일

(30) 우선권주장

0601513.5 2006년01월25일 영국(GB)

(71) 출원인

에라스무스 유니버시티 메디컬 센터 로테르담
네덜란드 3015 지이 로테르담 디알 몰레워터플레
인 50

(72) 발명자

그로스벨드, 프랭클린, 제라르더스

네덜란드, 엔엘-3000 씨에이 로테르담, 피.오.박
스 2040, 디파트먼트 오브 셀 바이알러지 앤드 제
네틱스, 에라스무스 유니버시티 메디컬 센터 로테
르담

얀센스, 리차드, 빌헬름

네덜란드, 엔엘-3000 씨에이 로테르담, 피.오.박
스 2040, 디파트먼트 오브 셀 바이알러지 앤드 제
네틱스, 에라스무스 유니버시티 메디컬 센터 로테
르담

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 원전

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 결합분자

(57) 요 약

본 발명은 1가, 2가 및 다가의 폴리펩티드 결합 복합체, 또는 단일특이적, 이특이적 또는 다특이적 폴리펩티드 결합 복합체의 제조 및 이들의 사용에 관련된다. 또한, 본 발명은 파아지 디스플레이 라이브리리, 형질전환 동물 또는 천연 기원으로부터 유래된 다양한 종류의 항원 특이적 VH 결합 영역의 제조 및 사용에 관련된다. VH 결합 영역 및 이합체화 영역은 인간 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 상기 폴리펩티드 결합 복합체는 바람직하게는 천연의 힌지 또는 링커 웹티드를 사용하여 이합체화 영역의 아미노 말단 및 카르복시 말단에서 융합된 4개의 항원 결합 [VH] 영역들을 갖는 동형- 또는 이형이합체화 영역들을 포함한다. 상기 폴리펩티드 결합 복합체가 CH2-CH3 이펙터 기능을 결하는 경우, 그들은 크기가 바람직하게는 120kDa 미만이다. 제조 경로는 본 발명에서 설명된다.

(72) 발명자

드라벡, 듀브라브카

네덜란드, 엔엘-3000 씨에이 로테르담, 피.오.박스
2040, 디파트먼트 오브 셀 바이알러지 앤드 제네틱
스, 애라스무스 유니버시티 메디컬 센터 로테르담

크레이그, 로저, 킹돈

영국 체셔 씨더블유11 2엑스비, 샌드배치, 스몰우
드, 스펜 모스, 주빌리 하우스 팜

특허청구의 범위

청구항 1

제1 폴리펩티드 쇄 및 제2 폴리펩티드 쇄의 이합체를 포함하며, 상기 각 폴리펩티드 쇄는 아미노 말단 VH 결합 영역; 카르복시 말단 VH 결합 영역; 및 C_H2-C_H3 기능성을 결한 이합체화 영역을 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이합체화 영역은 조작된 CH₂-CH₃ 영역 또는 천연 CH₂-CH₃ 영역인 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 쇄의 이합체화 영역은 상기 제2 폴리펩티드 쇄의 이합체화 영역과 상이하여, 상기 폴리펩티드 결합 복합체가 이형이합체인 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 폴리펩티드 쇄의 이합체화 영역은 상기 제2 폴리펩티드 쇄의 이합체화 영역과 동일하여, 상기 폴리펩티드 결합 복합체가 동형이합체인 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4개의 VH 결합 영역은 동일한 특이성(4가의 단일특이성)을 나타내는 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노 말단 VH 결합 영역들은 동일한 특이성을 나타내고; 상기 카르복시 말단 VH 결합 영역들은 동일한 특이성을 나타내며; 상기 아미노 말단 VH 영역들 및 카르복시 말단 VH 영역들의 결합 특이성은 상이한 (2가의 이특이성) 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노 말단 VH 결합 영역들은 동일한 특이성을 나타내고; 상기 카르복시 말단 VH 결합 영역들은 각각 상이한 특이성 및 상기 아미노 말단 VH 영역들과 상이한 특이성(삼특이성)을 나타내는 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카르복시 말단 VH 결합 영역들은 동일한 특이성을 나타내고; 상기 아미노 말단 VH 결합 영역들은 각각 상이한 특이성 및 상기 카르복시 말단 VH 영역들과 상이한 특이성(삼특이성)을 나타내는 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노 말단 VH 결합 영역들은 각각 상이한 특이성을 나타내고; 상기 카르복시 말단 VH 결합 영역들은 각각 상이한 특이성 및 상기 아미노 말단 VH 영역들과 상이한 특이성(사특이성)을 나타내는 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 크기가 120kDa 보다 크지 않은 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 VH 결합 영역은 폴리펩티드 결합 영역의 대체 군으로

치환될 수 있는 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1 폴리펩티드 쇄, 제2 폴리펩티드 쇄 또는 양 폴리펩티드 쇄는,
아미노 말단 결합 영역과 이합체화 영역 사이;
카르복시 말단 결합 영역과 이합체화 영역 사이; 또는
아미노 말단 결합 영역과 이합체화 영역 사이 및 카르복시 말단 결합 영역과 이합체화 영역 사이
에 유연성 헌지 영역을 더 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 대체 결합 영역은 사이토카인, 성장 인자, 수용체 길항제 또는 작용제, 또는 리간드인 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 각 폴리펩티드 쇄는 헌지 영역에 의해 분리된 일렬 배열의 하나 이상의 추가적인 아미노 말단 VH 결합 영역; 및 헌지 영역에 의해 분리된 일렬 배열의 하나 이상의 추가적인 카르복시 말단 VH 결합 영역을 더 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 제1 폴리펩티드 쇄, 제2 폴리펩티드 쇄 또는 양 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 16

제15항의 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 17

제16항의 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 18

제17항의 숙주 세포를 배양하고, 폴리펩티드 복합체를 분리하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 결합 복합체의 생산 방법.

청구항 19

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 결합 복합체를 코딩하는 벡터 또는 벡터들로 숙주세포를 형질전환하고;

상기 벡터 또는 벡터들의 코딩 서열(들)의 발현을 가능하게 하는 조건 하에서 상기 숙주세포를 성장시키고;

상기 숙주세포로부터 폴리펩티드 결합 복합체를 회수하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 결합 복합체의 생산 방법.

청구항 20

VH 결합 영역, 이합체화 영역 또는 링커 폴리펩티드를 웨პ티드 화학 또는 콘쥬게이션과 같은 합성 경로에 의해 생산하는, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 결합 복합체의 생산 방법.

청구항 21

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 결합 복합체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 22

질병의 예방 또는 치료를 위한 의약의 제조에 있어서, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 결합 복합체의 사용.

청구항 23

치료를 필요로 하는 환자에게 제21항에 따른 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 환자의 치료 방법.

청구항 24

진단제, 시약, 항체효소, 저해제, 세포화학제 또는 조영제로서의, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 결합 복합체의 사용.

청구항 25

인트라바디로서의, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 결합 복합체의 사용.

청구항 26

치료를 필요로 하는 환자에게 제16항에 따른 백터 또는 제21항에 따른 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 환자의 치료 방법.

명세서**기술분야**

<1>

본 발명은 (본 명세서에서 정의된 바와 같은) 이합체화 영역(dimerisation domains)의 아미노 말단과 카르복시 말단 양쪽에 연결된 VH 결합 영역(VH binding domains)을 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체(polypeptide binding complexes)의 제조에 관련된다. 본 발명의 방법을 사용하여 제조된 VH 결합 영역과 이합체화 영역은 종래기술에서 설명된 scFv 유래 폴리펩티드 결합 복합체에 비하여 고유한 구조적 및 기능적 안정성을 나타내므로, 생산물의 제조와 생산물의 안정성에 이점을 제공한다. 또한, 이들의 사용이 설명된다.

배경기술

<2>

단일클론항체(monoclonal antibodies) 또는 이들의 변이체들(variants)은 21세기 들어 본격화된 신규 의약품의 많은 부분을 차지할 것이다. 단일클론항체 치료는 이미 류마티즘 관절염(rheumatoid arthritis)과 크론병(Crohn's disease)의 치료에 우수한 방법으로서 받아들여지고 있으며, 암 치료에서 급격한 진보를 나타내고 있다. 또한, 항체를 이용한 생산물은 심혈관성 질환과 감염성 질환의 치료를 위하여 개발되고 있다. 잘 알려진 단일클론항체 생산물은 표적 리간드(예를 들어, TNF α) 상의 알려진 단일의 에피토프(epitope)를 인식하고 결합한다. 두 개의 중쇄와 두 개의 경쇄로 구성되는 복합체(H_2L_2 복합체)의 어셈블리(assembly) 및 순차적인 번역 후 당화 과정은 포유류 생산 시스템의 사용을 필요로 한다. 포유류 세포 배양을 이용한 항체 제조를 위한 생산비와 시설비는 매우 높아서, 허용 가능한 대체 요법의 부재로 인해 항체 이용 치료법의 활용 가능성이 제한받게 된다. 다양한 형질전환 생물은 완전한 기능성 항체를 발현할 수 있다. 이러한 생물로는 식물, 곤충, 닭, 염소 및 소가 포함된다. 기능성 항체 단편은 대장균(*E. coli*)에서 제조될 수 있지만, 제조된 생산물은 제조 과정 동안 PEG화되지 않는다면, 일반적으로 낮은 혈청 안정성을 가지게 된다.

<3>

이특이적 항체 복합체(bispecific antibody complexes)는, 동일 또는 상이한 항원 상의 다른 두 개의 에피토프와 결합할 수 있는, 면역글로불린에 기초한 조작된(engineered) 분자이다. 이특이적 결합 단백질-통합 항체는 단독으로 또는 다른 결합제와 조합하여, 예를 들어 병원체의 제거(Van Spriel 등, (1999) *J. Infect. Diseases*, 179, 661-669; Tacken 등, (2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940; US 5,487,890), 암의 치료(Glennie와 van der Winkel, (2003) *Drug Discovery Today*, 8, 503-5100), 및 면역 치료(Van Spriel 등, (2000) *Immunol. Today*, 21, 391-397; Segal 등, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6; Lyden 등, (2001) *Nat. Med.*, 7, 1194-1201)와 같은, 획득된 인간 면역 기능이 치료적 효과를 발휘하게 되는 치료 방식에 대한 가능성 을 보여준다.

<4>

제조와 관련된 문제들은, 이특이적 항체 생산물이 2종 이상의 H_2L_2 복합체들을 기초로 하는 경우에 복잡해진다.

예를 들어, 2세트 이상의 중쇄 및 경쇄 유전자들의 동시 발현은 최대 10가지의 다른 조합을 형성할 수 있으며, 이중 단지 하나가 원하는 이형이합체(heterodimer)이다(Suresh 등, (1986) *Methods Enzymol.*, 121, 210-228).

<5> 이러한 문제를 해결하기 위하여, 포유류 세포에서 중쇄 이펙터 기능(effector function)을 보유하는 전장 이특이성 IgG 형태(BsIgG)의 생산을 위한 수많은 전략이 개발되었다. BsIgG는 이형이합체 형성을 방지하기 위하여 조작된 "노브(knob) 및 홀(hole)" 중쇄를 요구하며, 경쇄 착오 쌍형성(mispairing)을 피하기 위하여 동일한 경쇄를 이용한다(Carter, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 7-15). 또한, 각각의 다른 항원들을 인식하는 항체 단편들로부터 복합체들을 생산하기 위하여, 대체적인 화학적 가교 전략들(Ferguson 등, (1995) *Arthritis and Rheumatism*, 38, 190-200) 또는 예를 들어, 콜렉틴(collectin)과 같은 다른 결합 단백질과 항체 단편의 가교 (Tacken 등, (2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940)가 설명되었다.

<6> 또한, 일반적으로 중쇄 이펙터 기능이 결핍된 디아바디(diabody) 또는 미니 항체(BsAb)의 개발은 이형이합체 중복성을 극복한다. 이러한 것들은 그들의 표적 항원 각각에 대해 1가(monovalent)인 2가(divalent)의 이특이적 항체를 형성하기 위하여 접혀지고 이합체화되는, V_H 및 V_L 결합 부위(scFv)가 통합된 최소 단일쇄 항체를 포함한다(Holliger 등, (1993) *PNAS*, 90, 6444-6448; Muller 등, (1998) *FEBS Lett.*, 422, 259-264). 한 예로서, C_{H1} 및 경쇄 불변 영역은 이특이적 미니 항체 형성을 위한 이형이합체화 영역으로서 사용되었다(Muller 등, (1998) *FEBS Lett.*, 259-264). BsAb의 생산을 위하여 대장균 발현 시스템에 기초한 다양한 재조합 방법들이 개발되었지만(Hudson, (1999) *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 548-557), 임상 등급의 다가(multivalent) 항체 물질의 생산비와 생산규모가 임상적 개발에 대한 기본적인 장애인 것으로 나타났다(Segal 등, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6).

<7> 최근에, BsAb 개념은, 각각의 중쇄 및 경쇄 상의 V_H 및 V_L 영역이 조작된 scFv 결합 영역들의 쌍들(pairs)로 대체된 2디아바디인 4가(tetraivalent)의 이특이적 항체를 포함하는 개념으로 확장되었다. 그러한 구조물들은 조작하는데 복잡하더라도, 이형이합체 중복성의 부재하의 배양에서 포유류 세포를 내에 어셈블리될 수 있다(Lu 등, (2003) *J. Immunol. Methods*, 279, 219-232).

<8> 면역글로불린의 구조는 당 분야에서 공지되어 있다. 대부분의 천연의 면역글로불린은 두 개의 중쇄와 두 개의 경쇄를 포함한다. 중쇄들은 각각의 중쇄의 약 절반 위치에 존재하는 힌지(hinge) 간의 이황화결합을 통하여 서로 연결된다. 경쇄는 힌지 영역의 N-말단상의 각각의 중쇄와 회합(association)된다. 각각의 경쇄는 정상적으로 힌지 영역에 근접된 이황화결합에 의하여 그것의 대응되는 중쇄와 결합된다.

<9> Ig 분자가 정확하게 접힐 때, 각각의 쇄는 많은 선형 폴리펩티드 서열들에 의하여 연결된 수많은 뚜렷한 구형 영역들 내로 접힌다. 예를 들어, 경쇄는 가변(V_L) 영역과 불변(C_L) 영역 내로 접힌다. 중쇄는 경쇄의 가변 영역에 인접한 단일의 가변 영역 V_H , 제1의 불변 영역, 힌지 영역 및 2개 또는 3개 추가의 불변 영역들을 가진다. 중쇄 가변 영역(V_H)과 경쇄 가변 영역(V_L)의 상호작용은 항원 결합 영역(Fv)의 형성을 초래한다. 일반적으로, 중쇄 이합체 및 아미노 말단 단편이 경쇄의 부재에서 활성을 보유하는 것으로 알려져 있지만, 최적의 항원 결합을 위해 V_H 와 V_L 은 둘 모두가 요구된다(Jaton 등, (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195).

<10> 새로운 분자 생물학 기술의 출현으로, 중쇄만의 항체(경쇄 결핍)의 존재가 인간(중쇄 질환)과 뮤린(murine) 모델 시스템에서의 B 세포 종식 이상에서 확인되었다. 분자 수준에서 중쇄 질환의 분석은, 개놈 수준에서의 변이와 결실이 중쇄 C_{H1} 영역의 부적절한 발현을 초래하고, 그 결과 경쇄와 결합하는 능력이 결핍된 중쇄만의 항체의 발현을 야기한다(Hendershot 등, (1987) *J. Cell Biol.*, 104, 761-767; Brandt 등, (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1270-1277).

<11> 과아지 라이브리리로부터 유래된 분리된 인간 V_H 영역에 대한 다른 연구(Ward 등, (1989) *Nature*, 341, 544-546)는 V_H 영역들의 항원 특이적 결합을 보여주었으나, 이들 V_H 영역들은 (항상 그런 것은 아니지만) 일반적으로 비교적 낮은 용해성을 가지는 것으로 확인되었다(Jespers 등, (2004) *J. Mol. Biol.* 337, 893-903 참고).

<12> 다른 척추동물 종을 사용한 연구는, 자연적인 유전자 변이의 결과인 카멜리드(camelid)는 C_{H1} 경쇄 결합 지역(region)의 부재에 기인하여 경쇄에 결합할 수 없는 작용성 IgG2와 IgG3 중쇄만의 이합체를 생산하고(Hamers-Casterman 등, (1993) *Nature*, 363, 446-448), 상어와 같은 종은 포유동물 T 세포 수용체 또는 면역글로불린 경쇄와 관련되는 것으로 보이는 유사 중쇄만의 결합 단백질 패밀리를 생산(Stanfield 등, (2004) *Science*, 305,

1770-1773)한다는 것을 보여주었다.

<13> 카멜리드 중쇄만의 항체의 특징은 천연 인간 V_H 영역과 관련된 개선된 용해성 및 안정성을 제공하는 카멜리드 V_H 영역이다. 인간 V_H 영역들은 개선된 용해 특성을 위하여 조작될 수 있거나(Davies와 Riechmann, (1996) Protein Eng., 9 (6), 531-537; Lutz와 Muyldermans, (1999) J. Immuno. Methods, 231, 25-38), 또는 용해성은 생체 내(*in vivo*)에서의 자연적 선택에 의하여 획득될 수 있다(Tanha 등, (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780; Jespers L, Schon O, James LC, Veprintsev D, Winter G., J Mol Biol. 2004 Apr 2;337(4):893-903). 그러나, V_H 결합 영역이 파아지 라이브러리로부터 유래되는 경우에, 예를 들어 친화도 핫 스팟 랜덤화(affinity hot spot randomisation)를 포함하는 친화도 개선 전략의 적용에도 불구하고, 항원에 대한 본질적 친화도는 낮게는 마이크로몰 범위로부터 높게는 나노몰 범위까지에 머무른다(Yau 등, (2005) J. Immunol. Methods, 291, 213-224).

<14> scFv는 숙주세포로부터 생산되고 회수될 때, 또는 환원성 세포 내 환경에서 세포 내 항체(intrabodies)로서 생산될 때, 고유의 불안정성 및 접힘 비효율성에 기인한 제한들을 갖는다(der Maur 등, (2002) J. Biol. Chem. 277, 45075-45085 참고). 반대로, 카멜리드 V_H 와 같은 V_H 영역들은 종래의 항체 단편들과 비교하여 높은 열역학적 안정성을 나타내고(Dumoulin 등, (2002) Protein Science, 11, 500-515), 비이온성 및 음이온성 계면활성제의 존재, 및 요소(urea)와 같은 가혹한 변성 조건 하에서 조차도 기능적 안정성을 보유하는데, 이는 가혹한 제조 환경으로부터 높은 수율로 기능적 항체 복합체를 회수하기 위한, 그리고 생체 내 및 생체 외 양쪽에서 생산물의 구조적 및 기능적 통합성을 유지하기 위한 중요한 특징들이다(Dolk 등, (2005) Applied and Environmental Microbiology, 71, 442-450). 또한 V_H 및 카멜리드화되거나 조작된 V_H 항체 영역들은 종래의 큰 항체 단편들보다 더 뛰어난 감염인자(infectious agent)의 표적 침투력의 잠재성을 보여주고(Stijlemans 등, (2004) J. Biol. Chem. 279, 1256-1261), "인트라바디(intrabody)"로 사용될 때, 배양에서 PK15 세포에 의한 돼지 레트로바이러스(porcine retrovirus)의 생산을 차단하는, 세포 내 구조적 및 기능적 안정성을 보유한다(Dekker 등, (2003) J. Virol. 77, 12132-12139).

<15> 또한, 카멜리드 V_H 항체는 수식된 CDR3 고리(loop)로 특징되어 진다. 이 CDR3 고리는 평균적으로 비-카멜리드 항체에서 발견되는 것보다 길고, 이는 카멜리드 중쇄만의 항체 종에서의 V_L 영역의 부재를 보상하는 것으로 보이는, 전체적 항원 친화도 및 특이성에 대해 주요한 영향을 미치는 것으로 여겨지는 특징이다(Desmyter 등, (1996) Nat. Struct. Biol., 3, 803-811; Riechmann과 Muyldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 23, 25-28).

<16> 최근에, 형질전환 포유동물에서 중쇄만의 항체의 생산 방법이 개발되었다(WO02/085945 및 WO02/085944). (인간을 포함하는) 어떠한 포유동물로부터 유래된, 잠재적인 어떠한 클래스(IgM, IgG, IgD, IgA 또는 IgE)의 작용성 중쇄만의 항체는 항원 투여(antigen challenge)의 결과로서 형질전환 포유동물(바람직하게는 마우스)로부터 생산될 수 있다.

<17> 중쇄만의 단일클론항체는 표준 클로닝 기술에 의해 비장의 B 세포로부터 회수되거나, 파아지 디스플레이 기술에 의해 B 세포 mRNA로부터 회수될 수 있다(Ward 등, (1989) Nature, 341, 544-546). 카멜리드 또는 형질전환 동물로부터 유래된 중쇄만의 항체는 높은 친화도를 가진다. 항원 노출의 결과로서 형질전환 마우스에서 생성되는 항체에 기초한 구조적 연구는 카멜리드화된 인간 V_H 항체 다양화가 VDJ 재조합 이벤트와 체세포성 돌연변이에 의존성을 갖는 생체 내 성숙 과정에 의하여 주로 이루어진다는 것을 보여준다. 그러나, 카멜리드 V_H 와는 달리, CD3 지역이 인간 D 및 J 지역으로부터 유래한 CDR3 고리는 카멜리드화된 인간 V_H 에는 존재하지 않는다(Janssens 등, (2006) PNAS 103 (41):15130-5. Epub 2006 Oct 2* 및 PCT/GB2005/002892 참고).

<18> 카멜리드 V_H 중쇄만의 항체 및 카멜리드화된 인간 V_H 중쇄만의 항체와 같은 중쇄만의 항체에서 발견되는 V_H 영역의 중요한 공통적인 특징은, 각 지역이 최적의 용해성과 결합 친화도를 위하여 V_L 지역과의 이합체화와 관계없이 모노머로서 결합한다는 것이다. 이러한 특징은 블로킹제와 조직 침투제의 생산에 특히 적합한 것으로 나타났다(리뷰를 위하여, Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) Nature Biotechnology 23, 1126-1136 참고).

<19> 그러나, 천연 항체 헌지 지역에 의하여 연결된 두 개의 V_H 영역이 이특이적 또는 2가의 구조물내에 결합 특성을 보유하는 것으로 나타났을지라도, 중쇄만의 항체에서 발견되는 V_H 영역의 이점은 여전히 시약, 치료제 및 진단시약으로서의 다합체성 단백질(multimeric proteins)의 디자인에 유용하게 사용되어야 한다(Conrath 등, (2001)

J. Biol. Chem. 276, 7346-7352).

<20> 이합체화 영역과 조합된 다중 결합 영역의 통합은, V_H 와 V_L 영역으로부터 조작(engineering)되어야 함으로 인해 특이성과 결합성(avidity)의 손실 가능성, 링커 펩티드(linker peptides)의 존재에 기인한 항원성의 증가된 위험, 및 V_H 결합 영역에 관한 고유한 안정성의 결핍을 갖는 scFv를 사용하는 대칭적 접근법들에 비해 명백한 이점을 가진다. 또한, T 세포 수용체 또는 상어 면역글로불린 패밀리와 같은 항체와 관련된 유전자 패밀리로부터 유래된 V_H 결합 영역은 이특이적 또는 다특이적 결합 분자의 생산을 위하여 scFv에 대한 대체물을 제공한다.

<21> 중쇄 C_{H2} 및 C_{H3} 불변영역의 존재는 천연 항체에서 나타나는 안정한 이합체화에 대한 기초를 제공하고, 중쇄 이펩티드 기능에 추가하여 번역 후 당화를 위한 인식 부위를 제공한다. $C_{H2}-C_{H3}$ 이합체화 영역은 아미노 말단 및 카르복시 말단에서 scFv 결합 영역을 운반하는 사합체성 단일특이적 동형이합체 또는 2가의 이특이적 동형이합체 (Jendreyko 등, (2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819) 또는 scFv 결합 영역과 수용체 결합 단백질의 조합물(Biburger 등, (2005) J. Mol. Biol. 346, 1299-1311)을 디자인하는데 사용되어 왔다. 또한, $C_{H2}-C_{H3}$ 영역은 중쇄만의 항체에서 발견되는 카멜리드화된 V_H 와 라마 V_{HH} 영역을 사용한 2가의 이특이적 동형이합체를 구성하는데 사용되어 왔다(PCT/GB2005/002892).

<22> 이용 가능한 scFv 결합 기술을 개량시키고, 구조적으로 안정한 가용성의 항원 특이적 1가, 2가 또는 다가 폴리펩티드 결합 복합체를 제공하는 기술이 요구된다. 이합체화 영역은, 예를 들어 IgG4 유래의 $C_{H2}-C_{H3}$ 와 같은 중쇄 이펩티드 기능이 결핍된 천연 또는 조작된 면역글로불린 $C_{H2}-C_{H3}$ 이합체화 영역을 포함할 수 있다(Bruggemann, M. 등, J. Ex. Med. (1987) 166, 1351-1361 참고). $C_{H2}-C_{H3}$ 와는 다른 이합체화 영역이 통합되는 것이 바람직하다. 결과의 폴리펩티드 결합 복합체는 생체 내로 투여되었을 때, 조직 침투성을 최대화하기 위하여 120kDa 분자량 미만이 바람직하다.

발명의 상세한 설명

<23> 발명의 개요

<24> 본 발명은 폴리펩티드 결합 복합체를 생산하기 위하여, scFv를 제외한 (본 발명에서 설명되는 것과 같은) VH 결합 영역 단독 또는 다른 결합 영역과 조합된 VH 결합 영역을 사용하는 방법을 제공한다.

<25> 본 발명에 따르면, 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이합체를 포함하고, 상기 각 중쇄는 (본 발명에서 정의되는) 아미노 말단 VH 결합 영역; (본 발명에서 정의되는) 카르복시 말단 VH 결합 영역; 및 바람직하게는 $C_{H2}-C_{H3}$ 이합체화 기능이 결여된 이합체화 영역을 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체가 제공된다.

<26> 본 발명에서 사용되는 용어 "VH 결합 영역"은 단일 V, D 및 J 유전자 단편들 사이의 재조합 및 연이은 체세포성 돌연변이에 의한 결과로서, 단독의 중쇄 유전자좌에 의해 발현되는 천연 VH 결합 영역들을 포함한다. 용어 "VH 결합 영역"은 상어, 카멜리드 및 인간을 포함하는 척추동물 유래의 어떠한 천연 발생 항원 결합 영역을 포함한다. 여기에서 VH 결합 영역은 카멜리드 또는 다른 천연 중쇄만의 항체로부터 얻으며, 이는 V_{HH} 영역으로 언급된다. 여기에서 VH 영역은 중쇄만의 항체와는 다른 항체로부터 얻거나 유래되며, 이는 V_H 영역으로 언급된다. "VH 결합 영역"은 그 특징들을 변화시키기 위하여 선택(selection) 또는 조작(engineering)을 통하여 변화된 V_H 또는 V_{HH} 영역들을 포함한다. 예를 들어, 특정 조건 또는 용해도 하에서 안정성이 변화될 수 있다. 또한, V_H 영역은 다른 종(species)의 V_H 또는 V_{HH} 영역과 더 유사하게 하기 위하여 선택 또는 조작을 통하여 변화될 수 있다. 예를 들어, 인간 V_H 영역의 V 지역은 카멜리드 V_{HH} 영역에서 발견되는 V 지역과 매우 유사하게 하기 위하여 변화될 수 있다. 또한, 용어 "VH 결합 영역"은 VH 영역으로서 기능할 수 있는 상동체(homologous), 유도체(derivatives) 또는 단백질 단편들, 예를 들어, VL 결합 영역을 포함한다. 이러한 모든 구체예들은 본 발명에 포함된다.

<27> 택일적으로, 폴리펩티드 결합 복합체는 제1 중쇄 및 제2 중쇄의 이합체를 포함할 수 있으며, 상기 각 중쇄는 헌지 영역에 의하여 분리되어 있는 일렬(tandem)로 배열된 하나 이상의 추가적인 아미노 말단 VH 결합 영역; 및 헌지 영역에 의하여 분리되어 있는 일렬로 배열된 하나 이상의 추가적인 카르복시 말단 VH 결합 영역을 포함한다.

<28> 치료제로 적용하기 위하여, 이합체화 영역은 인간 기원인 것이 바람직하고, 용도에 따라, 플라스마 안정성을 향상시키기 위하여 천연 당화 부위 또는 조작된 당화 부위를 포함하거나, 또는 플라스마 투명성을 향상시키거나 또는 표적 인식 및 결합을 향상시킬 목적으로 마스킹(masking)을 감소시키기 위하여 모든 번역 후 수식 부위들을 결실시킬 수 있다. 조직 침투성 또는 플라스마 투명성과 같은 생체 내 성능 기준이 요구되는 경우, 바람직하게는 전체적인 폴리펩티드 결합 복합체의 크기는 120kDa 이하여야 한다.

<29> VH 결합 영역들을 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체가 인트라바디로서 사용되는 경우(Dekker 등, (2003) J.Viro. 77, 12132-12139), 예를 들어, 핵 내 또는 세포막 위치를 결정하기 위하여 추가적으로 세포 내 신호 특성들이 통합될 수 있다(예를 들어, Jendreyo 등, (2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819 참고). 제조 목적을 위하여, 또한 최선의 생산 세포(예를 들어, 효모, 곤충 또는 포유동물 세포)로부터 어셈블리된 폴리펩티드 복합체의 합성 및 분비를 촉진시키기 위하여, 신호 웨프티드들을 벡터 내의 폴리펩티드 결합 복합체의 아미노 말단에 통합시킬 수 있다. 이합체화 영역은 동형이합체 또는 이형이합체일 수 있다.

<30> 하나의 구체예에 있어서, 제1 중쇄의 이합체화 영역은 제2 중쇄의 이합체화 영역과 상이하며, 이 경우 폴리펩티드 결합 복합체는 다른 폴리펩티드들(이형이합체)을 포함하는 이형이합체이다.

<31> 다른 구체예에 있어서, 제1 중쇄의 이합체화 영역은 제2 중쇄의 이합체화 영역과 동일하며, 이 경우 폴리펩티드 결합 복합체는 두 개의 동일한 폴리펩티드들(동형이합체)을 포함하는 동형이합체이다.

<32> 본 발명의 VH 영역들은 동일한 특이성을 나타낼 수 있거나, 다른 특이성을 나타낼 수도 있다. 폴리펩티드 결합 복합체가 4개의 VH 영역을 포함하는 경우, 4가의 단일특이성, 2가의 이특이성, 삼특이성(tri-specific) 또는 사특이성(tetra-specific)일 수 있다.

<33> 4개 이상의 VH 영역이 있는 경우, 폴리펩티드 결합 복합체는 추가적인 VH 영역들의 수에 따라 직선형으로 특이성 레벨이 증가하는 것으로 파악되었다. 예를 들어, 8개의 VH 영역을 가진 폴리펩티드 복합체는 8특이성(octa-specific)을 나타낸다.

<34> 신속한 투명성 또는 향상된 조직 침투성이 요구되는 경우, 바람직하게는 폴리펩티드 결합 복합체는 120kDa 미만의 크기이다.

<35> 다른 구체예에 있어서, 전부는 아닌 하나 이상의 VH 영역이 대체 클래스의 폴리펩티드 결합 영역에 의하여 치환될 수 있다. 바람직하게는, 상기 대체 결합 영역은 사이토카인, 성장 인자, 수용체 길항제 또는 작용제, 또는 리간드이다.

<36> 바람직하게는, 이합체화 영역 및/또는 하나 또는 양쪽 중쇄의 아미노 말단 또는 카르복시 말단 결합 영역들은 유연성 헌지 영역에 의해 분리되어 있다.

<37> 또한, 본 발명은 본 발명의 제1 중쇄, 제2 중쇄 또는 양쪽 중쇄를 코딩하는 분리된 핵산을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 나아가, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

<38> 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 상기 제1 중쇄, 제2 중쇄 또는 양쪽 중쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 생산을 위한 방법을 제공한다.

<39> 본 발명의 VH 결합 영역, 이합체화 영역 또는 링커 폴리펩티드는 웨프티드 화학 또는 화학적 콘쥬게이션과 같은 합성 경로로 생산될 수 있다. 폴리펩티드 결합 복합체는 생체 내에서 안정성을 향상시키기 위하여 PEG처리될 수 있다.

<40> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리펩티드 결합 복합체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 환자에게 본 발명의 약학적 조성물 또는 벡터를 투여하므로써 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

<41> 또한, 본 발명은 질병의 예방 또는 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명에 따른 폴리펩티드 결합 복합체의 사용을 제공한다.

<42> 또한, 본 발명은 진단시약, 시약, 항체효소(abzyme), 저해제, 세포화학시약, 조영제 또는 인트라바디로서 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체를 사용하는 것을 제공한다.

<43> 폴리펩티드 결합 복합체는 분자의 아미노 말단 및 카르복시 말단 양쪽에 VH 결합 영역들이 배치된 이합체화 영

역을 포함한다. 선택적으로, 이합체화 영역 및 VH 결합 영역은 유연성 폴리펩티드 링커에 의하여 분리되어 있다. 바람직한 구조는 4가의 단일특이적 폴리펩티드 VH 결합 복합체 및 2가의 이특이적 폴리펩티드 VH 결합 복합체를 포함한다(도 1 내지 도 5 참고).

<44> VH 결합 영역은 어떠한 척추동물로부터도 유래될 수 있지만, 바람직하게는 인간 기원이다. 그러한 VH 결합 영역은 카멜리드, 형질전환 동물 또는 상어와 같은 천연 기원으로부터 유래되거나, 파아지 또는 효모 VH 디스플레이 라이브러리와 같은 합성 라이브러리 어레이(synthetic library array)로부터 선별될 수 있다. VH 결합 영역은 용해도 및 안정성과 같은 물리적 특성을 향상시키기 위하여 조작되거나, 항원성을 회피하거나 감소시키기 위하여 인간화될 수 있다. VH의 정의는, 결합 부위가 사합체성 항체(H_2L_2)의 V_H 및 V_L 영역으로부터 조작되는 조작된 scFv 분자를 제외한, 면역글로불린 중쇄, 면역글로불린 경쇄, T-세포 수용체 또는 유사 분자로부터 유래된 어떠한 천연 폴리펩티드 결합 영역을 포함한다.

<45> 이합체화 영역은 천연 기원, 바람직하게는 인간으로부터 유래하는 동형이합체 또는 이형이합체를 포함하고, 이는 생리학적 조건 하에서 안정하다. 이합체화 영역은 자연적으로 추가적인 이펙터 기능이 통합되거나, 추가적인 이펙터 기능을 통합하기 위하여 조작될 수 있다. 이들은 번역 후 수식(인산화 및 당화)을 위한 부위, PEG화를 위한 부위, 효소 기능, 세포독성 기능 및 조영 기능, 면역 자극 기능 및 수용체 결합 기능을 위한 부위들을 포함할 수 있으며, 여기에 한정되는 것은 아니다.

<46> 또한, 본 발명은 본 발명의 VH 폴리펩티드 결합 복합체 및 이합체화 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터(들) 및 이러한 벡터(들)로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

<47> 또한, 의약의 제조에 있어서, 본 발명에 따른 폴리펩티드 결합 복합체의 사용이 제공된다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체는 조영제, 진단시약, 시약, 항체 효소 또는 저해제로서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 폴리펩티드 결합 복합체 및 약학적으로 적절한 캐리어를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체는 표적 세포에서 폴리펩티드 결합 복합체의 세포 내 합성을 이끌 수 있는 벡터로서 표적 세포로 전달되거나, 세포에 의한 수용 및 그에 이은 표적 세포 내에서의 세포 내 기능을 위한 단백질성 복합체로서 전달되는 인트라바디로서 사용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

<49> 본 발명의 발명자들은 형질전환 동물, 특히 마우스는 항원 노출에 대한 반응으로 플라스마(plasma) 또는 B 세포에 의하여 분비되는 클래스 특이적 중쇄만의 항체 또는 다른 클래스의 중쇄만의 항체들의 혼합물을 생산하기 위한 "마이크로 유전자좌(micro loci)"를 사용하여 생산될 수 있음을 이미 보고하였다(WO02/085945, WO02/085944 및 PCT/GB2005/002892 참고). 다음으로, 이러한 것들은 확립된 하이브리도마 기술을 사용하여 클래스 특이적 중쇄만의 항체의 안정된 공급을 제공하거나, 또는 작용성 카멜리드 V_{HH} 결합 영역 또는 VH 중쇄만의 결합 영역, 바람직하게는 인간 기원의 가용성 V_H 중쇄만의 결합 영역의 소스(source)로서 사용될 수 있다. 유사하게, 요구되는 특이성을 갖는 VH 결합 영역들은 파아지, 효모 또는 유사하게 구축된 디스플레이 라이브러리로부터 제공될 수 있다.

<50> 기능적 VH 영역은 항원 결합 특이성 및 친화도를 보유한 VH 결합 영역을 생산하기 위하여 세균 시스템에서 클로닝되고 발현될 수 있다. 더구나, VH 결합 영역은 이합체화 영역의 아미노 말단에 존재하는 카르복시 말단에 존재하는 기능성을 보유한다. 이러한 특징은 동형 이합체화 영역으로서 면역글로불린 중쇄 $C_{H2}-C_{H3}$ 이합체화 지역을 사용하여 2가의 이특이적 동형이합체 VH 결합 분자를 구축하기 위하여 사용되었다(PCT/GB2005/002892 참고).

<51> 종합하면, 이러한 관측은 기능적으로 안정하고, 가용성인 VH 영역의 사용을 통한, 항체의 향상되고, 간단한 조작을 위한 중요한 의미를 가진다. 4가의 단일특이적 VH 결합 복합체 또는 2가의 이특이적 VH 결합 복합체는 동형- 또는 이형이합체화 영역을 사용하여 어셈블리될 수 있고, 결합 영역(scFv)의 어려운 사전 조작의 필요성, 화학적 가교의 필요성 또는 미스매치된 결합 영역의 이종성 혼합물로부터 생산물을 분리하기 위한 필요성 없이, 배양 세포(예를 들어, 세균, 효모, 곤충, 식물 또는 포유동물 세포)를 사용하거나, 형질전환 생물(예를 들어, 포유동물, 곤충, 식물 등)에 의하여 발현되고 어셈블리될 수 있다.

<52> VH 영역은 scFv(28kDa) 또는 Fab(55kDa) 결합 영역에 비하여 작다(근사적으로 15kDa). 크기 차이와 중쇄 이펙터 기능의 존재 또는 부재는 생체 내에서 단백질 복합체의 약물역학 및 생체분포(biodistribution)에 영향을 주었다. 따라서, 빠른 조직 침투성 및 높은 표적 보유도를 나타내고, 약간의 또는 모든 이펙터 기능을 결하며, 혈류로부터 빠르게 분해되는 작은 가용성 폴리펩티드 결합 복합체가 미흡한 조직 침투성, 연관된 이펙터 기능, 및

연장된 혈청 반감기를 갖는 거대한 IgG 분자보다 어떤 임상적 조건에서는 보다 우수하다(상세한 리뷰를 위하여, Holliger, P. & Hudson, P. J. (2005) *Nature Biotechnology*, 23, 1126-1136 참고). 대부분의 천연 C_H2-C_H3 이합체화 영역의 사용은 VH 폴리펩티드 결합 복합체에 중쇄 이펙터 기능을 추가한다. IgG4 또는 대체 동형- 또는 이형이합체화 영역으로부터 유래된 C_H2-C_H3 영역의 사용은, 중쇄 이펙터 기능은 존재하지 않지만, 원하는 바에 따라 추가적인 원하는 기능적 특징이 통합된 상태에서, 조절된 방식으로 크기 제한의 조작이 가능하게 한다.

<53> 비공유성 상호작용을 요구하는, 구별되는 타입의 단백질-단백질 인터페이스를 통한 이합체 및 고차 올리고머를 형성하기 위한 단백질의 자가 회합(self association)은 많은 생물학적 기능을 촉진한다(Ofran, Y. & Rost, B. (2003) *J. Mol. Biol.*, 325, 377-387). 특이적 단백질 이합체화는 생물학적 기능, 구조 및 조절을 통합한다 (Marianayagam 등, (2004) *TIBS*, 29, 618-625 참고). 류신 지퍼(Leucine zippers)는 동형- 및 이형이합체를 형성할 수 있는 하나의 잘 알려진 대표적인 구조적 모티프(motif)이다(Landschulz 등, (1988) *Science*, 240, 1759-1764). C_H1 중쇄 영역 및 경쇄 불변영역은 안정한 이형이합체를 형성한다. TATA 결합 단백질과 같은 어떤 진핵성 전사 단백질의 카르복시 말단은 안정한 동형이합체를 형성한다(Coleman 등, (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 13842-13860). 수 많은 다른 이합체화 영역이 확인되었고, 특성화되었다(Brown, J.H. (2006) *Protein Science* 15, 1-13 참고). 전부는 아니지만, 몇몇 폴리펩티드 결합 복합체의 개발에 적합하다. 바람직한 이합체화 영역들은 인간 기원이고, 바람직하게는 특정된 조직에서 생산되며, 이들은 다양한 단백질 생산 시스템에서 제조되는 동안 상동성 오염체로서 존재하지 않을 것이다. 택일적으로, 천연 단백질로 존재할 때의 이합체화 영역은 핵성 또는 세포질성 위치를 가지므로, 내생적 단백질은 천연 세포내 막 결합 공정(natural intracellular membrane bound processes)을 사용하여 분비 경로를 통하여 분비되는 것으로 예정된 이합체화된 폴리펩티드 결합 단백질 생산물로부터 분리될 수 있다. 폴리펩티드 이합체의 회합/분리는 인산화에 의존적이지 않은 것이 바람직하다.

<54> VH 폴리펩티드 결합 복합체, 특히 인간 기원의 것은 농업, 환경 및 산업적 용도와 함께 의약, 조영제, 진단시약, 항체효소 및 시약으로서 의료 분야에서 광범위한 용도를 가진다.

중쇄만의 항체 및 이들의 단편

<56> 본 발명의 항원 특이적 VH 결합 영역은, 예를 들어, 상기 설명된 것과 같은 면역된 형질전환 동물의 항체 생산 세포로부터 분리된 mRNA로부터 클로닝될 수 있다. 또한, 클로닝된 VH 결합 영역 서열은 파아지 어레이(Ward 등, (1989) *Nature*, 341, 544-546) 또는 유사한 어레이 라이브러리, 예를 들어, 효모-기초 시스템(Boder와 Wittrup, (1997) *Nat. Biotechnol.*, 15, 553-7)을 사용하여 분리될 수 있다. 다음으로, 항원 특이적 VH 결합 영역은 계량화할 수 있는 세균, 효모 또는 대체 발현 시스템에서 단독으로 또는 융합 단백질로 제조될 수 있다. 또한, VH 결합 영역을 코딩하는 서열은 면역된 형질전환 마우스로부터 통상의 공정에 의하여 유래된 특징화된 하이브리도마로부터 클로닝될 수 있다. 다음으로, 이들은 항원 특이적 VH 결합 영역 및 이들의 유도체의 생산을 위하여 사용될 수 있다.

<57> 또는, VH 영역을 포함하는 단편은 효소적 또는 화학적 절단 기술 및 그에 이은 다른 절단 생산물로부터 VH 영역을 포함하는 단편의 분리를 이용하여 분리된 면역글로불린 중쇄, 형질전환 동물 또는 천연 기원(상어 및 카멜리드)으로부터 유래된 중쇄만의 항체로부터 생산될 수 있다(Jaton 등, (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195).

<58> VH 결합 영역이 특징화된 하이브리도마로부터 분리되는 경우, mRNA로부터 유래된 VH 결합 영역 서열은 선택된 VH 결합 영역의 친화도를 특정화하고 최적화하기 위한 파아지 및 다른 디스플레이 시스템을 사용하여, 필요한 추가적인 선별 단계로의 회귀 없이 발현벡터 내로 직접 클로닝될 수 있다.

<59> 중쇄 이합체화 및 이펙터 지역을 통합하는 VH 결합 영역의 생산 시스템은 포유동물 세포의 배양(예를 들어, B 세포 하이브리도마, CHO 세포), 식물(예를 들어, 옥수수), 형질전환 염소, 토끼, 소, 양 및 닭과 대량 생육 기술(mass rearing technology)에 적합한 유충을 포함한다. 바이러스 감염(예를 들어, 유충과 세포주에서의 바쿨로바이러스(baculovirus))을 포함하는 다른 생산 시스템들은 세포 배양 및 생식계열 접근을 위한 또 다른 방법이다. 또한, 다른 생산 방법들이 당업자에게 잘 알려져 있다. 카멜리드 중쇄만의 항체 또는 VH 결합 영역 단독 생산을 위한 적절한 방법은 당분야에서 공지되어 있다. 예를 들어, 카멜리드 VH 결합 영역은 세균성 시스템에서 생산되고, 카멜리드 중쇄만의 동형이합체는 하이브리도마 및 형질감염된 포유동물 세포에서 생산된다 (Reichmann과 Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38 참고).

<60> 또한, 파아지 디스플레이 기술을 사용하여 유도된, 조작된 인간 VH 결합 영역의 발현을 위한 방법들이 잘 알려져 있다(Tanha 등, (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 24774-24780 및 참고문헌 등).

<61> 형질전환 초파리로부터의 유충은 포유동물 세포에 의하여 생산된 기능성 중쇄만의 항체와 구별할 수 없는 특징을 가진 기능성 중쇄만의 항체 단편들을 생산한다는 것을 보여주었다(PCT/GB2003/0003319).

<62> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 VH 결합 영역 및 이합체화 영역(들)을 코딩하는 폴리펩티드 결합 단백질 또는 이들의 단편을 포함하는 벡터(들)을 제공한다.

<63> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

<64> 제1의 측면에서, 본 발명은 C_H2-C_H3 중쇄 이펙터 기능(들)을 결합한 이합체화 영역의 카르복시 말단 및 아미노 말단에 융합된 항원 특이적 VH 결합 영역들을 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체를 제공한다. 이러한 폴리펩티드 결합 복합체는 이합체화 영역에 원래 존재하거나, 조작되어 도입된 추가적인 표적화 또는 이펙터 기능과 조합된 항원 특이적 VH 결합 영역(들)에 의하여 부여되는 생리학적 기능을 보유한다. 그러한 폴리펩티드 결합 복합체는 기능적 단일특이적 사합체성 결합 복합체, 2가의 이특이적 결합 복합체 또는 사특이적 결합 복합체의 형태일 수 있다. VH 결합 영역은 결합 분자의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 존재한다(예를 들어, 도 1 참고). 이합체화 영역은 최종의 작용성 폴리펩티드 결합 복합체에 요구되는 디자인에 따라 동형이합체 또는 이형이합체일 수 있다.

<65> 이러한 배열의 이점은 수겹(several-fold)이다. 공동작동 방식으로 작용하는 2개 이상의 동등한 VH 영역들의 존재는 결합 분자에 단일의 VH보다 더 큰 친화도 및 결합성을 제공한다. 사합체성 VH 생산물(예를 들어, 의약)은 모노머성 또는 이합체성 VH 형태보다 더 큰 잠재능을 가지며, 단백질 동형이합체로서 어셈블리된 4가의 단일특이적 폴리펩티드 결합 복합체는 단일 생산물로서 미스매치된 오염 결합 서열이 없는 단일 클로닝된 유전자 서열로부터 생산될 수 있다. 2가의 이특이적 폴리펩티드 결합 복합체는 상이한 표적들의 가교를 촉진할 수 있으며, 각 항원에 대한 두 개의 VH 결합 영역의 유익한 공동작동 효과를 보유한다. 예를 들어, 이특이적 폴리펩티드 복합체는 세포-세포 상호작용 또는 세포-병원성 상호작용을 향상시키는데 이용될 수 있다. 본 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 복합체는, 예를 들어, 진핵생물 및 병원균과 같은 두 개의 세포 타입 간을 연결하기 위하여 이용될 수 있다(Taylor 등, (1991) PNAS 88, 3305-3309 참고). 이기능성(bifunctionality)은 효소 경로의 두 성분을 동시에 저해하는데 사용될 수 있다(Jendreyko 등, (2003) J. Biol. Chem. 278, 47812-47819).

<66> 이기능성은 이펙터 부분을 표적세포로 가까이 가져오는데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 각 영역의 아미노 말단에서의 VH 결합 영역은 동등하고, 카르복시 말단에서의 VH 결합 영역은 동등하여(그러나, 아미노 말단의 VH 결합 영역과는 다른 항원 또는 에피토프를 인식한다), VH 결합 영역 쌍의 공동작동적 결합을 촉진시킨다.

<67> 본 발명에서 사용되는 용어 '이펙터 부분(effectector moiety)'은 세포에서 원하는 생물학적 효과를 매개하는 어떠한 부분을 포함한다. 이펙터 부분은 바람직하게는 가용성이고, 웨პ티드, 폴리펩티드 또는 단백질일 수 있으며, 비펩티드성 구조일 수도 있다. 예를 들어, 이펙터 부분은 효소, 호르몬, 사이토카인, 드러그, 프로드러그, 톡신, 특히, 단백질성 톡신, 킬레이트 구조의 방사성핵종, 조영제. 알부민 또는 저해제일 수 있다. 이펙터 부분은 세포, 예를 들어, T 세포, 웨პ티드, 폴리펩티드 또는 단백질일 수 있거나, 비펩티드성 구조일 수도 있다. VH 결합 영역과 회합된 이펙터 부분은 원하는 효과에 따라 세포성, 단백질성, 천연의 유기물 또는 무기물일 수 있다.

<68> 알부민, 면역글로불린 또는 다른 혈청 단백질들은 항원 특이적 VH 결합 영역의 안정성 또는 약물역학 및/또는 약물동역학적 특성을 증가시키기 위한 이펙터 부분으로서 사용될 수 있다(Sung 등, (2003) J. Interferon Cytokine Res., 23 (1): 25-36: Harmsen 등, (2005) Vaccine, 23 (41) 4926-4934). 택일적으로, 이펙터 부분은 약물동역학적 특성을 향상시키기 위하여 PEG 처리된 구조이거나, 자연적으로 당화된 구조일 수 있다.

<69> **폴리펩티드 이합체화 영역**

<70> 또한, 본 발명자들은, 어떠한 폴리펩티드 결합 복합체의 특성은 최종적인 폴리펩티드 결합 복합체 내로 통합된 VH 결합 영역에만 의존하는 것은 아니라는 것을 인식하였다. 전체적인 복합체의 크기는 생체 내에서의 복합체의 약물역학 및 제조의 용이성에 크게 영향을 미친다. 더구나, 폴리펩티드 결합 복합체의 디자인에 따라, 이합체화 영역은 추가적인 이펙터 활성을 포함할 수 있다. 그러한 것으로서, 본 발명의 제2의 측면에서, 폴리펩티드 복합체는 조직 침투성을 우수하게 하기 위하여 크기가 제한되는 이합체화 영역을 포함한다. 본 발명의 제2의 측면은 이합체화 영역을 제공하고, 상기 이합체화 영역은 동형이합체 또는 이형이합체를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이합체화는 비공유성 상호작용을 통하여 이루어진다.

<71> 이합체화 영역은 이합체화 영역의 아미노 말단 및 카르복시 말단에서 VH 결합 영역에 공유적으로 연결된다.

<72> 선택적으로, 폴리펩티드 결합 복합체는 VH 결합 영역 및 이합체화 영역을 연결하는 천연 또는 조작된 유연성 힌지 유사 영역들을 포함한다. 힌지 지역의 존재는 결과의 폴리펩티드 결합 복합체 내의 VH 결합 영역의 독립적인 기능을 촉진시킨다.

<73> 선택적으로, 이합체화 영역은 다른 유용한 기능을 포함할 수 있으며, 당화 PEG화, 세포 표면 수용체 결합 또는 항체 또는 결합 단백질 인식을 위한 태그와 같은 추가적인 특징들을 통합하기 위하여 조작될 수 있다. 이합체화 영역은, 예를 들어, 추가적인 시스테인 잔기의 도입 또는 제거를 통하여 회합을 최적화하기 위하여 조작될 수 있다.

<74> 류신 지퍼와 같은 작은 이합체화 영역은 안정성을 향상시키기 위하여 모노머 또는 일렬의 쌍으로 존재할 수 있다. 추가적인 VH 영역은 일렬의 이합체화 영역들을 연결하기 위하여 사용될 수 있다.

<75> 바람직하게는, 이합체화 영역은 60kDa을 초과하지 않는 크기를 가지고, 폴리펩티드 결합 복합체의 크기는 조직 침투성을 향상시키기 위하여 약 120kDa이다.

<76> 바람직한 이합체화 영역은 천연 (인간) 단백질로부터의 작은 영역들을 포함한다. 이들 다수의 유전자 조절 단백질들에 존재하는 작은 30개의 아미노산 류신 지퍼 모티프를 포함한다(Landschulz 등, (1988) *Science*, 240, 1759-1764). 이러한 접근은 이특이적 $F(ab')_2$ 이형이합체의 생산을 위하여 이전에 사용되었다(Kostelny 등, (1992) *J. Immunology* 148, 1547-1553). 지퍼는 주어진 이형이합체화 개체(event)의 특이성을 증가시키기 위하여 조작될 수 있다(Loriaux 등, (1993) *PNAS* 90, 9046-9050).

<77> 본 발명의 제1의 측면 및 제2의 측면에 따른 이합체화 영역은, 제공되는 면역글로불린 중쇄 불변지역의 $C_{H2}-C_{H3}$ 지역, 면역글로불린 중쇄의 C_{H1} 영역 및 면역글로불린 경쇄의 불변지역간에 나타나는 것과 같은 동형- 또는 이형 이합체 단백질-단백질 상호작용, 또는 TATA 결합 단백질의 180개의 아미노산 카르복시 말단 영역의 동형이합체화(Colemen 등, (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13842-13849)를 형성할 수 있는 어떤 단백질, 웨პ티드 단면 또는 컨센서스 서열일 수 있고, 대체 예들로서 VCAM 및 VLA-4; 인테그린(integrins) 및 CD54 또는 CD102와 같은 세포 표면 분자; ALCAM; 류신 지퍼 이형이합체화 영역; 글루타치온 트랜스페라아제; 및 SRCR 영역들이 있다.

<78> 본 발명의 제1의 측면 및 제2의 측면에 따른 예시적인 폴리펩티드 결합 복합체는 세포화학적 표지, 표적 방법 또는 치료에 유용하다.

<79> 예를 들어:

<80> 1. 만약 아미노산 말단 항원-특이적 VH 결합 영역이 암 세포 표면 마커를 표적으로 한다면, 카르복시 말단 VH는 프로드러그 전환 효소를 포함하는 이펙터 부분에 결합할 수 있다. 아미노 말단 항원-특이적 VH 결합 영역이 상기 표적과 결합하고, 카르복시 말단 VH는 이펙터 부분을 표적에 밀접하게 접하게 하여, 이펙터 부분이 프로드러그(예를 들어, 니트로환원효소(nitroreductase) 또는 CB1954를 갖는 DT 디아포라아제(DT diaphorase))의 존재 하에 표적에 대한 생물학적 효과를 발휘할 수 있게 한다.

<81> 2. 만약 아미노 말단 및 카르복시 말단 VH 결합 영역들이 사이토카인(예를 들어, TNF α)을 표적으로 한다면, 공동작동적으로 작용하는 4개의 모든 결합 영역은 VH 모노머 또는 이합체 단독의 경우보다 더 큰 결합력과 친화도를 가지고 작용할 것이다. 택일적으로, 활성 복합체의 혈청 반감기를 향상시키기 위하여, 아미노 말단 VH 결합 영역은 사이토카인과 결합하고, 카르복시 영역은 혈청 알부민과 결합할 수 있다.

<82> 본 발명의 상기한 모든 측면에서 사용된 용어 '결합 영역'은 생리학적 배지에서 이펙터 활성을 갖는 어떤 폴리펩티드 결합 영역을 포함한다. 또한, 그러한 폴리펩티드 결합 영역은 생리학적 조건하에서 표적에 결합할 수 있는 능력을 가져야만 한다.

<83> VH 결합 영역은 카멜리드 VH 영역을 포함하거나, 비-카멜리드로부터 얻은 VH 영역을 포함할 수도 있다. 바람직하게는, VH 결합 영역은 인간 VH 결합 영역이다. VH 결합 영역은, VDJ 재배열 및 체세포 돌연변이를 통한 생체 내 항원 노출에 대한 반응에 따른 그들의 생성에 기인하여 더 높은 친화도를 가질 것이기 때문에, 합성 파아지라이브러리로부터 유래된 VH 영역과는 달리 (상기 설명된 것과 같은) 형질전환 동물 및 카멜리드로부터 유래된 B 세포 기원인 것이 바람직하다.

<84> 본 발명의 제3의 측면에 따르면, 일부 또는 모든 VH 결합 영역들은 대체 단백질 결합 영역들에 의하여 치환될 수 있다. 바람직하게는, 치환은 아미노 말단 또는 카르복시 말단의 어느 한쪽에서만 일어난다.

<85> 그러한 결합 영역은 세포 표면에의 결합 또는 부착을 중재할 수 있는 영역을 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드 복합체에서 사용될 수 있는 적절한 영역은, 조작된 단일쇄 Fv를 제외한, 포유동물, 원핵생물 및 바이러스 유래의 세포 부착 분자, 사이토카인, 성장인자, 수용체 길항제 또는 작용제, 리간드, 세포 표면 수용체, 조절인자, 구조적 단백질 및 웨პ티드, 혈청 단백질, 분비 단백질, 세포내막 회합 단백질(plasmalemma-associated proteins), 바이러스 항원, 세균 항원, 원생동물 항원, 기생충 항원, 지단백, 당단백, 호르몬, 신경전달물질, 응고인자 등이다.

<86> **폴리뉴클레오티드 서열, 벡터 및 숙주세포**

<87> 또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 어떠한 하나를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 하나 이상의 상기 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터 및 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체를 코딩하는 벡터 또는 벡터들로 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드는, 발현된 폴리펩티드 결합 복합체가 숙주세포가 성장하는 배지내로 동형- 또는 이형이합체로서 분비되게 하는 서열들을 포함한다.

<88> 나아가, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 동형- 또는 이형이합체 폴리펩티드 결합 복합체를 발현하는 형질 전환 생물을 제공한다. 형질전환 생물은 비-인간 척추동물 또는 포유동물, 식물 또는 곤충일 수 있다.

<89> 건강관리 적용을 위한 폴리펩티드 결합 복합체의 생산은, 예로서 상기에서 상세히 설명된 대량 제조 시스템들을 필요로 한다. 이러한 시스템은 식물(예를 들어, 옥수수), 형질전환 소 및 양, 및 닭, 또는 대량 생육 기술에 적절한 유충을 포함한다. 또한, 세포 배양에 대한 대체예로서 바이러스 감염(예를 들어, 유충 및 세포주 내의 바클로바이러스) 및 생식계열 접근을 포함하는 다른 생산 시스템들이 당업자에게 익숙할 것이다.

<90> 이러한 방법들 및 당 분야에서 공지된 다른 적절한 방법들은 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 생산을 위하여 사용될 수 있다. 동형이합체 및/또는 이형이합체의 생산은 이러한 방법들을 사용하여 달성될 수 있다.

<91> **본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 사용**

<92> 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체는 여러 용도에 적용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체는 단일특이적, 이특이적 및 다특이적 폴리펩티드 복합체를 포함한다. 이러한 복합체들은, 예를 들어, 질병의 치료, 예방 및 진단을 위한 치료제로서 특히 유익하다. 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체는 세포화학적 표지, 표적 방법, 치료 및 진단용으로 유용하다.

<93> 단일 항체 치료에 있어서, 예를 들어 단일 결합 부위의 손실을 이끄는 변이에 기인한 병원체 탈출(pathogen escape)은 항체의 치료적 효과를 없앨 것이다. 동일한 병원체 상의 상이한 항원들을 인식하는 2가의 이특이적 폴리펩티드 결합 복합체의 생산은 이러한 문제를 해결할 수 있다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체내의 다른 특이성들을 갖는 2개의 VH 결합 영역의 사용은 세포-세포 상호작용 및 세포-병원체 상호작용을 모두 향상시키기 위하여 사용될 수 있다.

<94> 본 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 복합체는, 예를 들어, 병원체 및 마크로파아지, 또는 암세포 및 T 세포와 같은 두 세포 타입 간의 폴리펩티드 복합체를 연결하기 위하여 이용될 수 있다. 또는, 폴리펩티드 복합체는 이합체화 영역 및 힌지 서열 내 또는 이들 사이에 삽입된 수용체 인식 영역에 의하여 제공되는 이펙터 기능을 갖는 동일한 병원체 상의 2 이상의 에피토프를 인식할 수 있다.

<95> 또는, 이특이적 폴리펩티드 결합 복합체는 생체 내에서 표적 세포 및 조직에 적용되어, 순환하는 이펙터 분자 또는 조영제를 포획하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 이특이적 암 표적제는 프로드러그 전환 복합체를 포획하여, 프로드러그를 국부적으로 반응제로 전환시키기 위하여 사용될 수 있다. 또한, 이펙터제와 조합된 이특이적 및 다특이적 결합 복합체는, 결합 영역들의 선택에 따라, 하나 이상의 병원체와 결합하여 이들을 파괴하기 위하여 사용될 수 있다. 또는, 동일한 병원체 상의 다른 항원들을 인식하는 2 이상의 결합 영역의 존재는 임상적인 이점을 제공하고, 병원체 내의 변이의 결과로서 병원체 탈출 및 드러그 과잉의 가능성을 감소시킨다.

<96> 본 발명의 제1의 측면은 VH 결합 영역 또는 이들의 단편, 및 일부의 또는 전부의 중쇄 이펙터 기능을 결한 천연의 또는 조작된 C_H2-C_H3 이합체화 영역들을 포함하는 이합체화 영역들을 제공한다. 본 발명의 제2의 측면에 따르면, 폴리펩티드 결합 복합체는 폴리펩티드 결합 복합체의 조직 침투력을 향상시키기 위하여 크기가 120kDa 보다 크지 않아야 한다. 본 발명의 제3의 측면에 따르면, 아미노 말단 또는 카르복시 말단 VH 결합 영역은 scFv를 제외한 대체 결합 영역들로 대체될 수 있다. 인간 서열들을 주로 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체는 인간에게 약학적으로 사용가능하므로, 본 발명은 임의의 힌지 지역을 통하여 이합체화 영역에 아미노 말단 및 카르복시 말단이 연결된 VH 결합 영역들을 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체의 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은

질병의 예방 및/또는 치료를 위한 의약의 제조에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 사용을 제공한다. 적절하다면, 폴리펩티드 결합 복합체 및 이펙터 부분들은 개별적으로 제제화되거나, 함께 제제화될 수 있다.

<97> 약학적 조성물 및 의약은 전형적으로 제제화되어, 환자에게 투여될 것이다.

<98> 예를 들어, 폴리펩티드 결합 복합체는, 특히, 만약 동결건조된다면, 안정화제와 혼합될 수 있다. 당(예를 들어, 만니톨, 수크로오스, 트레할로오스)의 첨가는 동결건조 동안 안정성을 제공하기 위한 전형적인 것이며, 바람직한 안정화제는 만니톨이다. 또한, 인간 혈청 알부민(바람직하게는, 재조합체)이 안정화제로서 첨가될 수 있다. 또한, 당의 혼합물, 예를 들어, 수크로오스와 만니톨, 트레할로오스와 만니톨 등이 사용될 수 있다.

<99> 완충액(buffer), 예를 들어 Tris 완충액, 히스티딘 완충액, 글리신 완충액 또는 바람직하게는 포스페이스 완충액(예를 들어, 소듐 디하이드로젠포스페이트 및 디소듐 하이드로젠포스페이트 함유)이 조성물에 첨가될 수 있다. 완충액의 첨가로, 바람직하게는 pH가 7.2 내지 7.8, 특히 약 7.5로 조정되는 것이 바람직하다.

<100> 동결건조 후 재구성하는 경우, 주사용 살균수가 사용될 수 있다. 또한, 동결건조된 케이크(cake)를 인간 혈청 알부민(바람직하게는, 재조합체)을 포함하는 수성 조성물로 재구성하는 것이 가능하다.

<101> 일반적으로, 폴리펩티드 결합 복합체는 정제된 형태로 약학적으로 적절한 캐리어와 함께 사용될 것이다.

<102> 그러므로, 본 발명은 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 환자의 치료를 위한 방법을 제공한다. 환자는 바람직하게는 인간이고, 소아(예를 들어, 유아(toddler) 또는 영아(infant)), 청소년 또는 성인일 수 있지만, 일반적으로 성인일 것이다.

<103> 또한, 본 발명은 의약으로서의 용도를 위한 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체를 제공한다.

<104> 또한, 본 발명은 환자를 치료하기 위한 의약의 제조에서 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 사용을 제공한다.

<105> 이러한 용도들, 방법들 및 의약들은 다음의 어느 하나의 질병 또는 장애의 치료 및 면역치료에 바람직하다: 창상치유(wound healing); 신생물(neoplasm), 흑색종(melanoma), 폐암, 대장암, 골육종, 직장암, 난소암, 육종, 자궁암, 식도암, 유방암, 췌장암, 방광암, 두경부암 및 다른 고형암을 포함하는 세포증식증(cell proliferative disorders); 백혈병(leukemia), 비호지킨림프종(non-Hodgkin lymphoma), 백혈구감소증(leukopenia), 혈소판감소증(thrombocytopenia), 혈관신생 질환(angiogenesis disorder), 카포시육종(Kaposi's sarcoma)과 같은 골수증식성 질환(myeloproliferative disorders); 알러지(allergy), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease), 관절염(arthritis), 건선(psoriasis) 및 호흡기 염증(respiratory tract inflammation), 천식(asthma), 면역질환(immunodisorders) 및 조직이식거부(organ transplant rejection)를 포함하는 자가면역/염증 질환(autoimmune/inflammatory disorders); 고혈압(hypertension), 부종(oedema), 협심증(angina), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 혈전증(thrombosis), 폐혈증(sepsis), 쇼크(shock), 재관류 손상(reperfusion injury) 및 허혈(ischemia)를 포함하는 심혈관 및 혈관 질환; 중추신경계 질환(central nervous system disease), 알츠하이머 질병(Alzheimer's disease), 뇌손상(brain injury), 근위축성 측상결화증(amyotrophic lateral sclerosis) 및 통증(pain)을 포함하는 신경학적 질환; 발달장애(developmental disorders); 당뇨병(diabetes mellitus), 골다공증(osteoporosis) 및 비만(obesity)을 포함하는 대사성 질환; AIDS 및 신장질환(renal disease); 바이러스 감염, 세균 감염, 진균 감염 및 기생충 감염을 포함하는 감염증;胎반(placenta)과 관련된 병리학적 증상 및 다른 병리학적 증상들.

<106> 또 다른 측면에서, 본 발명은 진단, 예방 또는 치료적 조영제로서 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 사용을 제공한다.

<107> 본 발명은 본 발명에서 설명된 것과 같은 세포 내 결합체 또는 항체효소로서 중쇄만의 항체 또는 이들의 단편의 사용을 제공한다. 바람직한 중쇄만의 항체 단편은 가용성 항원 특이적 VH 결합 영역들이다.

<108> 또한, 본 발명은 효소 저해제 또는 수용체 차단제로서 본 발명에 따른 VH 폴리펩티드 결합 복합체의 사용을 제공한다.

<109> 또한, 본 발명은 치료제, 조영제, 진단제, 항체효소 또는 시약으로서 사용하기 위한 VH 폴리펩티드 결합 복합체의 사용을 제공한다.

<110> 또한, 본 발명은 세포 내 결합체(인트라바디)로서 사용하기 위한 VH 폴리펩티드 결합 복합체를 제공하고, VH 폴리펩티드 결합 복합체를 포함하는 인트라바디의 세포 내 발현을 위해 표적 세포에서 기능하는 벡터를 제공한다.

실시예

실시예 1

4가의 단일특이적 항-TNF α 폴리펩티드 결합 단백질

TNF α 에 노출된 형질전환 동물에서 중쇄만의 IgM을 생산하는, 미리 특성화되어 있는 단일클론항체로부터 구조물을 얻었다. VH 영역은 카멜리드 V 단편 및 인간 DJ 및 불변지역을 포함하였다.

항체의 CH2-CH3 골격을 결실시키고, CH1 면역글로불린 중쇄 영역 및 면역글로불린 경쇄 불변영역으로 대체시켰다. 다음으로, VH 영역을 복사하고, 수식된 힌지 영역을 사용하여 각 구조물의 카르복시 말단에서 클로닝하였다. 상기 힌지는 실제하는 IgG2 힌지 서열과 유사하지만, 항체 이합체에서 시스테인의 가교를 차단하기 위하여 시스테인을 프롤린으로 대체하고, 제2의 항체의 기능을 저해할 수 있는 제2의 항체의 공간적 격리를 막기 위하여 프롤린을 통한 추가적인 유연성을 제공하므로써 변화되었다.

따라서, 인간 IgG2 힌지에 정상적으로 존재하는 이황화 가교의 형성을 시스테인(회색)을 프롤린(밀줄)으로 대체 시키므로써 차단되었다. 프롤린은 힌지에 추가적인 유연성을 부여하여, 힌지를 통한 이합체화 영역의 COOH 말단에 연결된 제2의 항체 영역에 적절한 기능성을 부여한다.

정상 IgG 힌지 서열(시스테인 코돈은 희색, 프롤린 코돈은 밀줄) GAGCGAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCCA (서열 번호:1)과 그것의 상보성 서열을 AGCTTCTGAGCGCAAACCCACAGTCGAGCCACCACCGCCACAC (서열번호:2) 및 그것의 상보성 서열 TCGAGTGGTGGCGGGTGGCTCGACTGGTGGTTGCGCTCAGA (서열번호:3)로 대체시켰다. 또한, 이것은 클로닝 목적으로 HindIII(굵은체) 및 Xho I(이탈릭체) 부위와 양립가능한 두 단일쇄 말단을 가진 단편(흰색 박스 힌지, 도 2의 가운데 부분)을 제공한다.

표준 재조합 DNA 기술로 닦 액틴 프로모터(chicken actin promoter) 및 CMV 인핸서 서열(도 22, 발현 플라스미드)을 포함하는 bluescript(Pbluescript II sk+) 발현 플라스미드 내로 라이케이션하여, 최종 구조물을 얻었다.

디아바디 발현 플라스미드를 증식시키고, 표준 방식(Superfect)을 사용하여 CHO 세포 내로 (형질감염된 세포의 선별을 가능하게 하기 위하여) 플라스미드 pGK-hyg로 동시에 형질감염시켰다. 하이그로마이신을 함유하는 배지에서 양성 클론들을 선별하고, 이들에 대해 CHO 세포에 의하여 분비된 디아바디를 함유하는 성장 배지를 이용한 표준 TNF α ELISA를 수행하여 디아바디를 발현하는 것으로 양성 확인하였다. 플라스미드로부터 발현된 단백질이 모노머와 비교되는 이합체임을 확인하기 위하여, 비활원 및 활원 조건 하에서 이러한 ELISA 선별 클론들의 웨스턴 블랏팅을 수행하였다. ELISA 및 웨스턴 블랏팅의 결과, 디아바디는 형질전환된 CHO 세포에 의하여 이합체로 발현되어 배지 내로 분비되고, 그 항체는 TNF α 에 결합할 수 있음을 확인하였다. TNF α VH 모노머, -이합체 및 -사합체의 결합 친화도의 비교에서 사합체가 최대 결합 친화도를 보여주었다.

실시예 2

IgG4 유래의 중쇄 이펙터 기능을 결합 VH 결합 영역 및 CH2-CH3 이합체화 영역을 포함하는 이특이적 2가의 폴리펩티드 결합 복합체

이합체화 영역의 아미노 말단에서 대장균 HSP70 단백질에 대응하여 나타난 카멜리드 인간 VH 영역들, 및 카르복시 말단에서 PERV gag 항원(Dekker 등, (2003) J. Virol. 77, (22) 12132-9)에 대응하여 나타난 라마 VHH 영역을 사용하여 실험을 수행하였다. 상세한 실험 방법은 IgG2 CH2-CH3 이합체화 영역을 인간 IgG4 CH2-CH3 이합체화 영역으로 대체(Bruggemann, M. 등, (1987) J. Ex. Med., 166, 1351-1361)한 것을 제외하고는, PCT/GB2005/002892의 실시예 2, 도 22, 23 및 24에서 설명된 것과 같다.

폴리펩티드 결합 복합체를 포함하는 벡터를 CHO 세포에서 발현시키고, 분비된 폴리펩티드 결합 복합체가 HSP70 및 gag 항원 양쪽에 결합한다는 것을 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다.

실시예 3~5

면역글로불린 불변 지역 대신에, 다른 이합체화 영역, 예를 들어, 다른 (인간) VH 영역들과 조합된 jun 및 fos 유전자의 류신 지퍼 영역을 사용하여 다가의 다특이적 결합 분자를 생산할 수 있다.

jun 지퍼 영역은 fos 지퍼 영역과 이형이합체화 될 수 있으며, 또한 동형이합체화 될 수도 있다. 아래의 두 실시예는 이러한 지퍼 영역들을 사용한 이형- 및 동형이합체화를 설명한다. 마지막 실시예는 다른 영역들의 사용을 설명한다.

<171> 실시예 3

<172> *fos* 및 *jun* 지퍼 영역들을 사용한 이합체화된 이특이적 2가의 결합 분자

<173> 이러한 분자들의 생산을 위한 기본 전략을 도 6에 설명하였고, 이는 다음의 단계들로 구성된다:

<174> 1. rTTA (Janssens 등, 2006)에 대하여 개발된 VH를, 5' 측이 EcoR I 부위를 가지고(프라이머 1), 리더 서열과 상동성이며, 3' 측이 힌지 지역 및 *fos*와 *jun* 서열의 5' 말단에 대한 상동 서열(각각 프라이머 2 및 3)에 상동 성인 프라이머들을 사용하여 PCR로 증폭시켰다. 표준 PCR의 결과, *fos*에 대한 단편 A(도 6의 직선) 또는 600bp의 *fos*(도 7의 점선)를 얻었다.

<175> 프라이머 1: CTGGAATTCTCACCATGGAGCTGGGCTGAGC (서열번호:4)

<176> 프라이머 2: CGCTTGGAGTGTATCAGTCAGTGGGCACCTTGGGCACGGGG (서열번호:5)

<177> 프라이머 3: CAGCCGGCGATTCTCTCCAGTGGCACCTTGGGCACGGGG (서열번호:6)

<178> 2. *fos* 및 *jun* 류신 지퍼 지역을 *fos* 또는 *jun*을 코딩하는 인간 cDNA로부터 증폭시켰다. 프라이머들은 5' 말단에서 rTTA VH의 힌지 지역의 3' 말단과 상동성이 있는 서열을 포함하였다(각각 프라이머 4 및 5). 프라이머들은 3' 말단에서 지퍼 지역의 3' 말단과 상동성이 있고(프라이머 6 및 7), A5 VH(Janssens 등, 2006)의 5' 말단에 존재하는 힌지 지역 (PCT/GB2005/002892)의 5' 말단과 상동성이 있는 서열을 3' 말단에 포함하였다. *fos* 및 *jun* 서열의 증폭으로, 각각 200bp의 단편 B(도 6의 직선) 및 단편 C(도 6의 점선)를 얻었다.

<179> 프라이머 4: CCCCCGTGCCAAGGTGCCACTGACTGATACACTCCAAGCG (서열번호:7)

<180> 프라이머 5: CCCCCGTGCCAAGGTGCCACTGGAGAGAAATGCCCGCTG (서열번호:8)

<181> 프라이머 6: TGGTGGTTGCGCTCAGAAGCCAGGATGAACCTAGTTTTC (서열번호:9)

<182> 프라이머 7: TGGTGGTTGCGCTCAGAAGCAACGTGGTCATGACTTCTG (서열번호:10)

<183> 3. 어떤 시스테인도 함유하지 않은 힌지 서열을 A5 VH 지역(Dekker 등, 2003; Janssens 등, 2006)상에 먼저 클로닝하였다(PCT/GB2005/002892에서 특정화된 것으로 ERKPPVEPPPPP). 힌지 지역의 5' 말단과 상동성이 있는 프라이머 및 정지 코돈을 포함하는 A5 VH 지역의 3' 말단과 상동성이 있는 프라이머를 사용하여 힌지 및 A5 VH를 순차적으로 증폭시켜, 400bp의 *fos*(도 6의 직선) 또는 *jun*(도 6의 점선)에 대한 단편 D를 얻었다.

<184> 프라이머 8: GAAAAACTAGAGTTCATCCTGGCTCTGAGCGCAAACCAACCA (서열번호:11)

<185> 프라이머 9: CAGAAAGTCATGAACCACGTTGCTCTGAGCGCAAACCAACCA (서열번호:12)

<186> 프라이머 10: GTCGAATTCTCATTCCGAGGAGACGGTGACCTGGTC (서열번호:13)

<187> 4. 단편 A(도 6의 직선), B 및 D(도 6의 점선)를 동일한 몰수로 혼합하고, 단편 A(도 6의 점선), C 및 D(도 6의 점선)를 동일한 몰수로 혼합하여, 변성시키고, 프라이머 1 및 10을 사용하여 PCR 증폭시켜, 1,200bp의 단편을 얻었다(도 7 아래, A5 서열의 5'에 특징적인 *Xho* I 부위를 포함하는 rTTA-fos-A5).<188> 5. rTTA-foszip-A5 및 rTTA-junzip-A5를 표준화된 방법을 사용하여 효모(*Pichia*, Invitrogen) 또는 표준 CHO 발현 벡터내로 (CAG 프로모터 및 폴리 A 부위 사이로) 클로닝하였다. 이러한 구조물을 효모 및 CHO 세포 각각에 도입하였다.

<189> 6. 배지와 세포를 수거하고, ELISA로 분석하여, 여전히 rTTA 및 A5에 결합하는 것을 보여주었고, 웨스턴 블랏팅으로 분석하여, 이합체화되어 있다는 것을 확인하였다.

<190> 실시예 4

<191> 본 실시예에서는, 단지 *jun* 지퍼 부분의 실험만이 수행되었다는 점을 제외하고는, 실시예 3에서 나타낸 것과 동일한 방법으로 이합체화를 보여준다. rTTA-junzip-A5를 *Pichia* 또는 CHO 세포에서 발현시켜, 실시예 2에서와 같은 방법으로 rTTA 및 A5 결합 동형이합체를 형성함을 보여주었다.

<192> 실시예 5

<193> 실시예 3 및 4에서 설명된 것과 유사한 방법을 다른 동형- 또는 이형이합체 형성 영역들에 적용할 수 있다. 그러한 경우를 위하여, 실시예 2의 단계 2에서 사용된 프라이머는 그러한 다른 이합체화 영역들에 상동성일 수 있

고, 단계 1 및 3에서 사용된 올리고뉴클레오티드들은 단계 4를 가능하게 하기 위하여 이들 영역들과 중첩하는 말단을 가질 수 있다.

<194> 모든 실시예에서, 다른 VH 또는 VL 영역 또는 전사 인자 DNA 결합 영역 또는 리간드 결합 영역과 같은 다른 결합 영역들을 사용할 수 있다.

<195> 상기 본 발명의 명세서에서 설명된 모든 문현은 참고문현으로 본원에 통합된다.

<196> 본 발명의 범위 및 사상을 벗어남이 없이, 본 발명의 설명된 방법과 시스템의 여러 가지 수식 및 변형은 당업자에서는 명백할 것이다. 본 발명이 특정된 바람직한 구체예를 통하여 설명되었지만, 본 발명이 청구하는 바는 이러한 구체예에 한정되지 않는다는 것을 이해하여야 한다. 나아가, 생화학, 분자생물학 또는 관련분야의 당업자에게 명백한, 본 발명을 수행하기 위하여 설명된 방법의 여러 가지 변형들은 다음의 특허청구범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

도면의 간단한 설명

<111> 도 1은 VH 폴리펩티드 결합 영역, 헌지 또는 링커 서열로 연결된 동형 이합체화 영역들을 포함하는 폴리펩티드 결합 복합체를 나타낸다. VH 폴리펩티드 영역은 이합체화 영역들의 아미노 말단 및 카르복시 말단에 위치된다.

<112> A는 4가의 단일특이적 폴리펩티드 결합 영역을 나타낸다.

<113> B는 2가의 이특이적 폴리펩티드 결합 영역을 나타낸다.

<114> C는 1가의 사특이적 폴리펩티드 결합 영역을 나타낸다.

<115> 도 2는 이형 이합체화 결합 영역의 다른 구조를 나타낸다.

<116> 도 3은 4가의 단일특이적 폴리펩티드 결합 복합체의 생성을 위한 전략을 나타낸다.

<117> 도 4는 GAG 및 HSP에 대한 결합 친화도를 갖는 이특이적 2가의 폴리펩티드 결합 복합체의 생성을 위한 전략을 나타낸다.

<118> 도 5는 하나 이상의 아미노 말단 및 카르복시 말단 VH 영역을 포함하는 이특이적 4가의 항체의 예를 나타낸다.

<119> 도 6은 *fos* 및 *jun* 지폐 영역을 사용한 이형이합체화된 이특이적 2가의 결합 분자를 생성하기 위한 개요도를 나타낸다.

<120> 도 7은 PCR 결과이다.

일반적 기술

<122> 다르게 정의가 되지 않는다면, 여기에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 당업자들에 의해 통상적으로 이해되는 바와 같은 동일한 의미를 갖는다(예를 들어, 세포 배양, 분자유전학, 핵산화학, 잡종형성기술 및 생화학에서 사용되는 의미). 표준 기술은 분자학적, 유전학적 및 생화학적 방법들(Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.(1989) Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 및 Ausubel 등, Short Protocols in Molecular Biology(1999) 4th Ed., John Wiley & Sons, Inc.)과 화학적 방법들을 사용하였다. 추가적으로, Harlow & Lane, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.를 표준면역학적 기술로서 참고하였다.

<123> 어떤 적당한 재조합 DNA 기술들이 본 발명의 2가와 다가의 폴리펩티드 복합체, 단일 중쇄 항체 및 이들의 단편의 생산에 사용될 수 있다. 플라스미드와 같은 전형적인 발현 벡터는 폴리펩티드 복합체 또는 항체의 쇄 각각을 코딩하는 DNA 서열을 포함하여 구성된다. 면역글로불린의 효소적 절단 및 화학적 절단과, 결과적으로 얻은 단편들의 분리를 위한 어떤 적절한 확립된 기술들이 사용될 수 있다. 카멜리드 및 형질전환 마우스로부터 유래된 과아지 디스플레이 라이브리리 및 하이브리도마로부터의 항원 특이적 VH 폴리펩티드 결합 영역의 확인, 분리 및 특성화를 위해 잘 알려진 방법들을 사용할 수 있다.

<124> 또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 구성 및 발현을 위한 구조물을 포함하는 벡터를 제공한다.

<125> 단일 벡터는 더 많은 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 DNA 서열들을 포함하여 구성될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들면, 회합된 VH 결합 영역들을 갖는 이형 이합체의 두 개의 상이한 폴리펩티드 쇄들을 코딩하는 DNA 서열

들은 동일한 플라스미드상의 상이한 위치에 삽입될 수 있다.

<126> 택일적으로, 각각의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 DNA 서열은 플라스미드 내에 개별적으로 삽입되어, 구성된 다수의 플라스미드를 생성할 수 있고, 각각은 특별한 폴리펩티드 쇄를 코딩한다. 바람직하게는, 서열들이 삽입되는 플라스미드들이 양립가능하다.

<127> 다음으로, 각각의 플라스미드는 숙주세포를 형질전환시키기 위해 사용되어, 각각의 숙주세포는 폴리펩티드 복합체 내의 각각의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 DNA 서열들을 포함한다.

<128> 박테리아 시스템에서 클로닝을 위해 사용될 수 있는 적당한 발현벡터는 Col E1, pcR1, pBR322, pACYC184 및 RP4와 같은 플라스미드들, 과아지 DNA 또는 이들 중 어느 것의 유도체들을 포함한다.

<129> 효모 시스템에서 클로닝하는데 사용되기 위하여, 적절한 발현벡터는 2 마이크론 오리진(2 micron origin)에 기초한 플라스미드들을 포함한다.

<130> 적절한 포유동물 유전자 프로모터 서열을 포함하는 어떤 플라스미드는 포유동물 시스템에서 클로닝에 사용될 수 있다. 곤충 또는 바클로 바이러스 프로모터 서열은 곤충세포 유전자 발현을 위해 사용될 수 있다. 이러한 벡터들은, 예를 들면, pBR322, 소과의 유두종 바이러스, 레트로바이러스, DNA 바이러스 및 우두 바이러스로부터 유래된 플라스미드들을 포함한다.

<131> 폴리펩티드 복합체 또는 항체의 발현을 위해 사용될 수 있는 적절한 숙주세포는 박테리아, 효모, 및 곤충 또는 포유동물 세포주와 같은 진핵세포, 형질전환 식물, 곤충, 포유동물 및 다른 무척추동물 또는 척추동물 발현 시스템을 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체

<133> 본 발명에서 용어 '폴리펩티드 결합 복합체'는 어떤 소스, 예를 들면, 관련된 세포성 상동체, 다른 종 유래의 상동체, 및 이들의 변이체 또는 유도체들로부터 얻어지는 상동성 폴리펩티드와 핵산 서열들을 포함한다.

<134> 따라서, 본 발명은 여기에서 설명된 바와 같은 폴리펩티드 결합 복합체, VH 결합 영역 및 이합체화 영역의 변이체, 상동체 또는 유도체들을 포함한다.

<135> 본 발명에서, 상동 서열은 적어도 30, 바람직하게는 50, 70, 90 또는 100 아미노산을 넘는 아미노산 수준에서, 적어도 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9% 동일성, 바람직하게는 적어도 98% 또는 99% 동일성이 있는 아미노산 서열을 포함하도록 취해진다. 또한, 비록 상동성이 유사성의 관점(즉, 유사한 화학적 성질/기능을 갖는 아미노산 잔기)에서 고려되지만, 본 발명에서는, 서열 동일성의 관점으로 상동성을 표현하는 것이 바람직하다.

<136> 또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체, 이합체화 영역 및 VH 결합 영역의 제조시에 사용하기 위한 구성된 발현 벡터와 형질전환된 숙주세포를 포함한다.

<137> 동일한 숙주세포 내에서 각각의 쇄의 발현 후, 이들은 완전한 폴리펩티드 결합 복합체 또는 활성 형태의 VH를 제공하도록 회수될 수 있다.

<138> 본 발명의 바람직한 형태에서, 개별적인 폴리펩티드 결합 복합체는 숙주세포에 의해 처리되어, 상기 숙주세포로부터 유리하게 분비되는 이합체화된 폴리펩티드 결합 복합체를 형성할 것이다.

<139> 재조합 항체 폴리펩티드 결합 복합체의 제조를 위한 기술은, 상기한 참고문헌에 설명되어 있고, 또한, 예를 들어 EP-A-0 623 679; EP-A-0 368 684 및 EP-A-0 436 597에 설명되어 있다.

본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 사용

<141> 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체 및 이들의 단편들은, 생체 내 치료 용도 및 예방 용도, 시험관 내와 생체 내에서의 진단 용도, 시험관 내 검정 및 시약 용도 등에 이용될 수 있다.

<142> 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 치료 및 예방을 위한 사용은, 인간과 같은 수령(recipient) 포유동물에 이들을 투여하는 것을 포함한다.

<143> 적어도 90~95% 상동성을 갖는 실질적으로 순수한 폴리펩티드 결합 복합체 및 이들의 단편들은 포유동물에 투여하기에 바람직하고, 98~99% 이상의 상동성을 갖는 것들은 약학적 사용, 특히 포유동물이 인간일 때 가장 바람직하다. 목표하는 수준으로 부분적으로 또는 균질하게 일단 정제된, 여기에서 설명된 바의 폴리펩티드 결합 복합체

체는 (여분의 유형을 포함하는) 진단 또는 치료 용도로 사용될 수 있고, 또는 당업자에게 공지된 방법을 사용하는 검정 과정을 개발하고 수행하는데 사용될 수 있다.

<144> 일반적으로, 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체는 약학적으로 적절한 캐리어들과 함께 정제된 형태로서 이용가능하다. 전형적으로, 이들 캐리어는 염수 및/또는 완충 배지를 포함할 수 있는 수성 또는 알코올/수성 용액, 에멀젼 또는 혼탁액을 포함한다. 비경구적 운반체는 염화나트륨용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스 및 염화나트륨 및 젖산화 링거를 포함한다.

<145> 혼탁액 내에서 폴리펩티드 복합체를 유지하는 것이 필요하다면, 적당한 생리학적으로 허용가능한 보조제들이 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴 및 알기네이트와 같은 중점제들로부터 선택될 수 있다.

<146> 정맥용 운반체는 링거 텍스트로오스에 기초를 둔 것들과 같은 유체와 영양보충제 및 전해질 보충제들을 포함한다. 또한, 항미생물제, 산화방지제, 퀼레이팅제 및 불활성 기체와 같은 보존제 및 다른 첨가제들도 존재할 수 있다(Mack(1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

<147> 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체 및 이들의 단편들은 개별적으로 투여되는 조성물로서 또는 다른 약제들과 함께 사용가능하다. 이들은 시클로스포린, 메토트렉세이트, 아드리아마이신, 시스플라티늄 또는 이뮤노톡신과 같은 여러 가지의 면역치료용 약제를 포함할 수 있다. 택일적으로, 폴리펩티드 결합 복합체는 그들의 작용 부위에서의 프로드러그의 전환을 위한 효소들과 함께 사용될 수 있다.

<148> 약학적 조성물은 본 발명의 선별된 폴리펩티드 결합 복합체 또는 본 발명의 선별된 폴리펩티드 결합 복합체의 조합물과 결합한 여러 가지의 세포독성제 또는 다른 제제와의 "칵테일"을 포함할 수 있다.

<149> 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 당업자에게 통상적으로 공지된 것 중의 어느 것일 수 있다. 제한 없이, 면역치료를 포함하는, 치료를 위한 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체는 표준기술에 따라서 어떤 환자에게 투여될 수 있다. 투여는 비경구, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 경피, 폐 경로 또는 적절한 카테터로 직접 투여하는 것을 포함하는 어떤 적절한 방법에 의해 이루어질 수 있다. 투여량과 빈도는 환자의 나이, 성별 및 상태, 다른 약제의 동시 투여, 카운터-인디케이션(counter-indication) 및 의사에 의해 고려될 수 있는 다른 변수들에 따라 달라질 수 있다.

<150> 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체는 저장을 위해 동결건조될 수 있고, 사용하기 전에 적당한 캐리어 내에서 재구성될 수 있다. 공지된 동결건조 및 재구성 기술이 적용될 수 있다. 동결건조 및 재구성은 다양한 정도의 기능 활성도 손실을 초래할 수 있고, 이를 보상하도록 사용수준이 상향 조절되어야 한다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

<151> 인트라바디로서 사용될 때, 폴리펩티드 결합 복합체는 비-바이러스 또는 바이러스 기원의 백터를 사용하여 전달될 수 있거나, 리포좀성 또는 택일적인 제형으로서 전달될 수 있고, 이로써 원하는 표적 세포 내로 주입되게 된다.

<152> 추가적으로, 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체는 진단목적으로 사용가능하다. 예를 들면, 여기에서 설명된 바의 VH 결합 영역은 질병상태 동안 특이적으로 발현되거나, 또는 질병상태 동안에 그 수준이 변화하는 항원에 대항하여 생성 또는 발생할 수 있다. 진단 또는 시약으로서의 목적을 위하여, 폴리펩티드 결합 복합체는 동일한 항원 상의 하나 이상의 에피토프에 결합하는 VH 영역을 포함할 수 있고, 택일적으로 하나 이상의 결합 영역은 폴리펩티드 복합체가 특정된 기질에 결합하게 하거나, 정성적 또는 정량적 측면의 검정 판독에 요구되는 검정 성분에 결합하게 하는 포획 영역(capture domains)으로서 작용할 수 있다.

<153> 진단 또는 추적 목적과 같은 특정한 목적을 위하여, 표지가 첨가될 수 있다. 적절한 표지는 제한되지는 않지만, 다음 중의 어떤 것을 포함한다: 방사성 표지, NMR 스핀 표지 및 형광 표지. 표지의 검출 방법은 당업자들에게는 익숙할 것이다.

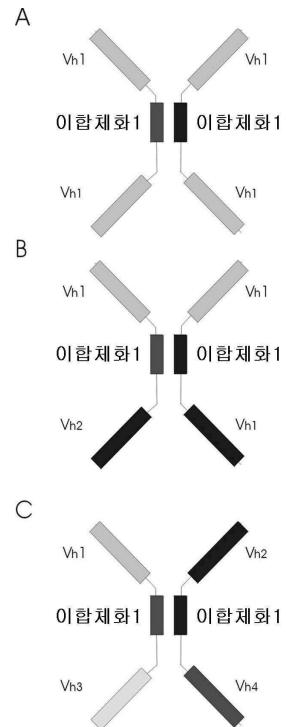
<154> 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체 또는 이들의 칵테일을 포함하는 조성물은 예방 및/또는 치료적 처치를 위해 투여될 수 있다.

<155> 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 결합 복합체를 포함하는 조성물은 포유동물에서 선택 표적 세포 집단의 변화, 불활성화, 사멸 또는 제거를 도와주기 위한 예방과 치료 세팅에 이용될 수 있다. 추가적으로, 여기에서 설명된 폴리펩티드 결합 복합체의 선택된 레퍼토리들은 세포의 이종 집단으로부터 표적 세포 집단을 죽이거나, 고갈시키거나, 또는 그렇지 않으면 효과적으로 제거시키기 위해 생체 외 또는 시험관 내에서 선택적으로 사용될

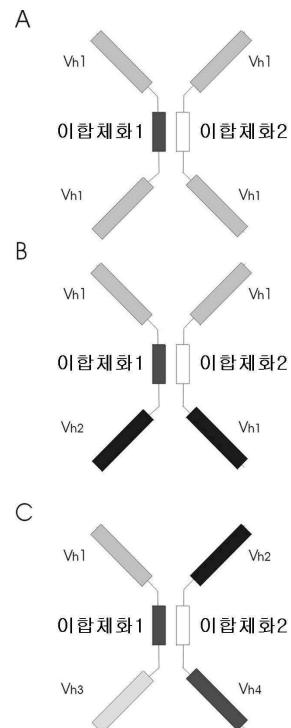
수 있다.

도면

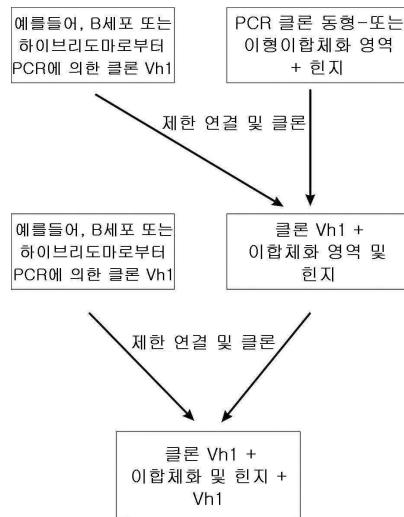
도면1



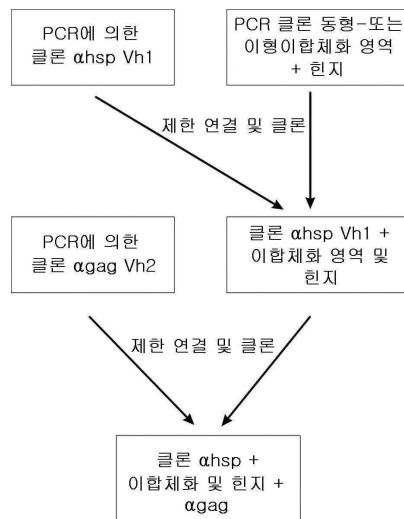
도면2



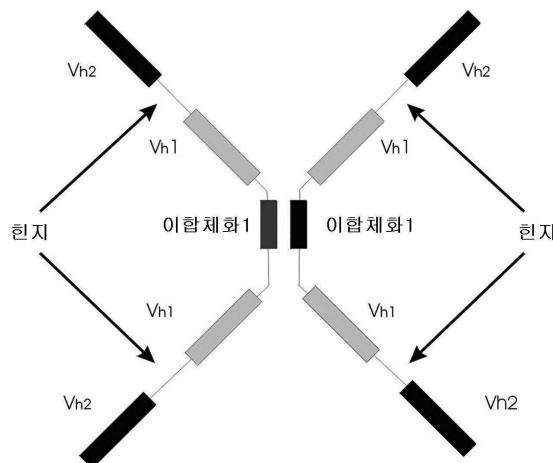
도면3



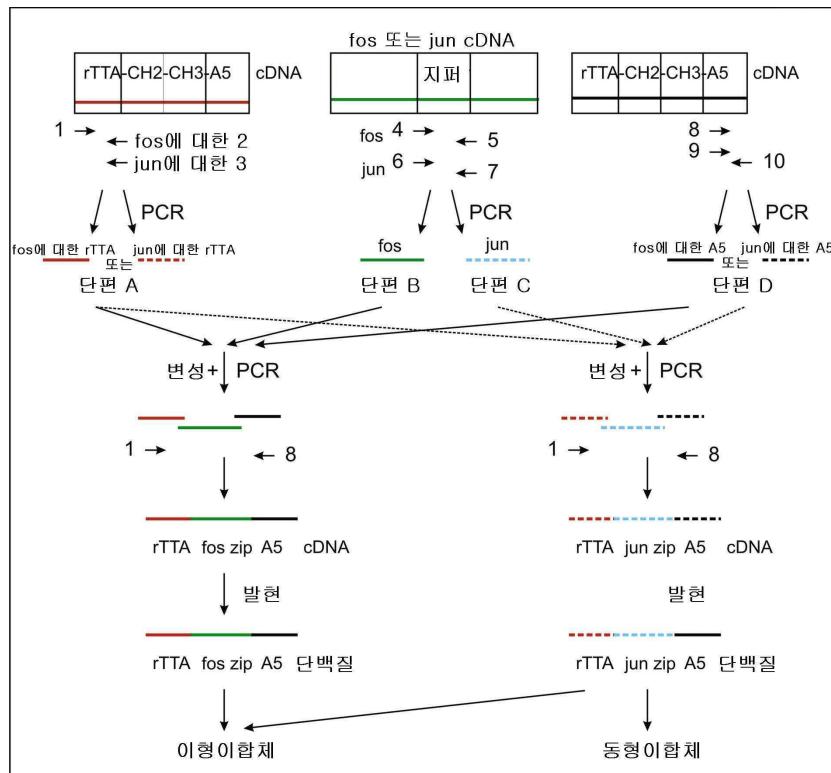
도면4



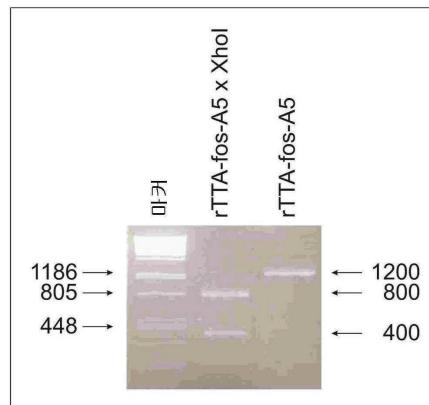
도면5



도면6



도면7



서 롤 목 록

<110> ERASmus UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM
 <120> BINDING MOLECULES

<130> P042858W0

<150> GB0601513.5

<151> 2006-01-25

<160> 13

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IgG hinge coding sequence

<400> 1
 gagcgcaat gttgtgtcga gtgcccacgg tgccca 36

<210> 2
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IgG hinge coding sequence replacement

<400> 2
 agcttctgag cgcaaaccac cagtcgagcc accacccca ccac 44

<210> 3
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> IgG hinge coding sequence replacement complement

<400> 3
 tcgagtggtg gcgggtggcgttgg ctcgactgggt ggtttgcgtt caga 44

<210> 4
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 4
 ctggaattct caccatggag ctggggctga gc 32

<210> 5
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 5
 cgcttggagt gtatcagtca gtgggcacct tgggcacggg gg 42

<210> 6
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 6
 cagccggcgc attctctcca gtgggcacct tgggcacggg gg 42

<210> 7
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 7
 cccccgtgcc caaggtgcc actgactgat acactccaag cg 42

<210> 8
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 8
 cccccgtgcc caaggtgcc actggagaga atcgccggc tg 42

<210> 9
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 9
 tggtggtttg cgctcagaag ccaggatcaa ctctagttt tc 42

<210> 10
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR Primer

<400> 10
 tggtggtttg cgctcagaag caacgtggtt catgacttgc tg 42

<210> 11

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

<220>
<223> PCR Primer

<400> 11
gaaaaactag agttcatcct ggcttcttag cgcaaaccac ca 42

<210> 12
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 12
cagaaagtca tgaaccacgt tgcttcttag cgcaaaccac ca 42

<210> 13
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR Primer

<400> 13
gtcgattct cattccgagg agacggtgac ctgggtc 37