



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월02일  
(11) 등록번호 10-2789821  
(24) 등록일자 2025년03월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/12 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/1282 (2013.01)  
C07K 16/241 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7026144
- (22) 출원일자(국제) 2016년03월31일  
심사청구일자 2021년03월31일
- (85) 번역문제출일자 2017년09월15일
- (65) 공개번호 10-2017-0132154
- (43) 공개일자 2017년12월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/057022
- (87) 국제공개번호 WO 2016/156466  
국제공개일자 2016년10월06일
- (30) 우선권주장  
15162114.1 2015년03월31일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2009021754 A2\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
소리소 파마슈티컬스 인크.  
미국 92130 캘리포니아주 샌디에고 엘 카미노 리  
얼 12230 스위트 230
- (72) 발명자  
크로, 스콧  
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3지엔, 캠브리  
지 로드, 코플리 힐 비즈니스 파크, 1 로어 코트,  
브이에이치스퀘어드 리미티드 내  
웨스트, 마이크  
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3지엔, 캠브리  
지 로드, 코플리 힐 비즈니스 파크, 1 로어 코트,  
브이에이치스퀘어드 리미티드 내  
로버츠, 케빈  
영국, 캠브리지 캠브리지셔 씨비22 3지엔, 캠브리  
지 로드, 코플리 힐 비즈니스 파크, 1 로어 코트,  
브이에이치스퀘어드 리미티드 내
- (74) 대리인  
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 19 항

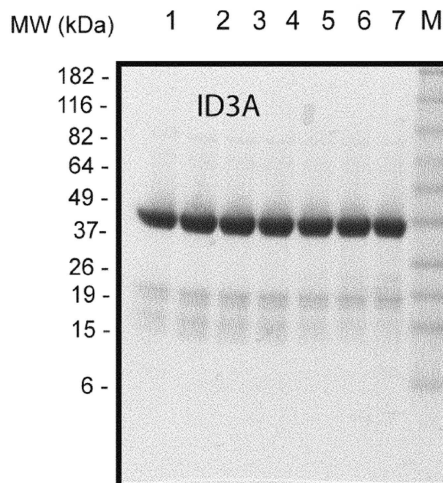
심사관 : 이미경

(54) 발명의 명칭 프로테아제-절단가능 링커를 갖는 펩티드 구조물

(57) 요약

불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 경구 투여에 적합한 구조물이 특히 제공되고, 상기 불안정 펩티드 링커는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하고 상기 제 1 및 제2 폴리펩티드는 상기 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/64 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

(30) 우선권주장

15162115.8 2015년03월31일

유럽특허청(EPO)(EP)

15162112.5 2015년03월31일

유럽특허청(EPO)(EP)

16152320.4 2016년01월21일

유럽특허청(EPO)(EP)

---

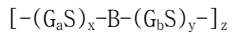
**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

구조물을 포함하는 장관의 자가면역 또는 염증 질환의 경구 투여에 의한 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 구조물은 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하고, 여기서

상기 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 트립신에 대해 내성이고, 상기 불안정 펩티드 링커는 서열번호 2에 따른 폴리펩티드 서열, 하기 포맷의 폴리펩티드 서열:



여기서:

a는 1 내지 10이고;

b는 1 내지 10이고;

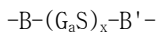
x는 1 내지 10이고;

y는 1 내지 10이고;

z는 1 내지 10이고;

B는 K 또는 R임,

또는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열:



여기서:

a는 1 내지 10이고;

x는 1 내지 10이고;

B는 K 또는 R이고;

B'은 K 또는 R임,

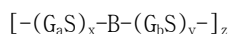
을 포함하며,

여기서, 상기 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 VHH이고, 상기 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 VHH이며, 상기 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 장관을 통해 접근 가능한 제1 표적에 결합하고, 상기 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 장관을 통해 접근 가능한 제2 표적에 결합하며, 여기서, 상기 제1 표적 및 제2 표적은 동일하거나 상이한, 약학적 조성물.

**청구항 2**

불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하는 경구 투여에 적합한 구조물을 제조하는 방법으로서, 상기 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 트립신에 대해 내성이고;

효모에서 상기 구조물을 생산하는 단계를 포함하며, 여기서 불안정 펩티드 링커는 서열번호 2에 따른 폴리펩티드 서열, 하기 포맷의 폴리펩티드 서열:



여기서:

a는 1 내지 10이고;

b는 1 내지 10이고;

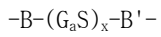
x는 1 내지 10이고;

y는 1 내지 10이고;

z는 1 내지 10이고;

B는 K 또는 R임,

또는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열:



여기서:

a는 1 내지 10이고;

x는 1 내지 10이고;

B는 K 또는 R이고;

B'은 K 또는 R임,

을 포함하며,

여기서 상기 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 VHH이고, 상기 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 VHH이며, 상기 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 장관을 통해 접근 가능한 제1 표적에 결합하고, 상기 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 장관을 통해 접근 가능한 제2 표적에 결합하며, 여기서, 상기 제1 표적 및 제2 표적은 동일하거나 상이한, 방법.

### 청구항 3

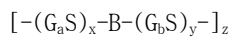
제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하는 구조물로서, 상기 구조물은 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하고, 상기 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 트립신에 대해 내성이며, 상기 불안정 펩티드 링커는 서열번호 2의 서열로 이루어지고, 상기 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 VHH이며, 상기 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 VHH이고, 상기 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 장관을 통해 접근 가능한 제1 표적에 결합하며, 상기 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 장관을 통해 접근 가능한 제2 표적에 결합하고, 여기서, 상기 제1 표적 및 제2 표적은 동일하거나 상이한, 구조물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 불안정 펩티드 링커는 40개 잔기 이하의 길이를 갖는, 약학적 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 불안정 펩티드 링커는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열로 이루어진, 약학적 조성물:



여기서:

a는 1 내지 10이고;

b는 1 내지 10이고;

x는 1 내지 10이고;

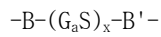
y는 1 내지 10이고;

z는 1 내지 10이고;

B는 K 또는 R임.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 불안정 펩티드 링커는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열로 이루어진, 약학적 조성물:



여기서:

a는 1 내지 10이고;

x는 1 내지 10이고;

B는 K 또는 R이고;

B'은 K 또는 R임.

**청구항 7**

제1항, 및 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적은 장관에 거주하는 병원성 미생물로부터 유래하는 제1 유해제(deleterious agent)인, 약학적 조성물.

**청구항 8**

제1항, 및 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적은 IL-6, IL-7, IL-23, IL-6R, IL-7R, IL-23R, 및 TNF-알파로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 불안정 펩티드 링커는 서열번호 2에 따른 폴리펩티드 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

**청구항 10**

제2항에 있어서, 상기 효모는 에스. 세레비지에(*S. cerevisiae*)인, 방법.

**청구항 11**

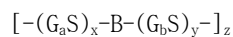
제2항에 있어서, 상기 효모는 피. 파스토리스(*P. pastoris*)인, 방법.

**청구항 12**

제2항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 불안정 펩티드 링커는 40개 잔기 이하의 길이를 갖는, 방법.

**청구항 13**

제2항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 불안정 펩티드 링커는 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진, 방법:



여기서:

a는 1 내지 10이고;

b는 1 내지 10이고;

x는 1 내지 10이고;

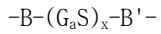
y는 1 내지 10이고;

z는 1 내지 10이고;

B는 K 또는 R임.

**청구항 14**

제2항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 불안정 펩티드 링커는 하기의 폴리펩티드 서열로 이루어진, 방법:



여기서:

a는 1 내지 10이고;

x는 1 내지 10이고;

B는 K 또는 R이고;

B'은 K 또는 R임.

**청구항 15**

제2항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적은 장관에 거주하는 병원성 미생물로부터 유래하는 제1 유해제인, 방법.

**청구항 16**

제2항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적은 IL-6, IL-7, IL-23, IL-6R, IL-7R, IL-23R, 및 TNF-알파로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 17**

제2항에 있어서, 상기 불안정 펩티드 링커는 서열번호 2의 서열을 포함하는, 방법.

**청구항 18**

제2항에 있어서,

a는 4이고;

b는 4이고;

x는 2이고;

y는 2이고;

z는 1이고;

B는 K인, 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서,

a는 4이고;

b는 4이고;

x는 2이고;

y는 2이고;

z는 1이고;

B는 K인, 약학적 조성물.

**청구항 20**

삭제

- 청구항 21
- 삭제
- 청구항 22
- 삭제
- 청구항 23
- 삭제
- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제

- 청구항 37  
삭제
- 청구항 38  
삭제
- 청구항 39  
삭제
- 청구항 40  
삭제
- 청구항 41  
삭제
- 청구항 42  
삭제
- 청구항 43  
삭제
- 청구항 44  
삭제
- 청구항 45  
삭제
- 청구항 46  
삭제
- 청구항 47  
삭제
- 청구항 48  
삭제
- 청구항 49  
삭제
- 청구항 50  
삭제
- 청구항 51  
삭제
- 청구항 52  
삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

- 청구항 69
- 삭제
- 청구항 70
- 삭제
- 청구항 71
- 삭제
- 청구항 72
- 삭제
- 청구항 73
- 삭제
- 청구항 74
- 삭제
- 청구항 75
- 삭제
- 청구항 76
- 삭제
- 청구항 77
- 삭제
- 청구항 78
- 삭제
- 청구항 79
- 삭제
- 청구항 80
- 삭제
- 청구항 81
- 삭제
- 청구항 82
- 삭제
- 청구항 83
- 삭제
- 청구항 84
- 삭제

- 청구항 85
- 삭제
- 청구항 86
- 삭제
- 청구항 87
- 삭제
- 청구항 88
- 삭제
- 청구항 89
- 삭제
- 청구항 90
- 삭제
- 청구항 91
- 삭제
- 청구항 92
- 삭제
- 청구항 93
- 삭제
- 청구항 94
- 삭제
- 청구항 95
- 삭제
- 청구항 96
- 삭제
- 청구항 97
- 삭제
- 청구항 98
- 삭제
- 청구항 99
- 삭제
- 청구항 100
- 삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 불안정 (labile) 펩티드 링커에 의해 연결된 폴리펩티드를 포함하는 경구 투여에 적합한 구조물 (construct) 뿐만 아니라 이러한 구조물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 구조물을 제조하는 방법, 이러한 구조물의 불안정성을 분석하는 방법, 이러한 구조물을 사용하는 방법, 이러한 구조물을 인코딩하는 핵산, 이러한 구조물을 인코딩하는 핵산을 포함하는 cDNA 및 벡터, 이러한 구조물을 발현 하거나 발현할 수 있는 숙주 세포 및 이러한 구조물 또는 약제학적 조성물의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 2개 이상의 폴리펩티드를 포함하는 구조물은 다-기능성 특성을 갖는 생체분자의 한 종류이다. 2개 이상의 폴리펩티드를 함께 유전적으로 융합함으로써, 결과의 구조물은 각각의 성분 폴리펩티드로부터 유래된 많은 별개의 기능을 수득할 수 있다. 이러한 구조물은 단백질 정제 및 영상화와 같은 다수의 목적을 위한 생물학적 연구에서 사용되고 있다. 이러한 구조물은 또한 바이오약품 (biopharmaceuticals)의 중요한 카테고리가 되었다. 효과적인 구조물은 적합한 링커를 요구한다. 링커 없이 폴리펩티드의 직접 융합은 융합된 폴리펩티드의 오중첩 (misfolding), 폴리펩티드 생산의 낮은 수율 또는 손상된 생체활성을 비롯한 많은 바람직하지 않은 결과를 초래할 수 있다. 따라서, 폴리펩티드를 연결하기 위한 링커의 선택 또는 합리적인 설계는 재조합 폴리펩티드 기법의 중요한 영역이다.

[0003] 다수의 구조물은 생체 내 전달 또는 재조합 생산의 목적을 위해 상대적으로 안정한 링커를 포함한다. 안정한 링커는 생체 내 또는 재조합 생산 공정을 통해 하나의 분자로 작용하도록 기능적 도메인을 함께 공유적으로 연결한다. 폴리펩티드들 사이의 안정한 연결은 연장된 혈장 반감기 및 숙주 유기체 프로테아제에 의한 절단에 대한 내성과 같은 많은 이점을 제공할 수 있다. 그러나, 안정한 링커는 또한 폴리펩티드 사이의 입체 장애 (steric hindrance), 감소된 생체활성, 및 변형된 생체분포를 포함하는 몇 가지 단점이 있다 (Chen et al. 2013 *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10): 1357-1369). 따라서 생체 내에서 구조물로부터 유리 폴리펩티드를 방출하고 그로써 잠재적으로 입체 장애를 감소시키고, 생체활성을 향상시키거나 개별 폴리펩티드의 독립적 기능을 달성하는 것이 유리할 것이다.

[0004] 장관 (intestinal tract)에서 효과를 갖는 폴리펩티드의 맥락에서, 이러한 방출은 경구 투여 후 장관에서 발생하는 것이 이상적일 것이다. 이러한 방출은 장관 내부의 하나 또는 다수의 특정 위치에서만 발생하는 것이 바람직할 수 있다.

[0005] 본 발명의 구조물은, 적어도 일부 실시양태에서, 종래 기술의 물질과 비교하여 하기의 이점들 중 하나 이상을 가질 수 있다:

- [0006] (i) 경구 투여를 위한 증가된 적합성;
- [0007] (ii) 경구 투여 후 장관으로의 국소 전달을 위한 증가된 적합성;
- [0008] (iii) 장관의 하나 이상의 특정 영역을 표적하는 능력 (즉, 구조물을 성분 (component) 폴리펩티드로 절단함);
- [0009] (iv) 하나의 재조합 산물에 2개 이상의 분리 가능한 폴리펩티드를 도입하는데 있어서의 증가된 편의성;
- [0010] (v) 위장관 감염 또는 자가면역 및/또는 염증 질환의 개선된 치료 및/또는 예방;
- [0011] (vi) 세균 (예: 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*)) 및/또는 포유동물 세포 및/또는 효모 또는 곰팡이 (예: 아스페르길러스 (*Aspergillus*), 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 클루베로마이세스 (*Kluyveromyces*), 한세룰라 (*Hansenula*) 또는 피치아 (*Pichia*) 속에 속하는 것들, 예컨대 사카로마이세스 세레비지에

(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*)와 같은 이중 숙주에서의 발현을 위한 증가된 적합성;

- [0012] (vii) 생산 동안 프로테아제 분해에 대한 증가된 안정성 (예를 들어, 효모, 곰팡이 또는 포유동물 세포 프로테아제에 대한 내성);
- [0013] (viii) 폴리펩티드의 개선된 중첩;
- [0014] (ix) 재조합 생산 동안 개선된 수율;
- [0015] (x) 개선된 생체활성 및/또는 생체분포;
- [0016] (xi) 약품으로의 사용을 위한 적합성, 및 개선된 특성;
- [0017] (xii) 기능성 식품으로의 사용을 위한 적합성, 및 개선된 특성.

**발명의 내용**

[0018] 본 발명자들은 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는, 경구 투여에 적합한 놀랍게도 유리한 구조물을 생산하였다. 이들 구조물은 이들의 생산의 편의성과 장관 내부에서 유리 성분 폴리펩티드를 방출하는 능력으로 인해 특히 유리하다. 일 실시양태에서, 유리 성분 폴리펩티드는 장관의 하나 이상의 특정 영역에서 방출될 수 있다.

[0019] 이들 구조물은 자가면역 및/또는 염증 질환, 예컨대 염증성 장질환과 같은 GIT 질환의 예방 또는 치료에, 또는 장관에 거주하는 병원성 미생물 (resident pathogenic microbe)로부터의 감염의 예방 또는 치료에 특별한 유용성을 갖는 것으로 예상될 수 있다.

[0020] 본 발명은 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 경구 투여에 적합한 구조물을 제공하고, 상기 불안정 펩티드 링커는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하고, 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이다. 관련된 조성물, 방법 및 본 발명의 구조물과 관련된 핵산이 또한 제공된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0021] 도 1 - 트립신 프로테아제 어세이를 이용해 ID3A의 비-불안정성을 입증하는 염색된 PAGE 겔
- 도 2 - 트립신 프로테아제 어세이를 이용해 ID25A 및 ID26A의 불안정성을 입증하는 염색된 PAGE 겔
- 도 3 - 트립신 프로테아제 어세이를 이용해 ID27A 및 ID28A의 불안정성을 입증하는 염색된 PAGE 겔
- 도 4 - 분변 프로테아제 어세이를 이용해 ID3A, ID25A, ID26A, ID27A 및 ID28A의 불안정성을 입증하는 염색된 PAGE 겔
- 도 5 - 분변 프로테아제 어세이를 이용해 ID55F, ID56F, ID57F, ID58F, ID59F 및 ID60F의 불안정성을 입증하는 염색된 PAGE 겔
- 도 6 - ID3A 및 ID25A의 저장 안정성을 입증하는 염색된 PAGE 겔
- 도 7 - ID26A, ID27A 및 ID28A의 저장 안정성을 입증하는 염색된 PAGE 겔
- 도 8 - ID4A의 저장 안정성을 입증하는 염색된 PAGE 겔

**서열의 기술**

- 서열번호 1 - 구조물 ID3A 및 ID55F에 사용된 링커의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 2 - 구조물 ID25A 및 ID57F에 사용된 링커의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 3 - 구조물 ID26A 및 ID58F에 사용된 링커의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 4 - 구조물 ID27A 및 ID59F에 사용된 링커의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 5 - 구조물 ID28A 및 ID60F에 사용된 링커의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 6 - 구조물 ID56F에 사용된 링커의 폴리펩티드 서열

- 서열번호 7 - ID3A 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 8 - ID25A 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 9 - ID26A 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 10 - ID27A 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 11 - ID28A 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 12 - ID55F 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 13 - ID57F 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 14 - ID58F 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 15 - ID59F 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 16 - ID60F 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 17 - ID56F 구조물의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 18 - ID1A ICVD의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 19 - ID5F ICVD의 폴리펩티드 서열
- 서열번호 20 - ID3A 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 21 - ID25A 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 22 - ID26A 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 23 - ID27A 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 24 - ID28A 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 25 - ID55F 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 26 - ID57F 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 27 - ID58F 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 28 - ID59F 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 29 - ID60F 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 30 - ID56F 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 31 - 구조물 ID3A 및 ID55F에 사용된 링커를 인코딩할 예시적인 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 32 - 구조물 ID25A 및 ID57F에 사용된 링커를 인코딩할 예시적인 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 33 - 구조물 ID26A 및 ID58F에 사용된 링커를 인코딩할 예시적인 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 34 - 구조물 ID27A 및 ID59F에 사용된 링커를 인코딩할 예시적인 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 35 - 구조물 ID28A 및 ID60F에 사용된 링커를 인코딩할 예시적인 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 36 - 구조물 ID56F에 사용된 링커를 인코딩할 예시적인 폴리뉴클레오티드 서열
- 서열번호 37 - 제안된 키모트립신-불안정 링커
- 서열번호 38 - ID4A 구조물의 폴리펩티드 서열

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0022] **불안정 펩티드 링커**

[0023] 본 발명의 구조물은 제1 및 제2 폴리펩티드를 연결하는 불안정 펩티드 링커를 포함한다. 발명의 일 실시양태에 서, 불안정 펩티드 링커는, 원하는 정도로 프로테아제에 의한 절단에 대해 내성이고/이거나 장관의 특정 영역에

의 노출 시에만 절단되도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 만약 구조물이 효모와 같은 숙주에서 재조합적으로 생산되는 경우, 효모에 의해 생산된 트립신-유사 프로테아제가 재조합 구조물 산물을 절단할 수 있다. 이는 정제에의 어려움을 초래하고 규제, 임상 및 상업적 복잡화를 야기할 수 있다. 유사하게, 예를 들어 만약 제1 폴리펩티드가 독소인 경우, 구조물의 제2 폴리펩티드는 이것이 적합한 표적 위치에서 방출될 때까지 독소의 효과를 '진정 (quench)'시키도록 작용할 수 있다.

[0024] 이는 불안정 부위(들) 측면의 불안정 펩티드 링커 내로 차폐 (shielding) 잔기를 도입함으로써 발명의 일 실시양태에 따라 달성될 수 있다. 차폐 잔기는 불안정 펩티드 링커의 불안정 부위(들)의 측면에 위치하여 이들의 불안정성을 감소시킨다. 절단 내성은 또한 불안정 부위(들)을 불안정 펩티드 링커에 더 가깝거나 이들의 주변에 위치시킴으로써 증가될 수 있다. 이 개념은 "차폐된 불안정 부위 (shielded labile site)"로 언급되고 제어된 불안정성을 제공한다.

[0025] 발명의 추가의 실시양태에서, 불안정 펩티드 링커는 장관 프로테아제에 의한 절단에 매우 불안정하여, 그로써 경구 투여 후 구조물의 구성 (constituent) 제1 및 제2 폴리펩티드를 신속히 방출시키도록 조작될 수 있다. 이는 불안정 부위가, 예를 들어 불안정 부위(들)을 불안정 펩티드 링커의 실질적으로 중심에 위치시키고/시키거나 측면 잔기에 의해 실질적으로 차폐되지 않은 불안정 부위에 의해, 단백질분해 (proteolysis)에 노출되도록 불안정 펩티드 링커 내로 하나 이상의 불안정 부위를 도입함으로써 달성된다. 이 개념은 "비-차폐된 불안정 부위"로 언급된다.

[0026] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개 잔기의 길이를 갖는다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 40개 이하, 예컨대 35개 이하, 예컨대 30개 이하, 예컨대 25개 이하, 예컨대 20개 이하, 예컨대 15개 이하 잔기의 길이를 갖는다.

[0027] 본 발명의 구조물의 불안정 펩티드 링커 내로의 P 잔기의 도입은 불안정 펩티드 링커의 절단을 실질적으로 방지할 것으로 기대된다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 임의의 P 잔기를 포함하지 않는다.

[0028] 트립신 불안정 부위

[0029] 차폐된 트립신 불안정 부위

[0030] 적절하게는 본 발명의 구조물의 불안정 펩티드 링커는 트립신 또는 트립신-유사 프로테아제에 대한 절단 부위를 포함한다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 K 잔기를 포함한다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 R 잔기를 포함한다. 바람직하게는 절단 부위(들)은 하나 이상의 K 잔기(들)이다.

[0031] 트립신 또는 트립신-유사 프로테아제 불안정 부위의 경우에 차폐 잔기는 D 또는 E일 수 있다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 D 또는 E로 구성된 목록으로부터 선택되는 하나 이상의 차폐 잔기를 포함한다.

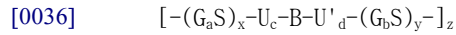
[0032] 적절하게는 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기는 그의 N-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 차폐 잔기를 갖고, 상기 차폐 잔기는: D 및 E로 구성된 목록으로부터 선택된다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기는 그의 N-말단 측면에 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 2 내지 5개, 2 내지 4개, 2 내지 3개, 3 내지 5개, 3 내지 4개, 4 내지 5개의 차폐 잔기를 갖고, 상기 차폐 잔기는: D 및 E로 구성된 목록으로부터 선택된다.

[0033] 적절하게는 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기는 그의 C-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 차폐 잔기를 갖고, 상기 차폐 잔기는: D 및 E로 구성된 목록으로부터 선택된다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기는 그의 C-말단 측면에 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 2 내지 5개, 2 내지 4개, 2 내지 3개, 3 내지 5개, 3 내지 4개, 4 내지 5개의 차폐 잔기를 갖고, 상기 차폐 잔기는: D 및 E로 구성된 목록으로부터 선택된다.

[0034] 적절하게는 모든 K 및 R 잔기는 이들에 인접한 적어도 하나의 차폐 잔기에 이어서, 적절하게는 하나 이상의 추

가의 연속적인 차폐 잔기를 갖는다. 적절하게는 차폐 잔기는 하나 이상의 K 또는 R 잔기의 한쪽 또는 양쪽 측면에서 발생한다.

[0035] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성된다:



[0037] 여기서

[0038] a는 1 내지 10이고;

[0039] b는 1 내지 10이고;

[0040] U는 D 또는 E이고;

[0041] U'은 D 또는 E이고;

[0042] c는 0 내지 7이고;

[0043] d는 0 내지 7이고;

[0044] x는 1 내지 10이고;

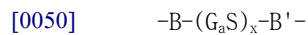
[0045] y는 1 내지 10이고;

[0046] z는 1 내지 10이고;

[0047] B는 K 또는 R임.

[0048] 적절하게는 a는 2 내지 5이고, 더욱 적절하게는 a는 4이다. 적절하게는 b는 2 내지 5이고, 더욱 적절하게는 b는 4이다. 적절하게는 x는 1 내지 5이고, 더욱 적절하게는 x는 1이다. 적절하게는 y는 1 내지 5이고, 더욱 적절하게는 y는 1이다. 적절하게는 z는 1 내지 3이고, 더욱 적절하게는 z는 1이다. 적절하게는, B는 K이다. 적절하게는, U는, 존재한다면, D이다. 적절하게는, U'은, 존재한다면, D이다. 일 실시양태에서 c는 1이고 d는 1이다. 다른 실시양태에서, c는 0이고 d는 0이다. 추가의 실시양태에서, c는 4이고 d는 0이다. 적절하게는 U 및 U'은 둘 다 각각 개별적으로 D이고 c 및 d는 둘 다 1이다.

[0049] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성된다:



[0051] 여기서

[0052] a는 1 내지 10이고;

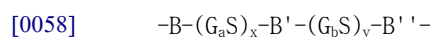
[0053] x는 1 내지 10이고;

[0054] B는 K 또는 R이고;

[0055] B'은 K 또는 R임.

[0056] 일 실시양태에서, a는 2 내지 5이고, 더욱 적절하게는 a는 4이다. 추가의 실시양태에서, x는 1 내지 5이다. 더욱 적절하게는, x는 2이다. 적절하게는, B는 K이다. 적절하게는, B'은 K이다.

[0057] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성된다:



[0059] 여기서

[0060] a는 1 내지 10이고;

[0061] b는 1 내지 10이고;

[0062] x는 1 내지 10이고;

[0063] y는 1 내지 10이고;

- [0064] B는 K 또는 R이고;
- [0065] B'은 K 또는 R이고;
- [0066] B''이 K 또는 R임.
- [0067] 일 실시양태에서, a는 2 내지 5이고, 더욱 적절하게는 a는 4이다. 일 실시양태에서, b는 2 내지 5이고, 더욱 적절하게는 b는 4이다. 추가의 실시양태에서 x는 1 내지 5이다. 더욱 적절하게는, x는 2이다. 추가의 실시양태에서 y는 1 내지 5이다. 더욱 적절하게는, y는 2이다. 적절하게는, B는 K이다. 적절하게는, B'은 K이다. 적절하게는, B''은 K이다.
- [0068] 비-차폐된 트립신 불안정 부위
- [0069] 적절하게는 본 발명의 구조물의 불안정 펩티드 링커는 트립신 또는 트립신-유사 프로테아제에 대한 절단 부위를 포함한다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 K 잔기를 포함한다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 R 잔기를 포함한다. 바람직하게는 절단 부위(들)은 하나 이상의 K 잔기(를)포함한다.
- [0070] 적절하게는 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기는 그의 N-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 비-차폐 잔기를 갖고, 상기 비-차폐 잔기는: C, A, S, N, G, L, I, V, T, M, F, Y, H, W 및 Q; 더욱 적절하게는 A, G, L, I, V, M, S 및 T; 더욱 적절하게는 A, G, L, I, V 및 S; 더욱 적절하게는 G 및 S로 구성된 목록으로부터 선택된다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기는 그의 C-말단 측면에 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 2 내지 5개, 2 내지 4개, 2 내지 3개, 3 내지 5개, 3 내지 4개, 4 내지 5개의 비-차폐 잔기를 갖고, 상기 차폐 잔기는: C, A, S, N, G, L, I, V, T, M, F, Y, H, W 및 Q; 더욱 적절하게는 A, G, L, I, V, M, S 및 T; 더욱 적절하게는 A, G, L, I, V 및 S; 더욱 적절하게는 G 및 S로 구성된 목록으로부터 선택된다.
- [0071] 적절하게는 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기는 그의 C-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 비-차폐 잔기를 갖고, 상기 비-차폐 잔기는: C, A, S, N, G, L, I, V, T, M, F, Y, H, W 및 Q; 더욱 적절하게는 A, G, L, I, V, M, S 및 T; 더욱 적절하게는 A, G, L, I, V 및 S; 더욱 적절하게는 G 및 S로 구성된 목록으로부터 선택된다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기는 그의 C-말단 측면에 1 내지 5개, 1 내지 4개, 1 내지 3개, 1 내지 2개, 2 내지 5개, 2 내지 4개, 2 내지 3개, 3 내지 5개, 3 내지 4개, 4 내지 5개의 비-차폐 잔기를 갖고, 상기 차폐 잔기는: C, A, S, N, G, L, I, V, T, M, F, Y, H, W 및 Q; 더욱 적절하게는 A, G, L, I, V, M, S 및 T; 더욱 적절하게는 A, G, L, I, V 및 S; 더욱 적절하게는 G 및 S로 구성된 목록으로부터 선택된다.
- [0072] 적절하게는 모든 K 및 R 잔기는 이들에 인접한 적어도 하나의 비-차폐 잔기에 이어서, 적절하게는 하나 이상의 추가의 연속적인 비-차폐 잔기를 갖는다. 적절하게는 비-차폐 잔기는 하나 이상의 K 또는 R 잔기의 한쪽 또는 양쪽 측면에서 발생한다.
- [0073] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 임의의 D 또는 E 잔기를 포함하지 않는다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 C, A, S, N, G, L, I, V, T, M, F, Y, H, K, R, W 및 Q; 더욱 적절하게는 A, G, L, I, V, M, S, T, K 및 R 잔기; 더욱 적절하게는 S, G, K 및 R 잔기로 구성된 목록으로부터 선택된 잔기로 구성된다.
- [0074] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성된다:
- [0075]  $[-(G_aS)_x-B-(G_bS)_y-]_z$
- [0076] 여기서
- [0077] a는 1 내지 10이고;
- [0078] b는 1 내지 10이고;
- [0079] x는 1 내지 10이고;

- [0080] y는 1 내지 10이고;
- [0081] z는 1 내지 10이고;
- [0082] B는 K 또는 R임.
- [0083] 적절하게는 a는 2 내지 5이고, 더욱 적절하게는 a는 4이다. 적절하게는 b는 2 내지 5이고, 더욱 적절하게는 b는 4이다. 적절하게는 x는 1 내지 5이고, 더욱 적절하게는 x는 1이다. 적절하게는 y는 1 내지 5이고, 더욱 적절하게는 y는 1이다. 적절하게는 z는 1 내지 3이고, 더욱 적절하게는 z는 1이다. 적절하게는 B는 K이다.
- [0084] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성된다:
- [0085]  $[-(G_4S)_x-B-(G_4S)_y-]_z$
- [0086] 여기서
- [0087] x는 1 내지 10이고;
- [0088] y는 1 내지 10이고;
- [0089] z는 1 내지 10이고;
- [0090] B는 K 또는 R임.
- [0091] 적절하게는 x는 1 내지 5이고, 더욱 적절하게는 x는 1이다. 적절하게는 y는 1 내지 5이고, 더욱 적절하게는 y는 1이다. 적절하게는 z는 1 내지 3이고, 더욱 적절하게는, z는 1이다. 적절하게는 B는 K이다.
- [0092] 키모트립신 불안정 부위
- [0093] *비-차폐된 키모트립신 불안정 부위*
- [0094] 대안적으로, 또는 트립신 불안정 부위에 덧붙여, 본 발명의 구조물의 불안정 펩티드 링커는 키모트립신 또는 키모트립신-유사 프로테아제에 대한 절단 부위를 포함한다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 W, F, Y, L 및 M; 더욱 적절하게는 W, F 및 Y로 구성된 목록으로부터 선택되는 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 잔기를 포함한다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 S, G, W, F, Y, L 및 M; 예컨대 S, G, W, F 및 Y로 구성된 목록으로부터 선택되는 잔기로 구성된다.
- [0095] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성된다:
- [0096]  $[-(G_aS)_x-J-(G_bS)_y-]_z$
- [0097] 여기서
- [0098] a는 1 내지 10이고;
- [0099] b는 1 내지 10이고;
- [0100] x는 1 내지 10이고;
- [0101] y는 1 내지 10이고;
- [0102] z는 1 내지 10이고;
- [0103] J는 W, F, Y, L 또는 M; 예컨대 W, F 또는 Y임.
- [0104] 일 실시양태에서 a는 2 내지 5이고, 추가의 실시양태에서, b는 2 내지 5이고, 추가의 실시양태에서 x는 1 내지 5이고, 추가의 실시양태에서, y는 1 내지 5이고, 추가의 실시양태에서 z는 1 내지 3이다. 적절하게는 x는 1이고, y는 1이고 z는 1이다.
- [0105] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성된다:
- [0106]  $[-(G_4S)_x-J-(G_4S)_y-]_z$
- [0107] 여기서

- [0108] x는 1 내지 10이고;
- [0109] y는 1 내지 10이고
- [0110] z는 1 내지 10이고;
- [0111] J는 W, F, Y, L 또는 M; 예컨대 W, F 또는 Y임.
- [0112] 일 실시양태에서, x는 1 내지 5이고, 추가의 실시양태에서, y는 1 내지 5이고, 추가의 실시양태에서 z는 1 내지 3이다. 적절하게는 x는 1이고, y는 1이고 z는 1이다.
- [0113] MMP 불안정 부위
- [0114] 일 실시양태에서, 본 발명의 구조물의 불안정 펩티드 링커는 MMP3, MMP10 또는 MMP12에 대한 절단 부위를 포함한다.
- [0115] 불안정성
- [0116] 구조물의 불안정성, 및 따라서 제어된-불안정성 또는 고도의 불안정한 구조물로서 구조물의 유용성은 실시예 1 내지 13에 정의된 분변 (Faecal) 프로테아제 어세이, 트립신 프로테아제 어세이 및/또는 키모트립신 프로테아제 어세이를 이용하여 평가될 수 있다.
- [0117] 적절하게는 구조물 질량 (mass)의 적어도 20%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 100%가 분변 프로테아제 어세이 및/또는 트립신 프로테아제 어세이 및/또는 키모트립신 프로테아제 어세이에서의 혼합 후 적어도 10분, 예컨대 적어도 20분, 예컨대 적어도 30분, 예컨대 적어도 40분, 예컨대 적어도 50분, 예컨대 적어도 60분, 예컨대 적어도 70분, 예컨대 적어도 80분, 예컨대 적어도 90분, 예컨대 적어도 100분, 예컨대 적어도 110분, 예컨대 적어도 120분, 예컨대 적어도 130분, 예컨대 적어도 140분, 예컨대 적어도 150분, 예컨대 적어도 160분 후 비절단된 상태로 남아있다.
- [0118] 대안적으로, 구조물의 적어도 60%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 100%는 분변 프로테아제 어세이 및/또는 트립신 프로테아제 어세이 및/또는 키모트립신 프로테아제 어세이에서의 혼합 후, 5분 이하, 예컨대 4분 이하, 예컨대 3분 이하, 예컨대 2분 이하, 예컨대 1분 이하 후에 절단된다.
- [0119] 발명의 일 측면에서, 하기 단계를 포함하는, 본 발명의 구조물의 불안정성을 평가하는 방법을 제공한다: (a) (예컨대 트립신 프로테아제 어세이, 키모트립신 프로테아제 어세이 또는 분변 프로테아제 어세이를 수행함으로써) 트립신을 포함하는 용액, 키모트립신, 분변 상청액, 소장 체액을 포함하는 용액, 또는 엔테로펩티다제를 포함하는 용액 중에 구조물을 인큐베이션하는 단계, 그 후에 (b) 하나 이상의 인큐베이션 기간 후 절단된 구조물의 비율을 확인하는 단계.
- [0120] 발명의 추가의 측면에서, 하기 단계를 포함하는, 단량체 항체 또는 이의 단량체 항원 결합 단편을 장관의 표적 영역에 전달하는 방법이 제공된다: (a) 상기에 기술된 구조물 불안정성을 평가하는 방법을 수행하는 단계, 그 후에 (b) 장관의 표적 영역에 대해 적합한 수준의 불안정성을 갖는 구조물을 선택하는 단계, (c) 장용 코팅된 패키징으로 선택된 구조물을 생산하는 단계, 그 후에 (d) 패키징된 선택된 구조물을 개체에 투여하는 단계.
- [0121] 발명의 추가의 측면에서, 선택된 본 발명의 구조물을 포함하는 제품을 생산하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은 제품 내로 선택된 구조물을 첨가하는 것을 포함하고, 상기 선택된 구조물은: (a) 상기에 기술된 구조물 불안정성을 평가하는 방법을 수행하는 단계, 그 후에 (b) 장관의 표적 영역에 대해 적합한 수준의 불안정성을 갖는 구조물을 선택하는 단계를 포함하는 방법에 의해 선택되고 생산된다.
- [0122] 안정성
- [0123] 다양한 유기체가 재조합 폴리펩티드를 발현하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로 사용되는 발현 유기체에는 효모, 곰팡이 및 포유동물 세포가 포함된다. 그러나, 이들 발현 유기체의 다수는 또한 발현된 재조합 폴리펩티드를 절단할 수 있는 트립신-유사 프로테아제와 같은 프로테아제를 생산한다. 발현된 폴리펩티드에 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 불안정한 펩티드 링커가 도입되는 경우, 그러면 이 펩티드 링커는 바람직하지 않게 발현 유기체에 의해 생산된 프로테아제에 또한 불안정해질 수 있고, 그로써 온전한 폴리펩티드의 효과적인 발현을 방지할 수 있다.
- [0124] 불안정 펩티드 링커는 구조물을 생산하기 위해 사용된 재조합 숙주에 의해 생산되는 효소에 실질적으로 비-불안정한 것이 유리하다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 *E. coli*와 같은 세균 또는 아스페르질러스, 사카로마이

세스, 클루이베로마이세스, 한세놀라 또는 피치아 속 (genus)에 속하는 효모 또는 곰팡이, 예컨대 사카로마이세스 세레비지에 또는 피치아 파스토리스와 같은 재조합 숙주에 의해 생산되는 프로테아제에 실질적으로 내성이다. 적절하게는 재조합 숙주는 효모이다. 적절하게는 재조합 숙주는 곰팡이이다. 적절하게는 효모는 사카로마이세스 세레비지에 또는 피치아 파스토리스 속에 속한다. 효모의 추가의 예시는 칸디다 및 토룰롭시스 (*Torulopsis*) 속에 속하는 것들이다. 적절하게는 곰팡이는 아스페르질러스 속에 속한다. 곰팡이의 추가의 예시는 아크레모니움 (*Acremonium*), 알터나리아 (*Alternaria*), 크리소스포리움 (*Chrysosporium*), 클라도스포리움 (*Cladosporium*), 디티오스텔리움 (*Dictyostelium*), 푸사리움 (*Fusarium*), 뮤코르 (*Mucor*), 페니실리움 (*Penicillium*), 리조퍼스 (*Rhizopus*), 스타치보트리스 (*Stachybotrys*), 트리코더마 (*Trichoderma*) 및 트리코파이톤 (*Trichophyton*) 속에 속하는 것들이다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 4°C에서 적어도 2일, 예컨대 적어도 4일, 예컨대 적어도 9일, 예컨대 적어도 14일, 예컨대 적어도 60일의 저장 동안 재조합 숙주에 의해 생산되는 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이다.

- [0125] 경구 투여를 위한 효모-생산 구조물
- [0126] 발명의 일 측면에서, 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인으로 경구 투여에 의해 장관의 질환을 치료하는 데 사용하기 위한 구조물이 제공되고, 상기 구조물은 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하고, 여기서:
  - [0127] (i) 불안정 펩티드 링커는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하고,
  - [0128] (ii) 불안정 펩티드 링커는 효모 프로테아제에 대해 안정하고,
  - [0129] (iii) 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 상기 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이고,
- [0130] 상기 구조물은 효모에서 생산된다.
- [0131] 발명의 추가의 측면에서, 구조물로부터의 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인으로 경구 투여에 의해 장관의 질환을 치료하는 방법이 제공되고, 상기 구조물은 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하고, 여기서:
  - [0132] (i) 불안정 펩티드 링커는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하고,
  - [0133] (ii) 불안정 펩티드 링커는 효모 프로테아제에 대해 안정하고,
  - [0134] (iii) 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 상기 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이고;
- [0135] 상기 구조물은 효모에서 생산된다.
- [0136] 발명의 추가의 측면에서, 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하는 구조물을 효모에서 생산한 후 경구로 투여하는 것을 포함하는, 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 장관에 전달하는 방법이 제공되고, 여기서:
  - [0137] (i) 불안정 펩티드 링커는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하고,
  - [0138] (ii) 불안정 펩티드 링커는 효모 프로테아제에 대해 안정하고,
  - [0139] (iii) 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 상기 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이다.
- [0140] 발명의 추가의 측면에서, 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하는 구조물을 제조하는 방법이 제공되고, 여기서:
  - [0141] (i) 불안정 펩티드 링커는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하고,
  - [0142] (ii) 불안정 펩티드 링커는 효모 프로테아제에 대해 안정하고,
  - [0143] (iii) 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 상기 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이고;
- [0144] 효모에서 구조물을 생산하는 단계를 포함한다.
- [0145] 적절하게는 효모에서 구조물을 생산하는 단계는 벡터로 형질전환된, 본 발명의 구조물을 발현할 수 있는 숙주 효모 세포를 제공함으로써 수행되고, 상기 벡터는 본 발명의 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고 숙주 효모 세포는 본 발명의 구조물의 발현에 적합한 조건에 노출된다.
- [0146] 적절하게는 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 효모 프로테아제에 대

해 실질적으로 내성이다.

- [0147] 적절하게는 상기에 요약된 방법은 구조물을 정제하는 단계를 추가로 포함한다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 의해 장관에서 절단된다. 발명의 추가의 측면에서, 상기 방법 중 임의의 하나에 의해 수득된 구조물이 제공된다.
- [0148] 상기에 기술된 용도 및 방법을 위한 구조물은 효모에서의 구조물의 생산과 관련된다. 그러나, 이들 용도 및 방법을 위한 구조물은 또한 포유동물 세포 또는 곰팡이 (예컨대, 아크레모니움, 알터나리아, 아스페르질러스, 크리소스포리움, 클라도스포리움, 디티오스텔리움, 푸사리움, 뮤코르, 페니실리움, 리조퍼스, 스타치보트리스, 트리코더라 및 트리코피아톤 속의 임의의 하나 이상으로부터의 곰팡이)와 같이 펩티드 링커를 절단할 수 있는 프로테아제를 생산하는 임의의 발현 유기체에서의 구조물의 생산에도 동일하게 적용 가능하다.
- [0149] 본 발명에 따른 이들 실시양태의 구체적인 특성은 다음과 같이 더 논의된다.
- [0150] 1. 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정한 불안정 펩티드 링커
- [0151] 하기 실시예 5 및 6은 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정한 불안정 펩티드 링커를 포함하는 본 발명의 특이적 구조물에 대한 세부 사항을 제공한다.
- [0152] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 구조물 질량의 50% 초과, 예컨대 60% 초과, 예컨대 70% 초과, 예컨대 80% 초과, 예컨대 85% 초과, 예컨대 90% 초과가 트립신 프로테아제 어세이에서의 혼합 후 160분 후, 더욱 적절하게는 105분 후, 더욱 적절하게는 60분 후, 더욱 적절하게는 25분 후, 더욱 적절하게는 10분 후 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인으로 절단되도록 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하다.
- [0153] 2. 효모 프로테아제에 대해 안정한 불안정 펩티드 링커
- [0154] 하기 실시예 7은 효모 프로테아제에 대해 안정한 불안정 펩티드 링커를 포함하는 본 발명의 특이적 구조물에 대한 세부 사항을 제공한다. 하기 실시예 9는 효모 프로테아제에 대해 안정하지 않은 특이적 구조물 (ID4A)에 대한 세부 사항을 제공한다.
- [0155] 효모 프로테아제에 대한 링커의 안정성은 하기에 개요된 효모 발현 프로토콜을 이용하여 평가될 수 있다.
- [0156] 효모 발현 프로토콜:
- [0157] 하기 프로토콜은 적당한 성장 배지에서의 유도가 폴리펩티드 발현 및 세포의 상청액 내로의 분비를 초래하도록 사카로마이세스 세레비지에의 염색체 내로 폴리펩티드 (예컨대, ICVD 또는 단량체 ICVD를 포함하는 구조물)를 클로닝하는 방법을 서술한다.
- [0158] 하기 설명의 에스. 세레비지에 균주가 이 과정에 사용된다: 폴리펩티드의 발현 및 제조에 사용된 생산 균주는 EUROSCARF 컬렉션 (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis)으로부터의 CEN.PK 시리즈의 유도체이다. CEN.PK 균주의 유전형은 다음과 같다: MATa/MATa ura3-52/ura3-52; trp1-289/trp1-289; leu2-3,112/leu2-3,112; his3Δ1/his3Δ1; MAL2-8C/MAL2-8C; SUC2/SUC2. 이 균주는 그 후에 갈락토키나아제 유전자의 결실 (gal1::URA3)에 의해 갈락토스 상에서 성장하는 능력이 억제되도록 더 변형된다. 이것이 폴리펩티드 발현 구조물에 의한 형질전환에 사용된 최종 균주이다.
- [0159] 폴리펩티드들 (예컨대, ICVD 또는 단량체 ICVD를 포함하는 구조물)이 단백질 링커에 의해 연결된, 단량체 또는 다량체 DNA 구조물이 적합한 다중-카피 염색체 통합 벡터 내로 클로닝되어 (Lopes *et al.* 1991. *Gene*. 105, 83-90.), 통합 카세트를 생성한다. 통합 카세트는 유도성 프로모터 (예를 들어, pGal7, Nogi & Fukasawa (1983). *Nucleic Acids Res.* 11(24): 8555-68.), 폴리펩티드 인코딩 영역, 폴리펩티드 코딩 영역에서 첫 번째 아미노산의 직전 상류에 융합된, 효모에서 세포의 상청액으로의 분비를 인코딩하는 시그널 서열 (Hashimoto *et al.* 1998. *Protein Engineering* 11 (75-77)), 영양요구성 선택 마커 및 염색체 내로의 재조합에 기여하는 DNA 서열을 포함할 수 있다. 통합 카세트를 인코딩하는 선형 DNA로의 적격 효모 세포의 형질전환 및 적합한 영양요구성 배지에서의 후속 선택 (예를 들어, 류신 생합성 유전자가 선택 마커인 경우에는 류신 생략)은 rDNA 유전자 좌에서의 통합 및 증폭을 초래하고, 그로써 100-200 카피의 발현 구조물이 세포 내에 존재할 수 있다. 선택적 압력의 제거 후, 발현 구조물은 염색체 내로 안정적으로 통합된 상태로 존재한다. 대안적으로, 폴리펩티드 생산은 염색체 통합에 대한 요구 없이, 유사한 발현 카세트를 갖는 효모 2 μM 플라스미드를 토대로 하는 다중-카피 에피솜 벡터로부터 달성될 수 있다.
- [0160] 폴리펩티드 발현을 유도하기 위해, 결과의 효모 균주의 콜로니를 2% 글루코스가 보충된 5 mL의 효모 소이톤

(soytone) 브로쓰 내로 접종하고 30℃에서 밤새 성장시킨다 (150-200 rpm). 다음 날 500 mL 엘렌메이어 (Erlenmeyer) 플라스크 내에 2% 글루코스 및 0.5% 갈락토스 (유도용)를 함유하는 50 mL의 효모 소이톤 브로쓰에 전체 5 mL 밤새 배양물을 접종한다. 결과의 유도 배양물을 30℃, 200 rpm에서 3일간 인큐베이션한다. 그 후에 배양물을 스윙 로터 원심분리기에서 20분간 스피ندا운 (spin down)시켜 효모 세포를 제거한다. 상청액을 그 후에 0.45 μm 및 0.2 μm 필터로 연속하여 여과한다.

- [0161] 효모 발현 프로토콜을 수행한 후, 이어서 폴리펩티드는 선택적으로 멸균 조건하에서 효모 상청액 중에 4℃에서의 저장 기간을 거칠 수 있다.
- [0162] 적절하게는 본 발명의 구조물은 효모 발현 프로토콜 (즉, 후속 저장 기간 부재)을 이용한 구조물의 생산 및 선택적으로 2일, 더욱 적절하게는 4일 또는 더욱 적절하게는 9일간의 저장 후 구조물 질량의 10% 이하, 더욱 적절하게는 5% 이하, 더욱 적절하게는 1% 이하가 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인으로 절단되도록 효모 프로테아제에 대해 안정하다. 본원에 사용된 바와 같은 "0일 저장"은 후속 저장 기간이 없음을 지칭한다.
- [0163] 효모-생산된 폴리펩티드는 세균과 같은 대체 발현 유기체를 사용해 생산된 것들과 구별될 수 있는데, 효모-생산 폴리펩티드는 당화와 같은 번역-후 변형을 포함할 수 있다.
- [0164] 3. 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 실질적으로 내성인 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인
- [0165] 하기 실시예 5 및 6은 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인이 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인, 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하는 본 발명의 특이적 구조물에 대한 세부 사항을 제공한다.
- [0166] 적절하게는 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 질량의 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 예컨대 적어도 99%, 예컨대 약 100% 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인 질량의 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 예컨대 적어도 99%, 예컨대 약 100%가 트립신 프로테아제 어세이에서의 혼합 후 10분, 더욱 적절하게는 25분 후, 더욱 적절하게는 60분 후, 더욱 적절하게는 105분 후, 더욱 적절하게는 160분 후에 비절단된 상태로 남아있도록 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이다.
- [0167] 4. 효모 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인
- [0168] 하기 실시예 7은 면역글로불린 사슬 가변 도메인이 효모 프로테아제에 대해 안정한 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하는 본 발명의 특이적 구조물에 대한 세부 사항을 제공한다.
- [0169] 적절하게는 제1 면역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인은 제1 또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인 질량의 10% 이하, 더욱 적절하게는 5% 이하, 더욱 적절하게는 1% 이하가 효모 발현 프로토콜을 사용한 제1 또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인의 생산 및 그 후 선택적으로 2일, 더욱 적절하게는 4일 또는 9일간의 저장 후 절단되도록 효모 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이다.
- [0170] 상기 항목 1-4 하에서 안정성 및 불안정성의 평가
- [0171] 적절하게는 구조물의 절단된 질량 및/또는 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인의 비절단된 질량 및/또는 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인의 절단된 질량은 겔 전기영동에 수반된 겔의 육안 검사에 의해 평가된다. 더욱 적절하게는, 정량적 겔 전기영동에 의해 평가된다. 대안적으로, 겔 전기영동에 수반된 질량 분광광도법에 의해 평가된다.
- [0172] 절단된 구조물 및 비절단된 면역글로불린 사슬 가변 도메인에 상응하는 겔 상의 밴드는 분자량 마커와의 비교에 의해, 구조물의 질량 (즉, 하나의 구성 면역글로불린 사슬 가변 도메인의 질량)의 대략 절반을 갖는 그러한 밴드로서 동정될 수 있다. 절단된 면역글로불린 사슬 가변 도메인에 상응하는 겔 상의 밴드는 분자량 마커 밴드와의 비교에 의해, 전체 구성 면역글로불린 사슬 가변 도메인의 것보다 작은 분자량을 갖는 것으로 동정 가능하다.
- [0173] 일 실시양태에서, 본 발명의 구조물의 불안정 펩티드 링커는 WO 2009/021754에 기술된 폴리펩티드를 포함하지 않는다. 더욱 구체적으로, 일 실시양태에서 본 발명의 구조물의 불안정 펩티드 링커는 서열 GGGGSDDDDKGGGGS (서열번호 4)을 포함하지 않는다.
- [0174] VH 및 VHH와 같은 면역글로불린 사슬 가변 도메인 (ICVD)을 포함하는 폴리펩티드, 항원-결합 폴리펩티드, 항체 및 항체 단편

- [0175] 폴리펩티드는 사슬 내 함께 결합된 다수의 아미노산 잔기로 구성된 유기 중합체이다. 본원에 사용된 바와 같이, '폴리펩티드'는 '단백질' 및 '펩티드'와 서로 교환 가능하게 사용된다. 폴리펩티드는 이들이 친화도 (affinity) (적절하게는, 본원에 추가로 기술되는 바와 같이,  $K_d$  값,  $K_a$  값,  $k_{on}$ -속도 및/또는  $k_{off}$ -속도로서 표현됨)를 갖고 표적 항원 상의 에피토프에 결합할 수 있는, 항원-결합 부위를 형성하는 아미노산 잔기의 하나 이상의 신장 (stretches)을 함유할 때 항원-결합인 것으로 불린다. 항원-결합 폴리펩티드는 항체, 항체 단편 및 항원-결합 단편과 같은 폴리펩티드를 포함한다. 폴리펩티드는 높은 친화도 (적절하게는, 본원에 추가로 기술되는 바와 같이,  $K_d$  값,  $K_a$  값,  $k_{on}$ -속도 및/또는  $k_{off}$ -속도로서 표현됨)로 표적에 결합할 수 있는 영역을 포함할 수 있다. 이러한 폴리펩티드에는 다르핀 (DARPin)(Binz et al. *Journal of Molecular Biology* 332(2): 489-503), 아피머 (Affimer™), 피노머 (Fynomer™), 센티린 (Centyrin), 나노피틴 (Nanofitin®) 및 시클릭 펩티드가 포함된다.
- [0176] 통상적인 항체 또는 면역글로불린 (Ig)은 4개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 단백질이다: 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L). 각각의 사슬은 불변 영역 및 가변 도메인으로 나누어진다. 중쇄 가변 도메인은 본원에서 VHC로 약칭되고, 경쇄 (L) 가변 도메인은 본원에서 VLC로 약칭된다. 이들 도메인, 이와 관련된 도메인 및 이로부터 유래된 도메인은 본원에서 면역글로불린 사슬 가변 도메인으로 언급된다. VHC 및 VLC 도메인은 "프레임워크 영역" ("FR")으로 불리는 더욱 보존된 영역이 산재된, "상보성 결정 영역" ("CDR")으로 명명된, 고가변성 (hypervariability)의 영역으로 더욱 세분화될 수 있다. 프레임워크 및 상보성 결정 영역은 정확하게 정의되어 있다 (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*, 그 전체가 참조로서 본원에 포함됨). 통상적인 항체에서, 각각의 VHC 및 VLC는 다음의 순서로 아미노-말단에서 카복시-말단으로 배열된, 3개의 CDRs 및 4개의 FRs로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 2개의 면역글로불린 중쇄 및 2개의 면역글로불린 경쇄의 통상적인 항체 사슬체는, 예컨대 이황화 결합으로 상호-연결된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄와, 연결된 중쇄 유사성을 이용해 형성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 구성된다. 중쇄의 가변 도메인 및 경쇄의 가변 도메인은 항원과 상호작용하는 결합 도메인이다. 항체의 불변 영역은 전형적으로 면역 시스템의 다양한 세포 (예: 효과기 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 보체 (C1q)를 비롯한, 숙주 조직 또는 인자에의 항체의 결합을 매개한다. 용어 항체는 유형 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (또한 이들의 아형)의 면역글로불린을 포함하고, 상기 면역글로불린의 경쇄는 카파 및 람타 유형일 수 있다. 2개의 동일한 중쇄 (H) 및 2개의 동일한 경쇄 (L) 폴리펩티드로부터 조립된 면역글로불린-감마 (IgG) 항체의 전체 구조는 잘 확립되어 있고 포유동물에서 고도로 보존되어 있다 (Padlan 1994 *Mol Immunol* 31: 169-217).
- [0177] 통상적인 항체 구조에 대한 예외가 낙타과 (Camelidae)의 혈청에서 발견된다. 통상적인 항체에 더하여, 이들 혈청은 특별한 IgG 항체를 보유한다. 중쇄 항체 (HCAbs)로 알려진, 이들 IgG 항체는 L 사슬 폴리펩티드가 결여되고 제1 불변 도메인 (CH1)이 부재한다. 그의 N-말단 영역에서, 동종이량체 단백질의 H 사슬은 VHH로 언급되는, 전용 (dedicated) 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 함유하고, 이는 그의 동족 항원과 연합하는 역할을 한다 (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, 이들 전체가 참조로서 본원에 포함됨).
- [0178] 본원에 사용된 바와 같이 항원-결합 단편 (또는 "항체 단편" 또는 "면역글로불린 단편")은 표적에 특이적으로 결합하는 항체의 일부 (예컨대, 하나 이상의 면역글로불린 사슬이 전장은 아니지만, 표적에 특이적으로 결합하는 분자)를 지칭한다. 용어 항원-결합 단편에 포함되는 결합 단편의 예시에는 하기가 포함된다:
- [0179] (i) Fab 단편 (VLC, VHC, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 일가 단편);
- [0180] (ii) F(ab')<sub>2</sub> 단편 (хин지 영역에서 이황화 다리에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편);
- [0181] (iii) Fd 단편 (VHC 및 CH1 도메인으로 구성됨);
- [0182] (iv) Fv 단편 (항체의 단일 암 (arm)의 VLC 및 VHC 도메인으로 구성됨);
- [0183] (v) scFv 단편 (재조합 방법을 이용하여, 이들이 VLC 및 VHC 영역이 쌍을 이뤄 일가 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬로서 만들어질 수 있게 하는 합성 링커에 의해 연결된, VLC 및 VHC 도메인으로 구성됨);
- [0184] (vi) VH (VHC 도메인으로 구성된 면역글로불린 사슬 가변 도메인 (Ward et al *Nature* 1989 341: 544-546));
- [0185] (vii) VL (VLC 도메인으로 구성된 면역글로불린 사슬 가변 도메인);

- [0186] (viii) V-NAR (연골어류 (chondrichthyes) IgNAR로부터의 VHC 도메인으로 구성된 면역글로불린 사슬 가변 도메인 (Roux et al 1998 *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11804-11809 및 Griffiths et al 2013 *Antibodies* 2: 66-81, 그 전체가 참조로서 본원에 포함됨);
- [0187] (ix) VHH.
- [0188] VHH 또는 VH 내 아미노산 잔기의 총 개수는 110-130개의 영역일 수 있고, 적절하게는 112-120개이고, 가장 적절하게는 115개이다.
- [0189] 폴리펩티드 및 불안정 펩티드 링커를 포함하는 본 발명의 구조물은, 예를 들면 핵산 합성을 위한 기법을 이용하여 2개 이상의 폴리펩티드 및 불안정 펩티드 링커를 인코딩하는 핵산을 제조하고, 이어서 그렇게 수득된 핵산의 발현에 의해 수득될 수 있다 (본원에 추가로 기술된 바와 같음). 특정 실시양태에 따라서, 본 발명에 따른 구조물은 자연 발생적인 폴리펩티드의 아미노산 서열과 정확하게 동일한 (즉, 이와 100% 서열 동일성을 공유하는) 아미노산 서열을 갖지 않는다.
- [0190] 적절하게는 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 항원-결합 폴리펩티드이고, 더욱 적절하게는 제1 및/또는 제2 항원-결합 폴리펩티드는 면역글로불린 사슬 가변 도메인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 더욱 적절하게는 항원-결합 단편은: VL, V-NAR, scFv, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편 또는 면역글로불린 사슬 가변 도메인, 예컨대 VHH 및 VH로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0191] **특이성, 친화도 및 결합력**
- [0192] 특이성 (specificity)은 특정 항원-결합 폴리펩티드가 그에 결합할 수 있는 상이한 유형의 항원 또는 항원 결정기의 수를 지칭한다. 항원-결합 폴리펩티드의 특이성은 항원-결합 폴리펩티드가 특정 항원을 고유한 분자적 실체로 인식하고 이를 다른 항원과 구별할 수 있는 능력이다.
- [0193] 항원의 항원-결합 폴리펩티드와의 해리에 대한 평형 상수 (Kd)로 표시되는, 친화도 (affinity)는 항원 결정기와 항원-결합 폴리펩티드 상의 항원-결합 부위 사이의 결합 강도의 척도이다: Kd 값이 더 약할수록, 항원 결정기와 항원-결합 폴리펩티드 사이의 결합 강도는 더 강하다 (대안적으로, 친화도는 또한 1/Kd인, 친화도 상수 (Ka)로도 표현될 수 있음). 친화도는 특이적 관심 항원에 따라서, 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0194] 결합력 (avidity)은 항원-결합 폴리펩티드와 관련 항원 사이의 결합 강도의 척도이다. 결합력은 항원 결정기와 항원-결합 폴리펩티드 상의 그의 항원-결합 부위 사이의 친화도 및 항원-결합 폴리펩티드 상에 존재하는 적절한 결합 부위의 수 둘 다와 관련이 있다.
- [0195] 적절하게는, 항원-결합 폴리펩티드는  $10^{-6}$  내지  $10^{-12}$  M, 더욱 적절하게는  $10^{-7}$  내지  $10^{-12}$  M, 더욱 적절하게는  $10^{-8}$  내지  $10^{-12}$  M 및 더욱 적절하게는  $10^{-9}$  내지  $10^{-12}$  M의 해리 상수 (Kd)로 결합한다.
- [0196]  $10^{-6}$  미만의 임의의 Kd 값은 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 항원 또는 항원 결정기에 대한 항원-결합 폴리펩티드의 특이적 결합은 예를 들면, 스캐차드 (Scatchard) 분석 및/또는 경쟁적 결합 분석, 예컨대 방사면역검정 (RIA), 효소 면역검정 (EIA) 및 샌드위치 경쟁 분석, 및 당해 분야에 공지된 이들의 상이한 변형을 비롯한, 임의의 공지된 방식으로 결정될 수 있다.
- [0197] **폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열**
- [0198] 본 발명의 구조물, 구조물 내부에 포함된 불안정 펩티드 링커 및 제1 및 제2 폴리펩티드는 모두 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0199] 적절하게는 제1 및 제2 폴리펩티드 각각은 서열번호 18 및 서열번호 19로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하거나 더욱 적절하게는 이들로 구성된다.
- [0200] 적절하게는 구조물은 서열번호 7 내지 17 로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하거나 더욱 적절하게는 이들로 구성된다. 적절하게는 구조물은 서열번호 8 내지 11 및 13 내지 16으로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하거나 더욱 적절하게는 이들로 구성된다.
- [0201] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하거나 더욱 적절하게는 이들로 구성된다. 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 서열번호 2 내지 5로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하거나 더욱 적절하게는 이들로 구성된다.

[0202] 불안정 펩티드 링커 이외의 구조물의 영역 내 아미노산 잔기는 폴리펩티드의 기능, 활성 또는 다른 생물학적 특성에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 예상되는 유사한 화학 구조의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 이러한 치환은 "보존적 (conservative)" 치환이다. 이러한 치환은 적절하게는 하기 그룹 내 하나의 아미노산이 동일한 그룹 내 다른 아미노산으로 치환되는 치환이다:

그룹	아미노산 잔기
비-극성 지방족	글리신
	알라닌
	발린
	류신
	이소류신
방향족	페닐알라닌
	티로신
	트립토판
극성 비하전	세린
	트레오닌
	아스파리긴
	글루타민
음으로 하전	아스파르테이트
	글루타메이트
양으로 하전	리신
	아르기닌

[0203]

[0204] 불안정 펩티드 링커를 제외하고, 구조물은 적절하게는 하나 이상의 보존적 치환을 포함할 수 있다.

[0205] 발명의 일 측면에서 본 발명의 구조물을 인코딩하는 핵산이 제공된다.

[0206] 의혹의 소지를 없애기 위해, 단일-문자 아미노산 코드는 다음과 같다:

[0207] G - 글리신 (Gly), P - 프롤린 (Pro), A - 알라닌 (Ala), V - 발린 (Val), L - 류신 (Leu), I - 이소류신 (Ile), M - 메티오닌 (Met), C - 시스테인 (Cys), F - 페닐알라닌 (Phe), Y - 티로신 (Tyr), W - 트립토판 (Trp), H - 히스티딘 (His), K - 리신 (Lys), R - 아르기닌 (Arg), Q - 글루타민 (Gln), N - 아스파리긴 (Asn), E - 글루탐산 (Glu), D - 아스파르트산 (Asp), S - 세린 (Ser), T - 트레오닌 (Thr).

[0208] **다량체**

[0209] 본 발명에 따른 구조물은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함한다. 따라서 본 발명의 구조물은 다량체이고 적절하게는 다가일 수 있다. 이러한 구조물은 동일한 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 2개의 동일한 폴리펩티드로 구성된 구조물은 "호모바이헤드 (homobihead)"이다. 발명의 일 측면에서 2개의 동일한 폴리펩티드를 포함하는 구조물이 제공된다. 대안적으로, 구조물은 서로 다른 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드로 구성될 수 있다 ("헤테로바이헤드 (heterobihead)").

[0210] 구조물은 다가 및/또는 다중특이적일 수 있다. 다가 구조물 (예컨대, 이가 구조물)은 2개 이상의 결합 폴리펩티드를 포함하고, 따라서 항원에의 부착이 적절하게는 불안정 펩티드 링커의 절단 전 또는 후에 일어날 수 있는 2개 이상의 부위를 제공한다. 다가 구조물의 예시는 호모바이헤드 또는 헤테로바이헤드일 수 있다. 이중특이적 구조물과 같은 다중특이적 구조물은 (a) 2개의 상이한 항원에의 부착 또는 (b) 동일한 항원 상의 2개의 상이한 에피토프에의 부착 중 하나가 적절하게는 불안정 펩티드 링커의 절단 전 또는 후에 일어날 수 있는 2개의 부위가 존재하는 2개의 상이한 결합 폴리펩티드를 포함한다. 다중특이적 구조물의 예시는 헤테로바이헤드일 수 있다. 다중특이적 구조물은 다가이다.

[0211] 본 발명의 구조물은 추가의 제3 폴리펩티드 (펩티드 링커에 의해 제1 폴리펩티드에 연결됨)를 포함할 수 있고 또한 추가의 제4 폴리펩티드 (펩티드 링커에 의해 제2 폴리펩티드에 연결됨)를 포함하거나 이로 구성될 수 있으며, 여기서 제3 및 제4 폴리펩티드는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이고 제1 및 제2 폴리펩티드와 관련하여 본원에서 정의된 바와 같다. 4개의 폴리펩티드로 구성된 본 발명의 구조물은 '쿼드라헤드 (quadrahead)'로 알려져 있다. 적절하게는, 펩티드 링커는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이거나 대안적으로 펩티드 링커는 본원에서 정의된 바와 같은 불안정 펩티드 링커이다.

[0212] 적절하게는 제1, 제2, 제3 및/또는 제4 폴리펩티드는 300 kDa 이하, 예컨대 250 kDa, 예컨대 200 kDa, 예컨대 180 kDa, 예컨대 160 kDa, 예컨대 140 kDa, 예컨대 120 kDa, 예컨대 100 kDa, 예컨대 80 kDa, 예컨대 60 kDa의

분자량을 가질 수 있다.

[0213] **위장관 및 소화 효소**

[0214] 위장관 (GIT)은 식품을 섭취하고 소화하며 영양분을 흡수하고 폐기물을 배출하는 장기이다. 인간 및 다른 포유 동물에서, GIT는 식도, 위, 소장 (십이지장, 공장 및 회장) 및 대장 (맹장, 결장, 직장 및 항문관)으로 구성된다. 다양한 병원체가 집락화를 이룰 수 있으며 다양한 질환이 GIT의 상이한 영역에서 나타날 수 있다. 장관은 (위장관과는 달리) 소장 및 대장으로 구성된다.

[0215] 위장관의 상이한 부분은 각각 소화 효소의 복잡한 혼합물을 함유한다. 이들 소화 효소에는 프로테아제, 리파제, 아밀라제 및 뉴클레아제가 포함된다. 프로테아제에는 세린 프로테아제, 트레오닌 프로테아제, 시스테인 프로테아제, 아스파르테이트 프로테아제, 글루탐산 프로테아제 및 메탈로프로테아제가 포함된다. 프로테아제는 아미노산 잔기를 연결하는 펩티드 결합을 분열시킴 (단백질분해)으로써 폴리펩티드 사슬을 더 짧은 단편으로 분해하는데 관여한다. 일부 효소는 단백질 사슬로부터 말단 아미노산을 분리하고 (엑소펩티다제), 다른 효소는 단백질의 내부 펩티드 결합을 공격한다 (엔도펩티다제).

[0216] 단백질분해 (proteolysis)는 고도로 복잡하여 매우 다양한 단백질 기질을 가수분해시킬 수 있다. 이는 장관에서 다양한 종류의 소화된 폴리펩티드를 더 작은 폴리펩티드 단편으로 절단하는 프로테아제의 경우에 그러하다.

[0217] 많은 프로테아제는 전형적으로 기질 상의 단일 아미노산 (불안정 부위)에 결합하고 그래서 그 잔기에 대해서만 특이성을 갖는다. 장관에 존재하는 프로테아제에는 트립신, 트립신-유사 프로테아제, 키모트립신, 키모트립신-유사 프로테아제, 카르복시펩티다제, 엘라스타제, 아미노펩티다제, 카르복시펩티다제 및 엔테로펩티다제가 포함된다. 트립신-유사 프로테아제는 리신 또는 아르기닌 잔기 이후의 펩티드 결합을 절단한다. 키모트립신-유사 프로테아제는 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 류신 및 메티오닌과 같은 소수성 잔기, 특히 티로신, 페닐알라닌 및 트립토판 이후의 펩티드 결합을 절단한다.

[0218] 적절하게는 불안정 펩티드 링커는 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하고, 제1 및 제2 폴리펩티드는 상기 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이고, 상기 하나 이상의 프로테아제는 소장 또는 대장, 더욱 적절하게는 공장, 회장 및/또는 맹장에 존재한다. 적절하게는 하나 이상의 프로테아제는 세린 프로테아제이다. 적절하게는 하나 이상의 프로테아제는 엔테로펩티다제, 트립신, 트립신-유사 프로테아제, 키모트립신 및 키모트립신-유사 프로테아제로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0219] 적절하게는 본 발명의 구조물의 제1 및 제2 폴리펩티드는 장관에 존재하는 모든 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이다. 이러한 프로테아제에는 위장관 공생 균총 또는 병원성 세균으로부터 공급되는 프로테아제가 포함되고, 예를 들면 프로테아제는 세포막-부착 프로테아제, 분비성 프로테아제 및 세포 용해 시 방출되는 프로테아제이다. 적절하게는 장관은 포유동물 장관, 예컨대 인간, 유인원, 쥐, 소, 양 또는 돼지 장관이다.

[0220] **GIT의 질환**

[0221] GIT의 질환은 위장관, 즉 식도, 위, 소장 (십이지장, 공장 및 회장) 및 대장 (맹장, 결장, 직장 및 항문관)을 포함하는 질환을 지칭한다. 본 발명의 구조물은 이러한 질환의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. GIT의 예시적인 질환이 하기에 서술된다.

[0222] GIT의 자가면역 질환 및/또는 염증 질환

[0223] 자가면역 질환은 면역계가 정상적인 신체 조직에 대해 불리하게 반응할 때 발병한다. 자가면역 장애는 신체 조직에의 손상, 비정상적 장기 성장 및/또는 장기 기능의 변화를 초래할 수 있다. 이 장애는 단지 하나의 장기 또는 조직에만 영향을 미칠 수 있거나 또는 복수의 장기 및 조직에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로 자가면역 장애에 의해 영향을 받은 장기 및 조직은 적혈구와 같은 혈액 성분, 혈관, 연결 조직, 갑상샘이나 췌장과 같은 내분비샘, 근육, 관절 및 피부를 포함한다. 염증 질환은 염증을 특징으로 하는 질환이다. 다수의 염증 질환은 자가면역 질환이고 그 반대의 경우도 마찬가지이다.

[0224] 어린이 및 성인 둘 다를 괴롭히는 만성 염증성 장질환 (IBD) 크론병 및 궤양성 대장염은 GIT의 자가면역 및 염증 질환의 예시이다 (Hendrickson et al 2002 *Clin Microbiol Rev* 15(1): 79-94, 그 전체가 참조로서 본원에 포함됨). 궤양성 대장염은 면역 반응 및 형태학적 변화가 결장에 국한되어 남아있는 상태로서 정의된다. 직장이 환자의 95%에서 관련된다. 염증은 주로 점막에 국한되며 궤양, 부종 및 결장의 길이에 따른 출혈을 동반한 다양한 중증도의 지속적인 병발 (involvement)로 이루어진다 (Hendrickson et al 2002 *Clin. Microbiol Rev*

15(1): 79-94, 그 전체가 참조로서 본원에 포함됨). 궤양성 대장염은 보통 배변의 통과 동안에 가장 심각한 하복부 경련과 함께, 대변이 섞인 혈액 및 점액의 존재에 의해 명백해진다. 임상적으로, 혈액과 점액이 섞인 설사의 존재는 궤양성 대장염을 혈액이 존재하지 않는 과민성 대장 증후군과 구별한다. 궤양성 대장염과는 달리, 크론병의 존재는 보통 미미하고, 이는 더 늦은 진단을 초래한다. 병발의 위치, 정도, 및 중증도와 같은 인자가 위장 증후군의 정도를 결정한다. 회장결장 병발을 갖는 환자는 일반적으로 우측 하단 사분면에서의 압통 및 간헐성 염증성 괴 (inflammatory mass)를 동반한 식후 복부 통증을 갖는다.

[0225] 적절하게는 본 발명의 약제학적 조성물 또는 구조물은 크론병, 궤양성 대장염, 과민성 대장 증후군, II형 당뇨병, 사구체신염, 자가면역 간염, 쇼그렌 증후군, 복강 질환 및 약물- 또는 방사선-유도 점막염으로 구성된 목록으로부터 선택되는 GIT의 자가면역 및/또는 염증 질환 (가장 적절하게는 크론병)의 치료에 사용된다.

[0226] GIT의 감염

[0227] 바이러스, 세균, 기생충 및 다른 병원성 감염이 GIT에서 일어날 수 있다. 이들은 신체의 다른 부위로 퍼지기 전에 GIT에 국한되거나 또는 GIT에서 개시될 수 있다. 본 발명의 구조물은 에스케리치아 콜라이, 살모넬라, 캄필로박터, 비브리오 콜레라, 쉬겔라, 클로스트리디움 퍼프린겐스 (*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 디피실레 (*Clostridium difficile*), 바실러스 세레우스, 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 예르시니아 에네로콜리티카를 포함하는 통상의 세균 GIT 병원체에 의한 감염을 포함하는 세균 감염의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 본 발명의 구조물은 로타바이러스, 노로바이러스 및 작은 원형 바이러스를 포함하는 통상의 바이러스 GIT 병원체를 포함하는 바이러스 감염의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 적절하게는 본 발명의 구조물은 병원내 감염의 치료 또는 예방에 사용된다. 적절하게는 본 발명의 구조물은 씨. 디피실레 감염의 치료 또는 예방에 사용된다.

[0228] 적절하게는, 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 장관 내부의 표적과 같은 장관을 통해 접근 가능한 표적에 결합한다. 적절하게는 표적은 장관에 거주하는 병원성 미생물로부터 유래하는 유해제 (deleterious agent)이다. 적절하게는 표적은: 인터류킨 (예컨대, IL-1, IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 및 IL-23), 인터류킨 수용체 (예컨대, IL-6R 및 IL-7R), 전사인자 (예컨대, NF-kB), 사이토카인 (예컨대, TNF-알파, IFN-감마, TGF-베타 및 TSLP), 막횡단 단백질 (예컨대, gp130 및 CD3), 표면 당단백질 (예컨대, CD4, CD20, CD40), 가용성 단백질 (예컨대, CD40L), 인테그린 (예컨대, a4b7 및 AlphaEbeta7), 부착 분자 (예컨대, MAdCAM), 케모카인 (예컨대, IP10 및 CCL20), 케모카인 수용체 (예컨대, CCR2 및 CCR9), 억제 단백질 (SMAD7), 키나아제 (예컨대, JAK3), G 단백질-결합 수용체 (예컨대, 스프링코신-1-P 수용체) 및 독소 (예컨대, 씨. 디피실레 독소 A 및 씨. 디피실레 독소 B)로 구성된 군으로부터 선택되고; 더욱 적절하게는 표적은: TNF-알파, 씨. 디피실레 독소 A, 씨. 디피실레 독소 B, CD3 및 IL-6R; 더욱 적절하게는 TNF-알파 또는 씨. 디피실레 독소 A로 구성된 군으로부터 선택된다. 적절하게는 제1 및 제2 폴리펩티드의 표적은 동일하거나 상이하다.

[0229] 일 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 인터류킨 (예컨대, IL-1, IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 및 IL-23)에 결합하지 않는다.

[0230] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 인터류킨 수용체 (예컨대, IL-6R 및 IL-7R)에 결합하지 않는다.

[0231] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 전사인자 (예컨대, NF-kB)에 결합하지 않는다.

[0232] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 사이토카인 (예컨대, TNF-알파, IFN-감마, TGF-베타 및 TSLP)에 결합하지 않는다.

[0233] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 막횡단 단백질 (예컨대, gp130 및 CD3)에 결합하지 않는다.

[0234] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 표면 당단백질 (예컨대, CD4, CD20 및 CD40)에 결합하지 않는다.

[0235] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 가용성 단백질 (예컨대, CD40L)에 결합하지 않는다.

- [0236] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 인테그린 (예컨대, α4β7 및 AlphaEβ7)에 결합하지 않는다.
- [0237] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 부착 분자 (예컨대, MAdCAM)에 결합하지 않는다.
- [0238] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 케모카인 (예컨대, IP10 및 CCL20)에 결합하지 않는다.
- [0239] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 케모카인 수용체 (예컨대, CCR2 및 CCR9)에 결합하지 않는다.
- [0240] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 억제 단백질 (SMAD7)에 결합하지 않는다.
- [0241] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 키나아제 (예컨대, JAK3)에 결합하지 않는다.
- [0242] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 G 단백질-결합 수용체 (예컨대, 스피고신-1-P 수용체)에 결합하지 않는다.
- [0243] 추가의 실시양태에서 본 발명의 구조물의 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 (예컨대, 제1 및/또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인)는 (예컨대, 씨. 디피실레 독소 A 및 씨. 디피실레 독소 B)에 결합하지 않는다.
- [0244] **치료적 사용 및 전달**
- [0245] 적절하게는 본 발명의 구조물 또는 조성물은 적절하게는 GIT의 질환의 치료 또는 예방에의 사용을 위해, 적절하게는 경구 투여에 의해 투여되는, 의약품으로서 사용된다 (내부 참조). 본 발명의 구조물 또는 조성물은 또한 경구 투여에 의한 대사 장애, 예컨대 비만과 같은 다른 의학적 상태의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 일 실시양태에서, 본 발명의 구조물 또는 조성물은 장관에서 국소 효과를 갖는 것으로 의도된다. 일 실시양태에서, 본 발명의 구조물 또는 조성물은 치료학적 유효량으로 순환계 내로의 전달에 의해 질환의 치료 또는 예방에 사용되지 않는다.
- [0246] 발명의 일 측면에서 본 발명의 구조물 또는 조성물의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 사람에게 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질환 또는 씨. 디피실레 감염을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0247] 본 발명의 구조물의 치료학적 유효량은, 개체에의 단일 또는 복수 용량 투여 시, 선택된 표적의 생물학적 효과를 개체에서 유의미한 정도로 증화시키는데 효과적인 양이다. 치료학적 유효량은 질환 상태, 연령, 성별, 및 개인의 체중, 및 개인에서 목적하는 반응을 유발하는 구조물의 능력과 같은 요인에 따라서 달라질 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 구조물의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 치료학적으로 유익한 효과가 더 큰 경우의 양이다. 본 발명의 구조물은 개체에의 경구 투여에 적합한 약제학적 조성물 내로 포함될 수 있다. 본 발명의 구조물은 약제학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있다.
- [0248] 발명의 일 측면에서 본 발명의 구조물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 단량체 항체 또는 이의 단량체 항원 결합 단편으로 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 본 발명의 구조물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 2개 이상의 단량체 항체 또는 이의 단량체 항원 결합 단편으로 질환을 치료하는 방법이 또한 제공된다.
- [0249] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 전달용으로 제제화된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이들은, 예를 들면, 액체, 반-고체 및 고체 투약 형태, 예컨대 액체 용액, 분산액 또는 현탁액, 정제, 알약 및 분말을 포함한다. 고체 투약 형태가 바람직하다. 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있고, 적절하게는 섭취가능 정제, 불 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 (wafer) 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [0250] 전형적으로, 약제학적 조성물은 본 발명의 구조물 및 담체와 같은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 담체의 예시에는 하나 이상의 물, 식염수, 인산염 완충된 식염수, 벡스트로스, 글리세롤, 에탄올 등의 하나 이상뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제와 같은 미량의 보조 물질을 추가로 포함할 수 있고, 이들은 본 발명의 폴리펩티드 또는 구조물의 유효 기간 또는 효능을 증강시킨다. 약제학적 조성물은 항접착제, 결합제, 코팅제, 붕해제, 향미제, 착색제, 윤활제, 흡착제, 보존제, 감미제, 동결건조 부형제 (동결방지제 포함) 또는 압축 보조제를 포함

할 수 있다. 적절하게는, 본 발명의 구조물은 약제학적 조성물 내로 도입되기 전에 동결건조된다.

- [0251] 적절하게는, 구조물의 제1 및 제2 폴리펩티드는 폴리펩티드 또는 구조물 자체의 내재적 특성으로 인해 장관에 존재하는 모든 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이다.
- [0252] 본 발명의 폴리펩티드는 또한 장용 코팅과 함께 제공될 수 있다. 장용 코팅은 위의 낮은 pH로부터 폴리펩티드를 보호하는 경구 투약 시 적용되는 중합체 장벽이다. 장용 코팅에 사용되는 재료에는 지방산, 왁스, 셸락(shellac), 플라스틱, 및 식물 섬유가 포함된다. 적합한 장용 코팅 성분에는 메틸 아크릴레이트-메타크릴산 공중합체, 셀룰로스 아세테이트 석시네이트, 히드록시 프로필 메틸 셀룰로스 프탈레이트, 히드록시 프로필 메틸 셀룰로스 아세테이트 석시네이트 (히프로멜로스 아세테이트 석시네이트), 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(PVAP), 메틸 메타크릴레이트-메타크릴산 공중합체, 소듐 알지네이트 및 스테아르산이 포함된다. 적합한 장용 코팅은 pH-의존성 방출 중합체를 포함한다. 이들은 위에서 발견되는 고도의 산성 pH에서는 불용성이지만, 덜 산성인 pH에서는 신속히 용해되는 중합체이다. 따라서, 적절하게는, 장용 코팅은 위의 산성액 (pH ~3)에서는 용해되지 않을 것이지만, 소장 (pH 6 초과) 또는 결장 (pH 7.0 초과) 내에 존재하는 더 높은 pH 환경에서는 그렇게 용해될 것이다. pH-의존성 방출 중합체는 본 발명의 구조물이 투약량이 장관의 표적 영역에 도달하는 대략의 시점에 방출될 수 있도록 선택된다.
- [0253] 본 발명의 약제학적 조성물 또는 구조물은 5-50 g/L, 또는 더욱 적절하게는 15-40 g/L 또는 더욱 적절하게는 25-30 g/L의 농도에서, 조성물의 pH를 안정화시키기 위해, 완충제 중에 제제화될 수 있다. 적합한 완충제 성분의 예시에는 소듐 시트레이트 및/또는 시트르산과 같은 생리학적 염이 포함된다. 적절하게는 완충제는 염화나트륨과 같은 생리학적 염을 100-200 mM, 더욱 적절하게는 125-175 mM 함유한다. 적절하게는 완충제는 조성물의 pH 또는 환자의 생리적 pH에 근접한 pKa를 갖는 것으로 선택된다.
- [0254] 약제학적 조성물에서 예시적인 구조물 농도는 약 1 mg/mL 내지 약 200 mg/ml 또는 약 50 mg/mL 내지 약 200 mg/mL, 또는 약 150 mg/mL 내지 약 200 mg/mL의 범위일 수 있다.
- [0255] 본 발명의 구조물 또는 약제학적 조성물의 수성 제제는, 예컨대 약 4.0 내지 약 7.0, 또는 약 5.0 내지 약 6.0의 범위, 또는 대안적으로 약 5.5의 pH에서 pH-완충된 용액 중에 제조될 수 있다. 적합한 완충제의 예시에는 포스페이트-, 히스티딘-, 시트레이트-, 석시네이트-, 아세테이트-완충제 및 다른 유기산 완충제가 포함된다. 완충제 농도는, 예를 들면 완충제 및 제제의 바람직한 긴장성 (tonicity)에 따라서 약 1 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 50 mM일 수 있다.
- [0256] 약제학적 조성물의 긴장성은 긴장성 조절제를 함유함으로써 변경될 수 있다. 이러한 긴장성 조절제는 하전된 또는 비하전된 화학적 종일 수 있다. 전형적인 비하전된 조절제에는 당 또는 당 알코올 또는 다른 폴리올, 바람직하게는 트레할로스, 수크로스, 만니톨, 글리세롤, 1,2-프로판디올, 라피노스, 소르비톨 또는 락티톨 (특히, 트레할로스, 만니톨, 글리세롤 또는 1,2-프로판디올)이 포함된다. 전형적인 하전된 긴장성 조절제에는 소듐염, 포타슘, 또는 칼슘 이온과 클로라이드, 설페이트, 카보네이트, 설파이트, 니트레이트, 락테이트, 석시네이트, 아세테이트 또는 말리에이트 이온과의 조합과 같은 염 (특히 소듐 클로라이드 또는 소듐 설페이트); 또는 아르기닌 또는 히스티딘과 같은 아미노산이 포함된다. 적절하게는, 고장성 또는 저장성 용액이 적합할 수도 있지만 수성 제제는 등장성이다. 용어 "등장성"은, 그것이 비교되는 생리학적 염 용액 또는 혈청과 같은 일부 다른 용액과 동일한 긴장성을 갖는 용액을 지칭한다. 긴장성 제제는 약 5 mM 내지 약 350 mM의 양, 예컨대, 1 mM 내지 500 mM의 양으로 사용될 수 있다. 적절하게는, 적어도 하나의 등장성 제제가 조성물 내에 포함된다.
- [0257] 계면활성제가 또한 제제화된 구조물의 응집 감소 및/또는 제제 내 미립자의 형성 최소화 및/또는 흡착 감소를 위해 약제학적 조성물에 첨가될 수 있다. 예시적인 계면활성제에는 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르 (트윈), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 (브리즈), 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에테르 (트리톤-X), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체 (폴록사머, 플루로닉), 및 소듐 도데실 설페이트 (SDS)가 포함된다. 폴리옥시에틸렌소르비탄-지방산 에스테르의 예시는 폴리소르베이트 20, 및 폴리소르베이트 80이다. 계면활성제의 예시적인 농도는 약 0.001% 내지 약 10% w/v의 범위일 수 있다.
- [0258] 동결건조 과정 동안의 불안정화 상태로부터 본 발명의 구조물을 보호하기 위해 동결방지제가 또한 첨가될 수 있다. 예를 들어, 공지의 동결방지제에는 당 (글루코스, 수크로스, 만노스 및 트레할로스 포함); 폴리올 (만니톨, 소르비톨 및 글리세롤 포함); 및 아미노산 (알라닌, 글리신 및 글루탐산 포함)이 포함된다. 동결방지제는 약 10 mM 내지 500 mM의 양으로 포함될 수 있다.

- [0259] 본 발명의 약제학적 조성물 또는 구조물의 투여를 위한 투약량 범위는 바람직한 치료적 효과를 발휘하게 하는 것들이다. 요구되는 투약량 범위는 약제학적 조성물 또는 구조물의 정확한 특성, 장관의 표적 영역, 제제의 특성, 환자의 연령, 환자 상태의 특성, 정도 또는 중증도, 금기, 만약에 있다면, 주치의의 판단에 좌우된다. 이들 투약량 수준에 있어서의 변화는 최적화를 위한 표준 경험적 관례를 이용하여 조정될 수 있다.
- [0260] 본 발명의 약제학적 조성물 또는 구조물의 적합한 일일 투약량은 체중 1 kg당 50 ng-50 mg, 예컨대 50 µg-40 mg, 예컨대 5-30 mg의 범위이다. 단위 투약량은 100 mg 미만으로부터 달라질 수 있지만, 전형적으로 용량당 250-2000 mg의 영역일 것이고, 이는 매일 또는 더 자주, 예를 들면 하루에 2, 3 또는 4회, 또는 덜 자주, 예를 들면 격일 또는 주 1회 투여될 수 있다.
- [0261] 질환의 치료는 또한 이의 악화의 치료를 포함하고 또한 질환 증상의 재발을 방지하기 위하여 질환 증상으로부터의 회복 상태인 환자의 치료를 포함한다.
- [0262] **조합 요법**
- [0263] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 하나 이상의 활성 제제 (예컨대, 본원에 언급된 것들과 같은 질환을 치료하는데 적합한 활성 제제)를 포함할 수 있다. 세균성, 자가면역 및/또는 염증 질환의 치료에 일반적으로 사용되는 다른 확립된 요법에 대한 보조제로서, 또는 이와 함께 세균 감염, 자가면역 및/또는 염증 질환의 치료를 위한 요법 방법에 본 발명의 약제학적 조성물을 사용하는 것이 발명의 범주에 포함된다.
- [0264] 과민성 장질환 (예컨대, 크론병 또는 궤양성 대장염)의 치료를 위해, 가능한 조합은, 예를 들면: 5-아미노살리실산, 또는 이의 전구약물 (예컨대, 설파살라진, 올살라진 또는 비살라진); 코르티코이드 (예컨대, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 또는 부데소니드); 면역억제제 (예컨대, 사이클로스포린, 타크롤리무스, 메토트렉세이트, 아자티오프린 또는 6-머캅토피린); 항-TNF-알파 항체 (예컨대, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골 또는 골리무맵); 항-IL12/IL23 항체 (예컨대, 우스테키누맵); 항-IL6R 항체 또는 소분자 IL12/IL23 억제제 (예컨대, 아필리모드); 항-알파-4-베타-7 항체 (예컨대, 베들리주맵); MAdCAM-1 차단제 (예컨대, PF-00547659); 세포 부착 분자 알파-4-인테그린에 대한 항체 (예컨대, 나탈리주맵); IL2 수용체 알파 아단위에 대한 항체 (예컨대, 다클리주맵 또는 바실릭시맵); JAK3 억제제 (예컨대, 토포시티닙 또는 R348); Syk 억제제 및 이의 전구약물 (예컨대, 포스타마티닙 및 R-406); 포스포디에스테라제-4 억제제 (예컨대, 테토밀라스트); HMPL-004; 프로바이오틱스; 데르살라진; 세마피모드/CPSI-2364; 및 단백질 키나아제 C 억제제 (예컨대, AEB-071)를 포함하는 목록으로부터 선택되는 하나 이상의 활성 제제와의 조합을 포함한다. 가장 적합한 조합 제제는 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르톨리주맵 페골 또는 골리무맵이다.
- [0265] 클로스트리디움 디피실레와 같은 세균 감염의 치료를 위해, 가능한 조합은, 예를 들면 씨. 디피실레 독소이드 백신, 암피실린, 아목시실린, 반코마이신, 메트로니다졸, 피탁소마이신, 리네졸리드, 니타족사니드, 리팍시민, 라모플라닌, 디피미신, 클린다마이신, 세팔로스포린 (예컨대, 제2 및 제3 세대 세팔로스포린), 플루우로퀴놀론 (예컨대, 가티플록사신 또는 목시플록사신), 마크롤라이드 (예컨대, 에리쓰로마이신, 클라리쓰로마이신, 아지쓰로마이신), 페니실린, 아미노글리코사이드, 트리메토프림-설파메톡사졸, 클로르암페니콜, 테트라사이클린, 이미페넴, 메로페넴, 항균제, 살균제 또는 정균제를 포함하는 목록으로부터 선택되는 하나 이상의 활성 제제와의 조합을 포함한다. 가능한 조합은 또한 프로바이오틱스, 예를 들면 사카로마이세스 보울라드리 (*Saccharomyces boulardii*) 또는 락토바실러스 람노서스 (*Lactobacillus rhamnosus*) GG인 하나 이상의 활성 제제와의 조합을 포함한다.
- [0266] 이제 본 발명의 다른 측면은 하나 이상의 추가의 활성 제제, 예를 들면 상기에 서술된 하나 이상의 활성 제제와 조합된 본 발명의 약제학적 조성물을 제공한다. 발명의 추가의 측면에서, 약제학적 조성물 또는 구조물은 상기 목록으로부터 선택된 적어도 하나의 활성 제제와 연속적으로, 동시에 또는 별개로 투여된다.
- [0267] 유사하게, 본 발명의 다른 측면은:
- [0268] (A) 본 발명의 약제학적 조성물 또는 구조물; 및
- [0269] (B) 하나 이상의 다른 활성 제제를 포함하는 조합 제품을 제공하고,
- [0270] 여기서 성분 (A) 및 (B) 각각은 약제학적으로-허용가능한 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합되어 제제화된다. 본 발명의 이 측면에서, 조합 제품은 단일 (조합) 제제 또는 키트-오브-파트 (kit-of-parts) 중 하나일 수 있다. 따라서, 본 발명의 이 측면은 약제학적으로 허용가능한 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합된, 본 발명의 약제학적 조성물 또는 구조물 및 또 다른 치료제를 포함하는 조합 제제를 포함한다.

- [0271] 본 발명은 또한 하기 성분을 포함하는 키트 오브 파트를 포함하고:
- [0272] (i) 약제학적으로 허용가능한 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합된, 본 발명의 약제학적 조성물 또는 구조물; 및
- [0273] (ii) 약제학적으로 허용가능한 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합된, 하나 이상의 다른 활성 제제를 포함하는 제제,
- [0274] 성분 (i) 및 (ii)는 각각 다른 것과 함께 투여하기에 적합한 형태로 제공된다.
- [0275] 따라서 키트 오브 파트의 성분 (i)은 약제학적으로 허용가능한 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합된 상기 성분 (A)이다. 유사하게, 성분 (ii)는 약제학적으로 허용가능한 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합된 성분 (B)이다. 하나 이상의 다른 활성 제제 (즉, 상기 성분 (B))는, 예를 들면 클로스트리디움 디피실레 감염과 같은 세균 감염, 자가면역 및/또는 염증 질환, 예컨대 IBD (예컨대, 크론병 및/또는 궤양성 대장염)의 치료와 관련하여 상기에 언급된 임의의 제제일 수 있다. 만약 성분 (B)가 1개 초과 추가의 활성 제제인 경우, 이들 추가의 활성 제제는 각각 제제화되거나 성분 (A)와 함께 제제화될 수 있고, 또는 이들은 개별적으로 제제화될 수 있다. 일 실시양태에서 성분 (B)는 하나의 다른 치료제이다. 또 다른 실시양태에서, 성분 (B)는 2개의 다른 치료제이다. 본 발명의 일 측면의 조합 제품 (조합된 제조물 또는 키트-오브-파트 중 하나)은 자가면역 질환 (예컨대, 본원에 언급된 자가면역 질환)의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0276] **백터 및 숙주**
- [0277] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "백터"는 그에 연결되어 있는 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 백터의 일 유형은 플라스미드인데, 이는 그 내로 추가의 DNA 분절이 결합될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA를 지칭한다. 백터의 또 다른 유형은 바이러스 백터인데, 추가의 DNA 분절이 바이러스 게놈 내로 결합될 수 있다. 특정 백터는 이들이 도입된 숙주 세포 내에서 자율 복제를 할 수 있다 (예컨대, 세균 복제 기원을 갖는 세균 백터, 에피솜 포유동물 및 효모 백터). 다른 백터 (예컨대, 비-에피솜 포유동물 백터)는 숙주 세포 내로의 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 그로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 백터는 이들이 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 백터는 본원에서 "재조합 발현 백터" (또는 간단히 "발현 백터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기법에서 유용한 발현 백터는 종종 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "백터"는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 백터의 형태이므로 호환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동일한 기능을 제공하는 바이러스 백터 (예컨대, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연합 바이러스), 및 또한 박테리오파지 및 파지미드 시스템과 같은 그러한 다른 형태의 발현 백터를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명은 또한 본 발명의 구조물을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 간단히 "숙주 세포")는 그 내로 재조합 발현 백터가 도입되어 있는 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손까지 지칭하는 것으로 의도된다.
- [0278] 발명의 일 측면에서 본 발명의 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 cDNA를 포함하는 백터가 제공된다. 발명의 추가의 측면에서 상기 백터로 형질전환된, 본 발명의 구조물을 발현할 수 있는 숙주 세포가 제공된다. 적절하게는 숙주 세포는 아스페르길러스, 사카로마이세스, 클루이베로마이세스, 한세놀라 또는 피치아 속에 속하는 효모, 예컨대 사카로마이세스 세레비지에, 에스케리치아 콜라이 또는 피치아 파스토리스와 같은 효모이다.
- [0279] 불안정 펩티드 링커는 장관 내 존재하는 프로테아제에 의해 절단되지만, 불안정 펩티드 링커가 또한 구조물이 생산되는 숙주 유기체의 프로테아제에 대해서는 실질적으로 내성이라면, 생산 및 편의상 특히 유리하다. 따라서, 본 발명의 일 실시양태에서, 불안정 펩티드 링커는 구조물이 생산되는 숙주 유기체의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성이다.
- [0280] **제조 방법**
- [0281] 본 발명의 구조물은, 예를 들면 문헌 [Green and Sambrook 2012 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4<sup>th</sup> Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 개시된 기법을 이용하여 수득 및 조작될 수 있다.
- [0282] 구체적으로, 인공적 유전자 합성이 본 발명에 따른 구조물을 생산하기 위해 사용될 수 있다 (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, 이들 전체가 본원에 참조로서

포함됨). 본 발명의 구조물을 인코딩하는 유전자는, 예를 들면, 고체상 DNA 합성에 의해 합성적으로 생산될 수 있다. 전체 유전자는 전구 주형 DNA의 요구 없이 드 노보 (de novo)로 합성될 수 있다. 목적하는 올리고뉴클레오티드를 획득하기 위해, 빌딩 블록은 생성물의 서열에 의해 요구되는 순서로 성장하는 올리고뉴클레오티드 사슬에 순차적으로 결합된다. 사슬 조립의 완료 시, 생성물은 고체상으로부터 액체 내로 방출되고, 탈보호되고, 수집된다. 생성물은 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)에 의해 분리되어 목적하는 올리고뉴클레오티드를 고순도로 획득한다 (Verma and Eckstein 1998 *Annu Rev Biochem* 67: 99-134).

[0283] 본 발명의 구조물은 DNA 수준, 즉 항원-결합 폴리펩티드와 같은 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 완전한 폴리펩티드 구조물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 유전적으로 융합될 수 있다. 유전적 경로를 통해 다수의 폴리펩티드를 연결하는 하나의 방식은 불안정 펩티드 링커 코딩 서열을 통해 폴리펩티드 코딩 서열을 연결함에 의해서이다. 예를 들면, 제1 폴리펩티드의 카르복시-말단은 불안정 펩티드 링커 코딩 서열을 통해 그 다음의 폴리펩티드의 아미노-말단에 연결될 수 있다. 이 연결 방식은 트리-, 테트라- 등의 기능적 구조물의 작제를 위해 폴리펩티드를 연결하도록 연장될 수 있다. 다가 (예컨대, 이가) VHH 폴리펩티드 구조물을 생산하는 방법이 W096/34103 (그 전체가 참조로서 본원에 포함됨)에 기술되어 있다.

[0284] 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대해서는 침묵이지만 특정 숙주에서의 번역을 위해서는 바람직한 코돈을 제공하는 구조물을 인코딩하는 DNA 또는 cDNA에 대해 돌연변이가 이루어질 수 있다. 예컨대, *E. coli* 및 에스. 세레비지에에서 핵산의 번역에 바람직한 코돈은 공지되어 있다.

[0285] 구조물의 돌연변이는, 예를 들면 구조물을 인코딩하는 핵산에 대한 치환, 부가 또는 결실에 의해 달성될 수 있다. 구조물을 인코딩하는 핵산에 대한 치환, 부가 또는 결실은, 예를 들면 오류-경향 PCR, 셔플링 (shuffling), 올리고뉴클레오티드-지시 돌연변이 유발, 어셈블리 PCR, PCR 돌연변이 유발, 생체 내 돌연변이 유발, 카세트 돌연변이 유발, 귀납적 앙상블 (recursive ensemble) 돌연변이 유발, 지수적 앙상블 (exponential ensemble) 돌연변이 유발, 부위-특이적 돌연변이 유발 (Ling et al 1997 *Anal Biochem* 254(2): 157-178, 그 전체가 참조로서 본원에 포함됨), 유전자 리어셈블리, 유전자 부위 포화 돌연변이 유발 (Gene Site Saturation Mutagenesis, GSSM), 합성 라이게이션 리어셈블리 (synthetic ligation reassembly, SLR) 또는 이들 방법의 조합을 포함하는, 다수의 방법에 의해 도입될 수 있다. 핵산에 대한 변형, 부가 또는 결실은 또한 재조합, 귀납적 서열 재조합, 포스포티오에이트-변형된 DNA 돌연변이 유발, 우라실-함유 주형 돌연변이 유발, 갭화된 (gapped) 듀플렉스 돌연변이 유발, 점 미스매치 쌍 돌연변이 유발, 복구-결손 숙주 균주 돌연변이 유발, 화학적 돌연변이 유발, 방사붕괴성 (radiogenic) 돌연변이 유발, 결실 돌연변이 유발, 제한-선택 돌연변이 유발, 제한-정제 돌연변이 유발, 앙상블 돌연변이 유발, 키메릭 핵산 다량체 생성, 또는 이들의 조합을 포함하는 방법에 의해 도입될 수 있다.

[0286] VH 및 VHH와 같은 면역글로불린 사슬 가변 도메인을 포함하는 구조물의 발현은 세균, 예를 들면 *E. coli*와 같은 원핵 세포와 같은 적합한 발현 벡터를 사용하여 달성될 수 있다 (예를 들면, 참조로서 본원에 포함되는, W094/04678 및 W096/34103에 기술된 프로토콜에 따름). VH 및 VHH와 같은 면역글로불린 사슬 가변 도메인의 발현은 또한 진핵 세포, 예를 들면 곤충 세포, CHO 세포, Vero 세포 또는 적절하게는 효모 세포, 예컨대 아스페르질러스, 사카로마이세스, 클루이베로마이세스, 한세놀라 또는 피치아 속에 속하는 효모를 사용하여 달성될 수 있다. 적절하게는 *S. 세레비지에*가 사용된다 (예를 들면, 참조로서 본원에 포함되는, W094/025591에 기술된 프로토콜에 따름).

[0287] 적절하게는, 본 발명의 구조물은 W002/48382에 기술된 방법에 따라서, 탄소원을 포함하는 배지 상에서 곰팡이의 성장을 포함하는 효모 (예를 들면, 에스. 세레비지에)와 같은 곰팡이에서 생산될 수 있고, 이때 상기 탄소원의 50-100 wt%는 에탄올이다.

[0288] 발명의 일 측면에서 하기 단계를 포함하는, 본 발명의 구조물의 제조 방법이 제공된다:

- [0289] i) 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 벡터, 예컨대 플라스미드 내로 클로닝하는 단계,
- [0290] ii) 본 발명의 구조물을 생산할 수 있는 세균 세포 또는 효모 세포와 같은 세포를 구조물의 생산을 허용하는 조건하에서 상기 벡터로 형질전환하는 단계,
- [0291] iii) 예컨대 친화도 크로마토그래피에 의해 구조물을 회수하는 단계.

[0292] **조항**

[0293] 발명 및 그의 바람직한 양상을 정의하는 조항의 세트는 하기와 같다:

- [0294] 1. 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 경구 투여에 적합한 구조물로서, 상기 불안정 펩티드 링커가 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하고, 제1 및 제2 폴리펩티드가 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인, 구조물.
- [0295] 2. 제1 조항에 있어서, 제1 폴리펩티드가 항원-결합 폴리펩티드인 것인, 구조물.
- [0296] 3. 제2 조항에 있어서, 항원-결합 폴리펩티드가 항체 또는 이의 항원-결합 단편인 것인, 구조물.
- [0297] 4. 제1 내지 제3 조항 중 어느 하나에 있어서, 제2 폴리펩티드가 항원-결합 폴리펩티드인 것인, 구조물.
- [0298] 5. 제4 조항에 있어서, 제2 항원-결합 폴리펩티드가 항체 또는 이의 항원-결합 단편인 것인, 구조물.
- [0299] 6. 제1 내지 제5 조항 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드가 장관에 존재하는 모든 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인 것인, 구조물.
- [0300] 7. 제1 내지 제6 조항 중 어느 하나에 있어서, 장관이 인간, 유인원, 쥐, 소, 양 또는 돼지 장관과 같은 포유동물 장관인 것인, 구조물.
- [0301] 8. 제1 내지 제7 조항 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 프로테아제가 소장 또는 대장에 존재하는 것인, 구조물.
- [0302] 9. 제8 조항에 있어서, 하나 이상의 프로테아제가 공장, 회장 및/또는 맹장에 존재하는 것인, 구조물.
- [0303] 10. 제8 또는 제9 조항에 있어서, 하나 이상의 프로테아제가 세린 프로테아제인 것인, 구조물.
- [0304] 11. 제1 내지 제10 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 구조물이 생산되는 숙주 유기체의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인 것인, 구조물.
- [0305] 12. 제1 내지 제11 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 트립신 또는 트립신-유사 프로테아제에 대한 절단 부위를 포함하는 것인, 구조물.
- [0306] 13. 제12 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 K 잔기를 포함하는 것인, 구조물.
- [0307] 14. 제1 내지 제13 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 R 잔기를 포함하는 것인, 구조물.
- [0308] 15. 제1 내지 제14 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 임의의 P 잔기를 포함하지 않는 것인, 구조물.
- [0309] 16. 제1 내지 제15 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기가 그의 N-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 차폐 잔기를 갖고, 상기 차폐 잔기가: D 및 E로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0310] 17. 제1 내지 제16 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기가 그의 C-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 차폐 잔기를 갖고, 상기 차폐 잔기가: D 및 E로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0311] 18. 제16 또는 제17 조항에 있어서, 모든 K 및 R 잔기가 이들에 인접한 적어도 하나의 차폐 잔기를 갖는 것인, 구조물.
- [0312] 19. 제1 내지 제18 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 임의의 D 또는 E 잔기를 포함하지 않는 것인, 구조물.
- [0313] 20. 제1 내지 제18 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 C, A, S, N, G, L, I, V, T, M, F, Y, H, K, R, W 및 Q로 구성된 목록으로부터 선택되는 잔기로 구성되는 것인, 구조물.
- [0314] 21. 제20 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 A, G, L, I, V, M, S, T, K 및 R 잔기로 구성된 목록으로부터 선택되는 잔기로 구성되는 것인, 구조물.
- [0315] 22. 제21 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 S, G, K 및 R로 구성된 목록으로부터 선택되는 잔기로 구성

되는 것인, 구조물.

- [0316] 23. 제 1 내지 제15 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기가 그의 N-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 비-차폐 잔기를 갖고, 상기 비-차폐 잔기가: C, A, S, N, G, L, I, V, T, M, F, Y, H, W 및 Q로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0317] 24. 제1 내지 제15 및 제23 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기가 그의 C-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 비-차폐 잔기를 갖고, 상기 비-차폐 잔기가: C, A, S, N, G, L, I, V, T, M, F, Y, H, W 및 Q로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0318] 25. 제23 또는 제24 조항에 있어서, 모든 K 및 R 잔기가 이들에 인접한 적어도 하나의 비-차폐 잔기를 갖는 것인, 구조물.
- [0319] 26. 제23 내지 제25 조항 중 어느 하나에 있어서, 비-차폐 잔기가: A, G, L, I, V, M, S 및 T로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0320] 27. 제26 조항에 있어서, 비-차폐 잔기가: A, G, L, I, V 및 S로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0321] 28. 제27 조항에 있어서, 비-차폐 잔기가: G 및 S로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0322] 29. 제1 내지 제11 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 키모트립신 또는 키모트립신-유사 프로테아제에 대한 절단 부위를 포함하는 것인, 구조물.
- [0323] 30. 제29 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 W, F, Y, L 및 M로 구성된 목록으로부터 선택되는 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 잔기를 포함하는 것인, 구조물.
- [0324] 31. 제30 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 W, F 및 Y로 구성된 목록으로부터 선택되는 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 잔기를 포함하는 것인, 구조물.
- [0325] 32. 제29 내지 제31 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 S, G, W, F, Y, L 및 M으로 구성된 목록으로부터 선택되는 잔기; 예컨대 S, G, W, F 및 Y로 구성되는 것인, 구조물.
- [0326] 33. 제1 내지 제32 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 적어도 3개 잔기, 예컨대 적어도 5개 잔기, 예컨대 적어도 10개 잔기의 길이를 갖는 것인, 구조물.
- [0327] 34. 제1 내지 제33 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 40개 잔기 이하, 예컨대 25개 잔기 이하, 예컨대 15개 잔기 이하의 길이를 갖는 것인, 구조물.
- [0328] 35. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성되는 것인, 구조물:
- [0329]  $[-(G_aS)_x-U_c-B-U'_d-(G_bS)_y-]_z$
- [0330] 여기서
- [0331] a는 1 내지 10이고;
- [0332] b는 1 내지 10이고;
- [0333] U는 D 또는 E이고;
- [0334] U'은 D 또는 E이고;
- [0335] c는 0 내지 7이고;
- [0336] d는 0 내지 7이고;
- [0337] x는 1 내지 10이고;

- [0338] y는 1 내지 10이고;
- [0339] z는 1 내지 10이고;
- [0340] B는 K 또는 R임.
- [0341] 36. 제35 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성되는 것인, 구조물:
- [0342]  $[-(G_aS)_x-B-(G_bS)_y-]_z$
- [0343] 여기서
- [0344] a는 1 내지 10이고;
- [0345] b는 1 내지 10이고;
- [0346] x는 1 내지 10이고;
- [0347] y는 1 내지 10이고;
- [0348] z는 1 내지 10이고;
- [0349] B는 K 또는 R임.
- [0350] 37. 제36 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성되는 것인, 구조물:
- [0351]  $[-(G_4S)_x-B-(G_4S)_y-]_z$
- [0352] 여기서
- [0353] x는 1 내지 10이고;
- [0354] y는 1 내지 10이고;
- [0355] z는 1 내지 10이고;
- [0356] B는 K 또는 R임.
- [0357] 38. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성되는 것인, 구조물:
- [0358]  $-B-(G_aS)_x-B'-$
- [0359] 여기서
- [0360] a는 1 내지 10이고;
- [0361] x는 1 내지 10이고;
- [0362] B는 K 또는 R이고;
- [0363] B'은 K 또는 R임.
- [0364] 39. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성되는 것인, 구조물:
- [0365]  $-B-(G_aS)_x-B'-(G_bS)_y-B' '-$
- [0366] 여기서
- [0367] a는 1 내지 10이고;
- [0368] b는 1 내지 10이고;
- [0369] x는 1 내지 10이고;

- [0370] y는 1 내지 10이고;
- [0371] B는 K 또는 R이고;
- [0372] B'은 K 또는 R이고;
- [0373] B''이 K 또는 R임.
- [0374] 40. 제35 내지 제39 조항 중 어느 하나에 있어서, a가 2 내지 5인 것인, 구조물.
- [0375] 41. 제40 조항에 있어서, a가 4인 것인, 구조물.
- [0376] 42. 제35 내지 제41 조항 중 어느 하나에 있어서, b가 2 내지 5인 것인, 구조물.
- [0377] 43. 제42 조항에 있어서, b가 4인 것인, 구조물.
- [0378] 44. 제35 내지 제43 조항 중 어느 하나에 있어서, x가 1 내지 5인 것인, 구조물.
- [0379] 45. 제44 조항에 있어서, x가 2인 것인, 구조물.
- [0380] 46. 제44 조항에 있어서, x가 1인 것인, 구조물.
- [0381] 47. 제35 내지 제46 조항 중 어느 하나에 있어서, y가 1 내지 5인 것인, 구조물.
- [0382] 48. 제47 조항에 있어서, y가 1인 것인, 구조물.
- [0383] 49. 제47 조항에 있어서, y가 2인 것인, 구조물.
- [0384] 50. 제35 내지 제49 조항 중 어느 하나에 있어서, z가 1 내지 3인 것인, 구조물.
- [0385] 51. 제50 조항에 있어서, z가 1인 것인, 구조물.
- [0386] 52. 제35 내지 제51 조항 중 어느 하나에 있어서, B가 K인 것인, 구조물.
- [0387] 53. 제35 내지 제52 조항 중 어느 하나에 있어서, U가 D인 것인, 구조물.
- [0388] 54. 제35 내지 제53 조항 중 어느 하나에 있어서, U'이 D인 것인, 구조물.
- [0389] 55. 제35 내지 제54 조항 중 어느 하나에 있어서, c가 1인 것인, 구조물.
- [0390] 56. 제35 내지 제55 조항 중 어느 하나에 있어서, d가 1인 것인, 구조물.
- [0391] 57. 제35 내지 제54 조항 중 어느 하나에 있어서, c가 0인 것인, 구조물.
- [0392] 58. 제35 내지 제55 또는 제57 조항 중 어느 하나에 있어서, d가 0인 것인, 구조물.
- [0393] 59. 제35 내지 제54 조항 중 어느 하나에 있어서, c가 4이고 d가 0인 것인, 구조물.
- [0394] 60. 제35 내지 제59 조항 중 어느 하나에 있어서, B'이 K인 것인, 구조물.
- [0395] 61. 제35 내지 제60 조항 중 어느 하나에 있어서, B'이 K인 것인, 구조물.
- [0396] 62. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성되는 것인, 구조물:  

$$[-(G_aS)_x-J-(G_bS)_y-]_z$$
- [0397] 여기서
- [0399] a는 1 내지 10이고;
- [0400] b는 1 내지 10이고;
- [0401] x는 1 내지 10이고;
- [0402] y는 1 내지 10이고;
- [0403] z는 1 내지 10이고;
- [0404] J는 W, F, Y, L 또는 M임.

- [0405] 63. 제62 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성되는 것인, 구조물:
- [0406]  $[-(G_4S)_x-J-(G_4S)_y-]_z$
- [0407] 여기서
- [0408] x는 1 내지 10이고;
- [0409] y는 1 내지 10이고;
- [0410] z는 1 내지 10이고;
- [0411] J는 W, F, Y, L 또는 M임.
- [0412] 64. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성되는 것인, 구조물:
- [0413]  $-J-(G_aS)_x-J'-$
- [0414] 여기서
- [0415] a는 1 내지 10이고;
- [0416] x는 1 내지 10이고;
- [0417] J는 W, F, Y, L 또는 M이고;
- [0418] J'은 W, F, Y, L 또는 M임.
- [0419] 65. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하거나 더 적절하게는 이로 구성되는 것인, 구조물:
- [0420]  $-J-(G_aS)_x-J'-(G_bS)_y-J''-$
- [0421] 여기서
- [0422] a는 1 내지 10이고;
- [0423] b는 1 내지 10이고;
- [0424] x는 1 내지 10이고;
- [0425] y는 1 내지 10이고;
- [0426] J는 W, F, Y, L 또는 M이고;
- [0427] J'은 W, F, Y, L 또는 M이고;
- [0428] J''은 W, F, Y, L 또는 M임.
- [0429] 66. 제62 내지 제65 조항 중 어느 하나에 있어서, a가 2 내지 5인 것인, 구조물.
- [0430] 67. 제66 조항에 있어서, a가 4인 것인, 구조물.
- [0431] 68. 제62 내지 제67 조항 중 어느 하나에 있어서, b가 2 내지 5인 것인, 구조물.
- [0432] 69. 제68 조항에 있어서, b가 4인 것인, 구조물.
- [0433] 70. 제62 내지 제69 조항 중 어느 하나에 있어서, x가 1 내지 5인 것인, 구조물.
- [0434] 71. 제70 조항에 있어서, x가 2인 것인, 구조물.
- [0435] 72. 제70 조항에 있어서, x가 1인 것인, 구조물.
- [0436] 73. 제62 내지 제72 조항 중 어느 하나에 있어서, y가 1 내지 5인 것인, 구조물.
- [0437] 74. 제73 조항에 있어서, y가 1인 것인, 구조물.

- [0438] 75. 제73 조항에 있어서, y가 2인 것인, 구조물.
- [0439] 76. 제62 내지 제75 조항 중 어느 하나에 있어서, z가 1 내지 3인 것인, 구조물.
- [0440] 77. 제76 조항에 있어서, z가 1인 것인, 구조물.
- [0441] 78. 제62 내지 제77 조항 중 어느 하나에 있어서, J가 W, F 또는 Y인 것인, 구조물.
- [0442] 79. 제62 내지 제78 조항 중 어느 하나에 있어서, J'이 W, F 또는 Y인 것인, 구조물.
- [0443] 80. 제62 내지 제79 조항 중 어느 하나에 있어서, J''이 W, F 또는 Y인 것인, 구조물.
- [0444] 81. 제1 내지 제80 조항 중 어느 하나에 있어서, 제1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 장관을 통해 접근 가능한 제1 표적, 예컨대 장관 내부의 표적에 결합하는 것인, 구조물.
- [0445] 82. 제81 조항에 있어서, 제1 표적이 장관에 거주하는 병원성 미생물로부터 유래하는 제1 유해제인 것인, 구조물.
- [0446] 83. 제81 조항에 있어서, 제1 표적이: TNF-알파, 씨. 디피실레 독소 A, 씨. 디피실레 독소 B, CD3 또는 IL-6R로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0447] 84. 제83 조항에 있어서, 제1 표적이: TNF-알파 또는 씨. 디피실레 독소 A로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0448] 85. 제81 조항에 있어서, 제2 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 장관을 통해 접근 가능한 제2 표적, 예컨대 장관 내부의 표적에 결합하는 것인, 구조물.
- [0449] 86. 제85 조항에 있어서, 제2 표적이 장관에 거주하는 병원성 미생물로부터 유래하는 제2 유해제인 것인, 구조물.
- [0450] 87. 제85 조항에 있어서, 제2 표적이: TNF-알파, 씨. 디피실레 독소 A, 씨. 디피실레 독소 B, CD3 또는 IL-6R로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0451] 88. 제87 조항에 있어서, 제2 표적이: TNF-알파 또는 씨. 디피실레 독소 A로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0452] 89. 제81 내지 제88 조항 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 표적이 동일한 것인, 구조물.
- [0453] 90. 제81 내지 제88 조항 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 표적이 상이한 것인, 구조물.
- [0454] 91. 제1 내지 제90 조항 중 어느 하나에 있어서, 항원-결합 단편이: VL, V-NAR, scFv, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, 또는 VHH 및 VH와 같은 면역글로불린 사슬 가변 도메인으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0455] 92. 제91 조항에 있어서, 항원-결합 단편이 VHH인 것인, 구조물.
- [0456] 93. 제91 조항에 있어서, 항원-결합 단편이 VH인 것인, 구조물.
- [0457] 94. 제1 내지 제93 조항 중 어느 하나에 있어서, 구조물 질량의 적어도 20%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 100%가 분변 프로테아제 어세이 (Faecal Protease Assay) 및/또는 트립신 프로테아제 어세이 및/또는 키모트립신 프로테아제 어세이에서의 혼합 후 적어도 10분, 예컨대 적어도 20분, 예컨대 적어도 30분 후에 비절단된 상태로 남아있는 것인, 구조물.
- [0458] 95. 제1 조항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드 각각이 서열번호 18 및 서열번호 19로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인, 구조물.
- [0459] 96. 제95 조항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드 각각이 서열번호 18 및 서열번호 19로 구성된 군으로부터 선택되는 서열로 구성되는 것인, 구조물.
- [0460] 97. 제 1 조항에 있어서, 구조물이 서열번호 7 내지 17로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인, 구조물.
- [0461] 98. 제97 조항에 있어서, 구조물이 서열번호 7 내지 17로 구성된 군으로부터 선택되는 서열로 구성되는 것인, 구조물.
- [0462] 99. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 서열을

포함하는 것인, 구조물.

- [0463] 100. 제99 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택되는 서열로 구성되는 것인, 구조물.
- [0464] 101. 제1 내지 제94 조항 중 어느 하나에 있어서, 구조물이 펩티드 링커에 의해 제1 폴리펩티드에 연결된 추가의 제3 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제3 폴리펩티드가 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인 것인, 구조물.
- [0465] 102. 제101 조항에 있어서, 구조물이 펩티드 링커에 의해 제2 폴리펩티드에 연결된 추가의 제4 폴리펩티드를 포함하고, 상기 제4 폴리펩티드가 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인 것인, 구조물.
- [0466] 103. 제101 또는 제102 조항에 있어서, 펩티드 링커가 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인 것인, 구조물.
- [0467] 104. 제101 또는 제102 조항에 있어서, 펩티드 링커가 불안정 펩티드 링커인 것인, 구조물.
- [0468] 105. 제1 내지 제104 조항 중 어느 하나에 있어서, 구조물이 장용-코팅되는 것인, 구조물.
- [0469] 106. 제1 내지 제105 조항 중 어느 하나에 따른 구조물 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0470] 107. 제1 내지 제106 조항 중 어느 하나에 있어서, 의약품으로 사용하기 위한 구조물 또는 조성물.
- [0471] 108. 제107 조항에 있어서, 의약품이 경구 투여에 의해 투여되는 것인, 구조물 또는 조성물.
- [0472] 109. 제108 조항에 있어서, GIT의 질환의 치료에 사용하기 위한 구조물 또는 조성물.
- [0473] 110. 제109 조항에 있어서, 자가면역 및/또는 염증 질환의 치료에 사용하기 위한 구조물 또는 조성물.
- [0474] 111. 제110 조항에 있어서, 크론병 및/또는 궤양성 대장염과 같은 염증성 장질환의 치료에 사용하기 위한 구조물 또는 조성물.
- [0475] 112. 제109 조항에 있어서, 씨. 디피실레 감염과 같은 세균 감염의 치료에 사용하기 위한 구조물 또는 조성물.
- [0476] 113. 제1 내지 제104 조항 중 어느 하나에 따른 구조물을 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산.
- [0477] 114. 제1 내지 제106 조항 중 어느 하나의 구조물 또는 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 사람에게 투여하는 것을 포함하는 자가면역 질환을 치료하는 방법.
- [0478] 115. 제1 내지 제106 조항 중 어느 하나의 구조물 또는 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 사람에게 투여하는 것을 포함하는 씨. 디피실레 감염과 같은 세균 감염을 치료하는 방법.
- [0479] 116. 제1 내지 제106 조항 중 어느 하나의 구조물 또는 조성물을 이를 필요로 하는 사람에게 투여하는 것을 포함하는, 단량체 폴리펩티드를 이용해 질환을 치료하는 방법.
- [0480] 117. 제1 내지 제106 조항 중 어느 하나의 구조물 또는 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 2개 이상의 단량체 폴리펩티드를 이용해 질환을 치료하는 방법.
- [0481] 118. 제1 내지 제106 조항 중 어느 하나의 구조물 또는 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 2개 이상의 단량체 폴리펩티드를 이용해 2개 이상의 질환을 치료하는 방법.
- [0482] 119. 제114 내지 제118 조항 중 어느 하나에 있어서, 질환이 자가면역 질환 및/또는 염증 질환 또는 GIT 감염인 것인, 방법.
- [0483] 120. 하기를 포함하는, 제1 내지 제104 조항 중 어느 하나에 따른 구조물의 불안정성 (lability)을 분석하는 방법: (a) 예컨대 실시예 1의 트립신 프로테아제 어세이, 실시예 2의 키모트립신 프로테아제 어세이 또는 실시예 3의 분변 프로테아제 어세이를 수행함으로써 트립신을 포함하는 용액, 키모트립신, 분변 상청액, 소장 체액을 포함하는 용액, 또는 엔테로펩티다제를 포함하는 용액 중에 구조물을 인큐베이션하는 단계, 그 후에 (b) 인큐베이션의 하나 이상의 기간 후 절단된 구조물의 비율을 확인하는 단계.
- [0484] 121. 제120 조항에 있어서, 불안정성의 수준이 실시예 1의 트립신 프로테아제 어세이, 실시예 2의 키모트립

신 프로테아제 어세이 또는 실시예 3의 분변 프로테아제 어세이에서의 혼합 후 적어도 10분, 예컨대 적어도 20분, 예컨대 적어도 30분 후에 비절단된 상태로 남아있는 구조물의 퍼센트인 것인, 방법.

- [0485] 122. 하기 단계를 포함하는, 단량체 항체 또는 이의 단량체 항원 결합 단편을 장관의 표적 영역에 전달하는 방법: (a) 제120 또는 제121 조항에 따른 방법을 수행하는 단계, 그 후에 (b) 장관의 표적 영역에 대해 적합한 수준의 불안정성을 갖는 구조물을 선택하는 단계, (c) 장용 코팅된 패키징을 이용해 선택된 구조물을 생산하는 단계, 그 후에 (d) 패키징된 선택된 구조물을 개체에 투여하는 단계.
- [0486] 123. 제1 내지 제106 조항 중 어느 하나의 구조물 또는 조성물을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 장관에 단량체 폴리펩티드를 전달하는 방법.
- [0487] 124. 제116 내지 제119 또는 제122 내지 제123 조항 중 어느 하나에 있어서, 개체가 인간과 같은 포유동물인 것인, 방법.
- [0488] 125. 선택된 제1 내지 제104 조항 중 어느 하나에 따른 구조물을 포함하는 제품을 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 제품 내로 선택된 구조물을 부가하는 것을 포함하고, 상기 선택된 구조물은: (a) 제120 또는 제121 조항에 따른 방법을 수행하는 단계, 그 후에 (b) 장관의 표적 영역에 대해 적합한 수준의 불안정성을 갖는 구조물을 선택하는 단계를 포함하는 방법에 의해 선택되고 생산되는 것인, 방법.
- [0489] 126. 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6을 포함하는 폴리펩티드.
- [0490] 127. 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36을 포함하는 폴리뉴클레오티드.
- [0491] **추가 조항**
- [0492] 발명 및 그의 바람직한 양상을 정의하는 추가 조항의 세트는 하기와 같다:
- [0493] 1. 불안정 펩티드 링커에 의해 연결된 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 경구 투여에 적합한 구조물로서, 불안정 펩티드 링커가 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 대해 불안정하고, 제1 및 제2 폴리펩티드가 하나 이상의 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인, 구조물.
- [0494] 2. 제 2조항에 있어서, 제1 폴리펩티드가 항원-결합 폴리펩티드이고 제2 폴리펩티드가 항원-결합 폴리펩티드인 것인, 구조물.
- [0495] 3. 제1 또는 제2 조항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드가 장관에 존재하는 모든 프로테아제에 대해 실질적으로 내성인 것인, 구조물.
- [0496] 4. 제1 내지 제3 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개, 예컨대 적어도 6개, 예컨대 적어도 7개, 예컨대 적어도 8개, 예컨대 적어도 9개, 예컨대 적어도 10개의 K 및/또는 R 잔기를 포함하는 것인, 구조물.
- [0497] 5. 제1 내지 제4 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기가 그의 N-말단 및/또는 C-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 차폐 잔기를 갖고, 상기 차폐 잔기가: D 및 E로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0498] 6. 제1 내지 제4 조항 중 어느 하나에 있어서, 불안정 펩티드 링커 내부에 포함된 모든 K 또는 R 잔기가 그의 N-말단 및/또는 C-말단 측면에 적어도 1개, 예컨대 적어도 2개, 예컨대 적어도 3개, 예컨대 적어도 4개, 예컨대 적어도 5개의 비-차폐 잔기를 갖고, 상기 비-차폐 잔기가: C, A, S, N, G, L, I, V, T, M, F, Y, H, W 및 Q로 구성된 목록으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0499] 7. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 구조물:
- [0500]  $[-(G_aS)_x-U_c-B-U'_d-(G_bS)_y-]_z$
- [0501] 여기서
- [0502] a는 1 내지 10이고;

- [0503] b는 1 내지 10이고;
- [0504] U는 D 또는 E이고;
- [0505] U'은 D 또는 E이고;
- [0506] c는 0 내지 7이고;
- [0507] d는 0 내지 7이고;
- [0508] x는 1 내지 10이고;
- [0509] y는 1 내지 10이고;
- [0510] z는 1 내지 10이고;
- [0511] B는 K 또는 R임.
- [0512] 8. 제7 조항에 있어서, c 및 d가 둘 다 0인 것인, 구조물.
- [0513] 9. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 구조물:
- [0514]  $-B-(G_aS)_x-B'-$
- [0515] 여기서
- [0516] a는 1 내지 10이고;
- [0517] x는 1 내지 10이고;
- [0518] B는 K 또는 R이고;
- [0519] B'은 K 또는 R임.
- [0520] 10. 제 1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인, 구조물:
- [0521]  $-B-(G_aS)_x-B'-(G_bS)_y-B''-$
- [0522] 여기서
- [0523] a는 1 내지 10이고;
- [0524] b는 1 내지 10이고;
- [0525] x는 1 내지 10이고;
- [0526] y는 1 내지 10이고;
- [0527] B는 K 또는 R이고;
- [0528] B'은 K 또는 R이고;
- [0529] B''이 K 또는 R임.
- [0530] 11. 제1 조항에 있어서, 불안정 펩티드 링커가 하기 포맷의 폴리펩티드 서열을 포함하는 것인 구조물:
- [0531]  $[-(G_aS)_x-J-(G_bS)_y-]_z$
- [0532] 여기서
- [0533] a는 1 내지 10이고;
- [0534] b는 1 내지 10이고;
- [0535] x는 1 내지 10이고;
- [0536] y는 1 내지 10이고;
- [0537] z는 1 내지 10이고;

- [0538] J는 W, F, Y, L 또는 M; 예컨대 W, F 또는 Y임.
- [0539] 12. 제7 내지 제11 조항 중 어느 하나에 있어서, a가 4이고, b가 4이고, z가 1인 것인, 구조물.
- [0540] 13. 제1 내지 제12 조항 중 어느 하나에 있어서, 항원-결합 단편이: VL, V-NAR, scFv, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, 또는 VHH 및 VH와 같은 면역글로불린 사슬 가변 도메인으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 구조물.
- [0541] 14. 경구 투여에 의해 투여되는 GIT 질환의 치료를 위한 의약품으로 사용하기 위한 제1 내지 제13 조항 중 어느 하나에 따른 구조물을 포함하는 약제학적 조성물.
- [0542] 15. 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6을 포함하는 폴리펩티드.
- [0543] 본 발명은 이제 하기 비-제한적인 실시예에 의해 추가로 기술될 것이다.
- [0544] **실시예 1: 트립신 프로테아제 어세이**
- [0545] 불안정 펩티드 링커의 불안정성을 시험하기 위해, 트립신 프로테아제 어세이를 개발하였다. 이 어세이는 하기와 같이 수행된다.
- [0546] L-1-토실아미도-2-페닐에틸 클로로메틸 케톤 (TPCK)-처리된 트립신-아가로스 비드 (소 체장 유래 트립신; T4019; Sigma Aldrich)의 완충된 (10 mM 아세트산, pH 3.2, 0.01% 티메로살 함유) 수성 현탁액이 본 어세이에 사용된다. 비드를 물 (250  $\mu$ l 비드 + 1.25 ml 물)로 3회 세척하고 이어서 트립신 완충제 (TRYP 완충제; 1 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub> [pH 8.0])로 5회 세척하였다. 마지막으로, 수지를 50% (v/v) 현탁액으로서 TRYP 완충제 중에 재현탁한다.
- [0547] 100  $\mu$ l의 2 mg/ml 구조물 용액을 TRYP 완충제 중의 225  $\mu$ l 50% (v/v) 고정된 TPCK-처리된 트립신과 혼합한다. 37°C의 셰이커 (shaker)에서 0, 10, 15, 30, 45 및 60분의 인큐베이션과 같은 시간 간격 후, 샘플을 하기와 같이 취한다: 수지를 500  $\times$ g에서 1분 원심분리 단계에 의해 펠렛화하고, 40  $\mu$ l 샘플을 상청액으로부터 취하고 2 $\times$  샘플 로우딩 완충제 (예컨대, Laemmli 완충제)와 혼합한다. 잔여 현탁액을 다시 혼합하고, 37°C의 셰이커 내로 돌려 놓았다.
- [0548] 분석을 위해, 15  $\mu$ l의 각 샘플을 5  $\mu$ l의 4 $\times$  로우딩 염료와 혼합하고, 10분간 끓이고 15  $\mu$ l를 폴리아크릴아미드 겔 (예컨대, NuPAGE 10% 아크릴아미드 비스-트리스 (Bis-Tris) 겔) 상에서 레인마다 로우딩한다. 겔을 200 V에서 35분간 SDS-MES 완충제 중에서 런닝한다. 겔을 30분간 40% 메탄올, 7% 아세트산 중에서 고정하고 콜로이드성 쿠마시 브릴리안트 블루 (Coomassie Brilliant Blue) 염색으로 밤새 염색하였다. 겔을 영상화 (예컨대, 7초 노출로 ImageQuant LAS4000을 사용함) 전에 물 중에서 탈염시킨다. 절단된 구성 폴리펩티드에 대한 온전한 구조물의 양은 각 시점 레인에서 상응하는 밴드를 비교함으로써 평가될 수 있다.
- [0549] **실시예 2: 키모트립신 프로테아제 어세이**
- [0550] 트립신 비드를 키모트립신 비드로 대체하여 트립신 프로테아제 어세이 프로토콜을 이용할 수 있다.
- [0551] **실시예 3: 분변 추출물 프로테아제 어세이**
- [0552] 불안정 펩티드 링커의 불안정성을 시험하기 위해, 분변 추출물 프로테아제 어세이를 개발하였다. 분변 추출물은 특히 대장을 표적하는 폴리펩티드에 대한 생리학적 관련 매트릭스이다. 이 어세이는 하기와 같이 수행된다.
- [0553] 다수의 개인으로부터의 인간 분변 샘플을 1 g의 분변당 1, 2 또는 3 mL 1 $\times$  PBS의 비율로 1 $\times$  PBS의 첨가를 이용해 슬러리로 전환시킨다. 이어서 슬러리를 (하나의 풀이 다수의 개인의 분변으로부터의 조합된 프로테아제 산출량을 나타내도록) 풀링시키고 (pooled), 원심분리하고 상청액을 제거하고, 분주하고 -70°C에서 저장한다. 이 과정은 임의의 세포성 재료를 포함하는 분변 매트릭스를 제거한다. 분해를 위해, 구조물을 BSA 담체의 부재 하에서 60분간 37°C에서 풀링된 인간 분변 상청액 중에 160.16  $\mu$ g/ml의 농도로 인큐베이션한다. 분액을 0, 10, 30 및 60분과 같은 시간 간격 후 취하고 프로테아제 중지 용액 (1 $\times$  PBS + 2 $\times$  프로테아제 억제제 각테일 (Sigma) + 1% PMSF) 중에 1:1로 혼합하고 -80°C에서 즉시 냉동시킨다.
- [0554] 분석을 위해, 샘플을 해동시키고 15  $\mu$ l의 각 샘플을 5  $\mu$ l 4 $\times$  로우딩 염료와 혼합하고, 10분간 끓인 후 15  $\mu$ l를 폴리아크릴아미드 겔 (예컨대, NuPAGE 10% 아크릴아미드 비스-트리 겔) 상에서 레인마다 로우딩한다. 겔을 35분간 200 V로 SDS-MES 완충제 중에서 런닝시킨다. 겔을 40% 메탄올, 7% 아세트산으로 30분간 고정하고 콜로이드성 쿠마시 브릴리안트 블루로 밤새 염색한다. 겔을 영상화 (예컨대, 7초 노출로 ImageQuant LAS4000을 사

용함) 전에 물 중에서 탈염하였다. 절단된 구성 폴리펩티드에 대한 온전한 구조물의 양은 각 시점 레인에서 상응하는 더 높고 더 낮은 분자량 밴드를 비교함으로써 평가될 수 있다.

[0555] **실시예 4: 구조물의 생산**

[0556] (a) 에스. 세레비지에에서 발현된 2개의 항-TcdA (클로스트리디움 디피실레 독소 A) ICVDs 및 (b) *E. coli*에서 발현된 2개의 항-TNF-알파 ICVDs 중 하나를 연결하는 다양한 상이한 링커 서열을 포함하는 호모바이헤드 구조물을 고안하였다. 항-TcdA 구조물은 상이한 링커에 의해 분리된, ICVD ID1A의 호모바이헤드였다. 항-TNF-알파 구조물은, 또한 Flag-6His 태그를 포함하는, 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는, ICVD ID5F의 호모바이헤드였다.

[0557] 항-TcdA 구조물

[0558] 호모바이헤드 구조물 ID3A, ID4A 및 ID25A 내지 ID28A를 에스. 세레비지에로부터 발현시켰다. 이들 구조물은 양쪽 말단에 아무런 단백질 태그도 가지고 있지 않다. 불안정 펩티드 링커를 포함하는 ID25A 내지 ID28A를 주형으로서 ID1A 인코딩 DNA를 사용한 오버랩 (overlap) PCR에 의해 생성하고 *E. coli* 및 에스. 세레비지에에서 복제할 수 있는 서플 벡터 pUR4547 (BAC)의 SacI/HindIII 부위 내로 클로닝하였다. 에스. 세레비지에로부터의 발현, 및 상청액 내로의 완전한 분비는 갈락토스 유도를 통해 서플 벡터로부터 달성되었다. 마지막으로, 구조물을 Capto S 양이온 교환 수지 (GE)를 사용하여 정제하고 1× PBS 내로 투석하였다.

[0559] 에스. 세레비지에에서의 발현 및 후속 저장은 상기에 기술된 바와 같은 효모 발현 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0560] 항-TNF-알파 구조물

[0561] ID55F 내지 ID60F를 벡터 pMEK222 (QVQ)의 SfiI/BstEII 부위 내로 직접 클로닝하였다. ID55F 내지 ID60F는 C-말단 Flag-6His 태그를 보유한다. 결과의 플라스미드를 발현 및 원형질로의 운송을 위해 *E. coli* BL21 DE3 (Novagen) 내로 형질전환하였다. 자가유도 (Autoinduction) 배지 테리픽 브로스 (Terrific broth, Formedium)에서의 밤새 성장 후, 세포를 펠렛화하고, -80°C에서 냉동시키고 1× PBS의 최초 부피의 1/10 중에 재-현탁하여 외막을 파괴하였다. ID55F 내지 ID60F를 His 태그에 결합하는 Ni-NTA 칼럼을 사용한 AKTA Prime FPLC에 의해 상청액으로부터 정제하고, 이어서 이미다졸 용출 및 1× PBS 내로의 투석을 수행하였다.

[0562] 링커의 서열이 하기 표 1에 제공된다.

**표 1**

구조물 명칭	ICVD 표적	링커 서열	링커 서열번호	구조물 서열번호
ID3A	TcdA	GGGSGGGSGGGSGGGGS	1	7
ID25A	TcdA	GGGSKGGGGS	2	8
ID26A	TcdA	GGGSDKGGGGS	3	9
ID27A	TcdA	GGGSDDDKGGGGS	4	10
ID28A	TcdA	KGGGSGGGGSK	5	11
ID4A	TcdA	RGGGSRGGGSR	6	38
ID55F	인간 TNF-알파	GGGSGGGSGGGSGGGGS	1	12
ID57F	인간 TNF-알파	GGGSKGGGGS	2	13
ID58F	인간 TNF-알파	GGGSDKGGGGS	3	14
ID59F	인간 TNF-알파	GGGSDDDKGGGGS	4	15
ID60F	인간 TNF-알파	KGGGSGGGGSK	5	16
ID56F	인간 TNF-알파	RGGGSRGGGSR	6	17

[0564] **실시예 5: 트립신 프로테아제 어세이를 이용한 항-TcdA 구조물의 불안정성의 분석**

[0565] TcdA를 표적하는 실시예 4의 구조물의 불안정성을 실시예 1에서 기술된 트립신 프로테아제 어세이를 이용하여 분석하였다. 어세이의 결과를 도 1 내지 3의 SDS-PAGE 겔에 나타내었는데, 여기서 M = 분자량 마커; 레인 1 = 트립신 비드의 첨가 전 ICVD, 레인 2 = 트립신 분해를 이용한 0분 분해, 레인 3 = 10분 분해, 레인 4 = 25분 분해, 레인 5 = 60분 분해, 레인 6 = 105분 분해 및 레인 7 = 160분 분해이다.

[0566] ID3A는 시험된 모든 기간에 걸쳐서 실질적으로 온전한 상태로 남아있는 것으로 볼 수 있다 (도 1). ID25A (도 2)는 0분과 10분 사이의 인큐베이션 후 매우 신속하게 완전히 절단되었다. ID26A에서 차폐 D 잔기 (도 2)는 0

분과 10분 사이에 링커의 점진적 절단 내지 105분 후의 완전한 절단을 초래하였다. ID28A 링커의 양쪽 말단에 위치한 불안정 잔기 (도 3) 및 ID27A 내 추가의 N-측면 차폐 D 잔기 (도 3) 둘 다는 더 느린 절단을 초래하였고, 160분의 인큐베이션 후에도 여전히 진행 중이었다. 가장 덜 불안정한 것부터 가장 불안정한 것의 구조물 순서는 ID3A>ID28A>ID27A>ID26A>ID25A였다.

[0567] 대략 35 kDa의 분자량에서 런닝된 비절단된 구조물은 초기 시점에 상응하는 레인에서 보인다 (도 2 및 3). 절단된 구조물 (즉, 구성 단량체 ICVD)는 대략 18 kDa의 분자량에서 런닝된 후기 시점에 상응하는 레인에서 보인다. 따라서 이들 겔의 육안 검사로부터, 구조물 ID25A, ID26A, ID27A 및 ID28A 질량의 50% 초과가 트립신 프로테아제 어세이에서의 혼합 후 160분 후에 (또는 일부 경우에는 더 초기에) 제1 및 제2 번역글로불린 사슬 가변 도메인 내로 절단되었음이 명백하다 (레인 7). 이들은 불안정 펩티드 링커를 포함하는 본 발명의 구조물이다.

[0568] 도 1에서 겔의 육안 검사로부터, 눈에 보이는 유일한 유의미한 밴드가 온전한 ID3A 구조물 (대략 37 kDa의 분자량에서 런닝됨)에 상응하는 것들임이 또한 명백하다. 따라서, ID3A는 트립신 프로테아제 어세이에서의 혼합 후 160분 후를 포함하는 임의의 시점에서 제1 및 제2 번역글로불린 사슬 가변 도메인으로 절단되지 않았다 (레인 7). ID3A는 불안정 펩티드 링커를 포함하지 않으며 본 발명에 따른 구조물이 아니다.

[0569] 나아가, 도 2 및 3에서 겔의 육안 검사로부터, 이들 구조물에서 제1 번역글로불린 사슬 가변 도메인 및 제2 번역글로불린 사슬 가변 도메인은 그들 자신이 장관에 존재하는 하나 이상의 프로테아제에 실질적으로 내성임이 명백하다. ICVD 단량체의 단편에 상응하는 눈에 보이는 어떠한 유의미한 밴드 (대략 18 kDa의 분자량에서 런닝된 온전한 단량체)도 없으며, 따라서 번역글로불린 사슬 가변 도메인 질량의 적어도 70%가 트립신 프로테아제 어세이에서의 혼합 후 160분을 포함하는 시험된 모든 시점 후에 명백히 비절단된 상태로 남아있음을 알 수 있다.

[0570] **실시예 6: 분변 프로테아제 어세이를 이용한 항-TcdA 및 항-TNF-알파 구조물의 불안정성 분석**

[0571] TcdA를 표적하고 TNF-알파를 표적하는 실시예 4의 구조물의 불안정성을 실시예 3에 기술된 분변 프로테아제 어세이를 이용하여 분석하였다. 어세이의 결과를 도 4 (항-TcdA 구조물) 및 도 5 (항-TNF-알파 구조물)의 SDS-PAGE 겔에 나타내었다. 레인을 시험된 구조물 및 인큐베이션 기간 (분)에 따라서 표지하였다. 'X'는 아무런 ICVD도 함유하지 않는 레인 (오직 분변 추출물)을 나타낸다. 도 5에서, 'B'는 바이헤드를 나타내고 'M'은 절단된 단량체를 나타낸다.

[0572] 항-TcdA 구조물

[0573] ID3A가 시험된 모든 시점에 걸쳐서 실질적으로 온전한 상태로 남아있음을 도 4로부터 알 수 있다. ID25A는 0분과 10분 사이의 인큐베이션 후 완전히 매우 신속하게 절단되었다. ID26A에서 차폐 D 잔기, ID27A에서 추가의 N-측면 차폐 D 잔기 및 ID28A 링커의 어느 한쪽 말단에 위치한 불안정 잔기 모두는 ID25A와 비교하여 더 느린 절단을 초래하였다. ID26A, ID27A 및 ID28A의 분해는 30분의 인큐베이션 후에도 여전히 진행 중이었다.

[0574] 항-TNF-알파 구조물

[0575] ID55F가 시험된 모든 시점에 걸쳐서 실질적으로 온전한 상태로 남아있음을 도 5로부터 알 수 있다. ID56F는 즉시 전체 절단을 거쳤다. ID57F는 0분과 10분 사이의 인큐베이션 후 완전히 매우 신속하게 절단되었다. ID58F에서 차폐 D 잔기, ID60F 링커의 어느 한쪽 말단에 위치한 불안정 잔기 및 ID59F에서 추가의 N-측면 차폐 D 잔기 모두는 ID57F와 비교하여 더 느린 절단을 초래하였다. ID58F, ID59F 및 ID60F의 분해는 60분의 인큐베이션 후에도 여전히 진행 중이었다.

[0576] 분변 프로테아제 어세이 요약

[0577] 불안정 펩티드 링커의 중심 영역 (그러나 주변 영역은 아님)에서의 리신 잔기가 분변 프로테아제에 대한 불안정성을 증가시키는 것이 분명하다. 불안정성은 플랭킹된 아스파르트레이트 잔기를 사용하여 리신 잔기를 차폐함으로써 감소된다. 분변 프로테아제 어세이에서 시험된 구조물의 불안정성을 하기 표 2 및 3에 요약한다.

**표 2**

[0578]

항-TcdA 구조물 명칭	링커 서열	불안정성	링커 서열번호
ID3A	GGGGSGGGSGGGSGGGGS	실질적으로 절단 부재	1
ID28A	KGGGSGGGGSK	미미한 절단	5
ID26A	GGGSDKDGGGGS	약간 절단	3
ID27A	GGGSDDDDKGGGGS	상당한 절단	4

ID25A	GGGGSKGGGGS	전체 절단	2
-------	-------------	-------	---

표 3

항-TNF-알파 구조물 명칭	링커 서열	불안정성	링커 서열번호
ID55F	GGGSGGGSGGGSGGGGS	실질적으로 절단 부재	1
ID59F	GGGSDDDDKGGGGS	최소 절단	4
ID60F	KGGGSGGGGSK	미미한 절단	5
ID58F	GGGSDKDKGGGGS	약간 절단	3
ID57F	GGGSKGGGGS	전체 절단	2
ID56F	RGGGSRGGGSR	즉각 절단	6

[0580] 실시예 7: 저장 동안 항-TcdA 구조물의 안정성

[0581] 항-TcdA 구조물 (ID3A, ID25A, ID25A, ID27A 및 ID28A)를 저장 동안 시간의 경과에 따라서 이들의 안정성에 대해 시험하였다. 샘플을 4°C에서 0, 2, 4 또는 9일의 냉장 후 취하였다 (도 6 및 7). SDS-PAGE 겔이 비절단된 바이헤드 구조물에 상응하는 밴드를 함유하고 절단된 단량체에 대한 밴드는 함유하지 않음을 알 수 있다. 따라서, 구조물은 이들 조건하에서 적어도 9일간 안정하다.

[0582] 이들 비절단된 구조물은 대략 35 kDa의 분자량으로 런닝되었고 구성 단량체는 대략 18 kDa의 분자량을 가질 것으로 기대될 것이다. 도 6 및 7에서 겔의 육안 검사로부터, 어떠한 유의미한 밴드도 온전한 구조물 자체에 상응하는 35 kDa 밴드보다 더 낮은 분자량에서는 보이지 않으며, 따라서 이들 구조물 질량의 10% 이하가 효모 발현 프로토콜을 사용한 건스트럭트의 제조 후 (0일 저장) 및 2, 4 또는 9일간의 저장 기간 후에 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인으로 절단됨이 명백하다.

[0583] 나아가, 단일 ICVD 단량체의 분자량보다 더 낮은 분자량으로 런닝된 어떠한 유의미한 밴드 (대략 18 kDa으로 런닝)도 도 6 또는 7에서 보이지 않기 때문에 구성 면역글로불린 사슬 가변 도메인이 효모 프로테아제에 대해 실질적으로 내성임이 명백하다. 따라서, 제1 또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인 질량의 10% 이하가 효모 발현 프로토콜을 사용한 제1 또는 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인의 생산 후 (0일 저장) 및 2, 4 또는 9일간의 저장 기간 후에 절단됨이 명백하다.

[0584] 실시예 8: 키모트립신-불안정한 링커를 도입하는 구조물의 생산

[0585] 키모트립신-불안정 부위 (W, F, Y, L 또는 M; 특히 W, F 또는 Y)를 함유하는 다양한 상이한 링커 서열을 포함하는 호모바이헤드 또는 헤테로바이헤드 구조물을 상기 실시예 4에 기술된 것들과 유사한 방법을 이용하여 고안하고 에스. 세레비지에와 같은 적합한 숙주에서 발현시킬 수 있다. 적합한 구조물이 표 4에 제공된다.

표 4

ICVD 표적	링커 서열	링커 서열목록
TcdA	GGGGSYGGGGS	37

[0587] 그 후에 이러한 구조물의 불안정성을 키모트립신 프로테아제 어세이 및 분변 프로테아제 어세이를 이용하여 평가한다.

[0588] 실시예 9: 생산 및 저장 동안 ID4A의 안정성 시험

[0589] 항-TcdA 구조물 ID4A를 효모 발현 프로토콜을 이용하여 에스. 세레비지에에서 발현시켰다. ID4A는 ICVD ID1A의 호모바이헤드이고 양쪽 말단에 임의의 단백질 태그를 보유하지 않는다. 링커의 서열이 상기 표 1에 제공된다.

[0590] ID4A를 생산 및 저장 동안 시간의 경과에 따라서 이들의 안정성을 검사하였다. 샘플을 4°C에서의 0, 2, 4 또는 9일의 냉장 후 취하였다 (도 8). SDS-PAGE 겔의 모든 레인이 절단된 단량체에 상응하는 밴드를 함유하고, 이들 모두가 대략 10 kDa의 분자량으로 런닝되고 어떠한 레인도 비절단된 바이헤드에 상응하는 밴드를 명백히 포함하지 않음을 알 수 있다. ID4A에 사용된 링커가 생산 동안 효모 프로테아제에 의해 절단되었던 것으로 보인다.

[0591] 따라서 도 8에서 겔의 육안 검사로부터, ID4A 질량의 10% 초과 (실제로는, 100%)가 효모 발현 프로토콜을 이용

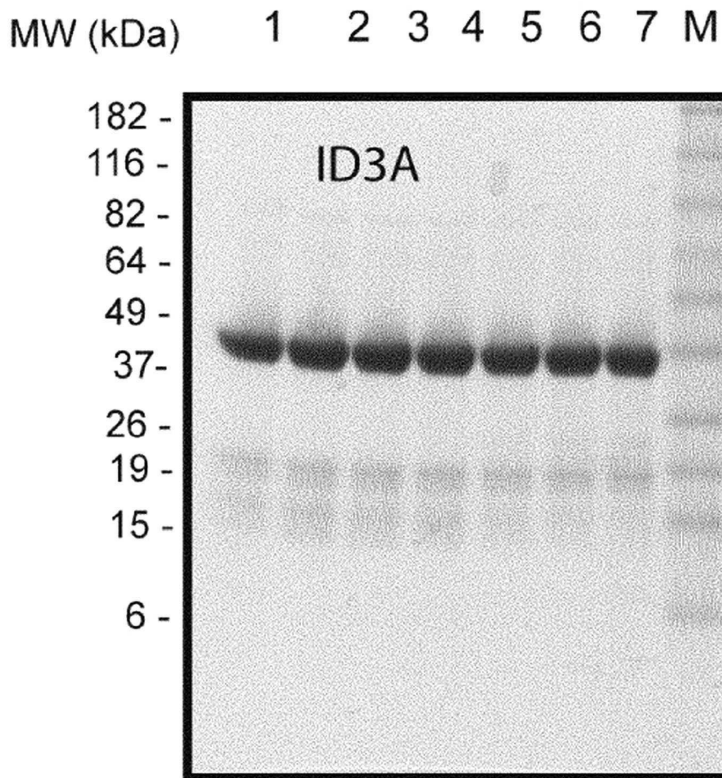
한 구조물의 생산 후 (0일 저장) 제1 및 제2 면역글로불린 사슬 가변 도메인으로 절단됨이 명백하다. 본 발명의 구조물은 효모 프로테아제에 대해 안정하고 따라서 ID4A는 본 발명의 구조물이 아니다.

[0592]

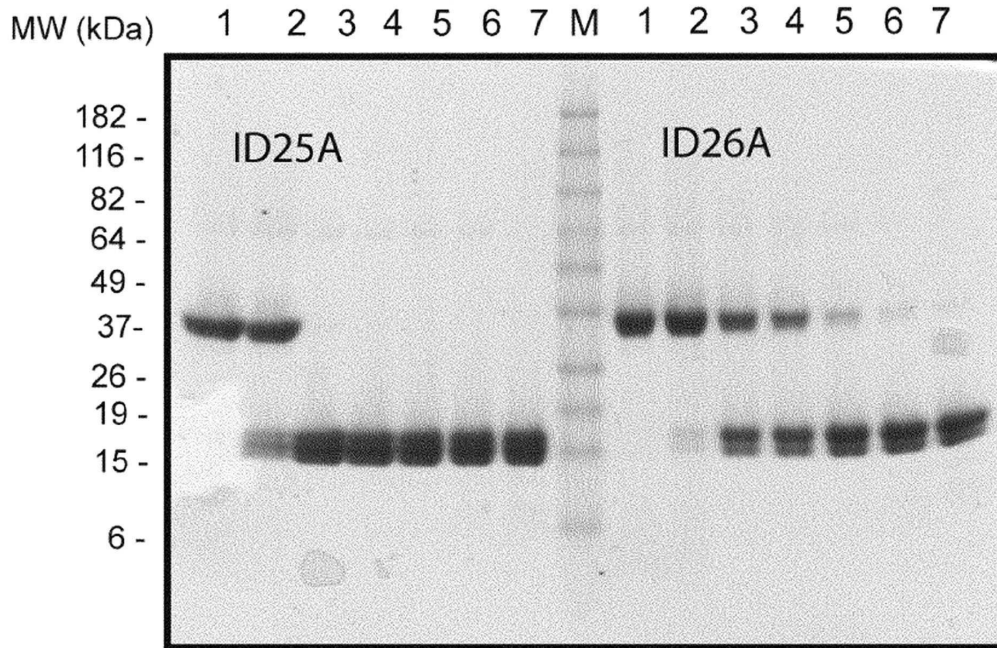
명세서 및 다음의 청구범위 전반에 걸쳐서, 명세서 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단어 '포함하다', 및 '포함한다' 및 '포함하는'과 같은 변형이 언급된 정수, 단계, 정수의 그룹 또는 단계의 그룹을 포함하지만 임의의 다른 정수, 단계, 정수의 그룹 또는 단계의 그룹을 배제하지 않음을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 본 발명의 명세서 전반에 걸쳐서 언급된 모든 특허 및 특허 출원은 참조로서 그 전체가 본원에 포함된다. 본 발명은 바람직한 및 보다 바람직한 그룹 및 적합한 및 보다 적합한 그룹 및 상기에 언급된 그룹의 실시양태의 모든 조합을 포함한다.

**도면**

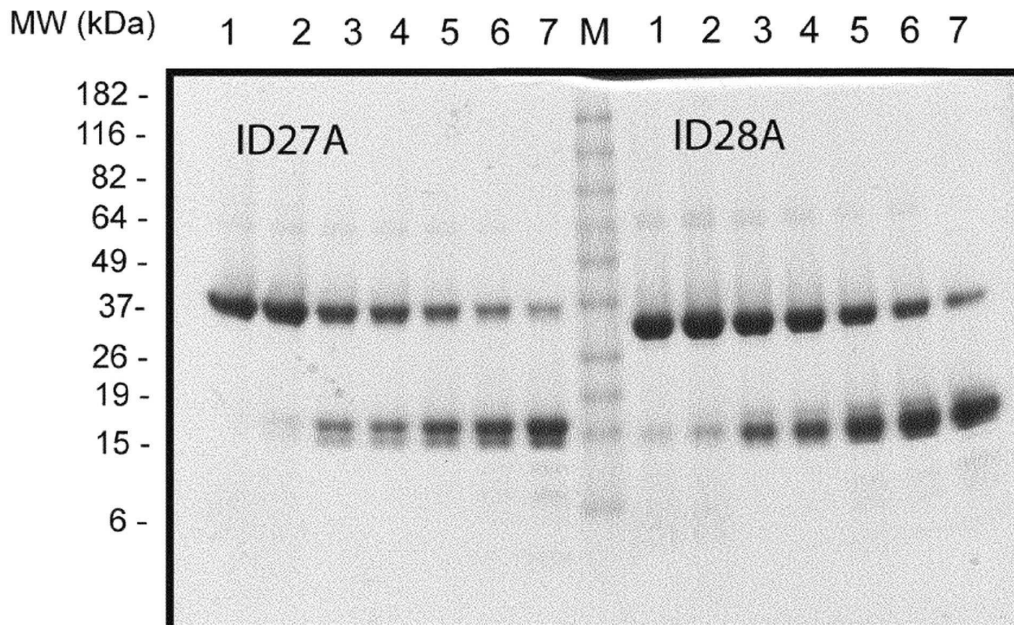
**도면1**



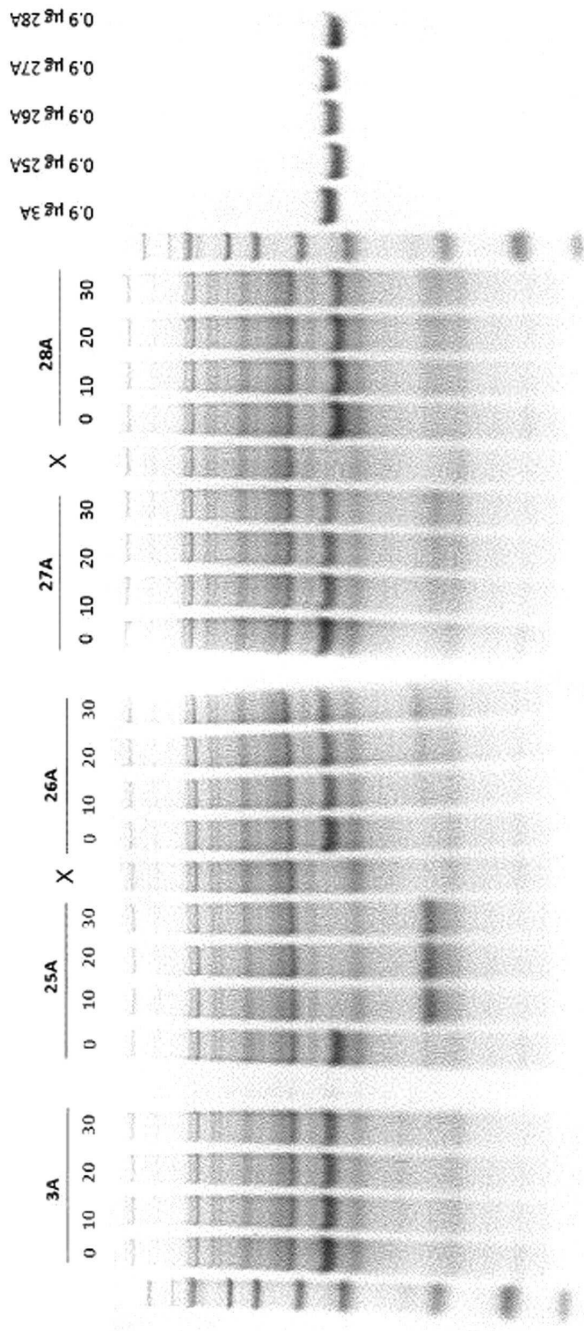
도면2



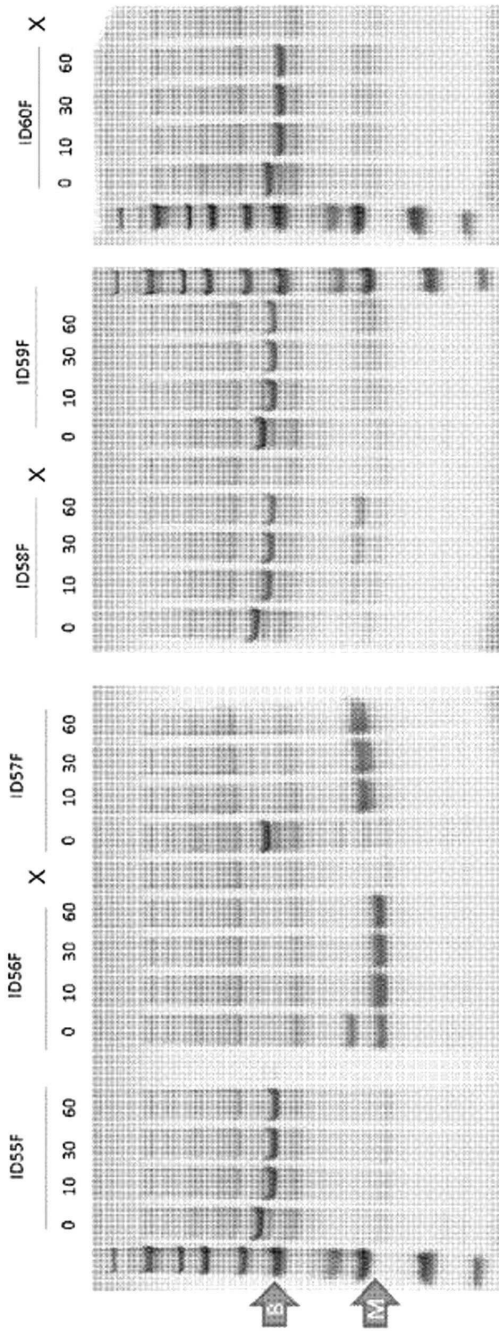
도면3



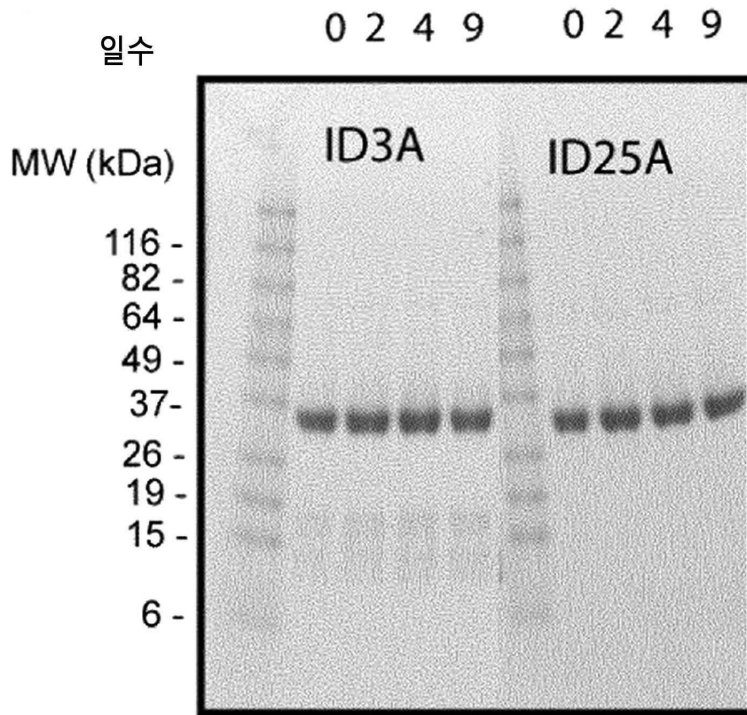
도면4



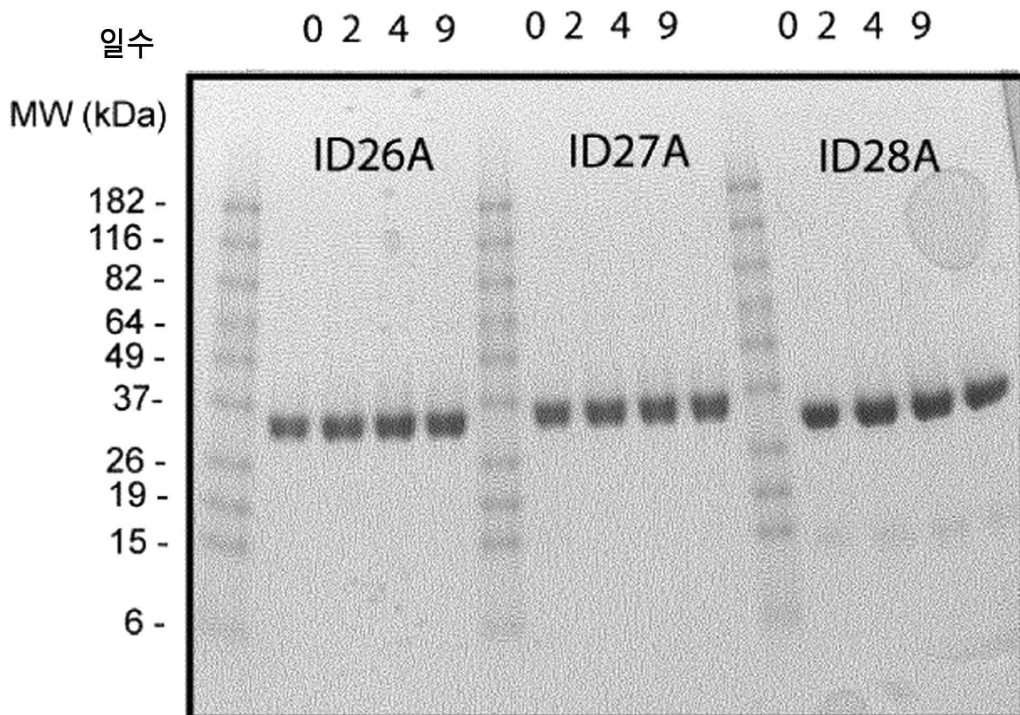
도면5



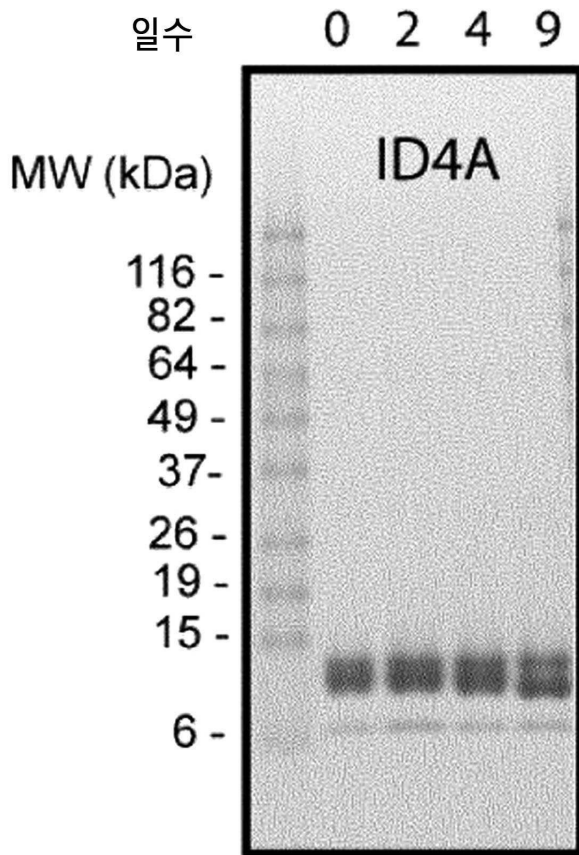
도면6



도면7



도면8



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Vhsquared Limited

<120> PEPTIDE CONSTRUCT HAVING A PROTEASE-CLEAVABLE LINKER

<130> IPA170916-GB

<150> EP15162114.1

<151> 2015-03-31

<150> EP15162115.8

<151> 2015-03-31

<150> EP15162112.5

<151> 2015-03-31

<150> EP16152320.4

<151> 2016-01-21

<160> 38

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of linker used in constructs ID3A and ID55F

<400> 1

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

1                    5                    10                    15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of linker used in constructs ID25A and ID57F

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5                    10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of linker used in constructs ID26A and ID58F

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Asp Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5                    10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of linker used in constructs ID27A and ID59F

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of linker used in constructs ID28A and ID60F

<400> 5

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys

1                    5                    10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of linker used in construct ID56F

<400> 6

Arg Gly Gly Gly Gly Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Arg

1                    5                    10

<210> 7

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of ID3A construct

<400> 7

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

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ile Ser Gly Met Asp Phe Ser His Lys

                  20                    25                    30

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



<223> Polypeptide sequence of ID25A construct

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ile Ser Gly Met Asp Phe Ser His Lys  
                   20                    25                    30

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

Ala Ser Ile Thr Thr Arg Ala Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
                   50                    55                    60

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

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

Ser Glu Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly  
                   100                    105                    110

Gly Gly Gly Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu  
                   115                    120                    125

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
                   130                    135                    140

Val Ile Ser Gly Met Asp Phe Ser His Lys Pro Ala Gly Trp Phe Arg  
 145                    150                    155                    160

Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ser Ile Thr Thr Arg  
                   165                    170                    175

Ala Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
                   180                    185                    190

Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys  
                   195                    200                    205

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys Asn Ser Glu Tyr Tyr Trp Gly  
                   210                    215                    220

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser



Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Glu Met Asn Ser  
 195 200 205

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys Asn Ser Glu Tyr Tyr  
 210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 225 230 235

<210> 10  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polypeptide sequence of ID27A construct  
 <400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ile Ser Gly Met Asp Phe Ser His Lys  
 20 25 30

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

Ala Ser Ile Thr Thr Arg Ala Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

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

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

Ser Glu Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val  
 115 120 125

Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 130 135 140

Arg Leu Ser Cys Val Ile Ser Gly Met Asp Phe Ser His Lys Pro Ala







<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Ser Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr  
                   20                    25                    30  
 Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val  
                   35                    40                    45  
 Ala Ala Val Thr Trp Asn Gly Pro Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                    55                    60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Asp Arg Asn Thr Leu 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 Arg Ser Ser Ile Met Gly Ile Tyr Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu  
                   100                    105                    110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
                   115                    120                    125  
 Ser Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
                   130                    135                    140  
 Gly Leu Val Glu Ser Gly Ala Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser  
                   145                    150                    155                    160  
 Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro  
                   165                    170                    175  
 Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Gly Pro Ser  
                   180                    185                    190  
 Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp  
                   195                    200                    205  
 Asn Asp Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu  
                   210                    215                    220  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Ile Met Gly Ile Tyr  
 225                    230                    235                    240

Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 245 250 255  
 Val Ser Ser

<210> 14

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of ID58F construct

<400> 14

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

1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr

20 25 30  
 Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val

35 40 45  
 Ala Ala Val Thr Trp Asn Gly Pro Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Asp Arg Asn Thr Leu 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 Arg Ser Ser Ile Met Gly Ile Tyr Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu

100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125  
 Ser Asp Lys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser

130 135 140  
 Gly Gly Gly Leu Val Glu Ser Gly Ala Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val

145 150 155 160  
 Thr Ser Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln



Ala Arg Ser Ser Ile Met Gly Ile Tyr Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val  
 130 135 140

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Ser Gly Ala Ser Leu Arg Leu Ser  
 145 150 155 160

Cys Val Thr Ser Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr Gly Met Gly Trp Phe  
 165 170 175

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp  
 180 185 190

Asn Gly Pro Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr  
 195 200 205

Ile Ser Lys Asp Asn Asp Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser  
 210 215 220

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Ile  
 225 230 235 240

Met Gly Ile Tyr Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly  
 245 250 255

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 260

<210> 16

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of ID60F construct

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ala Ala Val Thr Trp Asn Gly Pro Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Asp Arg Asn Thr Leu 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 Arg Ser Ser Ile Met Gly Ile Tyr Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu  
 100 105 110  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Lys Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Leu Val Glu Ser Gly Ala Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr  
 145 150 155 160  
 Ser Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala  
 165 170 175  
 Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Gly Pro  
 180 185 190  
 Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys  
 195 200 205  
 Asp Asn Asp Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro  
 210 215 220  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Ile Met Gly Ile  
 225 230 235 240  
 Tyr Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val  
 245 250 255  
 Thr Val Ser Ser

260

<210> 17

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of ID56F construct

<400> 17

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

1                    5                    10                    15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr

                  20                    25                    30  
Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val

                  35                    40                    45  
Ala Ala Val Thr Trp Asn Gly Pro Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val

                  50                    55                    60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Asp Arg Asn Thr Leu 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 Arg Ser Ser Ile Met Gly Ile Tyr Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu

                  100                    105                    110  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Gly Gly Gly

                  115                    120                    125  
Gly Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser

                  130                    135                    140  
Gly Gly Gly Leu Val Glu Ser Gly Ala Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val

145                    150                    155                    160  
Thr Ser Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln

                  165                    170                    175  
Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Gly

                  180                    185                    190

Pro Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser

195 200 205

Lys Asp Asn Asp Arg Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys

210 215 220

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Ile Met Gly

225 230 235 240

Ile Tyr Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

245 250 255

Val Thr Val Ser Ser

260

<210

> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of ID1A ICVD

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ile Ser Gly Met Asp Phe Ser His Lys

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ser Ile Thr Thr Arg Ala Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 19

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide sequence of ID5F ICVD

<400> 19

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

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly His Ile Phe Lys Leu Tyr

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Gly Pro Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val

                  50                    55                    60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Asp Arg Asn Thr Leu 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 Arg Ser Ser Ile Met Gly Ile Tyr Thr Thr Pro Asp Arg Tyr Glu

                  100                    105                    110

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

                  115                    120

<210> 20

<211> 732

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide sequence encoding ID3A construct

<400> 20

gatgtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tetgagactc        60

tcctgtgtaa tccttggaat ggacttcagt cacaaaccg cgggctgggt cgccaggct        120

ccaggaaaag agcgcgagtt cgtcgttcg attacgactc gtgctagcac gcactatgca        180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtatatcta 240

gaaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt cttgtaactc cgaatactac 300

tggggccagg ggaccacagg caccgtctcc tcaggaggag gcggttcagg cggaggtggc 360

tctggcgggt gcggaagtgg tggaggcggg tcagatgtgc agctgcagga gtctggggga 420

ggcttgggtg agcctggggg gtctctgaga ctctctgtg taatctctgg aatggacttc 480

agtcaaac ccgcgggctg gttccgccag gctccaggaa aagagcgcga gttcgtcgt 540

tcgattacga ctctgctag caccactat gcagactccg tgaagggccg attcaccatc 600

tccagagaca acgccaagaa caccgtatat ctgaaatga acagcctgaa acctgaggac 660

acggccgtct attctttaa ctccgaatac tactggggcc aggggacca ggtcaccgtc 720

tcctcataat ga 732

<210> 21

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide sequence encoding ID25A construct

<400> 21

gatgtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60

tcctgtgtaa tctctggaat ggacttcagt cacaaaccg cgggctggtt ccgccaggct 120

ccaggaaaag agcgcgagtt cgtcgtcttcg attacgactc gtgctagcac gcactatgca 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtatatcta 240

gaaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt cttgtaactc cgaatactac 300

tggggccagg ggaccacagg caccgtctcc tcaggaggag gcggttcaaa aggcggagggt 360

ggctctgatg tgcagctgca ggagctggg ggaggcttgg tgcagcctgg ggggtctctg 420

agactctctt gtgtaatctc tggaaatggac ttcagtcaca aaccgcggg ctggttccgc 480

caggctccag gaaaagagcg cgagttcgtc gtttcgatta cgactcgtgc tagcacgcac 540

tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgcaa gaacacggta 600

tatctagaaa tgaacagcct gaaacctgag gacacggccg tctattcttg taactccgaa 660

tactactggg gccaggggac ccaggtcacc gtctctcat aatga 705

<210> 22

<211> 711

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide sequence encoding ID26A construct

<400> 22

```

gatgtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc      60
tctctgttaa tctctggaat ggacttcagt cacaaaccgc cgggctggtt cgccaggct      120
ccaggaaaag agcgcgagtt cgtcgttcg attacgactc gtgctagcac gcaactatgca      180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtatatcta      240
gaaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt cttgtaactc cgaatactac      300
tggggccagg ggaccaggt caccgtctcc tcaggtggag gcggttcaga taaagacggc      360
ggagggtgct ctgatgtgca gctgcaggag tctgggggag gcttggtgca gcctgggggg      420
tctctgagac tctctgtgt aatctctgga atggacttca gtcacaaacc cgcgggctgg      480
ttccgccagg ctccaggaaa agagcgcgag ttcgtcgtt cgattacgac tcgtgctagc      540
acgcaactatg cagactcctg gaagggccga ttcacatct ccagagacaa cgccaagaac      600

acggtatata tagaaatgaa cagcctgaaa cctgaggaca cggccgtcta ttcttgaac      660
tccgaatact actggggcca ggggaccag gtcaccgtct cctcataatg a              711

```

<210> 23

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide sequence encoding ID27A construct

<400> 23

```

gatgtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc      60
tctctgttaa tctctggaat ggacttcagt cacaaaccgc cgggctggtt cgccaggct      120
ccaggaaaag agcgcgagtt cgtcgttcg attacgactc gtgctagcac gcaactatgca      180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtatatcta      240
gaaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt cttgtaactc cgaatactac      300
tggggccagg ggaccaggt caccgtctcc tcaggtggag gcggttcaga tgacgacgat      360
aaaggcggag gtggctctga tgtgcagctg caggagtctg ggggaggctt ggtgcagcct      420
gggggtctc ttagactctc ctgtgtaatc tctggaatgg acttcagtca caaacccgcg      480

```

ggctggttcc gccaggctcc aggaaaagag cgcgagttcg tgccttcgat tacgactcgt 540  
 gctagcacgc actatgcaga ctccgtgaag ggccgattca ccatctccag agacaacgcc 600  
  
 aagaacacgg tatatctaga aatgaacagc ctgaaacctg aggacacggc cgtctattct 660  
 tgtaactccg aatactactg gggccagggg acccaggtca ccgtctctc ataatga 717  
 <210> 24  
 <211> 708  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding ID28A construct  
 <400> 24  
 gatgtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60  
 tcctgtgtaa tctctggaat ggacttcagt caciaaccgc cgggctggtt ccgccaggct 120  
 ccaggaaaag agcgcgagtt cgtcgcttcg attacgactc gtgctagcac gcactatgca 180  
  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaacac ggtatatcta 240  
 gaaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt cttgtaactc cgaatactac 300  
 tggggccagg ggaccagggt caccgtctcc tcaaaagggt gaggcgggtc aggcggaggt 360  
 ggctctaagg atgtgcagct gcaggagtct gggggaggct ttggtgcagcc tggggggctc 420  
 ctgagactct cctgtgtaat ctctggaatg gacttcagtc acaaaccgc gggtctggtc 480  
 cgccaggctc caggaaaaga gcgcgagttc gtcgcttcga ttacgactcg tgctagcacg 540  
 cactatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacacg 600  
  
 gtatatctag aatgaacag cctgaaacct gaggacacgg ccgtctatc ttgtaactec 660  
 gaatactact gggccaggg gaccaggctc accgtctct cataatga 708  
 <210> 25  
 <211> 810  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding ID55F construct  
 <400> 25  
 gaggtgcagc tgggtgagtc tgggggagga ttggttgaga gtggggcctc tctgagactc 60  
 tcctgtgtaa cctctggaca tatctcaag ttgtatggca tgggctggtt ccggcaggct 120

cccgggaagg accgtgagtt cgtagcggct gttacatgga acggtccgag cacagagtac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccaaggaca acgacaggaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc acgaagttec 300

ataatgggaa tatatactac ccccacaga tacgaatact ggggccaggg gaccaagtcc 360

accgtctcct caggtggagg cggttcaggc ggaggtggct ctggcgggtg cggaagtgg 420

ggcgggtggat cagaggtgca gctggtggag tctgggggag gattggttga gagtggggcc 480

tctctgagac tctcctgtgt aacctctgga catatcttca agttgtatgg catgggctgg 540

ttccggcagg ctcccgggaa ggaccgtgag ttcgtagcgg ctgttacatg gaacgggtccg 600

agcacagagt acgacagactc cgtgaagggc cgattcacca tctccaagga caacgacagg 660

aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg aaacctgagg acacggccgt ttattactgt 720

gcacgaagt ccataatggg aatatatact acccccgaca gatacgaata ctggggccag 780

gggaccagg tcaccgtctc ctcataatga 810

<210> 26

<211> 783

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide sequence encoding ID57F construct

<400> 26

gaggtgcagc tgggtgagtc tgggggagga ttggttgaga gtggggcctc tctgagactc 60

tctctgtaa cctctggaca tatcttcaag ttgtatggca tgggctggtt ccggcaggct 120

cccgggaagg accgtgagtt cgtagcggct gttacatgga acggtccgag cacagagtac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccaaggaca acgacaggaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc acgaagttec 300

ataatgggaa tatatactac ccccacaga tacgaatact ggggccaggg gaccaagtcc 360

accgtctcct caggtggagg cggttcaaaa ggcggagggtg gctctgaggt gcagctggtg 420

gagtcctggg gaggattggt tgagagtggg gcctctctga gactctctg tgtaacctct 480

ggacatatct tcaagttgta tggcatgggc tggttccggc aggctcccgg gaaggaccgt 540

gagttcgtag cgctgttac atggaacggt ccgagcacag agtacgcaga ctccgtgaag 600

ggccgattca ccatctcaa ggacaacgac aggaacacgc tgtatctgca aatgaacagc 660

ctgaaacctg aggacacggc cgtttattac tgtgcacgaa gttccataat gggaatatat 720

actacccccg acagatacga atactggggc caggggaccc aggtcacctg ctctcataa 780  
 tga 783  
 <210> 27  
 <211> 789  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding ID58F construct  
 <400> 27  
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagga ttggttgaga gtggggcctc tctgagactc 60  
 tcctgtgtaa cctctggaca tatcttcaag ttgtatggca tgggctggtt ccggcaggct 120  
 cccgggaagg accgtgagtt cgtagcggct gttacatgga acggtccgag cacagagtac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccaaggaca acgacaggaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc acgaagtcc 300  
 ataatgggaa tatatactac ccccacaga tacgaatact ggggccaggg gaccaagtcc 360  
  
 accgtctcct caggtggagg cggttcagat aaagatggcg gaggtggctc tgaggtgcag 420  
 ctggtggagt ctgggggagg attggttgag agtggggcct ctctgagact ctctgtgta 480  
 acctctggac atatcttcaa gttgtatggc atgggctggt tccggcaggc tcccgggaag 540  
 gaccgtgagt tcgtagcggc tgttacatgg aacggtccga gcacagagta cgcagactcc 600  
 gtgaagggcc gattcaccat ctccaaggac aacgacagga acacgctgta tctgcaaatg 660  
 aacagcctga aacctgagga cacggccgtt tattactgtg cacgaagtcc cataatggga 720  
 atataacta ccccacagac atacgaatac tggggccagg ggaccagggt caccgtctcc 780  
  
 tcataatga 789  
 <210> 28  
 <211> 795  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding ID59F construct  
 <400> 28  
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggagga ttggttgaga gtggggcctc tctgagactc 60  
 tcctgtgtaa cctctggaca tatcttcaag ttgtatggca tgggctggtt ccggcaggct 120

cccgggaagg accgtgagtt cgtagcggct gttacatgga acggtccgag cacagagtac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccaaggaca acgacaggaa cacgctgtat 240  
  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc acgaagttec 300  
 ataatgggaa tatatactac ccccacaga tacgaatact ggggccaggg gacccaagtc 360  
 accgtctcct caggtggagg cggttcagac gatgacgata aaggcggagg tggctctgag 420  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggattg gttgagagtg gggcctctct gagactctcc 480  
 tgtgtaacct ctggacatat cttcaagttg tatggcatgg gctggttccg gcaggctccc 540  
 gggaaggacc gtgagttcgt agcgctgtt acatggaacg gtccgagcac agagtacgca 600  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc aaggacaacg acaggaacac gctgtatctg 660  
  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtttatt actgtgcacg aagttccata 720  
 atgggaatat ataactaccc cgacagatac gaatactggg gccaggggac ccaggtcacc 780  
 gtctctcat aatga 795  
  
 <210> 29  
 <211> 786  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding ID60F construct  
 <400> 29  
  
 gagggtgcagc tggtagagtc tgggggagga ttggttgaga gtggggcctc tctgagactc 60  
 tcctgtgtaa cctctggaca tatcttcaag ttgtatggca tgggctggtt ccggcaggct 120  
  
 cccgggaagg accgtgagtt cgtagcggct gttacatgga acggtccgag cacagagtac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccaaggaca acgacaggaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc acgaagttec 300  
 ataatgggaa tatatactac ccccacaga tacgaatact ggggccaggg gacccaagtc 360  
 accgtctcct caaaaggtgg aggcggttca ggcggagggtg gctctaaaga ggtgcagctg 420  
 gtggagtctg ggggaggatt ggttgagagt gggcctctc tgagactctc ctgtgtaacc 480  
 tctggacata tcttcaagtt gtatggcatg ggctggttcc ggcaggctcc cgggaaggac 540  
  
 cgtgagttcg tagcggctgt tacatggaac ggtccgagca cagagtacgc agactccgtg 600  
 aagggccgat tcaccatctc caaggacaac gacaggaaca cgctgtatct gcaaatgaac 660  
 agcctgaaac ctgaggacac ggccgtttat tactgtgcac gaagtccat aatgggaata 720

tatactacce cgcacagata cgaatactgg ggccagggga cccaggtcac cgtctcctca 780  
 taatga 786  
 <210> 30  
 <211> 795  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding ID56F construct  
 <400>  
 > 30  
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggagga ttggttgaga gtggggcctc tctgagactc 60  
 tcctgtgtaa cctctggaca tatcttcaag ttgtatggca tgggctggtt cggcaggct 120  
 cccgggaagg accgtgagtt cgtagcggct gttacatgga acggtccgag cacagagtac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccaaggaca acgacaggaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccgttt attactgtgc acgaagtcc 300  
 ataatgggaa tatatactac ccccgacaga tacgaatact ggggccaggg gaccaagtc 360  
 accgtctcct caggtggagg cggttcagac gatgacgata aaggcggagg tggctctgag 420  
  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggattg gttgagagtg gggcctctct gagactctcc 480  
 tgtgtaacct ctggacatat cttcaagttg tatggcatgg gctggttccg gcaggctccc 540  
 gggaaggacc gtgagttcgt agcggctgtt acatggaacg gtccgagcac agagtacgca 600  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc aaggacaacg acaggaacac gctgtatctg 660  
 caaatgaaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtttatt actgtgcacg aagttccata 720  
 atgggaatat atactacccc cgacagatac gaatactggg gccaggggac ccaggtcacc 780  
 gtctctcat aatga 795  
  
 <210> 31  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding linker used in constructs ID3A  
 and ID55F  
 <400> 31  
 ggtggtggtg gttctggtgg tgggtgttct ggtggtggtg gttctggtgg tgggtgttct 60

<210> 32  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding linker used in constructs ID25A  
 and ID57F  
 <400> 32  
 ggtggtggtg gttctaaagg tggggtggt tct 33  
 <210> 33  
 <211> 39  
  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding linker used in constructs ID26A  
 and ID58F  
 <400> 33  
 ggtggtggtg gttctgataa agatggtggt ggtggttct 39  
 <210> 34  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding linker used in constructs ID27A  
 and ID59F  
 <400> 34  
 ggtggtggtg gttctgatga tgatgataaa ggtggtggtg gttct 45  
 <210> 35  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213>  
 Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Polynucleotide sequence encoding linker used in constructs ID28A

and ID60F

<400> 35  
aaagtggtg gtggttctgg tgggtggtg tctaaa 36

<210> 36  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Polynucleotide sequence encoding linker used in construct ID56F

<400> 36  
agagtggtg gtggttctag aggtggtggt ggttctaga 39

<210> 37  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
> Proposed chymotrypsin-labile linker

<400> 37  
Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10

<210> 38  
<211> 235  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Polypeptide sequence of ID4A construct

<400> 38  
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ile Ser Gly Met Asp Phe Ser His Lys  
20 25 30  
Pro Ala Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
35 40 45

Ala Ser Ile Thr Thr Arg Ala Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

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

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

Ser Glu Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asp Val Gln Leu  
 115 120 125

Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 130 135 140

Ser Cys Val Ile Ser Gly Met Asp Phe Ser His Lys Pro Ala Gly Trp  
 145 150 155 160

Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ser Ile Thr  
 165 170 175

Thr Arg Ala Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr  
 180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Glu Met Asn Ser  
 195 200 205

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ser Cys Asn Ser Glu Tyr Tyr  
 210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 225 230 235