(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년11월18일
(11) 등록번호 10-0927261
(24) 등록일자 2009년11월10일

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2003-7009474
(22) 출원일자 2002년01월17일
심사청구일자 2007년01월17일
(85) 번역문제출일자 2003년07월16일
(65) 공개번호 10-2003-0066821
(43) 공개일자 2003년08월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/001487
(87) 국제공개번호 WO 2002/56910
국제공개일자 2002년07월25일
(30) 우선권주장
09/765,208 2001년01월17일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US05736137 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
트루비온 파마슈티칼스, 인코포레이티드
미국 98121 워싱턴주 시애틀 스위트 1050 포스 애비뉴 2401
(72) 발명자
레드베터,제프리,에이.
미국98177
워싱턴주쇼어라인리지필드로드엔.더블유.18798
헤이든-레드베터,마르타
미국98177
워싱턴주쇼어라인리지필드로드엔.더블유.18798
(74) 대리인
김영, 장수길

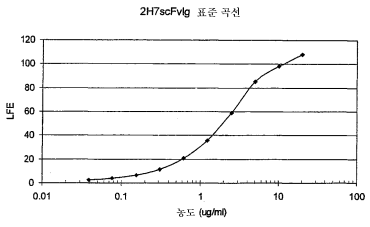
전체 청구항 수 : 총 74 항 심사관 : 권오희

(54) 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질

(57) 요 약

본 발명은 항원, 반대수용체 등과 같은 동계 구조물에 대한 결합 도메인, 시스테인 잔기를 함유하지 않거나 1개 함유하는 힌지 영역 폴리펩티드 및 면역글로불린 CH2 및 CH3 도메인을 특징으로 하고, ADCC 및/또는 CDC를 발휘할 수 있는 동시에, 단량체성 폴리펩티드로서 우세하게 발생할 수 있는 신규한 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질에 관한 것이다. 당해 융합 단백질을 고발현 수준에서 재조합적으로 제조할 수 있다. 또한, 관련된 조성물 및 면역요법 적용을 포함한 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도2



샘플	LFE @ 1:50	계산 농도 (μg/ml)
D2	26.1	56
IIIC8	25.7	55
IVA3	28.6	61
소비된 벌크	29.6	64

특허청구의 범위

청구항 1

(a) (i) 시스테인 잔기 수가 2개이고, 천연 IgG 또는 IgA 항체에서 경쇄 불변 영역과 디술피드 결합을 형성하는 힌지의 제1 시스테인이 제거되거나 치환되지 않은 변이형 IgG 또는 IgA 힌지 펩티드, (ii) 시스테인 잔기 수가 1개인 변이형 면역글로불린 힌지 펩티드, (iii) 야생형 인간 IgA 힌지 펩티드, 및 (iv) 시스테인 잔기가 존재하지 않는 변이형 인간 IgA 힌지 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드에 융합되어 있는 결합 도메인 폴리펩티드;

(b) 상기 힌지 영역 폴리펩티드에 융합되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및

(c) 상기 CH2 불변 영역 폴리펩티드에 융합되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드

를 포함하며, (1) 항체 의존성 세포-매개 세포독성 및 보체 고정으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 면역 활성을 촉진하고, (2) 상기 결합 도메인 폴리펩티드는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드가 야생형 인간 면역글로불린 G 힌지 영역 폴리펩티드에 비해 감소된 이량체화 능력을 나타내는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 결합 도메인 폴리펩티드가 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드 및 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 면역글로불린 가변 영역 폴리펩티드를 포함하는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 면역글로불린 가변 영역 폴리펩티드가 인간 면역글로불린으로부터 유래되는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 결합 도메인 폴리펩티드가

(a) 하나 이상의 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드;

(b) 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드; 및

(c) (a)의 폴리펩티드 및 (b)의 폴리펩티드에 융합되어 있는 하나 이상의 링커 펩티드

를 포함하는 것인 결합 도메인 Fv-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역 폴리펩티드가 인간 면역글로불린으로부터 유래되는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드 및 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드가 인간 면역글로불린 중쇄로부터 유래되는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 CH2 및 CH3 폴리펩티드가 인간 IgG 및 인간 IgA로 이루어진 군으로부터 선택된 아이소타입인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 항원이 CD19, CD20, CD37, CD40 및 L6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 10

제5항에 있어서, 링커 폴리펩티드가 아미노산 서열로서 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser[서열 21]을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 11

제5항에 있어서, 링커 폴리펩티드가 아미노산 서열로서 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser[서열 21]을 갖는 폴리펩티드의 3개 이상의 반복체를 포함하는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드가 인간 IgA 힌지 영역 폴리펩티드를 포함하는 것인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드가 시스테인 잔기 수가 1개인 변이형 면역글로불린 힌지 펩티드인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드가 시스테인이 존재하지 않거나 시스테인 잔기 수가 1개인 변이형 인간 IgA 힌지 펩티드인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 따른 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 16

프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는 제15항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 작제물.

청구항 17

제16항에 따른 재조합 발현 작제물로 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포.

청구항 18

(a) 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건하에 제17항에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

(b) 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 숙주 세포 배양물로부터 단리하는 단계

를 포함하는, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 제조 방법.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 따른 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 생리적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, 악성 상태 또는 B-세포 장애 치료용 제약 조성물.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 따른 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 치료 유효량을 포함하는, 악성 상태 또는 B-세포 장애를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 환자를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 악성 상태 또는 B-세포 장애가 B-세포 림프종, 및 자가항체 생산을 특징으로 하는 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 악성 상태 또는 B-세포 장애가 류마티스 관절염, 중증 근무력증, 그레이브 질환, 제I형 당뇨병, 다발성 경화증 및 자가면역 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 따른 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 포함하는, 악성 상태 또는 B-세포 장애 치료용 제약 조성물.

청구항 24

제1항 또는 제2항에 따른 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 포함하는, 악성 상태 또는 B-세포 장애 치료용 의약을 제조하기 위한 제약 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, 악성 상태 또는 B-세포 장애가 B-세포 림프종, 및 자가항체 생산을 특징으로 하는 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 26

제23항에 있어서, 악성 상태 또는 B-세포 장애가 류마티스 관절염, 중증 근무력증, 그레이브 질환, 제I형 당뇨병, 다발성 경화증 및 자가면역 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 27

(a) 표적 생물학적 분자에 결합할 수 있는 결합 도메인 폴리펩티드;

(b) 시스테인 잔기 수가 2개이고, 천연 IgG 또는 IgA 항체에서 경쇄 불변 영역과 디술피드 결합을 형성하는 힌지의 제1 시스테인이 제거되거나 치환되지 않은 변이형 IgG 또는 IgA 힌지 펩티드인, 상기 결합 도메인 폴리펩티드에 연결되어 있는 힌지 펩티드;

(c) 상기 힌지 펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및

(d) 상기 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드

를 포함하며, (1) 상기 표적 생물학적 분자에 결합하고, (2) 항체 의존성 세포-매개 세포독성, 보체 고정, 또는 양자 모두를 촉진하는 단일쇄 단백질.

청구항 28

(a) 표적 생물학적 분자에 결합할 수 있는 결합 도메인 폴리펩티드;

(b) 시스테인 잔기 수가 1개인 변이형 IgG 힌지 펩티드인, 상기 결합 도메인 폴리펩티드에 연결되어 있는 힌지 펩티드;

(c) 상기 힌지 펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및

(d) 상기 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드

를 포함하며, (1) 상기 표적 생물학적 분자에 결합하고, (2) 항체 의존성 세포-매개 세포독성, 보체 고정, 또는 양자 모두를 촉진하는 단일쇄 단백질.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 표적 생물학적 분자가 표적 세포 상의 생물학적 분자인, 상기 표적 세포에

결합할 수 있고 표적 세포 수를 감소시킬 수 있는 단일쇄 단백질.

청구항 30

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 결합 도메인 폴리펩티드가 단일쇄 Fv 폴리펩티드인 단일쇄 단백질.

청구항 31

제30항에 있어서, B-세포 표적에 결합할 수 있는 단일쇄 단백질.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 B-세포 표적이 CD20인 단일쇄 단백질.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 B-세포 표적이 CD37인 단일쇄 단백질.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 B-세포 표적이 CD19, CD22, CD30 리간드, CD54, CD106 및 인터류킨-12로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

제30항에 있어서, 단일쇄 Fv의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 아미노산 약 6개 이상으로 이루어진 폴리펩티드 링커에 의하여 연결되는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 39

제29항에 있어서, 상기 결합 도메인이 CD2, CD5, CD10, CD27, CD28, CD40, CTLA-4, 4-1BB, 4-1BB 리간드, 인터페론-γ, 인터류킨-4, 인터류킨-17 및 인터류킨-17 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적에 결합할 수 있는 단일쇄 Fv 폴리펩티드인 단일쇄 단백질.

청구항 40

제29항에 있어서, 상기 결합 도메인이 CD59, CD48, CD72, CD70, CD86/B7.2, CD40 리간드, IL-17, CD43 및 VLA-4 ($\alpha_4\beta_7$)로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적에 결합할 수 있는 단일쇄 Fv 폴리펩티드인 단일쇄 단백질.

청구항 41

제29항에 있어서, 상기 결합 도메인이 CD83 및 DEC-205로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적에 결합할 수 있는 단일쇄 Fv 폴리펩티드인 단일쇄 단백질.

청구항 42

제29항에 있어서, 상기 결합 도메인이 HER1, HER2, HER3, HER4, 표피 성장 인자 수용체, 혈관 내피 세포 성장 인자, 혈관 내피 세포 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 II, 트랜스페린 수용체, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 황체 자극 호르몬 수용체, 레티노산 수용체, MUC-1, NY-ESO-1, NA 17-A, Melan-A/MART-1, 티로시나제, Gp-100, MAGE, BAGE, GAGE, CTA 클래스 수용체, SSX2 유전자로부터 코

딩되는 HOM-MEL-40 항원, 암배아 항원 및 PyLT로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적에 결합할 수 있는 단일쇄 Fv 폴리펩티드인 단일쇄 단백질.

청구항 43

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 결합 도메인 폴리펩티드가 CD20에 결합할 수 있는 단일쇄 Fv이고, 상기 면역글로불린 중쇄 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드는 IgG1 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드인 단일쇄 단백질.

청구항 44

제43항에 있어서, 2H7 단일쇄 Fv 결합 도메인 폴리펩티드를 포함하는 단일쇄 단백질.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 힌지 펩티드가 1개 이상의 시스테인 잔기 대신 1개 이상의 세린을 함유하는 것인, 2H7 단일쇄 Fv 결합 도메인 폴리펩티드를 포함하는 단일쇄 단백질.

청구항 46

제43항에 있어서, 상기 중쇄 불변 영역이 234번 위치에서 류신이 세린으로 치환된 CH2 도메인을 포함하는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 47

제46항에 있어서, 결합 도메인 폴리펩티드가 2H7 단일쇄 Fv인 단일쇄 단백질.

청구항 48

제43항에 있어서, 상기 결합 도메인 폴리펩티드가 2H7 단일쇄 Fv이고, 상기 힌지 펩티드가 서열 36을 포함하는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 49

제30항에 있어서, 상기 결합 도메인은 L6 암종 항원에 결합할 수 있는 단일쇄 Fv이고, 상기 면역글로불린 중쇄 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드는 IgG1 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드인 단일쇄 단백질.

청구항 50

제30항에 있어서, 상기 단일쇄 Fv 폴리펩티드는 2H7 scFv이고, 상기 힌지 펩티드는 서열 36을 포함하는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 51

제30항에 있어서, 상기 힌지 펩티드가 야생형 IgA 힌지를 포함하는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 52

제30항에 있어서, 상기 표적은 L6 암종 항원이고, 상기 결합 도메인은 L6에 결합할 수 있고, 상기 힌지 펩티드는 서열 36을 포함하며, 상기 면역글로불린 중쇄 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드는 IgG1으로부터 유래한 것인 단일쇄 단백질.

청구항 53

제30항에 있어서, 상기 표적은 L6 암종 항원이고, 상기 결합 도메인은 L6에 결합할 수 있고, 상기 힌지 펩티드 중 1개 이상의 시스테인 잔기는 1개 이상의 세린 잔기로 치환되고, 상기 면역글로불린 중쇄 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드는 IgG1으로부터 유래한 것인 단일쇄 단백질.

청구항 54

제43항에 있어서, 상기 IgG1 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드 중 하나 또는 양자 모두가 인간 IgG1 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드이고, ADCC(항체 의존성 세포-매개 세포독성)를 매개할 수 있는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 55

제27항 또는 제28항에 있어서, 시스테인 잔기 수가 아미노산 치환에 의하여 감소된 것인 단일쇄 단백질.

청구항 56

제55항에 있어서, 아미노산 치환이 보존적(conservative) 아미노산 치환인 단일쇄 단백질.

청구항 57

제56항에 있어서, 시스테인 잔기가 세린 잔기로 치환된 것인 단일쇄 단백질.

청구항 58

환자에게 투여하기에 적합한 형태의 제27항 또는 제28항의 단일쇄 단백질 및 생리학적으로 허용가능한 담체를, 환자의 악성 상태 또는 B-세포 장애의 치료에 유용한 양으로 포함하는 제약 조성물.

청구항 59

제27항 또는 제28항의 단일쇄 단백질을 포함하는 악성 상태 또는 B 세포 장애를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 악성 상태 또는 B-세포 장애가 B-세포 림프종, 및 자가항체 생산을 특징으로 하는 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 61

제59항에 있어서, 악성 상태 또는 B-세포 장애가 류마티스 관절염, 중증 근무력증, 그레이브 질환, 제I형 당뇨병, 다발성 경화증 및 자가면역 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 62

(a) 서열 11의 아미노산 23-128에 나타난 면역글로불린 경쇄 가변 영역 및 CD20에 결합하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD20에 결합하는 결합 도메인 폴리펩티드;

(b) 시스테인 잔기 수가 1개 또는 2개인 변이형 IgG 힌지 펩티드인, 상기 폴리펩티드에 연결되어 있는 힌지 펩티드;

(c) 상기 힌지 펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및

(d) 상기 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드

를 포함하며, 항체 의존성 세포-매개 세포독성, 보체 고정, 또는 양자 모두를 촉진하는 단일쇄 단백질.

청구항 63

(a) 서열 11의 아미노산 145-266에 나타난 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하며 CD20에 결합하는 결합 도메인 폴리펩티드;

(b) 시스테인 잔기 수가 1개 또는 2개인 변이형 IgG 힌지 펩티드인, 상기 폴리펩티드에 연결되어 있는 힌지 펩티드;

(c) 상기 힌지 펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및

(d) 상기 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드

를 포함하며, 항체 의존성 세포-매개 세포독성, 보체 고정, 또는 양자 모두를 촉진하는 단일쇄 단백질.

청구항 64

(a) 서열 11의 아미노산 23-128에 나타난 면역글로불린 경쇄 가변 영역 및 서열 11의 아미노산 145-266에 나타난 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD20에 결합하는 결합 도메인 폴리펩티드;

(b) 시스테인 잔기 수가 1개 또는 2개인 변이형 IgG 힌지 펩티드인, 상기 폴리펩티드에 연결되어 있는 힌지 펩티드;

(c) 상기 힌지 펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및

(d) 상기 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드에 연결되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드

를 포함하며, 항체 의존성 세포-매개 세포독성, 보체 고정, 또는 양자 모두를 촉진하는 단일쇄 단백질.

청구항 65

제64항에 있어서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 아미노산 약 6개 이상으로 이루어진 폴리펩티드 링커에 의하여 연결되는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 66

제65항에 있어서, 폴리펩티드 링커가 아미노산 서열로서 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser[서열 21]을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 67

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 중쇄 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드가 IgG1 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드인 단일쇄 단백질.

청구항 68

제67항에 있어서, 중쇄 불변 영역이 234번 위치에서 류신이 세린으로 치환된 CH2 도메인을 포함하는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 69

제67항에 있어서, IgG1 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드 중 하나 또는 양자 모두가 ADCC를 매개하는 인간 IgG1 CH2 및 CH3 불변 영역 폴리펩티드인 단일쇄 단백질.

청구항 70

(a) 서열 11의 아미노산 23-128에 나타난 면역글로불린 경쇄 가변 영역 및 CD20에 결합하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD20에 결합하는 결합 도메인 폴리펩티드;

(b) 시스테인 잔기 수가 1개 또는 2개인, 상기 폴리펩티드에 연결되어 있는 IgG1 힌지 펩티드;

(c) 상기 힌지 펩티드에 연결되어 있는 IgG1 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및

(d) 상기 IgG1 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드에 연결되어 있는 IgG1 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드

를 포함하며, 항체 의존성 세포-매개 세포독성, 보체 고정, 또는 양자 모두를 촉진하는 단일쇄 단백질.

청구항 71

(a) 서열 11의 아미노산 23-128에 나타난 면역글로불린 경쇄 가변 영역 및 CD20에 결합하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD20에 결합하는 결합 도메인 폴리펩티드;

(b) 시스테인 잔기 수가 1개 또는 2개인, 상기 폴리펩티드에 연결되어 있는 IgG1 힌지 펩티드;

(c) 상기 힌지 펩티드에 연결되어 있는 IgG1 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및

(d) 상기 IgG1 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드에 연결되어 있는 IgG1 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드

를 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역 및 상기 중쇄 가변 영역은 링커에 의하여 연결되어 있으며,

항체 의존성 세포-매개 세포독성, 보체 고정, 또는 양자 모두를 촉진하는 단일쇄 단백질.

청구항 72

(a) 서열 11의 아미노산 23-128에 나타난 면역글로불린 경쇄 가변 영역 및 CD20에 결합하는 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는, CD20에 결합하는 결합 도메인 폴리펩티드;

(b) 시스테인 잔기 수가 1개 또는 2개인, 상기 폴리펩티드에 연결되어 있는 인간 IgG1 힌지 펩티드;

(c) 상기 힌지 펩티드에 연결되어 있는 인간 IgG1 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및

(d) 상기 인간 IgG1 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드에 연결되어 있는 인간 IgG1 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드를 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역 및 상기 중쇄 가변 영역은 링커에 의하여 연결되어 있으며,

항체 의존성 세포-매개 세포독성, 보체 고정, 또는 양자 모두를 촉진하는 단일쇄 단백질.

청구항 73

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 도메인 폴리펩티드가 서열 11의 아미노산 145-266에 나타난 면역글로불린 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 74

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 아미노산 약 6개 이상으로 이루어진 폴리펩티드 링커에 의하여 연결되는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 75

제74항에 있어서, 폴리펩티드 링커가 아미노산 서열로서 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser[서열 21]을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 76

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, CH2 영역 중 233, 234, 235, 236, 237, 238, 253, 297, 310, 318, 320, 322 또는 331 위치에서의 돌연변이를 포함하는 단일쇄 단백질.

청구항 77

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 불변 영역이 234번 위치에서 류신이 세린으로 치환된 CH2 도메인을 포함하는 것인 단일쇄 단백질.

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

명 세 서

배 경 기 술

<1> 본 발명은 일반적으로 면역학적으로 활성인 재조합 결합 단백질에 관한 것이고, 특히 일본쇄 Fv-면역글로불린 융합 단백질을 포함한 분자 조작된 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 자가항체 생산을 특징으로 하는 질환을 포함한 악성 상태 및 B-세포 장애를 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

<2> 면역글로불린 분자는 쇄간 디술피드 결합에 의해 거대분자 복합체에 결합되어 있는 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성되어 있다. 쇄내 디술피드 결합은 동일한 폴리펩티드 쇄의 상이한 영역을 결합시키고, 이는 인접한 아미노산과 함께 면역글로불린 도메인을 구성하는 루프의 형성을 유발한다. 각각의 경쇄 및 각각의 중

쇄는 한 항체로부터 다른 항체로의 아미노산 조성에서의 상당한 변이를 나타내는 단일 가변 영역을 갖는다. 경쇄 가변 영역, V_L은 중쇄의 가변 영역, V_H와 결합하여, 면역글로불린의 항원 결합 부위, Fv를 형성한다. 경쇄는 단일 불변 영역 도메인을 가지고, 중쇄는 다수의 불변 영역 도메인을 갖는다. IgG, IgA 및 IgE 클래스는 CH1, CH2 및 CH3로 명명된 3개의 불변 영역 도메인을 가지고, IgM 및 IgE 클래스는 4개의 불변 영역 도메인을 갖는다.

<3> 면역글로불린의 중쇄는 3개의 기능성 영역으로 분류할 수 있다: Fd, 힌지 및 Fc. Fd 영역은 V_H 및 CH1 도메인을 포함하고, 경쇄와 결합하여 Fab를 형성한다. Fc 단편은 일반적으로 보체 고정 및 Fc 수용체에의 결합과 같은 면역글로불린의 이펙터 기능을 유발하는 것으로 간주된다. IgG, IgA 및 IgD 클래스에서 발견되는 힌지 영역은 Fab 부분이 공간에서 자유롭게 이동하도록 하는 유연성 스페이서로서 작용한다. 불변 영역과는 대조적으로, 힌지 도메인은 구조적으로 다양하여, 면역글로불린 클래스 및 서브클래스 사이의 서열 및 길이가 상이하다. 예를 들어, 인간 IgG 서브클래스, IgG1, IgG2 및 IgG4는 12 내지 15개 아미노산의 힌지 영역을 가지는 한편, IgG3은 21개의 프롤린 잔기 및 11개의 시스테인 잔기를 포함한 약 62개 아미노산을 포함한다. 결정학 연구에 따르면, 힌지는 기능상 3개 영역으로 추가로 소분류할 수 있다: 상부 힌지, 코어 및 하부 힌지[참조: Shin et al., Immunological Reviews 130:87 (1992)]. 하부 힌지는 CH1의 카복실 말단부터 이동을 제한하는 힌지내의 제1 잔기, 일반적으로 2개의 중쇄 사이에 쇄내 디술피드 결합을 형성하는 제1 시스테인 잔기까지의 아미노산을 포함한다. 상부 힌지 영역의 길이는 항체의 절편 유연성과 상호관련이 있다. 코어 힌지 영역은 중쇄간 디술피드 가교를 함유하고, 하부 힌지 영역은 CH2 도메인의 아미노 말단부를 결합시키고, CH2내의 잔기를 포함한다[상기 문헌 참조]. 인간 IgG1의 코어 힌지 영역은 디술피드 결합이 형성될 경우에 피벗으로서 작용하는 것으로 간주되는 시클릭 옥타-펩티드를 생성시켜, 유연성을 제공하는 서열인 Cys-Pro-Pro-Cys를 함유한다. 힌지 영역은 또한 탄수화물 결합 부위를 함유할 수 있다. 예를 들어, IgA1은 힌지 영역의 17개 아미노산 절편내에 5개의 탄수화물 부위를 함유하여, 장 프로테아제에 대한 힌지의 예외 내성을 제공하고, 이는 분비성 면역글로불린에 대한 유리한 특성으로 간주된다.

<4> 힌지 영역의 구조 및 유연성에 의해 허용되는 입체형태 변화는 항체의 Fc 부분의 이펙터 기능에 영향을 미칠 수 있다. Fc 영역과 관련된 이펙터 기능의 3가지 일반적 카테고리는 (1) 전형적인 보체 캐스케이드의 활성화, (2) 이펙터 세포와의 상호작용 및 (3) 면역글로불린의 구획화를 포함한다. 상이한 인간 IgG 서브클래스는 보체 캐스케이드 단계를 활성화시키고 증폭시키는 이들의 상대적 효능에 있어서 다르다. 일반적으로, IgG1 및 IgG3은 가장 효과적으로 보체를 고정시키고, IgG2는 보다 덜 효과적이고, IgG4는 보체를 활성화시키지 않는다. 보체 활성화는 캐스케이드내의 제1 보체 C1의 서브유니트인 C1q의 항원-항체 복합체에의 결합에 의해 개시된다. C1q에 대한 결합 부위가 항체의 CH2 도메인내에 위치하더라도, 힌지 영역은 캐스케이드를 활성화시키는 항체의 능력에 영향을 미친다. 예를 들어, 힌지 영역이 결손된 재조합 면역글로불린은 보체를 활성화시킬 수 없다[상기 문헌 참조]. 힌지 영역에 의해 제공되는 유연성의 부재하에, 항원에 결합된 항체의 Fab 부분은 C1q를 CH2에 결합시키는데 필요한 입체형태를 채택하지 못할 수 있다[상기 문헌 참조]. 이러한 연구는 힌지 길이 및 절편 유연성이 보체 활성화와 상호관련이 있지만, 상호관련이 절대적이지는 않다는 것을 제시하였다. IgG4만큼 강성인 것으로 변형된 힌지 인간 IgG3 분자는 여전히 효과적으로 캐스케이드를 활성화시킨다.

<5> 힌지 영역의 결손은 또한 면역 이펙터 세포 상에서 Fc 수용체에 결합하는 IgG 면역글로불린의 능력에 영향을 미친다. 면역글로불린의 Fc 수용체에의 결합은 항체-의존성 세포의 세포독성(ADCC)을 촉진하며, 이는 종양 세포를 제거하기 위한 중요한 수단으로 추정된다. 인간 IgG Fc 수용체 패밀리는 3종 그룹, 즉 고친화성을 갖는 IgG에 결합할 수 있는 FcγRI(CD64), 저친화성 수용체인 FcγRII(CD32) 및 FcγRIII(CD16)으로 분류된다. 3종의 수용체와 면역글로불린 사이의 분자 상호작용은 정확하게 정의되지는 않았지만, 실험에 의해 CH2 도메인의 힌지 기부 영역내의 잔기가 항체와 Fc 수용체 사이의 상호작용의 특이성에 중요한 것으로 제시된다. 또한, 힌자 영역이 결손된 IgG1 골수종 단백질 및 재조합 IgG3 키메라 항체는 아마도 CH2에 대한 접근성이 감소되기 때문에 FcγRI에 결합할 수 없다[Shin et al., Intern. Rev. Immunol. 10:177, 178-79 (1993)].

<6> 모노클로날 항체 기법 및 유전자 조작 방법은 인간 질환의 진단 및 치료를 위한 면역글로불린 분자의 신속한 개발에 이르게 하였다. 항체의 친화성을 이의 동계 항원에 대해 향상시키기 위해, 면역원성에 관련된 문제를 감소시키기 위해, 항체의 이펙터 기능을 변형시키기 위해 단백질 조작을 적용시켰다. 면역글로불린의 도메인 구조는 항원 결합 도메인 및 이펙터 기능을 제공하는 도메인을 면역글로불린 클래스 및 서브클래스 사이에 교환될 수 있다는 점에서 조작하기에 적합하다.

<7> 또한, 보다 소형인 면역글로불린 분자가 전체 면역글로불린 요법과 관련된 문제를 극복하도록 작제되었다. 일

본쇄 Fv(scFv)는 짧은 링커 펩티드를 통해 경쇄 가변 도메인에 결합된 중쇄 가변 도메인을 포함한다[Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-83, 1988]. scFv 분자의 작은 크기로 인해, 이들은 혈장 및 조직으로부터의 매우 신속한 제거 및 전체 면역글로불린에 비해 조직으로의 보다 효과적인 침투를 나타낸다. 항-종양 scFv는 상응하는 키메라 항체에 비해 종양괴를 통한 보다 신속한 종양 침투 및 보다 균일한 분포를 나타내었다[Yokota et al., Cancer Res. 52, 3402-08 (1992)]. scFv의 다른 분자, 예를 들어, 독소에의 융합은 독소를 표적 조직에 전달하기 위해 scFv의 특이적 항원-결합 활성 및 작은 크기를 이용한다[Chaudary et al., Nature 339:394 (1989); Batra et al., Mol. Cell. Biol. 11:2200 (1991)].

<8> scFv 분자를 혈청요법에 전달하는 잇점에도 불구하고, 이러한 요법적 접근법에 대한 수가지의 결점이 존재한다. scFv의 신속한 제거가 정상 세포에서 독성 효과를 감소시키는 반면, 이러한 신속한 제거는 표적 조직에의 최소 유효 투여량의 전달을 방해할 수 있다. 환자에게 투여하기에 적합한 양의 scFv를 제조하는 것은 수율에 부작용을 미치는 scFv의 발현 및 단리에서의 어려움으로 인해 곤란하였다. 발현 동안, scFv 분자는 상이한 분자로부터의 가변 영역의 짝짓기로 인해 안정성이 결손되고 종종 응집된다. 또한, 포유동물 발현계내에서의 scFv 분자의 생산 수준은 낮으며, 이는 요법을 위한 scFv 분자의 효율적인 제조에 대한 잠재성을 제한한다[Davis et al, J. Biol. Chem. 265:10410-18 (1990); Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655-59 (1991)]. 글리코실화 부위의 가변 영역에의 첨가를 포함한 생산율을 향상시키기 위한 전략이 검토되었다[Jost, C. R. 미국 특허 제5,888,773호, Jost et al, J. Biol. Chem. 269: 26267-73 (1994)].

<9> 독소의 scFV에의 접합 또는 융합은 매우 강력한 분자를 제공하지만, 투여량은 독소 분자로부터의 독성에 의해 제한된다. 독성 효과는 간 효소의 증대 및 혈관 누출 증후군을 포함한다. 또한, 면역독소는 고도로 면역원성이고, 독소에 대해 생산된 숙주 항체는 반복된 치료에 대한 이의 잠재력을 제한한다.

<10> 요법에 대해 scFv를 사용하는 것의 추가의 결점은 이펙터 기능의 결손이다. 면역글로불린의 불변 영역과 관련된 세포독성 기능, ADCC 및 보체 의존성-세포독성 (CDC)의 부재하에 scFv는 질환을 치료하는데 효과가 없을 수 있다. scFv 기법의 개발이 12여년 전에 개시되었음에도 불구하고, 현재 어떠한 scFv 산물도 요법에 대해 승인되어 있지 않다.

<11> 질환의 치료에 대한 항체 불변 영역-관련 이펙터 기능의 잇점은 비면역글로불린 서열이 항체 가변 영역 대신에 치환되어 있는 융합 단백질의 개발을 촉진시켰다. 예를 들어, HIV에 의해 인식된 T 세포 표면 단백질인 CD4를 면역글로불린 Fc 이펙터 도메인에 재조합적으로 융합시켰다[참조: Sensel et al., Chem. Immunol. 65:129-158 (1997)]. 상기 분자의 생물학적 활성은 부분적으로 불변 영역의 클래스 또는 서브클래스에 따라 달라질 것이다. IL-2-IgG1 융합 단백질은 IL-2 수용체-보유 세포의 보체-매개된 용해에 영향을 미쳤다[상기 문헌 참조]. 상기 및 기타 융합 단백질을 작제하기 위한 면역글로불린 불변 영역의 사용은 또한 향상된 약동학적 특성을 제공할 수 있다.

<12> 특정한 유형의 면역글로불린 요법에 적합한 것으로 간주되는 질환 및 장애는 암 및 면역계 장애를 포함한다. 암은 광범위한 질환을 포함하며, 세계적으로 4명 중 약 1명이 이에 걸린다. 악성 세포의 신속하고 비조절된 증식은 혈액 악성 종양을 포함한 다수 유형의 암의 특징이다. 혈액 악성 상태를 갖는 환자는 대부분 지난 20년 동안 암 요법에서의 진보에 의해 이득을 얻었다[Multani et al., J. Clin. Oncology 16: 3691-3710, 1998]. 완화 속도가 증가하더라도, 대부분의 환자는 여전히 이들의 병이 재발하고, 이로 인해 사망한다. 세포독성 약물로 치료하는데 대한 장애물은 종양 세포 내성 및 화학요법의 높은 독성을 포함하며, 이는 다수의 환자에서 최적 투여를 방해한다. 모노클로날 항체(mAb)를 포함한, 악성 세포에 특이적으로 결합하는 분자를 사용한 표적화를 기본으로 하는 신규한 치료는 독성의 증가 없이 효능을 향상시킬 수 있다.

<13> mAb가 1975에 최초로 개시된 이후로[참조: Kohler et al., Nature 256:495-97 (1975)], 다수의 환자를 종양 세포 상에서 발현된 항원에 대한 mAb로 치료하였다. 이들 연구로 요법에 적합한 표적 항원의 선택과 관련하여 중요한 교훈을 얻었다. 첫째로 및 가장 중요하게는, 표적 항원은 결정적인 정상 조직에 의해 발현시켜서는 안된다. 다행히, 혈액 악성 세포는 간세포 또는 다른 필수적인 세포 상에서 발현되지 않는 다수의 항원을 발현시킨다. 혈액 기원의 정상 및 악성 세포 둘 다가 결손된 혈액 악성 상태의 치료는 선조세포로부터의 정상 세포의 재생이 치료가 종결된 후에 발생하기 때문에 만족스러웠다. 두번째로, 표적 항원은 종양 세포의 모든 콜로니 형성 군집 상에서 발현되어야 하고, 발현은 면역글로불린 요법으로부터의 선택적 압력에도 불구하고 지속되어야 한다. 따라서, B 세포 악성의 요법에 대한 표면 이디오타입의 선택은 항원이 고도의 종양 선택성을 나타냄에도 불구하고 변형된 표면 이디오타입 발현을 갖는 종양 세포 변이체의 과성장에 의해 제한되었다[Meeker et al., N. Engl. J. Med. 312:1658-65 (1985)]. 세번째로, 선택된 항원은 면역글로불린이 이에 결합된 후에 적합하게

상호교환되어야 한다. 면역글로불린이 항원에 결합한 후에 표적 항원의 발산 또는 내재화는 종양 세포가 파괴를 회피하도록 하여, 혈청요법의 효능을 제한할 수 있다. 네번째로, 면역글로불린의 활성화 시그널을 전달하는 표적 항원에의 결합은 성장 억제 및 아폽토시스를 유도하는 종양 세포에서의 향상된 기능적 반응을 유발할 수 있다. 상기 특성 모두가 중요하지만, 면역글로불린이 항원에 결합한 후에 아폽토시스를 유발하는 것이 성공적인 혈청요법을 달성하는데 중요한 요인일 것이다.

<14> B 및 T 세포 악성 종양의 혈청요법에 대한 표적물로서 시험된 항원은 Ig 이디오타입[Brown et al., Blood 73:651-61 (1989)], CD19[Hekman et al., Cancer Immunol. Immunother. 32:364-72 (1991); Vlasveld et al., Cancer Immunol. Immunother. 40:37-47 (1995)], CD20[Press et al., Blood 69:584-91 (1987); Maloney et al., J. Clin. Oncol. 15:3266-74, (1997)], CD21[Scheinberg et. al., J. Clin. Oncol. 8:792-803, (1990)], CD5[Dillman et. al., J. Biol. Respn. Mod. 5:394-410 (1986)] 및 CD52(CAMPATH)[Pawson et al., J. Clin. Oncol. 15:2667-72, (1997)]를 포함한다. 이들 중, 대부분의 성공은 B 세포 림프종의 요법에 대한 표적물로서 CD20을 사용할 경우에 획득되었다. 기타 표적물의 각각은 항원의 생물학적 특성에 의해 제한되었다. 예를 들어, 표면 이디오타입은 체세포 돌연변이를 통해 변형될 수 있으며, 이는 종양 세포 회피를 가능하게 한다. CD5, CD21 및 CD19는 mAb 결합 후에 신속하게 내재화되고, 이는 mAb가 독소 분자와 접합되지 않는 한 파괴를 회피하도록 한다. CD22는 B 세포 림프종의 서브셋트 상에서만 발현되는 한편, CD52는 T 세포 및 B 세포 상에서 발현되어, T 세포 제거로부터의 면역억제를 발생시킨다.

<15> CD20은 B 세포 악성 상태의 요법에 적합한 표적 항원의 선택에 대해 상기한 기본적인 기준을 충족시킨다. 저등급 또는 소포 B 세포 림프종에 걸린 환자의 키메라 CD20 mAb를 사용한 치료는 다수의 환자에서 부분적이거나 완전한 반응을 유도한다[McLaughlin et al, Blood 88:90a (abstract, suppl. 1) (1996); Maloney et al, Blood 90:2188-95 (1997)]. 그러나, 종양 재발은 통상적으로 6개월 내지 1년 이내에 발생한다. 따라서, 혈청요법에서의 추가의 개선이 저등급 B 세포 림프종에서 보다 영구적인 반응을 유도하고, 고등급 림프종 및 기타 B 세포 질환의 유효한 치료를 가능하도록 하는데 필요하다.

<16> CD20 혈청요법을 개선시키는 한 접근법은 CD20에 특이적인 mAb를 사용하여 B 세포 림프종에 대해 방사성 동위원소를 표적화시키는 것이었다. 상기 요법의 효능이 증대되는 한, 방사성 항체의 긴 생체내 반감기로부터 관련된 독성은 증대되고, 또한 때때로 환자가 간세포 구조를 경험하는 것을 필요로 한다[Press et al., N. Eng. J. Med. 329:1219-1224, 1993; Kaminski et al., N. Eng. J. Med. 329:459-65 (1993)]. CD20에 대한 mAb를 프로테아제로 분해하여, 방사성 동위원소의 부착 전에 $F(ab')_2$ 또는 Fab 단편을 수득하였다. 이는 종양으로의 방사성 동위원소 접합체의 침투를 향상시키고, 생체내 반감기를 단축시켜, 정상 조직에 대한 독성을 감소시킨다. 그러나, CD20 mAb의 Fc에 의해 제공되는, 보체 고정 및 ADCC를 포함한 이펙터 기능의 잇점이 소실된다. 따라서, 방사성 동위원소의 향상된 전달을 위해, Fc-의존성 이펙터 기능을 보유하지만, 크기가 보다 작아서, 종양 침투를 증가시키고 mAb 반감기를 단축시키는 CD20 mAb 유도체를 제조하기 위한 전략이 필요하다.

<17> CD20은 모노클로날 항체에 의해 동정되는 제1 인간 B 세포 계통-특이적 표면 분자이지만, B 세포 생물학에서의 CD20의 기능은 여전히 불완전한 것으로 이해된다. CD20은 세포질내에 아미노 및 카복시 말단을 갖는 비글리코실화된 소수성 35kDa 인단백질이다[Einfeld et al, EMBO J. 7:711-17 (1988)]. CD20에 대한 천연 리간드는 동정되지 않았다. CD20은 모든 정상적인 성숙 B 세포에 의해서는 발현되지만, 전구체 B 세포에 의해서는 발현되지 않는다.

<18> CD20 mAb는 변이성 및 성장에 영향을 미치는 정상 B 세포에 시그널을 전달한다[Clark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4494-98 (1986)]. 최근 데이터는 CD20의 광범위한 가교결합이 B 림프종 세포주의 아폽토시스를 유도할 수 있는 것으로 제시하였다[Shan et al., Blood 91:1644-52 (1998)]. 세포 표면 상에서의 CD20의 가교결합은 시그널 전달의 규모 및 동력학을 증가시키며, 이는 티로신 잔기 상에서의 세포 기질의 포스포릴화를 측정함으로써 검출하였다[Deans et al., J. Immunol. 146:846-53 (1993)]. 중요하게는, Ramos B 림프종 세포의 아폽토시스는 또한 Fc-수용체 양성 세포의 첨가에 의한 CD20 mAb의 가교결합에 의해 유도되었다[Shan et al., Blood 91:1644-52 (1998)]. 따라서, 보체 및 ADCC 메카니즘에 의한 세포 제거 이외에, 생체내에서의 CD20 mAb에 의한 Fc-수용체 결합은 CD20 가교결합에 의한 악성 B 세포의 아폽토시스를 촉진시킬 수 있다. 이러한 이론은 SCID 마우스 모델에서의 인간 림프종의 CD20 요법의 효능이 CD20 mAb에 의한 Fc-수용체 결합에 의존적임을 제시하는 실험과 일치한다[Funakoshi et al., J. Immunotherapy 19:93-101 (1996)].

<19> CD20 폴리펩티드는 4개의 경막 도메인을 함유한다[Einfeld et al., EMBO J. 7:711-17, (1988); Stamenkovic et al., J. Exp. Med. 167:1975-80 (1988); Tedder et. al., J. Immunol. 141:4388-4394 (1988)]. 다수의 막 스

패닝 도메인은 항체 결합 후의 CD20 내재화를 방해한다. CD20의 상기한 특성은 마우스 CD20 mAb인 1F5를 B 세포 림프종에 걸린 환자에게 주사하여, 악성 세포의 유의한 제거 및 부분적인 임상 반응을 유발할 경우에 B 세포 악성 종양의 효과적인 요법에 중요한 특성으로서 인식되었다[Press et al., Blood 69:584-91 (1987)].

<20> 정상적인 성숙 B 세포가 또한 CD20을 발현시키기 때문에, 정상 B 세포는 CD20 항체 요법 동안 제거된다[Reff, M.E. et al, Blood 83:435-445, 1994]. 그러나, 치료가 완료된 후에, 정상 B 세포가 CD20 음성 B 세포 전구체로부터 재생되고; 따라서, 항-CD20 요법으로 치료된 환자는 상당한 면역억제를 경험하지 않는다. 정상 B 세포의 제거는 자가항체의 부적합한 생산과 관련된 질환 또는 B 세포가 작용할 수 있는 질환에서 유익할 것이다. 인간 IgG1 중쇄 및 인간 카파 경쇄 불변 영역에 융합된 마우스 기원의 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 구성된, CD20에 특이적인 키메라 mAb는 CD20의 결합 및 ADCC를 중재하고 보체를 고정시키는 능력을 보유하였다[Liu et al., J. Immunol. 139:3521-26 (1987); Robinson et al., 미국 특허 제5,500,362호]. 이러한 연구는 B 세포 림프종의 요법에 대해 허가에 대해 미국 식약청에 의해 현재 승인된 키메라 CD20 mAb인 Rituximab의 개발을 유도하였다. 임상 반응이 Rituximab으로의 치료 후에 빈번하게 관찰되는 동시에, 환자는 약 6 내지 12개월 후에 종종 재발병한다.

<21> 분자가 약 150kDa으로 대형이기 때문에 고용량의 Rituximab(등록상표)이 필요하고, 다수의 종양 세포가 존재하는 경우에 확산이 림프양 조직내로 제한된다. Rituximab(등록상표)의 항-종양 활성의 메카니즘은 ADCC, 보체의 고정 및 아폽토시스를 촉진하는 악성 B 세포내에서의 시그널의 유발을 포함한 다수의 활성의 조합인 것으로 간주된다. 대형의 Rituximab(등록상표)은 분자의 악성 B 세포를 함유하는 림프양 조직으로의 최적 확산을 방해하여, 상기 항-종양 활성을 제한한다. 위에서 논의한 바와 같이, CD20 mAb를 프로테아제로 Fab 또는 $F(ab')_2$ 단편으로 분해하는 것은 이들을 보다 소형으로 만들고, 림프양 조직으로의 침투를 보다 우수하게 하지만, 항-종양 활성에 중요한 이펙터 기능은 소실된다. CD20 mAb 단편이 방사성 동위원소의 전달에 대해 무손상 항체보다 효과적일 수 있는 한편, Fc 부위의 이펙터 기능을 보유하지만, 크기가 보다 작아서, 보다 우수한 종양 침투를 촉진하고, 보다 짧은 반감기를 유발하는 CD20 mAb 유도체를 작제하는 것이 바람직할 것이다.

<22> CD20은 B 세포 림프종 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함한 B 세포 기원의 악성 세포에 의해 발현된다. CD20은 급성 림프아구성 백혈병과 같은 전-B 세포의 악성 종양에 의해 발현되지 않는다. 따라서, CD20은 B 세포 림프종, CLL, 및 B 세포가 질환 활성에 관련된 다른 질환의 치료에 우수한 표적물이다. 다른 B 세포 장애는 자가항체가 B 세포의 형질 세포로의 분화 동안 생산되는 자가면역 질환을 포함한다. B 세포 장애의 예는 그레이브 질환 및 하시모토 갑상선염을 포함한 자가면역 갑상선 질환, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창(SLE), 쇼그렌 증후군, 면역 혈소판감소성 자반증(ITP), 다발성 경화증(MS), 중증 근무력증(MG), 건선, 경피증, 및 크론 질환 및 궤양성 대장염을 포함한 염증 장 질환을 포함한다.

<23> 상기한 것으로부터, 악성 상태 및 B 세포 장애를 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법에 대한 확실한 요구가 명백하다. 본 발명의 조성물 및 방법은, 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드에 융합된 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역에 융합되어 있는 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드에 융합되어 있는 결합 도메인 폴리펩티드를 포함하는, ADCC 또는 보체 고정을 매개할 수 있는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 제공함으로써 선행 기술의 한계를 극복한다. 또한, 당해 조성물 및 방법은 다른 관련된 잇점을 제공한다.

<24> 발명의 요약

<25> (a) (i) 1개 이상의 시스테인 잔기를 갖는 야생형 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드로부터 유래된, 시스테인 잔기를 함유하지 않는 변이형 힌지 영역 폴리펩티드, (ii) 2개 이상의 시스테인 잔기를 갖는 야생형 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드로부터 유래된, 1개의 시스테인 잔기를 함유하는 변이형 힌지 영역 폴리펩티드, (iii) 야생형 인간 IgA 힌지 영역 폴리펩티드, (iv) 야생형 인간 IgA 영역 폴리펩티드로부터 유래된, 시스테인 잔기를 함유하지 않는 변이형 인간 IgA 힌지 영역 폴리펩티드 및 (v) 야생형 인간 IgA 영역 폴리펩티드로부터 유래된, 1개의 시스테인 잔기를 함유하는 변이형 인간 IgA 힌지 영역 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드에 융합되어 있는 결합 도메인 폴리펩티드; (b) 힌지 영역 폴리펩티드에 융합되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드; 및 (c) CH2 불변 영역 폴리펩티드에 융합되어 있는 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 (1) 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 항체 의존성 세포-매개된 세포독성 및 보체 고정으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 면역 활성을 발휘할 수 있고, (2) 결합 도메인 폴리펩티드는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는, 결합-도메인 면역글로불린 융합 단백질을 제공하는 것이 본 발명의 국면이다. 한 양태에 있어서, 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드는 변이형 힌

지 영역 폴리펩티드이고, 야생형 인간 면역글로불린 G 힌지 영역 폴리펩티드에 비해 감소된 이량체화 능력을 나타낸다. 또 다른 양태에 있어서, 결합 도메인 폴리펩티드는 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드 또는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드인 하나 이상의 면역글로불린 가변 영역 폴리펩티드를 포함한다. 추가의 양태에 있어서, 면역글로불린 가변 영역 폴리펩티드는 인간 면역글로불린으로부터 유래된다.

<26> 또 다른 양태에 있어서, 결합 도메인 Fv-면역글로불린 융합 단백질 결합 도메인 폴리펩티드는 (a) 하나 이상의 면역글로불린 경쇄 가변 영역 폴리펩티드; (b) 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 가변 영역 폴리펩티드; 및 (c) (a)의 폴리펩티드 및 (b)의 폴리펩티드에 융합되어 있는 하나 이상의 링커 펩티드를 포함한다. 추가의 양태에 있어서, 면역글로불린 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역 폴리펩티드는 인간 면역글로불린으로부터 유래된다.

<27> 또 다른 양태에 있어서, 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드 및 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 중쇄로부터 유래된다. 또 다른 양태에 있어서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 CH2 및 CH3 폴리펩티드는 인간 IgG 및 인간 IgA로부터 선택된 아이소타입이다. 또 다른 양태에 있어서, 항원은 CD19, CD20, CD37, CD40 및 L6으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 상기한 융합 단백질의 특정한 추가의 양태에 있어서, 링커 폴리펩티드는 아미노산 서열로서 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser[서열 21]을 갖는 하나 이상의 폴리펩티드를 포함하고, 특정한 다른 양태에 있어서, 링커 폴리펩티드는 아미노산 서열로서 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser[서열 21]을 갖는 폴리펩티드의 3개 이상의 반복체를 포함한다. 특정한 양태에 있어서, 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드는 인간 IgA 힌지 영역 폴리펩티드를 포함한다. 특정한 양태에 있어서, 결합 도메인 폴리펩티드는 CD154 세포외 도메인을 포함한다. 특정한 양태에 있어서, 결합 도메인 폴리펩티드는 CD154 세포외 도메인 및 하나 이상의 면역글로불린 가변 영역 폴리펩티드를 포함한다.

<28> 다른 양태에 있어서, 본 발명은 임의의 상기한 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 관련된 양태에 있어서, 본 발명은 상기한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 작제물을 제공하고, 특정한 추가의 양태에 있어서, 본 발명은 상기한 재조합 발현 작제물로 형질전환되거나 형질감염된 숙주 세포를 제공한다. 또 다른 양태에 있어서, 본 발명은 (a) 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건하에 상기한 숙주 세포를 배양하는 단계 및 (b) 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 숙주 세포 배양물로부터 단리하는 단계를 포함하는, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 제조 방법을 제공한다.

<29> 또한, 본 발명은 특정한 양태에 있어서 상기한 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 생리적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 또 다른 양태에 있어서, 상기한 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 치료 유효량을 악성 상태 또는 B-세포 장애를 가지거나 갖는 것으로 의심되는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 악성 상태 또는 B-세포 장애를 가지거나 갖는 것으로 의심되는 환자의 치료 방법을 제공한다. 특정한 추가의 양태에 있어서, 악성 상태 또는 B-세포 장애는 B-세포 림프종 또는 자가항체 생산을 특징으로 하는 질환이고, 특정한 다른 추가의 양태에 있어서, 악성 상태 또는 B-세포 장애는 류마티스 관절염, 중증 근무력증, 그레이브 질환, 제I형 당뇨병, 다발성 경화증 또는 자가면역 질환이다.

<30> 본 발명의 상기 및 기타 국면은 하기 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조로 하면 명백해질 것이다. 본원에 개시된 모든 참고문헌은 각각이 개별적으로 인용된 것처럼 이들의 전문이 본원에 참고로 인용되어 있다.

발명의 상세한 설명

<53> 본 발명은, 면역요법 및 면역진단 적용에 유용할 수 있고 선행 기술의 항원-특이적 폴리펩티드보다 우수한 소정의 잇점을 제공할 수 있는, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 및 관련된 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 융합 단백질은 바람직하게는 다음의 융합된 도메인을 적합한 부분에 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄이다: 결합 도메인 폴리펩티드, 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드, 면역글로불린 중쇄 CH2 불변 영역 폴리펩티드 및 면역글로불린 중쇄 CH3 불변 영역 폴리펩티드. 특히 바람직한 양태에 있어서, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 폴리펩티드 도메인은 인간 유전자 서열의 산물인 폴리펩티드로 구성되어 있거나 이로부터 유래되지만, 본 발명은 이와 같이 한정할 필요는 없으며, 실제로 유전자 조작되고/되거나 변이된 폴리펩티드를 포함한 천연 또는 인공 공급원 유래의 본원에 제공된 바와 같은 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질에 관련될 수 있다.

<54> 본 발명은 부분적으로 본원에 기술된 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질이 면역 활성을 발휘할 수 있다는 경이적인 관찰에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 이들 단백질은 이펙터 활성을 촉진시킬 수 있는 것으로 예

상되지 않을 수 있는 구조를 가짐에도 불구하고 항체 의존성 세포 매개된 세포독성(예를 들어, 적합한 조건하에 FcRγIII를 보유하는 자연 킬러(NK) 세포와 같은 적합한 Fc 수용체를 보유하는 세포독성 이펙터 세포의 표면에의 항원 결합, 교합 및 유도에 후속적인 ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포독성에서의 보체 고정(예를 들어, 혈액 보체 캐스캐이드의 보체인 세포용해성 단백질의 세포 표면에의 항원 결합, 점증 및 활성화에 후속적인 CDC)을 포함한 익히 공지된 면역학적 이펙터 활성에 관계하는 능력을 보유한다. 아래에 보다 상세하게 기술한 바와 같이, ADCC 및 CDC는 면역글로불린 중쇄 영역을 포함하는 단량체성 단백질에 대한 예상외의 기능이며, 이는 당해 융합 단백질에 대해 선택된 구조에 의해, 및 특히 쇄간 단독이량체성 디술피드 결합을 형성하는 이들의 능력에서 손상되는 힌지 영역의 선택에 의해 지지된다.

<55> 본 발명에 의해 제공되는 또 다른 잇점은 선행 기술의 일본쇄 항체 작제물을 사용하여 통상적으로 수득된 것보다 전형적으로 실질적으로 많은 양으로 제조할 수 있는 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드이다. 바람직한 양태에 있어서, 본 발명의 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드는 포유동물 발현계에서 재조합적으로 발현되고, 이는 생체내에서(예를 들어, 생리적 조건하에) 안정한 폴리펩티드를 제공하는 잇점을 제공한다. 비제한적인 이론에 따라, 상기한 안정성은 융합 단백질의 해독 후 변형, 및 구체적으로 글리코실화로부터 부분적으로 유도할 수 있다. 재조합 포유동물 발현을 통한 본 발명의 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 제조는 배양 상청액 리터당 단백질 50mg 이상의 수준에서 정지 세포 배양물 중에서 달성되었고, 10-50mg/ℓ에서 상기한 배양물에서 통상적으로 관찰되었고, 바람직하게는 10-50mg/ℓ 이상에서 상기한 배양물은 정지 배양 조건하에 제조될 수 있고; 또한 기술-허용된 스케일업 방법, 예를 들어, "유가 뱃치" (즉, 비정지) 제조법을 이용한 융합 단백질의 증강된 제조법이 고려되고, 여기서 5-500mg/ℓ 이상, 및 특정 단백질 산물에 따라 몇몇 경우에 0.5-1gm/ℓ 이상의 생산량이 수득된다.

<56> 본 발명에 따르는 결합 도메인 폴리펩티드는 특이적으로 인식하여 동계 생물학적 분자 또는 하나 이상의 분자의 복합체, 또는 안정한지 일시적인지의 여부에 따라 단백질, 폴리펩티드, 펩태드, 아미노산 또는 이의 유도체; 지질, 지방산 등, 또는 이의 유도체; 탄수화물, 당류 등, 또는 이의 유도체; 핵산, 뉴클레오티드, 뉴클레오시드, 퓨린, 피리미딘 또는 관련된 분자, 또는 이의 유도체 등; 또는 예를 들어, 당단백질, 당펩티드, 당지질, 지단백질, 단백지질과 같은 이들의 배합물; 또는 생물학적 샘플에 존재할 수 있는 임의의 다른 생물학적 분자를 포함하는 상기한 분자의 조립체 또는 응집체에 결합하는 능력을 갖는 임의의 폴리펩티드일 수 있다. 생물학적 샘플은 혈액 샘플, 생검 검체, 조직 이식편, 기관 배양물, 생물학적 체액 또는 환자 또는 생물학적 공급원으로부터의 임의의 다른 조직 또는 세포 제제에 의해 제공할 수 있다. 환자 또는 생물학적 공급원은 염색체 통합되거나 에피솜 재조합 핵산 서열, 불멸화 또는 불멸화가능한 세포주, 체세포 하이브리드 세포주, 분화되거나 분화가능한 세포주, 형질전환된 세포주 등을 함유할 수 있는 유전자 조작된 세포주를 비제한적으로 포함하는 인간 또는 비인간 동물, 일차 세포 배양 또는 배양 적응 세포주일 수 있다. 본 발명의 특정한 바람직한 양태에 있어서, 환자 또는 생물학적 공급원은 본원에 제공된 바와 같은 악성 상태 또는 B-세포 장애를 갖는 것으로 의심되거나 상기 장애에 걸릴 위험에 처할 수 있으며, 특정한 추가의 바람직한 양태에 있어서 상기 장애는 자가면역 질환이고, 본 발명의 특정한 다른 바람직한 양태에 있어서, 환자 또는 생물학적 공급원은 상기한 질환의 위험 또는 존재를 면한 것으로 판단될 수 있다.

<57> 따라서, 결합 도메인 폴리펩티드는 본원에서 "항원"으로 칭해지는 관심의 대상인 표적 구조물인 본원에서 제공된 바와 같은 동계 생물학적 분자에 대한 임의의 천연 발생되거나 재조합적으로 제조된 결합 파트너일 수 있지만, 본 발명의 기재에 따라서 본 발명의 융합 단백질이 특이적으로 결합하도록 하는 것이 바람직한 임의의 표적 생물학적 분자를 포함하고자 한다. 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 "면역특이적"이거나 이들이 목적하는 표적 분자, 예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 항원에 약 10^4M^{-1} 이상, 바람직하게는 10^5M^{-1} 이상, 보다 바람직하게는 10^6M^{-1} 이상, 보다 더 바람직하게는 10^7M^{-1} 이상의 K_a로 결합하는 경우에 특이적으로 결합할 수 있는 것으로 정의된다. 본 발명에 따르는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 친화성은 통상의 기법, 예를 들어, 문헌[Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 (1949)]에 기술된 기법을 이용하여 용이하게 측정할 수 있다. 관심의 대상인 표적 항원에 결합하는 융합 단백질의 상기한 측정은 또한 다른 단백질 또는 폴리펩티드와 특이적으로 상호작용하는 단백질을 동정하고 수득하기 위한 임의의 다수의 공지된 방법, 예를 들어, 미국 특허 제5,283,173호 및 미국 특허 제5,468,614호 또는 대응 특허에 기술된 것과 같은 효모 투-하이브리드 스크리닝 시스템을 이용하여 수행할 수 있다.

<58> 본 발명의 바람직한 양태에 있어서, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 하나 이상의 면역글로불린 가변 영역 폴리펩티드, 예를 들어, 중쇄 또는 경쇄 V-영역의 전체 또는 일부 또는 단편을 포함하는 결합 도메인을 포

함하며, 단, 이는 본원에 기술된 바와 같은 관심의 대상인 항원 또는 다른 목적하는 표적 구조물에 특이적으로 결합할 수 있다. 또 다른 바람직한 양태에 있어서, 결합 도메인은 일본쇄 면역글로불린-유래된 Fv 산물을 포함하며, 이는 하나 이상의 면역글로불린 경쇄 V-영역의 전체 또는 일부 또는 면역글로불린 중쇄 V-영역의 전체 또는 일부를 포함할 수 있고, 추가로 V-영역에 융합된 링커를 포함하며; 상기한 작제물의 제조법 및 시험법은 본원에 보다 상사하게 기술되어 있고, 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 다른 결합 도메인 폴리펩티드는 비-면역글로불린을 포함한, 본원에 제공된 바와 같은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 임의의 단백질 또는 이의 일부를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명은 폴리펩티드 리간드, 예를 들어, 호르몬, 시토킨, 케모킨 등; 상기한 폴리펩티드 리간드에 대한 세포 표면 또는 가용성 수용체; 렉틴; 세포간 유착 수용체, 예를 들어, 특이적 백혈구 인테그린, 셀렉틴, 면역글로불린 유전자 슈퍼패밀리 일원, 세포간 유착 분자(ICAM-1, -2, -3) 등; 조직적합성 항원 등으로부터 유래된 결합 도메인 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 고려한다.

<59> 결합 도메인 폴리펩티드를 제공할 수 있고, 또한 본 발명의 결합 도메인-Ig 융합 단백질에 바람직하게 결합하는 표적 분자 또는 항원으로 선택할 수 있는 세포 표면 수용체의 예는 HER1(예를 들어, GenBank 기탁 번호 U48722, SEG_HEGFREXS, K03193), HER2(Yoshino et al., 1994 J. Immunol. 152:2393; Disis et al., 1994 Canc. Res. 54:16; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 X03363, M17730, SEG_HUMHER20 참조), HER3(예를 들어, GenBank 기탁 번호 U29339, M34309), HER4(Plowman et al., 1993 Nature 366:473; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 L07868, T64105 참조), 표피 성장 인자 수용체(EGFR)(예를 들어, GenBank 기탁 번호 U48722, SEG_HEGFREXS, K03193), 혈관 내피 세포 성장 인자(예를 들어, GenBank 기탁 번호 M32977), 혈관 내피 세포 성장 인자 수용체(예를 들어, GenBank 기탁 번호 AF022375, 1680143, U48801, X62568), 인슐린 유사 성장 인자-I(예를 들어, GenBank 기탁 번호 X00173, X56774, X56773, X06043, 또한, 유럽 특허 제GB 2241703호 참조), 인슐린 유사 성장 인자-II(예를 들어, GenBank 기탁 번호 X03562, X00910, SEG_HUMGFIA, SEG_HUMGFI2, M17863, M17862), 트랜스페린 수용체(Trowbridge and Omary, 1981 Proc. Nat. Acad. USA 78:3039; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 X01060, M11507 참조), 에스트로겐 수용체(예를 들어, GenBank 기탁 번호 M38651, X03635, X99101, U47678, M12674), 프로게스테론 수용체(예를 들어, GenBank 기탁 번호 X51730, X69068, M15716), 난포 자극 호르몬 수용체(FSH-R)(예를 들어, GenBank 기탁 번호 Z34260, M65085), 레티노산(예를 들어, GenBank 기탁 번호 L12060, M60909, X77664, X57280, X07282, X06538), MUC-1 (Barnes et al., 1989 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:7159; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 SEG_MUSMUCIO, M65132, M64928 참조), NY-ESO-1(예를 들어, GenBank 기탁 번호 AJ003149, U87459), NA 17-A(예를 들어, 유럽 특허 제WO 96/40039호), Melan-A/MART-1(Kawakami et al., 1994 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3515; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 U06654, U06452 참조), 티로시나제(Topalian et al., 1994 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:9461; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 M26729, SEG_HUMTYRO 참조, 또한, Weber et al., J. Clin. Invest (1998) 102:1258 참조), Gp-100(Kawakami et al., 1994 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3515; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 S73003 참조, 또한 유럽 특허 제EP 668350호 참조; Adema et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:20126 참조), MAGE(van den Bruggen et al., 1991 Science 254:1643; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 U93163, AF064589, U66083, D32077, D32076, D32075, U10694, U10693, U10691, U10690, U10689, U10688, U10687, U10686, U10685, L18877, U10340, U10339, L18920, U03735, M77481 참조), BAGE(예를 들어, GenBank 기탁 번호 U19180, 또한 미국 특허 제5,683,886호 및 제5,571,711호 참조), GAGE(예를 들어, GenBank 기탁 번호 AF055475, AF055474, AF055473, U19147, U19146, U19145, U19144, U19143, U19142), 특히 SSX2 유전자에 의해 암호화된 HOM-MEL-40 항원을 포함한 수용체의 CTA 클래스 중 하나(예를 들어, GenBank 기탁 번호 X86175, U90842, U90841, X86174), 암배아 항원(CEA, Gold and Freedman, 1985 J. Exp. Med. 121:439; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 SEG_HUMCEA, M59710, M59255, M29540 참조) 및 PyLT(예를 들어, GenBank 기탁 번호 J02289, J02038) 등을 포함한다.

<60> 결합 도메인 폴리펩티드의 공급원일 수 있거나 동계 항원일 수 있는 추가의 세포 표면 수용체는 CD2(예를 들어, GenBank 기탁 번호 Y00023, SEG_HUMCD2, M16336, M16445, SEG_MUSCD2, M14362), 4-1BB(CDw137, Kwon et al., 1989 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:1963), 4-1BB 리간드(Goodwin et al., 1993 Eur. J. Immunol. 23:2361; Melero et al., 1998 Eur. J. Immunol. 3:116), CD5(예를 들어, GenBank 기탁 번호 X78985, X89405), CD10(예를 들어, GenBank 기탁 번호 M81591, X76732), CD27(예를 들어, GenBank 기탁 번호 M63928, L24495, L08096), CD28(June et al., 1990 Immunol. Today 11:211; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 J02988, SEG_HUMCD28, M34563 참조), CTLA-4(예를 들어, GenBank 기탁 번호 L15006, X05719, SEG_HUMIGCTL), CD40(예를 들어, GenBank 기탁 번호 M83312, SEG_MUSC040A0, Y10507, X67878, X96710, U15637, L07414), 인터페론-γ(IFN-γ; 예를 들어, Farrar et al. 1993 Ann. Rev. Immunol. 11:571 및 본원에 인용된 참고문헌, Gray et al. 1982 Nature 295:503, Rinderknecht et al. 1984 J. Biol. Chem. 259:6790, DeGrado et al. 1982 Nature 300:379

참조), 인터류킨-4(IL-4; 예를 들어, 53rd Forum in Immunology, 1993 Research in Immunol. 144:553-643; Banchereau et al., 1994, The Cytokine Handbook, 2nd ed., A. Thomson, ed., Academic Press, NY, p. 99; Keegan et al., 1994 J Leukocyt. Biol. 55:272 및 본원에 인용된 참고문헌 참조), 인터류킨-17(IL-17)(예를 들어, GenBank 기탁 번호 U32659, U43088) 및 인터류킨-17 수용체(IL-17R)(예를 들어, GenBank 기탁 번호 U31993, U58917) 등을 포함한다. 상기한 것에도 불구하고, 본 발명은 미국 특허 제5,807,734호, 미국 특허 제5,795,572호 또는 미국 특허 제5,807,734호에 개시된 임의의 면역글로불린 융합 단백질을 포함하지 않는다.

<61> 결합 도메인 폴리펩티드의 공급원일 수 있거나 동계 항원일 수 있는 추가의 세포 표면 수용체는 CD59(예를 들어, GenBank 기탁 번호 SEG_HUMCD590, M95708, M34671), CD48(예를 들어, GenBank 기탁 번호 M59904), CD58/LFA-3(예를 들어, GenBank 기탁 번호 A25933, Y00636, E12817; 또한 JP 1997075090-A 참조), CD72(예를 들어, GenBank 기탁 번호 AA311036, S40777, L35772), CD70(예를 들어, GenBank 기탁 번호 Y13636, S69339), CD80/B7.1(Freeman et al., 1989 J. Immunol. 43:2714; Freeman et al., 1991 J. Exp. Med. 174:625; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 U33208, I683379 참조), CD86/B7.2(Freeman et al., 1993 J. Exp. Med. 178:2185, Boriello et al., 1995 J. Immunol. 155:5490; 또한, 예를 들어, GenBank 기탁 번호 AF099105, SEG_MMB72G, U39466, U04343, SEG_HSB725, L25606, L25259 참조), CD40 리간드(예를 들어, GenBank 기탁 번호 SEG~HUMCD40L, X67878, X65453, L07414), IL-17(예를 들어, GenBank 기탁 번호 U32659, U43088), CD43(예를 들어, GenBank 기탁 번호 X52075, J04536) 및 VLA-4($\alpha_4\beta_7$)(예를 들어, GenBank 기탁 번호 L12002, X16983, L20788, U97031, L24913, M68892, M95632) 등을 포함한다. 다음의 세포 표면 수용체는 전형적으로 B 세포와 결합한다: CD19(예를 들어, GenBank 기탁 번호 SEG_HUMCD19W0, M84371, SEG_MUSCD19W, M62542), CD20(예를 들어, GenBank 기탁 번호 SEG_HUMCD20, M62541), CD22(예를 들어, GenBank 기탁 번호 I680629, Y10210, X59350, U62631, X52782, L16928), CD30 리간드(예를 들어, GenBank 기탁 번호 L09753, M83554), CD37(예를 들어, GenBank 기탁 번호 SEG_MMCD37X, X14046, X53517), CD106(VCAM-1)(예를 들어, GenBank 기탁 번호 X53051, X67783, SEG_MMVCAM1C, 또한, 미국 특허 제5,596,090호 참조), CD54(ICAM-1)(예를 들어, GenBank 기탁 번호 X84737, S82847, X06990, J03132, SEG_MUSICAM0), 인터류킨-12(예를 들어, Reiter et al, 1993 Crit. Rev. Immunol. 13:1 및 본원에 인용된 참고문헌 참조). 부세포 제제는 또한 전형적으로 수지상 세포와 결합하는 임의의 다음 세포 표면 수용체를 포함할 수 있다: CD83(예를 들어, GenBank 기탁 번호 AF001036, AL021918), DEC-205(예를 들어, GenBank 기탁 번호 AF011333, U19271).

<62> 위에서 논의한 바와 같은 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드는 천연에서, 인공 펩티드로서 또는 유전자 조작의 결과로서 발생하고 CH1 및 CH2 영역내에서 쇄간 면역글로불린-도메인 디술피드 결합의 형성을 유발하는 아미노산 잔기 사이의 면역글로불린 중쇄 폴리펩티드내에 위치하는 힌지 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함하고; 본 발명에서 사용하기 위한 힌지 영역 폴리펩티드는 또한 변이형 힌지 영역 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 따라서, 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드는 상기한 바와 같은 힌지 기능을 갖는 것으로 통상적으로 간주되는 면역글로불린 폴리펩티드 쇄 영역으로부터 유래하거나 이의 일부 또는 단편(즉, 펩티드 연결내의 하나 이상의 아미노산, 전형적으로 5 내지 65개 아미노산, 바람직하게는 10 내지 50개, 보다 바람직하게는 15 내지 35개, 보다 더 바람직하게는 18 내지 32개, 보다 더 바람직하게는 20개 내지 30개, 보다 더 바람직하게는 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개 또는 29개 아미노산)일 수 있지만, 본 발명에서 사용하기 위한 힌지 영역 폴리펩티드는 이와 같이 한정할 필요는 없고, CH1 도메인 또는 CH2 도메인과 같은 인접 면역글로불린 도메인 또는 특정한 인공적으로 조작된 면역글로불린 작제물의 경우에는 면역글로불린 가변 영역 도메인내에 (당해 분야에 공지된 바와 같이 특정한 잔기를 변화할 수 있는 특정한 도메인에 배정하기 위한 구조적 기준에 따라) 위치하는 아미노산을 포함할 수 있다.

<63> 야생형 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드는 면역글로불린의 불변 영역 도메인, CH1 및 CH2 사이에 위치하는 임의의 천연 발생 힌지 영역을 포함한다. 야생형 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드는 바람직하게는 인간 IgG 면역글로불린으로부터의 힌지 영역 및 보다 바람직하게는 인간 IgG1 아이소타입으로부터의 힌지 영역 폴리펩티드를 포함하는 인간 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드이다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 면역글로불린 아미노산 서열내의 극심한 전체적인 다양성에도 불구하고, 면역글로불린 일차 구조는 특히 술피히드릴 기에 의해 다른 술프히드릴 기와의 디술피드 결합 형성에 대한 잠재성을 제공하는 시스테인 잔기의 발생과 관련하여 면역글로불린 폴리펩티드 쇄의 특정한 부분에서 고도의 서열 보존성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 문맥에서는 야생형 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드는 하나 이상의 고도로 보존된(예를 들어, 통계적으로 유의한 방식으로 군집내에서 우세한) 시스테인 잔기를 특징으로 하는 것으로 간주될 수 있으며, 특정한 바람직한 양태에 있어서, 상기한 야생형 힌지 영역으로부터 유래된, 시스테인 잔기를 함유하지 않거나 1개 함유하는 변이형 힌지 영역 폴

리펩티드를 선택할 수 있다.

<64> 변이형 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드는 면역글로불린 아이소타입 또는 클래스 또는 CH2 및 CH3 도메인의 것과는 상이한 면역글로불린 서브클래스의 종의 면역글로불린에서 이의 기원을 갖는 힌지 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 특정한 양태에 있어서, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 야생형 인간 IgA 힌지 영역 폴리펩티드 또는 본원에서 논의된 바와 같이 시스테인 잔기를 함유하지 않거나 1개 함유하는 변이형 인간 IgA 힌지 영역 폴리펩티드를 포함하는 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드에 융합되어 있는 결합 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 이러한 힌지 영역 폴리펩티드는 상이한 Ig 아이소타입 또는 클래스, 예를 들어, 특정한 바람직한 양태에서 IgG1 서브클래스일 수 있는 IgG 서브클래스로부터의 면역글로불린 중쇄 CH2 영역 폴리펩티드에 융합될 수 있다.

<65> 예를 들어, 아래에 보다 상세하게 기술된 바와 같이, 본 발명의 특정한 양태에 있어서는 천연적으로 3개의 시스테인을 포함하는 야생형 인간 IgA 힌지 영역으로부터 유래되는 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드를 선택하고, 여기서 선택된 힌지 영역 폴리펩티드는 단지 하나의 시스테인 잔기가 잔류하도록(예를 들어, 서열 35-36) 전체 힌지 영역에 대해 절단한다. 유사하게는, 본 발명의 특정한 다른 양태에 있어서 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 시스테인 잔기의 수가 아미노산 치환 또는 결실에 의해 감소된 변이형 힌지 영역 폴리펩티드를 포함하는 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드에 융합되어 있는 결합 도메인 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 변이형 힌지 영역 폴리펩티드는 1개 이상의 시스테인 잔기를 함유하는 야생형 면역글로불린 힌지 영역으로부터 유래될 수 있다. 특정한 양태에 있어서, 변이형 힌지 영역 폴리펩티드는 시스테인 잔기를 함유하지 않거나 1개 함유할 수 있고, 여기서 변이형 힌지 영역 폴리펩티드는 각각 1개 이상 또는 2개 이상의 시스테인 잔기를 함유하는 야생형 면역글로불린 힌지 영역으로부터 유래된다. 변이형 힌지 영역 폴리펩티드에서, 야생형 면역글로불린 힌지 영역의 시스테인 잔기는 바람직하게는 디술피드 결합을 형성시킬 수 있는 아미노산으로 치환된다. 본 발명의 한 양태에 있어서, 변이형 힌지 영역 폴리펩티드는 4종의 인간 IgG 아이소타입 서브클래스, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중 어느 것을 포함할 수 있는 인간 IgG 야생형 힌지 영역 폴리펩티드로부터 유래된다. 특정한 바람직한 양태에 있어서, 변이형 힌지 영역 폴리펩티드는 인간 IgG1 야생형 힌지 영역 폴리펩티드로부터 유래된다. 예로서, 인간 IgG1 야생형 힌지 영역 폴리펩티드로부터 유래된 변이형 힌지 영역 폴리펩티드는 야생형 면역글로불린 힌지 영역내의 3개 시스테인 잔기 중 2개에서의 변이 또는 전체 3개 시스테인 잔기에서의 변이를 포함할 수 있다.

<66> 야생형 면역글로불린 힌지 영역에 존재하고 본 발명의 특히 바람직한 양태에 따라 돌연변이 유발에 의해 제거되는 시스테인 잔기는 쇄간 디술피드 결합을 형성하거나 형성시킬 수 있는 시스테인 잔기를 포함한다. 이론에 한정되지 않길 바라면서, 본 발명은 쇄간 디술피드 가교의 형성에 관련되는 것으로 간주되는 상기한 힌지 영역 시스테인 잔기의 변이가 쇄간 디술피드 결합 형성을 통해 이량체화시키는(또는 보다 고도의 올리고머를 형성시키는) 본 발명의 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 능력을 감소시키면서, 놀랍게도 항체 의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC)을 증진시키거나 보체를 고정시키는 융합 단백질의 능력을 제거하지 않는 것을 고려한다. 특히, ADCC를 매개하는 Fc 수용체(FcR)(예를 들어, FcRIII, CD16)는 면역글로불린 Fc 도메인에 대해 낮은 친화성을 나타내고, 이는 Fc의 FcR에의 기능적 결합은 통상의 항체에서의 중쇄의 이량체 구조에 의한 Fc-FcR 복합체의 항원 항체 결합력 안정화, 및/또는 통상의 Ab Fc 구조에 의한 FcR 응집 및 가교결합을 필요로 한다는 것을 제시한다[Sonderman et al., 2000 Nature 406:267; Radaev et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:16469; Radaev et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:16478; Koolwijk et al., 1989 J. Immunol. 143:1656; Kato et al., 2000 Immunol. Today 21:310]. 따라서, 본 발명의 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 일본쇄 면역글로불린 융합 단백질과 관련된 잇점을 제공하면서, 또한 경이롭게 면역 활성을 보유한다. 유사하게는, 보체를 고정시키는 능력은 Fc를 포함하는 것과 같은 중쇄 불변 영역과 관련하여 이량체인 면역글로불린과 결합되는 한편, 본 발명의 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 보체를 고정시키는 경이로운 능력을 나타낸다.

<67> 상기한 바와 같이, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 비제한적인 이론에 따라 이량체화시키는 이들의 능력이 손상되는 것으로 간주되고, 추가로 이론에 따라 이러한 특성은 융합 단백질의 작제에서 함유물로 선택된 면역글로불린 힌지 영역 폴리펩티드내에 존재하는 시스테인 잔기수의 감소의 결과이다. 이량체화시키는 폴리펩티드의 상대적 능력의 측정법은 충분히 관련 분야의 지식 범위내이고, 여기서 임의의 다수의 확립된 방법은 단백질 이량체화를 검출하는데 적용시킬 수 있다[참조예: Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, 1987 Springer-Verlag, New York]. 예를 들어, 분자 크기를 기준으로 하여 단백질을 분해하기 위한 생화학적 분리 기법(예를 들어, 겔 전기영동, 겔 여과 크로마토그래피, 분석용 초원심분리 등), 및/또는 술프히드릴-활성제(예를 들어, 요오도아세트아미드, N-에틸말레이미드) 또는 디술피드-환원제(예를 들어, 2-머캅토에

탄올, 디티오트레이톨)의 도입 전후의 단백질 물리화학적 특성의 비교법, 또는 다른 등가의 방법 모두를 폴리펩티드 이량체화 또는 올리고머화의 정도를 측정하고 상기한 잠재적 사차 구조에 대한 디술피드 결합의 가능한 기여를 측정하는데 사용할 수 있다. 특정한 양태에 있어서, 본 발명은 본원에 제공된 바와 같은 야생형 인간 면역글로불린 G 힌지 영역 폴리펩티드와 비교하여(즉, 통계적으로 유의한 방식으로 적합한 IgG-유래된 대조군과 비교하여) 감소된 이량체화 능력을 나타내는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질에 관한 것이다. 따라서, 당업자는 특정한 융합 단백질이 이와 같은 감소된 이량체화 능력을 나타낼 것인지의 여부를 용이하게 측정할 것이다.

<68> 면역글로불린 융합 단백질을 제조하기 위한 조성물 및 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제5,892,019호에 기술된 바와 같이 당해 분야에 익히 공지되어 있으며, 상기 특허는 폴리뉴클레오티드를 단독으로 암호화하는 산물이지만, 본 발명에 따르는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 아닌 재조합 항체를 개시하고 있다.

<69> 인간에서 사용하고자 하는 본 발명의 면역글로불린 융합 단백질의 경우에, 분변 영역은 전형적으로는 잠재적 항-인간 면역 반응을 최소화시키고 적합한 이펙터 기능을 제공하는 인간 서열 기원일 수 있다. 항체 불변 영역을 암호화하는 서열의 조작은 문헌[PCT 공개공보, Morrison and Oi, WO 89/07142]에 기술되어 있다. 특히 바람직한 양태에 있어서, CH1 도메인은 결실되고, 결합 도메인의 카복실 말단, 또는 결합 도메인이 2개의 면역글로불린 가변 영역 폴리펩티드를 포함하는 경우에, 제2(즉, C-말단에 보다 근접한) 가변 영역은 힌지 영역을 통해 CH2의 아미노 말단에 연결되어 있다. 2개의 예시적인 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 구조를 도시하는 도식도가 도 11에 도시되어 있으며, 여기서 특히 바람직한 양태에 있어서는 쇄간 디술피드 결합이 존재하지 않으며, 다른 양태에 있어서는 쇄간 디술피드 결합의 한정된 수가 야생형 힌지 영역 폴리펩티드가 대신 존재할 경우에 존재할 수 있는 상기한 결합의 수에 비례하여 존재할 수 있으며, 다른 양태에 있어서는 융합 단백질이 야생형 인간 IgG 힌지 영역 폴리펩티드에 비해 감소된 이량체화 능력을 나타내는 변이형 힌지 영역 폴리펩티드를 포함함을 주지하여야 한다. 따라서, 단리된 폴리뉴클레오티드 분자는 선택된 항원에 대해 특이적 결합 친화성을 제공하는 결합 도메인을 갖는 일본쇄 면역글로불린 융합 단백질을 암호화한다.

<70> 상기한 바와 같이, 특정한 양태에 있어서는 결합 단백질-면역글로불린 융합 단백질은 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 폴리펩티드일 수 있는 하나 이상의 면역글로불린 가변 영역 폴리펩티드를 포함하고, 특정한 양태에 있어서는 융합 단백질은 하나 이상의 상기한 경쇄 V-영역 및 하나의 상기한 중쇄 V-영역 및 각각의 V-영역에 융합되어 있는 하나 이상의 링커 펩티드를 포함한다. 상기한 결합 도메인, 예를 들어, 일본쇄 Fv 도메인의 작제법은 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 하기한 실시예에 보다 상세하게 기술되어 있고, 예를 들어, 미국 특허 제5,892,019호 및 본원에 인용된 참고문헌에 기술되어 있으며; (예를 들어, 일본쇄 Fv 폴리펩티드를 포함하는 결합 도메인을 생성시키기 위해) 일본쇄 가변 영역 및 각각의 중쇄-유래된 및 경쇄-유래된 V 영역의 각각에 융합될 수 있는 링커 폴리펩티드의 선택 및 조립은 또한 당해 분야에 공지되어 있고, 본원 및 예를 들어, 미국 특허 제5,869,620호, 미국 특허 제4,704,692호 및 제4,946,778호에 기술되어 있다. 특정 양태에 있어서, 비인간 공급원으로부터 유래되는 면역글로불린 서열의 전체 또는 일부를 인간화 항체를 생산하기 위한 승인된 방법에 따라 "인간화"시킬 수 있으며, 즉 인간 Ig 서열을 면역글로불린 서열에 도입하여 인간 면역계가 상기한 단백질을 이물질로서 인식할 수 있는 정도를 감소한다[참조예: 미국 특허 제5,693,762호; 제5,585,089호; 제4,816,567호; 제5,225,539호; 제5,530,101호; 및 본원에 인용된 참고문헌].

<71> 본원에 제공된 바와 같은 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질이 디자인되면, 폴리펩티드를 암호화하는 DNA를, 예를 들어, 문헌[Sinha et al., Nucleic Acids Res., 12, 4539-4557 (1984)]에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오티드 합성법에 의해 합성하고; 예를 들어, 문헌[Innis, Ed., PCR Protocols, Academic Press (1990) 및 Better et al. J. Biol. Chem. 267, 16712-16118 (1992)]에 기술된 바와 같은 PCR에 의해 조립하고; 예를 들어, 문헌[Ausubel et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1989) 및 Robinson et al., Hum. Antibod. Hybridomas, 2, 84-93 (1991)]에 기술된 바와 같은 표준 방법에 의해 클로닝 및 발현시키고; 예를 들어, 문헌[Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988) 및 Munson et al., Anal. Biochem., 107, 220-239 (1980)]에 기술된 바와 같이 특이적 항원 결합 활성에 대해 시험할 수 있다.

<72> Fv 영역의 일본쇄 폴리펩티드 결합 분자, 일본쇄 Fv 분자의 제조법은 본원에 참고문헌으로 인용되어 있는 미국 특허 제4,946,778호에 기술되어 있다. 본 발명에 있어서, 일본쇄 Fv-유사 분사를 중쇄 또는 경쇄의 제1 가변 영역, 이어서 상응하는 경쇄 또는 중쇄 각각의 가변 영역에 대한 하나 이상의 링커를 암호화함으로써 합성한다. 2개의 가변 영역 사이의 적합한 링커(들)의 선택은 미국 특허 제4,946,778호에 기술되어 있다. 본원에 기술된

예시적인 링커는 $(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_3$이다. 링커를 사용하여, 천연적으는로 응집되지만 화학적으로는 단일 쇄 폴리펩티드의 아미노산 말단 항원 결합 부분으로 분리되는 중쇄 및 경쇄를 전환시키는데 사용하며, 여기서 상기 항원 결합 부분은 2개의 폴리펩티드 쇄로 제조된 본래 구조와 유사한 구조로 중첩되어, 관심 항원에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 링커 암호화 서열에 의해 연결되어 있는 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 항체 불변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 연결되어 있다. 불변 영역은 생성된 폴리펩티드가 쇄간 디술피드 결합을 형성시켜 이량체를 형성시키도록 하고, 항체-의존성 세포의 세포독성(ADCC)을 매개하는 능력과 같은 목적하는 이펙터 기능을 함유하는 것이다. 인간에서 사용하고자 하는 본 발명의 면역글로불린-유사 분자의 경우에, 불변 영역은 전형적으로 잠재적 항-인간 면역 반응을 최소화시키고 공인된 이펙터 기능을 제공하는 실질적 인간일 것이다. 항체 불변 영역을 암호화하는 서열의 조작은 본원에 참고문헌으로 인용된 문헌[PCT 공개공보, Morrison and Oi, WO 89/07142]에 기술되어 있다. 바람직한 양태에 있어서, CH1 도메인은 결실되어 있고, 제2 가변 영역의 카복실 말단은 힌지 영역을 통해 CH2의 아미노 말단에 연결되어 있다. 경쇄의 상응하는 Cys를 갖는 디술피드 결합이 천연 항체 분자의 중쇄 및 경쇄를 보유하도록 하는 힌지의 Cys 잔기는 결실될 수 있거나, 바람직하게는 Pro 잔기 등으로 치환된다.

<73> 상기한 바와 같이, 본 발명은 본원에 제공된 바와 같은 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 발현을 지시할 수 있는 재조합 발현 작제물을 제공한다. 본원에 인용된 각종 아미노산 서열에서 발생하는 아미노산은 익히 공지된 3문자 또는 1문자 약어에 따라 식별한다. 본원에 인용된 각종 DNA 서열 또는 이의 단편에서 발생하는 뉴클레오티드는 당해 분야에 통상적으로 사용되는 표준 단일 문자 명명법으로 명명한다. 제공된 아미노산 서열은 또한 단지 사소한 변화, 예를 들어, 예시적이며 비제한적인 공유 화학적 변이, 삽입, 결실 및 치환을 갖는 유사한 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 이는 보존적 치환을 추가로 포함할 수 있다. 서로 유사한 아미노산 서열은 서열 상동체의 실질적 영역을 공유할 수 있다. 유사한 방식으로, 뉴클레오티드 서열은 단지 사소한 변화, 예를 들어, 예시적이며 비제한적인 공유 화학적 변이, 삽입, 결실 및 치환을 갖는 실질적으로 유사한 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으며, 이는 유전자 암호의 축퇴로 인한 잠재적 변이를 추가로 포함할 수 있다. 서로 유사한 뉴클레오티드 서열은 서열 상동체의 실질적 영역을 공유할 수 있다.

<74> 환자에서의 악성 상태의 존재는 환자에서의, 예를 들어, 신생물, 종양, 비접촉 억제되거나 종양원적으로 형질전환된 세포 등을 포함한 형성이상성, 암성 및/또는 형절전환된 세포의 존재를 의미한다. 본 발명에 의해 고려된 바람직한 양태에 있어서는, 예를 들어, 상기한 암 세포는 악성 조혈 세포, 예를 들어, 림프양 계통의 형질전환된 세포 및 특히 B-세포 림프종 등이고; 암 세포는 특정한 바람직한 양태에 있어서는 또한 암종 세포와 같은 상피 세포일 수 있다. 본 발명은 또한 B-세포 장애를 고려하고, 이는 B-세포에는 영향을 미치지만 이와 같이 한정시키고자 하지는 않으며, 또한 자가면역 질환 및 특히 자가항체 생산을 특징으로 하는 질환, 장애 및 상태를 포함하고자 하는 특정한 악성 상태(예를 들어, B-세포 림프종)를 포함할 수 있다.

<75> 자가항체는 자가 항원과 반응하는 항체이다. 자가항체는 다수의 자가면역 질환(즉, 숙주 면역계가 부적합한 항-"자가" 면역 반응을 발생시키는 질환, 장애 또는 상태)에서 검출되며, 여기서 이들은 질환 활성에 관련된다. 이들 자가면역 질환에 대한 현행 치료법은 연속 투여를 필요로 하고, 특이성이 결여되어 있고, 상당한 부작용을 유발하는 면역억제 약물이다. 최소의 독성을 갖는 자가항체 생산을 배제할 수 있는 신규한 접근법은 다수의 사람들이 걸린 질환의 범위에 대한 미충족 의약 요구를 극복할 것이다. 본 발명의 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 림프양 조직으로의 향상된 침투에 대해 디자인한다. B 림프구의 제거는 자가항체 생산 사이클을 방해하여, 새로운 B 림프구가 골수에서 전구체로부터 제조될 때 면역계가 재개시되도록 한다.

<76> 유리한 효과가 비제한적인 이론에 따라 B 세포 제거 요법으로부터 발생하는 것으로 간주되는 다수의 질환이 확인되었으며, 이들 질환의 수가지 예의 간단한 설명은 다음과 같다.

<77> 자가면역 갑상선 질환은 그레이브 질환 및 하시모토 갑상선염을 포함한다. 미국에서만도 특정 형태의 자가면역 갑상선 질환에 걸린 사람이 약 2천만명이다. 자가면역 갑상선 질환은 갑상선이 갑상선 기능 항진증(그레이브 질환)을 유발하도록 자극하거나 갑상선이 갑상선 기능 저하증(하시모토 갑성선염)을 유발하도록 파괴하는 자가항체의 생산으로부터 야기된다. 갑상선의 자극은 갑상선 자극 호르몬(TSH) 수용체에 결합하여 이를 활성화시키는 자가항체에 의해 유발된다. 갑상선의 파괴는 다른 갑상선 항원과 반응하는 자가항체에 의해 유발된다.

<78> 그레이브 질환에 대한 현행 요법은 수술, 방사성 요오드 또는 항갑상선 약물 요법을 포함한다. 항갑상선 약물은 상당한 부작용을 가지고 질환 재발율이 높기 때문에 방사성 요오드가 광범위하게 사용된다. 수술은 대형 갑상선종을 가진 환자의 경우 또는 갑상선 기능의 매우 신속한 정상화를 필요로 하는 경우에 한정된다. TSH 수용체의 자극을 유발하는 자가항체의 생산을 표적화하는 요법은 존재하지 않는다. 하시모토 갑상선염에 대한 현행

요법은 레보티록신 나트륨이고, 당해 요법은 완화의 낮은 가능성으로 인해 통상적으로 장기간이다. 억제 요법은 하시모토 갑상선염에서 갑상선종을 수축시키는 것으로 보여지나, 질환 메카니즘을 표적화하는 자가항체 생산을 감소시키는 요법은 공지되어 있지 않다.

<79> 류마티스 관절염(RA)은 부종, 통증 및 기능 상실을 유도하는 관절의 염증을 특징으로 하는 만성 질환이다. 미국에서는 약 이천오백만명의 사람이 RA에 걸려 있다. RA는 초기 감염 또는 손상, 비정상적인 면역 반응 및 유전자 요인을 포함한 이벤트의 조합에 의해 야기된다. 자가반응성 T 세포 및 B 세포가 RA에서 존재하는 한편, 류마티스양 인자로 불리는, 관절에서 수집된 고수준의 항체의 검출은 RA의 진단에서 사용된다. RA에 대한 현행 요법은 통증을 관리하고 질환의 진행을 지체하는 다수의 약제를 포함한다. 상기 질환을 치유할 수 있는 요법은 발견되지 않았었다. 당해 약제는 비스테로이드계 소염제(NSAID) 및 질환 완화 항류마티스 약물(DMARD)을 포함한다. NSAID는 양성 질환에서 효과적이나, 관절 파괴에 대한 NSAID 및 DMARD 둘 다 상당한 부작용과 관려이 있다. 단지 1종의 신규한 DMARD인 레플루노미드만이 10년 넘게 승인되어 왔다. 레플루노미드는 자가항체의 생산을 차단하고, 염증을 감소시키고, RA의 진행을 지체한다. 그러나, 당해 약물도 또한 구토, 설사, 모발 손상, 발진 및 간 손상을 포함한 심각한 부작용을 유발한다.

<80> 전신 홍반성 낭창(SLE)은 신장, 피부 및 관절을 포함한 다수의 기관내 혈관에 대한 재발 손상에 의해 유발되는 자가면역 질환이다. 미국에서 500,000명이 넘는 사람이 SLE에 걸려 있다. SLE에 걸린 환자에서, T 세포와 B 세포 사이의 결함이 있는 상호작용은 세포 핵을 공격하는 자가항체의 생산을 유발한다. 이들은 항-이본쇄 DNA 및 항-Sm 항체를 포함한다. 인지질에 결합하는 자가항체는 또한 SLE 환자의 약 절반에서 발견되고, 이는 혈관 손상 및 낮은 혈구수를 유발한다. 면역 복합체는 SLE 환자의 신장, 혈관 및 관절에 축적되고, 여기서 이들은 염증 및 조직 손상을 유발한다. SLE에 대한 어떠한 치료제도 당해 질환을 치유하는 것으로 밝혀지지 않았다. NSAID 및 DMARD는 질환의 중증도에 따라 요법에 사용된다. 자가항체를 제거하기 위한 혈장 교환을 이용하는 혈장반출술은 SLE 환자에서 일시적인 완화를 유발할 수 있다. 자가항체가 SLE를 유발한다는 일반적인 의견 일치가 존재하므로, B 세포 계통을 제거하여, 새로운 B 세포가 전구체로부터 생성될 때 면역계를 재개시함으로써 SLE 환자에서의 장기간 이익에 대한 희망을 제공한다.

<81> 쇼그렌 증후군은 신체의 수분 분비선의 파괴를 특징으로 하는 자가면역 질환이다. 쇼그렌 증후군은 가장 유행하는 자가면역 장애 중 하나이고, 미국에서는 4백만명 정도가 걸려 있다. 쇼그렌에 걸린 사람 중 약 절반이 또한 결합 조직 질환, 예를 들어, 류마티스 관절염에 걸린 한편, 나머지 절반은 어떠한 병발성 자가면역 질환이 없는 원발성 쇼그렌에 걸린다. 항-핵 항체, 류마티스양 인자, 항-포드린 및 항-무스카린 수용체를 포함한 자가항체가 종종 쇼그렌 증후군에 걸린 환자에서 존재한다. 통상의 요법은 코르티코스테로이드를 포함한다.

<82> 면역 혈소판감소성 자반증(ITP)은 혈소판에 결합하여 이들의 파괴를 유발하는 자가항체에 의해 야기된다. ITP 중 몇몇 경우는 약물에 의해 유발되고, 나머지는 감염, 임신 또는 자가면역 질환, 예를 들어, SLE와 관련된다. 모든 경우 중 약 절반은 "특발성"으로 분류되고, 이는 원인이 미지인 것을 의미한다. ITP의 치료법은 증상의 중증도에 의해 결정된다. 몇몇 경우에, 어떠한 요법도 필요하지 않다. 대부분의 경우에, 코르티코스테로이드를 포함한 면역억제 약물 또는 면역글로불린의 정맥내 주입으로 T 세포를 제거한다. 혈소판의 증가된 수를 통상적으로 유발하는 또 다른 치료법은 항체-코팅된 혈소판을 파괴하는 기관인 비장의 제거이다. 시클로스포린, 시클로포스파미드 또는 아자티오프린을 포함한 보다 강력한 면역억제 약물을 중증 병상의 환자에 사용된다. 환자의 혈장의 단백질 A 칼럼을 통한 통과에 의한 자가항체의 제거가 중증 질환에 걸린 환자의 제2 방식 치료법으로서 사용된다.

<83> 다발성 경화증(MS)은 뇌, 척수 및 소체의 신경 세포 섬유를 격리하는 중추신경계의 염증 및 미엘린의 파괴를 특징으로 하는 자가면역 질환이다. MS의 원인은 밝혀지지 않았지만, 자가면역 T 세포가 질환의 병인에 근원적인 요인인 것으로 널리 간주되고 있다. 그러나, 고수준이 항체가 MS에 걸린 환자의 뇌 척수액에 존재하고, 몇몇 이론은 항체 생산을 유도하는 B 세포 반응이 질환의 매개에 중요하다고 추정한다. B 세포 제거 요법이 MS에 걸린 환자에서 연구된 적은 없다. MS에 대한 치료제는 존재하지 않는다. 현행 요법은 공격의 기간 및 증증도를 감소시킬 수 있지만 경시적으로 MS의 경과에 영향을 미치지 않는 코르코스테로이드이다. MS에 대한 새로운 생물공학 인터페론(IFN) 요법이 최근 승인되었다.

<84> 중증 근무력증(MG)은 수의 근육군의 약화를 특징으로 하는 만성 자가면역 신경근육 장애이다. 미국에서는 약 40,000명의 사람이 MG에 걸려 있다. MG는 신경근육 접합부에서 발현되는 아세틸콜린 수용체에 결합하는 자가항체에 의해 발병된다. 자가항체는 아세틸콜린 수용체를 감소시키거나 차단하고, 신경으로부터 근육으로의 시그널 전달을 방해한다. MG에 대한 알려진 치료제는 없다. 통상의 치료법은 코르티코스테로이드,

시클로스포린, 시클로포스파미드 또는 아자티오프린을 이용한 면역억제를 포함한다. 흉선의 수술에 의한 제거가 자가면역 반응을 약화시키기 위해 종종 사용된다. 혈액 중의 자가항체 수준을 감소시키는데 사용되는 혈장반출술은 MG에서 효과적이지만, 자가항체의 생산이 지속적이기 때문에 일시적이다. 혈장반출술은 수술 전 중증 근육 약화에 대해 보류된다.

<85> 약 5백만명이 건선에 걸려 있다. 이는 피부에서의 자가면역 염증이다. 건선은 30%가 관절염과 관련된다(건선성 관절염). 스테로이드, UV 광 레티노이드, 비타민 D 유도체, 시클로스포린, 메토트렉세이트를 포함한 다수의 치료법이 있다.

<86> 경피증은 전신 경화증으로도 알려져 있는 결합 조직의 만성 자가면역 질환이다. 경피증은 피부의 비후를 야기하는 콜라겐의 과생산을 특징으로 한다. 미국에서는 약 300,000명의 사람이 경피증에 걸려 있다.

<87> 크론 질환 및 궤양성 대장염을 포함한 염증성 장 질환은 소화계의 자가면역 질환이다.

<88> 또한, 본 발명은 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 작제물, 및 특히 발현시킬 수 있는 상기한 단백질을 암호화하는 재조합 단백질을, 예를 들어, 상기한 폴리펩티드의 단편, 유사체 및 유도체로서 투여하는 방법에 관한 것이다. 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 언급하는 경우에 용어 "단편", "유도체" 및 "유사체는 상기한 폴리펩티드와 본질적으로 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 임의의 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 의미한다. 따라서, 유사체는 프로단백질 부분의 절단에 의해 활성화시켜 활성 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드를 생성시킬 수 있는 프로단백질을 포함한다.

<89> 본원에 인용된 cDNA에 의해 암호화된 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 포함한 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 단편, 유도체 또는 유사체는 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존되거나 비보존된 아미노산 잔기(바람직하게는 보존된 아미노산 잔기)로 치환될 수 있고 이러한 치환된 아미노산 잔기가 유전자 암호에 암호화된 것일 수 있거나 아닐 수 있는 것, (ii) 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환기를 포함하는 것 또는 (iii) 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 프로단백질 서열의 검출 또는 특이적 기능 변화에 사용되는 아미노산을 포함한, 추가의 아미노산이 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드에 융합되어 있는 것일 수 있다. 이러한 단편, 유도체 및 유사체는 본원의 교시로부터 당업자의 범주내에 있는 것으로 간주된다.

<90> 본 발명의 폴리펩티드는 당해 분야에 공지된 서열과 동일하거나 유사한 결합 도메인 폴리펩티드 아미노산 서열을 갖는 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 및 융합 단백질, 또는 이의 단편 또는 부분을 포함한다. 예를 들어, 예시로서 비제한적으로, 인간 CD154 분자 세포외 도메인은 본 발명에 따라서 사용하기 위해 고려되고, 리포팅된 폴리펩티드에 대해 70% 이상의 유사성(바람직하게는 70% 이상의 동일성) 및 보다 바람직하게는 90% 이상의 유사성(보다 바람직하게는 90% 이상의 동일성) 및 보다 더 바람직하게는 리포팅된 폴리펩티드 및 이러한 폴리펩티드의 부분에 대해 95% 이상의 유사성(보다 더 바람직하게는 95% 이상의 동일성)을 갖는 폴리펩티드도 마찬가지이며, 여기서 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드의 상기한 부분은 일반적으로 30개 이상의 아미노산 및 보다 바람직하게는 50개 이상의 아미노산을 함유한다.

<91> 당해 분야에 공지된 바와 같이, 2개의 폴리펩티드 사이의 "유사성"은 폴리펩티드의 아미노산 서열 및 이에 대한 보존된 아미노산 치환기를 제2 폴리펩티드의 서열과 비교함으로써 측정한다. 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 단편 또는 부분을 본 발명의 전장 핵산을 합성하는데 사용할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "동일성 %"는 2개 이상의 폴리펩티드가 정렬되어 있고 이들의 서열을 서열 갭 및 서열 미스매취를 (국립 보건원)/NCBI 데이터베이스(Bethesda, MD; www. ncbi. nlm. nih. gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast 참조)에 의해 제공된 디폴트 가중에 따라 평가하는 갭핑된 BLAST 알고리듬[참조예: Altschul et al., 1997 Nucl. Ac. Res. 25:3389] 이용하여 분석한다.

<92> 용어 "단리된"은 물질을 이의 본래 환경(예를 들어, 물질이 천연 발생인 경우에 자연 환경)으로부터 제거하는 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물내에 존재하는 천연 발생 핵산 또는 폴리펩티드는 단리되지 않으나, 자연계에 공존하는 물질 중 일부 또는 전체로 분리된 동일한 핵산 또는 폴리펩티드는 단리된다. 이러한 핵산은 벡터의 일부일 수 있고/있거나 상기한 핵산 또는 폴리펩티드는 조성물의 일부일 수 있고, 상기한 벡터 또는 조성물이 이의 자연 환경의 일부이지 않을 경우에 단리될 수 있다.

<93> 용어 "유전자"는 폴리펩티드 쇄를 제조하는데 관련되는 DNA의 절편을 의미하고; 이는 암호화 영역 "리더 및 트레일러"에 선행하고 후행하는 영역뿐만 아니라 개별적 암호화 절편(엑손) 사이에 개입된 서열(인트론)을 포함한

다.

<94> 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명은 예를 들어, 예시적으로 비제한적으로 융합 단백질의 검출, 기능 변화, 단리 및/또는 정제를 가능하게 하는 추가의 기능성 폴리펩티드 서열에 융합되어 있는 결합 도메인 폴리펩티드 서열의 발현에 제공하기 위한 추가의 면역글로불린 도메인 암호화 서열에 프레임내에서 융합되어 있는 결합 도메인 암호화 서열을 갖는 핵산에 의해 암호화되는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 제공한다. 상기 융합 단백질은 융합 생성물의 거동에 영향을 미치는 추가의 면역글로불린-유래된 폴리펩티드 서열을 함유시키는 것에 의해, 예를 들어(및 상기한 바와 같이) 디술피드 결합 형성에의 관여를 위한 술프히드릴 기의 이용가능성을 감소시키는 것에 의해 및 ADCC 및/또는 CDC를 증강시키는 능력을 제공하는 것에 의해 결합 도메인의 기능 변화를 가능하게 할 수 있다.

<95> 폴리펩티드의 변이는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 수행할 수 있다. 본원에서 바람직한 방법은 융합 단백질을 암호화하는 DNA의 변이 및 변이된 DNA의 발현에 따라 달라진다. 위에서 논의된 바와 같은 결합 도메인-면역글로불린 융합물 중 하나를 암호화하는 DNA를 하기한 방법을 포함한 표준 방법을 이용하여 돌연변이 유발할 수 있다. 예를 들어, 달리 다량체 형성을 용이하게 하거나 특정 분자 입체형태를 조성할 수 있는 시스테인 잔기를 폴리펩티드로부터 결실시키거나, 예를 들어, 응집물 형성을 초래하는 시스테인 잔기를 치환시킬 수 있다. 필요한 경우에, 응집물 형성을 초래하는 시스테인 잔기의 정체를 시스테인 잔기의 결실 및/또는 생리적으로 허용되는 완충액 및 염을 함유하는 용액 중에서 생성된 단백질 응집물의 존재 여부의 확인에 의해 실험적으로 결정할 수 있다. 또한, 결합 도메인-면역글로불린 융합물의 단편을 작제하여 사용할 수 있다. 상기한 바와 같이, 다수의 후보 결합 도메인-면역글로불린 융합물에 대한 반대수용체/리간드 결합 도메인을 묘사하여, 당업자는 본 발명의 발현 작제물의 암호화된 생성물 중의 함유물에 대해 적합한 폴리펩티드 도메인을 용이하게 선택할 수 있다.

<96> 아미노산의 보존적 치환은 익히 공지되어 있고, 일반적으로 생성된 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 분자의 생물학적 활성을 변화시키지 않고 수행할 수 있다. 예를 들어, 이러한 치환은 일반적으로 극성 잔기, 하전된 잔기, 소수성 잔기, 소형 잔기 등의 군내에서 상호교환함으로써 수행한다. 필요한 경우에, 이러한 치환은 단순히 생성된 변이된 단백질을 적합한 세포 표면 수용체에 결합하는 능력 또는 적합한 항원 또는 목적하는 표적 분자에 결합하는 능력에 대해 시험관내 생물학적 검정법으로 시험함으로써 실험적으로 결정할 수 있다.

<97> 본 발명은 또한 본원에 제공된 바와 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 암호화 폴리뉴클레오티드 서열에 하이브리화하는 핵산 또는 당업자가 용이하게 식별할 수 있을 때 서열 사이에 70% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 및 보다 바람직하게는 95% 이상의 동일성이 존재하는 경우에 이의 보체에 관한 것이다. 본 발명은 특히 본원에 인용된 결합 도메인-면역글로불린 융합물 암호화 핵산에 엄격한 조건하에 하이브리드화하는 핵산에 관한 것이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "엄격한 조건"은 하이브리드가 서열 사이에 95% 이상 및 바람직하게는 97% 이상의 동일성이 존재하는 경우에만 발생할 수 있는 것을 의미한다. 바람직한 양태에 있어서 본원에 인용된 결합 도메인-면역글로불린 융합물 암호화 핵산에 하이브리드화 하는 핵산은 본원에 인용된 참고문헌의 cDNA에 의해 암호화된 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드와 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 실질적으로 보유하는 폴리펩티드를 암호화한다.

<98> 본원에 사용된 바와 같이, 특정한 엄격도의 조건하에서의 "하이브리드화"는 2개의 일본쇄 핵산 분자 사이에 형성된 하이브리드의 안정성을 기술하는데 사용한다. 하이브리드화의 엄격도는 전형적으로 하이브리드를 어닐링하고 세척하는 이온 강도 및 온도의 조건으로 표현한다. 전형적으로, "높은", "중간" 및 "낮은" 엄격도는 다음의 조건 또는 이에 등가인 조건을 포함한다: 높은 엄격도: 0.1 x SSPE 또는 SSC, 0.1% SDS, 65℃; 중간 엄격도: 0.2 x SSPE 또는 SSC, 0.1% SDS, 50℃; 및 낮은 엄격도: 1.0 x SSPE 또는 SSC, 0.1% SDS, 50℃. 당업자에게 공지된 바와 같이, 하이브리드화 조건의 엄격도의 변경은 예비하이브리드화, 하이브리드화 및 세척 단계에 사용되는 시간, 온도 및/또는 용액의 농도를 변경함으로써 달성할 수 있고, 적합한 조건은 또한 사용되는 프로브 또는 블롯팅된 프로밴드 핵산 샘플의 특정한 뉴클레오티드 서열에 따라 부분적으로 달라질 수 있다. 따라서, 적합한 엄격한 조건은 프로브의 목적하는 선택성을 확인하는 경우에 과도한 실험작업 없이 하나 이상의 특정한 프로밴드 서열에 하이브리드하지만, 특정한 다른 프로밴드 서열에는 하이브리드화 하지 않는 이의 능력을 기초로 하여 용이하게 선택할 수 있다.

<99> 본원에서 폴리뉴클레오티드로도 불리는 본 발명의 핵산은 RNA 형태 또는 DNA 형태일 수 있으며, 여기서 DNA는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함할 수 있다. DNA는 이본쇄 또는 일본쇄일 수 있고, 일본쇄일 경우에 암호화 쇄이거나 비-암호화(안티-센스) 쇄일 수 있다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 결합 도메인-면역글로불린 융합

폴리펩티드를 암호화하는 암호화 서열은 임의의 제공된 결합 도메인-면역글로불린 융합물에 대해 당해 분야에 공지된 암호화 서열과 동일할 수 있거나, 유전자 암호의 중복 또는 축퇴의 결과로서 동일한 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드를 암호화하는 상이한 암호화 서열일 수 있다.

<100> 본 발명에 따라 사용하기 위한 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드에 대한 암호화 서열 단독; 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드에 대한 암호화 서열 및 추가의 암호화 서열; 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드에 대한 암호화 서열 (및 임의로 추가의 암호화 서열) 및 비-암호화 서열, 예를 들어, 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드에 대한 암호화 서열의 인트론 또는 비-암호화 서열 5' 및/또는 3'을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 이는, 예를 들어, 조절되거나 조절가능한 프로모터, 인핸서, 다른 전사 조절 서열, 리프레서 결합 서열, 해독 조절 서열 또는 임의의 다른 조절 핵산 서열일 수 있는 하나 이상의 조절 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정할 필요는 없다. 따라서, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 "암호화하는 핵산" 또는 "암호화하는 폴리뉴클레오티드"라는 용어는 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드에 대한 암호화 서열만을 포함하는 핵산뿐만 아니라 추가의 암호화 및/또는 비-암호화 서열(들)을 포함하는 핵산을 포함한다.

<101> 본원에 기술된 바와 같이 사용하기 위한 핵산 및 올리고뉴클레오티드는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 합성할 수 있다[참조예: WO 93/01286, 미국 특허원 제07/723,454호; 미국 특허 제5,218,088호; 미국 특허 제5,175,269호; 미국 특허 제5,109,124호]. 본 발명에서 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드 및 핵산 서열의 동정법은 당해 분야에 익히 공지된 방법을 포함한다. 예를 들어, 유용한 올리고뉴클레오티드의 바람직한 특성, 길이 및 다른 특성은 익히 공지되어 있다. 특정한 양태에 있어서, 합성 올리고뉴클레오티드 및 핵산 서열을 포스포티오에이트, 메틸포스포네이트, 술폰, 술페이트, 케틸, 포스포로디티오에이트, 포스포라미데이트, 포스페이트 에스테르와 같은 연결기, 및 안티센스 적용에서 유용한 것으로 입증된 다른 연결기를 함유시킴으로써 내인성 숙주 세포 핵분해 효소에 의한 분해를 극복하도록 디자인할 수 있다[참조예: Agrwal et al., Tetrehedron Lett. 28:3539-3542 (1987); Miller et al., J. Am. Chem. Soc. 93:6657-6665 (1971); Stec et al., Tetrehedron Lett. 26:2191-2194 (1985); Moody et al., Nucl. Acids Res. 12:4769-4782 (1989); Uznanski et al., Nucl. Acids Res. (1989); Letsinger et al., Tetrahedron 40:137-143 (1984); Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 54:367-402 (1985); Eckstein, Trends Biol. Sci. 14:97-100 (1989); Stein, Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression, Cohen, Ed, Macmillan Press, London, pp. 97-117 (1989); Jager et al., Biochemistry 27:7237-7246 (1988)].

<102> 한 양태에 있어서, 본 발명은 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질에서 사용하기 위한 절단형 성분(예를 들어, 결합 도메인 폴리펩티드, 힌지 영역 폴리펩티드, 링커 등)을 제공하고, 또 다른 양태에 있어서, 본 발명은 상기한 절단형 성분을 갖는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 제공한다. 절단형 분자는 분자의 전장 미만의 형태를 포함하는 임의의 분자일 수 있다. 본 발명에 의해 제공된 절단형 분자는 절단형 생물학적 중합체를 포함할 수 있고, 본 발명의 바람직한 양태에 있어서, 상기한 절단형 분자는 절단형 핵산 분자 또는 절단형 폴리펩티드일 수 있다. 절단형 핵산 분자는 공지되거나 기술된 핵산 분자의 전장 미만의 뉴클레오티드 서열을 보유하고, 여기서, 상기한 공지되거나 기술된 핵산 분자는, 당업자가 이를 전장 분자로서 간주하는 한, 천연 발생, 합성 또는 재조합 핵산 분자일 수 있다. 따라서, 예를 들어, 유전자 서열에 상응하는 절단형 핵산 분자는 유전자가 암호화 및 비-암호화 서열, 프로모터, 인핸서 및 다른 조절 서열, 플랭킹 서열 등, 및 유전자의 일부로서 인식되는 다른 기능성 및 비-기능성 서열을 포함하는 경우에 전장 미만의 유전자를 함유한다. 또 다른 예에서, mRNA 서열에 상응하는 절단형 핵산 분자는 다양한 절단형 및 비-절단형 영역뿐만 아니라 다른 기능성 및 비-기능성 서열을 포함할 수 있는 전장 미만의 mRNA 전사체를 함유한다.

<103> 또 다른 바람직한 양태에 있어서, 절단형 분자는 특유한 단백질 또는 폴리펩티드 성분의 전장 미만의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다. 본원에서 사용된 바와 같은 "결실"은 당업자에게 이해되는 바와 같은 이의 통상의 의미를 가지며, 예를 들어, 본원에 제공된 절단형 분자의 경우에서와 같이 상응하는 전장 분자에 대해 말단 또는 비-말단 영역으로부터 서열의 일부가 하나 이상 결손된 분자를 의미할 수 있다. 선형 생물학적 중합체인 절단형 분자, 핵산 분자 또는 폴리펩티드는 분자의 말단으로부터의 결실 또는 분자의 비-말단 영역으로부터의 결실을 하나 이상 가질 수 있으며, 여기서 이러한 결실은 1 내지 1500개의 연속적인 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기, 바람직하게는 1 내지 500개의 연속적인 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 및 보다 바람직하게는 1 내지 300개의 연속적인 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 결실일 수 있다. 특정한 특히 바람직한 양태에 있어서, 절단형 핵산 분자는 270 내지 330개의 연속적인 뉴클레오티드의 결실을 가질 수 있다. 특정한 또 다른 특히 바람직한 양태에 있어서, 절단형 폴리펩티드 분자는 80 내지 140개의 연속적인 아미노산의 결실을 가질 수

있다.

<104> 본 발명은 또한 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드의 단편, 유사체 및/또는 유도체를 암호화하는 본원에 언급된 핵산 핵산의 변이체에 관한 것이다. 결합 도메인-면역글로불린 융합물을 암호화하는 핵산의 변이체는 핵산의 천연 발생 대립유전자 변이체 또는 비-천연 발생 변이체일 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 대립유전자 변이체는 하나 이상의 뉴클레오티드의 하나 이상의 치환, 결실 또는 첨가를 가질 수 있는 핵산 서열의 대체 형태이고, 이들 중 어떠한 것은 암호화된 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드의 기능을 실질적으로 변화시키지 않는다.

<105> 결합 도메인-면역글로불린 융합물의 변이체 및 유도체는 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 변이에 의해 수득할 수 있다. 천연 아미노산 서열의 변이는 임의의 다수의 통상적인 방법에 의해 달성할 수 있다. 돌연변이는 변이체 서열을 함유하는 올리고뉴클레오티드를 합성함으로써 특정한 유전자좌에서 도입할 수 있고, 천연 서열의 단편에 연결할 수 있는 제한 부위에 의해 플랭킹할 수 있다. 연결 후에, 생성된 재작제된 서열은 목적하는 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 갖는 유사체를 암호화한다.

<106> 달리, 올리고뉴클레오티드-지시된 부위-특이적 돌연변이 유발 방법을 이용하여, 변이된 유전자를 제공할 수 있으며, 여기서 예정된 코돈을 치환, 결실 또는 삽입에 의해 변이시킬 수 있다. 상기한 변이를 수행하는 예시적인 방법은 문헌[Walder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985); Kunkel et al. (Methods in Enzymol. 154:367, 1987); 미국 특허 제4,518,584호 및 제4,737,462호]에 의해 개시되어 있다.

<107> 예로서, DNA의 변이는 DNA 주형에서의 변이를 도입하고 증폭시키는 프라이머를 사용하는 DNA 증폭 방법, 예를 들어, 중복 증폭에 의한 PCR 스플라이싱(SOE)의 사용과 조합된 단백질을 암호화하는 DNA의 부위-지시된 돌연변이 유발에 의해 수행할 수 있다. 부위-지시된 돌연변이 유발은 전형적으로 일본쇄 및 이본쇄 형태를 갖는 파아지 벡터, 예를 들어, 익히 공지되고 상업적으로 구입가능한 M13 파이지 벡터를 사용하여 수행한다. 일본쇄 파아지 복제 기원을 함유하는 다른 적합한 벡터를 사용할 수 있다[참조예: Veira et al., Meth. Enzymol. 15:3, 1987]. 일반적으로, 부위-지시된 돌연변이 유발은 관심 단백질(예를 들어, 제공된 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 전체 또는 성분 일부)을 암호화하는 일본쇄 벡터를 제조함으로써 수행할 수 있다. 일본쇄 벡터에 DNA에 대한 상동성 영역내의 목적하는 변이를 함유하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 벡터에 어닐링시킨 다음, DNA 폴리머라제, 예를 들어, 이. 콜라이(E. coli) DNA 폴리머라제 I(Klenow 단편)을 첨가하고, 헤테로듀플렉스를 제조하는 프라이머로서 이본쇄 영역을 사용하고, 여기서 일본쇄는 변이된 서열을 암호화하고, 나머지는 원래 서열을 암호화한다. 헤테로듀플렉스를 적합한 세균 세포에 도입하고, 목적하는 변이를 포함하는 클론을 선택한다. 생성된 변이된 DNA 분자를 적합한 숙주 세포내에서 재조합적으로 발현시켜, 변이된 단백질을 제조할 수 있다.

<108> 아미노산 잔기 또는 서열의 다수의 첨가 또는 치환, 또는 생물학적 활성에 필요로 하지 않는 말단 또는 내부 잔기 또는 서열의 결실을 암호화하는 등가의 DNA 작제물이 또한 본 발명에 의해 포함된다. 예를 들어, 및 상기한 바와 같이, 생물학적 활성에 바람직하지 않거나 본질적이지 않은 Cys 잔기를 암호화하는 서열을 변이시켜, Cys 잔기가 결실되거나 다른 아미노산으로 치환되도록 하여, 탈변성시 부적합한 분자내 디술피드 가교의 형성을 방해한다.

<109> 숙주 유기체는 시험관내 및 생체내 발현을 포함한, 본 발명의 재조합 작제물에 의해 암호화된 결합 도메인-면역글로불린 융합물 제조가 발생할 수 있는 유기체, 예를 들어, 세균(예를 들어, 이. 콜라이), 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) 및 피키아 파스토리스(Pichia pastoris)), 곤충 세포 및 포유동물을 포함한다. 따라서, 숙주 유기체는 본원에 제공된 백신의 제조에서 작제, 증식, 발현 또는 다른 단계를 위한 유기체를 포함할 수 있고; 또한 숙주는 면역 반응이 상기한 바와 같이 발생하는 환자를 포함한다. 현재 바람직한 숙주 세포는 이. 콜라이 세균 균주, 동계 교배 마우스 균주 및 마우스 세포주, 및 인간 세포, 환자 및 세포주이다.

<110> 목적하는 결합 도메인-면역글로불린 융합물을 암호화하는 DNA 작제물을 적합한 숙주내에서의 발현을 위한 플라스미드에 도입한다. 바람직한 양태에 있어서, 숙주는 세균 숙주이다. 리간드 또는 핵산 결합 도메인을 암호화하는 서열은 바람직하게는 특정한 숙주내에서 발현을 위해 최적화된 코돈이다. 따라서, 예를 들어, 인간 결합 도메인-면역글로불린 융합물을 세균에서 발현시키는 경우에, 코돈은 세균 사용에 대해 최적화시킬 것이다. 소

형 암호화 영역의 경우에, 유전자를 단일 올리고뉴클레오티드로서 합성할 수 있다. 보다 대형 단백질의 경우에, 다수의 올리고뉴클레오티드의 스플라이싱, 돌연변이 유발, 또는 당업자에게 공지된 다른 기법을 사용할 수 있다. 프로모터 및 오퍼레이터와 같은 조절 영역인 플라스미드내에서의 뉴클레오티드의 서열은 전사를 위해 서로 작동적으로 연결될 수 있다. 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드의 서열은 또한 분비 시그널을 암호화하는 DNA를 포함할 수 있고, 이에 의해 생성된 펩티드는 전구체 단백질이다. 생성된 처리된 단백질은 원형질 주위 공간 또는 발효 매질로부터 회수할 수 있다.

<111> 바람직한 양태에 있어서, DNA 플라스미드는 또한 전사 터미네이터 서열을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "전사 터미네이터 영역"은 전사 종결을 시그널링하는 서열이다. 전체 전사 터미네이터는 단백질-암호화 유전자로부터 수득할 수 있으며, 이는 삽입된 결합 도메인-면역글로불린 융합물 암호화 유전자 또는 프로모터의 공급원과 동일하거나 상이할 수 있다. 전사 터미네이터는 본원에서의 발현계의 임의의 성분이지만, 바람직한 양태에서 사용된다.

<112> 본원에서 사용되는 플라스미드는 관심 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 DNA와 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하고, 결합 도메인-면역글로불린 융합물 서열을 함유하는 플라스미드의 바람직한 사용(예를 들어, 백신의 투여)에 따라 달라지는 상기한 바와 같은 적합한 숙주(예를 들어, 세균, 마우스 또는 인간)내에서 발현을 위해 디자인한다. 본원에서 단백질 및 폴리펩티드의 발현에 적합한 프로모터는 널리 구입가능하고, 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 조절 영역에 결합되어 있는 유도성 프로모터 또는 구조성 프로모터가 바람직하다. 이러한 프로모터는 이. 콜라이 유래의 T7 파아지 또는 다른 T7-유사 파아지 프로모터, 예를 들어, T3, T5 및 SP6 프로모터, trp, lpp 및 lac 프로모터, 예를 들어, lacUV5; 바쿨로바이러스/곤충 세포 발현계의 P10 또는 폴리헤드린 유전자[참조예: 미국 특허 제5,243,041호, 제5,242,687호, 제5,266,317호, 제4,745,051호 및 제5,169,784호] 및 다른 진핵생물 발현계3 유래의 유도성 프로모터를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 단백질의 발현을 위해, 상기한 프로모터를 lac 오페론과 같은 조절 영역과 작동적으로 연결된 플라스미드내에 삽입한다.

<113> 바람직한 프로모터 영역은 이. 콜라이내에서 유도성 및 기능성인 것이다. 적합한 유도성 프로모터 및 프로모터 영역의 예는 이소프로필 β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG; 참조: Nakamura et al., Cell 18:1109-1117, 1979)에 반응성인 이. 콜라이 lac 오퍼레이터; 중금속(예를 들어, 아연) 유도에 반응성인 메탈로티오네인 프로모터 금속-조절-인자[참조예: 미국 특허 제4,870,009호, Evans et al.); IPTG에 반응성인 파아지 T7lac 프로모터[참조예: 미국 특허 제4,952,496호; 및 Studier et al., Meth. Enzymol. 185:60-89, 1990) 및 TAC 프로모터를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

<114> 플라스미드는 선택성 마커 유전자 또는 숙주내에서 기능성인 유전자를 임의로 포함할 수 있다. 선택성 마커 유전자는 형질전환된 세균 세포를 막대한 대부분의 비형질전환된 세포 중에서 동정하여 선택적으로 성장시키는 세균에 대한 표현형을 제공하는 임의의 유전자를 포함한다. 세균 숙주에 적합한 선택성 마커 유전자는, 예를 들어, 암피실린 내성 유전자(Amp^r), 테트라시클린 내성 유전자(Tc^r) 및 카나마이신 내성 유전자(Kan^r)를 포함한다. 카나마이신 내성 유전자가 현재 바람직하다.

<115> 플라스미드는 또한 작동적으로 연결된 단백질의 분비에 대한 시그널을 암호화하는 DNA를 포함할 수 있다. 사용하기에 적합한 분비 시그널은 널리 구입가능하고, 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 이. 콜라이에서 기능성인 원핵생물 및 진핵생물 분비 시그널을 사용할 수 있다. 현재 바람직한 분비 시그널은 다음의 이. 콜라이 유전자: ompA, ompT, ompF, ompC, 베타-락타마제, 알칼리 포스파타제 등에 의해 암호화된 것을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다[von Heijne, J. Mol. Biol. 184:99-105, 1985]. 또한, 세균 pelB 유전자 분비 시그널[Lei et al., J. Bacteriol. 169:4379, 1987], phoA 분비 시그널 및 곤충 세포내에서 기능성인 cek2를 사용할 수 있다. 가장 바람직한 분비 시그널은 이. 콜라이 ompA 분비 시그널이다. 당업자에게 공지된 다른 원핵생물 및 진핵생물 분비 시그널을 또한 사용할 수 있다[참조: von Heijne, J. Mol. Biol. 184:99-105, 1985]. 본원에 기술된 방법을 이용하여, 당업자는 효모, 곤충 또는 포유동물 세포내에서 기능성인 분비 시그널을 치환시켜, 상기 세포로부터 단백질을 분비할 수 있다.

<116> 이. 콜라이 세포의 형질전환에 바람직한 플라스미드는 발현 pET 벡터(예를 들어, pET-11a, pET-12a-c, pET-15b; 참조: 미국 특허 제4,952,496호; 구입원: Novagen, Madison, WI.]를 포함한다. 다른 바람직한 플라스미드는 pKK 플라스미드, 특히 pKK 223-3이고, 이는 tac 프로모터[Brosius et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6929, 1984; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology; 미국 특허 제5,122,463호, 제5,173,403호, 제5,187,153호, 제5,204,254호, 제5,212,058호, 제5,212,286호, 제5,215,907호, 제5,220,013호, 제5,223,483호

및 제5,229,279호]를 포함한다. 플라스미드 pKK는 암피실린 내성 유전자의 카나마이신 내성 유전자로의 치환에 의해 변이시켰다[구입원: Pharmacia; pUC4K로부터 수득함; 참조예: Vieira et al. Gene 19:259-268, 1982; 미국 특허 제4,719,179호]. 바큘로바이러스 벡터, 예를 들어, pBlueBac(pJVETL로도 칭함 및 이의 유도체), 특히 pBlueBac III[참조예: 미국 특허 제5,278,050호, 제5,244,805호, 제5,243,041호, 제5,242,687호, 제5,266,317호, 제4,745,051호 및 제5,169,784호; 구입원: Invitrogen, San Diego]를 또한 곤충 세포내에서 폴리펩티드의 발현에 사용할 수 있다. 다른 플라스미드는 pIN-IIIompA 플라스미드[참조예: 미국 특허 제4,575,013호; Duffaud et al., Meth. Enz. 153:492-507, 1987), 예를 들어, pIN-IIIompA2를 포함한다.

<117> 바람직하게는, DNA 분자를 세균 세포, 바람직하게는 이. 콜라이내에서 복제한다. 바람직한 DNA 분자는 또한 세균의 세대로부터 세대로의 DNA 분자의 유지를 확보하기 위한 세균의 복제 기원을 포함한다. 이러한 방식으로, 다량의 DNA 분자를 세균내에서의 복제에 의해 제조할 수 있다. 바람직한 세균의 복제 기원은 f1-ori 및 col E1 복제 기원을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 바람직한 숙주는 유도성 프로모터, 예를 들어, lacUV 프로모터에 작동적으로 연결되어 있는 T7 RNA 폴리머라제를 암호화하는 DNA의 염색체 복사체를 함유하다[참조: 미국 특허 제4,952,496호]. 이러한 숙주는 용원균 이. 콜라이 균주 HMS174(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysS, HMS174(DE3) 및 BL21(DE3)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 균주 BL21(DE3)이 바람직하다. pLys 균주는 T7 RNA 폴리머라제의 천연 억제제인 T7 리소자임을 저수준으로 제공한다.

<118> 제공된 DNA 분자는 또한 리프레서 단백질을 암호화하는 유전자를 함유할 수 있다. 리프레서 단백질은 리프레서 단백질이 결합되는 뉴클레오티드의 서열을 함유하는 프로모터의 전사를 억제할 수 있다. 상기 프로모터는 세포의 생리적 조건을 변화시킴으로써 약화시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 변화는 성장 배지에 오퍼레이터와 또는 조절 단백질 또는 DNA의 다른 영역과 상호작용하는 능력을 억제하는 분자를 첨가함으로써 또는 성장 배지의 온도를 변화시킴으로써 달성할 수 있다. 바람직한 리프레서 단백질은 IPTG 유도에 반응성인 이. 콜라이 lacI 리프레서, 감온성 λ cI857 리프레서 등을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 이. 콜라이 lacI 리프레서가 바람직하다.

<119> 일반적으로, 본 발명의 재조합 작제물은 또한 전사 및 해독에 필수적인 성분을 함유할 것이다. 특히, 이러한 성분은 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 암호화하는 재조합 발현 작제물을 숙주 세포 또는 유기체내에서 발현시키고자 하는 경우에 바람직하다. 본 발명의 특정한 양태에 있어서, 세포 결합 도메인-면역글로불린 융합물 암호화 유전자의 세포 유형에 바람직하거나 세포 유형에 특이적인 발현은 유전자를 프로모터의 조절하에 위치시킴으로써 달성할 수 있다. 프로모터의 선택은 형질전환시킬 세포 유형 및 목적하는 조절의 정도 또는 유형에 따라 달라질 것이다. 프로모터는 구조성이거나 활성일 수 있고, 추가로 세포 유형 특이적, 조직 특이적, 개별 서열 특이적, 이벤트 특이적, 일시적으로 특이적 또는 유도성일 수 있다. 세포 유형 특이적 프로모터 및 이벤트 유형 특이적 프로모터가 바람직하다. 구조성 또는 비특이적 프로모터의 예는 SV40 초기 프로모터(미국 특허 제5,118,627호), SV40 후기 프로모터(미국 특허 제5,118,627호), CMV 초기 유전자 프로모터(미국 특허 제5,168,062호) 및 아데노바이러스 프로모터를 포함한다. 바이러스 프로모터 이외에, 세포 프로모터가 또한 본 발명의 범주내에서 적합하다. 특히, 소위 하우스키핑 유전자에 대한 세포 프로모터가 유용하다. 바이러스 프로모터가 바람직한데, 이는 일반적으로 이들이 세포 프로모터보다 강력하기 때문이다. 프로모터 영역은 보다 고등 진핵생물을 포함한 다수의 진핵생물의 유전자내에서 동정되었고, 특정한 숙주에서 사용하기에 적합한 프로모터는 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다.

<120> 유도성 프로모터를 또한 사용할 수 있다. 이들 프로모터는 덱사메타손에 의해 유도가능한 MMTV LTR(PCT WO 91/13160); 중금속에 의해 유도가능한 메탈로티오네인 프로모터; 및 cAMP에 의해 유도가능한 cAMP 반응 성분을 갖는 프로모터를 포함한다. 유도성 프로모터를 사용함으로써, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 본 발명의 발현 작제물에 의해 세포로 전달할 수 있고, 인듀서의 첨가까지 정지상태를 유지할 수 있다. 이는 유전자 산물의 제조의 타이밍에 대한 추가의 조절의 가능하게 한다.

<121> 이벤트 유형 특이적 프로모터는 이벤트의 발생시, 예를 들어, 종양 형성 또는 바이러스 감염시에만 활성이거나 상향 조절된다. HIV LTR은 이벤트 특이적 프로모터의 익히 공지된 예이다. 상기 프로모터는 tat 유전자 산물이 존재하지 않는 한 불활성이고, 바이러스 감염시 발생한다. 특정한 이벤트 유형 프로모터는 또한 조직 특이적이다.

<122> 또한, 특정한 세포 유전자에 대등하게 조절되는 프로모터를 사용할 수 있다. 예를 들어, 대등하게 발현되는 유전자의 프로모터는 특정한 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 암호화 유전자의 발현이 하나 이상의 추가의 내인적으로 또는 외인적으로 유도된 유전자의 발현과 동시에 바람직한 경우에 사용할 수 있다. 이러한 유형의

프로모터는 면역계의 특정한 조직에서 면역 반응의 유도과 관련된 유전자 발현의 패턴을 인지하여, 상기 조직내에서의 특이적 면역적격 세포를 활성화시키고 달리 면역 반응에 관여하도록 강화시킬 수 있는 경우에 특히 유용하다.

<123> 프로모터 이외에, 리프레서 서열, 네가티브 레귤레이터 또는 조직-특이적 사일런서를 삽입하여, 예를 들어, 치료법의 일부로서 일시적으로 면역손상된 숙주와 같은 특정한 상황에서 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 암호화 유전자의 비-특이적 발현을 감소시킬 수 있다. 다수의 리프레서 성분을 프로모터 영역에 삽입할 수 있다. 전사의 억제는 리프레서 인자의 배향 또는 프로모터로부터의 거리에 독립적이다. 일종의 리프레서 서열은 인슐레이터 서열이다. 이러한 서열은 전사를 억제하고[Dunaway et al., Mol Cell Biol 17:182-9, 1997; Gdula et al., Proc Natl Acad Sci USA 93:9378-83, 1996, Chan et al., J Virol 70:5312-28, 1996; Scott and Geyer, EMBO J 14:6258-67, 1995; Kalos and Fournier, Mol Cell Biol 15:198-207, 1995; Chung et al., Cell 74:505-14, 1993], 배경 전사를 잠재화시킬 것이다.

<124> 리프레서 인자는 또한 유형 II(연골) 콜라겐, 콜린 아세틸트랜스페라제, 알부민[Hu et al., J. Cell Growth Differ. 3(9):577-588, 1992], 포스포글리세레이트 키나제(PGK-2)[Misuno et al., Gene 119(2):293-297, 1992]에 대한 유전자의 프로모터 영역내에서, 및 6-포스포프룩토-2-키나제/프룩토스-2,6-비스포스파타제 유전자[Lemaigre et al., Mol. Cell Biol. 11(2):1099-1106]내에서 동정되었다. 또한, 네가티브 조절 인자 Tse-1은 다수의 간 특이적 유전자내에서 동정되었고, 간세포내에서의 유전자 활성화의 cAMP 반응 인자(CRE)-매개된 유도를 차단하는 것으로 제시되었다[Boshart et al., Cell 61(5):905-916, 1990].

<125> 바람직한 양태에 있어서, 목적한 산물의 발현을 증가시키는 인자를 작제물에 혼입한다. 상기 인자는 내부 리보솜 결합 부위[IRES; Wang and Siddiqui, Curr. Top. Microbiol. Immunol 203:99, 1995; Ehrenfeld and Semler, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 203:65, 1995; Rees et al., Biotechniques 20:102, 1996; Sugimoto et al., Biotechnology 12:694, 1994]를 포함한다. IRES는 해독 효능을 증가시킨다. 또한, 다른 서열은 발현을 증강시킬 수 있다. 특정한 유전자의 경우에, 서열은 특히 5' 말단에서 전사 및/또는 해독을 억제한다. 이러한 서열은 통상적으로 헤어핀 구조를 형성할 수 있는 팔린드롬이다. 전달할 핵산내에서 임의의 상기 서열은 일반적으로 결실시킨다. 전사체 또는 해독된 산물의 발현 수준은 노던 블롯 하이브리드화, RNase 프로브 보호 등을 포함한 임의의 공지된 방법에 의해 평가할 수 있다. 단백질 수준은 ELISA, 웨스턴 블롯, 면역세포화학 또는 다른 익히 공지된 기법을 포함한 임의의 공지된 방법에 의해 평가할 수 있다.

<126> 다른 인자를 본 발명의 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 암호화 작제물에 혼입할 수 있다. 바람직한 양태에 있어서, 상기 작제물은 폴리아데닐화 서열, 스플라이스 공여체 및 수용체 부위를 포함한 전사 터미네이터 서열, 및 인핸서를 포함한다. 포유동물 세포 또는 다른 진핵생물 세포내에서의 작제물의 발현 및 유지에 유용한 다른 인자(예를 들어, 복제 기원)를 또한 혼입할 수 있다. 작제물은 세균 세포내에서 통상적으로 제조되기 때문에, 세균내에서의 증식에 필요하거나 이를 증강시킬 수 있는 인자를 혼입한다. 상기 인자는 복제 기원, 선택성 마커 등을 포함한다.

<127> 본원에 제공된 바와 같이, 본 발명의 작제물을 사용하여 세포에 전달되는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 핵산의 발현을 조절하는 추가의 수준은 2개 이상의 차별적으로 조절된 핵산 작제물을 동시에 전달함으로써 제공할 수 있다. 상기 다수의 핵산 작제물 접근법의 사용은, 예를 들어, 세포 유형 및/또는 또 다른 발현된 암호화된 인자의 존재에 따르는 시공 등위화와 같은 면역 반응의 등위화된 조절을 가능하게 할 수 있다. 당업자는 다양한 수준의 조절된 유전자 발현은 프로모터, 인핸서 및 다른 익히 공지된 유전자 조절 인자를 포함한 적합한 조절 서열의 선택에 의해 유사한 방식으로 달성할 수 있다.

<128> 본 발명은 또한 벡터, 및 본 발명의 핵산을 포함하는 공지된 벡터로부터 제조된 작제물, 및 특히 위에서 제공된 바와 같은 본 발명에 따르는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 및 폴리펩티드를 암호화하는 임의의 핵산을 포함하는 "재조합 발현 작제물"; 벡터 및/또는 본 발명의 작제물로 유전자 조작된 숙주 세포; 및 재조합 기법에 의해 본 발명의 상기한 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 및 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함하는 발현 작제물을 투여하는 방법에 관한 것이다. 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 작제물의 특성(예를 들어, 상기한 바와 같은 프로모터의 유형) 및 목적하는 숙주 세포의 특성(예를 들어, 유사분열후 말기에 분화되는지 활성적으로 분할하는지의 여부; 예를 들어, 발현 작제물이 에피솜으로서 숙주 세포에서 발생하는지 또는 숙주 세포 게놈에 통합되는지의 여부)에 따라 달라지는, 적합한 프로모터의 조절하에 실질적으로 임의의 숙주 세포내에서 발현시킬 수 있다. 원핵생물 및 진핵생물 숙주와 함께 사용하기 위한 적합한 클로닝 및 발현 벡터는 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second

Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989)]에 의해 기술되어 있고; 상기한 바와 같이, 본 발명의 특히 바람직한 양태에 있어서, 재조합 발현은 본 발명의 재조합 발현 작제물로 형질감염되거나 형질전환된 포유동물 세포에서 수행한다.

<129> 전형적으로, 작제물은 플라스미드 벡터로부터 유래된다. 바람직한 작제물은 암피실린 내성 유전자, 폴리아데닐화 시그널 및 T7 프로모터 부위를 암호화하는 핵산 서열을 갖는 변이된 pNASS 벡터(Clontech, Palo Alto, CA)이다. 다른 적합한 포유동물 발현 벡터가 익히 공지되어 있다[참조예: Ausubel et al., 1995; Sambrook et al., supra; 참조예: Invitrogen, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJ; 및 기타 회사로부터의 카탈로그]. 적합한 선택 제제(예를 들어, 메토트렉세이트)의 적용 후에 유전자 증폭으로부터 발생하는, 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 증강된 생산 수준을 촉진하는데 적합한 조절 제어하에 디히드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 암호화 서열을 포함하는 현재 바람직한 작제물을 제조할 수 있다.

<130> 일반적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포의 형질전환을 가능하게 하는 복제 기원 및 선택성 마커, 및 상기한 바와 같은 하류 구조성 서열의 전사를 지시하는 고도로 발현된 유전자로부터 유래되는 프로모터를 포함할 것이다. 이종 구조성 서열을 해독 개시 및 종결 서열을 갖는 적합한 상으로 조립한다. 따라서, 예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 암호화 서열은 숙주 세포내에서 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드를 발현시키기 위한 재조합 발현 작제물로서 다양한 발현 벡터 작제물 중 어느 하나에 포함시킬 수 있다. 특정한 바람직한 양태에 있어서, 작제물은 생체내로 투여되는 제형에 포함시킨다. 상기한 벡터 및 작제물은 염색체, 비염색체 및 합성 DNA 서열, 예를 들어, SV40의 유도체; 세균 플라스미드; 파아지 DNA; 효모 플라스미드; 플라스미드 및 파아지 DNA, 바이러스 DNA, 예를 들어, 백시니아, 아데노바이러스, 계두 바이러스 및 슈도라비, 또는 하기한 바와 같은 복제 결손 레트로바이러스와의 배합물 유래의 벡터를 포함한다. 그러나, 임의의 다른 벡터를 재조합 박현 작제물의 제조에 사용할 수 있고, 바람직한 양태에 있어서, 상기 벡터는 숙주내에서 복제가능하고 생존가능할 것이다.

<131> 적합한 DNA 서열(들)을 다양한 방법에 의해 벡터에 삽입할 수 있다. 일반적으로, DNA 서열을 당해 분야에 공지된 방법에 의해 적합한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들)에 삽입한다. 클로닝, DNA 단리, 증폭 및 정제에 대한, DNA 리가제, DNA 폴리머라제, 제한 엔도뉴클레아제 등을 포함한 효소 반응에 대한, 및 다양한 분리 기법에 대한 표준 기법은 당업자에 의해 익히 공지되고 통상적으로 이용되는 것들이다. 다수의 표준 기법은 문헌[참조예: Ausubel et al. (1993 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Glover (Ed.) (1985 DNA Cloning Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK); Hames and Higgins (Eds.), (1985 Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK); 및 기타 문헌]에 기술되어 있다.

<132> 발현 벡터내에서 DNA 서열은 mRNA 합성을 지시하는 하나 이상의 적합한 발현 조절 서열(예를 들어, 구조성 프로모터 또는 조절된 프로모터)에 작동적으로 연결되어 있다. 상기 발현 조절 서열의 대표적인 예는 상기한 바와 같은 진핵생물 세포 또는 이들의 바이러스의 프로모터를 포함한다. 프로모터 영역은 (클로람페니콜 트랜스페라제) 벡터 또는 선택성 마커를 함유하는 다른 벡터를 사용하여 임의의 바람직한 유전자로부터 선택할 수 있다. 진핵생물 프로모터는 CMV 즉시형 초기, HSV 티미딘 키나제, 초기 및 후기 SV40, 레트로바이러스 유래의 LTR 및 마우스 메탈로티오네인-I을 포함한다. 적합한 벡터 및 프로모터의 선택은 당업자의 수준에서 용이하고, 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산에 작동적으로 연결되어 있는 하나 이상의 프로모터 또는 조절된 프로모터를 포함하는 특정한 특히 바람직한 재조합 발현 작제물의 제조법은 본원에 기술되어 있다.

<133> 보다 고등의 진핵생물에 의한 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터에 삽입함으로써 증가시킬 수 있다. 인핸서는 이의 전사를 증가시키기 위한 프로모터에 대해 작용하는 통상적으로 약 10 내지 300bp의 DNA의 시스-작용 성분이다. 예는 100 내지 270bp의 복제 기원의 후기측에 대한 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기원의 후기측에 대한 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다.

<134> 본원에 제공된 바와 같이, 특정한 양태에 있어서, 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터[Miller et al., 1989 BioTechniques 7:980; Coffin and Varmus, 1996 Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.]일 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 플라스미드 벡터가 유래될 수 있는 레트로바이러스는 몰로니 마우스 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스, 레트로바이러스, 예를 들어, 라우스 육종 바이러

스, 하비 육종 바이러스, 조류 백혈병 바이러스, 긴팔 원숭이 백혈병, 인간 면역결핍 바이러스, 아데노바이러스, 골수증식 육종 바이러스 및 유방 종양 바이러스를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

<135> 레트로바이러스는 DNA 중간체를 통해 숙주 세포의 게놈내로 복제하고 통합할 수 있는 RNA 바이러스이다. 상기 DNA 중간체 또는 프로바이러스는 숙주 세포 DNA내로 안정하게 통합할 수 있다. 본 발명의 특정한 양태에 따라, 백신은 외래 단백질을 암호화하는 외래 유전자가 정상 레트로바이러스 RNA 대신에 혼입되어 있는 레트로바이러스를 포함할 수 있다. 레트로바이러스 RNA를 감염과 부합된 숙주 세포에 유입하는 경우에, 외래 유전자를 또한 세포에 도입한 다음, 레트로바이러스 게놈의 일부인 경우에 숙주 세포 DNA내에 통합할 수 있다. 숙주내에서의 상기한 외래 유전자의 발현은 외래 단백질의 발현을 유발한다.

<136> 유전자 요법에 대해 개발된 대부분의 레트로바이러스 벡터계는 마우스 레트로바이러스를 기본으로 한다. 상기 레트로바이러스는 비리온으로 불리는 유리 바이러스 입자로서 또는 숙주 세포 DNA내에 통합된 프로바이러스로서 2가지 형태로 존재한다. 바이러스의 비리온 형태는 레트로바이러스의 구조성 및 효소 단백질(효소 역전사효소를 포함), 바이러스 게놈의 2개의 RNA 복사체, 및 바이러스 엔벨로프 지단백질을 함유하는 공급원 세포 원형질막의 일부를 함유한다. 레트로바이러스 게놈은 4개의 주요 영역으로 구성된다: 전사의 개시 및 종결에 필요한 시스-작용 성분을 함유하고 암호화 서열의 5' 및 3' 말단 둘 다에 위치하는 긴 말단 반복체(LTR), 및 3종의 암호화 유전자 gag, pol 및 env. 이들 3종 유전자 gag, pol 및 env는 각각 내부 바이러스 구조, 효소 단백질(예를 들어, 인테그라제), 및 바이러스의 감염성 및 숙주 범위의 특이성을 제공하는 엔벨로프 지단백질(gp70 및 p15e로 명명)뿐만 아니라 측정되지 않은 기능의 "R" 펩티드를 암호화한다.

<137> 별개의 패키징 세포주 및 벡터 생산 세포주가 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 백신에서의 이들의 사용을 포함한 레트로바이러스의 사용과 관련된 안전성 염려로 인해 개발되었다. 간략하게, 이러한 방법은 2종 성분, 레트로바이러스 벡터 및 패키징 세포주(PCL)의 사용을 이용한다. 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복체(LTR), 전달할 외래 DNA 및 패키징 서열(y)을 함유한다. 상기 레트로바이러스 벡터는 구조성 및 엔벨로프 단백질을 암호화하는 유전자가 벡터 게놈내에 포함되지 않기 때문에 단독으로 복제할 수 없다. PCL은 gag, pol 및 env 단백질을 암호화하는 유전자를 함유하지만, 패키징 시그널 "y"를 함유하지는 않는다. 따라서, PCL는 단지 단독으로 빈 비리온 입자를 형성할 수 있다. 이러한 일반적 방법에서는, 레트로바이러스 벡터를 PCL에 도입하고, 이에 의해 벡터-생산 세포주(VCL)를 생성시킨다. 이러한 VCL은 레트로바이러스 벡터(외래) 게놈만을 함유하는 비리온 입자를 제조하고, 따라서 이전에는 치료 용도에 안전한 레트로바이러스 벡터인 것으로 간주되었다.

<138> "레트로바이러스 벡터 작제물"은 본 발명의 바람직한 양태내에서 관심 서열(들) 또는 유전자(들), 예를 들어, 결합 도메인-면역글로불린 융합물 암호화 핵산 서열의 발현을 지시할 수 있는 조립체를 의미한다. 간략하게, 레트로바이러스 벡터 작제물은 5' LTR, tRNA 결합 부위, 패키징 시그널, 제2 쇄 DNA 합성 기원 및 3' LTR을 포함하여야 한다. 예를 들어, 단백질(예를 들어, 세포독성 단백질, 질환-관련 항원, 면역 보조 분자 또는 대체 유전자)을 암호화하거나 분자 자체로서(예를 들어, 리보자임 또는 안티센스 서열로서) 유용한 서열을 포함한 다양한 이종 서열은 벡터 작제물에 포함될 수 있다.

<139> 본 발명의 레트로바이러스 벡터 작제물은, 예를 들어, B, C 및 D 유형 레트로바이러스뿐만 아니라 스푸마바이러스 및 렌티바이러스를 포함한 다양한 레트로바이러스로부터 용이하게 작제할 수 있다[참조예: RNA Tumor Viruses, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985]. 상기 레트로바이러스는 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(American Type Culture Collection)("ATCC"; Rockville, Maryland)과 같은 기탁기관 또는 수집기관으로부터 용이하게 입수할 수 있거나, 통상적으로 이용가능한 기법을 이용하여 공지된 공급원으로부터 단리할 수 있다. 상기 레트로바이러스 중 어느 것 및 표준 재조합 기법[참조예: Sambrook et al, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Kunkle, PNAS 82: 488, 1985]을 레트로바이러스 벡터 작제물, 패키징 세포 또는 본원에 제공된 개시에 제공된 본 발명의 생산자 세포를 조립하거나 작제하기 위해 용이하게 이용할 수 있다.

<140> 바이러스 벡터에서 사용하기에 적합한 프로모터는 일반적으로 레트로바이러스 LTR; SV40 프로모터; 및 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터[Miller, et al., Biotechniques 7:980-990 (1989)], 또는 임의의 다른 프로모터(예를 들어, 히스톤, pol III 및 β-액틴 프로모터를 비제한적으로 포함하는 진핵생물 세포 프로모터와 같은 세포 프로모터)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 사용할 수 있는 다른 바이러스 프로모터는 아데노바이러스 프로모터, 티미딘 키나제(TK) 프로모터 및 B19 파르보바이러스 프로모터를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 적합한 프로모터의 선택은 본원에 포함된 교시로부터 당업자에게 자명할 것이고, 조절된 프로모터 또는 상기한 바와 같은 프로모터 중 하나일 수 있다.

<141> 상기한 바와 같이, 레트로바이러스 플라스미드 벡터를 사용하여, 패키징 세포주를 형질도입함으로써 생산자 세포주를 형성할 수 있다. 형질감염시킬 수 있는 패키징 세포의 예는 PE501, PA317, ψ-2, ψ-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψCRE, ψCRIP, GP+E-86, GP+envAm12, 및 문헌[Miller, Human Gene Therapy, 1:5-14 (1990)]에 기술된 바와 같은 DAN 세포주를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 벡터는 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 통해 패키징 세포를 형질도입할 수 있다. 이러한 방법은 전기천공, 리포좀의 사용 및 $CaPO_4$ 침전법을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 한 별법에 있어서, 레트로바이러스 플라스미드 벡터는 리포좀에 캡슐화시키거나, 지질에 결합시켜 숙주에 투여할 수 있다.

<142> 생산자 세포주는 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열(들)을 포함하는 감염성 레트로바이러스 벡터 입자를 생성시킨다. 다음, 상기 레트로바이러스 벡터 입자를 사용하여, 시험관내 또는 생체내에서 진핵생물 세포를 형질도입할 수 있다. 형질도입된 진핵생물 세포는 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 암호화하는 핵산 서열(들)을 발현시킬 것이다. 형질도입할 수 있는 진핵생물 세포는 배아 간세포뿐만 아니라 조혈 간세포, 간 세포, 섬유아세포, 골수단구 세포를 포함한 순환 말초혈 단핵 및 다형핵 세포, 림프구, 근모세포, 조직 대식세포, 수지상 세포, 쿠퍼 세포, 림프절 및 비장의 림프구양 및 망상내피 세포, 각질세포, 내피 세포 및 기관지 상피 세포를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

<143> 바이러스 벡터가 재조합 결합 도메인-면역글로불린 융합물 발현 작제물을 제조하는데 사용되는 본 발명의 양태의 또 다른 예로서, 바람직한 양태에 있어서, 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 발현을 지시하는 재조합 바이러스 작제물에 의해 형질도입된 숙주 세포는 바이러스 분아 동안 바이러스 입자에 의해 혼입된 숙주 세포 막의 일부로부터 유래된 발현된 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 함유하는 바이러스 입자를 생산할 수 있다.

<144> 또 다른 국면에 있어서, 본 발명은 상기한 재조합 결합 도메인-면역글로불린 융합물 발현 작제물을 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다. 당해 숙주 세포는, 예를 들어, 클로닝 벡터, 셔틀 벡터 또는 발현 작제물일 수 있는 본 발명의 벡터 및/또는 발현 작제물을 사용하여 유전자 조작(형질도입, 형질전환 또는 형질감염)할 수 있다. 당해 벡터 또는 작제물은, 예를 들어, 플라스미드, 바이러스 입자, 파아지 등의 형태일 수 있다. 조작된 숙주 세포는 프로모터를 활성화시키거나, 형질전환체를 선택하거나 특정한 유전자, 예를 들어, 결합 도메인-면역글로불린 융합 폴리펩티드 또는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 유전자를 증폭시키기 위해 필요한 경우에 변형된 통상의 영양 배지에서 배양할 수 있다. 발현을 위해 선택된 특정한 숙주 세포에 대한 배양 조건, 예를 들어, 온도, pH 등은 당업자에게 용이하게 식별가능할 것이다.

<145> 숙주 세포는 보다 고등의 진핵생물 세포, 예를 들어, 포유동물 세포, 또는 보다 저등의 진핵생물 세포, 예를 들어, 효모 세포일 수 있거나, 숙주 세포는 원핵생물 세포, 예를 들어, 세균 세포일 수 있다. 본 발명에 따르는 적합한 숙주 세포의 대표적인 예는 세균 세포, 예를 들어, 이. 콜라이, 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium); 진균 세포, 예를 들어, 효모; 곤충 세포, 예를 들어, 드로소필라(Drosophila) S2 및 스포도프테라(Spodoptera) Sf9; 동물 세포, 예를 들어, CHO, COS 또는 293 세포; 아데노바이러스; 식물 세포, 또는 시험관내 증식에 미리 적합화되거나 새로이 확립된 임의의 적합한 세포를 포함하나, 이에 한정할 필요는 없다. 적합한 숙주의 선택은 본원의 교시로부터 당업자의 범주내인 것으로 간주된다.

<146> 다양한 포유동물 세포 배양계를 또한 사용하여, 재조합 단백질을 발현시킬 수 있다. 포유동물 발현계의 예는 원숭이 신장 섬유아세포의 COS-7 세포주[Gluzman, Cell 23:175 (1981)] 및 양립성 벡터를 발현시킬 수 있는 다른 세포주, 예를 들어, C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주를 포함한다. 포유동물 발현 벡터는, 예를 들어, 결합 도메인-면역글로불린 융합 발현 작제물의 제조와 관련하여 본원에 기술된 바와 같은 복제 기원, 적합한 프로모터 및 인핸서, 및 또한 임의의 필수적인 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여체 및 수용체 부위, 전사 종결 서열 및 5' 플랭킹 비전사된 서열을 포함할 것이다. SV40 스플라이스 유래의 DNA 서열, 및 폴리아데닐화 부위를 사용하여, 필요한 비전사 유전자 성분을 제공할 수 있다. 작제물의 숙주 세포로의 도입은, 예를 들어, 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염 또는 전기천공을 비제한적으로 포함한, 당업자가 정통할 수 있는 다양한 방법에 의해 수행할 수 있다[Davis et al., 1986 Basic Methods in Molecular Biology].

<147> 본 발명의 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질은 익히 공지된 방법에 따라 투여하기 위한 제약 조성물로 제형화시킬 수 있다. 제약 조성물은 일반적으로 하나 이상의 재조합 발현 작제물 및/또는 상기 작제물의 발현 산물을 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제와 함께 포함한다. 상기 담체는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 무독성일 것이다. 핵산 기제 제형의 경우 또는 본 발명의 발현 산물을 포함하는 제형의 경우에, 약

0.01㎍/kg 내지 약 100mg/kg 체중을 피내, 피하, 근육내 또는 정맥내 경로에 의해 또는 다른 경로에 의해 투여할 수 있다. 바람직한 투여량은 약 1㎍/kg 내지 약 1mg/kg이고, 약 5㎍/kg 내지 약 200㎍/kg이 특히 바람직하다. 투여 회수 및 빈도가 숙주의 반응에 의존성일 수 있는 것은 당업자에게 자명할 것이다. 치료 용도를 위한 "제약상 허용되는 담체"는 제약 분야에서 익히 공지되어 있고, 문헌[참조예: Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985)]에 기술되어 있다. 예를 들어, 멸균 식염수 및 인산염-완충 식염수를 생리적 pH에서 사용할 수 있다. 보존제, 안정화제, 염료 및 또한 향미제를 제약 조성물에 제공할 수 있다. 예를 들어, 벤조산, 소르브산 및 p-히드록시벤조산의 에스테르를 보존제로서 첨가할 수 있다[상기 문헌 1449 참조]. 또한, 항산화제 및 현탁화제를 사용할 수 있다[상기 문헌 참조].

<148> "제약상 허용되는 염"은 본 발명의 화합물 및 유기 산 또는 무기 산과의 배합물(산 부가염) 또는 유기 염기 또는 무기 염기와의 배합물(염기 부가염)로부터 유래된 본 발명의 화합물의 염을 의미한다. 본 발명의 화합물은 유리 염기 또는 염 형태로 사용할 수 있으며, 이들 형태는 본 발명의 범주내에 있는 것으로 간주된다.

<149> 하나 이상의 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 암호화 작제물(또는 이들의 발현된 산물)을 함유하는 제약 조성물은 당해 조성물을 환자에게 투여하기에 가능한 임의의 형태일 수 있다. 예를 들어, 당해 조성물은 고체, 액체 또는 기체(에어로졸) 형태일 수 있다. 전형적인 투여 경로는 비제한적으로 경구, 국소, 비경구(예를 들어, 설하 또는 협측), 설하, 직장내, 질내 및 비내를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 비경구는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 흉골내, 해면체내, 경막내, 외이도내, 요도내 주사 또는 주입 기법을 포함한다. 제약 조성물은 이에 함유된 활성 성분이 환자에게 조성물의 투여시 생체이용가능하도록 제형화시킨다. 환자에게 투여할 조성물은 하나 이상의 투여 단위 형태를 취할 수 있으며, 여기서, 예를 들어, 정제는 단일 투여 단위일 수 있고, 에어로졸 형태의 본 발명의 하나 이상의 화합물의 용기는 다수의 투여 단위를 보유할 수 있다.

<150> 경구 투여의 경우에, 부형제 및/또는 결합제가 존재할 수 있다. 예로는 수크로스, 카올린, 글리세린, 전분 덱스트린, 알긴산나트륨, 카복시메틸셀룰로스 및 에틸 셀룰로스가 있다. 착색제 및/또는 향미제가 존재할 수 있다. 코팅 쉘을 사용할 수 있다.

<151> 당해 조성물은 액체, 예를 들어, 엘릭시르, 시럽, 액제, 유제 또는 현탁제 형태일 수 있다. 액체는 2가지 예로서 경구 투여용 또는 주사에 의한 전달용일 수 있다. 경구 투여용일 경우, 바람직한 조성물은 하나 이상의 결합 도메인-면역글로불린 융합 작제물 또는 발현된 산물 이외에 하나 이상의 감미제, 보존제, 염료/착색제 및 향미 증진제를 함유한다. 주사에 의해 투여하고자 하는 조성물에 1종 이상의 계면활성제, 보존제, 습윤화제, 분산화제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 및 등장화제를 포함시킬 수 있다.

<152> 액제, 현탁제 또는 다른 기타 형태인 액체 제약 조성물은 1종 이상의 다음 보조제를 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예를 들어, 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리 식염수, 링거액, 등장성 염화나트륨, 경화유, 예를 들어, 용매 또는 현탁화 매질로서 작용할 수 있는 합성 모노 또는 디글리세리드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 용매; 항균제, 예를 들어, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예를 들어, 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이트화제, 예를 들어, 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예를 들어, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 등장성 조절제, 예를 들어, 염화나트륨 또는 덱스트로스. 비경구용 제제는 앰풀, 1회용 주사기 또는 다수 투여용 유리제 또는 플라스틱제 바이알에 봉입할 수 있다. 생리 식염수가 바람직한 보조제이다. 주사용 제약 조성물은 바람직하게는 무균이다.

<153> 또한, 제제 중에 기타 성분, 예를 들어, 알루미늄 염, 유중수 유화제, 생분해가능한 유성 비히클, 수중유 유화제, 생분해가능한 마이크로캡슐 및 리포좀을 비제한적으로 포함하는 전달 비히클을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 비히클에서 사용하기 위한 면역자극 물질(애쥬번트)의 예는 N-아세틸무라밀-L-알라닌-D-이소글루타민(MDP), 지다당류(LPS), 글루칸, IL-12, GM-CSF, 감마 인터페론 및 IL-15를 포함한다.

<154> 당업자에게 공지된 임의의 적합한 담체를 본 발명의 제약 조성물에서 사용할 수 있고, 담체의 종류는 투여 방식 및 서방성을 목적하는지의 여부에 따라 달라질 것이다. 비경구 투여, 예를 들어, 피하 주사의 경우에, 담체는 바람직하게는 물, 식염수, 알콜, 지방, 밀납 또는 완충액을 포함한다. 경구 투여의 경우에, 임의의 상기한 담체 또는 고체 담체, 예를 들어, 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 사카린나트륨, 활석, 셀룰로스, 글루코스, 수크로스 및 탄산마그네슘을 사용할 수 있다. 생분해가능한 마이크로스피어(예를 들어, 폴라락트산 갈락티드)를 또한 본 발명의 제약 조성물용 담체로서 사용할 수 있다. 적합한 생분해가능한 마이크로스피어가 문헌[참조예: 미국 특허 제4,897,268호 및 제5,075,109호]에 개시되어 있다. 이와 관련하여, 마이크로스피어가 약 25마이크론보다 대형인 것이 바람직하다.

<155> 제약 조성물은 또한 희석제, 예를 들어, 완충제, 항산화제, 예를 들어, 아스크로브산, 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드, 단백질, 아미노산, 글루코스, 수크로스 또는 덱스트린을 포함한 탄수화물, 킬레이트화제, 예를 들어, EDTA, 글루타치온 및 기타 안정화제 및 부형제를 함유할 수 있다. 중성 완충 식염수 또는 비특이적 혈청 알부민과 혼합된 식염수가 예시적인 적합한 희석제이다. 바람직하게는, 생성물을 희석제로서 적합한 부형제 용액(예를 들어, 수크로스)을 사용하여 동결건조물로서 제형화시킨다.

<156> 상기한 바와 같이, 본 발명은 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 전달할 수 있는 조성물을 포함한다. 상기 조성물은 재조합 바이러스 벡터{예를 들어, 레트로바이러스[참조: WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 및 WO 94/03622], 아데노바이러스[참조: Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988; Li et al., Hum. Gene Ther. 4:403-409, 1993; Vincent et al., Nat. Genet. 5:130-134, 1993; 및 Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219, 1994], 두창 바이러스[참조: 미국 특허 제4,769,330호; 미국 특허 제5,017,487호; 및 WO 89/01973]}, 다가 양이온 분자에 착체화되어 있는 재조합 발현 작제물 핵산 분자[참조: WO 93/03709] 및 리포좀에 결합되어 있는 핵산[참조: Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851, 1987]을 포함한다. 특정한 양태에 있어서, DNA를 사멸되거나 불활성화된 아데노바이러스에 연결시킬 수 있다[참조: Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992; Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6094, 1992]. 다른 적합한 조성물은 DNA-리간드[참조: Wu et al., J. Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989] 및 지질-DNA 배합물[참조; Felgner et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 84:7413-7417, 1989]를 포함한다.

<157> 직접적인 생체내 방법 이외에, 세포를 숙주로부터 제거하여, 변이시키고, 동일하거나 다른 숙주 동물에 도입하는 생체외 방법을 사용할 수 있다. 생체외 상황에서 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 또는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 암호화 핵산 분자의 조직 세포로의 도입을 위해 상기한 임의의 조성물을 사용할 수 있음은 명백할 것이다. 취입의 바이러스적, 물리적 및 화학적 방법에 대한 프로토콜이 당해 분야에 익히 공지되어 있다.

<158> 따라서, 본 발명은 B-세포 장애에 걸리거나 악성 상태를 갖는 환자를 치료하거나 상기한 환자 유래의 세포 배양물을 치료하는데 유용하다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "환자"는 임의의 온혈 동물, 바람직하게는 인간을 의미한다. 환자는 암, 예를 들어, B-세포 림프종으로 고통받을 수 있거나, 정상(즉, 검출가능한 질환 및 감염 부재)일 수 있다. "세포 배양물"은 생체외 치료에 적합한 임의의 제제제, 예를 들어, 면역계의 면역적격 세포 또는 단리된 세포(T 세포, 대식세포, 단구세포, B 세포 및 수지상 세포를 비제한적으로 포함)를 함유하는 제제이다. 상기 세포는 당업자에게 익히 공지된 임의의 다양한 기법(예를 들어, 피콜-하이파크 밀도 원심분리)에 의해 단리할 수 있다. 세포를 B-세포 또는 악성 종양으로 고통받는 환자로부터 단리할 수 있고(그러나, 반드시 그럴 필요는 없고), 치료 후에 환자에 재도입할 수 있다.

<159> 비경구 또는 경구 투여용 액체 조성물은 적합한 투여량을 수득할 수 있도록 하는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질 암호화 작제물 또는 발현된 산물의 양을 함유하여야 한다. 전형적으로, 이들 양은 조성물 중의 결합 도메인-면역글로불린 융합 작제물 또는 발현된 산물 0.01중량%이다. 경구 투여용인 경우에, 이들 양은 조성물의 0.1 및 약 70중량%이다. 바람직한 경구용 조성물은 결합 도메인-면역글로불린 융합 작제물 또는 발현된 산물(들)을 약 4 내지 약 50% 함유한다. 바람직한 조성물 및 제제는 활성 화합물을 0.01 내지 1중량% 함유한다.

<160> 제약 조성물은 국소 투여용일 수 있으며, 이러한 경우에 담체는 적합하게는 액제, 유제, 연고 또는 겔 기제를 포함할 수 있다. 기제는, 예를 들어, 다음 성분 중 1종 이상을 포함할 수 있다: 바셀린, 라놀린, 폴리에틸렌 글리콜, 밀납, 광유, 희석제, 예를 들어, 물 및 알콜, 및 유화제 및 안정화제. 증점제는 국소 투여용 제약 조성물 중에 존재할 수 있다. 경피 투여를 목적하는 경우에, 당해 조성물은 경피 패취 및 이온영동 장치를 포함할 수 있다. 국소용 제형은 약 0.1 내지 약 10%w/v(단위 체적당 중량)의 결합 도메인-면역글로불린 융합 작제물 또는 발현된 산물의 농도를 함유할 수 있다.

<161> 당해 조성물은, 예를 들어, 직장내에서 용융되어 약물을 방출할 수 있는 좌제 형태로서의 직장내 투여용일 수 있다. 직장내 투여용 조성물은 유성 기제를 비자극성 부형제로서 함유할 수 있다. 이러한 기제는 비제한적으로 라놀린, 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

<162> 본 발명의 방법에 있어서, 결합 도메인-면역글로불린 융합물 암호화 작제물 또는 발현된 산물(들)을 삽입체(들), 비드(들), 서방성 제형(들), 패취(들) 또는 속방성 제형(들)의 사용에 의해 투여할 수 있다.

<163> 하기 실시예는 예시로서 제공하는 것이지, 제한하고자 제공하는 것은 아니다.

실 시 예

<164> 실시예 1

<165> 2H7 가변 영역의 클로닝 및 2H7scFv-Ig의 작제 및 서열분석

<166> 본 실시예는 모노클로날 항체 2H7의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA 분자의 클로닝을 예시한다. 본 실시예는 또한 2H7 scFv-Ig의 작제, 서열분석 및 발현을 명시한다.

<167> CD20에 특이적으로 결합된 2H7 모노클로날 항체를 발현시키는 하이브리도마 세포를 출발 물질로서 사용하였다. 수거 전에, 하이브리도마 세포를 글루타민, 피루베이트, DMEM, 비필수 아미노산 및 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지(Life Technologies, Gaithersburg, MD)에서 수일 동안 대수기 성장으로 유지시켰다. 세포를 원심분리에 의해 배양 배지로부터 펠릿화시키고, 2 x 10^7개 세포를 사용하여, RNA를 제조하였다. RNA를 Pharmingen(San Diego, CA) 완전 RNA 단리 키트(카탈로그 제45520K호)를 이용하여 키트에 동봉된 제조업체의 지침사항에 따라 2H7-생산 하이브리도마 세포로부터 단리하였다. 완전 RNA 1마이크로그램(1㎍)을 주형으로서 사용하여, 역전사에 의해 cDNA를 제조하였다. RNA 및 300ng 랜덤 프라이머를 합하여, 72℃에서 10분 동안 변성시킨 다음, 효소를 첨가하였다. 슈퍼스크립트 II 역전사효소(Life Technologies)를 효소와 함께 제공된 5X 제2쇄 완충액 및 0.1M DTT의 존재하에 총 용적 25㎕로 RNA와 프라이머와의 혼합물에 첨가하였다. 역전사 반응을 42℃에서 1시간 동안 진행시켰다.

<168> 랜덤하게 프라이밍된 역전사효소 반응에서 생성된 2H7 cDNA 및 V 영역 특이적 프라이머를 사용하여, 2H7 항체의 경쇄 및 중쇄에 대한 가변 영역을 PCR에 의해 증폭시켰다. V 영역 특이적 프라이머는 가이드로서 공개된 서열(V_L에 대해 Genbank 기탁 번호 M17954 및 V_H에 대해 M17953)을 사용하여 디자인하였다. 2개의 가변 쇄를 적합한 말단 서열로 디자인하여, scFv를 증폭 및 제한 효소 분해 후 2개의 V 영역의 연결에 의해 조립할 수 있다.

<169> 2개의 V 영역 사이에 삽입할 $(gly_4ser)_3$ 영역을 여분의 뉴클레오티드의 2H7의 V_L에 대한 안티센스 프라이머에의 첨가에 의해 혼입하였다. Sac I 제한 부위를 또한 2개의 V 영역 사이의 연결부에서 도입하였다. HindIII 제한 부위 및 경쇄 리더 펩티드를 포함한 2H7 V_L를 증폭시키는데 사용되는 센스 프라이머는 5'-gtc *aag ctt* gcc gcc **atg** gat ttt caa gtg cag att ttt cag c-3'(서열 _)이었다. 안티센스 프라이머는 5'-gtc gtc *gag ctc* cca cct cct cca gat cca cca ccg ccc gag cca ccg cca cct ttc agc tcc agc ttg gt**ccc**-3'(서열 _)이었다. V 영역의 리딩 프레임은 굵은 밑줄친 코돈으로서 나타내었다. Hind III 및 SacI 부위는 밑줄친 이탤릭체 서열로 나타내었다.

<170> V_H 도메인은 리더 펩티드의 부재하에 증폭되었지만, V_L에의 융합물에 대한 5' SacI 제한 부위 및 다양한 말단부에 대한 융합물에 대한 3' 말단에서의 BclI 제한 부위를 포함하고, 이는 인간 IgG1 Fc 도메인 및 CD40 리간드, 즉 CD154의 절단형을 포함하였다. 센스 프라이머는 5'-gct gct *gag ctc* t**cag**gc tta tct aca gca agt ctg g-3'(서열 _)이었다. SacI 부위는 이탤릭체의 밑줄친 폰트로 나타내었고, V_H 도메인의 제1 아미노산에 대한 코돈의 리딩 프레임은 굵은 밑줄친 활자체로 나타내었다. 안티센스 프라이머는 5'-gtt gtc *tga tca***gag** acg gtg acc gtg gtc cc-3'(서열 _)이었다. BclI 부위는 이탤릭체의 밑줄친 활자체로 나타내었고, V_H 도메인 서열의 마지막 세린은 굵은 밑줄친 활자체로 나타내었다.

<171> 2H7 scFv HindIII-BclI 단편을 인간 IgG1 힌지, CH2 및 CH3 영역을 함유하는 pUC19에 삽입함으로써 scFv-Ig를 조립하고, 이를 제한 효소 HindIII 및 BclI로 분해하였다. 연결 후에, 연결 산물을 DH5α세균내로 형질전환시켰다. 양성 클론을 진단 부위로서의 2H7의 V_L-V_H 연결부에서의 SacI를 사용하여 적합하게 삽입된 단편에 대해 스크리닝하였다. 2H7 scFv-Ig cDNA를 96℃에서 10초 동안 변성시키고, 50℃에서 30초 동안 어닐링시키고, 72℃에서 4분 동안 증폭시킴으로써 25주기 프로그램을 이용하는 PE 9700 써모사이클러 상에서 사이클 서열분석에 적용시켰다. 서열분석용 프라이머는 pUC 정방향 및 역방향 프라이머 및 인간 IgG 불변 영역 부분에서 CH2 도메인에 어닐링되는 내부 프라이머였다. 서열분석 반응은 즉석 서열분석 믹스(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 제조업체의 지침사항에 따라 수행하였다. 후속적으로, 샘플을 Centrisep 칼럼(카탈로그 제CS-901호, Princeton Separations, Adelphia, N.J.)을 이용하여 정제하고, 용출물을 Savant 진공 건조기를

이용하여 건조시키고, 주형 억제 시약(PE-ABI)으로 변성시키고, ABI 310 유전자 분석기(PE-Applied Biosystems) 상에서 분석하였다. 벡터 Nti 버젼 6.0(Inforax, North Bethesda, MD)을 이용하여, 서열을 편집하고, 해독하고, 분석하였다. 도 1은 2H7scFv-Ig 작제물의 cDNA 및 추정 아미노산 서열을 도시한다.

<172> 실시예 2

<173> 안정한 CHO 세포주내에서의 2H7scFv-Ig의 발현

<174> 본 실시예는 진핵생물 세포주내에서의 2H7 scFv-Ig의 발현 및 SDS-PAGE 및 기능 검정법에 의한 ADCC 및 보체 고정을 포함한 발현된 2H7 scFv-Ig의 특성을 예시한다.

<175> 정확한 서열을 갖는 2H7scFv-Ig HindIII-XbaI(~1.6kb) 단편을 포유동물 발현 벡터 pD18에 삽입하고, 양성 클론으로부터의 DNA를 QIAGEN 플라스미드 제조 키트(QIAGEN, Valencia, CA)를 이용하여 증폭시켰다. 다음, 재조합 플라스미드 DNA(100㎍)를, AscI로의 분해에 의해 비필수 영역내에 선형화시키고, 페놀 추출에 의해 정제하고, 조직 배양 배지, Excell 302(카탈로그 제14312-79P호, JRH Biosciences, Lenexa, KS)에 재현탁시켰다. 형질감염용 세포인 CHO DG44 세포를 대수 성장으로 유지시키고, 10^7개 세포를 각각의 형질감염 반응용으로 수거하였다. 선형화 DNA를 전기천공용으로 총 용적 0.8ml로 CHO 세포에 첨가하였다.

<176> 2H7 scFv-Ig 융합 단백질(서열 10)의 안정한 제조는 CMV 프로모터의 제어하에서 2H7 scFv-Ig cDNA를 함유하는 선택가능하고, 증폭가능한 플라스미드 pD18를 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포내로 전기천공시킴으로써 달성하였다. 2H7 발현 카셋트를 ~1.6kb HindIII-XbaI 단편으로서 벡터 다중 클로닝 부위에 CMV 프로모터의 하류에 서브클로닝시켰다. pD18 벡터는 플라스미드에 대한 선택 압력을 증가시키기 위한 약화된 프로모터를 갖는 DHFR 선택성 마커를 암호화하는 pcDNA3의 변형이다. 플라스미드 DNA는 Qiagen 맥시프렙 키트를 이용하여 제조하고, 정제된 플라스미드를 페놀 추출 및 에탄올 침전 전에 특유한 AscI 부위에서 선형화시켰다. 연어 정자 DNA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 캐리어 DNA로서 첨가하고, 플라스미드 및 캐리어 DNA를 각각 100㎍ 사용하여, 10^7개 CHO DG44 세포를 전기천공에 의해 형질감염시켰다. 세포를 글루타민(4mM), 피루베이트, 재조합 인슐린, 페니실린-스트렙토마이신 및 2X DMEM 비필수 아미노산(모두의 공급원: Life Technologies, Gaithersburg, Maryland)을 함유하는 Excell 302 배지(JRH Biosciences; 이하 "Excell 302 완전" 배지로 칭함) 중에서 대수기로 성장시켰다. 비형질감염된 세포용 배지는 또한 HT(히포크산틴 및 티미딘의 100X 용액으로부터 희석)(Life Technologies)를 함유하였다. 선택하에서의 형질감염용 배지는 50nM 내지 5μM 범위내에서 선택 제제로서 다양한 수준의 메토트렉세이트(Sigma-Aldrich)를 함유하였다. 전기천공을 275볼트, 950°F에서 수행하였다. 125개 세포/웰 내지 2000개 세포/웰 범위의 다양한 계열 희석율로 96웰 평저 플레이트(Costar)에 선택적 플레이팅시키기 전에 비선택 배지에서 감염된 세포를 회수하였다. 세포 클로닝용 배양 배지는 100nM 메토트렉세이트를 함유하는 Excell 302 완전이었다. 클론의 과성장이 충분하면, 마스터 웰로부터의 배양 상청액의 계열 희석액을 CD20-CHO 형질감염된 세포에의 결합에 대해 스크리닝하였다. 융합 단백질의 가장 높은 생산율을 갖는 클론을 T25내에서, 이어서 T75 플라스크내에서 증식시켜, 2H7 scFv-Ig의 생산을 동결하고 증가시키기 위한 적합한 수의 세포를 제공하였다. 생산 수준을 메토트렉세이트 함유 배양 배지에서의 누진적 증폭에 의해 3개의 클론으로 배양물에서 추가로 증가시켰다. 세포의 각각의 계대 배양에서, Excell 302 완전 배지는 증가된 농도의 메토트렉세이트를 함유하므로, DHFR 플라스미드를 증폭시킨 세포만이 생존할 수 있었다.

<177> 상청액을 2H7scFv-Ig 발현 CHO 세포로부터 수집하고, 0.2㎛ PES 익스프레스 필터(Nalgene, Rochester, NY)를 통해 여과하고, 단백질 A-아가로스(IPA 300 가교결합된 아가로스) 칼럼(Repligen, Needham, MA)을 통해 통과시켰다. 칼럼을 PBS로 세척한 다음, 결합된 단백질을 0.1M 시트르산염 완충액, pH 3.0으로 용출시켰다. 분획을 수집하고, 용출된 단백질을 1M Tris, H 8.0로 중화시킨 다음, PBS 중에서 밤새 투석하였다. 정제된 2H7scFv-Ig(서열 _)의 농도를 280nm에서의 흡광도에 의해 측정하였다. 1.77의 흡광 계수를 벡터 Nti 버젼 6.0 소프트웨어 패키지(Informax, North Bethesda, MD) 중의 단백질 분석 도구를 이용하여 측정하였다. 이러한 프로그램은 흡광 계수를 계산하기 위한 아미노산 조성 데이터를 이용한다.

<178> 형질감염된 안정한 CHO 세포에 의한 2H7 scFv-Ig 생산 수준을 유세포 분석법에 의해 분석하였다. CHO에 대해 정제된 2H7scFv-Ig를 CHO 세포에의 발현된 CD20에의 결합(CD20 CHO)을 가능하게 하고, 플루오레세인-접합된 항-인간 IgG 제2 단계 시약(카탈로그 제H10101호 및 제H10501호, CalTag, Burlingame, CA)을 사용하여 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 도 2(상단)는 CD20 CHO에의 2H7scFv-Ig 결합의 적정에 의해 생성된 표준 곡선을 도시한다. 2H7scFv-Ig의 각각의 농도에서, 선형 단위로 플루오레세인 시그널의 평균 광도가 도시되어 있다.

2H7scFv-Ig를 발현시키는 CHO 세포 클론을 함유하는 T 플라스크로부터의 상청액을 CD20 CHO에 결합시킨 다음, 결합을 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 상청액 중에 함유된 2H7scFv-Ig에 의해 생성된 플루오레세인 시그널을 측정하고, 상청액 중의 2H7scFv-Ig 농도를 표준 곡선(도 2, 하단)으로부터 계산하였다.

<179> 정제된 2H7scFv-Ig(서열 _)를 SDS-폴리아크릴아미드 상에서의 전기영동에 의해 분석하였다. 독립적 단백질 A 아가로스 칼럼 유출에 의해 정제된 2H7scFv-Ig의 샘플을 디술피드 결합의 환원 없이 SDS 샘플 완충액 중에서 비등시킨 다음, SDS 10% Tris-BIS 겔(카탈로그 제NP0301호, Novex, Carlsbad, CA)에 적용시켰다. 각각의 정제된 배취 20마이크로그램을 겔 상에 로딩시켰다. 쿠마시 블루 염색(피어스 겔 코드 블루 염색 시약(Pierce Gel Code Blue Stain Reagent, 카탈로그 제24590호, Pierce, Rockford, IL)에 의한 전기영동 및 증류수로의 탈염색 후에 단백질은 가시화되었다. 분자량 마커를 동일한 겔(칼라이도스코프 예비염색된 표준물(Kaleidoscope Prestained Standards), 카탈로그 제161-0324호, Bio-Rad, Hercules, CA) 상에 포함시켰다. 결과는 도 3에 제시한다. 레인 위의 숫자는 독립적 정제 배취를 명시한다. 크기 마커의 킬로달톤 단위의 분자량은 도면의 좌측에 표시되어 있다. 대체 샘플 제제 조건을 이용한 추가의 실험은 DTT 또는 2-머캅토에탄올을 함유하는 SDS 샘플 완충액의 비등에 의한 디술피드 결합의 환원은 2H7scFv-Ig가 응집되도록 한다는 것을 제시하였다.

<180> 다수의 다른 면역학적 파라미터는 당해 분야에 익히 공지된 통상의 검정법을 이용하여 모니터링할 수 있다. 이들은, 예를 들어, 항체 의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC) 검정법, 2차 시험관내 항체 반응, 충분히 확립된 마커 항원계를 이용하는 다양한 말초혈 또는 림프구양 단핵 세포 아군집의 유동 면역세포 형광분석, 면역조직화학 또는 다른 관련된 검정법을 포함할 수 있다. 이들 및 기타 검정법은 문헌[참조예: Rose et al. (Eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th Ed., 1997 American Society of Microbiology, Washington, DC]에서 찾아볼 수 있다.

<181> 보체의 존재하에서 CD20 양성 세포를 사멸시키는 2H7scFv-Ig의 능력은 B 세포주 Ramos 및 Bjab를 이용하여 시험하였다. 래빗 보체(Pel-Freez, Rogers, AK)를 1/10의 최종 희석율로 검정법에서 사용하였다. 정제된 2H7scFv-Ig를 37℃에서 45분 동안 B 세포 및 보체와 함께 인큐베이션한 다음, 트립판 블루 배제에 의해 생존 및 사멸 세포를 카운팅하였다. 도 4A에서의 결과는 래빗 보체의 존재하에 2H7scFv-Ig가 CD20를 발현시키는 B 세포를 용해시키는 것으로 제시한다.

<182> 말초혈 단핵 세포의 존재하에 CD20 양성 세포를 사멸시키는 2H7scFv-Ig의 능력을 100:1 비율의 PBMC 대 Bjab 세포를 이용하여 4시간의 검정법으로 표지된 Bjab 세포로부터의 ^{51}Cr의 방출을 측정함으로써 시험하였다. 도 4B에 제시된 결과는 ^{51}Cr 방출율이 PBMC 또는 2H7scFv-Ig 단독의 존재하에서보다 PBMC와 2H7scFv-Ig 둘 다의 존재하에서 높기 때문에 2H7scFv-Ig가 항체 의존성 세포의 세포독성(ADCC)을 매개할 수 있는 것으로 제시하였다.

<183> 실시예 3

<184> 정상 B 세포의 성장, CD95 발현 및 아폽토시스의 유도에 대한 CD20 및 CD40의 동시 연결의 영향

<185> 본 실시예는 세포 증식에 대한 세포 표면에서 발현된 CD20 및 CD40의 가교결합의 영향을 예시한다.

<186> 조밀한 휴지기 B 세포를 퍼콜 단계 구배에 의해 인간 편도선으로부터 단리하고, T 세포를 E-로제팅에 의해 제거하였다. 휴지기의 조밀한 편도선 B 세포의 증식을 4일간 실험 중 마지막 12시간 동안 ^{3}[H]-티미딘 섭취율에 의해 측정하였다. 증식을 제시된 바와 같은 평균 및 표준 편자를 갖는 4중 배양물 중에서 측정하였다. 마우스 항-인간 CD20 mAb 1F5(항-CD20)를 단독으로 사용하거나, 항-마우스 κ mAb 187.1(항-CD20XL)과 가교결합시켰다. CD40 활성화를 마우스 CD8(CD154)와 융합된 가용성 인간 CD154를 사용하여 달성하였고[Hollenbaugh et al., EMBO J. 11:4212-21(1992)], CD40 가교결합을 항-마우스 CD8 mAb 53-6(CD154XL)을 사용하여 달성하였다. 당해 과정은 세포 표면 상에서의 CD20 및 CD40의 동시 가교결합을 가능하게 하였다. 결과는 도 5에 제시되어 있다.

<187> Ramos 세포, B 림프종 세포주에 대한 CD20 및 CD40 가교결합의 영향을 조사하였다. Ramos 세포를 CD20(1F5) 및 CD40(G28-5)에 특이적으로 결합하는 마우스 mAb를 사용한 처리(염소 항-마우스 IgG(GAM) 부재) 및/또는 가교결합(+GAM)한지 8시간 후에 CD95(Fas) 발현 및 아폽토시스 백분율에 대해 분석하였다. 대조 세포를 CD3에 특이적인 비-결합 아이소타입 대조군(64.1)으로 처리하였다.

<188> 처리된 Ramos 세포를 수거하여, FITC-항-CD95와 함께 인큐베이션하고, 유세포 분석법에 의해 분석하여, CD20 또

는 CD40 가교결합 후 세포 표면에서의 Fas의 상대적 발현 수준을 측정하였다. 데이터를 지시된 자극으로의 처리 후에 세포의 평균 형광도로서 플롯팅하였다(도 6A).

<189> 동일한 실험으로부터의 처리된 Ramos 세포를 수거하고, 아넥신 V의 결합을 측정하여, 처리된 배양물 중의 아폽토시스 백분율을 지시하였다. 1F5 및 G28-5를 사용한 CD20 및 CD40의 가교결합, 및 이어서 GAM과의 가교결합 18시간 후에 아넥신 V의 결합에 의해 아폽토시스를 측정하였다. 아넥신 V의 결합은 FITC-아넥신 V 키트(카탈로그 제PN-IM2376호, Immunotech, Marseille, France)를 사용하여 측정하였다. 아넥신 V 결합은 세포의 아폽토시스로의 진행에서의 초기 이벤트인 것으로 공지되어 있다. 아폽토시스 또는 프로그래밍된 세포 사멸은 자살에 의한 세포 사멸을 유도하는 이화작용 반응의 캐스케이드를 특징으로 하는 과정이다. 아폽토시스의 초기 단계에 있어서, 세포가 형태를 변화하고 DNA를 가수분해하기 전에, 세포 막의 완전성은 유지되지만, 세포는 이들의 막 인지질의 비대칭성을 소실하여, 세포 표면에서 포스파티딜세린과 같은 음으로 하전된 인지질을 노출시킨다. 아넥신 V, 칼슘 및 인지질 결합 단백질은 포스파티딜세린에 우선적으로 및 고친화성으로 결합한다. FAS 수용체(CD95)의 발현에 대한 CD20 및 CD40 둘 다의 가교결합의 영향을 명시하는 결과는 도 6B에 제시한다. 세포에의 아넥신 V 결합에 대한 CD20 및 CD40 둘 다의 영향은 도 6B에 제시한다.

<190> 실시예 4

<191> 2H7 scFv-CD154 융합 단백질의 작제 및 특성화

<192> CD20 및 CD40 둘 다에 결합할 수 있는 분자를 작제하기 위해, 2H7 scFv를 암호화하는 cDNA를 CD154, 즉 CD40 리간드를 암호화하는 cDNA와 융합시켰다. HindIII-BclI 단편 상에서 암호화된 2H7 scFv cDNA를 2H7 scFv-Ig 작제물로부터 제거하고, 인간 CD154의 세포외 도메인을 암호화하는 BamHI-XbaI cDNA 단편과 함께 pD18 벡터에 삽입하였다. 세포외 도메인은 다른 II형 막 단백질과 유사한, CD154의 카복시 말단에서 암호화된다.

<193> 인간 CD154의 세포외 도메인은 랜덤 프라이머 및 PHA(피토헤마글루티닌)으로 활성화된 인간 T 림프구로부터의 RNA를 사용하여 생성된 cDNA를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 프라이머 셋트는 CD154의 세포외 도메인내의 2가지 상이한 위치에서 융합물 연결부를 생성시키는 5' 또는 센스 프라이머를 함유하였다. CD154의 세포외 도메인의 아미노산 108(Glu)-261(Leu)+(Glu)를 포함한 단형 또는 절단형(형태 S4), 및 아미노산 48(Arg)-261(Leu)+(Glu)를 포함한 장형 또는 완전형(형태 L2)을 생성시키는 2가지 상이한 융합물 연결부를 디자인하였고, 상기 2가지 형태는 BamHI-XbaI 단편으로서 작제하였다. 2가지 상이한 절단형 세포외 도메인을 2H7scFv에 융합시키는 센스 프라이머는 클로닝을 위한 BamHI 부위를 포함한다. CD154 cDNA의 S4 형태에 대한 센스 프라이머는 서열 11 또는 CD154BAM108로서 지명되고, 다음 서열: 5'-gtt gtc gga tcc aga aaa cag ctt tga aat gca a-3'를 갖는 34량체를 암호화하는 한편, 안티센스 프라이머는 서열 12 또는 CD154XBA로 지명되고, 다음 서열: 5'-gtt gtt tct aga tta tca ctc gag ttt gag taa gcc aaa gga cg-3'를 갖는 44량체를 암호화한다.

<194> 아미노산 48(Arg)-261(Leu)+(Glu)를 암호화하는 CD154 세포외 도메인의 장형 (L2)을 증폭시키는데 사용되는 올리고뉴클레오티드 프라이머는 다음과 같다: CD154 BAM48(서열 13)로 명명된 안티센스 프라이머는 다음 서열: 5'-gtt gtc gga tcc aag aag gtt gga caa gat aga ag-3'를 갖는 35량체를 암호화하였다. CD154XBA(서열 _)로 명명된 안티센스 프라이머는 44량체: 5'-gtt gtt tct aga tta tca ctc gag ttt gag taa gcc aaa gga cg-3'를 암호화하였다. 기타 PCR 반응 조건은 2H7 scFv를 증폭시키는데 사용되는 것과 동일하였다(실시예 1 참조). PCR 단편을 PCR 신속 키트(QIAGEN, San Diego, CA)에 의해 정제하고, ddH_2O 30㎕로 용출시키고, 반응 용적 40㎕로 37℃에서 3시간 동안 BamHI 및 XbaI(Roche) 제한 엔도뉴클레아제로 분해하였다. 단편을 겔 정제하고, 제조업체(QIAGEN)의 지침사항에 따라 QIAEX 키트를 사용하여 정제하고, 2H7 HindIII-BclI 단편과 함께 HindIII+XbaI로 분해된 pD18 발현 벡터로 연결하였다. 연결 반응물을 DH5-알파 화학적 성분 세균내로 형질전환시키고, 100㎍/ml 암피실린을 함유하는 LB 배지 상에 플레이팅하였다. 형질전환체를 37℃에서 밤새 성장시키고, 사용된 콜로니를 단리하여, 3ml 액체 배양물을 100㎍/ml 암피실린을 함유하는 루리아 브로쓰(Luria Broth)에 접종하였다. 클론을 2H7 scFv 및 CD154 세포외 도메인 단편의 삽입을 위한 미니-플라스미드 제제(QIAGEN)에 대하여 스크리닝하였다.

<195> 2H7scFv-CD154 작제물 cDNA를 96℃에서 10초 동안 변성시키고, 50℃에서 5초 동안 어닐링시키고, 60℃에서 4분 동안 증폭시키는 것으로 포함하는 25주기 프로그램을 이용하는 PE 9700 써모사이클러 상에서 사이클 서열분석에 적용시켰다. 사용되는 서열분석용 프라이머는 pD18 정방향(서열 _: 5'-gtctatataagcagagctctggc-3') 및 pD18 역방향(서열 _: 5'-cgaggctgatcagcgagctctagca-3') 프라이머였다. 또한, 인간 CD 154 서열(서열 _: 5'-

ccgcaatttgaggattctgatcacc-3')에 대한 상동성을 갖는 내부 프라이머를 사용하였다. 서열분석 반응물은 3.2pmol의 프라이머, 약 200ng DNA 주형 및 8㎕ 서열분석 믹스를 함유하였다. 서열분석 반응은 제조업체의 지침사항에 따라 대형 염료 터미네이터 즉석 서열분석 믹스(Big Dye Terminator Ready Sequencing Mix: PE-Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 수행하였다. 샘플을 후속적으로 Centrisep 칼럼(Princeton Separations, Adelphia, NJ)을 이용하여 정제하였다. 용출물을 Savant 고속-진공 건조기로 건조시키고, 20㎕ 주형 억제 시약(ABI) 중에서 95℃에서 2분 동안 변성시키고, ABI 310 유전자 분석기(PE-Applied Biosystems) 상에서 분석하였다. 벡터 Nti 버젼 6.0(Inforax, North Bethesda, MD)을 이용하여, 서열을 편집하고, 해독하고, 분석하였다. 2H7scFv-CD154 L2 cDNA 서열 및 추정 아미노산 서열은 도 7A에 제시하고, 2H7 scFv-CD154 S4 cDNA 서열 및 추정 아미노산 서열은 도 7B에 제시한다.

<196> CD20 및 CD40에 동시에 결합하는 2H7 scFv-CD154 융합 단백질(서열 _ 및 _)의 활성을 유세포 분석법에 의해 측정하였다. 검정법은 CD20을 발현시키는 CHO 세포 표적물을 사용하였다. CD20 CHO 세포와 2H7 scFv-CD154 발현 플라스미드로 형질감염된 세포로부터의 상청액과의 45분간 인큐베이션 후에, CD20 CHO 세포를 2회 세척하고, 비오틴-접합된 CD40-Ig 융합 단백질을 PBS/2% FBS 중에서 인큐베이션하였다. 45분 후에, 세포를 2회 세척하고, 피코에리트린(PE)-표지된 스트렙타비딘과 함께 1:100으로 PBS/2% FBS(Molecular Probes, Eugene OR) 중에서 인큐베이션하였다. 추가의 30분간 인큐베이션 후에, 세포를 2회 세척하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다. 결과는 2H7 scFv-CD154 분자가 세포 표면 상에서 CD20에 결합하여, 용액으로부터 비오틴-접합된 CD40을 포획할 수 있는 것을 제시한다(도 8).

<197> B 림프종 및 림프아구양 세포주의 성장 및 생존율에 대한 2H7scFv-CD154의 영향을 측정하기 위해, 세포를 2H7scFv-CD154 L2(서열 _)와 함께 12시간 동안 인큐베이션한 다음, 아넥신 V의 결합에 대해 조사하였다. 아넥신 V의 결합을 FITC-아넥신 V 키트(Immunotech, Marseille, France, 카탈로그 제PN-IM2376호)를 이용하여 측정하였다. B 세포주를 2H7scFv-CD 154 융합 단백질의 분비된 형태를 발현시키는 세포로부터의 농축되고, 투석된 상청액의 희석액과 함께 1ml 배양물로 인큐베이션하였다. 결과는 도 9에 제시한다.

<198> 2H7scFv-CD154의 존재하에서의 Ramos B 림프종 세포주의 성장 속도는 24시간 배양 중 마지막 6시간 동안 ^{3}H-티미딘의 섭취율에 의해 조사하였다. 세포 증식에 대한 2H7scFv-CD154의 영향은 도 10에 제시되어 있다.

<199> 실시예 5

<200> CytoxB 항체 유도체의 작제 및 특성화

<201> CytoxB 항체를 2H7 scFv-IgG 폴리펩티드로부터 유도하였다. 2H7 scFv(실시예 1 참조)를 변형된 힌지 도메인을 통해 인간 IgG1 Fc 도메인에 연결시켰다(도 11 참조). 힌지 영역 중의 시스테인 잔기를 부위-지시된 돌연변이 유발 및 당해 분야에 공지된 다른 방법에 의해 세린 잔기로 치환시켰다. 변이체 힌지를 야생형 Fc 도메인에 융합시켜, CytoxB-MHWTG1C로 명명된 특정한 작제물을 생성시키거나, CH2 도메인내로 도입된 추가의 변이를 갖는 변이형 Fc 도메인(CytoxB-MHMG1C)에 융합시켰다. 이펙터 기능에 관련된 CH2내의 아미노산 잔기는 도 11에 도시되어 있다. 하나 이상의 상기 잔기의 변이는 FcR 결합 및 이펙터 기능의 매개인자를 감소시킬 수 있다. 본 실시예에서, Fc 수용체 결합에 중요한 것으로 당해 분야에 공지된 로이신 잔기 234는 2H7 scFv 융합 단백질, CytoxB-[MG1H/MG1C]에서 변이시켰다. 또 다른 작제물에 있어서, 인간 IgG1 힌지 영역을 야생형 인간 Fc 도메인에 융합되어 있는 인간 IgA 힌지 부분(CytoxB-IgAHWTHG1C)로 치환시켰다(도 11 참조). 이러한 변이형 힌지 영역은 인간 IgG1 CH2 및 CH3 도메인의 기능적 특성을 보유하는 인간 단량체성 및 이량체성 분자의 혼합물의 발현을 가능하게 한다. 이들 분자에 대한 합성 재조합 cDNA 발현 카셋트를 작제하고, 폴리펩티드를 실시예 2에 기술된 방법에 따라 CHODG44 세포내에서 발현시켰다.

<202> CytoxB-scFvIg 분자의 정제된 융합 단백질 유도체를 실시예 2에 기술된 방법에 따라 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 폴리아크릴아미드 겔을 비환원 및 환원 조건하에 유출시켰다. 2가지 상이한 분자량 마커 셋트, Biorad 예비염색된 마커(Biorad, Hercules, CA) 및 Novex Multimark 분자량 마커를 각각의 겔 상에 로딩시켰다. 상이한 작제물 및 Rituximab(등록상표)의 이동 패턴이 도 12에 제시되어 있다.

<203> 매개된 ADCC에 대한 CytoxB-scFvIg의 상이한 유도체의 능력은 표적물로서 Bjab B 림프종 세포를 사용하고 이펙터 세포로서 인간 PBMC를 사용하여 측정하였다(실시예 2 참조). 이펙터 대 표적물 비는 70:1, 35:1 및 18:1로 변화시키고, 웰당 Bjab 세포의 수는 일정하게 유지되나, PBMC의 수는 변화하였다. Bjab 세포를 ^{51}Cr로 2시간 동

안 표지시키고, 세포 밀도 5 x 10^4개 세포/웰로 평저 96웰 플레이트의 각각의 웰에 분액하였다. 정제된 융합 단백질 또는 Rituximab을 10mg/ml의 농도로 PBMC의 다양한 희석액에 첨가하였다. 자발성 방출을 PBMC 또는 융합 단백질의 첨가 없이 측정하였고, 최대 방출을 세제(1% NP-40)의 적합한 웰에의 첨가에 의해 측정하였다. 반응물을 4시간 동안 배양하고, 배양물 상청액 100ul를 루마플레이트(Lumaplate; Packard Instruments)에 수거하고, 밤새 건조시킨 다음, 방출된 cpm을 카운팅하였다. 결과는 도 13에 제시되어 있다.

<204> CytoxB 유도체의 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 또한 측정하였다. 반응을 실질적으로 실시예 2에 기술된 바와 같이 수행하였다. 결과는 융합 단백질의 각각의 농도에 대한 사멸된 세포 대 전체 세포의 백분율로서 도 14에 제시되어 있다.

<205> 실시예 6

<206> 마카크에서의 생체내 연구

<207> CytoxB 유도체를 사용한 초기 생체내 연구는 비인간 영장류에서 수행하였다. 도 15는 원숭이에서의 CytoxB의 혈청 반감기를 특성화하는 데이터를 제시한다. 측정은 6mg/kg의 투여량을 화살표에 의해 지시된 날에 각각의 원숭이에게 투여한 후에 2마리의 다른 마카크(J99231 및 K99334)로부터 획득된 혈청 샘플 상에서 수행하였다. 각각의 샘플에 대해, 존재하는 2H7scFvIg의 수준을 정제된 CytoxB-(MHWTG1C)-Ig 융합 단백질의 CD20 CHO 세포에의 결합에 의해 생성된 표준 곡선에 대한 비교에 의해 개산하였다(실시예 2 참조).

<208> 마카크에서의 순환 CD40+ 세포의 수준에 대한 CytoxB-(MHWTG1C)-Ig 융합 단백질의 영향을 조사하였다. 전혈 카운트를 도 16에 지시된 각각의 날에 수행하였다. 또한, FACS(형광 활성화 세포 분류기) 검정법을 CD40-특이적 플루오레세인 접합된 항체를 사용하여 말초혈 림프구 상에서 수행하여, 세포 군집 중에서 B 세포를 검출하였다. 다음, 양성 세포의 백분율을 사용하여, 원래 샘플 중의 B 세포의 수를 계산하였다. 데이터는 주사 후에 지시된 날에 측정된 혈액 마이크로리터당 수천개 B 세포로서 그래프로 도시되어 있다(도 16).

<209> 실시예 7

<210> 항-CD19 scFv-Ig 융합 단백질의 작제 및 발현

<211> 항-CD19 scFv-Ig 융합 단백질을 작제하고, 진핵생물 세포에 형질감염시키고, 실시예 1, 2 및 5에 제시된 방법 및 당해 분야의 표준법에 따라 발현시켰다. 가변 중쇄 영역 및 가변 경쇄 영역을 CD19에 특이적으로 결합하는 항체 HD37를 생산하는 하이브리도마 세포로부터 단리된 RNA로부터 클로닝시켰다. HD37scFv-IgAHWTG1C 및 HD37scFv-IgMHWTG1C의 발현 수준을 측정하고, 정제된 HD37 scFvIg를 사용하여 생성된 표준 곡선과 비교하였다. 결과는 도 17에 제시되어 있다.

<212> 실시예 8

<213> 항-L6 scFv-IG 융합 단백질의 작제 및 발현

<214> scFv-Ig 융합 단백질을 항-암종 mAb, L6으로부터 유래된 가변 영역을 사용하여 작제하였다. 융합 단백질을 진핵생물 세포에 형질감염시키고, 실시예 1, 2 및 5에 제시된 방법 및 당해 분야의 표준법에 따라 발현시켰다. L6scFv-IgAHWTG1C 및 L6scFv-IgMHWTG1C의 발현 수준을 측정하고, 정제된 HD37 scFvIg를 사용하여 생성된 표준 곡선과 비교하였다. 결과는 도 18에 제시되어 있다.

<215> 실시예 9

<216> 다양한 scFv-IG 융합 단백질의 특성화

<217> 상기한 scFv-Ig 융합 단백질 이외에, G28-1(항-CD37) scFv-Ig 융합 단백질을 실질적으로 실시예 1 및 5에 기술된 바와 같이 제조하였다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 당해 분야에 공지된 방법에 따라 클로닝시켰다. 2H7-MHWTG1C, 2H7-IgAHWTG1C, G28-1-MHWTG1C, G28-1 IgAHWTG1C, HD37-MHWTG1C 및 HD37-IgAHWTG1C의 ADCC 활성을 상기한 방법에 따라 측정하였다(실시예 2 참조). 결과는 도 19에 제시되어 있다. L6scFv-IgAHWTG1C 및

L6scFv-IgMHWTG1C의 ADCC 활성을 2981 인간 폐 암종 세포주를 사용하여 측정하였다. 결과는 도 20에 제시되어 있다. 마우스 L6 모노클로날 항체는 ADCC 활성을 나타내지 않는 것으로 공지되어 있다.

<218> 정제된 단백질을 환원 및 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 샘플을 제조하고, 겔을 실질적으로 실시예 2 및 5에 기술한 바와 같이 유출시켰다. L6 및 2H7 scFv-Ig 융합 단백질에 대한 결과는 도 21에 제시되어 있고, G28-1 및 HD37 scFv-Ig 융합 단백질에 대한 결과는 도 22에 제시되어 있다.

<219> 상기한 바로부터, 본 발명의 구체적 양태가 예시의 목적으로 본원에 기술되었더라도, 다양한 변형을 본 발명의 취지 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 수행할 수 있는 것을 충분히 인지할 수 있다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구의 범위에 의한 경우를 제외하고는 한정되지 않는다.

도면의 간단한 설명

<31> 도 1은 CD20에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질인 2H7Fv-Ig의 DNA 및 추정 아미노산 서열[서열 _]을 도시한다.

<32> 도 2는 형질감염된 안정한 CHO 세포주에 의한 2H7scFv-Ig의 생산 수준 및 2H7scFv-Ig의 CD20 발현 CHO 세포에의 결합에 의한 표준 곡선의 생성을 도시한다.

<33> 도 3은 다수의 단리된 2H7scFv-Ig 단백질 제제의 SDS-PAGE 분석을 도시한다.

<34> 도 4는 2H7scFv-Ig에 의한 보체 고정(도 4A) 및 항체-의존성 세포의 세포독성(ADCC, 도 4B)의 매개를 도시한다.

<35> 도 5는 정상 B 세포의 성장에 대한 CD20 및 CD40의 동시 연결의 영향을 도시한다.

<36> 도 6은 B 림프아구양 세포주내에서의 CD95 발현 및 아폽토시스의 유도에 대한 CD20 및 CD40의 영향을 도시한다.

<37> 도 7은 CD20 및 CD40에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질인 2H7scFv-CD154 L2(도 7A, 서열 _) 및 2H7scFv-CD154 S4(도 7B, 서열 _)의 DNA 및 추정 아미노산 서열[서열 _]을 도시한다.

<38> 도 8은 유동 면역세포 형광분석에 의한 2H7scFv-CD154 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 CD20+ CHO 세포에의 결합을 도시한다.

<39> 도 9는 2H7scFv-CD154 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 세포에의 결합 후의 아넥신 V의 B 세포주 Ramos, BJAB 및 T51에의 결합을 도시한다.

<40> 도 10은 2H7 scFv-CD154 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 결합 후의 B 세포주 T51의 증식에 대한 영향을 도시한다.

<41> 도 11은 CytoxB 또는 CytoxB 유도체: CytoxB-MHWTG1C(2H7 scFv, 변이형 힌지, 야생형 IgG1 Fc 도메인), CytoxB-MHMG1C(2H7 scFv, 변이형 힌지, 변이형 인간 IgG1 Fc 도메인) 및 CytoxB-IgAHWTHG1C(2H7 scFv, 인간 IgA-유래 힌지[서열 _], 야생형 인간 IgG1 Fc 도메인)으로 칭해지는 2H7 scFv-Ig 융합 단백질[서열 _]의 구조의 도식적 표시를 도시한다. 화살표는 FcR 결합 및 ADCC 활성(진한 화살표) 및 보체 고정(옅은 화살표)에 기여하는 것으로 간주되는 아미노산의 위치 번호를 나타낸다. 쇄간 디술피드 결합의 부재를 주목한다.

<42> 도 12는 단리된 CytoxB 및 2H7 scFv-CD154 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질의 SDS-PAGE 분석을 도시한다.

<43> 도 13은 CytoxB 유도체의 항체 의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC) 활성을 도시한다.

<44> 도 14는 CytoxB 유도체의 보체 의존성 세포독성(CDC)을 도시한다.

<45> 도 15는 마카크 혈액 샘플 중의 CytoxB-MHWTG1C의 혈청 반감기 측정치를 도시한다.

<46> 도 16은 마카크 혈액 샘플 중의 순환 CD40+ B 세포의 수준에 대한 CytoxB-MHWTG1C의 영향을 도시한다.

<47> 도 17은 형질감염된 포유동물 세포주에 의한 HD37(CD19-특이적) ScFv-Ig의 생산 수준 및 정제된 HD37 ScFv-Ig의 CD19 발현 세포에의 결합에 의한 표준 곡선의 생성을 도시한다.

<48> 도 18은 형질감염된 안정한 CHO 세포주에 의한 L6(암종 항원) ScFv-Ig의 생산 수준 및 정제된 L6 ScFv-Ig의 L6 항원 발현 세포에의 결합에 의한 표준 곡선의 생성을 도시한다.

<49> 도 19는 결합 도메인-면역글로불린 융합 단백질인 2H7 scFv-Ig, HD37 scFv-Ig 및 G28-1(CD37-특이적) scFv-Ig의 ADCC 활성을 도시한다.

<50> 도 20은 L6 ScFv-Ig 융합 단백질의 ADCC 활성을 도시한다.

<51> 도 21은 L6 ScFv-Ig 및 2H7 scFv-Ig 융합 단백질의 SDS-PAGE 분석을 도시한다.

<52> 도 22는 G28-1 ScFv-Ig 및 HD37 ScFv-Ig 융합 단백질의 SDS-PAGE 분석을 도시한다.

도면

도면1A

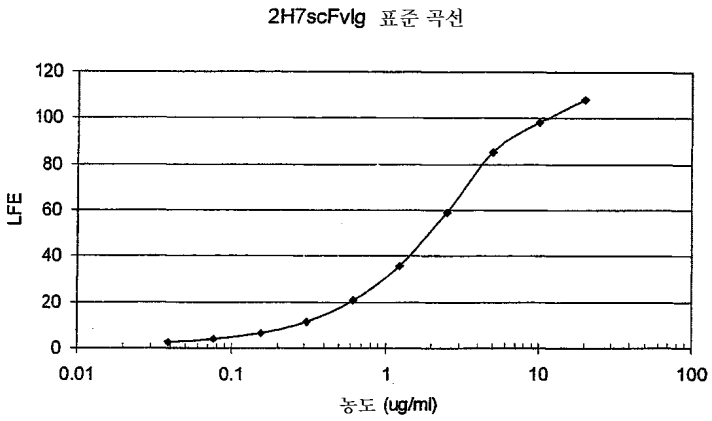
2H7scFv-Ig cDNA 및 추정 아미노산 서열 :

```
      HindIII      NcoI       2H7 VL 리더 펩티드 →
      ~~~~~~      ~~~~~~
                      M  D  F   Q  V  Q   I  F  S  F   L  L  I   S  A  S
  1   AAGCTTGCCG CC   ATGGATTT TCAAGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA

                          2H7 VL→
       V  I  I  A   R  G  Q   I  V  L   S  Q  S  P   A  I  L   S  A  S
 61   GTCATAATTG CCAGAGGACA AATTGTTCTC TCCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT

       P  G  E  K   V  T  M   T  C  R   A  S  S  S   V  S  Y   M  H  W
121   CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTTGCAGG GCCAGCTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

                      BamHI
                      ~~~~~~~
       Y  Q  Q  K   P  G  S   S  P  K   P  W  I  Y   A  P  S   N  L  A
181   TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCCAAA CCCTGGATTT ATGCCCCATC CAACCTGGCT

       S  G  V  P   A  R  F   S  G  S   G  S  G  T   S  Y  S   L  T  I
241   TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTTACTC TCTCACAATC

       S  R  V  E   A  E  D   A  A  T   Y  Y  C  Q   Q  W  S   F  N  P
301   AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAACCCA

                                                  (Gly4Ser)3 링커
       P  T  F  G   A  G  T   K  L  E   L  K  G  G   G  G  S   G  G  G
361   CCCACGTTCG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT

                                  2H7 VH →
       G  S  G  G   G  G  S   S  Q  A   Y  L  Q  Q   S  G  A   E  L  V
421   GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG

       R  P  G  A   S  V  K   M  S  C   K  A  S  G   Y  T  F   T  S  Y
481   AGGCCTGGGG CCTCAGTGAA GATGTCCTGC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC

       N  M  H  W   V  K  Q   T  P  R   Q  G  L  E   W  I  G   A  I  Y
541   AATATGCACT GGGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG AGCTATTTAT

       P  G  N  G   D  T  S   Y  N  Q   K  F  K  G   K  A  T   L  T  V
601   CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA

       D  K  S  S   S  T  A   Y  M  Q   L  S  S  L   T  S  E   D  S  A
661   GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGCG

       V  Y  F  C   A  R  V   V  Y  Y   S  N  S  Y   W  Y  F   D  V  W
721   GTCTATTTCT GTGCAAGAGT GGTGTACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG
```

도면1B

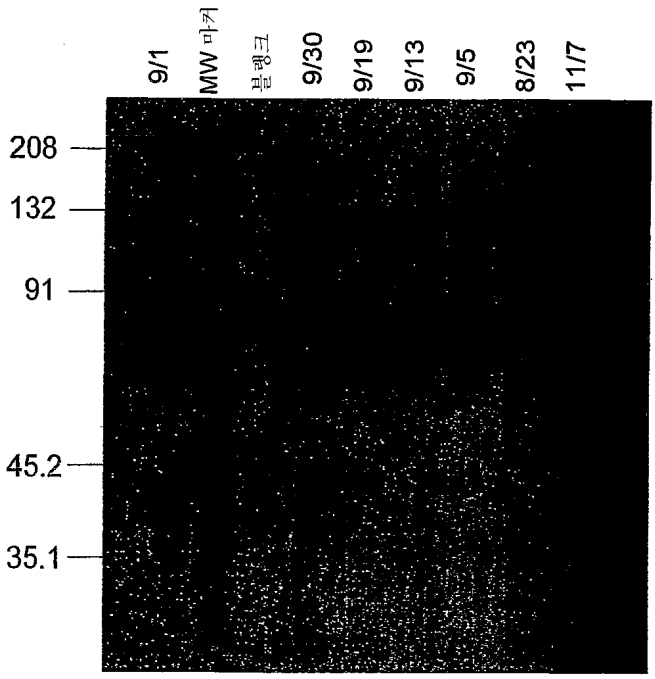
```
                                    BclI
                                   ~~~~~~~ 인간 IgG1 Fc도메인 →
      G  T  G  T   T  V  T   V  S  D   Q  E  P  K   S  C  D   K  T  H
 781  GGCACAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGAT CAGGAGCCCA AATCTTGTGA CAAAACTCAC

      T  C  P  P   C  P  A   P  E  L   L  G  G  P   S  V  F   L  F  P
 841  ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC

      P  K  P  K   D  T  L   M  I  S   R  T  P  E   V  T  C   V  V  V
 901  CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG

      D  V  S  H   E  D  P   E  V  K   F  N  W  Y   V  D  G   V  E  V
 961  GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG

      H  N  A  K   T  K  P   R  E  E   Q  Y  N  S   T  Y  R   V  V  S
1021  CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC

      V  L  T  V   L  H  Q   D  W  L   N  G  K  E   Y  K  C   K  V  S
1081  GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC

      N  K  A  L   P  A  P   I  E  K   T  I  S  K   A  K  G   Q  P  R
1141  AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACAATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA

      E  P  Q  V   Y  T  L   P  P  S   R  D  E  L   T  K  N   Q  V  S
1201  GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC

      L  T  C  L   V  K  G   F  Y  P   S  D  I  A   V  E  W   E  S  N
1261  CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT

      G  Q  P  E   N  N  Y   K  T  T   P  P  V  L   D  S  D   G  S  F
1321  GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC

      F  L  Y  S   K  L  T   V  D  K   S  R  W  Q   Q  G  N   V  F  S
1381  TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA

      C  S  V  M   H  E  A   L  H  N   H  Y  T  Q   K  S  L   S  L  S
1441  TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT

                  XbaI
                 ~~~~~
      P  G  K  *   S  R
1501  CCGGGTAAAT GATCTAGA
```

도면2



클론	LFE @ 1:50	개산 농도 (μg/ml)
D2	26.1	56
IIIC6	25.7	55
IVA3	28.6	61
소비된 벌크	29.6	64

도면3



도면4A

CD20-표적화 2H7 유도체의 결합 후의 보체 매개된 B 세포 사멸

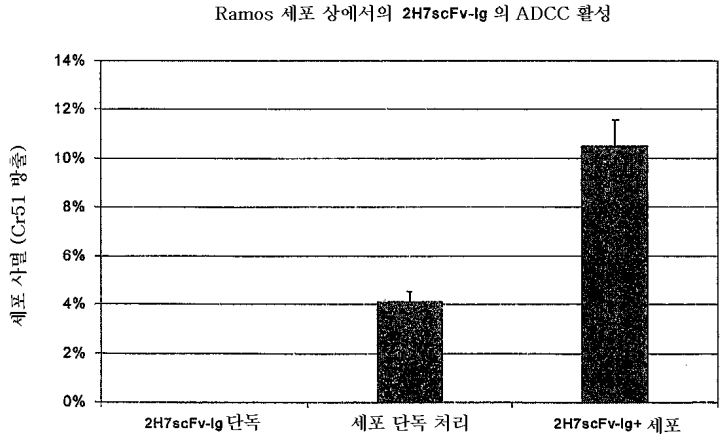
2H7scFv-Ig 농도	RAMOS	BJAB
20 μg/ml + 보체	0.16	0.07
5 μg/ml + 보체	0.2	N.D.
1.25 μg/ml + 보체	0.32	0.1
보체 단독	0.98	0.94

* 생존율은 트립판 블루 배제에 의해 측정하였으며, 카운팅된 세포의 총수 중 생존 가능한 세포의 비율로서 제표하였다.

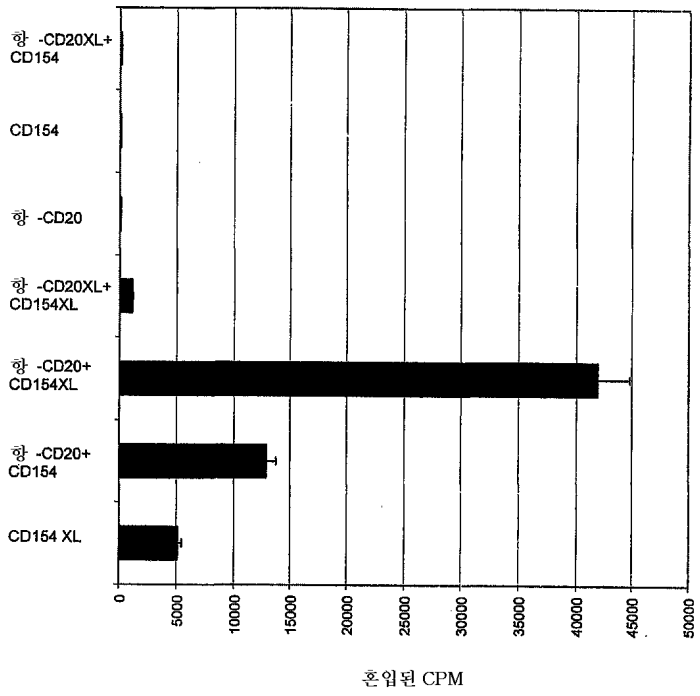
**N.D. (측정되지 않음)

도면4B

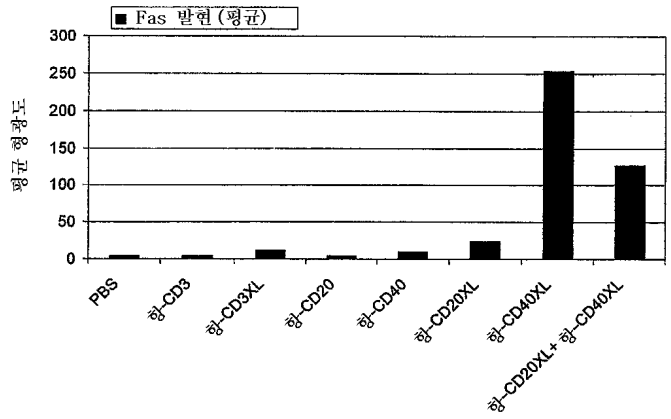
2H7scFv-Ig 에 의해 매개된 항체-의존성 세포의 세포독성(ADCC):



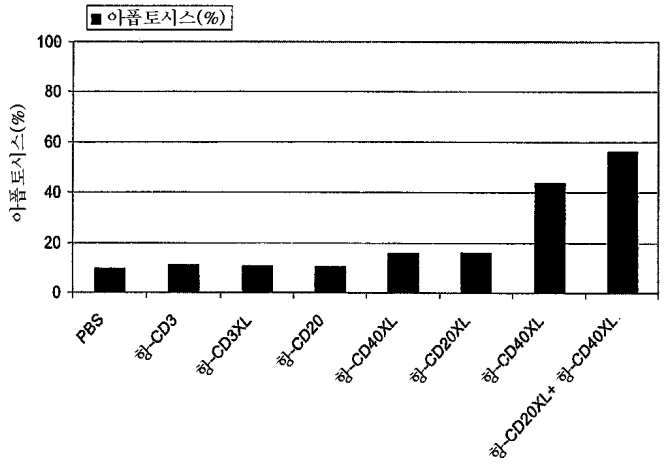
도면5



도면6A

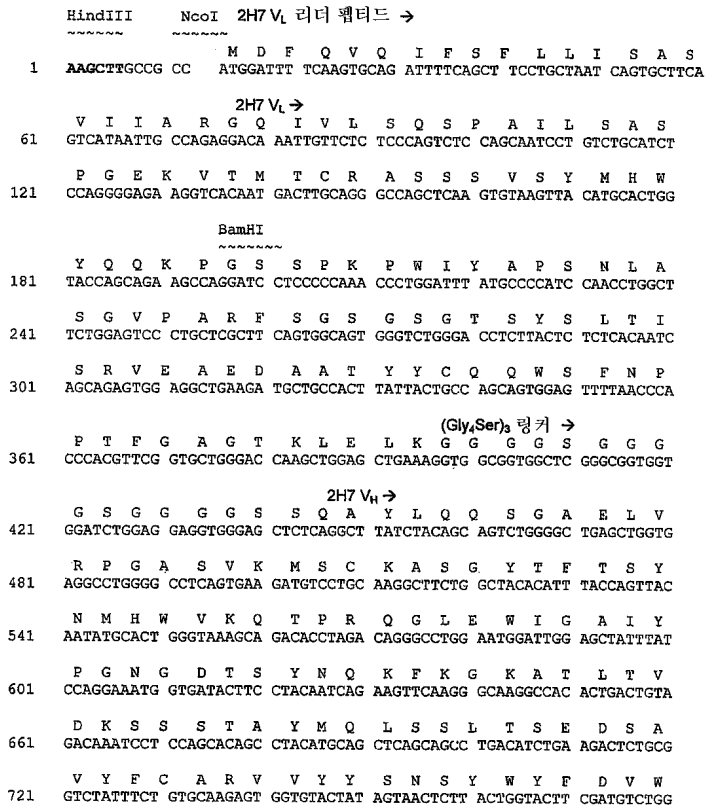

■ Fas 발현 (평균)
평균 형광도
300
250
200
150
100
50
0
PBS
항-CD3
항-CD3XL
항-CD20
항-CD40
항-CD20XL
항-CD40XL
항-CD20XL+ 항-CD40XL

도면6B

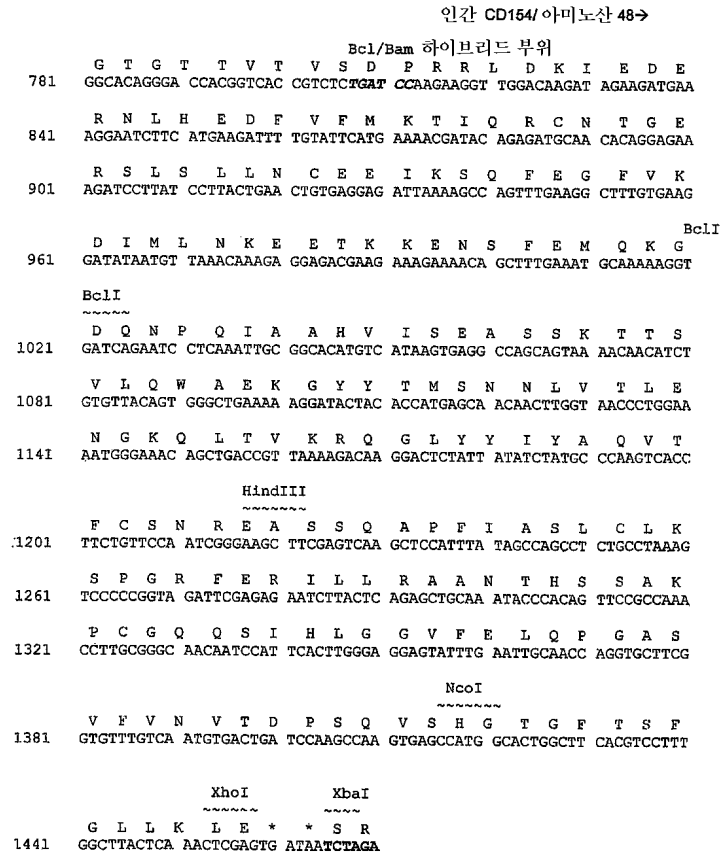

■ 아폽토시스(%)
아폽토시스(%)
100
80
60
40
20
0
PBS
항-CD3
항-CD3XL
항-CD20
항-CD40XL
항-CD20XL
항-CD40XL
항-CD20XL+ 항-CD40XL

도면7A

2H7-CD154 L2 cDNA 및 추정 아미노산 서열:



도면7B


인간 CD154/ 아미노산 48→
Bcl/Bam 하이브리드 부위
781 G T G T T V T V S D P R R L D K I E D E
GGCACAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGAT CCAAGAAGGT TGGACAAGAT AGAAGATGAA
841 R N L H E D F V F M K T I Q R C N T G E
AGGAATCTTC ATGAAGATTT TGTATTCATG AAAACGATAC AGAGATGCAA CACAGGAGAA
901 R S L S L L N C E E I K S Q F E G F V K
AGATCCTTAT CCTTACTGAA CTGTGAGGAG ATTAAAAGCC AGTTTGAAGG CTTTGTGAAG
BclI
961 D I M L N K E E T K K E N S F E M Q K G
GATATAATGT TAAACAAAGA GGAGACGAAG AAAGAAAACA GCTTTGAAAT GCAAAAAGGT
BclI
~~~~~
1021 D Q N P Q I A A H V I S E A S S K T T S
GATCAGAATC CTCAAATTGC GGCACATGTC ATAAGTGAGG CCAGCAGTAA AACAACATCT
1081 V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T L E
GTGTTACAGT GGGCTGAAAA AGGATACTAC ACCATGAGCA ACAACTTGGT AACCCTGGAA
1141 N G K Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T
AATGGGAAAC AGCTGACCGT TAAAAGACAA GGACTCTATT ATATCTATGC CCAAGTCACC
HindIII
~~~~~~~
1201 F C S N R E A S S Q A P F I A S L C L K
TTCTGTTCCA ATCGGGAAGC TTCGAGTCAA GCTCCATTTA TAGCCAGCCT CTGCCTAAAG
1261 S P G R F E R I L L R A A N T H S S A K
TCCCCCGGTA GATTCGAGAG AATCTTACTC AGAGCTGCAA ATACCCACAG TTCCGCCAAA
1321 P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S
CCTTGCGGGC AACAATCCAT TCACTTGGGA GGAGTATTTG AATTGCAACC AGGTGCTTCG
NcoI
~~~~~~~
1381 V F V N V T D P S Q V S H G T G F T S F
GTGTTTGTCA ATGTGACTGA TCCAAGCCAA GTGAGCCATG GCACTGGCTT CACGTCCTTT
XhoI
~~~~~~
XbaI
~~~~
1441 G L L K L E * * S R
GGCTTACTCA AACTCGAGTG ATAATCTAGA
~~~~

도면7C

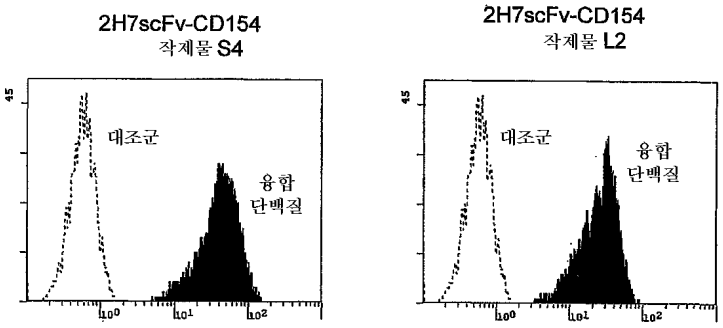
2H7scFv-CD154 S4 cDNA 및 추정 아미노산 서열 :

```
        HindIII     NcoI
        ~~~~~~      ~~~~~~2H7 VL 리더 펩티드 →
                              M  D  F  Q  V  Q  I  F  S  F  L  L  I  S  A  S
   1    AAGCTTGCCG CC   ATGGATTT TCAAGTGCAG ATTTTCAGCT TCCTGCTAAT CAGTGCTTCA

                                  2H7 VL →
        V  I  I  A  R  G  Q  I  V  L  S  Q  S  P  A  I  L  S  A  S
  61    GTCATAATTG CCAGAGGACA AATTGTTCTC TCCCAGTCTC CAGCAATCCT GTCTGCATCT

        P  G  E  K  V  T  M  T  C  R  A  S  S  S  V  S  Y  M  H  W
 121    CCAGGGGAGA AGGTCACAAT GACTTGCAGG GCCAGCTCAA GTGTAAGTTA CATGCACTGG

                        BamHI
                        ~~~~~~~
        Y  Q  Q  K  P  G  S  S  P  K  P  W  I  Y  A  P  S  N  L  A
 181    TACCAGCAGA AGCCAGGATC CTCCCCCAAA CCCTGGATTT ATGCCCCATC CAACCTGGCT

        S  G  V  P  A  R  F  S  G  S  G  S  G  T  S  Y  S  L  T  I
 241    TCTGGAGTCC CTGCTCGCTT CAGTGGCAGT GGGTCTGGGA CCTCTTACTC TCTCACAATC

        S  R  V  E  A  E  D  A  A  T  Y  Y  C  Q  Q  W  S  F  N  P
 301    AGCAGAGTGG AGGCTGAAGA TGCTGCCACT TATTACTGCC AGCAGTGGAG TTTTAACCCA

                                        (Gly4Ser)3 링키 →
        P  T  F  G  A  G  T  K  L  E  L  K  G  G  G  G  S  G  G  G
 361    CCCACGTTCG GTGCTGGGAC CAAGCTGGAG CTGAAAGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT

                                  2H7 VH →
        G  S  G  G  G  G  S  S  Q  A  Y  L  Q  Q  S  G  A  E  L  V
 421    GGATCTGGAG GAGGTGGGAG CTCTCAGGCT TATCTACAGC AGTCTGGGGC TGAGCTGGTG

        R  P  G  A  S  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y
 481    AGGCCTGGGG CCTCAGTGAA GATGTCCTGC AAGGCTTCTG GCTACACATT TACCAGTTAC

        N  M  H  W  V  K  Q  T  P  R  Q  G  L  E  W  I  G  A  I  Y
 541    AATATGCACT GGGTAAAGCA GACACCTAGA CAGGGCCTGG AATGGATTGG AGCTATTTAT

        P  G  N  G  D  T  S  Y  N  Q  K  F  K  G  K  A  T  L  T  V
 601    CCAGGAAATG GTGATACTTC CTACAATCAG AAGTTCAAGG GCAAGGCCAC ACTGACTGTA

        D  K  S  S  S  T  A  Y  M  Q  L  S  S  L  T  S  E  D  S  A
 661    GACAAATCCT CCAGCACAGC CTACATGCAG CTCAGCAGCC TGACATCTGA AGACTCTGCG

        V  Y  F  C  A  R  V  V  Y  Y  S  N  S  Y  W  Y  F  D  V  W
 721    GTCTATTTCT GTGCAAGAGT GGTGTACTAT AGTAACTCTT ACTGGTACTT CGATGTCTGG
```

도면7D

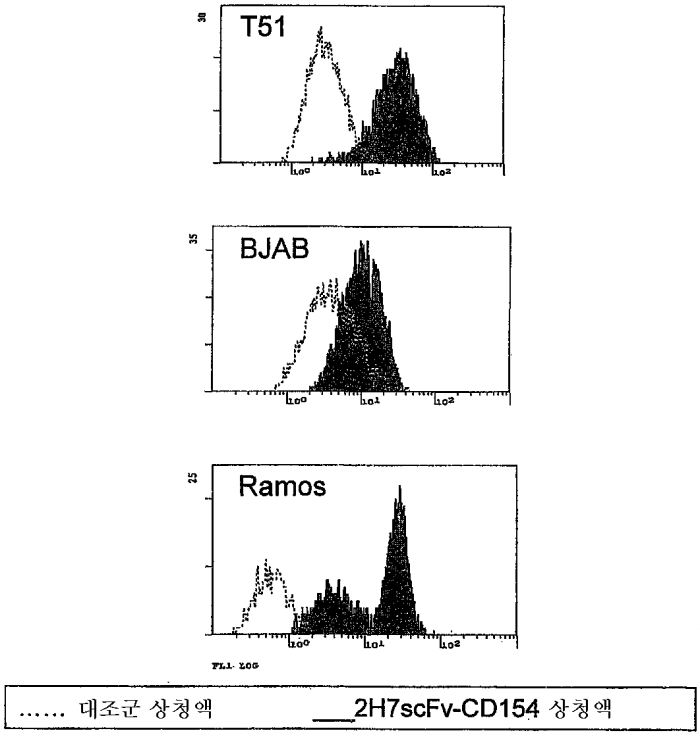
```
                                                  인간 CD154/ 아미노산 108 →
                                  Bcl/Bam 하이브리드 부위                  BclI
        G  T  G  T  T  V  T  V  S  D  P  E  N  S  F  E  M  Q  K  G
 781    GGCACAGGGA CCACGGTCAC CGTCTC*TGAT CC*AGAAAACA GCTTTGAAAT GCAAAAAGGT

        BclI
        ~~~~~
        D Q N P Q I A A H V I S E A S S K T T S
 841   GATCAGAATC CTCAAATTGC GGCACATGTC ATAAGTGAGG CCAGCAGTAA AACAACATCT

        V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T L E
 901   GTGTTACAGT GGGCTGAAAA AGGATACTAC ACCATGAGCA ACAACTTGGT AACCCTGGAA

        N G K Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T
 961   AATGGGAAAC AGCTGACCGT TAAAAGACAA GGACTCTATT ATATCTATGC CCAAGTCACC

                        HindIII
                        ~~~~~~~
        F C S N R E A S S Q A P F I A S L C L K
1021   TTCTGTTCCA ATCGGGAAGC TTCGAGTCAA GCTCCATTTA TAGCCAGCCT CTGCCTAAAG

        S P G R F E R I L L R A A N T H S S A K
1081   TCCCCCGGTA GATTCGAGAG AATCTTACTC AGAGCTGCAA ATACCCACAG TTCCGCCAAA

        P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S
1141   CCTTGCGGGC AACAATCCAT TCACTTGGGA GGAGTATTTG AATTGCAACC AGGTGCTTCG

                                              NcoI
                                              ~~~~~~~
        V F V N V T D P S Q V S H G T G F T S F
1201   GTGTTTGTCA ATGTGACTGA TCCAAGCCAA GTGAGCCATG GCACTGGCTT CACGTCCTTT

                    XhoI   XbaI
                    ~~~~~~   ~~~~
        G L L K L E * * S R
1261   GGCTTACTCA AACTCGAGTG ATAATCTAGA
```

도면8

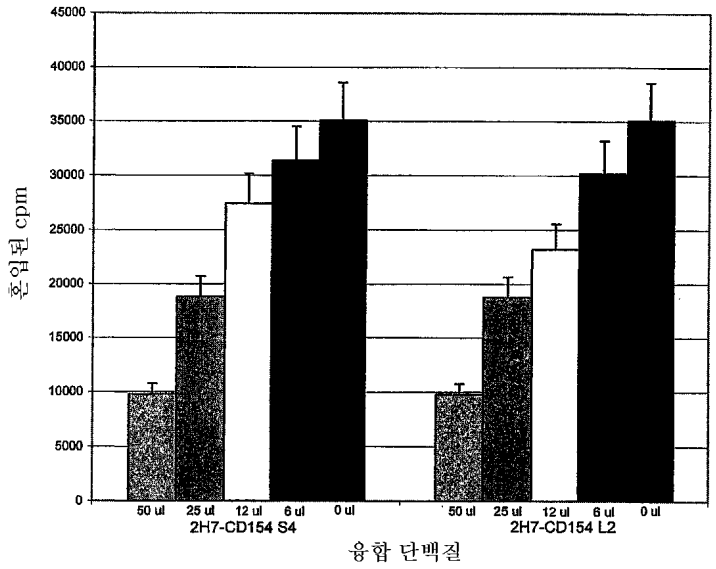


CD20 CHO 세포 표적물 + (대조군 또는 융합 단백질)
+ 비오틴-CD40Ig + PE-SA

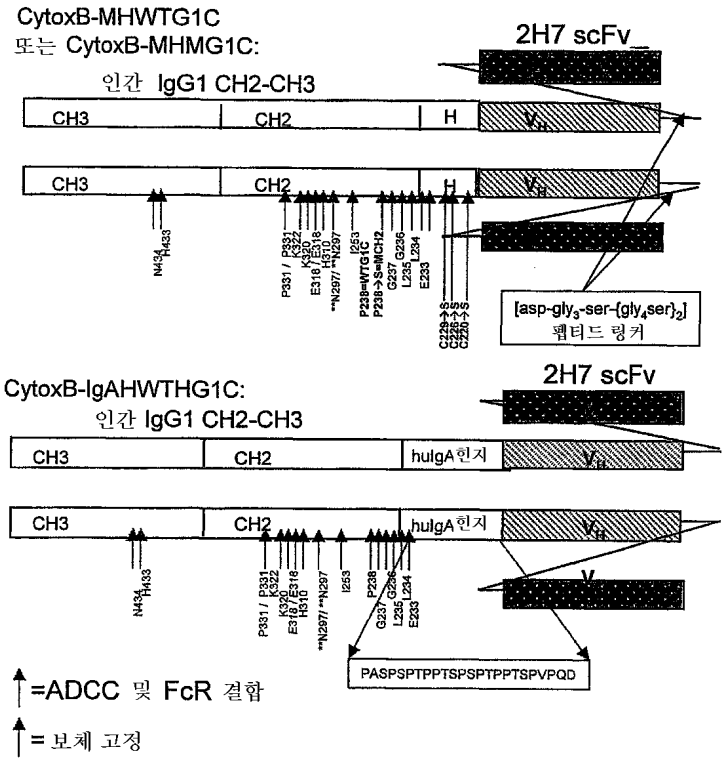
도면9



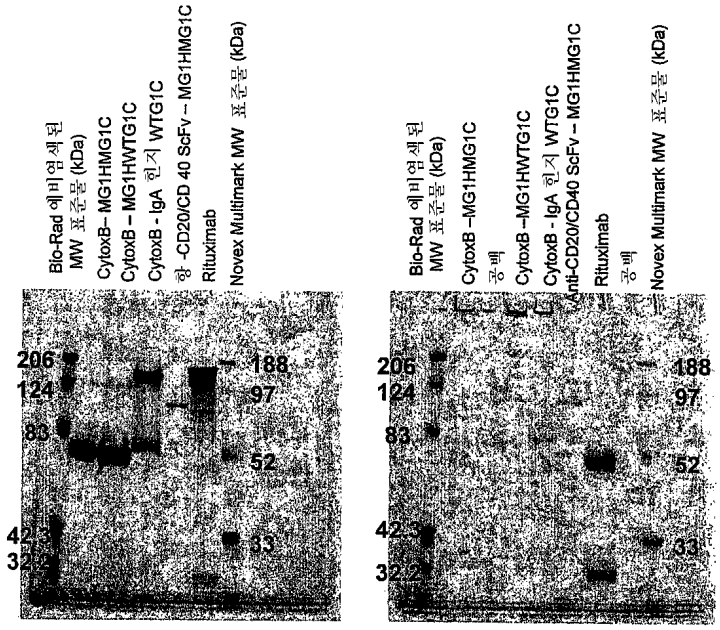
도면10


45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
혼입된 cpm
50 ul
25 ul
12 ul
6 ul
0 ul
2H7-CD154 S4
2H7-CD154 L2
융합 단백질

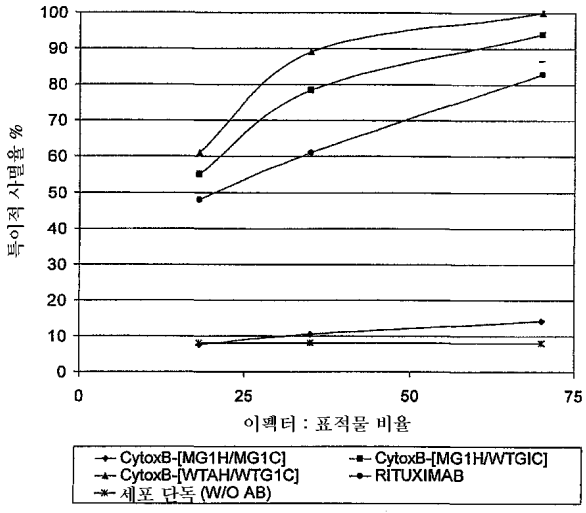
도면11


CytoxB-MHWTG1C
또는 CytoxB-MHMG1C:
인간 IgG1 CH2-CH3
2H7 scFv
CH3
CH2
H
[asp-gly3-ser-(gly4ser)2]
펩티드 링커
CytoxB-IgAHWTHG1C:
인간 IgG1 CH2-CH3
huIgA힌지
PASPSPTPPTSPSPTPPTSPVPQD
=ADCC 및 FcR 결합
= 보체 고정

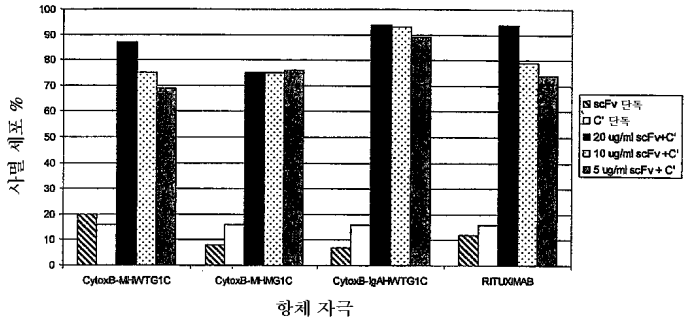
도면12


Bio-Rad 에비염색된 MW 표준물 (kDa)
CytoxB– MG1HMG1C
CytoxB – MG1HWTG1C
CytoxB - IgA 힌지 WTG1C
항 -CD20/CD 40 ScFv – MG1HMG1C
Rituximab
Novex Multimark MW 표준물 (kDa)
206
124
83
42
32
188
97
52
33
비환원
Bio-Rad 에비염색된 MW 표준물 (kDa)
CytoxB –MG1HMG1C
공백
CytoxB –MG1HWTG1C
CytoxB - IgA 힌지 WTG1C
Anti-CD20/CD40 ScFv – MG1HMG1C
Rituximab
공백
Novex Multimark MW 표준물 (kDa)
206
124
83
42
32
188
97
52
33
환원

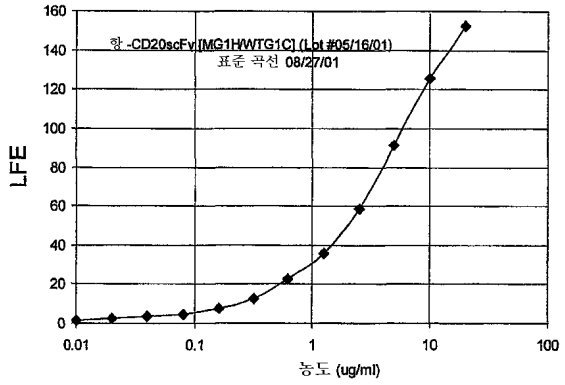
도면13


특이적 사멸율 %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
25
50
75
이펙터 : 표적물 비율
CytoxB-[MG1H/MG1C]
CytoxB-[MG1H/WTGIC]
CytoxB-[WTAH/WTG1C]
RiTUXIMAB
세포 단독 (W/O AB)

도면14

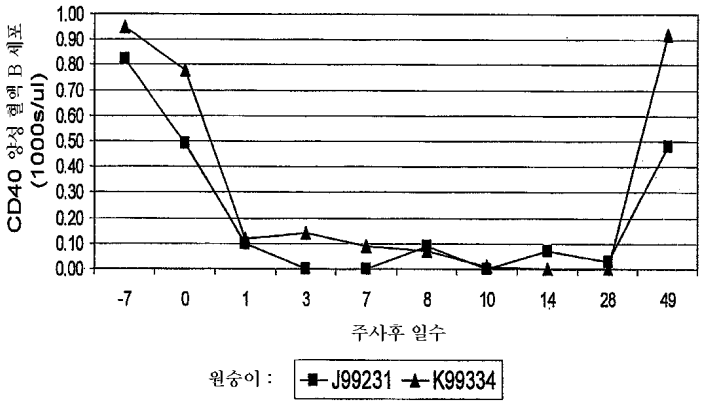


도면15



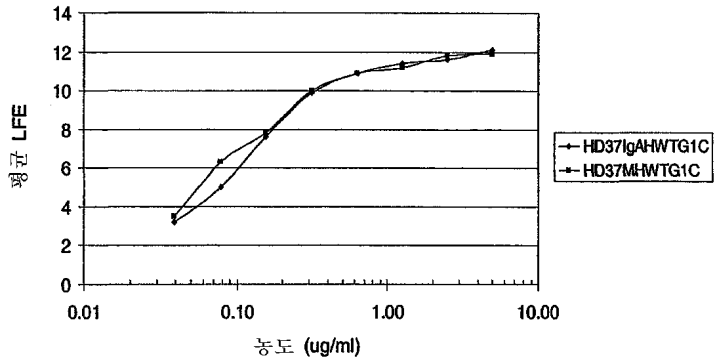
일수	원숭이 J99231 LFE(1:40)	농도 (μg/mL)	원숭이 K99334 LFE(1:40)	농도 (μg/mL)
주사 → -7	2.41	<0.6μg/mL	1.51	<0.4μg/mL
0	2.22	<0.6μg/mL	1.63	<0.4μg/mL
주사 → 1	73.8	220μg/mL	44.4	100μg/mL
3	20.0	28μg/mL	40.2	80μg/mL
7	15.6	24μg/mL	15.7	24μg/mL
8	39.1	80μg/mL	42.6	92μg/mL
10	11.5	18μg/mL	2.74	1.2μg/mL
14	2.05	0.6mg/mL	1.96	0.6μg/mL

도면16



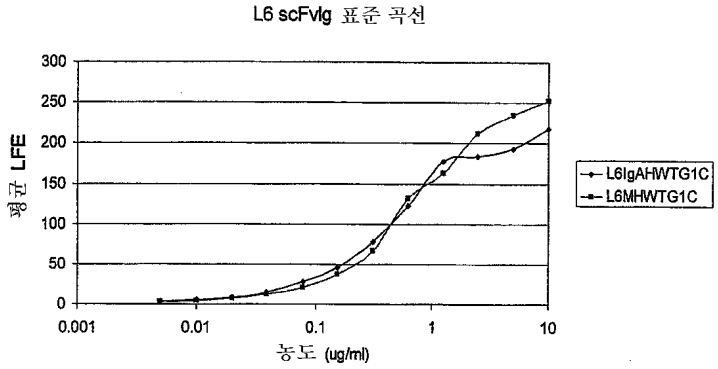
도면17

B 세포에의 HD37 scFvIg 유도체 결합의 표준 곡선



클론/단리물	1:100에서의 평균 LFE	개산 농도
벌크 IgAHWTG1C	11.2	> 60 ug/ml
1B2	10.4	>50 ug/ml
6C5	10.5	>50 ug/ml
4B1	8.6	>40 ug/ml
벌크 MHWTG1C	10.9	> 50 ug/ml
2G8	10.6	> 50 ug/ml
3F3	8.3	>40 ug/ml
3D9	11.1	> 60 ug/ml

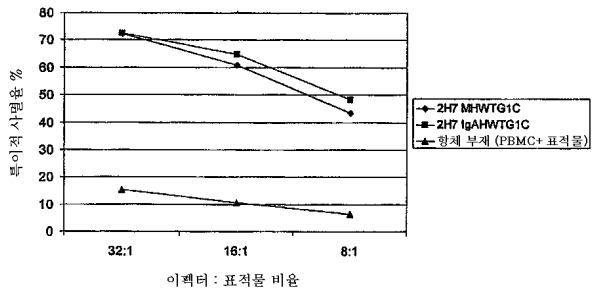
도면18



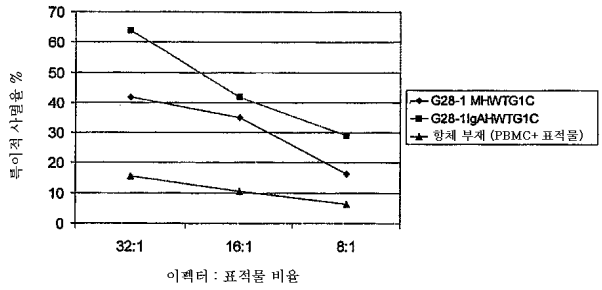
작제물	평균 LFE 1:20	계산 농도
L6IgAHWTG1C 비증폭 CHO 상청액	51.1	6.25 ug/ml
L6IgGMHWTG1C 비증폭 CHO 상청액	23.0	3.2 ug/ml

도면19

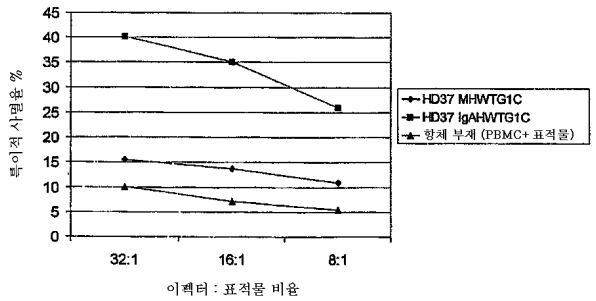
A. 2H7 (항 -CD20) scFv 유도체



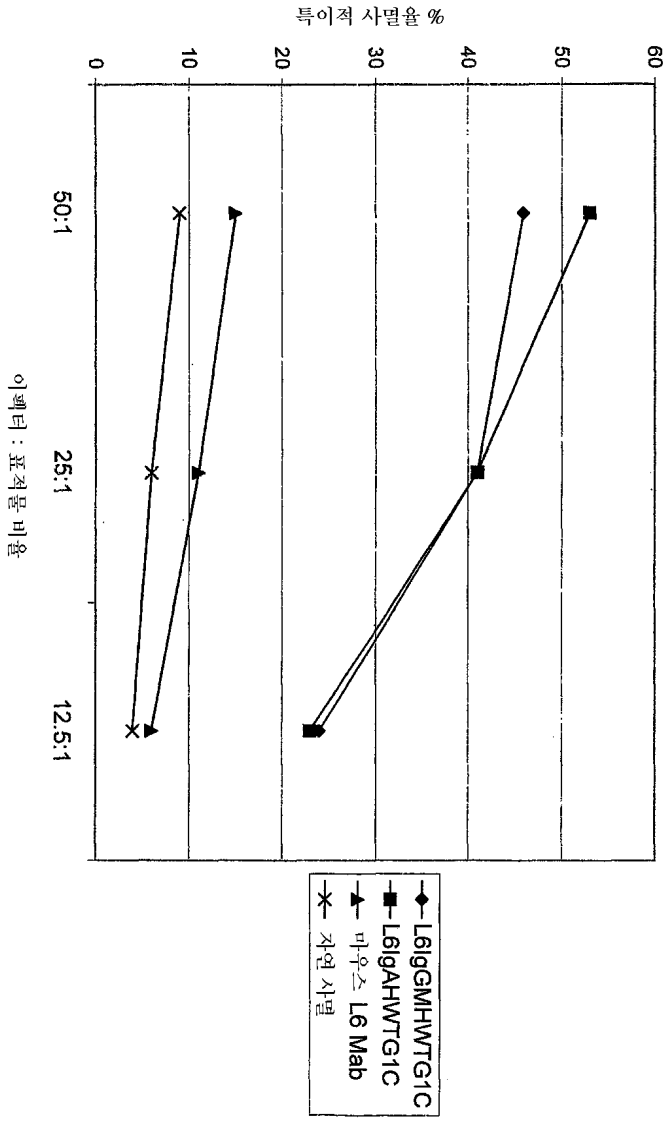
B. G28-1 (항 -CD37) scFv 유도체



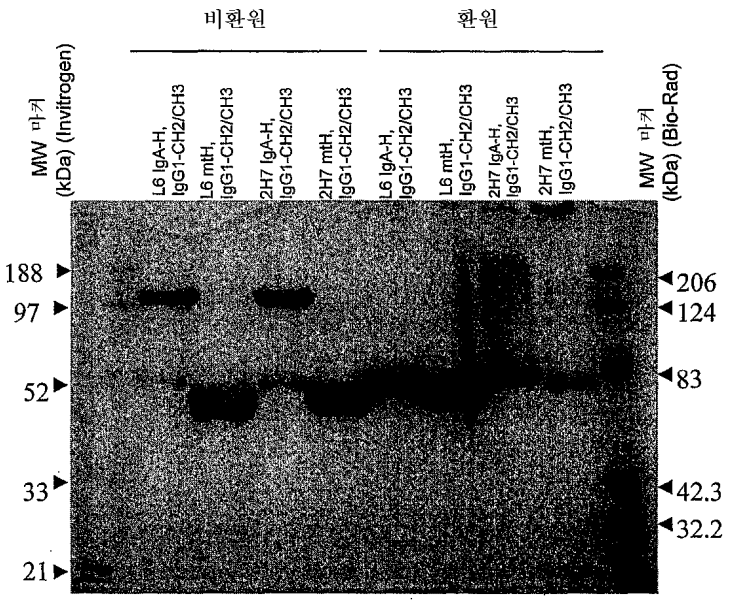
C. HD37 (항 -CD19) scFv 유도체



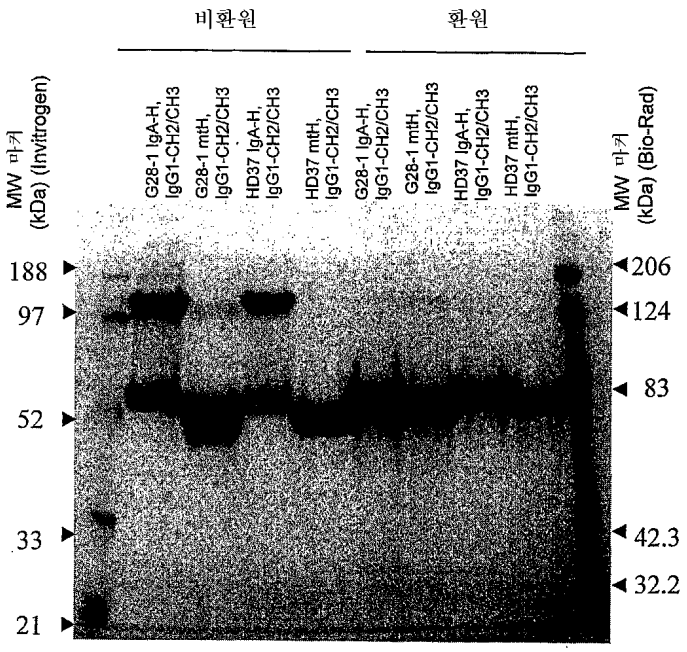
도면20


특이적 사멸율 %
0
10
20
30
40
50
60
50:1
25:1
12.5:1
이펙터 : 표적물 비율
L6IgGMHWTG1C
L6IgAHWTG1C
마우스 L6 Mab
자연 사멸

도면21



도면22



서 열 목 록

<110> Genecraft, Inc.
Ledbetter, Jeffrey
Hayden-Ledbetter, Martha
<120> Binding Domain-Immunoglobulin Fusion Proteins
<130> 390069.401PC

<140> PCT
<141> 2002-01-17
<160> 38
<170> PatentIn version 3.0
<210> 1
<211> 812
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> SYNTHETIC MOUSE SCFV FUSION GENE

<220>
<221> sig_peptide
<222> (13)..(78)
<220>

<221> V_region
<222> (79)..(396)
<223> light chain variable region for anti-CD20 scFv
<220>

<221> misc_feature
<222> (397)..(444)
<223> asp-gly3ser(gly4ser)2-ser peptide linker
<220>

<221> V_region
<222> (445)..(808)
<223> heavy chain variable region for anti-CD20 scFv
<400> 1
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact
tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaaggtg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt
ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat ca 812
<210> 2
<211> 1518
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> SYNTHETIC MOUSE HUMAN CHIMERIC FUSION GENE
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(807)
<223> MURINE ANTI-HUMAN CD20 scFv

<220>

<221> C_region
<222> (808)..(1513)
<223> HUMAN IgG1 Fc TAIL, WILD TYPE HINGE, CH2 AND CH3
<400> 2
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact
tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt
ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttgtga caaaactcac 840
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
aacaaagccc
tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
ccgggtaaat gatctaga 1518

<210> 3
<211> 1518
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> SYNTHETIC MOUSE-HUMAN CHIMERIC FUSION GENE
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(807)<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV
<220>

<221> C_region
<222> (808)..(1513)
<223> HINGE CYSTEINES (826-829; 844-847; 853-856) MUTATED TO SERINES
PROLINE TO SERINE MUTATION (880-883) IN CH2 DISRUPTS EFFECTOR FUN
CTION
<400> 3
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180

taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240

tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta
660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 900
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg
tgtggtcagc 1080
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc
agaagagcct ctccctgtct 1500
ccgggtaaat gatctaga 1518

<210> 4
<211> 1518
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> SYNTHETIC MOUSE-HUMAN CHIMERIC FUSION GENE
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(807)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV
<220>

<221> C_region
<222> (808)..(1513)
<223> HINGE CYSTEINES MUTATED TO SERINES (826-829; 844-847; 853-856)
WILD TYPE CH2 AND CH3 DOMAINS MEDIATE EFFECTOR FUNCTIONS
<400> 4
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt
gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660

gacaaatcct ccagcacagc

ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960
gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
gtcctcaccg

tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa acaatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500

ccgggtaaat gatctaga 1518
<210> 5
<211> 1524
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> SYNTHETIC MOUSE HUMAN CHIMERIC FUSION GENE
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(796)
<223> MOUSE ANTI HUMAN CD20 SCFV
<220>

<221> N_region
<222> (797)..(864)
<223> HUMAN IGA HINGE REGION
<220>

<221> C_region
<222> (865)..(1518)
<223> HUMAN IGG1 CH2 AND CH3 WILD TYPE FC DOMAIN
<400> 5
atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcttcagt cataattgcc 60
agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120
gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggta ccagcagaag 180
ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccccatcca acctggcttc tggagtccct 240
gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagtt
ttaacccacc cacgttcggt 360
gctgggacca agctggagct gaaagatggc ggtggctcgg gcggtggtgg atctggagga 420
ggtgggagct ctcaggctta tctacagcag tctggggctg agctggtgag gcctggggcc 480
tcagtgaaga tgtcctgcaa ggcttctggc tacacattta ccagttacaa tatgcactgg 540
gtaaagcaga cacctagaca gggcctggaa tggattggag ctatttatcc aggaaatggt 600
gatacttcct acaatcagaa gttcaagggc aaggccacac tgactgtaga caaatcctcc 660
agcacagcct acatgcagct cagcagcctg acatctgaag actctgcggt ctatttctgt 720
gcaagagtgg tgtactatag taactcttac

tggtacttcg atgtctgggg cacagggacc 780
acggtcaccg tctctgatca gccagttccc tcaactccac ctaccccatc tccctcaact 840
ccacctaccc catctccctc atgcgcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 900

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 960
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 1020
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1080
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1140
gtctccaaca aagccctccc
agcccccatc gagaaaacaa tctccaaagc caaagggcag 1200
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1260
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1320
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1380
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1440
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1500
ctgtctccgg gtaaatgatc taga 1524
<210> 6

<211> 711
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> SYNTHETIC HUMAN PARTIAL FUSION GENE
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(705)
<223> HINGE CYSTEINES MUTATED TO SERINES (19-21; 37-39; 46-48)

<400> 6
gatcaggagc ccaaatcttc tgacaaaact cacacatccc caccgtcccc agcacctgaa 60
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 120
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 180
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 240
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 300
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 360
aaaacaatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac
cctgccccca 420
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 480
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 540
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 600
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 660
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgatctag a 711
<210> 7
<211> 729
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> SYNTHETIC HUMAN PARTIAL FUSION GENE
<220>
<221> N_region
<222> (1)..(69)
<223> HUMAN IGA HINGE
<220>

<221> C_region
<222> (70)..(723)
<223> HUMAN WILD TYPE IGG1 CH2 AND CH3, FC
<400> 7
gatcagccag ttccctcaac tccacctacc ccatctccct caactccacc taccccatct 60

ccctcatgcg cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 120
aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 180
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 240
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 300
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt
gcaaggtctc caacaaagcc 360
ctcccagccc ccatcgagaa aacaatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 420
gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 480
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 540
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 600
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 660
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 720
tgatctaga 729

<210> 8
<211> 825
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> SYNTHETIC MOUSE SCFV FUSION GENE
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(72)
<223> LIGHT CHAIN LEADER PEPTIDE

<220>
<221> V_region
<222> (73)..(405)
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD19: HD37
<220>

<221> misc_feature
<222> (406)..(450)
<223> SYNTHETIC (GLY4SER)3 LINKER PEPTIDE
<220>

<221> V_region
<222> (454)..(825)
<223> HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD19: HD37
<400> 8
aagcttgccg ccatggagac agacacactc ctgctatggg tgctgctgct ctgggttcca 60
ggctccactg gtgacattgt gctgacccaa tctccagctt ctttggctgt gtctctaggg 120
cagagggcca ccatctcctg caaggccagc caaagtgttg attatgatgg tgatagttat 180
ttgaactggt accaacagat tccaggacag ccacccaaac tcctcatcta tgatgcatcc 240
aatctagttt ctgggatccc acccaggttt agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc 300
ctcaacatcc atcctgtgga
gaaggtggat gctgcaacct atcactgtca gcaaagtact 360
gaggatccgt ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaaggtgg cggtggctcg 420
ggcggtggtg ggtcgggtgg cggcggatcg tcacaggttc agctgcagca gtctggggct 480
gagctggtga ggcctgggtc tcagtgaag atttcctgca aggcttctgg ctatgcattc 540
agtagctact ggatgaactg ggtgaagcag aggcctggac agggtcttga gtggattgga 600
cagatttggc ctggagatgg tgatactaac tacaatggaa agttcaaggg taaagccact 660
ctgactgcag acgaatcctc cagcacagcc tacatgcaac tcagcagcct agcatctgag 720
gactctgcgg
tctatttctg tgcaagacgg gagactacga cggtaggccg ttattactat 780
gctatggact actggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctca 825

<210> 9
<211> 795
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> SYNTHETIC MOUSE SCFV FUSION GENE
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(72)
<223> LIGHT CHAIN LEADER PEPTIDE SEQUENCE
<220>

<221> V_region
<222> (73)..(393)
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD37: G28-1
<220>

<221> misc_feature
<222> (394)..(441)
<223> SYNTHETIC LINKER PEPTIDE ENCODED (GLY4SER)3
<220>

<221> V_region
<222> (442)..(795)
<223> HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD37: G28-1
<400> 9
aagcttgccg ccatggtatc cacagctcag ttccttgggt tgctgctgct gtggcttaca 60
ggtggcagat gtgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctatctgc atctgtggga 120
gagactgtca ccatcacatg tcgaacaagt gaaaatgttt acagttattt ggcttggtat 180
cagcagaaac agggaaaatc tcctcagctc ctggtctctt ttgcaaaaac cttagcagaa 240
ggtgtgccat caaggttcag tggcagtgga tcaggcacac agttttctct gaagatcagc 300
agcctgcagc ctgaagattc
tggaagttat ttctgtcaac atcattccga taatccgtgg 360
acgttcggtg gaggcaccga actggagatc aaaggtggcg gtggctcggg cggtggtggg 420
tcgggtggcg gcggatcgtc agcggtccag ctgcagcagt ctggacctga gctggaaaag 480
cctggcgctt cagtgaagat ttcctgcaag gcttctggtt actcattcac tggctacaat 540
atgaactggg tgaagcagaa taatggaaag agccttgagt ggattggaaa tattgatcct 600
tattatggtg gtactaccta caaccggaag ttcaagggca aggccacatt gactgtagac 660
aaatcctcca gcacagccta catgcagctc aagagtctga catctgagga ctctgcagtc 720
tattactgtg
caagatcggt cggccctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 780
gtctcttctg atcag 795
<210> 10
<211> 824
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> SYNTHETIC MOUSE FUSION GENE
<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(61)
<223> native light chain leader peptide
<220>

<221> V_region
<222> (62)..(397)
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD22: G28-7
<220>

<221> misc_feature
<222> (398)..(445)
<223> (gly4ser)3 linker peptide
<220>

<221> V_region
<222> (445)..(818)
<223> HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD22: G28-7
<220>

<221> misc_feature
<222> (819)..(824)
<223> BclI restriction site
<400> 10
atggagtcac attcccaggt ctttctctcc ctgctgctct gggtatctgg tacctgtggg 60
aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt cagcaggaga aaaggtcact 120
atgaactgta agtccagtca aagtgttttc tacagttcaa atcagaggaa ttatttggcc 180
tggtatcagc agaaaccagg gcagtctccc aaattgctga tctactgggc atctactagg 240
gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatccg ggacagactt tactcttacc 300
atcagcagtg tacatactga agacctggca gtttattact gtcatcaatt
cctctcttcg 360
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaaggcg gtggtggttc gggtggtggt 420
ggttcgggtg gcggcggatc ttctcaggtc caactgcagc agcctggggc tgaactggtg 480
aagcctggga cttcagtgaa gctgtcctgc aaggcctctg gctacacctt caccaactac 540
tggatggtct gggtgaagca gacgcctgga gaaggccttg agtggattgg agaaattatt 600
cctagcaacg gtcgtactaa atacaatgag aagttcaaga gcaaggccac actgactgca 660
gacaaatcct cccgcacagc ctacatgcaa ctcagcagcc tggcatctga ggactctgcg 720
gtctattatt gtgcaagaga gatgtccatt attactacgg
tactgactcc cggtttgctt 780
actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgcagcctg atca 824
<210> 11
<211> 266
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> INIT_MET
<222> (1)..(1)
<220>

<221> SIGNAL
<222> (1)..(22)
<220>

<221> DOMAIN
<222> (23)..(128)
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD20
<220>

<221> SITE
<222> (129)..(144)

<223> ASP-(GLY3SER)-(GLY4SER)2-SER LINKER PEPTIDE
<220>

<221> DOMAIN
<222> (145)..(266)
<223> HEAVY CHAIN VARIABLE DOMAIN FOR MOUSE ANTI-HUMAN CD20
<400> 11
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

20 25 30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

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

65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

100 105 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

115 120 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser

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

145 150 155 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

180 185 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

195 200 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

210 215 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

225 230 235 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp

260 265
<210> 12
<211> 271

<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(271)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD19 SCFV
<400> 12
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala

20 25 30
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser

35 40 45
Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro

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

65 70 75 80
Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys

100 105 110
Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

115 120 125
Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

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

145 150 155 160
Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
165 170 175
Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

180 185 190
Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn

195 200 205
Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser

210 215 220
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val

225 230 235 240
Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr
245 250 255
Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

260 265 270
<210> 13

<211> 259
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>

<221> SITE
<222> (1)..(259)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD37 SCFV
<400> 13
Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15
Gly Gly Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

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

35 40 45
Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro

50 55 60
Gln Leu Leu Val Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser

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

85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser

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

115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ala

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

145 150 155 160
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
165 170 175
Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly

180 185 190
Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys

195 200 205
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

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

225 230 235 240
Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
245 250 255
Val Ser Ser

<210> 14

<211> 272
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>

<221> SITE
<222> (1)..(272)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD22 SCFV
<400> 14

```
Met Glu Ser His Ser Gln Val Phe Leu Ser Leu Leu Leu Trp Val Ser

1               5                   10                  15
Gly Thr Cys Gly Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala

            20                  25                  30
Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser

        35                  40                  45
Val Phe Tyr Ser Ser Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

    50                  55                  60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg

65                  70                  75                  80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

                85                  90                  95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val His Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

            100                 105                 110
Tyr Cys His Gln Phe Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys

        115                 120                 125
Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

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

145                 150                 155                 160
Lys Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
                165                 170                 175
Phe Thr Asn Tyr Trp Met Val Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Glu Gly

            180                 185                 190
Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ile Pro Ser Asn Gly Arg Thr Lys Tyr

        195                 200                 205
Asn Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser

    210                 215                 220
Arg Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala

225                 230                 235                 240
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Met Ser Ile Ile Thr Thr Val Leu Thr
                245                 250                 255
Pro Gly Leu Leu Thr Gly Ala Lys Gly Leu Trp Ser Leu Ser Leu Gln

            260                 265                 270
```

<210> 15
<211> 499
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN
<220>

<221> SITE
<222> (1)..(265)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV: 2H7
<220>

<221> DOMAIN
<222> (266)..(499)
<223> HUMAN IGG1 WILD TYPE HINGE, CH2, CH3 FC
<400> 15
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

20 25 30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

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

65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

100 105 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

115 120 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser

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

145 150 155 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

180 185 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

195 200 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

```
    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Cys

            260                 265                 270
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

        275                 280                 285
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

    290                 295                 300
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

305                 310                 315                 320
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
                325                 330                 335
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

            340                 345                 350
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

        355                 360                 365
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

    370                 375                 380
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

385                 390                 395                 400
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
                405                 410                 415
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

            420                 425                 430
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

        435                 440                 445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

    450                 455                 460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465                 470                 475                 480
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                485                 490                 495
Pro Gly Lys
```

<210> 16
<211> 499
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN
<220>

<221> SITE
<222> (1)..(265)
<223> 2H7 SCFV TARGETED TO HUMAN CD20
<220>

<221> DOMAIN
<222> (265)..(499)
<223> HINGE CYSTEINES MUTATED TO SERINES (AMINO ACIDS 272, 278, 281)
PROLINE IN CH2 MUTATED TO SERINE (AMINO ACID 290)
<400> 16
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

20 25 30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

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

65 70 75 80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

100 105 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

115 120 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser

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

145 150 155 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
165 170 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

180 185 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

195 200 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

210 215 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

225 230 235 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser

```
            260                 265                 270
Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

        275                 280                 285
Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

    290                 295                 300
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

305                 310                 315                 320
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
                325                 330                 335
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

            340                 345                 350
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

        355                 360                 365
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

    370                 375                 380
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

385                 390                 395                 400
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
                405                 410                 415
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

            420                 425                 430
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

        435                 440                 445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

    450                 455                 460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465                 470                 475                 480
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                485                 490                 495
Pro Gly Lys
```

<210> 17
<211> 499
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN
<220>

<221> SITE
<222> (1)..(265)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV: 2H7
<220>

<221> DOMAIN
<222> (266)..(499)

<223> HINGE CYSTEINES MUTATED TO SERINES (AMINO ACIDS 272, 278, 281)
CH2 AND CH3 DOMAINS ARE WILD TYPE IN SEQUENCE
<400> 17

```
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1               5                   10                  15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

        35                  40                  45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

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

65                  70                  75                  80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

                85                  90                  95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

            100                 105                 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

        115                 120                 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser

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

145                 150                 155                 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                165                 170                 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

            180                 185                 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

        195                 200                 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser

            260                 265                 270
Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

        275                 280                 285
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

    290                 295                 300
```

```
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

305                 310                 315                 320
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
                325                 330                 335
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

            340                 345                 350
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

        355                 360                 365
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

    370                 375                 380
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

385                 390                 395                 400
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
                405                 410                 415
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

            420                 425                 430
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

        435                 440                 445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

    450                 455                 460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465                 470                 475                 480
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
                485                 490                 495
Pro Gly Lys

<210>  18
<211>  505
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence
<220>


<223>  MOUSE-HUMAN FUSION PROTEIN
<220>

<221>  SITE
<222>  (1)..(265)
<223>  MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV:  2H7


<220>
<221>  DOMAIN
<222>  (266)..(288)
<223>  WILD TYPE IGA HINGE
<220>


<221>  DOMAIN
<222>  (289)..(505)
<223>  HUMAN IGG1 CH2 AND CH3 DOMAINS, WILD TYPE SEQUENCE
<400>  18
```

```
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1               5                   10                  15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

        35                  40                  45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

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

65                  70                  75                  80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

                85                  90                  95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

            100                 105                 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

        115                 120                 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser

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

145                 150                 155                 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                165                 170                 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

            180                 185                 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

        195                 200                 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Pro Val Pro Ser Thr

            260                 265                 270
Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys

        275                 280                 285
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

    290                 295                 300
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

305                 310                 315                 320
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
```

```
                325                 330                 335
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

            340                 345                 350
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

        355                 360                 365
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

    370                 375                 380
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

385                 390                 395                 400
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
                405                 410                 415
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

            420                 425                 430
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

        435                 440                 445
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

    450                 455                 460
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

465                 470                 475                 480
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
                485                 490                 495
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

            500                 505
<210>  19
<211>  234
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<220>

<221>  DOMAIN
<222>  (1)..(234)
<223>  MUTANT IGG1 HINGE (AMINO ACIDS 7, 13, 16)
       WILD TYPE CH2 AND CH3 DOMAINS
       ALTERNATIVE CARBOXY TERMINUS OF SCFVIG FUSION PROTEINS
<400>  19
Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser

1               5                   10                  15
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

            20                  25                  30
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

        35                  40                  45
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

    50                  55                  60
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
```

65 70 75 80
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

85 90 95
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

100 105 110
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

115 120 125
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

130 135 140
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

145 150 155 160
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

165 170 175
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

180 185 190
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

195 200 205
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

210 215 220
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230
<210> 20
<211> 240
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SITE
<222> (1)..(23)
<223> ALTERNATIVE CARBOXY TERMINUS OF SCFVIG FUSION PROTEINS
<220>

<221> DOMAIN
<222> (24)..(240)
<223> HUMAN IGG1 WILD TYPE CH2 AND CH3 FC
<400> 20
Asp Gln Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro

1 5 10 15
Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

20 25 30
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

35 40 45
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

50 55 60

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

65 70 75 80
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

85 90 95
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

100 105 110
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

115 120 125
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

130 135 140
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

145 150 155 160
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
165 170 175
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

180 185 190
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

195 200 205
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

210 215 220
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230 235 240
<210> 21
<211> 1470
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> MOUSE-HUMAN HYBRID
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(808)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV
<220>

<221> misc_feature
<222> (814)..(1455)
<223> HUMAN EXTRACELLULAR DOMAIN LONG FORM, CD154
<400> 21
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact
tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480

aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt
ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat ccaagaaggt tggacaagat agaagatgaa 840
aggaatcttc atgaagattt tgtattcatg aaaacgatac agagatgcaa cacaggagaa 900
agatccttat ccttactgaa ctgtgaggag attaaaagcc agtttgaagg ctttgtgaag 960
gatataatgt taaacaaaga ggagacgaag aaagaaaaca gctttgaaat gcaaaaaggt 1020
gatcagaatc ctcaaattgc ggcacatgtc ataagtgagg ccagcagtaa aacaacatct 1080
gtgttacagt gggctgaaaa aggatactac accatgagca acaacttggt aaccctggaa 1140
aatgggaaac
agctgaccgt taaaagacaa ggactctatt atatctatgc ccaagtcacc 1200
ttctgttcca atcgggaagc ttcgagtcaa gctccattta tagccagcct ctgcctaaag 1260
tcccccggta gattcgagag aatcttactc agagctgcaa atacccacag ttccgccaaa 1320
ccttgcgggc aacaatccat tcacttggga ggagtatttg aattgcaacc aggtgcttcg 1380
gtgtttgtca atgtgactga tccaagccaa gtgagccatg gcactggctt cacgtccttt 1440
ggcttactca aactcgagtg ataatctaga 1470
<210> 22
<211> 1290
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> MOUSE-HUMAN HYBRID
<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(808)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV
<220>

<221> misc_feature
<222> (814)..(1275)
<223> HUMAN EXTRACELLULAR DOMAIN, SHORT FORM, CD154
<400> 22
aagcttgccg ccatggattt tcaagtgcag attttcagct tcctgctaat cagtgcttca 60
gtcataattg ccagaggaca aattgttctc tcccagtctc cagcaatcct gtctgcatct 120
ccaggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccctggattt atgccccatc caacctggct 240
tctggagtcc ctgctcgctt cagtggcagt gggtctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggctgaaga tgctgccact
tattactgcc agcagtggag ttttaaccca 360
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaagatg gcggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggct tatctacagc agtctggggc tgagctggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggcctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt
ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacaggga ccacggtcac cgtctctgat ccagaaaaca gctttgaaat gcaaaaaggt 840
gatcagaatc ctcaaattgc ggcacatgtc ataagtgagg ccagcagtaa aacaacatct 900
gtgttacagt gggctgaaaa aggatactac accatgagca acaacttggt aaccctggaa 960
aatgggaaac agctgaccgt taaaagacaa ggactctatt atatctatgc ccaagtcacc 1020
ttctgttcca atcgggaagc ttcgagtcaa gctccattta tagccagcct ctgcctaaag 1080
tcccccggta gattcgagag aatcttactc agagctgcaa atacccacag ttccgccaaa 1140

ccttgcgggc

aacaatccat tcacttggga ggagtatttg aattgcaacc aggtgcttcg 1200
gtgtttgtca atgtgactga tccaagccaa gtgagccatg gcactggctt cacgtccttt 1260
ggcttactca aactcgagtg ataatctaga 1290
<210> 23
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE
<400> 23
gtcaagcttg ccgccatgga ttttcaagtg cagatttttc agc 43
<210> 24
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE
<400> 24
gtcgtcgagc tcccacctcc tccagatcca ccaccgcccg agccaccgcc acctttcagc 60
tccagcttgg tccc 74
<210> 25
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE
<400> 25
gctgctgagc tctcaggctt atctacagca agtctgg 37
<210> 26
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE
<400> 26
gttgtctgat cagagacggt gaccgtggtc cc 32
<210> 27
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE
<400> 27
gttgtcggat ccagaaaaca gctttgaaat gcaa 34
<210> 28
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 28
gttgtttcta gattatcact cgagtttgag taagccaaag gacg 44
<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE
<400> 29
gttgtcggat ccaagaaggt tggacaagat agaag 35
<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE
<400> 30
gtctatataa gcagagctct ggc 23
<210> 31
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE
<400> 31
cgaggctgat cagcgagctc tagca 25
<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> OLIGONUCLEOTIDE
<400> 32
ccgcaatttg aggattctga tcacc 25
<210> 33
<211> 482
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN
<220>

<221> SITE
<222> (1)..(266)
<223> MOUSE ANTI-HUMAN CD20 SCFV
<220>

<221> DOMAIN
<222> (268)..(481)
<223> EXTRACELLULAR DOMAIN, LONG FORM, HUMAN CD154
<400> 33

```
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1               5                   10                  15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

        35                  40                  45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

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

65                  70                  75                  80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

                85                  90                  95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

            100                 105                 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

        115                 120                 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser

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

145                 150                 155                 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                165                 170                 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

            180                 185                 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

        195                 200                 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Pro Arg Arg Leu Asp Lys

            260                 265                 270
Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr

        275                 280                 285
Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys

    290                 295                 300
Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys Asp Ile Met Leu

305                 310                 315                 320
Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met Gln Lys Gly
```

```
                325                 330                 335
Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser

            340                 345                 350
Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met

        355                 360                 365
Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val Lys

    370                 375                 380
Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn

385                 390                 395                 400
Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Lys
                405                 410                 415
Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His

            420                 425                 430
Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val

        435                 440                 445
Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro

    450                 455                 460
Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys

465                 470                 475                 480
Leu Glu
<210>  34
<211>  422
<212>  PRT
<213>  Artificial Sequence

<220>
<223>  MOUSE-HUMAN HYBRID FUSION PROTEIN
<220>

<221>  SITE
<222>  (1)..(266)
<223>  MOUSE ANTI-HUMAN SCFV
<220>

<221>  DOMAIN
<222>  (268)..(421)
<223>  EXTRACELLULAR DOMAIN, SHORT FORM, HUMAN CD154
<400>  34
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1               5                   10                  15
Val Ile Ile Ala Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

            20                  25                  30
Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

        35                  40                  45
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

    50                  55                  60
```

```
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

65                  70                  75                  80
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

                85                  90                  95
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

            100                 105                 110
Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

        115                 120                 125
Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser

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

145                 150                 155                 160
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
                165                 170                 175
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile

            180                 185                 190
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

        195                 200                 205
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

    210                 215                 220
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

225                 230                 235                 240
Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
                245                 250                 255
Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Pro Glu Asn Ser Phe Glu

            260                 265                 270
Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser

        275                 280                 285
Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly

    290                 295                 300
Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln

305                 310                 315                 320
Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
                325                 330                 335
Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

            340                 345                 350
Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

        355                 360                 365
Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His

    370                 375                 380
Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
```

385 390 395 400
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
405 410 415
Gly Leu Leu Lys Leu Glu

420
<210> 35
<211> 63
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> N_region
<222> (1)..(63)
<223> PORTION OF HUMAN IGA HINGE DOMAIN CONTAINING ONLY 1 CYSTEINE
<400> 35
ccagttccct caactccacc taccccatct ccctcaactc cacctacccc atctccctca 60
tgc 63
<210> 36
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr

1 5 10 15
Pro Ser Pro Ser Cys

20
<210> 37
<211> 763
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> BCLI SITE FOR FUSION TO AMIN TERMINAL SCFVS
<220>

<221> N_region
<222> (8)..(752)
<223> WILD TYPE IGA HINGE, CH2, CH3 DOMAINS
TRUNCATED TO REMOVE SECRETORY COMPONENT ATTACHMENT
<400> 37
tgatcagcca gttccctcaa ctccacctac cccatctccc tcaactccac ctaccccatc 60
tccctcatgc tgccaccccc gactgtcact gcaccgaccg gccctcgagg acctgctctt 120
aggttcagaa gcgatcctca cgtgcacact gaccggcctg agagatgcct caggtgtcac 180
cttcacctgg acgccctcaa gtgggaagag cgctgttcaa ggaccacctg accgtgacct 240
ctgtggctgc tacagcgtgt ccagtgtcct gccgggctgt gccgagccat ggaaccatgg
300
gaagaccttc acttgcactg ctgcctaccc cgagtccaag accccgctaa ccgccaccct 360
ctcaaaatcc ggaaacacat tccggcccga ggtccacctg ctgccgccgc cgtcggagga 420
gctggccctg aacgagctgg tgacgctgac gtgcctggca cgtggcttca gccccaagga 480
tgtgctggtt cgctggctgc aggggtcaca ggagctgccc cgcgagaagt acctgacttg 540
ggcatcccgg caggagccca gccagggcac caccaccttc gctgtgacca gcatactgcg 600
cgtggcagcc gaggactgga agaaggggga caccttctcc tgcatggtgg gccacgaggc 660

cctgccgctg gccttcacac agaagaccat cgaccgcttg gcgggtaaac

ccacccatgt 720

caatgtgtct gttgtcatgg cggaggtgga ctgataatct aga 763

<210> 38

<211> 250

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (3)..(250)

<223> TRUNCATED FORM, REMOVAL OF LAST THREE AMINO ACIDS THAT MEDIATE ATTACHMENT TO SECRETORY COMPONEN

<400> 38

Asp Gln Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro

1 5 10 15

Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg

20 25 30

Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Ile Leu Thr Cys

35 40 45

Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr

50 55 60

Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Asp Arg Asp Leu

65 70 75 80

Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro

85 90 95

Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser

100 105 110

Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg

115 120 125

Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn

130 135 140

Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp

145 150 155 160

Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys

165 170 175

Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr

180 185 190

Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys

195 200 205

Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala

210 215 220

Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val

225 230 235 240

Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp
245 250