



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월08일
(11) 등록번호 10-2622281
(24) 등록일자 2024년01월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/241 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7029482
- (22) 출원일자(국제) 2016년03월31일
심사청구일자 2021년03월25일
- (85) 번역문제출일자 2017년10월13일
- (65) 공개번호 10-2017-0127021
- (43) 공개일자 2017년11월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/057021
- (87) 국제공개번호 WO 2016/156465
국제공개일자 2016년10월06일
- (30) 우선권주장
15162112.5 2015년03월31일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2008539772 A*
JP2006524036 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

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

전체 청구항 수 : 총 7 항

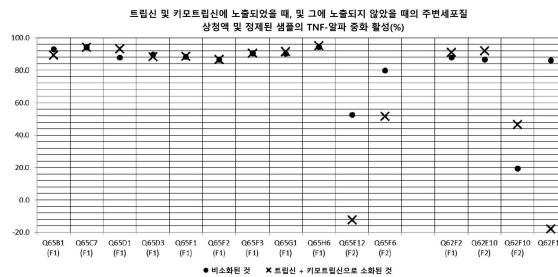
심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 폴리펩티드

(57) 요약

특히, TNF-알파에 결합하는 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, 여기서, 면역글로불린 쇠 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역 (FR1-FR4)을 포함하고, 여기서, CDR1-CDR3 및 FR1-FR4는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 것인 폴리펩티드를 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/542 (2013.01)
C07K 2317/22 (2013.01)
C07K 2317/30 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/54 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/90 (2013.01)

(72) 발명자

로버츠, 케빈

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

칼튼, 팀

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

마조레, 루아나

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

큐빗, 매리언

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

레이, 키스

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

명세서

청구범위

청구항 1

TNF-알파에 결합하는 면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, 여기서 면역글로불린쇄 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역 (FR1-FR4)을 포함하되, 상기 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호 1이고, CDR2의 아미노산 서열은 서열번호 2이고, CDR3의 서열은 서열번호 3인, 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 폴리펩티드가 VHH인, 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 따른 적어도 하나의 면역글로불린쇄 가변 도메인 및 적어도 하나의 상이한 면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 구축물 (construct)로서, 상기 상이한 면역글로불린쇄 가변 도메인이 TNF-알파 이외의 표적에 결합하는, 구축물.

청구항 5

제4항에 있어서, 적어도 하나의 상이한 면역글로불린쇄 가변 도메인이 IL-23에 결합하는, 구축물.

청구항 6

제4항에 있어서, 적어도 하나의 상이한 면역글로불린쇄 가변 도메인이 IL-7R에 결합하는, 구축물.

청구항 7

제4항에 있어서, 적어도 하나의 상이한 면역글로불린쇄 가변 도메인이 IL-6R에 결합하는, 구축물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

- 청구항 14
- 삭제
- 청구항 15
- 삭제
- 청구항 16
- 삭제
- 청구항 17
- 삭제
- 청구항 18
- 삭제
- 청구항 19
- 삭제
- 청구항 20
- 삭제
- 청구항 21
- 삭제
- 청구항 22
- 삭제
- 청구항 23
- 삭제
- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

- 청구항 110
삭제
- 청구항 111
삭제
- 청구항 112
삭제
- 청구항 113
삭제
- 청구항 114
삭제
- 청구항 115
삭제
- 청구항 116
삭제
- 청구항 117
삭제
- 청구항 118
삭제
- 청구항 119
삭제
- 청구항 120
삭제
- 청구항 121
삭제
- 청구항 122
삭제
- 청구항 123
삭제
- 청구항 124
삭제
- 청구항 125
삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 종양 괴사 인자-알파 ('TNF-알파,' 'TNF- α ' 또는 'TNF')에 결합하는 면역글로불린쇄 가변 도메인 (또는 '가변 도메인')을 포함하는 폴리펩티드 뿐만 아니라, 상기 폴리펩티드를 포함하는 구축물 (construct) 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산, 상기 폴리펩티드를 제조하는 방법, 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 cDNA 및 벡터, 상기 폴리펩티드를 발현하거나, 또는 발현할 수 있는 숙주 세포, 상기 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종양 괴사 인자-알파는 가용성 형태 및 막 결합 형태, 둘 모두로 존재하는 전신 염증에 관여하는 동형 삼량체의 염증 유발성 시토카인이다. TNF-알파는 주로 단핵구 및 대식세포에 의해 분비되지만, 이는 또한 종양 세포주 뿐만 아니라, CD4+ 및 CD8+ 말초 혈액 T 림프구 및 일부 배양된 T 및 B 세포주에 의해서도 분비된다. TNF-알파는 염증성 질환, 자가면역 질환, 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염, 악성 종양, 및/또는 신경퇴행성 질환에 연루되어 왔고, 이는 자가면역/자가염증성 질환, 예컨대, 류마티스 관절염 및 크론병에서 특정 생물학적 요법을 위한 표적이 된다.

[0003] 크론 증후군 및 국한성 장염으로도 알려져 있는 크론병은 매우 다양한 증상을 유발하는 염증성 장 질환의 한 유형이다. 이는 주로 복통, 설사, 구토 및/또는 체중 감소를 유발하지만, 이는 또한 위장관 (GIT) 바깥쪽의 합병증, 예컨대, 빈혈, 피부 발진, 관절염, 눈 염증, 피로, 및 집중력 부족을 유발할 수도 있다 (문헌 [Baumgart et al., 2012 *The Lancet* 380(9853):1590-605], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 크론병은 현재, 종래 요법으로는 제어하기가 어려운 치유할 수 없는 평생의 위장 질환이다. 크론병은 하기의 '자가면역 질환'하에서 더욱 상세하게 논의된다.

[0004] TNF-알파에 대하여 충분한 특이성을 가지는 TNF-알파 억제제는, TNF-알파가 관찰된 병상을 유도하는 중요한 시토카인으로서 연루되어 왔던 질환, 예컨대, 크론병을 예방 또는 치료하는 데 효과적인 예방학적 또는 치료학적

제약이 될 수 있다.

- [0005] 항체 기반 치료제는 그의 표적에 대한 특이성은 높고, 고유의 독성은 낮기 때문에, 이는 자가면역 질환에 효과적인 치료법으로서 상당한 잠재능을 가지고 있다. TNF-알파에 결합하는 항체의 투여에 의해 자가면역 질환을 치료하는 방법이 기술되었다 (문헌 [Kamm et al., 2011 *Inflamm Bowel Dis* 17:2366-91, 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다]).
- [0006] 3종의 항-TNF-알파 항체, 인플릭시맵 (상표명 레미케이드(Remicade)), 아달리무맵 (상표명 휴미라(Humira)) 및 세르톨리주맵 (또는 '세르톨리주맵 페골,' 둘모두 상표명 심지아(Cimzia))이 크론병 치료용으로 임상적으로 사용되고 있지만; 이들 항체는 그의 고유한 불안정성 및 소화계에 의한 단백질 분해성 분해, 장관의 병상 부위에 존재하는 염증성 프로테아제, 및 장내 미생물군에 기인하여, 일반적으로는 경구용 치료제로서 투여하기에는 부적합한 것으로 간주되고 있다. 그러므로, 상기 작용제는 피하 시린지 또는 니들을 정확하고 안전하게 사용하기 위하여 전문가 훈련을 필요로 하는 정맥내 주입 또는 피하 주사에 의해 투여되어야 한다. 상기 작용제는 또한 멸균 장비, 치료학적 폴리펩티드의 액체 제제, 상기 폴리펩티드의 멸균 및 안정적인 형태의 바이알 패키징, 및 니들 유입에 적합한 대상체의 부위를 필요로 한다. 대상체는 보편적으로 주사를 맞기 전 심리적 스트레스 및 주사를 맞는 동안에는 통증을 경험하게 된다. 이러한 전신 항-TNF-알파 항체를 이용한 장기간의 치료는 중증 감염 및 암의 위험 부담은 증가하게 된다. 높은 생산 비용과 함께, 이들 인자들로 인해, 현재 중증도가 더 높은 질환을 앓는 환자에게 상기 작용제를 사용하는 것은 제한되고 있다.
- [0007] 수개의 소형 분자 항-염증성 및 면역억제성 약물 또한 현재 크론병용으로 임상 개발 중에 있다 (문헌 [Danese 2012 장관 61:918-932] 및 [Shealy et al., 2010 *mAbs* 2:428-439], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 비록 이들 약물이 경구적으로 투여되기는 하지만, 다수는 투여 이후에 전신으로 흡수될 것이며, 따라서, 위장관 병변에 대한 작용과는 관련이 없는 전신 면역억제성 작용을 가질 수 있다. 추가로, 소형 분자는 항체의 특이성이 부족하기 때문에, 유의적인 표적에서 벗어난 부작용을 일으킬 수 있는 위험은 여전히 높다.
- [0008] 크론병은 주로 위장관 질환이다. TNF-알파 생산은 점막 및 점막하 조직 내에 존재하는 세포로 국재화되어 있고, 이는 장관 벽 내에서의 만성 염증성 프로세스 및 질환 면역병상의 발생을 담당하는 추가의 염증성 세포의 동원을 유도한다 (문헌 [van Deventer 1999 *Ann Rheum Dis* 58(Suppl 1):I114-I120]). 전신 노출 감소에 기인한 안전성의 유의적인 개선과 함께 조합된, TNF-알파에 대하여 높은 특이성을 가지되, 노출 및 활성은 장관으로 제한되는, 경구용 치료제를 전달할 수 있는 능력이 주사용 항-TNF-알파 항체와 유사한 효능을 제공할 수 있다.
- [0009] WO 2004/041862, WO 2006/122786 및 문헌 [Coppeters et al., 2006 *Arthritis & Rheumatism* 54(6):1856-1866] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에는 TNF-알파에 대한 단일 도메인 항체 및 관련된 측면이 개시되어 있다. WO 2006/122786에서 "TNF1," "PMP1C2" 또는 "서열번호 52"로 지칭되는 상기 서열은 하기에서 추가로 특징화된다.
- [0010] 적어도 일부 실시양태에서 본 발명의 폴리펩티드는 선행 기술의 항-TNF-알파 물질과 비교하였을 때, 하기 이점들 중 하나 이상의 것을 가질 수 있다:
- [0011] (i) TNF-알파에 대한 친화도 증가;
- [0012] (ii) TNF-알파에 대한 특이성 증가;
- [0013] (iii) TNF-알파에 대한 중화 능력 증가;
- [0014] (iv) 상이한 종, 예컨대, 인간 및 시노몰구스 원숭이로부터의 TNF-알파와의 교차 반응성 증가;
- [0015] (v) 가용성 형태의 TNF-알파 및 막 형태의 TNF-알파, 둘 모두와의 교차 반응성 증가;
- [0016] (vi) 예를 들어, 마우스, 시노몰구스 원숭이 또는 인간에게 투여되었을 때, 면역원성 감소;
- [0017] (vii) 프로테아제의 존재하에서의, 예를 들어, (a) 소장 및/또는 대장에서 발견되는 프로테아제 및/또는 IBD 염증성 프로테아제, 예를 들어, 트립신, 키모트립신, MMP3, MMP10, MMP12, 다른 MMP 및 카텡신의 존재하에서의, 및/또는 (b) 소장 및/또는 대장에서 발견되는 미생물 세포의 용해에 의해 활발히 분비 및/또는 방출되는, 장관 공생 미생물군 및/또는 병원성 박테리아로부터의 프로테아제의 존재하에서의 안정성 증가;
- [0018] (viii) 생산 동안 프로테아제 분해에 대한 안정성 (예를 들어, 효모 프로테아제에 대한 내성) 증가;
- [0019] (ix) 경구 투여에의 적합성 증가;

- [0020] (x) 경구 투여 후 장관 및 점막 고유층으로의 국소 전달에의 적합성 증가;
- [0021] (xi) 이중성 숙주, 예컨대, 박테리아, 예컨대, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 또는 아스페르길루스(*Aspergillus*) 속, 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속, 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 속, 한세놀라(*Hansenula*) 속 또는 피치아(*Pichia*) 속에 속하는 효모, 예컨대, 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서의 발현에의 적합성 증가;
- [0022] (xii) 제약에서의 사용을 위한 적합성, 및 제약에서의 사용을 위한 개선된 특성;
- [0023] (xiii) 기능성 식품에서의 사용을 위한 적합성, 및 기능성 식품에서의 사용을 위한 개선된 특성;
- [0024] (xiv) 조직 침투, 예컨대, 점막하 점막 고유층에 접근하기 위한 염증이 생긴 결장 점막 상피 및 점막하 조직의 침투 개선;
- [0025] (xv) (a) 냉동 및 해동 이후 및/또는 (b) 예를 들어, 37 또는 50°C에서 동결건조된, 액체/크립 포맷으로 장기간의 보관 이후에도 실질적으로 활성을 띠는 상태 그대로 유지;
- [0026] (xvi) 예를 들어, 인간 면역글로불린에의 서열 유사성 증가에 기인한 인간에서의 면역원성 감소;
- [0027] (xvii) 다중특이적 포맷으로 포맷화하는 데에서의 적합성 증가;
- [0028] (xviii) 신규한 에피토프에의 결합.
- [0029] 상기 이점 (i) 내지 (xviii)은 잠재적으로는 1가 포맷으로 또는 다가 포맷, 예컨대, 비헤드(bihead) 포맷 (예를 들어, 동종비헤드(homobihead) 또는 이종비헤드(heterobihead) 포맷)의 본 발명의 폴리펩티드에 의해 실현될 수 있다.

발명의 내용

- [0030] 본 발명자들은 놀랍게도 유익한, TNF-알파에 결합하는 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제조하였다. 특히, 본 폴리펩티드는 놀랍게도 높은 효능으로부터 이익을 얻는다. 이는 또한 가용성 형태의 TNF-알파 및 막 형태의 TNF-알파, 둘 모두를 중화시키고, 시노물구스 원숭이 TNF-알파와 교차 반응할 수 있으며, 소장 및 대장의 트립신, 키모트립신 및/또는 프로테아제에의 노출시에도 안정한 상태 그대로 유지된다. 한 실시양태에서, 본 폴리펩티드는 조작에 의해 추가로 증진되었다. 상기의 추가로 증진된 폴리펩티드는 상기 이점들로부터 이익을 얻고, 장관을 통과하는 동안 그의 TNF-알파-중화 활성을 유지하고, 장관의 프로테아제, 예를 들어, 다중의 포유동물 중 (설치류, 돼지, 비-인간 영장류 및 인간)으로부터의 소화성, 염증성 및 미생물 프로테아제에 의한 분해 및/또는 불활성화에 대하여 저항성을 띤다.
- [0031] 이들 폴리펩티드는 자가면역 및/또는 염증성 질환, 예컨대, 염증성 장 질환 (예를 들어, 크론병 또는 궤양성 대장염)의 예방 또는 치료에서, 또는 점막염 치료에서 특히, 경구적으로 투여되었을 때에 특정 유용성을 가진다고 기대할 수 있다.
- [0032] 본 발명은 TNF-알파에 결합하는 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, 여기서, 면역글로불린 쇠 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역 (FR1-FR4)을 포함하고, 여기서, CDR1은 서열번호 1과 60% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하고, CDR2는 서열번호 2와 50% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하고, (a) CDR3은 서열번호 3과 80% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 (b) CDR3은 서열번호 3과 50% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하고, 여기서, 서열번호 3의 잔기 번호 3번에 상응하는 CDR3의 잔기가 R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y 또는 V인 것인 폴리펩티드를 제공한다.
- [0033] TNF-알파에 결합하는 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, 여기서, 면역글로불린 쇠 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역 (FR1-FR4)을 포함하고, 여기서, CDR1은 서열번호 15와 60% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하고, CDR2는 서열번호 16과 50% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하고, CDR3은 서열번호 17과 50% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드 또한 제공한다.
- [0034] TNF-알파에 결합하는 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, 여기서, 면역글로불린 쇠 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역 (FR1-FR4)을 포함하고, 여기서, CDR1은 서열번호 15와 60% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하고, CDR3은 서열번호 3과 80% 이상의 서열

동일성을 공유하는 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드 또한 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0035]

- 도 1 - 트립신 및 키모트립신에 노출되었을 때, 및 그에 노출되지 않았을 때의 주변세포질 상청액 및 정제된 샘플의 TNF-알파 중화 활성(%).
- 도 2a - HEK-Nf-κB-SEAP 리포터 검정법에서의 Q65B1, Q65C7, Q62E10 및 아달리무맙에 의한 hs-TNF-알파 중화.
- 도 2b - Q65B1 및 Q65D3에 의한 hs-TNF-알파 중화.
- 도 3 - 마우스 소장 및 인간 대변 소화물 중의 면역글로불린 쇠 가변 도메인.
- 도 4a - ID32F, ID34F, Q65B1 및 인플릭시맙에 의한 hs-TNF-알파 중화 (제1 실험).
- 도 4b - ID32F, ID34F 및 Q65B1에 의한 hs-TNF-알파 중화 (제2 실험).
- 도 4c - ID37F, ID38F 및 레미케이드에 의한 hs-TNF-알파 중화 (제2 실험).
- 도 5a - IBD 프로테아제에서의 ID34F 및 ID25F의 안정성.
- 도 5b - IBD 프로테아제에서의 에타네르셉트 및 아달리무맙의 안정성.
- 도 5c - IBD 프로테아제에서의 인플릭시맙의 안정성.
- 도 6 - 선행 기술의 항-TNF-알파 폴리펩티드에 의한 h-TNF-알파의 중화.
- 도 7 - 시노물구스 원숭이 위장관 절편에서의 관강내 [항-TNF ICVD] 산술치.
- 도 8 - 시노물구스 원숭이 위장관으로부터의 항-TNF ICVD의 전체 회수율(%).
- 도 9 - 휴미라 경쟁 ELISA OD450 데이터.
- 도 10 - 폴링된 시노물구스 원숭이 대변 중의 항-TNF ICVD 농도.
- 도 11 - 폴링된 시노물구스 원숭이 대변으로부터 회수된 항-TNF ICVD의 산술치.

서열의 설명

- 서열번호 1 - ID38F CDR1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 2 - ID38F CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 3 - ID38F CDR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 4 - ID38F FR1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 5 - ID38F FR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 6 - ID38F FR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 7 - ID38F FR4의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 8 - ID38F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 9 - 가용성 인간 TNF-알파 (단량체)의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 10 - 막 결합 인간 TNF-알파 (단량체)의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 11 - 가용성 시노물구스 원숭이 TNF-알파 (단량체)의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 12 - 막 결합 시노물구스 원숭이 TNF-알파 (단량체)의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 13 - 가용성 마우스 TNF-알파 (단량체)의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 14 - 막 결합 마우스 TNF-알파 (단량체)의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 15 - Q62E10 CDR1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 16 - Q62E10 CDR2의 폴리펩티드 서열.

- 서열번호 17 - Q62E10 CDR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 18 - Q62E10 FR1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 19 - Q62E10 FR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 20 - Q62E10 FR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 21 - Q62E10 FR4의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 22 - Q62E10의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 23 - Q65F2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 24 - Q65F3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 25 - Q62F2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 26 - Q65G1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 27 - Q65H6의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 28 - Q65F1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 29 - Q65D1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 30 - Q65C7의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 31 - Q65D3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 32 - Q65B1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 33 - Q65F6의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 34 - Q65F11의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 35 - Q65E12의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 36 - Q65C12의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 37 - Q65A6의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 38 - Q65A3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 39 - Q62F10의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 40 - Q62F11의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 41 - ID7F-EV의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 42 - ID8F-EV의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 43 - ID9F-EV의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 44 - ID13F-EV의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 45 - ID14F-EV의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 46 - ID15F-EV의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 47 - ID22F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 48 - ID23F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 49 - ID24F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 50 - ID25F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 51 - ID26F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 52 - ID27F의 폴리펩티드 서열.

- 서열번호 53 - ID28F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 54 - ID29F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 55 - Q62E10-DVQLV의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 56 - ID34F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 57 - ID37F의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 58 - Spe 부위를 포함하는 3' 프라이머의 폴리뉴클레오티드 서열.
- 서열번호 59 - Q65F1 CDR1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 60 - Q65D1 CDR1의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 61 - ID27F CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 62 - ID28F CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 63 - Q65F2 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 64 - Q65F3 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 65 - Q62F2 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 66 - Q65F1 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 67 - Q65D1 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 68 - Q65D3 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 69 - Q65B1 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 70 - Q65F2 CDR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 71 - Q65F1 CDR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 72 - Q65D3 CDR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 73 - Q65F6 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 74 - Q65F11 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 75 - Q65C12 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 76 - Q65A6 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 77 - Q65A3 CDR2의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 78 - Q65F6 CDR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 79 - Q65F11 CDR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 80 - Q62F10 CDR3의 폴리펩티드 서열.
- 서열번호 81 - M13.rev의 폴리뉴클레오티드 서열.
- 서열번호 82 - M13.fw의 폴리뉴클레오티드 서열.
- 서열번호 83 - 효모 발현을 위해 코돈 최적화된 ID38F의 폴리뉴클레오티드 코딩 서열.
- 서열번호 84 - 효모 발현을 위해 코돈 최적화된 Q62E10의 폴리뉴클레오티드 코딩 서열.
- 서열번호 85 - 이. 콜라이 발현을 위해 코돈 최적화된 ID38F의 폴리뉴클레오티드 코딩 서열.
- 서열번호 86 - 이. 콜라이 발현을 위해 코돈 최적화된 Q62E10의 폴리뉴클레오티드 코딩 서열.
- 서열번호 87 - 이. 콜라이 발현을 위한 ID38F 오픈 리딩 프레임으로 구성된 폴리뉴클레오티드 (Pe1B 리더에서 부터 c-myc-6His 태그 2x 정지 코돈까지).

서열번호 88 - 이. 콜라이 발현을 위한 ID38F 오픈 리딩 프레임으로 구성된 폴리뉴클레오티드 (PelB 리더에서부터 Flag-6His 태그 2x정지 코돈까지).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] **VH 및 VHH를 포함하는 항체 및 항체 단편을 포함하는 폴리펩티드**

[0037] 통상의 항체 또는 면역글로불린 (Ig)은 4개의 폴리펩티드 쇠: 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 단백질이다. 각 쇠는 불변 영역 및 가변 도메인으로 나뉜다. 중쇄 가변 도메인은 본원에서 VHC로 약칭되고, 경쇄 (L) 가변 도메인은 본원에서 VLC로 약칭된다. 상기 도메인, 그와 관련된 도메인 및 그로부터 유래된 도메인은 본원에서 면역글로불린 쇠 가변 도메인으로 지칭된다. VHC 및 VLC 도메인은, 더욱 보존성이 큰 영역인 "프레임워크 영역" ("FR")으로 명명되는 영역 사이에 산재되어 있는, 초가변 영역인 "상보성 결정 영역" ("CDR")으로 명명되는 영역으로 추가로 다시 나뉘어질 수 있다. 프레임워크 영역 및 상보성 결정 영역은 정확하게 정의되었다 (문헌 [Kabat et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication Number 91-3242], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 통상의 항체에서, 각 VHC 및 VLC는 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 하기 순서로: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 배열되어 있는, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 2개의 면역글로불린 중쇄 및 2개의 면역글로불린경쇄로 이루어진 통상의 항체 사량체가 형성되고, 면역글로불린 중쇄 및 경쇄는 예컨대, 디설피드 결합에 의해 서로 연결되고, 중쇄 유사부가 연결된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, CL로 구성된다. 중쇄의 가변 도메인 및 경쇄의 가변 도메인은 항원과 상호작용하는 결합 도메인이다. 항체의 불변 영역은 전형적으로 면역계의 각종 세포 (예컨대, 이펙터 세포) 및 고전적 보체계의 제1 성분 (C1q)를 비롯한 숙주 조직 또는 인자에의 항체의 결합을 매개한다. 항체라는 용어는 IgA형, IgG형, IgE형, IgD형, IgM형 (뿐만 아니라, 그의 서브유형)을 포함하고, 여기서, 면역글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다 유형일 수 있다. 2개의 동일한 중쇄 (H) 및 2개의 동일한 경쇄 (L) 폴리펩티드로부터 어셈블리된 면역글로불린-감마 (IgG) 항체의 전체 구조는 잘 확립되어 있고, 포유동물에서 고도로 보존된다 (문헌 [Padlan 1994 Mol 면역l 31:169-217]).

[0038] 통상의 항체 구조에 대한 예외는 낙타과의 혈청에서 발견된다. 통상의 항체 이외에도, 상기 혈청은 특별한 IgG 항체를 가진다. 중쇄 항체 (HCAb)로 알려져 있는 상기 IgG 항체에는 L 쇠 폴리펩티드가 없고, 제1 불변 도메인 (CH1)이 없다. 그의 N 말단 영역에서, 동종 이량체 단백질의 H 쇠는 VHH로 지칭되는, 전용 면역글로불린 쇠 가변 도메인을 함유하는데, 이는 그의 동족 항원과 회합하는 역할을 한다 (문헌 [Muyldermans 2013 Annu Rev Biochem 82:775-797], [Hamers-Casterman et al., 1993 Nature 363(6428):446-448], [Muyldermans et al., 1994 Protein Eng 7(9):1129-1135], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다).

[0039] 본원에서 사용되는 바, 항원 결합 단편 (또는 "항체 단편" 또는 "면역글로불린 단편")이란, TNF-알파에 특이적으로 결합하는 항체의 일부분 (하나 이상의 면역글로불린 쇠가 전장의 것은 아니지만, TNF-알파에 특이적으로 결합하는 것인 분자)을 지칭한다. 항원 결합 단편이라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예로는

[0040] (i) Fab 단편 (VLC, VHC, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편);

[0041] (ii) F(ab')₂ 단편 (힌지 영역에서 디설피드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편);

[0042] (iii) (VHC 및 CH1 도메인으로 구성된) Fd 단편;

[0043] (iv) (항체의 단일 아암의 VLC 및 VHC 도메인으로 구성된) Fv 단편;

[0044] (v) (재조합 방법을 사용하여, VLC 및 VHC 영역이 쌍을 형성하여 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 쇠로서 제조될 수 있도록 하는 합성 링커에 의해 연결된 VLC 및 VHC 도메인으로 구성된) scFv 단편;

[0045] (vi) VH (VHC 도메인으로 구성된 면역글로불린 쇠 가변 도메인) (문헌 [Ward et al., Nature 1989 341:544-546]);

[0046] (vii) VL (VLC 도메인으로 구성된 면역글로불린 쇠 가변 도메인);

[0047] (viii) V-NAR (연골어강 IgNAR로부터의 VHC 도메인으로 구성된 면역글로불린 쇠 가변 도메인) (문헌 [Roux et al., 1998 Proc Natl Acad Sci USA 95:11804-11809] 및 [Griffiths et al., 2013 Antibodies 2:66-81], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)

- [0048] (ix) VHH를 포함한다.
- [0049] VHH 또는 VH 중 아미노산 잔기의 총 개수는 약 110-130개일 수 있고, 적합하게, 112-120개이고, 가장 적합하게, 115개이다.
- [0050] 본 발명의 면역글로불린쇄 가변 도메인은 예를 들어, 핵산 합성을 위한 기법을 사용하여 면역글로불린쇄 가변 도메인을 코딩하는 핵산을 제조한 후, 상기와 같이 수득된 핵산을 발현시킴으로써 수득될 수 있다. 구체적인 실시양태에 따라, 본 발명의 면역글로불린쇄 가변 도메인은 예컨대, 자연적으로 발생된 항체의 VH 또는 VHH과 같은 자연적으로 발생된 폴리펩티드의 아미노산 서열과 정확하게 동일한 (즉, 그와 100%의 서열 동일성을 공유하는) 아미노산 서열을 가지는 것은 아니다.
- [0051] 본원에서 제공하는 예는 TNF-알파에 결합하는 면역글로불린쇄 가변 도메인 그 자체에 관한 것이다. 그러나, 본원에 개시된 본 발명의 원리가 TNF-알파에 결합하는 면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드, 예컨대, 항체 및 항체 단편에 동등하게 적용가능하다. 예를 들어, 본원에 개시된 항-TNF-알파 면역글로불린쇄 가변 도메인은 폴리펩티드, 예컨대, 전장의 항체 내로 도입될 수 있다. 상기 접근법은, 이량체 구조물로서 발현된, (히지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하는) 인간 Fc 영역과의 융합물로서 조작된 항-HIV VHH를 제공하는 맥코이(McCoy) (문헌 [McCoy et al., *Retrovirology* 2014, 11:83])에 의해 입증된다.
- [0052] 비인간 면역글로불린 가변 도메인의 프레임워크 영역 중의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 인간 가변 도메인으로부터의 상응하는 잔기로 치환하는 것이 인간화이다. 가변 도메인의 인간화가 인간에서의 면역원성을 감소시킬 수 있다.
- [0053] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 면역글로불린쇄 가변 도메인으로 구성된다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 항체 또는 항체 단편이다. 적합하게, 항체 단편은 VHH, VH, VL, V-NAR, Fab 단편, VL 또는 F(ab')₂ 단편 (예컨대, VHH 또는 VH, 가장 적합하게, VHH)이다.
- [0054] **특이성, 친화도, 결합활성 및 교차 반응성**
- [0055] 특이성이란, 특정 항원 결합 폴리펩티드의 결합 대상이 될 수 있는 상이한 유형의 항원 또는 항원 결정기의 개수를 지칭한다. 항원 결합 폴리펩티드의 특이성은 특정 항원을 독특한 분자 엔티티로서 인식하고, 그를 다른 것과 구별할 수 있는 능력이다.
- [0056] 항원 결합 폴리펩티드와 항원의 해리에 대한 평형 상수 (Kd)로 표현되는 친화도는 항원 결합 폴리펩티드 상의 항원 결합 부위와 항원 결정기 사이의 결합 강도의 척도이며: Kd 값이 작을수록, 항원 결합 폴리펩티드와 항원 결정기 사이의 결합 강도는 더 강하다 (대안적으로, 친화도는 또한 1/Kd인 친화도 상수 (Ka)로 표시될 수 있다). 친화도는 관심의 대상이 되는 특정 항원에 의존하여 공지 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0057] 결합활성은 항원 결합 폴리펩티드와 관련 항원 사이의 결합 강도의 척도이다. 결합활성은 항원 결정기와, 항원 결합 폴리펩티드 상의 그의 항원 결합 부위 사이의 친화도, 및 항원 결합 폴리펩티드 상에 존재하는 관련 결합 부위의 개수, 둘 모두에 관한 것이다.
- [0058] 적합하게, 본 발명의 항원 결합 폴리펩티드는 10^{-6} 내지 10^{-12} M, 더욱 적합하게, 10^{-7} to 10^{-12} M, 더욱 적합하게, 10^{-8} 내지 10^{-12} M 및 더욱 적합하게, 10^{-9} 내지 10^{-12} M의 해리 상수 (Kd)로 결합하게 될 것이다.
- [0059] 10^{-6} 미만인 임의의 Kd 값은 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 항원 결합 폴리펩티드의 항원 또는 항원 결정기에의 특이적 결합은 예를 들어, 스캐차드 (Scatchard) 분석 및/또는 경쟁적 결합 검정법, 예컨대, 방사성 면역검정법 (RIA), 효소 면역검정법 (EIA) 및 샌드위치 경쟁 검정법, 및 당업계에서 공지된, 그의 다른 변형법을 비롯한, 임의의 적합한 공지된 방식으로 측정될 수 있다.
- [0060] 항-TNF-알파 폴리펩티드, TNF-알파와 상호작용하는 폴리펩티드, 또는 TNF-알파에 대한 폴리펩티드는 모두 TNF-알파에 결합하는 효과적인 폴리펩티드이다. 본 발명의 폴리펩티드는 TNF-알파 상의 선형 또는 입체형태의 에피토프에 결합할 수 있다. "TNF-알파에 결합한다"라는 용어는 삼량체 TNF-알파와의 결합, TNF-알파의 단량체와의 결합 및/또는 TNF-알파의 단량체의 일부와의 결합을 의미한다.
- [0061] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 가용성 TNF-알파 및 막 TNF-알파, 둘 모두에 결합할 것이다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 인간 TNF-알파에 결합할 것이다. 더욱 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 인간, 및 개코 원숭이 TNF-알파, 마모셋 TNF-알파, 시노물구스 TNF-알파 및 레수스 TNF-알파로 구성된 군으로부터 선택되는 적

어도 하나의 추가의 영장류 TNF-알파, 둘 모두에 결합할 것이다. 가장 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 인간 및 시노몰구스 TNF-알파, 둘 모두에 결합한다.

[0062] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 가용성 TNF-알파 및 막 TNF-알파, 둘 모두 중화시킬 것이다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 인간 TNF-알파를 중화시킬 것이다. 더욱 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 인간, 및 개 코원숭이 TNF-알파, 마모셋 TNF-알파, 시노몰구스 TNF-알파 및 레수스 TNF-알파로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 추가의 영장류 TNF-알파, 둘 모두를 중화시킬 것이다. 가장 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 인간 및 시노몰구스 TNF-알파, 둘 모두를 중화시킨다.

[0063] 적합하게, TNF-알파는 서열번호 9를 포함하는 폴리펩티드이고, 더욱 적합하게, TNF-알파는 서열번호 9로 구성된 폴리펩티드이다. 적합하게, TNF-알파는 서열번호 10을 포함하는 폴리펩티드이고, 더욱 적합하게, TNF-알파는 서열번호 10으로 구성된 폴리펩티드이다. 적합하게, TNF-알파는 서열번호 11을 포함하는 폴리펩티드이고, 더욱 적합하게, TNF-알파는 서열번호 11로 구성된 폴리펩티드이다. 적합하게, TNF-알파는 서열번호 12를 포함하는 폴리펩티드이고, 더욱 적합하게, TNF-알파는 서열번호 12로 구성된 폴리펩티드이다.

[0064] 인간으로부터의 TNF-알파 및 또 다른 종으로부터의 TNF-알파와, 예컨대, 시노몰구스 원숭이 TNF-알파와 반응할 수 있는 ("교차 반응"할 수 있는) 폴리펩티드는 임상전 연구가 동물 모델에서 더욱 쉽게 수행될 수 있도록 허용하기 때문에 이롭다.

[0065] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 TNF-알파 삼량체의 수용체 결합 부위(들)에 있고/거나, 그의 일부를 형성하는 TNF-알파 상의 (및 특히, TNF-알파 삼량체의) 에피토프에 대한 것이며, 이로써, 상기 본 발명의 폴리펩티드는 TNF-알파 삼량체에의 결합시, 상기 TNF-알파 삼량체에 의해 매개되는 TNF-알파 수용체 가교결합, 및/또는 상기 수용체 가교결합에 의해 매개되는 신호 전달을 억제 또는 감소시킬 수 있다.

[0066] 본 발명의 폴리펩티드는 TNF-알파 삼량체 상의 하나 이상의 에피토프(들)에 결합한다. 본 발명의 한 측면에서, Q65F2, Q65F3, Q62F2, Q65G1, Q65H6, Q65F1, Q65D1, Q65C7, Q65D3, Q65B1, Q65F6, Q65F11, Q65E12, Q65C12, Q65A6, Q65A3, Q62E10, Q62F10, ID7F-EV, ID8F-EV, ID9F-EV, ID13F-EV, ID14F-EV, ID15F-EV, ID22F, ID23F, ID24F, ID25F, ID26F, ID27F, ID28F, ID29F, ID34F, ID37F 또는 ID38F와 동일한, TNF-알파 삼량체 상의 에피토프에 결합하는 폴리펩티드를 제공한다.

[0067] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 단리된 것이다. "단리된" 폴리펩티드는 그의 원래의 환경으로부터 제거된 것이다. 예를 들어, 자연적으로 발생된 본 발명의 폴리펩티드가 자연계에서 공존 물질 중 일부 또는 그 모두로부터 분리되었다면, 이는 단리된 것이다.

[0068] **효력, 억제 및 중화**

[0069] 효력은 주어진 강도의 효과를 일으키는 데 필요한 양으로 표현되는 치료제의 활성 척도이다. 저농도에서 더 작은 반응을 일으키는 더 낮은 효력의 작용제와 비교하였을 때, 고도로 강력한 작용제는 저농도에서 더 큰 반응을 일으킨다. 효력은 친화도 및 효능의 함수이다. 효능이란, 표적 리간드와의 결합시 생물학적 반응을 일으킬 수 있는 치료제의 능력 및 상기 반응의 정량적 크기를 지칭한다. 반수 최대 유효 농도 (EC50)라는 용어는 지정된 노출 시간 후, 기준선과 최대 사이의 중간의 반응을 일으키는 치료제 농도를 지칭한다. 치료제는 억제 또는 자극을 유발할 수 있다. 이는 일반적으로 효력의 척도로 사용되며, 본원에서 사용된다.

[0070] 본 발명의 목적을 위한 중화 폴리펩티드는 ELISA에 의해 측정되는 바, TNF-알파에 결합하여, TNF-알파의, 그의 동족 수용체 (예컨대, TNFR1, TNFR2) 중 하나 또는 그 둘 모두와의 결합을 억제시키는 폴리펩티드이다. 대안적으로, 또는 추가로, 본 발명의 목적을 위한 중화 폴리펩티드는 예를 들어, TNF-알파의 생물학적 효과를 억제시킴으로써 TNF-알파의 효과로부터 세포를 방어하는 폴리펩티드이다. 통상, 항-TNF-알파 치료학적 항체 생성물은 중화 검정법과 같이 세포 사멸 종점과 함께 L929 뮤린 세포주를 사용하였다 (문헌 [Humphreys and Wilson 1999 *Cytokine* 11(10):773-782]). L929 뮤린 세포주를 사용하는 상기 목적의 방법은 하기를 포함한다:

[0071] 고정 농도 L929 검정법 - 고정-농도 L929 검정법은 (실시에 섹션의 파트 2.2.3에서 상세하게 설명되는 바와 같이) 예컨대, 주변세포질 추출물 내에 함유되어 있는 고정 농도의 폴리펩티드가 TNF-알파 세포독성의 효과를 중화시킬 수 있는 능력을 비교적 빠르게 나타내는 데 사용될 수 있다.

[0072] 일반 L929 검정법 - 공지된 농도의 항-TNF-알파 폴리펩티드를 사용하는 일반 L929 검정법은 실시에 섹션의 파트 3.2 내지 3.2.3에서 상세하게 설명되는 바와 같이) 항-TNF-알파 폴리펩티드의 반수 최대 유효 농도 (EC50)를 확인함으로써 TNF-알파 세포독성의 효과를 중화시킬 수 있는 항-TNF-알파 폴리펩티드의 능력을 검정하기 위해 수

행될 수 있다.

- [0073] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 일반 L929 검정법에서 1 nM 이하, 예컨대, 0.9 nM 이하, 예컨대, 0.8 nM 이하, 예컨대, 0.7 nM 이하, 예컨대, 0.6 nM 이하, 예컨대, 0.5 nM 이하, 예컨대, 0.4 nM 이하, 예컨대, 0.3 nM 이하, 예컨대, 0.2 nM 이하, 예컨대, 0.1 nM 이하, 예컨대, 0.09 nM 이하, 예컨대, 0.08 nM 이하, 예컨대, 0.07 nM 이하, 예컨대, 0.06 nM 이하, 예컨대, 0.05 nM 이하, 예컨대, 0.04 nM 이하의 EC50 으로 인간 TNF-알파 세포독성을 증화시킨다.
- [0074] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 일반 L929 검정법에서 1 nM 이하, 예컨대, 0.9 nM 이하, 예컨대, 0.8 nM 이하, 예컨대, 0.7 nM 이하, 예컨대, 0.6 nM 이하, 예컨대, 0.5 nM 이하, 예컨대, 0.4 nM 이하, 예컨대, 0.3 nM 이하, 예컨대, 0.2 nM 이하, 예컨대, 0.1 nM 이하, 예컨대, 0.09 nM 이하, 예컨대, 0.08 nM 이하, 예컨대, 0.07 nM 이하, 예컨대, 0.06 nM 이하, 예컨대, 0.05 nM 이하, 예컨대, 0.04 nM 이하, 예컨대, 0.03 nM 이하, 예컨대, 0.02 nM 이하, 예컨대, 0.01 nM 이하의 EC50으로 시노몰구스 TNF-알파 세포독성을 증화시킨다.
- [0075] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 ELISA 검정법에서 30 nM 이하, 더욱 적합하게, 10 nM 이하, 더욱 적합하게, 3 nM 이하, 더욱 적합하게, 1 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.6 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.5 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.4 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.3 nM 이하의 EC50으로 인간 TNF-알파의 TNFR2에의 결합을 억제시킨다.
- [0076] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 ELISA 검정법에서 110 nM 이하, 더욱 적합하게, 30 nM 이하, 더욱 적합하게, 10 nM 이하, 더욱 적합하게, 3 nM 이하, 더욱 적합하게, 1 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.6 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.5 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.4 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.3 nM 이하의 EC50으로 시노몰구스 원숭이 TNF-알파의 TNFR2에의 결합을 억제시킨다.
- [0077] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 ELISA 검정법에서 2 nM 이하, 더욱 적합하게, 1 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.9 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.8 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.7 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.6 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.5 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.4 nM 이하, 더욱 적합하게, 0.3 nM 이하의 EC50으로 인간 TNF-알파의 TNFR1에의 결합을 억제시킨다.
- [0078] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 3 nM 이하, 적합하게, 2 nM 이하, 적합하게, 1 nM 이하, 적합하게, 0.5 nM 이하, 적합하게, 0.4 nM 이하, 적합하게, 0.3 nM 이하, 적합하게, 0.2 nM 이하, 적합하게, 0.1 nM 이하, 적합하게, 0.08 nM 이하의 EC50으로 가용성 인간 TNF-알파-유도성 HEK-293-NF-카파-B SEAP 리포터 세포 활성화를 억제시킨다.
- [0079] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 300 nM 이하, 적합하게, 150 nM 이하, 적합하게, 100 nM 이하, 적합하게, 80 nM 이하, 적합하게, 40 nM 이하, 적합하게, 30 nM 이하, 적합하게, 25 nM 이하, 적합하게, 20 nM 이하, 적합하게, 15 nM 이하의 EC50으로 막 인간 TNF-알파-유도성 HEK-293-NF-카파-B SEAP 리포터 세포 활성화를 억제시킨다.
- [0080] **폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 서열**
- [0081] 밀접한 관련이 있는 두 폴리펩티드 서열을 비교하기 위해, 폴리펩티드 서열에 대한 표준 설정 환경 (BLASTP)을 이용하여 NCBI BLAST v2.0을 사용함으로써 제1 폴리펩티드 서열과 제2 폴리펩티드 서열 사이의 "서열 동일성(%)"을 산출할 수 있다. 밀접한 관련이 있는 두 폴리뉴클레오티드 서열을 비교하기 위해, 뉴클레오티드 서열에 대한 표준 설정 환경 (BLASTN)을 이용하여 NCBI BLAST v2.0을 사용함으로써 제1 뉴클레오티드 서열과 제2 뉴클레오티드 서열 사이의 "서열 동일성(%)"을 산출할 수 있다.
- [0082] 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 그의 전체 길이에 걸쳐 100%의 서열 동일성을 공유한다면, 이는 다른 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 같거나, 또는 동일하다고 말할 수 있다. 서열 잔기는 좌측에서 우측으로, 즉, 폴리펩티드의 경우, N 말단에서 C 말단으로; 폴리뉴클레오티드의 경우, 5' 말단에서 3' 말단으로 넘버링된다.
- [0083] 서열 사이의 "차이"는 제1 서열과 비교하였을 때 제2 서열 위치의 단일 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 지칭한다. 두 폴리펩티드 서열은 1, 2개 이상의 상기와 같은 아미노산 차이를 함유할 수 있다. 다르게는 제1 서열과 동일한 (100%의 서열 동일성) 제2 서열의 삽입, 결실, 또는 치환은 서열 동일성(%)을 감소시킨다. 예를 들어, 동일한 서열의 길이가 9개의 아미노산 잔기 길이인 경우, 제2 서열에서 하나의 치환은 88.9%의 서열 동일성을 가지게 된다. 동일한 서열의 길이가 17개의 아미노산 잔기 길이인 경우, 제2 서열에서 2개의 치환은

88.2%의 서열 동일성을 가지게 된다. 동일한 서열의 길이가 7개의 아미노산 잔기 길이인 경우, 제2 서열에서 3개의 치환은 57.1%의 서열 동일성을 가지게 된다. 제1 및 제2 폴리펩티드 서열의 길이가 9개의 아미노산 잔기 길이이고, 6개의 동일한 잔기를 공유하는 경우, 제1 및 제2 폴리펩티드 서열은 66% 초과와 동일성을 공유한다 (제1 및 제2 폴리펩티드 서열은 66.7%의 동일성을 공유한다). 제1 및 제2 폴리펩티드 서열이 17개의 아미노산 잔기 길이이고, 16개의 동일한 잔기를 공유하는 경우, 제1 및 제2 폴리펩티드 서열은 94% 초과와 동일성을 공유한다 (제1 및 제2 폴리펩티드 서열은 94.1%의 동일성을 공유한다). 제1 및 제2 폴리펩티드 서열이 7개의 아미노산 잔기 길이이고, 3개의 동일한 잔기를 공유하는 경우, 제1 및 제2 폴리펩티드 서열은 42% 초과와 동일성을 공유한다 (제1 및 제2 폴리펩티드 서열은 42.9%의 동일성을 공유한다).

[0084] 대안적으로, 제1 참조 폴리펩티드 서열을 제2 비교 폴리펩티드 서열과 비교하기 위해, 제2 서열을 제조하기 위해 제1 서열에 대하여 이루어진 부가, 치환 및/또는 결실의 개수를 확인할 수 있다. 부가는 제1 폴리펩티드의 서열 내로 하나의 아미노산 잔기를 부가하는 것 (제1 폴리펩티드의 어느 한 말단에서의 부가 포함)이다. 치환은 제1 폴리펩티드의 서열 중의 하나의 아미노산 잔기를 다른 한 아미노산 잔기로 치환하는 것이다. 결실은 제1 폴리펩티드의 서열로부터 하나의 아미노산 잔기를 결실시키는 것 (제1 폴리펩티드의 어느 한 말단에서의 결실 포함)이다.

[0085] 제1 참조 폴리뉴클레오티드 서열을 제2 비교 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하기 위해, 제2 서열을 제조하기 위해 제1 서열에 대하여 이루어진 부가, 치환 및/또는 결실의 개수를 확인할 수 있다. 부가는 제1 폴리뉴클레오티드의 서열 내로 하나의 뉴클레오티드 잔기를 부가하는 것 (제1 폴리뉴클레오티드의 어느 한 말단에서의 부가 포함)이다. 치환은 제1 폴리뉴클레오티드의 서열 중의 하나의 뉴클레오티드 잔기를 다른 한 뉴클레오티드 잔기로 치환하는 것이다. 결실은 제1 폴리뉴클레오티드의 서열로부터 하나의 뉴클레오티드 잔기를 결실시키는 것 (제1 폴리뉴클레오티드의 어느 한 말단에서의 결실 포함)이다.

[0086] "보존적" 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 화학 구조를 가지는 또 다른 아미노산 잔기로 대체되고, 폴리펩티드의 기능, 활성 또는 다른 생물학적 특성에 거의 영향을 미치지 않을 것으로 예상되는 아미노산 치환이다. 그러한 보존적 치환은 적합하게는 하기 군 내의 한 아미노산이 같은 군 내의 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환된 치환이다:

기	아미노산 잔기
비극성 지방족	글리신
	알라닌
	발린
	류신
	이소류신
방향족	페닐알라닌
	티로신
	트립토판
극성 비하전된 것	세린
	트레오닌
	아스파라긴
	글루타민
음으로 하전된 것	아스파르테이트
	글루타메이트
양으로 하전된 것	리신
	아르기닌

[0087]

[0088] 적합하게, 소수성 아미노산 잔기는 비극성 아미노산이다. 더욱 적합하게, 소수성 아미노산 잔기는 V, I, L, M, F, W 또는 C로부터 선택된다.

[0089] 본원에서 사용되는 바, 폴리펩티드 서열의 넘버링 및 CDR 및 FR의 정의는 카바트(Kabat) 체계에 따라 정의되는 바와 같다 (문헌 [Kabat et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition

U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication Number 91-3242], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 제1 및 제2 폴리펩티드 서열 사이의 "상응하는" 아미노산 잔기는 카바트 체계에 따라 같은 위치에서 제2 서열 중의 아미노산 잔기와 공유하는 제1 서열 중의 아미노산 잔기인 반면, 제2 서열 중의 아미노산 잔기는 제1의 것과 동일성이 다를 수 있다. 적합하게, 프레임워크 및 CDR이 카바트 정의에 따라 같은 길이라면, 상응하는 잔기는 같은 개수 (및 문자)를 공유할 것이다. 정렬은 수동으로, 또는 예를 들어, 표준 설정 환경을 이용하여 서열 정렬을 위한 공지된 컴퓨터 알고리즘, 예컨대, NCBI BLAST v2.0 (BLASTP 또는 BLASTN)을 사용함으로써 달성될 수 있다.

- [0090] 적합하게, 본 발명에서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 단리된 것이다. "단리된" 폴리뉴클레오티드는 그의 원래의 환경으로부터 제거된 것이다. 예를 들어, 자연적으로 발생된 폴리뉴클레오티드가 자연계에서 공존 물질 중 일부 또는 그 모두로부터 분리되었다면, 이는 단리된 것이다. 폴리뉴클레오티드는 그가 예를 들어, 그의 천연 환경의 일부가 아닌 벡터 내로 클로닝되었거나, 또는 그가 cDNA 내에 포함되었다면, 이는 단리된 것으로 간주된다.
- [0091] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 적합하게, 폴리뉴클레오티드는 서열번호 83 내지 88 중 어느 하나와 70% 이상의, 예컨대, 80% 이상의, 예컨대, 90% 이상의, 예컨대, 95% 이상의, 예컨대, 99% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된다. 더욱 적합하게, 폴리뉴클레오티드는 서열번호 83 내지 88 중 어느 하나를 포함하거나, 또는 그로 구성된다. 추가 측면에서, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 cDNA를 제공한다.
- [0092] 본 발명의 한 측면에서, 코딩된 면역글로불린쇄 가변 도메인의 CDR1, CDR2 또는 CDR3을 코딩하는, 서열번호 83 내지 86 중 어느 하나의 일부 중 어느 하나와 70% 이상의, 예컨대, 80% 이상의, 예컨대, 90% 이상의, 예컨대, 95% 이상의, 예컨대, 99% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0093] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 서열은 천연 서열과 관련하여 적어도 하나의 변경을 함유한다. 적합하게, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열은 천연 서열과 관련하여 적어도 하나의 변경을 함유한다. 적합하게, 장관에 존재하는 프로테아제 (예를 들어, 트립신 및 키모트립신)에 대한 폴리펩티드 또는 코딩된 폴리펩티드의 안정성을 증가시키기 위해 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열에 대하여 변경이 이루어진다.

성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

- [0101] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR2는 서열번호 2와 비교하여 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 CDR2는 적합하게, 서열번호 2와 비교하여 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 CDR2는 적합하게, 서열번호 2와 비교하여 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0102] 적합하게, 서열번호 2에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 CDR2의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. 적합하게, 서열번호 2의 잔기 번호 10번에 상응하는 CDR2의 잔기는 R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F 또는 I (가장 적합하게, H)이다. CDR2는 적합하게, 서열번호 2를 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 적합하게, CDR2의 서열은 서열번호 61, 서열번호 62, 서열번호 2, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69이다.
- [0103] 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 적합하게, 서열번호 3과 80% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0104] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 서열번호 3과 비교하여 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 적합하게, 서열번호 3과 비교하여 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 적합하게, 서열번호 3과 비교하여 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 적합하게, 임의의 치환은 서열번호 3에서 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적인 것이다.
- [0105] 적합하게, 서열번호 3에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 CDR3의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. 적합하게, 서열번호 3의 잔기 번호 3번에 상응하는 CDR3의 잔기는 R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F 또는 I; 또는 적합하게, R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, V, L, W, P, M, C, F 또는 I (가장 적합하게, H)이다. 적합하게, 서열번호 3의 잔기 번호 3번에 상응하는 CDR3의 잔기는 H이고, 서열번호 3에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 CDR3의 임의의 다른 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. CDR3은 적합하게, 서열번호 3을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0106] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 서열번호 3과 50%, 예컨대, 60%, 예컨대, 80% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성되고, 여기서, 서열번호 3의 잔기 번호 3번은 R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y 또는 V (적합하게, H 또는 H의 보존적 치환; 더욱 적합하게, H)이다. 대안적으로, 서열번호 3의 잔기 번호 3번은 H 또는 H의 보존적 치환 (가장 적합하게, H)이고, 서열번호 3에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 CDR3의 임의의 다른 잔기는 보존적 치환이다. 적합하게, CDR3의 서열은 서열번호 3, 서열번호 70, 서열번호 71 또는 서열번호 72이다.
- [0107] 적합하게, CDR1의 잔기 1은 S, V 또는 N이고; 잔기 2 내지 4는 HWM이고, 잔기 5는 Y 또는 C이다. 적합하게, CDR2의 잔기 1 내지 9는 EINTNGLIT이고; 잔기 10은 H, K, S 또는 N이고; 잔기 11은 Y이고, 잔기 12는 G, V, I 또는 A이고; 잔기 13은 D이고; 잔기 14는 S 또는 F이고; 잔기 15는 V 또는 T이고; 잔기 16은 H, K, R 또는 G이고, 잔기 17은 G이다. 적합하게, CDR3의 잔기 1은 N이고; 잔기 2는 Q 또는 E이고; 잔기 3은 H, K, M 또는 R이고, 잔기 4 내지 6은 GLN이다.
- [0108] 특히 적합한 일부 CDR 서열은 하기 표에 제시되어 있다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR1은 하기 열거된 CDR1 서열 중 하나이다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR2는 하기 열거된 CDR2 서열 중 하나이다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 하기 열거된 CDR3 서열 중 하나이다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드는 하기 열거된 CDR 서열 중 2개, 또는 더욱 적합하게, 3개의 조합을 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드의 특정 패밀리 1 CDR

CDR1	CDR2	CDR3
SHWMY (서열 번호: 1)	EINTNGLITHYGDSVHG (서열 번호: 61)	NQHGLN (서열 번호: 3)
VHWMY (서열 번호: 59)	EINTNGLITKYGDSVHG (서열 번호: 62)	NQKGLN (서열 번호: 70)
NHWMC (서열 번호: 60)	EINTNGLITHYGDSVKG (서열 번호: 2)	NQMGLN (서열 번호: 71)
	EINTNGLITSYVDSVKG (서열 번호: 63)	NERGLN (서열 번호: 72)
	EINTNGLITKYIDSVRG (서열 번호: 64)	
	EINTNGLITNYVDSVKG (서열 번호: 65)	
	EINTNGLITKYIDSVGG (서열 번호: 66)	
	EINTNGLITKYADSVKG (서열 번호: 67)	
	EINTNGLITKYADSTKG (서열 번호: 68)	
	EINTNGLITKYGDSVKG (서열 번호: 69)	

[0109]

ID38F의 CDR의 다른 패밀리 1 구성원, TNF1 및 Q62F11과의 동일성(%)
--

명칭	CDR 1	CDR 2	CDR 3
Q65B1	100	94.1	83.3
Q65F2	100	88.2	83.3
Q65F3	100	82.4	83.3
Q62F2	100	88.2	83.3
Q65G1	100	82.4	83.3
Q65H6	100	82.4	83.3
Q65F1	80	82.4	83.3
Q65D1	60	82.4	83.3
Q65D3	100	82.4	66.7
Q65C7	100	82.4	83.3
TNF1	60	88.2	33.3
Q62F11	20	52.9	13.3

[0110]

[0111]

본 발명의 폴리펩티드의 FR1은 적합하게, 서열번호 4와 5%, 12%, 18%, 26%, 32%, 38%, 46%, 52%, 58%, 62%, 66%, 68%, 72%, 75%, 78%, 82%, 85%, 90%, 95% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0112]

대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR1은 서열번호 4와 비교하여 28개 이하, 더욱 적합하게, 26개 이하, 더욱 적합하게, 24개 이하, 더욱 적합하게, 22개 이하, 더욱 적합하게, 20개 이하, 더욱 적합하게, 18개 이하, 더욱 적합하게, 16개 이하, 더욱 적합하게, 14개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR1은 적합하게, 서열번호 4와 비교하여 28개

이하, 더욱 적합하게, 26개 이하, 더욱 적합하게, 24개 이하, 더욱 적합하게, 22개 이하, 더욱 적합하게, 20개 이하, 더욱 적합하게, 18개 이하, 더욱 적합하게, 16개 이하, 더욱 적합하게, 14개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR1은 적합하게, 서열번호 4와 비교하여 28개 이하, 더욱 적합하게, 26개 이하, 더욱 적합하게, 24개 이하, 더욱 적합하게, 22개 이하, 더욱 적합하게, 20개 이하, 더욱 적합하게, 18개 이하, 더욱 적합하게, 16개 이하, 더욱 적합하게, 14개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0113] 적합하게, 서열번호 4에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 FR1의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. 적합하게, 서열번호 4의 잔기 번호 1번에 상응하는 FR1의 잔기는 G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E 또는 N (더욱 적합하게, D 또는 E, 가장 적합하게, D)이다. 적합하게, 서열번호 4의 잔기 번호 5번에 상응하는 FR1의 잔기는 G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E 또는 N (적합하게, V)이다. 적합하게, 서열번호 4의 잔기 번호 1 내지 5번에 상응하는 FR1의 잔기는 DVQLV이다. 적합하게, 서열번호 4의 잔기 번호 20번 및/또는 24번에 상응하는 FR1의 잔기는 소수성인 아미노산 (가장 적합하게, 각각 L 또는 A)이다. 적합하게, 서열번호 4의 잔기 번호 29번에 상응하는 FR1의 잔기는 F이다. FR1은 적합하게, 서열번호 4를 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0114] 본 발명의 폴리펩티드의 FR2는 적합하게, 서열번호 5와 10%, 15%, 25%, 30%, 40%, 45%, 55%, 60%, 70%, 75%, 85%, 90% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0115] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR2는 서열번호 5와 비교하여 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR2는 적합하게, 서열번호 5와 비교하여 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR2는 적합하게, 서열번호 5와 비교하여 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0116] 적합하게, 서열번호 5에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 FR2의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. 적합하게, 서열번호 5의 잔기 번호 8 내지 11번에 상응하는 FR2의 잔기는 KEXE이고, 여기서, X는 R 또는 L이다. 대안적으로, 서열번호 5의 잔기 번호 9 내지 12번에 상응하는 FR2의 잔기는 GLEW이다. FR2는 적합하게, 서열번호 5를 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0117] 본 발명의 폴리펩티드의 FR3은 적합하게, 서열번호 6과 8%, 15%, 20%, 26%, 32%, 40%, 45%, 52%, 58%, 65%, 70%, 76%, 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 95% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0118] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR3은 서열번호 6과 비교하여 29개 이하, 더욱 적합하게, 27개 이하, 더욱 적합하게, 25개 이하, 더욱 적합하게, 23개 이하, 더욱 적합하게, 21개 이하, 더욱 적합하게, 19개 이하, 더욱 적합하게, 17개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합

하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR3은 적합하게, 서열번호 6과 비교하여 29개 이하, 더욱 적합하게, 27개 이하, 더욱 적합하게, 25개 이하, 더욱 적합하게, 23개 이하, 더욱 적합하게, 21개 이하, 더욱 적합하게, 19개 이하, 더욱 적합하게, 17개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR3은 적합하게, 서열번호 6과 비교하여 29개 이하, 더욱 적합하게, 27개 이하, 더욱 적합하게, 25개 이하, 더욱 적합하게, 23개 이하, 더욱 적합하게, 21개 이하, 더욱 적합하게, 19개 이하, 더욱 적합하게, 17개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0119] 적합하게, 서열번호 6의 잔기 번호 26번에 상응하는 FR3의 잔기는 소수성인 아미노산 (적합하게, A)이다. 적합하게, 서열번호 6에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 FR3의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. FR3은 적합하게, 서열번호 6을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0120] 본 발명의 폴리펩티드의 FR4는 적합하게, 서열번호 7과 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0121] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR4는 서열번호 7과 비교하여 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR4는 적합하게, 서열번호 7과 비교하여 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR4는 적합하게, 서열번호 7과 비교하여 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0122] 적합하게, 서열번호 7에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 FR4의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. FR4는 적합하게, 서열번호 7을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0123] 본 발명의 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 8과 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0124] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드는 서열번호 8과 비교하여 20개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 8과 비교하여 20개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 8과 비교하여 20개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0125] 적합하게, 폴리펩티드의 N 말단은 D이다. 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 8을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

- [0126] 패밀리 2에 속하는 서열
- [0127] 본 발명의 폴리펩티드의 CDR1은 적합하게, 서열번호 15와 80% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0128] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR1은 서열번호 15와 비교하여 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 CDR1은 적합하게, 서열번호 15와 비교하여 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 CDR1은 적합하게, 서열번호 15와 비교하여 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0129] 적합하게, 서열번호 15에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 CDR1의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. CDR1은 적합하게, 서열번호 15를 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0130] 본 발명의 폴리펩티드의 CDR2는 적합하게, 서열번호 16과 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0131] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR2는 서열번호 16과 비교하여 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR2는 서열번호 16과 비교하여 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR2는 서열번호 16과 비교하여 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0132] 적합하게, 서열번호 16의 잔기 번호 10번 및/또는 16번에 상응하는 CDR2의 잔기는 R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F 또는 I (더욱 적합하게, H)이다. 적합하게, 서열번호 16에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 CDR2의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. CDR2는 적합하게, 서열번호 16을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 적합하게, CDR2의 CDR2는 서열번호 73, 서열번호 74, 서열번호 75, 서열번호 76, 서열번호 77 또는 서열번호 16이다.
- [0133] 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 적합하게, 서열번호 17과 60% 이상의 서열 동일성, 예컨대, 80% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0134] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 서열번호 17과 비교하여 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 적합하게, 서열번호 17과 비교하여 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 적합하게, 서열번호 17과 비교하여 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0135] 적합하게, 서열번호 17에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 CDR3의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. 적합하게, CDR3의 서열은 서열번호 78, 서열번호 79, 서열번호 17 또는 서열번호 80이다. CDR3은 적합하게, 서열번호 17을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0136] 적합하게, CDR1의 잔기 1 내지 5는 IHWMY이다. 적합하게, CDR2의 잔기 1 내지 9는 EINTNGLIT이고; 잔기 10은 L, T, H, K 또는 V이고; 잔기 11은 Y이고; 잔기 12는 S, A, T 또는 P이고; 잔기 13 내지 15는 DSV이고; 잔기 16은 R, K 또는 S이고, 잔기 17은 G이다. 적합하게, CDR3의 잔기 1은 S, A 또는 T이고; 잔기 2는 R 또는 Q이고; 잔기 3 내지 4는 NG이고; 잔기 5는 A 또는 K이고, 잔기 6은 A 또는 T이다.
- [0137] 특히 적합한 일부 CDR 서열은 하기 표에 제시되어 있다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR1은 하기 열거된 CDR1 서열 중 하나이다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR2는 하기 열거된 CDR2 서열 중 하나이다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드의 CDR3은 하기 열거된 CDR3 서열 중 하나이다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티

드는 하기 열거된 CDR 서열 중 2개, 또는 더욱 적합하게, 3개의 조합을 포함한다.

본 발명의 폴리펩티드의 특정 패밀리 2 CDR

CDR1	CDR2	CDR3
IHWMY (서열 번호: 15)	EINTNGLITLYSDSVRG (서열 번호: 73)	SRNGAA (서열 번호: 78)
	EINTNGLITLYADSVKG (서열 번호: 74)	ARNGAA (서열 번호: 79)
	EINTNALITTYADSVKG (서열 번호: 75)	TQNGAA (서열 번호: 17)
	EINTNGLITHYTSVSG (서열 번호: 76)	TQNGKT (서열 번호: 80)
	EINTNALITKYADSVKG (서열 번호: 77)	
	EINTNGLITVYPDSVKG (서열 번호: 16)	

[0138]

62E10의 CDR의 다른 패밀리 2 구성원, TNF1 및 Q62F11과의 동일성(%)

명칭	CDR 1	CDR 2	CDR 3
----	-------	-------	-------

Q65F6	100	76.5	66.7
Q65F11	100	88.2	66.7
Q65E12	100	88.2	66.7
Q62C12	100	94.1	66.7
Q65A6	100	76.5	66.7
Q65A3	100	100	100
Q65F10	100	82.4	66.7

TNF1	60	88.2	16.7
Q62F11	20	52.9	13.3

[0139]

[0140]

본 발명의 폴리펩티드의 FR1은 적합하게, 서열번호 18과 5%, 12%, 18%, 26%, 32%, 38%, 46%, 52%, 58%, 62%, 66%, 68%, 72%, 75%, 78%, 82%, 85%, 90%, 95% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0141]

대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR1은 서열번호 18과 비교하여 28개 이하, 더욱 적합하게, 26개 이하, 더욱 적합하게, 24개 이하, 더욱 적합하게, 22개 이하, 더욱 적합하게, 20개 이하, 더욱 적합하게, 18개 이하, 더욱 적합하게, 16개 이하, 더욱 적합하게, 14개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR1은 서열번호 18과 비교하여 28개 이하, 더욱 적합하게, 26개 이하, 더욱 적합하게, 24개 이하, 더욱 적합하게, 22개 이하, 더욱 적합하게, 20개 이하, 더욱 적합하게, 18개 이하, 더욱 적합하게, 16개 이하, 더욱 적합하게, 14개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR1은 서열번호 18과 비교하여 28개 이하, 더욱 적합하게, 26개 이하, 더욱 적합하게, 24개 이하, 더욱 적합하게, 22개 이하, 더욱 적합하게, 20개 이하, 더욱 적합하게, 18개 이하, 더욱 적합하게, 16개 이하, 더욱 적합하게, 14개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

적합하게, 14개 이하, 더욱 적합하게, 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0142] 적합하게, 서열번호 4의 잔기 번호 1번에 상응하는 FR1의 잔기는 G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E 또는 N (더욱 적합하게, D 또는 E, 가장 적합하게, D)이다. 적합하게, 서열번호 18의 잔기 번호 5번에 상응하는 FR1의 잔기는 G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E 또는 N (적합하게, V)이다. 적합하게, 서열번호 18의 잔기 번호 1 내지 5번에 상응하는 FR1의 잔기는 DVQLV이다. 적합하게, 서열번호 18의 잔기 번호 20번에 상응하는 FR1의 잔기는 소수성인 아미노산 (적합하게, L)이다. 적합하게, 서열번호 18의 잔기 번호 29번에 상응하는 FR1의 잔기는 F이다. 적합하게, 서열번호 18에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 FR1의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. FR1은 적합하게, 서열번호 18을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0143] 본 발명의 폴리펩티드의 FR2는 적합하게, 서열번호 19와 10%, 15%, 25%, 30%, 40%, 45%, 55%, 60%, 70%, 75%, 85%, 90% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0144] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR2는 서열번호 19와 비교하여 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR2는 적합하게, 서열번호 19와 비교하여 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR2는 적합하게, 서열번호 19와 비교하여 13개 이하, 더욱 적합하게, 12개 이하, 더욱 적합하게, 11개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0145] 적합하게, 서열번호 19의 잔기 번호 8 내지 11번에 상응하는 FR2의 잔기는 KELE이다. 적합하게, 서열번호 19에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 FR2의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. FR2는 적합하게, 서열번호 19를 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0146] 본 발명의 폴리펩티드의 FR3은 적합하게, 서열번호 20과 8%, 15%, 20%, 26%, 32%, 40%, 45%, 52%, 58%, 65%, 70%, 76%, 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 95% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

[0147] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR3은 서열번호 20과 비교하여 29개 이하, 더욱 적합하게, 27개, 더욱 적합하게, 25개, 더욱 적합하게, 23개, 더욱 적합하게, 21개, 더욱 적합하게, 19개, 더욱 적합하게, 17개, 더욱 적합하게, 15개, 더욱 적합하게, 13개, 더욱 적합하게, 11개, 더욱 적합하게, 9개, 더욱 적합하게, 7개, 더욱 적합하게, 6개, 더욱 적합하게, 5개, 더욱 적합하게, 4개, 더욱 적합하게, 3개, 더욱 적합하게, 2개, 더욱 적합하게, 1개의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR3은 적합하게, 서열번호 20과 비교하여 29개 이하, 더욱 적합하게, 27개, 더욱 적합하게, 25개, 더욱 적합하게, 23개, 더욱 적합하게, 21개, 더욱 적합하게, 19개, 더욱 적합하게, 17개, 더욱 적합하게, 15개, 더욱 적합하게, 13개, 더욱 적합하게, 11개, 더욱 적합하게, 9개, 더욱 적합하게, 7개, 더욱 적합하게, 6개, 더욱 적합하게, 5개, 더욱 적합하게, 4개, 더욱 적합하게, 3개, 더욱 적합하게, 2개, 더욱 적합하게, 1개의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR3은 적합하게, 서열번호 20과 비교하여 29개 이하, 더욱 적합하게, 27개, 더욱 적합하게, 25개, 더욱 적합하게, 23개, 더욱 적합하게, 21개, 더욱 적합하게, 19개, 더욱 적합하게, 17개, 더욱 적합하게, 15개, 더욱 적합하게, 13개, 더욱 적합하게, 11개, 더욱 적합하게, 9개, 더욱 적합하게, 7개, 더욱 적합하게, 6개, 더욱 적합하게, 5개, 더욱 적합

하게, 4개, 더욱 적합하게, 3개, 더욱 적합하게, 2개, 더욱 적합하게, 1개의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.

- [0148] 적합하게, 서열번호 20의 잔기 번호 26번에 상응하는 FR3의 잔기는 소수성인 아미노산 (적합하게, A)이다. 적합하게, 서열번호 20에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 FR3의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. FR3은 적합하게, 서열번호 20을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0149] 본 발명의 폴리펩티드의 FR4는 적합하게, 서열번호 21과 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0150] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드의 FR4는 서열번호 21과 비교하여 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR4는 적합하게, 서열번호 21과 비교하여 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드의 FR4는 적합하게, 서열번호 21과 비교하여 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0151] 적합하게, 서열번호 21의 잔기 번호 1번에 상응하는 CDR2의 잔기는 R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F 또는 I (적합하게, H)이다. 적합하게, 서열번호 21에서 그의 상응하는 잔기와 상이한 FR4의 임의의 잔기는 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적 치환이다. FR4는 적합하게, 서열번호 21을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0152] 본 발명의 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 22와 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0153] 대안적으로, 본 발명의 폴리펩티드는 서열번호 22와 비교하여 20개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 부가(들)를 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 22와 비교하여 20개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 본 발명의 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 22와 비교하여 20개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 결실(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0154] 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 22를 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 적합하게, 폴리펩티드의 N 말단은 D이다. 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 55를 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다.
- [0155] 본 발명의 폴리펩티드는 적합하게, 서열번호 22와 관련하여 20개 이하, 더욱 적합하게, 15개 이하, 더욱 적합하게, 10개 이하, 더욱 적합하게, 9개 이하, 더욱 적합하게, 8개 이하, 더욱 적합하게, 7개 이하, 더욱 적합하게, 6개 이하, 더욱 적합하게, 5개 이하, 더욱 적합하게, 4개 이하, 더욱 적합하게, 3개 이하, 더욱 적합하게, 2개 이하, 더욱 적합하게, 1개 이하의 치환(들)을 가지는 서열을 포함하거나, 또는 더욱 적합하게, 그로 구성된다. 적합하게, 임의의 치환은 서열번호 22에서 그의 상응하는 잔기와 관련하여 보존적인 것이다.
- [0156] **링커 및 다량체**
- [0157] 본 발명에 따른 구축물은 다중 폴리펩티드를 포함하고, 그러므로, 적합하게는 다가일 수 있다. 상기 구축물은

적어도 2개의 동일한, 본 발명에 따른 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 2개의 동일한, 본 발명에 따른 폴리펩티드로 구성된 구축물은 "동중비헤드"이다. 본 발명의 한 측면에서, 2개 이상의 동일한, 본 발명에 따른 폴리펩티드를 포함하는 구축물을 제공한다.

[0158] 대안적으로, 구축물은 상이하지만, 이 둘 모두는 여전히 본 발명에 따른 폴리펩티드인 것인 적어도 2개의 폴리펩티드를 포함할 수 있다 ("이중비헤드").

[0159] 대안적으로, 상기 구축물은 (a) 적어도 하나의, 본 발명에 따른 폴리펩티드 및 (b) 본 발명의 폴리펩티드가 아닌, 적어도 하나의 폴리펩티드, 예컨대, 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다 (이는 또한 "이중비헤드"). (b)의 적어도 하나의 폴리펩티드는 (예를 들어, (a)의 것과 상이한 에피토프를 통해) TNF-알파에 결합할 수 있거나, 또는 대안적으로, TNF-알파와 다른 표적에 결합할 수 있다. 적합하게, 상이한 폴리펩티드 (b)는 예를 들어: 인터루킨 (예컨대, IL-1, IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 및 IL-23), 인터루킨 수용체 (예컨대, IL-6R 및 IL-7R), 전사 인자 (예컨대, NF-κB), 시토카인 (예컨대, TNF-알파, IFN-감마 TGF-베타 및 TSLP), 막횡단 단백질 (예컨대, gp130 및 CD3), 표면 당단백질 (예컨대, CD4, CD20, CD40), 가용성 단백질 (예컨대, CD40L), 인테그린 (예컨대, a4b7 및 알파E베타7), 부착 분자 (예컨대, MAdCAM), 케모카인 (예컨대, IP10 및 CCL20), 케모카인 수용체 (예컨대, CCR2 및 CCR9), 억제성 단백질 (예컨대, SMAD7), 키나제 (예컨대, JAK3), G 단백질 커플링된 수용체 (예컨대, 스펅고신-1-P 수용체), 다른 염증성 매개인자 또는 인간 병리학적 프로세스에 관여하는 면역학적으로 관련된 리간드에 결합한다. 따라서, 상이한 폴리펩티드 (b)는 예를 들어, IL-6R, IL-6, IL-12, IL-23, IL-1-베타, IL-17A 또는 CD3; 또는 다른 염증성 매개인자 또는 인간 병리학적 프로세스에 관여하는 면역학적으로 관련된 리간드에 결합한다.

[0160] 구축물은 다가 및/또는 다중특이적일 수 있다. 다가 구축물 (예컨대, 2가 구축물)은 2개 이상의 결합 폴리펩티드를 포함하며, 그러므로, 하나 이상의 항원에의 결합이 이루어질 수 있는 2개 이상의 부위가 존재한다. 다가 구축물의 한 예는 동중비헤드 또는 이중비헤드일 수 있다. 다중특이적 구축물 (예컨대, 이중특이적 구축물)은, (a) 2개 이상의 상이한 항원에의 부착이 이루어질 수 있거나, 또는 (b) 동일한 항원 상의 2개 이상의 상이한 에피토프에의 부착이 이루어질 수 있는 2개 이상의 부위가 존재하는 2개 이상의 상이한 결합 폴리펩티드를 포함한다. 다중특이적 구축물의 한 예는 이중비헤드일 수 있다. 다중특이적 구축물은 다가이다.

[0161] 적합하게, 구축물 내에 포함된 폴리펩티드는 항체 단편이다. 더욱 적합하게, 구축물 내에 포함된 폴리펩티드는 VHH, VH, VL, V-NAR, Fab 단편 및 F(ab')₂ 단편으로 구성된 목록으로부터 선택된다. 더욱 적합하게, 구축물 내에 포함된 폴리펩티드는 VHH이다.

[0162] 본 발명의 폴리펩티드는 서로 직접 (즉, 링커를 사용하지 않고), 또는 링커를 통해 연결될 수 있다. 적합하게, 링커는 프로테아제 불안정성 또는 비-프로테아제 불안정성 링커이다. 링커는 적합하게는 폴리펩티드이고, 폴리펩티드가 그의 에피토프에 결합할 수 있도록 선택될 것이다. 치료학적 목적으로 사용되는 경우, 링커는 적합하게는 폴리펩티드를 투여받는 대상체에서 비-면역원성이다. 적합하게, 폴리펩티드는 모두 비-프로테아제 불안정성 링커에 의해 연결된다. 적합하게, 프로테아제 불안정성 링커는 포맷 $[-(G_4S)_x-BJB'-(G_4S)_y-]_z$ 를 가지며, 상기 식에서, J는 리신 또는 아르기닌이고, B는 R, H, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F, K 또는 I로부터 선택되는 0 내지 5개의 아미노산 잔기이고, B'는 R, H, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, M, C, F, K 또는 I로부터 선택되는 0 내지 5개의 아미노산 잔기이고, x는 1 내지 10이고; y는 1 내지 10이고, z는 1 내지 10이다. 가장 적합하게, J는 리신이고, B는 0이고, x는 1이고, y는 1이고, z는 1이다. 적합하게, 비-프로테아제 불안정성 링커는 포맷 $(G_4S)_x$ 를 가진다. 가장 적합하게, x는 6이다.

[0163] **벡터 및 숙주**

[0164] 본원에서 사용되는 바, "벡터"라는 용어는 핵산 분자가 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 벡터의 한 유형으로는 "플라스미드"가 있으며, 이는 추가의 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 벡터의 또 다른 유형으로는 바이러스 벡터가 있으며, 여기서, 추가의 DNA 세그먼트는 바이러스 게놈으로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 그가 도입되는 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다 (예컨대, 박테리아 복제 기점을 가지는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 및 효모 벡터). 다른 벡터 (예컨대, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입시, 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이로써, 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 그가 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단하게, "발현 벡터")로 지칭된다. 일

반적으로, 재조합 DNA 기법에서 유용한 발현 벡터는 대개 플라스미드 형태이다. 플라스미드는 벡터 중 가장 일반적으로 사용되는 형태인 바, 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 등가의 기능을 하는 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대, 바이러스 벡터 (예컨대, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스), 및 또한 박테리오파지 및 파지미드 시스템을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명은 또한 폴리펩티드 서열 또는 다가 및/또는 다중특이적 구축물을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다. 본원에서 사용되는 바, "재조합 숙주 세포" (또는 간단하게 "숙주 세포")라는 용어는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 상기 용어는 특정 대상체 세포 뿐만 아니라, 상기 세포의 자손도 지칭하는 것으로 의도된다.

[0165] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 cDNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명의 추가 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물을 발현할 수 있는, 상기 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다. 적합하게, 숙주 세포는 박테리아, 예컨대, 에스케리키아 콜라이, 아스페르길루스 속, 사카로마이세스 속, 클루이베로마이세스 속, 한세놀라 속 또는 피치아 속에 속하는 효모, 예컨대, 사카로마이세스 세레비시아에 또는 피치아 파스토리스이다.

[0166] **안정성**

[0167] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 경구적으로 전달되었을 때, 및 장관에의 노출 후 (예를 들어, 소장 및/또는 대장의 프로테아제 및/또는 IBD 염증성 프로테아제에의 노출 후)에도 실질적으로는 중화 능력 및/또는 효력을 유지한다. 상기 프로테아제로는 엔테로펩티다제, 트립신, 키모트립신, 및 과민성 장 질환 염증성 프로테아제 (예컨대, MMP3, MMP12 및 카텡신)를 포함한다. 소장 및/또는 대장의, 또는 소장 및/또는 대장에서 생산되는 프로테아제로는 장내 공생 미생물군 및/또는 병원성 박테리아로부터 공급되는 프로테아제, 예를 들어, 프로테아제가 세포 막에 부착되어 있는 프로테아제인 것인 프로테아제, 배출된 프로테아제 및 세포 용해시 방출된 프로테아제)를 포함한다. 가장 적합하게, 프로테아제는 트립신 및 키모트립신이다.

[0168] 적합하게, 장관은 개, 돼지, 인간, 시노물구스 원숭이 또는 마우스의 장관이다. 소장은 적합하게, 십이지장, 공장 및 회장으로 구성된다. 대장은 적합하게, 맹장, 결장, 직장 및 항문관으로 구성된다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 실질적으로 하나 이상의 프로테아제에 대하여 저항성을 띤다. 위장관과 달리, 장관은 오직 소장 및 대장으로만 구성된다.

[0169] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 실질적으로 소장 및/또는 대장에 존재하는 프로테아제 및/또는 IBD 염증성 프로테아제에의 노출 후에도 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물의 원래의 중화 능력의 적합하게 10%, 더욱 적합하게, 20%, 더욱 적합하게, 30%, 더욱 적합하게, 40%, 더욱 적합하게, 50%, 더욱 적합하게, 60%, 더욱 적합하게, 70%, 더욱 적합하게, 80%, 더욱 적합하게, 90%, 더욱 적합하게, 95%, 더욱 적합하게, 100%가 유지될 때, 중화 능력을 유지한다.

[0170] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 실질적으로 예를 들어, 37°C에서 최대 적어도 2시간, 더욱 적합하게, 최대 적어도 3시간, 더욱 적합하게, 최대 적어도 4시간, 더욱 적합하게, 최대 적어도 5시간, 더욱 적합하게, 최대 적어도 5.5시간, 더욱 적합하게, 최대 적어도 16시간, 더욱 적합하게, 최대 적어도 21시간 또는 더욱 적합하게, 최대 적어도 22시간 동안 소장 및/또는 대장에 존재하는 프로테아제 및/또는 IBD 염증성 프로테아제에의 노출 후에도, 중화 능력을 유지한다.

[0171] 적합하게, 장관, 더욱 적합하게, 소장 또는 대장 조건, 더욱 적합하게, 인간 대변 추출물에의 노출 16시간 후에도, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물의 중화 능력의 10% 이상, 더욱 적합하게, 20% 이상, 더욱 적합하게, 30% 이상, 더욱 적합하게, 40% 이상, 더욱 적합하게, 50% 이상, 더욱 적합하게, 60% 이상, 더욱 적합하게, 70% 이상이 유지된다.

[0172] 적합하게는, 적합하게, 마우스 소장 상청액에의 노출 4, 6 또는 16시간 후에도, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물의 중화 능력의 10% 이상, 더욱 적합하게, 20% 이상, 더욱 적합하게, 30% 이상, 더욱 적합하게, 40% 이상, 더욱 적합하게, 50% 이상, 더욱 적합하게, 60% 이상, 더욱 적합하게, 70% 이상이 유지된다.

[0173] 적합하게, 마우스 소장 상청액에의 노출 16시간 후에도, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물의 중화 능력의 10% 이상, 더욱 적합하게, 15% 이상, 더욱 적합하게, 20% 이상, 더욱 적합하게, 25% 이상, 더욱 적합하게, 30% 이상, 더욱 적합하게, 35% 이상, 더욱 적합하게, 40% 이상이 유지된다.

[0174] 적합하게, 마우스 소장 상청액에의 노출 16시간 후에도, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물의 중화 능력의 50% 이상, 더욱 적합하게, 60% 이상, 더욱 적합하게, 65% 이상, 더욱 적합하게, 70% 이상, 더욱 적합하게, 75%

이상, 더욱 적합하게, 80% 이상, 더욱 적합하게, 85% 이상, 더욱 적합하게, 85% 이상이 유지된다.

[0175] 적합하게, 장관의 조건에의 노출 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7시간 후에도 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물의 투여된 용량의 10% 이상, 더욱 적합하게, 20% 이상, 더욱 적합하게, 30% 이상, 더욱 적합하게, 40% 이상, 더욱 적합하게, 50% 이상, 더욱 적합하게, 60% 이상, 더욱 적합하게, 70% 이상이 TNF-알파에 대한 중화 능력을 유지하고, 마우스, 시노물구스 원숭이 및/또는 인간의 대변 (적합하게, 배설된 대변 또는 장관으로부터 제거된 대변)에 그대로 남아있다.

[0176] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물의 투여된 양의 적합하게, 10%, 더욱 적합하게, 20%, 더욱 적합하게, 30%, 더욱 적합하게, 40%, 더욱 적합하게, 50%, 더욱 적합하게, 60%, 더욱 적합하게, 70%, 더욱 적합하게, 80%, 더욱 적합하게, 90%, 더욱 적합하게, 95%, 더욱 적합하게, 99%, 가장 적합하게, 100%가 소장 및/또는 대장에 존재하는 프로테아제 및/또는 IBD 염증성 프로테아제에 노출된 후에도 무손상 상태 그대로 유지될 때, 실질적으로 무손상 상태 그대로 유지되는 것이다.

[0177] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 실질적으로 5시간 동안 시노물구스 원숭이의 위, 십이지장, 공장 또는 회장에의 노출 후에도 무손상 상태 그대로 유지된다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 실질적으로 16시간 동안 시노물구스 원숭이의 맹장 또는 결장에의 노출 후에도 무손상 상태 그대로 유지된다.

[0178] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 실질적으로 냉동 및 해동 후에도 폴리펩티드 또는 구축물의 원래의 중화 능력의 적합하게 10%, 더욱 적합하게, 20%, 더욱 적합하게, 30%, 더욱 적합하게, 40%, 더욱 적합하게, 50%, 더욱 적합하게, 60%, 더욱 적합하게, 70%, 더욱 적합하게, 80%, 더욱 적합하게, 90%, 더욱 적합하게, 95%, 더욱 적합하게, 100%가 유지될 때, 중화 능력을 유지하는 것이다.

[0179] **치료학적 용도 및 전달**

[0180] 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물의 치료학적 유효량은 대상체에게 단일 또는 다회 용량으로 투여되었을 때, 대상체에서 유의적인 정도로 TNF-알파를 중화시키는 데 효과적인 양이다. 치료학적 유효량은 인자, 예컨대, 질환, 개체의 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 유도할 수 있는 제약 조성물 또는 구축물의 능력에 따라 달라질 수 있다. 치료학적 유효량은 또한 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물의 임의의 독성 또는 해로운 독성을 치료학적 유의한 효과가 능가하는 양이다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 대상체에게 투여하는 데 적합한 제약 조성물 내로 도입될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 제약상 허용되는 염 형태일 수 있다.

[0181] 본 발명의 제약 조성물은 적합하게 경구, 근육내, 피하 또는 정맥내 전달용으로 제제화될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 다양한 형태일 수 있다. 이는 예를 들어, 액체, 반고체 및 고체 투여 형태, 예컨대, 액체 액제 (예컨대, 주사액 및 주입액), 분산제 또는 현탁제, 정제, 환제, 분제, 리포솜 및 좌제일 수 있다. 고체 투여 형태가 바람직하다. 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물은 부형제와 함께 도입될 수 있고, 섭취할 수 있는 정제, 흡착용 정제, 트로키, 캡슐제, 엘릭시르, 현탁제, 시럽제, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.

[0182] 전형적으로, 제약 조성물은 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물 및 제약상 허용되는 희석제 또는 담체를 포함한다. 제약상 허용되는 담체의 예로는 물, 염수, 포스페이트 완충처리된 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 뿐만 아니라, 그의 조합 중 하나 이상의 것을 포함한다. 제약상 허용되는 담체는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물의 보관 수명 또는 효과를 증진시키는 보조 물질, 예컨대, 습윤화제 또는 유화제, 보존제, 또는 완충제를 최소량으로 추가로 포함할 수 있다. 제약 조성물은 점착방지제, 결합제, 코팅제, 봉해제, 향미제, 착색제, 윤활제, 흡착제, 보존제, 감미제, 동결 건조 부형제 (동결건조보호제 포함) 또는 압착 보조제를 포함할 수 있다.

[0183] 가장 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 제약 조성물 또는 구축물은 경구적으로 투여된다. 경구 전달의 경우, 중요한 문제는 충분한 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물이, 그를 필요로 하는 장관 영역에 확실히 도달할 수 있도록 하는 것이다. 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물이, 그를 필요로 하는 장관 영역에 도달하지 못하게 막는 인자로는 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물을 분해할 수 있는 소화 분비물 중의 프로테아제의 존재를 포함한다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물은 폴리펩티드 또는 구축물 그 자체의 고유한 특성에 의해 상기 프로테아제 중 하나 이상의 것의 존재하에서도 실질적으로 안정적이다. 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 제약 조성물 내로 도입되기 이전에 동결건조된다.

[0184] 본 발명의 폴리펩티드는 또한 장용 코팅제와 함께 제공될 수 있다. 장용 코팅제는 위의 낮은 pH로부터 폴리펩

티드를 보호하는 데 도움을 주는, 경구용 약물 상에 도포된 중합체 장벽이다. 장용 코팅제용으로 사용되는 물질로는 지방산, 왁스, 셀락, 플라스틱, 및 식물 섬유를 포함한다. 적합한 장용 코팅제 성분으로는 메틸 아크릴레이트-메타크릴산 공중합체, 셀룰로스 아세테이트 숙시네이트, 히드록시 프로필 메틸 셀룰로스 프탈레이트, 히드록시 프로필 메틸 셀룰로스 아세테이트 숙시네이트 (히프로멜로스 아세테이트 숙시네이트), 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트 (PVAP), 메틸 메타크릴레이트-메타크릴산 공중합체, 알긴산 나트륨 및 스테아르산을 포함한다. 적합한 장용 코팅제로는 pH 의존성 방출 중합체를 포함한다. 이는 위에서 발견되는 고도로 산성인 pH에서는 불용성이지만, 산성이 더 낮은 pH에서는 빠르게 용해되는 중합체이다. 따라서, 적합하게, 장용 코팅제는 산성 위액 (pH ~3)에서는 용해되지 않지만, 소장 (pH 6 초과) 중에 또는 결장 (pH 7 초과) 중에 존재하는 더 높은 pH 환경에서는 용해될 것이다. pH 의존성 방출 중합체가 선택되며, 이로써, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물은 대략 투여량이 소장에 도달하는 시점에 방출될 것이다.

[0185] 본 발명의 폴리펩티드, 구축물 또는 제약 조성물은 그를 수성 또는 비수성 용매, 예컨대, 식물성 오일 또는 다른 유사 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족 산의 에스테르 또는 프로필렌 글리콜 중에; 및 원하는 경우, 통상의 첨가제, 예컨대, 가용제, 등장제, 현탁화제, 유화제, 안정화제 및 보존제와 함께 용해, 현탁 또는 유화시킴으로써 주사용 제제로 제제화될 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 및/또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수혜자에 대하여 비독성이며, 이는 완충제, 예컨대, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산, 글루타티온, 시스테인, 메티오닌 및 시트르산을 비롯한 항산화제; 보존제 (예컨대, 에탄올, 벤질알콜, 페놀, m-크레졸, p-클로르-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤, 벤즈알코늄 클로라이드, 또는 그의 조합); 아미노산 예컨대, 아르기닌, 글리신, 오르니틴, 리신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 이소류신, 류신, 알라닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 메티오닌, 세린, 프롤린 및 그의 조합; 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대, 젤라틴 또는 혈청 알부민; 킬레이팅제, 예컨대, EDTA; 당, 예컨대, 트레할로스, 수크로스, 락토스, 글루코스, 만노스, 말토스, 갈락토스, 프럭토스, 소르보스, 라피노스, 글루코사민, N-메틸글루코사민, 갈락토사민, 및 뉴라민산; 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리소르베이트, POE 에테르, 폴록사머, 트리톤-X, 또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0186] 본 발명의 제약 조성물은 (예를 들어, 자가면역 질환, 예컨대, 건선 또는 습진 치료에서의 사용을 위해) 국소적으로 피부에 전달될 수 있다. 상기 제약 조성물은 적합하게 크림제, 연고제, 로션제, 젤제, 폼제, 경피용 패치, 분제, 페이스트제 또는 틱크제 형태일 수 있고, 적합하게 비타민 D3 유사체 (예컨대, 칼시포트리올 및 막사칼시톨), 스테로이드 (예컨대, 플루티카손 프로피오네이트, 베타메타손 발레레이트 및 클로베타솔 프로피오네이트), 레티노이드 (예컨대, 타자로텐), 콜타르 및 디트라놀을 포함할 수 있다. 국소용 의약품은 대개 서로 조합되어 (예컨대, 비타민 D3 및 스테로이드), 또는 추가 작용제, 예컨대, 실리실산과 함께 사용된다. 본 발명의 제약 조성물을 건선 또는 습진 치료를 위해 국소적으로 전달하고자 하는 경우, 적합하게, 건선 또는 습진 치료에 효과적인 것으로 간주되는 추가 물질, 예컨대, 스테로이드, 특히, 클래스 4 또는 클래스 5 스테로이드, 예컨대, 히드로코르티손 (예컨대, 1% 히드로코르티손 크림제); 시클로스포린 또는 유사 마크몰라이드 작용제 또는 레티노이드가 조성물에 포함될 수 있다.

[0187] 모든 전달 모드를 위해, 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물은 조성물의 pH를 안정화시키기 위해 5-50g/l, 또는 더욱 적합하게, 15-40g/l 또는 더욱 적합하게, 25-30 g/l인 농도로 완충제 중에서 제제화될 수 있다. 적합한 완충제 성분의 예로는 생리학적 염, 예컨대, 시트르산 나트륨 및/또는 시트르산을 포함한다. 적합하게, 완충제는 100-200, 더욱 적합하게, 125-175 mM 생리학적 염, 예컨대, 염화나트륨을 포함한다. 적합하게, 완충제는 조성물의 pH, 또는 환자의 생리학적 pH에 가까운 pKa를 가지는 것으로 선택된다.

[0188] 제약 조성물 중의 예시적인 폴리펩티드 또는 구축물 농도는 약 1 mg/mL 내지 약 200 mg/ml, 또는 약 50 mg/mL 내지 약 200 mg/mL, 또는 약 150 mg/mL 내지 약 200 mg/mL 범위일 수 있다.

[0189] 본 발명의 폴리펩티드, 구축물 또는 제약 조성물의 수성 제제는 pH 완충처리된 용액 중에서, 예컨대, 약 4.0 내지 약 7.0, 또는 약 5.0 내지 약 6.0 범위의 pH, 대안적으로 pH 약 5.5에서 제조될 수 있다. 적합한 완충제의 예로는 포스페이트 완충제, 히스티딘 완충제, 시트레이트 완충제, 숙시네이트 완충제, 아세테이트 완충제 및 다른 유기산 완충제를 포함한다. 완충제 농도는 예를 들어, 완충제, 및 제제의 원하는 장성에 의존하여 약 1 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 50 mM일 수 있다.

[0190] 제약 조성물의 장성은 장성 개질제를 포함함으로써 변경될 수 있다. 상기 장성 개질제는 하전된 또는 비하전된 화학물질 중일 수 있다. 전형적인 비하전된 장성 개질제로는 당 또는 당 알콜 또는 다른 폴리올, 바람직하게, 트레할로스, 수크로스, 만니톨, 글리세롤, 1,2-프로판디올, 라피노스, 소르비톨 또는 락티톨 (특히,

트레할로스, 만닛톨, 글리세롤 또는 1,2-프로판디올)을 포함한다. 전형적인 하전된 장성 개질제로는 염, 예컨대, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 이온과 클로라이드, 술페이트, 카르보네이트, 술페이트, 니트레이트, 락테이트, 숙시네이트, 아세테이트 또는 말레이이트 이온과의 조합 (특히, 염화나트륨 또는 황산나트륨); 또는 아미노산, 예컨대, 아르기닌 또는 히스티딘을 포함한다. 적합하게, 수성 제제는 비록 고장성 또는 저장성 용액이 적합할 수도 있지만, 등장성이다. "등장성"이라는 용어는 용액이 그의 비교 대상이 되는 일부 다른 용액, 예컨대, 생리학적인 용액 또는 혈청과 동일한 장성을 가진다는 것을 나타낸다. 장성 작용제는 약 5 mM 내지 약 350 mM인 양으로, 예컨대, 1 mM 내지 500 mM인 양으로 사용될 수 있다. 적합하게, 적어도 하나의 등장성 작용제가 조성물에 포함된다.

[0191] 계면활성제는 또한 제제화된 폴리펩티드 또는 구축물의 응집을 감소시키고/거나, 제제 중 미립자의 형성을 최소화하고/거나, 흡착을 감소시키기 위해 제약 조성물에 첨가될 수 있다. 예시적인 계면활성제로는 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르 (트윈), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 (Brij), 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에테르 (트리톤-X), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체 (폴록사머, 플루로닉), 및 소듐 도데실 술페이트 (SDS)를 포함한다. 적합한 폴리옥시에틸렌소르비탄-지방산 에스테르의 예로는 폴리소르베이트 20, 및 폴리소르베이트 80이 있다. 계면활성제의 예시적인 농도는 약 0.001% w/v 내지 약 10% w/v 범위일 수 있다.

[0192] 동결건조 프로세스 동안 탈안정화 조건으로부터 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물을 보호하기 위해 동결건조보호제 또한 첨가될 수 있다. 예를 들어, 공지된 동결건조보호제로는 당 (글루코스, 수크로스, 만노스 및 트레할로스 포함); 폴리올 (만닛톨, 소르비톨 및 글리세롤 포함); 및 아미노산 (알라닌, 글리신 및 글루탐산 포함)을 포함한다. 동결건조보호제는 약 10 mM 내지 500 mM의 양으로 포함될 수 있다.

[0193] 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 제약 조성물 또는 구축물 투여를 위한 투여량 범위는 원하는 치료학적 효과를 발휘하는 투여량이다. 필요한 투여량 범위는 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물의 정확한 성질, 투여 경로, 제제의 성질, 환자의 연령, 환자의 병태의 성질, 정도 또는 중증도, 존재하는 경우, 사용 금지 사항, 및 주치의의 판단에 의존한다. 최적화를 위한 표준 실험상의 통상적 방법을 사용하여 상기 투여량 수준의 변동은 조정될 수 있다.

[0194] 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 제약 조성물 또는 구축물의 적합한 1일 투여량은 50 ng-50 mg/kg (체중), 예컨대, 50 ug-40 mg/kg (체중), 예컨대, 5-30 mg/kg (체중) 범위이다. 단위 투여량은 100 mg 미만으로부터 달라질 수 있지만, 전형적으로는 1회 투약당 250-2,000 mg인 범위가 될 것이며, 이는 1일당 또는 더욱 빈번하게, 예를 들어, 1일 2, 3 또는 4회, 또는 덜 빈번하게, 예를 들어, 2주마다, 또는 주당 1회, 2주일당 1회, 또는 월 1회로 투여될 수 있다.

[0195] 본 발명의 한 측면에서, 자가면역 질환 치료용 의약 제조에서의 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물의 용도를 제공한다. 본 발명의 추가 측면에서, 자가면역 질환 치료를 필요로 하는 인간에게 치료학적 유효량의, 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물을 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0196] '치료'라는 단어는 예방적인 것 뿐만 아니라, 치료학적 치료를 포함하는 것으로 의도된다. 질환 치료는 그의 악화를 치료하는 것을 포함하고, 이는 또한 질환 증상의 재발을 막기 위해 질환 증상으로부터 차도가 있도록 환자를 치료하는 것을 포함한다.

[0197] **조합 요법**

[0198] 본 발명의 제약 조성물은 또한 하나 이상의 활성제 (예컨대, 본원에 언급된 질환 치료용의 활성제)를 포함할 수 있다. 자가면역 질환 치료에서 일반적으로 사용되는 확립된 다른 요법에 대한 부가물로서, 또는 그와 함께 자가면역 질환 치료를 위한 치료 방법에서 본 발명의 제약 조성물을 사용하는 것이 본 발명의 범주 내에 포함된다.

[0199] IBD (예컨대, 크론병 또는 궤양성 대장염) 치료를 위해, 가능한 조합은 예를 들어, 5-아미노살리실산, 또는 그의 프로드럭 (예컨대, 술페살라진, 올살라진 또는 비살라지드); 코르티코스테로이드 (예컨대, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 또는 부데소니드); 면역억제제 (예컨대, 시클로스포린, 타크로리무스, 메토트렉세이트, 아자티오프린 또는 6-메르캅토피린); 항-TNF-알파 항체 (예컨대, 인플릭시맵, 아달리무맵, 세르틀리주맵 페골 또는 골리무맵); 항-IL12/IL23 항체 (예컨대, 우스테키누맵); 항-IL6R 항체 또는 소분자 IL12/IL23 억제제 (예컨대, 아필리모드); 항-알파-4-베타-7 항체 (예컨대, 베돌리주맵); MAdCAM-1 차단제 (예컨대, PF-00547659); 세포 부착 분자 알파-4-인테그린에 대한 항체 (예컨대, 나탈리주맵); IL2 수용체 알파 서브유닛에 대한 항체 (예컨대,

다클리주맙 또는 바실릭시맙); JAK3 억제제 (예컨대, 토파시티닙 또는 R348); Syk 억제제 및 그의 프로드럭 (예컨대, 포스타마티닙 및 R-406); 포스포디에스테라제-4 억제제 (예컨대, 테토밀라스트); HMP-004; 프로바이오틱스; 데르살라진; 세마피모드/CPSI-2364; 및 단백질 키나제 C 억제제 (예컨대, AEB-071)를 포함하는 목록으로부터 선택되는 하나 이상의 활성제와의 조합을 포함한다. 가장 적합한 조합 작용제는 인플릭시맙, 아달리무맙, 세르틀리주맙 페골 또는 골리무맙이다.

[0200] 그러므로, 본 발명의 또 다른 측면은 하나 이상의 추가의 활성제, 예를 들어, 상기 기술된 하나 이상의 활성제와 함께 조합된 본 발명의 제약 조성물을 제공한다.

[0201] 본 발명의 추가 측면에서, 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물은 상기 목록으로부터 선택되는 적어도 하나의 활성제와 순차적으로, 동시에 또는 별개로 투여된다.

[0202] 유사하게, 본 발명의 또 다른 측면은

[0203] (A) 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물; 및

[0204] (B) 하나 이상의 다른 활성제를 포함하는 조합 생성물로서,

[0205] 여기서, 성분 (A) 및 (B)가 각각 제약상 허용되는 애주번트, 희석제 또는 담체와 함께 혼합되어 제제화되는 것인 조합 생성물을 제공한다. 본 발명의 본 측면에서, 조합 생성물은 단일 (조합) 제제 또는 부품들의 키트일 수 있다. 따라서, 본 발명의 본 측면은 제약상 허용되는 애주번트, 희석제 또는 담체와 함께 혼합하여, 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물을 포함하는 조합 제제를 포함한다.

[0206] 본 발명은 또한 성분:

[0207] (i) 제약상 허용되는 애주번트, 희석제 또는 담체와 함께 혼합된 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물; 및

[0208] (ii) 제약상 허용되는 애주번트, 희석제 또는 담체와 함께 혼합된 하나 이상의 다른 활성제를 포함하는 제제를 포함하고, 성분 (i) 및 (ii)는 각각 서로 함께 투여되는 데 적합한 형태로 제공되는 것인, 부품들의 키트도 포함한다.

[0209] 따라서, 부품들의 키트의 성분 (i)은 제약상 허용되는 애주번트, 희석제 또는 담체와 함께 혼합되는 상기 성분 (A)이다. 유사하게, 성분 (ii)는 제약상 허용되는 애주번트, 희석제 또는 담체와 함께 혼합되는 상기 성분 (B)이다. 하나 이상의 다른 활성제 (즉, 상기 성분 (B))는 예를 들어, 자가면역 질환 예컨대, IBD (예컨대, 크론병 및/또는 궤양성 대장염) 치료와 관련하여 상기 언급된 작용제들 중 임의의 것일 수 있다. 성분 (B)가 1개 초과인 추가 활성제일 경우, 이들 추가 활성제는 서로 제제화될 수 있거나, 또는 성분 (A)로 제제화될 수 있거나, 또는 별개로 제제화될 수 있다. 한 실시양태에서, 성분 (B)는 다른 한 치료제이다. 또 다른 실시양태에서, 성분 (B)는 2개의 다른 치료제이다. 본 발명의 본 측면의 조합 생성물 (조합된 제제 또는 부품들의 키트)은 자가면역 질환 (예컨대, 본원에서 언급된 자가면역 질환)의 치료 또는 예방에서 사용될 수 있다.

[0210] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물은 의약으로서 사용하기 위한 것, 및 자가면역 및/또는 염증성 질환 치료용 의약으로서 사용하기 위한 것이다.

[0211] **자가면역 질환 및/또는 염증성 질환**

[0212] 자가면역 질환은 면역계가 정상적인 신체 조직에 불리하게 반응할 때 발생한다. 자가면역 장애는 신체 조직을 손상시키고/거나, 비정상적인 기관 성장을 일으키고/거나, 기관 기능을 변화시킬 수 있다. 상기 장애는 오직 한 기관 또는 조직 유형에만 영향을 줄 수 있거나, 또는 다중 기관 및 조직에 영향을 줄 수 있다. 일반적으로 자가면역 장애에 의해 영향을 받는 기관 및 조직으로는 혈액 성분, 예컨대, 적혈구, 혈관, 결합 조직, 내분비선, 예컨대, 갑상선 또는 췌장, 근육, 관절 및 피부를 포함한다. 염증성 질환은 염증을 특징으로 하는 질환이다. 다수의 염증성 질환은 자가면역 질환이고, 그 반대의 경우도 그러하다.

[0213] GIT의 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환

[0214] 아동 및 성인, 둘 모두에서 이환되는 것인 만성 염증성 장 질환 (IBD) 크론병 및 궤양성 대장염은 GIT의 자가면역 및 염증성 질환의 예이다 (문헌 [Hendrickson et al., 2002 *Clin Microbiol Rev* 15(1):79-94], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 궤양성 대장염은 염증성 반응 및 형태학적 변화가 결장으로 국한된 상태로 유지되는 병태인 것으로 정의된다. 직장은 환자 중 95%에 연루되어 있다. 염증은 대개 점막으로 제한되

고, 결장 길이를 따라 진행되는 궤양 형성, 부종, 및 출혈과 함께 다양한 중증도의 연속된 병발로 구성된다 (문헌 [Hendrickson et al., 2002 *Clin. Microbiol Rev* 15(1):79-94], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 궤양성 대장염은 보통, 배변 통과 동안에 가장 심각한 경련성 하복부 복통과 함께, 대변에 섞인 혈액 및 점액이 존재하는 소견을 나타낸다. 임상적으로, 혈액 및 점액을 포함하는 설사의 존재를 통해 궤양성 대장염은, 혈액이 존재하지 않는 과민성 장 증후군과 구별된다. 궤양성 대장염과 달리, 크론병으로 나타나는 것은 보통 감지하기가 어렵고, 이로 인해 후반에 진단을 받게 된다. 인자, 예컨대, 병발 위치, 정도, 및 중증도가 위장 증상의 정도를 결정짓는다. 회결장 병발을 앓는 환자는 보통 우하복 4분부 압통 및 간헐성 염증성 덩어리와 함께 식후 복통을 앓는다. 위 십이지장 크론병과 관련된 증상으로는 조기 포만감, 구역, 구토, 심와부 통증, 또는 연하곤란을 포함한다. 항문 꼬리, 항문 심부 열창, 및 누공과 함께 항문 주변 질환이 일반적이다 (문헌 [Hendrickson et al., 2002 *Clin Microbiol Rev* 15(1):79-94], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다).

[0215] 상기 질환에서, TNF-알파는 위장 상피 밑에 있는 점막 고유층에서 생산된다. 상기 상피는 IBD에서 파괴되고, TNF-알파의 생산 부위이자, 상기 질환의 생물학적 작용 부위인 점막 고유층으로의 면역글로불린쇄 가변 도메인의 수송을 촉진시킨다 (실시예 8 참조). GIT의 다른 질환으로는 예를 들어, 면역글로불린쇄 가변 도메인의 TNF-알파 생산 부위의 접근도 허용하는 상피 밀착 연결부를 허용하는 염증성 병변이 점막에 존재하는 염증성 질환 점막염 (적합하게, 약물 및 방사선 유도성 점막염)을 포함한다. 점막염에서 병변은 입부터 항문까지 어디에서나 발생할 수 있고, 입 및 식도 병변인 경우, 가변 도메인을 함유하는 구강 청결제 또는 크림제 제제가 사용될 수 있다. 항문 및 직장 병변인 경우, 가변 도메인을 함유하는 좌제, 크림제, 또는 폼제가 국소 적용용으로 적합할 것이다. 면역글로불린쇄 가변 도메인은 염증 부위에서의 혈류 내로의 흡수를 통해 또는 림프성 제거, 및 이어서, 혈류 내로의 유입을 통해 점막 고유층 또는 다른 염증성 부위로부터 제거될 것이다. 이로써, 도메인은 혈류를 통해 간에 도달하게 될 것이며, 신장에서의 사구체 여과를 통해 제거될 것이다. 그러므로, 도메인이 질환, 예컨대, 자가면역 간염, II형 당뇨병 및 사구체신염에서 치료학적으로 작용하게 된다는 것은 충분히 이론적으로 설명이 된다.

[0216] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물은 TNF-알파가 GI (위장) 관의 자가면역 및/또는 염증성 질환의 병상의 원인이 되는 상기 질환의 치료에서 사용된다.

[0217] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물은 크론병, 궤양성 대장염, 과민성 장 질환, II형 당뇨병, 사구체신염, 자가면역 간염, 쇼그렌 증후군, 셀리악병 및 약물 또는 방사선 유도성 점막염 (가장 적합하게, 크론병)으로 구성된 목록으로부터 선택되는 GI 관의 자가면역 및/또는 염증성 질환의 치료에서 사용하기 위한 것이다.

[0218] 이상적으로는 면역글로불린쇄 가변 도메인의 경구적 전달이, TNF-알파가 염증성 질환 병상의 적어도 일부의 원인이 되는 염증성 질환을 치료할 것이며, 면역글로불린쇄 가변 도메인은 TNF-알파가 생물학적으로 활성을 띠는 조직에 접근할 수 있다.

[0219] 피부의 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환

[0220] 건선은 쇠약성 자가면역, 피부과학적 질환이다. 상기 질환의 가장 일반적인 형태인 플라크 건선은 은색 비늘로 덮여 있는 붉은 색 피부를 특징으로 한다. 조직학상, 상기와 같은 용태는 염증성 세포 침윤물을 포함하는 건선성 플라크 내의 케라틴세포의 이화된 분화 및 과다증식 중 하나이다 (문헌 [Ortonne, 1999 *Brit J Dermatol* 140(suppl 54):1-7]). 건선성 피부 병변은, 특징적인 은색의 광택이 나는 낙설과 함께, 다양한 형상의 뚜렷이 구분되는 염증성의 붉은 플라크이다. 건선이라는 용어는 건선, 및 홍반, 피부 비후/용기 및 낙설을 비롯한, 건선의 증상을 포함한다.

[0221] 건선 치료에서 사용하기 위한 생물학적 작용제로는 항-TNF-알파 요법 (예컨대, TNF에 대한 모노클로날 항체, 예컨대, 아달리무맙 및 인플릭시맙, 또는 TNF-알파 수용체 융합 단백질, 예컨대, 에타네르셉트), CD11a에 대한 인간화 항체 (예팔리주맙) 또는 CD2에 결합하는 (이로써, CD2 LFA3 상호작용을 차단하는) 작용제, 예컨대, 알레파셉트를 포함한다. 여기 열거된 생물학적 작용제 모두가 건선 치료용으로 승인을 받은 것은 아니라는 것에 주의하여야 한다.

[0222] 본 발명의 폴리펩티드는, TNF-알파가 병변의 병상의 원인이 되는 염증성 피부 병변에의 투여를 위한 크림제/연고제 또는 다른 국소용 담체로 도입될 수 있다.

[0223] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물은 수포창, 건선, 습진 및 경피증으로 구성된 목록으

로부터 선택되는 피부의 자가면역 및/또는 염증성 질환 치료에서 사용하기 위한 것이다.

- [0224] 적합하게, 폴리펩티드, 제약 조성물 또는 구축물은 TNF-알파가 관찰되는 병상의 상당부를 담당하는 다른 자가면역/염증성 질환 치료에서 사용하기 위한 것이다.
- [0225] **제조 방법**
- [0226] 본 발명의 폴리펩티드는 예를 들어, 문헌 [Green and Sambrook 2012 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press]에 개시된 기법을 사용하여 획득되고, 조작될 수 있다.
- [0227] 모노클로날 항체는 하이브리도마 기술을 사용하여 특정 항체 생산 B 세포를, 조직 배양물 중에서 성장할 수 있는 그의 능력 및 항체쇄 합성 부재에 대하여 선별된 골수종 (B 세포 암) 세포와 융합시킴으로써 제조될 수 있다 (문헌 [Kohler and Milstein 1975 *Nature* 256:495-497] 및 [Nelson et al., 2000 *Molecular Pathology* 53(3):111-117], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다).
- [0228] 결정된 항원에 대한 모노클로날 항체는 예를 들어,
- [0229] a) 하이브리도마를 형성하기 위해, 앞서 결정된 항원으로 면역화된 동물의 말초 혈액으로부터 획득된 림프구를 불멸 세포 및 바람직하게, 골수종 세포로 무한증식시키고,
- [0230] b) 형성된 무한증식된 세포 (하이브리도마)를 배양하고, 원하는 특이성을 가지는 항체를 생산하는 세포를 회수함으로써 획득될 수 있다.
- [0231] 대안적으로, 하이브리도마 세포 사용이 요구되는 것은 아니다. 따라서, 모노클로날 항체는
- [0232] a) (적합하게, 앞서 결정된 항원으로 면역화된) 동물의 림프구, 특히, 말초 혈액 림프구로부터 획득된 DNA 또는 cDNA 서열을 벡터로, 특히, 파지로, 및 더욱 특히, 사상성 박테리오파지로 클로닝하는 단계,
- [0233] b) 원핵 세포를 항체 생산을 허용하는 조건하에서 상기 벡터로 형질전환시키는 단계,
- [0234] c) 이에 대하여 항원 친화성 선별을 수행하여 항체를 선별하는 단계,
- [0235] d) 원하는 특이성을 가지는 항체를 회수하는 단계를 포함하는 방법에 의해 획득될 수 있다.
- [0236] 낙타과를 면역화하고, 혈중 순환 B 세포의 VHH 레퍼토리를 클로닝하고 (문헌 [Chomezynski and Sacchi 1987 *Anal Biochem* 162:156-159]), 및 파지, 효모, 또는 리보솜을 이용하여 면역 (문헌 [Arbabi-Ghahroudi et al., 1997 *FEBS Lett* 414:521-526]) 및 비면역 (문헌 [Tanha et al., 2002 *J Immunol Methods* 263:97-109]) 라이브러리로부터 항원 특이 VHH를 단리시키는 방법은 공지되어 있다 (문헌 W092/01047, [Nguyen et al., 2001 *Adv Immunol* 79:261-296] 및 [Harmsen et al., 2007 *Appl Microbiol Biotechnol* 77(1):13-22]). 상기 참고 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.
- [0237] 항체의 항원 결합 단편, 예컨대, scFv 및 Fv 단편을 단리시키고, 이, 콜라이에서 발현시킬 수 있다 (문헌 [Miethe et al., 2013 *J Biotech* 163(2):105-111], [Skerra et al., 1988 *Science* 240(4855):1038-1041] 및 [Ward et al., *Nature* 1989 341:544-546], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다).
- [0238] 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대하여 침묵이지만, 특정 숙주에서의 번역에 바람직한 코돈을 제공하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 cDNA로 돌연변이화시킬 수 있다. 예컨대, 이. 콜라이 및 에스. 세레비시아에(*S. cerevisiae*)에서의 핵산 번역에 바람직한 코돈은 공지되어 있다.
- [0239] 폴리펩티드의 돌연변이는 예를 들어, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에의 치환, 부가 또는 결실에 의해 달성될 수 있다. 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에의 치환, 부가 또는 결실은 예를 들어, 오류 유발 PCR, 서플링, 올리고뉴클레오티드-유도 돌연변이유발, 어셈블리 PCR, PCR 돌연변이유발, 생체내 돌연변이유발, 카세트 돌연변이유발, 순환 양상돌연변이유발, 지수적 양상돌연변이유발, 부위 특이적 돌연변이유발 (문헌 [Ling et al., 1997 *Anal Biochem* 254(2):157-178], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다), 유전자 리어셈블리, 유전자 부위 포화 돌연변이유발 (GSSM), 합성 라이게이션 리어셈블리 (SLR) 또는 상기 방법의 조합을 비롯한, 다수의 방법에 의해 도입될 수 있다. 핵산에의 변형, 부가 또는 결실 또한 재조합, 순환 서열 재조합, 포스포티오에이트 변형된 DNA 돌연변이유발, 우라실 함유 주형 돌연변이유발, 갭이 있는 이중 돌연변이유발, 점 미스매치 수복 돌연변이유발, 수복 결핍 숙주 균주 돌연변이유발, 화학적 돌연변이유발, 방사성 돌연변이유발, 결실 돌연변이유발, 제한-선별 돌연변이유발, 제한-정제 돌연변이유발, 양상돌연변이유발, 키메라 핵산 다량체 생성, 또는

그의 조합을 포함하는 방법에 의해 도입될 수 있다.

- [0240] 특히 인공 유전자 합성이 사용될 수 있다 (문헌 [Nambiar et al., 1984 *Science* 223:1299-1301], [Sakamar and Khorana 1988 *Nucl. Acids Res* 14:6361-6372], [웰 et al., 1985 *Gene* 34:315-323] 및 [Grundstrom et al., 1985 *Nucl. Acids Res* 13:3305-3316], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 유전자는 예를 들어, 고체상 DNA 합성에 의해 합성적으로 제조될 수 있다. 전체 유전자는 전구체 주형 DNA를 필요로 하지 않으면서, 새로 합성될 수 있다. 원하는 올리고뉴클레오티드를 획득하기 위해, 빌딩 블록을 생성물 서열에 필요한 순서로 성장 올리고뉴클레오티드에 순차적으로 커플링시킨다.쇄 어셈블리 완료시, 생성물을 고체상으로부터 용액으로 유리시키고, 탈보호화하고, 수집한다. 생성물을 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)에 의해 단리시켜 고순도의 원하는 올리고뉴클레오티드를 획득할 수 있다 (문헌 [Verma and Eckstein 1998 *Annu Rev Biochem* 67:99-134]).
- [0241] 면역글로불린쇄 가변 도메인, 예컨대, VH 및 VHH의 발현은 (예를 들어, W094/04678 (상기 문헌은 본원에서 참조로 포함되고, 하기에서 추가로 상세하게 설명된다)에 개시된 프로토콜에 따라) 적합한 발현 벡터, 예컨대, 원핵 세포, 예컨대, 박테리아, 예를 들어, 이. 콜라이를 사용하여 달성될 수 있다. 면역글로불린쇄 가변 도메인, 예컨대, VH 및 VHH의 발현은 또한 진핵 세포, 예를 들어, 곤충 세포, CHO 세포, 베로(Vero) 세포 또는 적합하게, 효모 세포, 예컨대, 아스페르길루스 속, 사카로마이세스 속, 클루이베로마이세스 속, 한세놀라 속 또는 피치아 속에 속하는 효모를 사용하여 달성될 수 있다. 적합하게, (예를 들어, W094/025591 (상기 문헌은 본원에서 참조로 포함되고, 하기에서 추가로 상세하게 설명된다)에 개시된 프로토콜에 따라) 에스. 세레비시아에가 사용된다.
- [0242] 구체적으로, VHH는 이. 콜라이 세포를 사용하여 W094/04678에 개시된 방법에 따라
- [0243] a) 임의적으로 His-태그를 포함하는 (예를 들어, 낙타과의 림프구로부터 획득되거나, 또는 합성적으로 제조된) VHH를 코딩하는 DNA 또는 cDNA 서열을 블루스크립트(Bluescript) 벡터 (애질런트 테크놀로지즈(Agilent Technologies))에 클로닝하는 단계,
- [0244] b) XhoI 부위를 함유하는, VHH에 대하여 특이적인 5' 프라이머, 및
- [0245] 서열
- [0246] TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG (서열번호 58)를 가지는 SpeI 부위를 포함하는 3' 프라이머를 사용하는 증폭 이후에 클로닝된 단편을 회수하는 단계,
- [0247] c) 벡터를 XhoI 및 SpeI 제한 효소로 소화시킨 후, 상에서 회수된 단편을 면역 PBS 벡터에 클로닝시키는 단계 (문헌 [Huse et al., 1989 *Science* 246 (4935):1275-1281], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다),
- [0248] d) 형질감염에 의해 숙주 세포, 특히, 이. 콜라이를 단계 c의 재조합 면역 PBS 벡터로 형질전환시키는 단계,
- [0249] e) 예를 들어, 친화성 정제에 의해, 예컨대, VHH가 His-태그를 포함하는 경우, 단백질 A, 양이온 교환, 또는 니켈-친화성 수지를 이용하는 칼럼 상의 크로마토그래피에 의해 VHH 코딩 서열의 발현 생성물을 회수하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0250] 대안적으로, 면역글로불린쇄 가변 도메인, 예컨대, VH 및 VHH는
- [0251] a) 결정된 특이적 항원 결합 부위를 VHH에 대하여 코딩하는 DNA 또는 cDNA 서열을 획득하는 단계,
- [0252] b) 개시 코돈 및 HindIII 부위를 함유하는 5' 프라이머, 및 XhoI 부위를 가지는 종결 코돈을 함유하는 3' 프라이머를 사용하여 획득된 DNA 또는 cDNA를 증폭시키는 단계,
- [0253] c) 증폭된 DNA 또는 cDNA를 플라스미드 pMM984의 HindIII (2650번 위치) 및 XhoI (4067번 위치) 부위로 재조합하는 단계 (문헌 [Merchinsky et al., 1983 *J. Virol.* 47:227-232], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다),
- [0254] d) 허용 세포 특히, NB-E 세포 (문헌 [Faisst et al., 1995 *J Virol* 69:4538-4543], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)를 재조합 플라스미드로 형질감염시키는 단계,
- [0255] e) 획득된 생성물을 회수하는 단계를 포함하는 방법에 의해 획득가능하다.
- [0256] 추가로, 면역글로불린쇄 가변 도메인, 예컨대, VHH 또는 VH는 문헌 [Frenken et al., 2000 *J Biotech* 78:11-

21] 및 W099/23221 (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 개시된 방법에 따라 이. 콜라이 또는 에스. 세레비시아에를 사용하여 하기와 같이 제조될 수 있다:

[0257] 면역화된 라마로부터 혈액 샘플을 채취하고, 피콜(Ficoll) (수용액 중에서 쉽게 용해되는 중성, 고분자형, 고질량, 친수성 다당류 - 파마시아(Pharmacia)) 불연속 구배 원심분리를 통해 림프구 집단을 강화시키고, 산 구아니디늄 티오시아네이트 추출에 의해 전체 RNA를 단리시키고 (문헌 [Chomezynski and Sacchi 1987 *Anal Biochem* 162:156-159]), (예컨대, cDNA 키트, 예컨대, RPN 1266 (애머삼(Amersham))을 사용하여) 제1 가닥 cDNA 합성을 수행한 후, W099/23221의 22 및 23페이지에 상세하게 설명된 특이적 프라이머를 사용하여 VHH 및 VH 단편, 및 짧은 또는 긴 힌지 영역의 일부를 코딩하는 DNA 단편을 증폭시킨다. PstI 및 HindIII 또는 BstEII 를 이용하여 PCR 단편을 소화시켰을 때, 길이가 약 300 내지 450 bp인 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 통해 정제시키고, 각각 이. 콜라이 파지미드 벡터 pUR4536 또는 에피솜 에스. 세레비시아에 발현 벡터 pUR4548에 라이게이션시킨다. pUR4536은 pHEN으로부터 유도된 것이고 (문헌 [Hoogenboom et al., 1991 *Nucl Acid Res* 19:4133-4137], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다), 라마 VHH 및 VH 유전자의 클로닝을 허용하는 독특한 제한 부위 및 lacI^q 유전자를 함유한다. pUR4548은 pSY1으로부터 유도된 것이다 (문헌 [Harmsen et al., 1993 *Gene* 125:115-123], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 상기 플라스미드로부터 leu2 유전자 중의 BstEII 부위를 PCR을 통해 제거하고, VH/VHH 유전자 단편의 클로닝을 촉진시키기 위해 SUC2 신호 서열과 종결인자 사이의 클로닝 부위를 대체한다. VH/VHH는 검출을 위해 C 말단에 c-myc 태그를 가진다. 1% 글루코스 및 100 mg L⁻¹ 암피실린으로 보충된 150 ml 2TY 배지를 함유하는 96 웰 마이크로타이터 플레이트로 개별 이. 콜라이 JM109 콜로니를 옮긴다. 밤새도록 성장시킨 후 (37°C), 100 mg L⁻¹ 암피실린 및 0.1 mM IPTG 를 함유하는 2TY 배지 중에서 플레이트를 이중으로 복제한다. 추가로 또 밤새도록 인큐베이션시키고, 임의적으로 냉동 및 해동시킨 후, 세포를 원심분리하고, 펠릿화하고, 상청액을 ELISA에서 사용할 수 있다. 개별 에스. 세레비시아에 콜로니를 (필수 아미노산 및 염기로 보충된, 0.7% 효모 질소 염기, 2% 글루코스를 포함하는) 선별 최소 배지를 함유하는 시험관으로 옮기고, 30°C에서 48 h 동안 성장시킨다. 이어서, 배양물을 (1% 효모 추출물, 2% 박토 펩톤 및 5% 갈락토스를 포함하는) YPGal 배지 중에서 10배 희석시킨다. 24 및 48 h 성장 후, 세포를 펠릿화하고, 배양물 상청액을 ELISA로 분석할 수 있다. 임의적으로 600 nm에서의 흡광도 (OD600)를 측정한다.

[0258] 추가로, 하기와 같은 방법을 사용하여 에스. 세레비시아에를 이용함으로써 면역글로불린쇄 가변 도메인, 예컨대, VH/VHH를 제조할 수 있다:

[0259] VH/VHH를 코딩하는 자연적으로 발생된 DNA 서열을 단리시키거나, 또는 5'-UTR, 신호 서열, 종결 코돈을 포함하고, SacI 및 HindIII 부위가 측면에 있는, VH/VHH를 코딩하는 합성적으로 제조된 DNA 서열을 수득한다 (상기 합성 서열은 상기 개략적으로 설명된 바와 같이 제조될 수 있거나, 또는 상업적 공급업체, 예컨대, 진아트 (Geneart) (라이프 테크놀로지즈(Life Technologies))로부터 주문할 수 있다.

[0260] 하기와 같이, VH/VHH 유전자를 다중 카피 통합 (MCI) 벡터 pUR8569 또는 pUR8542로 전달하기 위해 제한 부위를 사용한다. 37°C에서 밤새도록 25 ul VHH DNA (진아트 플라스미드 또는 MCI 벡터), 1 ul SacI, 1 ul HindIII, 3 ul의, 이중 소화에 적합한 완충제, 예컨대, NEB 완충제 1 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))을 이용하여 임의적으로, SacI 및 HindIII를 포함하는 MCI 벡터 및 서플 벡터, 카세트 또는 다른 합성 유전자 구축물 내에 함유되어 있는, VHH를 코딩하는 DNA 서열을 절단한다. 25 ul의 소화된, VHH를 코딩하는 DNA 및 25 ul의 소화된 MCI 벡터를 1.5% 아가로스 겔 상에서 1xTAE 완충제와 함께 전개시킨 후, 예를 들어, QIA퀵 겔 엑스트랙션 키트(QIAquick Gel Extraction Kit) (퀴아젠(Qiagen))을 이용하여 겔 추출을 수행한다. 소화된 MCI 벡터 및 소화된, VH/VHH를 코딩하는 DNA의 라이게이션을 하기와 같이 셋업한다: 100 ng 벡터, 30 ng VHH 유전자, 1.5 ul 10x 리가제 완충제, 1 ul T4 DNA 리가제, 및 ddH₂O. 이어서, 16°C에서 밤새도록 라이게이션을 수행한다.

[0261] 이어서, 이. 콜라이 세포를 형질전환시킨다. 화학 적격 XL-1 블루 세포의 경우, 200 ul 열 적격 XL-1 블루 세포를 해동시키고, 약 30분 동안 얼음 상에서 5 ul 라이게이션 믹스를 첨가한 후, 42°C에서 90초 동안 열 충격을 가한다. 이어서, 2% 글루코스로 보충된 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 저염 배지 800 ul를 첨가하고, 37°C에서 2시간 동안 세포를 회수한다. 루리아-베르타니 아가 및 암피실린 (100 ug/ml) 플레이트 상에 세포를 플레이트팅하고, 37°C에서 밤새도록 유지시킨다. 전기 적격 TG1 이. 콜라이 세포의 경우, 전기천공 큐베트를 이용한다. 전기천공 큐베트에서: 약 15분 동안 얼음 상에서 50 ul 전기 적격 TG1 세포 및 1 ul 라이게이션 믹스를 해동

시킨다. 홀더에 큐베트를 놓고, 펼싱한다. 500 ul 2TY 배지를 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 세포를 회수한다. 암피실린 (100 ug/ml) 및 2% 글루코스를 함유하는 루리아-베르타니 아가 플레이트 상에 100 ul 세포를 플레이팅한다. 플레이트를 37°C에서 밤새도록 유지시킨다.

[0262] 상기 상세하게 설명된 바와 같이, VH/VHH 유전자를 이. 콜라이로 클로닝한 후, 에스. 세레비시아에를 선형화된 MCI 벡터로 형질전환시킬 수 있다. 형질전환을 수행하기 이전에, 일부 단계를 수행한다: (i) DNA는 소화에 의해 환형에서 선형으로 변경되어야 하며, 그렇지 않으면, DNA는 효모 계층 내로 통합될 수 없고, (ii) 소화된 DNA는 에탄올 침전에 의해 불순물 제거가 이루어져야 한다. 또한, 형질전환 프로세스 동안, 효모 세포는 반투과성으로 제조되고, 이로써, DNA가 막을 통과할 수 있다.

[0263] 효모 형질전환을 위한 준비: 하기와 같이, VH/VHH 유전자를 발현하는 선별된 이. 콜라이 콜로니로부터 제조된 미디-프랩의 HpaI 소화를 수행한다. 20 ng의 미디-프랩, 5 ul HpaI, 10 ul 적절한 완충제, 예컨대, NEB4 완충제 (바이오랩스(BioLabs)), 및 ddH₂O를 함유하는 100 ul 용액을 제조한다.

[0264] DNA를 실온에서 밤새도록 HpaI로 절단한다. 이어서, 에탄올 침전을 수행한다 (그리고, 5 ul 샘플을 HpaI 소화로부터 별개로 처리한다). 300 ul 에탄올 100%를 95 ul HpaI 소화된 미디-프랩에 첨가하고, 와동시키고, 5분 동안 전속력으로 회전시킨다. 펠릿이 존재할 경우, 주의를 기울여 경사 분리하고, 100 ul의 에탄올 70%를 첨가한 후, 다시 5분 동안 전속력으로 회전시킨다. 샘플을 다시 경사 분리하고, 펠릿이 건조될 때까지 50-60°C에서 유지시킨다. 펠릿을 50 ul ddH₂O 중에 재현탁시킨다. 5 ul HpaI 소화된 샘플 이외에도, 5 ul를 겔 상에서 전개시킨다.

[0265] 효모 형질전환: YNBglu 플레이트를 준비한다. 10 g 아가 + 425 ml (멸균된) 물, 25 ml 여과된 20x YNB (25 ml 멸균된 H₂O 중 3.35g YNB (효모 질소 염기)) 및 50 ml 멸균 20% 글루코스를 사용하고, 이를 페트리 디쉬에 붓는다. 마스터플레이트로부터 1개의 효모 콜로니를 채취하고, 30°C에서 밤새도록 3 ml YPD (효모 추출물 펩톤 텍스트로스) 중에서 성장시킨다. 다음날, 약 600 ml YPD를 제조하고, 이를 사용하여 3개의 플라스크를 275 ml, 225 ml 및 100 ml YPD로 충전시킨다. 27.5 ul 효모 YPD 배양물을 제1 플라스크에 첨가하고, 온화하게 혼합한다. 제1 플라스크로부터 75 ml를 채취하고, 이를 제2 플라스크에 넣고, 온화하게 혼합한다. 제2 플라스크로부터 100 ml를 채취하고, 이를 제3 플라스크에 넣고, 온화하게 혼합한다. OD660가 1 내지 2에 도달할 때까지 성장시킨다. 상기 OD에 도달한 플라스크를 4개의 팔콘(Falcon) 튜브에 각각 ± 45 ml씩으로 나눈다. 2분 동안 4,200 rpm으로 회전시킨다. 상청액을 경사 분리한다. (튜브 개수를 4개에서 2개로 감소시키면서) 2개의 팔콘 튜브 중의 펠릿을 45 ml H₂O로 용해시킨다. 2분 동안 4,200 rpm으로 회전시킨다. 펠릿을 45 ml H₂O에 용해시킨다 (2개의 튜브에서 1개로). 2분 동안 4,200 rpm으로 회전시킨다. 펠릿을 5 ml 아세트산 리튬 (LiAc) (100 mM) 중에 온화하게 용해시키고, 몇 초 동안 회전시킨다. 일부 LiAc는 주의를 기울여 경사 분리하되, 튜브 중 LiAc 중 절반 이상은 그대로 유지시킨다. 세포를 와동시키고, 캐리어 DNA를 5분 동안 비등시키고, 빙수에서 빠르게 냉각시킨다. 240 ul PEG, 50 ul 세포, 36 u LiAc (1 M), 25 ul 캐리어 DNA, 45 ul 에탄올 침전된 VH/VHH를 함유하는 15 ml 튜브에 첨가한다. 각 단계 후에는 온화하게 혼합한다 (동일하되, 단, 오직 에탄올 침전된 VH/VHH만을 포함하지 않는 블랭크 샘플을 처리한다). 30°C에서 30분 동안 인큐베이션시키고, 튜브를 3-4회에 걸쳐 온화하게 도립시킨 후, 42°C에서 20-25분 동안 열 충격을 가한다. 단시간 동안 최대 6,000 rpm으로 회전시킨다. 상청액을 온화하게 제거하고, 250 ul ddH₂O를 첨가하고, 혼합한다. 플레이트가 건조될 때까지 YNBglu 플레이트 상에 그들 모두를 스트리킹하고, 30°C에서 4-5일 동안 성장시킨다. 마지막으로, 플레이트를 동일한 6개 파트로 나누어 YNBglu 플레이트를 준비하고, 파트 1부터 6으로 넘버링하고, 가장 큰 콜로니를 접종하고, 번호 1번으로 스트리킹한다. 다른 콜로니에 대해서도 큰 것부터 작은 것까지 1에서 6으로 반복 수행한다. 콜로니가 생성될 때까지 30°C에서 3-4일 동안 크게 성장시킨다. 탄소원으로서는 글루코스를 사용하여 VH/VHH 클론을 성장시키고, 0.5% 갈락토스를 첨가하여 갈락토스-7-프로모터를 작동시킴으로써 VH/VHH 발현 발현을 유도한다. 3 mL 소규모 배양을 수행하여 콜로니를 시험하고, VH 또는 VHH를 가장 잘 발현하는 것을 선별한다. 이어서, 상기 콜로니를 정제에 사용한다.

[0266] 정제: 강한 음이온 수지 (예컨대, 캡토 S(Capto S))를 이용하여 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 VH/VHH를 정제한다. 1일째, VH/VHH를 발현하는, 선별된 효모 콜로니를 5 ml YPD 배지 (YP 배지 + 2% 글루코스) 중에 접종하고, (180 rpm으로 진탕시키면서) 30°C에서 밤새도록 25 mL 실링된 멸균 튜브 중에서 세포를 성장시킨다. 2일째, 5 ml의 밤새도록 배양된 배양물을 50 mL 새로 제조된 YP 배지 + 2% 글루코스 + 0.5% 갈락토스 중에서 희석시키고, (180 rpm으로 진탕시키면서) 30°C에서 이를 동안 밤새도록 250 ml 통기 배플형 플라스크에서 성장시

킨다. 4일째, 20 min 동안 4,200 rpm으로 원심분리기에서 세포를 원심분리시킨다. 강한 음이온 수지를 이용한 양이온 교환 정제 단계: 리간드를 함유하는 상청액의 pH를 3.5로 조정한다. 50 mL의 ddH₂O를 이용하여 50 mL 상청액당 0.75 ml 수지 (+/- 0.5mL 슬러리)를 세척한 후, 결합 완충제로 3회에 걸쳐 세척한다. 세척된 수지를 상청액에 첨가하고, 현탁액을 진탕기 상에서 4°C에서 1.5시간 동안 인큐베이션시킨다. 2분 동안 500 g로 원심 분리하여 수지 결합된 VH/VHH를 펠릿화하고, 이를 세척 완충제로 세척한다. 상청액을 경사 분리하고, 10 mL의 결합 완충제로 수지를 재현탁시킨다. 필터를 PD-10 칼럼에 넣고, 칼럼에 수지를 붓고, 잠시 동안 수지를 가라 앉힌 후, 수지 위에 필터를 첨가한다. 결합 완충제 모두가 속으로 퍼질 때까지 기다린다. 6 x 0.5 ml 용출 완충제를 이용하여 VH/VHH를 용출시킨다. 에펜도르프 튜브 중에 용출 분획을 수집한다. 나노드롭(Nanodrop)을 이용하여 6개의 용출된 분획의 단백질 농도를 측정한다. VHH를 함유하는 분획을 풀링하고, 상기 용액을 3,500 Da 컷오프 투석 막으로 옮겨 놓는다. 정제된 단백질 용액을 4°C에서 밤새도록 3 L PBS에 대하여 투석한다. 5 일째, 정제된 단백질 용액을 4°C에서 추가로 2시간 동안 2 L의 새 PBS에 대하여 투석한다. 마지막으로, BCA에 의해 최종 농도를 산출한다.

[0267] 비록 VH/VHH와 관련하여 논의되기는 하였지만, 상기 기술된 기법은 필요하다면, scFv, Fab, Fv 및 다른 항체 단편에 대해서도 또한 사용될 수 있다.

[0268] 다중 항원 결합 단편 (적합하게, VH/VHH)은 예컨대, 블래틀러(Blattler) 등에 의해 기술된 바와 같이 (문헌 [Blattler et al., *Biochemistry* 24:1517-1524], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다), 아미노산 잔기를 유기 유도체화제와 반응시킴으로써 화학적 가교 결합에 의해 융합될 수 있다. 대안적으로, 항원 결합 단편은 DNA 수준으로 유전적으로 융합될 수 있고, 즉, 하나 이상의 항원 결합 단편을 포함하는 완전한 폴리펩티드 구축물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 구축물로 형성될 수 있다. 유전적 경로를 통해 다중 항원 결합 단편을 연결시키는 한 방법은 항원 결합 단편 코딩 서열을 직접 또는 펩티드 링커를 통해 연결함으로써 이루어진다. 예를 들어, 제1 항원 결합 단편의 카르복시 말단 단부는 다음 항원 결합 단편의 아미노 말단 단부에 연결될 수 있다. 이러한 연결 모드는 트리, 테트라 등의 기능성 구축물의 구축을 위해 순차적으로 연장되어 항원 결합 단편을 연결할 수 있다. 다가 (예컨대, 2가) VHH 폴리펩티드 구축물을 제조하는 방법은 WO 96/34103 (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 개시되어 있다.

[0269] 적합하게, 본 발명의 폴리펩티드 (특히, 본 발명의 VHH)는 W002/48382에 개시된 방법에 따라, 탄소원 중 50-100 wt%는 에탄올인, 탄소원을 포함하는 배지 상에서의 진균 성장을 포함하는, 진균, 예컨대, 효모 (예를 들어, 에스. 세레비시아에)에서 제조될 수 있다. 에스. 세레비시아에에서의 VHH 단편의 대규모 제조는 문헌 [Thomassen et al., 2002 *Enzyme and Micro Tech* 30:273-278] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있다.

[0270] 본 발명의 한 측면에서, 하기 단계:

[0271] i) 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 벡터, 예컨대, 플라스미드로 클로닝하는 단계,

[0272] ii) 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물을 제조할 수 있는 세포, 예컨대, 박테리아 세포 또는 효모 세포를 폴리펩티드 또는 구축물이 제조될 수 있도록 허용하는 조건하에서 상기 벡터로 형질전환시키는 단계,

[0273] iii) 예컨대, 친화성 크로마토그래피에 의해 폴리펩티드 또는 구축물을 회수하는 단계를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드 또는 구축물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0274] 본 발명은 이제 하기의 비제한적인 실시예에 의해 추가로 기술될 것이다.

[0275] **실시예**

[0276] **실시예 1: 라마 면역화, 파지 디스플레이, 면역글로불린 쇄 가변 도메인 선별 및 증식**

[0277] **1.1 면역화 프로토콜 1**

[0278] 먼저, 2마리의 라마 (라마 33 및 라마 35)는 각각 가용성 인간 재조합 TNF-알파 (스티뮴(Stimune) 애주브트와 1:1로 혼합된 후, 100 ug씩 근육내로 주사)를 3회에 걸쳐 (0, 14 및 28일째) 주사를 맞은 후, 이어서, 막 TNF-알파 발현을 증가시키기 위해 박테리아 지질다당류와의 인큐베이션에 의해 미리 활성화된 THP-1 세포 (1 ml PBS 중에서 피하로 주사된 10⁷개의 THP-1 세포)를 2회에 걸쳐 (56 및 70일째) 주사를 맞았다. 84일째 가용성 TNF-알파 및 활성화된 THP-1 세포, 둘 모두에 의한 최종 부스팅 면역화를 수행하고, 라이브러리 구축을 위하여 말초 혈액 림프구 분리 및 RNA 추출을 위해 9일 후에 혈액을 채취하였다.

[0279] 1.2 면역화 프로토콜 2

[0280] 4개월 동안의 휴면기 후, 비-절단가능한 막형단 형태의 인간 TNF-알파를 발현하도록 조작된 CHO Flp-In 세포를 1주 간격을 두고 2회에 걸쳐 라마에 주사하여 재면역화시켰다. 말초 혈액 림프구 단리를 위해 2주 후 혈액을 채취하고, 라이브러리 구축을 위하여 RNA를 추출하였다. 플레이트 ELISA 포맷, 및 토끼 폴리클로날 항-가변 도메인 혈청 및 호오스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP)에 커플링된 당나귀 항-토끼 IgG를 이용한 검출을 사용하여 고정화된 인간 TNF-알파에의, 중쇄만 포함하는 항체의 결합을 측정함으로써 여러 시점에서 각 라마의 면역화에 대한 혈청 면역 반응을 사정하였다. 수득된 적정 곡선에서는 각 라마는 제1 라운드의 면역화에 대하여 반응하였고, 높은 역가의 TNF-알파-결합 IgG 중쇄 항체를 제공하는 것으로 나타났다. 비록 두 동물 모두에서 더 낮기는 하였지만, 제2 라운드의 면역화 후에도 또한 상승된 혈청 항체 역가가 관찰되었다.

[0281] 1.3 파지 라이브러리 구축

[0282] 각 면역화 단계 종료시 각 라마로부터 수집된 혈액 세포를 사용하여 4개의 별개의 파지 디스플레이 라이브러리 (#33, #35, #33NEW 및 #35NEW)를 생성하였다. 각각의 면역화된 라마 (라마 33 및 35)로부터 단리된 말초 혈액 림프구로부터 전체 RNA를 추출하였다. 이어서, RNA를 이용하여 역전사 효소 및 프라이머 또는 무작위 팔랑체 올리고뉴클레오티드를 사용함으로써 cDNA를 생성하였다. 이어서, 적합한 프라이머를 이용하여 PCR을 수행함으로써 중쇄만 포함하는 항체의 가변 도메인 영역을 특이적으로 증폭시켰다. 가변 도메인 레퍼토리를 코딩하는 cDNA 단편을 파지미드 벡터로 클로닝하고, 라이브러리를 이. 콜라이 내로 도입하였다. 글루코스 및 암피실린을 함유하는 50 ml 배지 중 글리세롤 스톱으로부터의 각각 40 및 51 ul씩을 접종함으로써 라이브러리를 함유하는 박테리아로부터 파지를 구조하였다. 배양물이 지수증식기에 있을 때, 헬퍼 파지를 첨가하여 배양물을 감염시키고, 파지를 제조하였다. 다음날, PEG/NaCl 용액을 사용하여 제조된 파지를 배양물 상청액으로부터 침전시켰다. 용액을 적정하고, 지수증식기 이. 콜라이 TG1을 상이한 파지 희석액으로 감염시킴으로써 파지 개수를 측정하였다. 콜로니를 계속해서 여전히 형성하는 최고 희석률의 희석액을 사용하여 파지 역가를 산출하였다. sTNF-알파 상에서의 선별을 위해, 멸균 96 웰 (예컨대, 맥시소르프(Maxisorp)) 플레이트를 4°C에서 밤새도록 1,000, 250 또는 63 ng/웰로 또는 PBS로만 코팅하였다. 다음날, 플레이트의 웰을 PBS 중 4% 마블(Marvel)로 차단한 후, 2% 마블/PBS와 함께 미리 인큐베이션된, 침전된 파지를 웰에 첨가하였다. PBS-트윈 및 PBS를 사용하여 철저히 세척한 후, 결합된 파지를 알칼리성 pH 쇼크 (0.1 M 트리에틸아민)를 사용하여 15분 동안 용출시키고, 1 M 트리스-HCl (pH 7.5)로 중화시키거나 (전체 용출), 또는 10배 과량의 TNF 수용체를 사용하여 2시간 동안 경쟁적 용출로 용출시켰다. 상이한 웰로부터의 용출액을 적정한 후, 지수증식기 이. 콜라이 TG1을 감염시킴으로써 용출된 파지 개수를 측정하였다. 지수증식기 TG1을 감염시키고, 암피실린 및 글루코스를 함유하는 배지 중에서 선별함으로써 용출된 파지 중 약 절반을 구조하였다.

[0283] 1.4 인간 및 시노물구스 원숭이 TNF-알파 결합 활성을 가지는 파지에 대한 라이브러리 선별

[0284] 파지의 인간 TNF-알파에의 결합에 이어서, TNF-알파-특이적 가변 도메인을 과량의 가용성 TNFR2-Fc 용합 단백질 (에타네르셉트)로 용출시킴으로써, 또는 회분식 용출에 의해 4개의 파지 디스플레이 라이브러리로부터 TNF-알파 결합 활성을 가지는 가변 도메인을 단리시켰다. 이어서, 시노물구스 원숭이에의 용출된 인간 TNF-알파 특이적 파지의 결합에 의해 제2 라운드의 선별을 수행하여 교차 중 TNF-알파-결합 활성을 가지는 가변 도메인의 풀을 수득할 수 있었다.

[0285] 1.4.1 인간 TNF-알파 결합 활성을 가지는 가변 도메인을 디스플레이하는 파지에 대한 제1 라운드 라이브러리 선별

[0286] 파지 라이브러리는 각 면역화 단계와 관련하여 라마 33 및 라마 35로부터 유래된 것이었다 (제1 단계 면역화: 라이브러리 #33 및 라이브러리 #35; 제2 단계 면역화: 라이브러리 #33NEW 및 라이브러리 #35NEW). 인간 TNF-알파 상에서 패닝함으로써 제1 라운드 선별을 수행하여 TNF-알파-결합 활성을 보이는 가변 도메인을 디스플레이하는 파지를 단리시켰다.

[0287] 가용성 재조합 인간 TNF-알파 (1,000, 250 또는 63 ng/웰)를 친수화된 폴리프로필렌 마이크로웰 (HPM) 플레이트, (예를 들어, 눈크 맥시소르프(Nunc maxisorp))의 웰 상에 직접 코팅하고, 파지가 부착될 수 있도록 하였다. 철저히 세척한 후, (i) 알칼리성 pH 쇼크에 의한 비-선택적 용출에 의해, 또는 (ii) TNFR2-Fc (에타네르셉트 100, 25 및 6.3 ug/ml, 2 h) 첨가에 의한 TNF-알파-결합 파지의 선택적 대체에 의해 결합된 파지를 수집하였다.

[0288] 라이브러리 #33 및 라이브러리 #35 - 대조군 웰 (TNF-알파를 함유하지 않는 대조군 및 PBS 대조군)로부터 용출

된 파지의 개수는 낮았고, 두 라이브러리 모두, 용출 방법 중 어느 하나를 사용하였을 때, TNF-알파로 미리 코팅된 웰로부터 용출된 파지는 농도와 관련하여 강화되었다. 전반적으로, 제1 라운드 선별에서 달성된 TNF-결합 파지의 강화는 라이브러리 #33 및 #35, 둘 모두 약 100배로 이루어졌다.

[0289] 라이브러리 #33NEW 및 라이브러리 #35NEW - 재면역화된 라마로부터 제조된 라이브러리의 제1 라운드 선별로부터 회수된 클론의 개수는 낮은 것으로 나타났다. 이는 mTNF-알파-CHO 세포에 대한 라마의 더 낮은 면역 반응 (전체로서 더 낮은 개수의 TNF-알파-반응성 클론)을 반영하는 것일 수 있거나, 또는 상기 반응이 mTNF-알파 반응성 클론의 생성은 유도하였지만, 이들 중 오직 제한된 개수의 것만이 가용성 형태의 TNF-알파와 교차 반응하였다는 것을 반영하는 것일 수 있다. 1,000 ng/ml 인간 TNF-알파로 코팅된 웰로부터 TNFR2-Fc (에타네르셉트)를 이용한 제1 라운드 선별에서 용출된 파지를 확장시켜 역가가 대략 2×10^{12} 개의 파지/ml인 현탁액을 수득하였다.

[0290] 1.4.2 인간 및 시노물구스 원숭이 TNF-알파 결합 활성을 가지는 면역글로불린쇄 가변 도메인을 디스플레이하는 파지에 대한 제2 라운드 선별

[0291] 라이브러리 #33 및 라이브러리 #35 - HPM 플레이트의 웰 표면 상에 미리 흡착된 가용성 인간 또는 시노물구스 원숭이 TNF-알파 (500, 125 또는 31 ng/웰 또는 PBS)에의 선택된 파지의 부착에 의해 제2 라운드 선별을 수행하였다. 인간 TNF-알파에 결합된 파지는 가용성 TNFR2-Fc (각각 50, 12.5 및 3.1 ug/ml)로 용출시키고, 시노물구스 원숭이 TNF-알파에 결합된 것은 알칼리성 pH 쇼크를 이용하여 용출시켰다. 시노물구스 원숭이 TNF-알파에 대한 선별로부터의 회수량은 인간 TNF-알파에 대한 것보다 낮았는데, 그 이유는 가능하게는 인간 및 시노물구스 원숭이 TNF-알파, 둘 모두와 교차 반응성인 가변 도메인을 발현하는 파지 라이브러리 둘 모두의 빈도가 더 낮기 때문이었다.

[0292] 라이브러리 #33NEW 및 라이브러리 #35NEW - HPM 플레이트의 웰 표면 상에 미리 흡착된 가용성 시노물구스 원숭이 TNF-알파 (1,000, 250 또는 63 ng/웰 또는 PBS)에의 선택된 파지의 부착에 의해 제2 라운드 선별을 수행하였다. 알칼리성 pH 쇼크를 이용하여 결합된 파지를 용출시켰다.

[0293] **실시예 2: 무작위로 선택된 면역글로불린쇄 가변 도메인 클론으로부터의 주변세포질 상청액에 관한 1차 평가**

[0294] 2.1 1차 평가를 위한 주변세포질 추출물의 증식 및 생성

[0295] 인간 TNF-알파에 관한 제1 라운드 선별 및 시노물구스 원숭이 TNF-알파에 관한 제2 라운드 선별로부터의 용출액 중에 존재하는 파지를 사용하여 이. 콜라이 TG1 세포를 감염시켰다. 콜로니를 무작위로 채취하고 (라이브러리 #33 및 #35로부터 186개의 클론을 마스터 플레이트 M60-M63으로 채취; 라이브러리 #33NEW 및 라이브러리 #35NEW로부터 96개의 클론을 마스터 플레이트 M65로 채취), 증식시키고, 순차적으로 원심분리하고, 1xPBS 중에 재현탁시키고, 냉동-해동 할당을 수행하고, 증식된 배양물을 원심분리함으로써 주변세포질 상청액을 생성하였다 (M60-63 및 M65는 또한 각각 'MP60-63' 및 'MP65'로도 지칭되고; 주변세포질 상청액은 주변세포질 분획 (PF) 또는 추출물로도 명명된다).

[0296] 주변세포질 추출물을 스크리닝하여 (i) 플레이트 ELISA에서 가용성 인간 TNF-알파의 TNFR2-Fc에의 결합을 억제시킬 수 있고, (ii) 고정 농도 L929 검정법에서 TNF-알파-유도성 세포독성을 증화시킬 수 있는 그의 능력에 대하여 시험하였다. L929 검정법에서, TNF-알파 (0.5 ng/ml)의 세포독성 효과는 TNFR1을 통해 매개되는 것으로 간주되는 바, 이에, TNF-알파-TNFR2-결합 및 L929 검정법에서 억제 활성을 가지는 가변 도메인은 수용체를 통해 매개되는 TNF-알파-반응을 억제시킬 것으로 예상된다.

[0297] 2.2.1 TNF-알파 결합 및 중화 활성 평가 (마스터 플레이트 M60-M63)

[0298] 라이브러리 #33 및 라이브러리 #35로부터 선택된 클론으로부터 수득된 186개의 주변세포질 분획 모두에 대해 L929 세포독성 및 ELISA 검정법을 수행하였다. 4개의 마스터 플레이트 M60, M61, M62 및 M63 상에 클론을 배열하고, 이들 마스터 플레이트로부터 주변세포질 분획을 제조하였다. M60-61은 라이브러리 #33 및 #35로부터 무작위로 채취된 클론을 함유하였다. M62-63은 하기와 같이 2회에 걸쳐 후속 선별 단계를 수행한 이후에 동일 라이브러리로부터 선별된 클론을 함유하였다: (i) 용출을 위한 10 ug/mL hsTNF-알파 및 에타네르셉트; (ii) hsTNF-알파 (5 ug/mL 및 0.3 ug/mL) 또는 시노물구스 sTNF-알파 (5 ug/mL 및 0.3 ug/mL), 이어서, 에타네르셉트를 이용한 선택적 용출 및 트리에틸아민을 이용한 완전한 용출. 레자주린을 이용하여 농도 의존적 L929 세포독성 검정법에 의해 186개의 PF를 모두 분석하였다.

[0299] 2.2.2 ELISA에 의한 주변세포질 상청액 스크리닝 (마스터 플레이트 M60-63)

- [0300] 스크리닝을 위해 사용된 TNF-알파 농도는 1.25 ng/ml였다. 주변세포질 상청액을 1% BSA중 1/20 희석물로 (M60 또는 M61) 또는 1/10 희석물로 (M62 및 M63) 분석하였다. TNF-알파 및 주변세포질 상청액을 검정 농도의 2배되는 농도로 구성한 후, 1:1로 함께 혼합하였다. 각 상청액에 대해 삼중으로 측정을 수행하였다. 추가로, 10 nM 아달리무맙은 양성 중화 항체 대조군으로서 사용하였다. 각 ELISA 플레이트 상에서, 제한된 TNF-알파 용량-반응 (0-5 ng/ml) 또한 도입하였다. 주변세포질 상청액 분석을 위해 ELISA 플레이트를 밤새도록 0.7 ug/ml, 50 ul/웰 에타네르셉트로 코팅하였다. 세척 및 차단 후, TNF-알파 - 상청액 혼합물을 첨가하고, 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 비오틴화된 폴리클로날 토끼 항-인간 TNF-알파 항체, 예를 들어, 0.2 ug/ml의 BAF210 (R&D 시스템즈(R&D Systems)), 이어서, m아비딘 - HRP 및 이어서, TMB를 사용하여 ELISA를 발색시켰다.
- [0301] M60 또는 M61 상에서 어떤 클론도 유의적인 TNF-알파 중화 활성을 보이지 않았다 (모든 클론은 대략 10% 또는 10% 미만의 TNF-알파 중화를 보였다). 그에 반해, 아달리무맙은 그를 포함한 모든 플레이트 상에서의 ELISA에서 거의 완전한 억제력을 보였다. (라이브러리 33으로부터 유래된) M62 상의 클론 다수는 우수한 TNF-알파 중화를 보였다 (11개의 클론이 90% 이상의 중화를 달성하였고, 45개의 클론이 50% 이상의 중화를 달성하였다). (라이브러리 35로부터 유래된) M63 상에서도 또한 소수의 우수한 중화 클론이 관찰되었지만, 비록 선별 방법이 동일하기는 하였지만, 그 개수는 M62로부터의 것보다 훨씬 더 낮았다 (2개의 클론이 90% 이상의 중화를 달성하였고, 7개의 클론이 50% 이상의 중화를 달성하였다).
- [0302] 2.2.3 고정 농도 L929 세포독성 검정법에 의한 주변세포질 상청액 (PS)의 스크리닝 (마스터 플레이트 M60-M63)
- [0303] 물질
- [0304] - L929 세포 (10,000개의 세포/웰)
- [0305] - 검정을 위한 인간 TNF-알파 고정 농도: 500 pg/ml
- [0306] - 악티노마이신 D 농도: 0.75 ug/mL
- [0307] - 검정법에서 1:10으로 희석된, 마스터플레이트 M60-M63으로부터의 PS
- [0308] - 양성 대조군으로서의 순수한 항-TNF-알파 VHH: 250 nM 최종 농도
- [0309] - 인간 TNF-알파 짧은 용량 반응 곡선: 500, 125, 31.25, 7.8 pg/ml
- [0310] - 인큐베이션 시간: 24 h
- [0311] - 레자주린 세포 생존능 시약
- [0312] 방법
- [0313] 0일째, 100 ul 중 10,000개의 세포/웰을 96 웰 마이크로플레이트 중 완전 DMEM 배지에 플레이팅하고, 37°C, 5% CO₂에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 1일째, 희석 플레이트를 셋업하였고 (각 지점에 대하여 삼중으로 수행하는데 충분한 부피 이용), 추가로, 각 플레이트는 대조군으로서 하기의 것을 함유하였다:
- [0314] 1. 완전 DMEM + 0.01% 트리톤 X-100
- [0315] 2. 완전 DMEM + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D
- [0316] 3. TNF-알파 용량 반응 곡선 + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D.
- [0317] 배지를 마이크로플레이트의 각 웰로부터 제거하고, 500 pg/mL의 hTNF-알파 + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D+ PS (1:10)를 함유하는 100 ul의 완전 DMEM과 함께, 또는 100 ul의 상이한 대조군과 함께 세포를 인큐베이션시켰다. 37°C, 5% CO₂에서 24 h 동안 인큐베이션시킨 후, 10 ul의 레자주린을 각 웰에 첨가하고, 세포를 37°C, 5% CO₂에서 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 50 ul의 3% SDS를 각 웰에 첨가하였다. 이어서, 여기 (Ex) 544 nm/방출 (Em) 590 nm에서 형광 플레이트 판독기 상에서 플레이트를 판독하였다.
- [0318] 결과
- [0319] M60-61의 주변세포질 상청액 중 어느 것도 인간 TNF-알파로부터의 L929 세포에 대하여 어떤 보호 효과도 보이지 않았다. 양성 대조군은 TNF-알파의 효과로부터 보호를 보인 반면, 비관련 VHH는 보이지 않았다. M62-63의 선별된 클론으로부터의 다중의 주변세포질 상청액은 TNF-알파로부터의 L929 세포에 대하여 보호 효과를 보였다 (107개의 클론은 50% 이상의 생존을 달성하였다). 양성 대조군은 (100% 이상의) TNF-알파 중화를 보인 반면,

비관련 VHH는 10% 미만의 TNF-알파 중화를 보였다.

- [0320] 2.3 TNF-알파 결합 및 중화 활성 평가 (마스터 플레이트 M65)
- [0321] 달리 언급되지 않는 한, M60-M63에 대해 상기 기술된 것과 동일한 방식으로 M65에 대해 ELISA 및 L929 세포독성 검정법을 수행하였다.
- [0322] 2.3.1 ELISA에 의한 주변세포질 상청액의 스크리닝 (마스터 플레이트 M65)
- [0323] TNF-알파 특이적 가변 도메인 클론의 M65 주변세포질 상청액 (총 96개)을 해동한 후 즉시 및 37°C에서 18 h 인큐베이션시킨 후, 둘 모두의 시점에 ELISA에 의해 TNFR-2-TNF-알파 결합 억제에 관하여 분석하였다.
- [0324] ELISA 플레이트를 2 ug/ml, 50 ul/웰 에타네르셉트로 4°C에서 밤새도록 코팅하고, 세척한 후, 인큐베이션용 체제 중에서 TNF-알파 - 가변 도메인 혼합물로 차단시켰다. 10 nM 아달리무맙을 양성 대조군으로서 사용하였다. 먼저, 항-TNF-알파 가변 도메인 주변세포질 상청액을 1% BSA 중에서 1:10으로 희석한 후, 2.5 ng/ml TNF-알파와 1:1로 혼합하고, ELISA 플레이트에 첨가하였다. ELISA의 후속 프로세싱은 M60-63과 관련하여 상기 기술된 프로토콜에 따라 진행하였다.
- [0325] 상기 상청액 중 28개가 TNF-알파 결합을 80% 초과로 억제시켰고, 그 중 18개는 37°C에서의 인큐베이션 이후에도 대부분 또는 모든 억제 활성을 유지하였다.
- [0326] 2.3.2 L929 세포독성 검정법에 의한 주변세포질 상청액의 스크리닝 (마스터 플레이트 M65)
- [0327] 2개의 파지 디스플레이 라이브러리 (M65 - #33NEW 및 #35NEW로부터)로부터 선택된 클론으로부터 수득된 총 96개의 주변세포질 상청액 (PS)을 이용하여 L929 세포독성 검정법을 수행하였다. (i) hsTNF-알파 (10 ug/mL) 에타네르셉트에 대한 제1 라운드 선별, 및 용출을 위한 TEA 수행 후, 및 (ii) 시노물구스 sTNF-알파 (10 ug/mL)에 대한 제2 라운드 선별, 이어서, 트리에틸아민을 이용한 완전한 용출로부터 클론을 채취하였다. 96개의 PS 모두 레자주린을 이용하여 L929 세포독성 검정법에 의해 분석하였다.
- [0328] 물질
- [0329] - L929 세포 (10,000개의 세포/웰)
- [0330] - 검정을 위한 인간 TNF-알파 고정 농도: 500 pg/ml 최종 농도
- [0331] - 검정법에서 PS의 희석률: 1:10
- [0332] - 양성 대조군으로서 순수한 항-TNF-알파 VHH: 250 nM 최종 농도
- [0333] - M65 상청액
- [0334] - TNF-알파 짧은 용량 반응 곡선: 500, 125, 7.8 pg/ml
- [0335] - 인큐베이션 시간: 22 h
- [0336] - 레자주린 세포 생존능 시약
- [0337] 방법
- [0338] 0일째, 100 ul 중 10,000개의 세포/웰을 96 웰 코스타(Costar) 마이크로플레이트 중 완전 DMEM 배지에 플레이트팅하고, 37°C 및 5% CO₂에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 1일째, 희석 플레이트를 셋업하였고 (각 지점에 대하여 삼중으로 수행하는 데 충분한 부피 이용), 추가로, 각 플레이트는 대조군으로서 하기의 것을 함유하였다:
- [0339] 1. 완전 DMEM + 0.01% 트리톤 X-100
- [0340] 2. 완전 DMEM + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D
- [0341] 3. TNF-알파 용량 반응 곡선 + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D.
- [0342] 배지를 마이크로플레이트의 각 웰로부터 제거하고, 500 pg/mL의 hTNF-알파 + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D+ PS (1:10)를 함유하는 100 ul의 완전 DMEM과 함께, 또는 100 ul의 상이한 대조군과 함께 세포를 인큐베이션시켰다. 37°C에서 22 h 동안 인큐베이션시킨 후, 10 ul의 레자주린을 각 웰에 첨가하고, 세포를 37°C, 5% CO₂에서 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 50 ul의 3% SDS를 각 웰에 첨가하였다. 이어서, Ex544 nm/Em590 nm에서 형광

플레이트 판독기를 이용하여 플레이트를 판독하였다.

[0343] M65의 선별된 클론으로부터의 다중의 주변세포질 상청액은 h-TNF-알파로부터의 L929 세포에 대하여 보호 효과를 보였다. 9개의 클론에서, 주변세포질 분획으로 처리하였을 때, 120% 초과인 L929 세포 생존을 보였다. 96개 중 총 53개의 클론이 L929 검정법에서 50% 초과인 TNF-알파 중화 활성을 보였고, 그 중 32개는 거의 완전한 중화를 나타내었다.

[0344] 2.3.3 트립신 및 키모트립신에 의한 불활성화에 대한 저항

[0345] TNF-TNFR2 ELISA에서의 그의 TNF-결합 활성 유지에 기초하여 상청액 (및 정제된 샘플)을 트립신 및 키모트립신에 의한 불활성화에 대한 가변 도메인 클론의 저항에 대하여 시험하였다.

[0346] 방법

[0347] 트립신 및 키모트립신을 1 mM 트리스-HCl (pH 8.0), 20 mM CaCl₂ 중에 (최종 부피의 절반인 양으로) 따로따로 용해시킨 후, 이어서, 함께 혼합하여 최종 농도가 각각 3 mg/mL (검정 농도의 3배)인 것을 수득하였다. 20 μ L의 각 주변세포질 추출물을 10 μ L의 PBS와 (비분해) 또는 10 μ L의 3 mg/mL 트립신 + 키모트립신 믹스 (분해)와 함께 37°C에서 75 min 동안 인큐베이션시켰다. 30 μ L의 빙냉 2x 프로테아제 정지액 (2% BSA, 1xPBS, 5 mM NaEDTA, 4 mM AEBSF, 0.6 μ M 아프로티닌, 260 μ M 베스타틴, 2 mM EDTA, 28 μ M E-64, 2 μ M 류펩틴, 1 mM PBSF)을 각 샘플에 첨가한 후, 이어서, 140 μ L의 1xPBS, 1% BSA를 각 샘플에 첨가하여 주변세포질 추출물의 희석액의 최종 희석률이 1:10에 도달하도록 만들었다. 정제된 각 샘플을 1% BSA 중 3 μ M인 상위 농도를 비롯한 다양한 농도로 제조하였다. 10 μ L의 정제된 샘플을 10 μ L의 트립신 및 키모트립신 믹스 (또는 비소화된 샘플의 경우, PBS) 및 10 μ L의 트립신/키모트립신 완충제와 함께 인큐베이션시켰다. 주변세포질 및 정제된 샘플을 -80°C에서 밤새도록 보관하고, 다음날 TNFR-2-TNF-알파 ELISA 검정법으로 시험하였다. ELISA 플레이트를 밤새도록 0.7 μ g/ml, 50 μ l/웰 에타네르셉트로 코팅하고, 세척한 후, TNF-알파 - 가변 도메인 샘플과의 인큐베이션을 위해 제제 중에서 차단시켰다. (TNF-알파 검정 농도 2.5 ng/mL 및 1:20으로 희석된 샘플을 수득하기 위해) TNF-알파 가변 도메인 샘플을 5 ng/ml h-TNF-알파와 1:1로 혼합하고, 50 μ L의 각 샘플을 ELISA 플레이트에 첨가하였다. 4°C에서 인큐베이션시킨 후, ELISA 플레이트를 세척하고, RT에서 1 h 동안 0.2 μ g/mL의 비오틴닐화된 폴리클로날 토끼 항-h-TNF-알파 항체와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, ELISA 플레이트를 세척하고, 1:1,000 변형된-아비딘-HRP 접합체 (m아비딘-HRP(mAvidin-HRP)) (m아비딘, 예를 들어, 엑스트라비딘(ExtrAvidin)® (시그마 (Sigma))은 비오틴에 대한 아비딘의 높은 친화도 및 특이성은 유지하지만, 아비딘에 대하여 보고된 바 있는 생리학적 pH에서의 비특이적인 결합은 보이지 않는, 변형된 형태의 난백 아비딘이다)과 함께 RT에서 1 h 동안 인큐베이션시키고, 다시 세척하고, 100 μ L의 TMB ELISA 기질을 각 샘플에 첨가하였다. 30 min 후, 50 μ L의 0.5 M H₂SO₄를 이용하여 반응을 정지시키고, ELISA 플레이트를 450 nm에서의 흡광도에 대해 판독하였다.

[0348] 결과

[0349] 11개의 가변 도메인 (Q65B1-Q65F6)은 주변세포질 상청액으로부터 유래된 것이고, 4개의 가변 도메인 (Q62F2-Q62F11)은 정제된 샘플로부터 유래된 것이었다. 주변세포질 상청액 중의 10개의 가변 도메인 및 2개의 정제된 가변 도메인이 우수한 또는 탁월한 트립신 및 키모트립신 저항성을 띠는 것으로 나타났다. 이들 가변 도메인 중 10개는 추후에 동일 패밀리 (패밀리 1, 하기 파트 2.4 참조)에 속하는 것으로 밝혀졌고, 이들 가변 도메인 중 2개는 추후에 동일 패밀리 (패밀리 2, 하기 파트 2.4 참조)에 속하는 것으로 밝혀졌다. 패밀리 1에도 패밀리 2에도 속하지 않는 Q62F11은 프로테아제 저항성을 띠지 않았다. Q62F10 경우의 결과는 실험상 오류에 기인하는 것으로 간주된다 (도 1).

[0350] 2.4 1차 평가 요약

[0351] M62 및 M63: 원래대로 처음에 채취된 186개의 클론 중 52개의 주변세포질 상청액이 L929 세포 세포독성 검정법에서 50% 이상의 인간 가용성 TNF-알파 중화를 보였을 뿐만 아니라, ELISA 검정법에서 50% 이상의 TNF-알파-TNFR2 결합 활성 억제력을 보였다. 중화 활성이 가장 큰 25개의 가변 도메인 클론에 대해 수행된 서열 분석 결과, 이는 패밀리로 분류될 수 있는 것으로 나타났다. 대표적인 클론을 상이한 패밀리 군으로부터 선택하였다. 이. 콜라이에서의 고수준 발현을 위해 가변 도메인 DNA 서열을 재클로닝하고, 더욱 상세한 평가 연구를 위해 정제된 가변 도메인을 생성하였다.

[0352] M65: 원래대로 처음에 채취된 96개의 클론 중 53개의 주변세포질 상청액이 L929 세포 세포독성 검정법에서 인간 가용성 TNF-알파에 대해 50% 초과인 중화 활성을 보였을 뿐만 아니라, ELISA 검정법에서 50% 이상의 TNF-알파-

TNFR2 결합 활성 억제를 보였고, 32개는 두 검정법 모두에서 거의 완전한 중화를 보였다. 가장 안정적인 클론을 확인하기 위해, 주변세포질 상청액 (총 96개)을 해동 후 즉시 및 37°C에서 18 h 인큐베이션 이후에, 둘 모두의 시점에 ELISA에 의해 TNFR-2-TNF-알파 결합 억제에 관하여 분석하였다. 18개의 상청액이 TNFR-2-TNF-알파 결합 억제 활성을 대부분 또는 모두 유지하였다. 이어서, 가장 큰 활성을 띠는 주변세포질 상청액 (28/96)을 선택하여 시노몰구스 원숭이 TNF-유도성 L929 세포 세포독성 억제에 대해 시험하였다. 가장 큰 TNF-알파 중화 활성 및 프로테아제에 대해 저항성을 가지는 36개의 가변 도메인 클론에 대해 수행된 서열 분석 결과, 이는 M62 및 M63 유래 가변 도메인을 이용하여 패밀리로 분류될 수 있는 것으로 나타났다. 대표적인 M65 유래 클론을 상이한 패밀리 군으로부터 선택하였다. 이. 콜라이에서의 발현을 위해 가변 도메인 DNA 서열을 재클로닝하고, 더욱 상세한 평가 연구를 위해 정제된 가변 도메인을 생성하였다.

[0353] **실시예 3: 정제된 이. 콜라이 재조합 가변 도메인 평가**

[0354] **3.1 이. 콜라이에서의 선별된 가변 도메인 클론의 제조**

[0355] M62, M63 및 M65로부터 선별된 가변 도메인의 DNA 서열을 이. 콜라이에서의 제조를 위해 재클로닝한 후, 발현된 가변 도메인을 하기와 같이 정제하였다.

[0356] 선별된 가변 도메인을 파지미드 벡터로부터 발현 플라스미드 pMEK222로 서브클로닝하였다 (pMEK222는 파지미드 pUR8100의 유전자3이 결실된 버전이고, 여기서, 클로닝된 가변 도메인 다음으로 c-myc 및 6His 태그, 2개의 종결 코돈 및 M13 종결인자 서열이 이어진다 (WO2013/064701 참조)). 가변 도메인 유전자를 SfiI 및 Eco91I로 소화시키고, 같은 제한 효소로 절단된 pMEK222에 라이게이션시켰다. 라이게이션에 의해 이. 콜라이 균주 BL21 DE3을 형질전환시키고, 암피실린 및 2% 글루코스로 보충된 LB 아가 플레이트 상에 플레이팅시켰다. 콜로니 PCR을 사용하여 형질전환체를 스크리닝하였다. 프라이머 M13.rev (서열번호 81) 및 M13.fw (서열번호 82)를 사용하여 증폭시킴으로써, PCR에 의해 관찰되는 700 bp의 인서트 및 ~350 bp 인서트 (공 플라스미드)를 함유하는 플라스미드를 생성하였다.

[0357] 새로 밤새도록 성장시킨 배양물을 800 ml 2X YT, 0.1% 글루코스와 100 ug/ml 암피실린 중에 1/100 희석물로 접종하고, 37°C에서 2 h 동안 성장시킴으로써 pMEK222로부터 가변 도메인을 제조하였다. 이어서, 1 mM 이소프로필 베타-D-1-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 첨가하고, 배양물을 37°C에서 추가의 5 h 동안 성장시켰다. 원심분리에 의해 박테리아를 수거하고, 30 mL PBS에 재현탁시켰다. 박테리아를 -20°C에서 밤새도록 인큐베이션시켜 냉동시켰다. 박테리아를 실온에서 해동시키고, 원심분리에 의해 분별하였다. 가변 도메인을 함유하는 가용성 분획에 Co²⁺ 아가로스 비드, 예를 들어, 탈론(Talon) 수지 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 첨가하여 His-태그부착된 가변 도메인에 결합시켰다. 비드를 세척한 후, 150 mM 이미다졸로 보충된 PBS로 결합된 가변 도메인을 용출시켰다. 최종적으로, 가변 도메인을 함유하는 분획을 PBS에 대해 분석시켜 이미다졸을 제거하였다.

[0358] 수개의 시험관내 검정법 시스템에서 정제된 가변 도메인의 TNF-알파-중화 활성을 평가하여 가용성 형태 및 막 형태의 인간 TNF-알파 및 가용성 시노몰구스 원숭이 TNF-알파에 대한 효능을 사정하였다.

[0359] **3.2 L929 세포의 TNF-알파-유도성 세포독성 억제**

[0360] L929 뮤린 세포주 및 가용성 인간 (또는 시노몰구스 원숭이) TNF-알파에 의한 세포독성의 유도에 기초한 생물학적 판독값에 기초하여 TNF-알파-중화 활성을 가진 가변 도메인에 관한 검정법을 수행하였다. L929 세포 (10,000개의 세포/웰)를 정제된 가변 도메인의 희석액과 함께 가용성 TNF-알파 (500 pg/ml) 및 악티노마이신 (0.75 ug/mL)의 존재하에서 24 h 동안 배양하였다. 실험 종료시, 레자주린을 사용하여 세포독성을 측정하였다. 마우스 L929 세포의 가용성 인간 TNF-유도성 세포독성의 억제를 시험하여 인간 및 시노몰구스 원숭이 TNF에 대한 각 이. 콜라이 재조합 Q62, Q63 및 Q65 시리즈 가변 도메인의 TNF-알파 중화 활성을 측정하였다.

[0361] **3.2.1 M62 및 M63으로부터 선별된, 정제된 면역글로불린 쇄 가변 도메인**

[0362] 물질

[0363] - L929 세포 (10,000개의 세포/웰)

[0364] - 멸균 폴리프로필렌 96 웰 플레이트

[0365] - 검정을 위한 h-TNF-알파 고정 농도: 500 pg/ml

- [0366] - 악티노마이신 D 농도: 0.75 ug/mL
- [0367] - Q62F2, Q62F11, Q62E10, Q62F10을 비롯한, (MP 62-63으로부터의) 정제된 가변 도메인
- [0368] - 정제된 가변 도메인의 희석액의 범위: 300 nM - 5 pM (1:3 희석률)
- [0369] - 인간-TNF-알파 용량 반응 곡선: 3 ng/mL - 0.5 pg/mL
- [0370] - 시노물구스 원숭이 TNF-알파 용량 반응 곡선: 10 ng/mL - 0.2 pg/mL
- [0371] - 아달리무맙 용량 반응 곡선: 10 nM - 0.5 pM
- [0372] - 인큐베이션 시간: 22 h
- [0373] - 레자주린 세포 생존능 시약.
- [0374] 방법
- [0375] 0일째, 100 uL 중 10,000개의 세포/웰을 96 웰 마이크로플레이트 중 완전 DMEM 배지에 플레이팅하고, 37°C 및 5% CO₂에서 밤새도록 보관하였다. 1일째, 희석 플레이트를 셋업하였고 (각 지점에 대하여 삼중으로 수행하는 데 충분한 부피 이용), 추가로, 각 플레이트는 대조군으로서 하기를 함유하였다:
- [0376] 1. 완전 DMEM + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D
- [0377] 2. 완전 DMEM + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D + 0.5 ng/mL h-TNF-알파
- [0378] 3. 완전 DMEM + 0.01% 트리톤 (오직 시노-TNF-알파 용량 반응을 포함하는 플레이트에서만)
- [0379] 4. 완전 DMEM (오직 시노-TNF-알파, h-TNF-알파 및 아달리무맙 용량 반응을 포함하는 플레이트에서만).
- [0380] 배지를 마이크로플레이트의 각 웰로부터 제거하고, 100 uL의 각 가변 도메인 희석액과 함께, 또는 100 uL의 상이한 대조군과 함께 세포를 인큐베이션시켰다. 37°C 및 5% CO₂에서 22 h 동안 인큐베이션시킨 후, 10 uL의 레자주린을 각 웰에 첨가하고, 세포를 37°C에서 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 50 uL의 3% SDS를 각 웰에 첨가하였다. 이어서, 형광 플레이트 판독기 플레이트 판독기 Ex544 nm/Em590 nm을 이용하여 플레이트를 판독하였다.
- [0381] 3.2.2 M65로부터 선별된, 정제된 면역글로불린 쇠 가변 도메인
- [0382] 물질
- [0383] - L929 세포 (10,000개의 세포/웰)
- [0384] - 멸균 폴리프로필렌 96 웰 플레이트
- [0385] - DMEM
- [0386] - 인간 TNF-알파 농도: 500 pg/ml
- [0387] - 시노물구스 원숭이 TNF-알파 농도: 500 pg/ml
- [0388] - 악티노마이신 D 농도: 0.75 ug/mL
- [0389] - Q65D1, Q65D3, Q65B1, Q65C7, Q65A3, Q65E12, Q65F6을 비롯한, M65로부터의, 정제된 가변 도메인
- [0390] - 정제된 가변 도메인의 희석액의 범위: 300 nM - 5 pM (1:3 희석률)
- [0391] - 인간 TNF-알파 및 시노물구스 TNF-알파 용량 반응 곡선: 10 ng/mL - 0.5 pg/mL
- [0392] - 아달리무맙 용량 반응 곡선: 10 nM - 0.5 pM
- [0393] - 인큐베이션 시간: 22 h
- [0394] - 레자주린 세포 생존능 시약.
- [0395] 방법
- [0396] 0일째, 100 uL 중 10,000개의 세포/웰을 96 웰 마이크로플레이트 중 완전 DMEM 배지에 플레이팅하고, 37°C 및

5% CO₂에서 밤새도록 보관하였다. 1일째, 정제된 가변 도메인에 대한 (DMEM + Act.D + TNF 중의) 1:3의 연속 희석액을, 최고 농도가 300 nM인 것을 시작으로 하여, (각 지점에 대하여 삼중으로 수행하는 데 충분한 부피 이용) 셋업하였다. 아달리무맙의 경우, 사용된 최고 농도는 10 nM이었다.

[0397] 하기 대조군을 플레이트에 첨가하였다:

[0398] 1. 완전 DMEM + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D

[0399] 2. 완전 DMEM + 0.75 ug/mL 악티노마이신 D + 0.5 ng/mL의 h-TNF-알파 또는 시노-TNF-알파

[0400] 3. 완전 DMEM + 0.01% 트리톤 (오직 TNF-알파 용량 반응을 포함하는 플레이트에서만)

[0401] 4. 완전 DMEM (오직 TNF-알파 용량 반응을 포함하는 플레이트에서만).

[0402] 배지를 마이크로플레이트의 각 웰로부터 제거하고, 100 uL의 각 가변 도메인 희석액과 함께, 또는 100 uL의 상이한 대조군과 함께 세포를 인큐베이션시켰다. 37°C 및 5% CO₂에서 22 h 동안 인큐베이션시킨 후, 10 uL의 레자주린을 각 웰에 첨가하고, 세포를 37°C에서 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 50 uL의 3% SDS를 각 웰에 첨가하였다. 이어서, 형광 플레이트 판독기 플레이트 판독기 Ex544 nm/Em590 nm을 이용하여 플레이트를 판독하였다.

[0403]

[0404] 3.2.3 L929 세포독성 검정법의 결과

표 1

표 1(a)

M62 및 M63으로부터 유래된 항-TNF-알파 클론: 인간 및 시노몰구스 TNF-유도성 L929 세포 세포독성의 억제

클론 ID	패밀리	인간 및 시노몰구스 TNF-유도성 L929 세포 세포독성의 억제 EC50(nM)	
		인간 TNF	시노몰구스 TNF
Q62F2	1	1	0.8
Q62F11	-	6	1.5
Q62E10	2	0.2	< 0.1
Q62F10	2	2	1.3

표 1(b)

M65로부터 유래된 항-TNF-알파 클론: 인간 및 시노몰구스 TNF-유도성 L929 세포 세포독성의 억제

클론 ID	패밀리	인간 및 시노몰구스 TNF-유도성 L929 세포 세포독성의 억제 EC50(nM)	
		인간 TNF	시노몰구스 TNF
Q65D3	1	0.15	0.1
Q65D1	1	0.1	0.06
Q65B1	1	0.04	0.01
Q65C7	1	0.15	0.03
Q65A3	2	0.15	0.04
Q65E12	2	4	4
Q65F6	2	1.5	1
아달리무맙		0.1	0.04

[0405]

[0406] 패밀리 1에 속하는 가변 도메인은 일반적으로 인간 TNF-알파-유도성 세포독성 및 시노몰구스 TNF-알파-유도성 세포독성, 둘 모두를 대단히 효과적으로 억제시킨 것으로 나타났고, 패밀리 2에 속하는 가변 도메인 또한 일반적으로 인간 TNF-알파-유도성 세포독성 및 시노몰구스 TNF-알파-유도성 세포독성, 둘 모두를 매우 효과적으로

억제시킨 것으로 나타났다는 것을 알 수 있다. 다수의 가변 도메인은 아달리무맙과 유사한 성능을 보였다.

[0407] 3.3 TNF-TNFR2 결합 활성 억제 (M65로부터 선별된, 정제된 면역글로불린 쇠 가변 도메인)

[0408] 맥시소르브(Maxisorb) 플레이트를 에타네르셉트 (50 ul/웰의 0.7 ug/ml)로 코팅하였다. 가변 도메인을 ELISA 플레이트에 첨가하기 이전에 희석하고, 인간 또는 시노물구스 원숭이 TNF-알파 (1.25 ng/ml)와 혼합하여 결합할 수 있도록 하였다. 에타네르셉트에 결합된 TNF-알파를 비오틴화된 토끼 폴리클로날 항-TNF-알파 항체 (0.2 ug/ml) 및 m아비딘-HRP, 이어서, TMB로 검출하고, 에타네르셉트에의 TNF-알파 결합에 대한 가변 도메인에 의한 경쟁 수준을 측정하였다. 특정 가변 도메인은 인간 및 시노물구스 원숭이 TNF-알파에 결합하여 TNF-알파-TNFR2 상호작용을 억제시킬 수 있다.

[0409] 3.3.1 TNF-TNFR2 결합 활성 검정법의 결과

표 2

표 2(a)

M62 및 M63으로부터 유래된 항-TNF-알파 클론 - TNFR2에의 인간 및 시노물구스 TNF-알파의 결합 억제

클론 ID	패밀리	TNF-알파-TNFR2 결합의 억제 (ELISA) EC50(nM)	
		인간 TNF	시노물구스 TNF
Q62F2	1	0.7	1.3
Q62F11	-	2.3	1.4
Q62E10	2	0.8	1.2
Q62F10	2	30	108
아달리무맙	-	0.3	

표 2(b)

M65로부터 유래된 항-TNF-알파 클론 - TNFR2에의 인간 및 시노물구스 TNF-알파의 결합 억제

클론 ID	패밀리	TNF-TNFR2 결합의 억제 (ELISA) EC50(nM)	
		인간 TNF	시노물구스 TNF
Q65D3	1	0.33	0.45
Q65D1	1	0.37	0.32
Q65B1	1	0.29	0.45
Q65C7	1	0.35	0.32
Q65A3	2	1.3	1.1
Q65E12	2	47	65
Q65F6	2	13	24

[0410]

[0411] 패밀리 1에 속하는 가변 도메인은 일반적으로 인간 TNF-알파-TNFR2 결합 및 시노물구스 TNF-알파-TNFR2 결합, 둘 모두를 대단히 효과적으로 억제시킨 것으로 나타났고, 패밀리 2에 속하는 가변 도메인 또한 일반적으로 인간 TNF-알파-TNFR2 결합 및 시노물구스 TNF-알파-TNFR2 결합, 둘 모두를 매우 효과적으로 억제시킨 것으로 나타났다는 것을 알 수 있다. 다수의 가변 도메인은 아달리무맙과 유사한 성능을 보였다.

[0412] 3.4 NF-κB/SEAP HEK-293 리포터 세포의 가용성 TNF-알파-유도성 활성화 억제

[0413] 먼저, 무린 L929 세포에 대한 가용성 TNF-알파의 세포독성 억제에 기초하여 선별된 가변 도메인의 효력을 측정하였다. 인간 세포를 사용한 검정법에서 상기 가변 도메인이 또한 효과적이고, 강력한 효능이 보였다는 것을 확인하기 위해, HEK-293-NF-κB-SEAP 리포터 세포를 이용하여 실험을 수행하였다. NF-κB/SEAP HEK-293 세포를 NF-κB 반응 효소의 전사 제어하에 SEAP (분비된 알칼리성 포스파타제) 리포터 유전자로 안정적으로 형질감염시킨다. 가용성 인간 TNF-알파에 의한 리포터 유전자의 유도를 확인하고, TNF-알파-중화 항체에 의해 이 반응을 억제시킬 수 있는 능력에 대해 입증하였다. 상기 세포에서, SEAP 리포터 유전자의 활성화는 세포막 TNFR1 수용체를 통해 가용성 TNF-알파에 의해 활성화되는 NF-κB 경로에 의존한다.

- [0414] 제1 실험에서, Q65B1 (패밀리 1), Q65C7 (패밀리 1), Q62E10 (패밀리 2) 및 아달리무맙을 시험하였다. 제2 실험에서는 Q65D3을 Q65B1과 비교하였다.
- [0415] 3.4.1 Q65B1, Q65C7, Q62E10 및 아달리무맙에 의한 억제
- [0416] 물질
- [0417] - HEK-293 NF- κ B/SEAP 세포 (임게넥스(Imgenex)): 3.5×10^4 개의 세포/웰, 2×10^4 개의 세포/웰 (ii), 10^4 개의 세포/웰 (i)
- [0418] - 멸균 96 웰 플레이트
- [0419] -10% FBS, Pen/Strep, 및 500 ug/mL 제네티신(Geneticin) 항생제 (G418, 인비트로젠(Invitrogen), 10131027)로 보충된 DMEM (시그마, D6429)
- [0420] - 인간 TNF-알파 (인비트로젠, PHC3015) 농도: 2 ng/ml
- [0421] - 정제된 면역글로불린 쇠 가변 도메인 Q65B1, Q65C7, Q65D3, Q65E5, Q65E6 및 Q62E10
- [0422] - 면역글로불린 쇠 가변 도메인 및 아달리무맙의 희석액의 범위: 500 nM - 2 pM; 150 nM-1 pM; (3.5배 희석액)
- [0423] -인간 TNF-알파 용량 반응 곡선: 10 ng/mL - 0.01 ng/mL
- [0424] - 플레이트 중 대조군:
- [0425] - 세포 배지 (CM)
- [0426] - 2 ng/ml의 인간 가용성 TNF-알파 ("hs-TNF-알파")
- [0427] - 0.01% 트리톤 X-100 (TNF 용량 반응용)
- [0428] - 인큐베이션 시간: 22.5 h
- [0429] - 콰티블루(Quant iBlue) 배지 (인비보젠(InvivoGen)): 200 μ L
- [0430] - 시험된 상청액 부피: (i) 10 μ L, (ii) 10 μ L 및 20 μ L
- [0431] - 관독 시점: 2 h 45 min
- [0432] - 바이오래드(BioRad) 플레이트 관독기 (620 nm)
- [0433] 방법
- [0434] 0일째, 3.5×10^4 개의 세포/웰의 NF- κ B/SEAP HEK-293 세포를 96 웰 멸균 평저형 마이크로플레이트 중 100 μ L 중에 플레이팅하고, 37°C 및 5% CO₂에서 밤새도록 보관하였다. 1일째, 각 정제된 면역글로불린 쇠 가변 도메인에 대한 (3.5배의) 연속 희석액을, 2 ng/mL hs-TNF-알파를 함유하는 100 μ L의 HEK 배지 중에서 (삼중으로 수행하는데 충분한 부피로) 셋업하였다. 배지를 검정 플레이트로부터 제거하고, 100 μ L의 각 샘플 희석액으로 치환하였다. 37°C 및 5% CO₂에서 22.5 h 경과 후, 10 μ L 또는 20 μ L의 각 상청액을 96 웰 평저형 NUNC 플레이트 중에서 200 μ L의 미리 가온된 콰티블루 배지 (인비보젠)와 혼합하였다. 암실에서 진탕시키면서, 37°C에서 2 h 45 min 동안 인큐베이션시킨 후, 620 nm에서 바이오래드 플레이트 관독기를 사용하여 SEAP 생산량을 측정하였다.
- [0435] 그 결과, Q65B1 (패밀리 1), Q65C7 (패밀리 1) 및 Q62E10 (패밀리 2)은 가용성 인간 TNF-알파에 의해 유도된 유도성 세포 활성화를 최대로 억제시키는 것으로 나타났다. 그 결과, 상기 면역글로불린 쇠 가변 도메인은 인간 세포 상에서 발현된 TNFR에 의해 매개되는 가용성 TNF-알파에 대한 반응을 강력하게 및 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다 (도 2a).
- [0436] 3.4.2 Q65D3 및 Q65B1 (둘 모두 패밀리 1)에 의한 억제
- [0437] 물질 및 방법은 상기 포인트 3.4.1하에 기술된 바와 같되, 단, 예외적으로, 세포/웰의 개수 (3.5×10^4 개, 2×10^4 개, 및 1×10^4 개), 및 TNF 자극 후 세포 상청액의 부피 (10 μ L 및 20 μ L)는 상이하였다.
- [0438] 결과

[0439] Q65B1 및 Q65D3, 둘 모두 HEK-293 NF- κ B/SEAP 리포터 세포 상의 인간 가용성 TNF-알파의 활성을 완전하게 중화시킬 수 있고, 여기서, EC50 값은 Q65B1의 경우, 약 0.2 nM이고, Q65D3의 경우, 0.6 nM이다 (도 2b).

[0440] 3.5 막 TNF-알파 유도성 세포 활성화 억제

[0441] 가용성 및 막 결합 TNF-알파, 둘 모두는 TNF-알파-수용체를 발현하는 세포의 활성화를 유도할 수 있고, 상기 두 형태 모두 크론병에서 염증 및 병상의 원인이 되는 것으로 간주된다. 가용성 및 막 결합 TNF-알파, 둘 모두에 결합할 수 있고, 그의 활성을 중화시킬 수 있는 가변 도메인이 가능하게는 가장 효과가 클 것이다.

[0442] 막-TNF-알파 유도성 세포 활성화를 억제시킬 수 있는 능력을 이용하여 확실하게 가변 도메인을 확인할 수 있도록 하기 위하여 세포 접촉 리포터 검정법을 개발하였다. 비-절단가능한 막횡단 형태의 인간 TNF-알파 (mTNF-알파-CHO)를 구성적으로 발현하는 CHO 세포주를 생성하였다. NF- κ B/SEAP HEK-293 세포와의 공동 배양시, mTNF-알파-CHO 세포는 리포터 유전자의 활성화를 유도하였다. 그러므로, mTNF-알파 유도성 세포 활성화를 억제시킬 수 있는 상이한 가변 도메인의 능력을 측정할 수 있었다.

[0443] 3.5.1 막 TNF-알파 유도성 세포 활성화 검정법의 결과

표 3

표 3(a)
M62 및 M63으로부터 유래된 항-TNF-알파 클론 - mTNF-알파-유도성 NF- κ B/SEAP HEK-293 리포터 세포 활성화의 억제

클론 ID	패밀리	mTNF-알파-유도성 HEK-NF- κ B/SEAP 리포터 억제 (EC50 = nM)
Q62F2	1	34
Q62F11	-	40
Q62E10	2	80
Q62F10	2	-
아달리무맙		1 - 3

표 3(b)
M65로부터 유래된 클론 - mTNF-알파-유도성 NF- κ B/SEAP HEK-293 리포터 세포 활성화의 억제

클론 ID	패밀리	mTNF-알파-유도성 HEK-NF- κ B/SEAP 리포터 억제 (EC50 = nM)
Q65D3	1	16.0
Q65D1	1	15.3
Q65B1	1	10.9
Q65C7	1	14.1
Q65A3	2	23.9
Q65E12	2	173.8
Q65F6	2	109.6
아달리무맙		1.2

[0444]

[0445] 패밀리 1에 속하는 가변 도메인은 일반적으로 mTNF-알파를 효과적으로 억제시킨 것으로 나타났고, 패밀리 2에 속하는 가변 도메인 또한 일반적으로 mTNF-알파를 억제시킨 것으로 나타났다는 것을 알 수 있다.

[0446] **실시예 4: 아달리무맙과의 교차 반응성**

[0447] 아달리무맙 1 μ g/ml를 HPM 플레이트 상에 코팅한 후, 상이한 가변 도메인의 부재 또는 존재하에서 인간 TNF-알파와 함께 인큐베이션시켰다. 세척하여 유리 TNF-알파-가변 도메인 복합체를 제거한 후, 고정화된 mAb에 결합한 상태 그대로 남아있는 TNF-알파를 비오틴화된 토끼 폴리클로날 항-hTNF-알파 항체와 인큐베이션시킴으로써 검출하였고; ELISA 색상 발색을 위해 m아비딘-HRP에 이어서, TMB를 첨가하였다.

- [0448] 결과
- [0449] Q62E10 (패밀리 2), Q62F2 (패밀리 1), Q62F10 (패밀리 2), Q65A3 (패밀리 2), Q65B1 (패밀리 1), Q65C7 (패밀리 1), Q65D1 (패밀리 1), Q65D3 (패밀리 1), Q65E12 (패밀리 2), Q65F6 (패밀리 2) 및 Q62F11 (패밀리 1도 패밀리 2도 아님)은 TNF-알파의 아달리무맙에의 결합을 완전히 억제시키는 것으로 나타났다.
- [0450] **실시예 5: 마우스 소장으로부터의 상청액 중에서의 정제된 이. 콜라이 재조합 항-TNF-알파 면역글로블린쇄 가변 도메인의 안정성**
- [0451] 여러 마우스의 플링된 소장 내용물로부터 제조된 상청액 추출물의 존재하에서 정제된 가변 도메인을 시험하였다. 장 추출물의 존재하에서 가변 도메인을 상이한 기간 동안 인큐베이션시킨 후, h-TNF-알파-TNFR2 ELISA를 사용하여 "소화된" 가변 도메인 샘플의 TNF-알파-결합 활성을 검정하였다.
- [0452] 마우스 소장 상청액
- [0453] 마우스 소장을 절개하고, 고체 내용물을 제거하고, 장을 1 ml의 0.9% 염수로 세정하였다. 1.5 mL 소형 원심분리기 튜브에서 고체 및 액체 부분을 조합하고, 균질해질 때까지 와동시키고, 4°C에서 10분 동안 16k xrcf로 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 사용 전 -80°C에서 보관하였다.
- [0454] 플레이트 및 항원
- [0455] 4°C에서 밤새도록 1 ug/mL 에타네르셉트 (50 uL/웰)로 코팅된 HPM 플레이트 상에서 항-TNF-알파 가변 도메인을 검정하였다. 검정법에서 사용하기 전 최소 1시간 동안 플레이트를 1% BSA로 차단하였다.
- [0456] 프로테아제 정지액
- [0457] 프로테아제 억제제 각테일 탭을 5 mL 프로테아제 정지 완충제 (2% BSA, 1xPBS, 5 mM NaEDTA)에 용해시켜 20x 프로테아제 억제제 스톱 용액을 제조하였다. 프로테아제 정지 완충제 중의 1/100의 PMSF 희석액을 이용하여 20x 프로테아제 억제제 용액을 1/10으로 희석하여 (섹션 2.3.3에 기술된 바와 같은) 2x 프로테아제 정지액을 제조하였다.
- [0458] 방법
- [0459] 소화물
- [0460] 0.4% BSA 중에서 250 ug/mL로 가변 도메인 스톱 용액을 제조하였다. 얼음 상의 55.2 uL의 SI 상청액에 4.8 uL의 가변 도메인을 첨가하고, 와동시켜 혼합하였다. 25 uL를 즉시 제거하고, 25 uL의 빙냉 프로테아제 정지액과 혼합하고 (비소화된 대조군), -80°C에서 냉동시켰다. 25 uL의 제2 분취물을 폴리카르보네이트 박막 PCR 플레이트 중의 단일 웰로 이동시키고, 37°C에서 1 내지 24시간 동안 인큐베이션시켰다 (소화된 가변 도메인). 인큐베이션 후, 소화된 가변 도메인 샘플을 얼음 상에 놓고, 25 uL의 빙냉 프로테아제 정지액을 각 튜브에 첨가하였다. 샘플을 검정 이전에 -80°C에서 냉동시켰다.
- [0461] ELISA
- [0462] 1% BSA 중에 20x 프로테아제 억제제 스톱 용액을 희석시켜 제조된 1% BSA + 1x 프로테아제 억제제 용액 중에서 가변 도메인을 희석시키고, 5 ng/mL h-TNF-알파와 1:1로 혼합하였다. 1 ug/mL 에타네르셉트로 코팅된, 차단된 HPM ELISA 플레이트로 TNF-알파 믹스를 옮겼다. 플레이트를 2 h 동안 인큐베이션시킨 후, PBS 0.5% PEG20 (PBST)으로 4x 세척하고, 건조시킨 후, 이어서, RT에서 진탕시키면서 1시간 동안 비오틴화된 토끼 폴리클로날 항-인간 TNF-알파 항체 (50 uL/웰, 0.27 ug/mL)와 함께 인큐베이션시켰다. 1 h 경과 후, 플레이트를 PBST로 4x 세척하고, 탭핑(tapping)하여 건조시킨 후, RT에서 30 min 동안 진탕시키면서 m아비딘-HRP (50 uL/웰, 1/1,000 희석액)와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 PBST로 4x 세척하고, 탭핑하여 건조시키고, 100 uL TMB를 사용하여 발색시켰다. (PBS 중) 가변 도메인의 표준 곡선을 소화된/비-소화된 샘플과 함께 나란히 전개시켰다. 표준 곡선에서 사용된 가변 도메인 및 시험 샘플의 최고 농도는 각각 300 ng/mL 및 200 ng/mL였다.
- [0463] 데이터 분석
- [0464] TNF만 포함하는 대조군 (최대 신호)으로부터 소화된 가변 도메인 및 비소화된 대조군 가변 도메인에서의 신호를 감산하여 가변 도메인에 의해 달성된 억제 수준을 산출하였다. 이를 통해 각 가변 도메인에 대한 신호 감소량을 획득하였는데, 이는 샘플 중의 가변 도메인의 양에 비례한다. 소화된 가변 도메인의 신호 감소량을 단일 희

석에 대한 비-소화된 가변 도메인의 신호 감소량으로 나눔으로써 잔존율(%)을 산출하였다.

[0465]

결과

[0466]

62F2 및 65B1 (둘 모두 패밀리 1)은 80% 초과 잔존율을 보였고, 62E10은 70% 초과 잔존율을 보였고 (패밀리 2), 65D1 및 65C7 (패밀리 1)은 약 50%의 잔존율을 보였다.

[0467]

이어서, 시간 경과에 따른 연구를 수행하여 1 h, 3 h 및 7 h째의 성능을 측정하였다. 결과는 광범위하게는 이전 소장 상청액 연구의 것과 일치하였다.

[0468]

실시예 6: 선별된 항-TNF-알파 면역글로불린쇄 가변 도메인의 최적화

[0469]

이제까지 연구된 가변 도메인은 돌연변이화되지 않은 것이었고, 정제된 가변 도메인은 모두 C-말단 태그 (c-myc-6His 또는 Flag-6His)를 포함하였다. Q65B1로의 돌연변이와 조합되었을 때, N-말단 아미노산의 변형, 또는 C-말단-태그의 부재가 안정성을 추가로 증가시키는지 여부를 조사하기 위해 돌연변이체를 디자인하였다.

[0470]

6.1 구조물 및 돌연변이

[0471]

(i) 특정 돌연변이가 프로테아제 저항성에 미치는 효과를 조사하기 위해 Q65B1 단량체 돌연변이체 세트 (ID7F-EV, ID8F-EV ID9F-EV, ID13F-EV, ID14F-EV 및 ID15F-EV; 모두 His-태그 포함)를 디자인하였다.

[0472]

(ii) 돌연변이화된 Q65B1 단량체 변이체를 포함하고, His-태그는 제거된 비헤드 구조물 세트 (ID22F - ID29F)를 디자인하였다.

[0473]

(iii) 추후의 효모 발현 최적화 가능성을 조사하기 위해 서열 시작부를 DVQLV로 돌연변이화하고, His-태그를 제거하는 것을 포함한 Q65B1 단량체 돌연변이체 세트를 디자인하였다 (DVQLV 돌연변이체 ID37F 및 ID38F를 각각 EVQLV 등가물 ID32F (ID32F는 His-태그를 포함하지 않는 ID8F-EV이다) 및 ID34F와 비교).

[0474]

상기 구조물 및 돌연변이에 대한 추가의 상세한 설명은 하기 표에 제시되어 있다. 돌연변이는 모체 Q65B1 단량체 서열과 비교하여 밑줄체 및 볼드체로 표시되어 있다.

ID26F	EYQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIT HT YGD SV KG	REFVSRNNAAN SM YLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ HL GIN	KGGGTQVTVSS
	EYQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIT HT YGD SV KG	REFVSRNNAAN SM YLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ HL GIN	KGGGTQVTVSS
ID27F	EYQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIT HT YGD SV HT G	REFVSRNNAANKMYLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ KL GIN	KGGGT L VTVSS
	EYQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIT HT YGD SV HT G	REFVSRNNAANKMYLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ KL GIN	KGGGT L VTVSS
ID28F	EYQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIKYGD SV HT G	REFVSRNNAANKMYLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ KL GIN	KGGGTQVTVSS
	EYQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDF	SSHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIKYGD SV HT G	REFVSRNNAANKMYLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ KL GIN	KGGGTQVTVSS
ID29F	EYQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIKYGD SV HT G	REFVSRNNAANKMYLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ HL GIN	KGGGTQVTVSS
	EYQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIKYGD SV HT G	REFVSRNNAANKMYLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ HL GIN	KGGGTQVTVSS
ID34F	EYQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIT HT YGD SV KG	REFVSRNNAANKMYLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ HL GIN	KGGGTQVTVSS
ID37F	D YQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIT HT YGD SV KG	REFVSRNNAANKMYLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ KL GIN	KGGGTQVTVSS
ID38F	D YQIVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS	SHWMY WVRQAPGKELEWLS EINTNGLITIT HT YGD SV KG	REFVSRNNAANKMYLELITRLEPEPDTALYYCAR	NQ HL GIN	KGGGTQVTVSS

[0476]

[0477]

6.2.1 효력 및 장 프로테아제에 대한 저항성에 미치는 효과

[0478]

(i) ID7F-EV, ID8F-EV ID9F-EV, ID13F-EV, ID14F-EV 및 ID15F-EV

[0479]

나이브 마우스 소장 상청액: 7마리의 C57BL/6 수컷 마우스로부터의 소장의 내용물을 0.9% 염수로 제거하고, 조합하고, 균질화시키고, 원심분리하였다. 생성된 상청액을 제거하고, 분취하고, 냉동시켰다.

[0480]

인간 대변 상청액 풀: 1x PBS를 첨가하고 대변 샘플을 슬러리로 만들었다. 이어서, 슬러리를 풀링하고, 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 분취하고, -80°C에서 보관하였다. 상기 프로세스를 통해 임의의 세포 물질을 포함하는 대변 매트릭스를 제거하였다.

[0481]

밤새도록 1 ug/mL 에타네르셉트 (50 uL/웰)로 코팅된 HPM 플레이트 상에서 항-TNF-알파 가변 도메인을 검정하였다. 검정법에서 사용하기 전 최소 1시간 동안 플레이트를 1% BSA로 차단하였다. 실시예 5에 기술된 바와 같이 2x 프로테아제 정지액을 제조하였다.

- [0482] 소화물
- [0483] 0.34% (3,400 ug/mL) BSA 중에서 250 ug/mL 가변 도메인 스톱 용액을 제조하였다. 얼음 상의 55.2 uL의 대변 또는 소장 상청액에 4.8 uL의 가변 도메인을 첨가하고, 와동시켜 혼합하였다. 25 uL를 즉시 제거하고, 25 uL의 빙냉 프로테아제 정지액과 혼합하고 (비소화된 대조군), -80°C에서 냉동시켰다. 25 uL의 제2 분취물을 폴리카르보네이트 박막 PCR 플레이트 중의 웰에 배치하고, 37°C에서 각각 17 h 또는 7 h 동안 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 소화된 가변 도메인 샘플을 얼음 상에 놓고, 25 uL의 빙냉 프로테아제 정지액을 각 튜브에 첨가하였다. 샘플을 검정 이전에 -80°C에서 냉동시켰다.
- [0484] ELISA
- [0485] 실시예 5에 기술된 바와 같이 1% BSA + 1x 프로테아제 억제 용액에 가변 도메인을 희석시키고, 5 ng/mL h-TNF-알파와 1:1로 혼합하고, RT에서 1 h 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 가변 도메인 TNF-알파 혼합물을, 1 ug/mL 에타네르셉트로 코팅된 차단된 ELISA 플레이트 상에 로딩하고, RT에서 진탕시키면서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 PBST로 4x 세척하고, 탭핑하여 건조시키고, RT에서 진탕시키면서 1시간 동안 비오틴화 된 토끼 항-인간-TNF-알파 폴리클로날 항체 (50 uL/웰, 0.3 ug/mL)와 함께 인큐베이션시켰다. 1 h 경과 후, 플레이트를 상기와 같이 세척하고, RT에서 30 min 동안 진탕시키면서 m아비딘-HRP (50 uL/웰, 1/1,000 희석액)와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 상기와 같이 세척하고, 건조시키고, 100 uL TMB를 이용하여 발색시켰다. (PBS 중) 가변 도메인의 표준 곡선을 소화된/비-소화된 샘플과 함께 나란히 전개시켰다. 표준 곡선에서 사용된 가변 도메인 및 시험 샘플의 최고 농도는 100 ng/mL였다.
- [0486] 데이터 분석
- [0487] 소화 후, TNFR2-간접 ELISA를 사용하여 가변 도메인 농도를 측정하였다. 본 검정법에서, 가변 도메인을 TNF-알파와 혼합한다. 이어서, TNF-알파의 잔류 수준을 측정한다. ELISA 플레이트에 결합된 TNFR2 수용체와의 결합이 억제된 TNF-알파의 양으로부터 가변 도메인의 농도를 도출해 낸다. 오직 1% BSA만을 함유하는 웰로부터 구한 블랭크 판독값을 이용하여 원시 OD450 값을 조정하였다. 4 파라미터 곡선을 피팅하기 위해 비-선형 회귀를 사용하여 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)을 이용함으로써 표준 곡선을 플롯팅하였다. 표준 곡선을 사용하여 그래프패드 프리즘으로 시험 샘플 중의 가변 도메인 농도를 산출하였다. 0 시점의 웰 중의 평균 가변 도메인 농도를 단일 시점에 대한 평균 가변 도메인 농도로 나눔으로써 잔존율(%)을 산출하였다. 두 평균의 비의 표준 오차를 산출하였다.
- [0488] 결과
- [0489] Q65B1 가변 도메인 단량체 평가 결과, 이들 돌연변이를 포함하는 것은 놀랍게도 변형된 가변 도메인의 TNF-알파 중화 효력 (TNF-알파-TNFR2 ELISA)에 크게 영향을 주지 않은 것으로 나타났다.
- [0490] ID8F-EV 및 ID13F-EV는 마우스 장 및 인간 대변 상청액 추출물에 존재하는 프로테아제에 의한 불활성화에 대하여 개선된 저항성을 보였다 (도 3).
- [0491] (ii) 구축물 ID22F - ID29F
- [0492] 물질
- [0493] - HEK-293 NF-κB/SEAP 세포: 50 uL 중 10⁴개의 세포/웰
- [0494] - 96 웰 플레이트
- [0495] - 10% FBS, Pen/Strep, 및 500 ug/mL 제네티신 항생제 (G418)로 보충된 DMEM
- [0496] - 인간 TNF-알파 농도: 2 ng/ml
- [0497] - 정제된 동종비헤드 가변 도메인: ID22F - ID29F
- [0498] - 가변 도메인 희석액: 20 nM - 2.1 pM; 2.5배 희석액
- [0499] - 인큐베이션 시간: 23 h
- [0500] - SEAP 비색 기질 배지: 200 uL; 시험된 상청액 부피: 20 uL; 판독 시점: 2 h
- [0501] - 플레이트 판독기 (620 nm)

- [0502] 방법
- [0503] 0일째, 10^4 개의 세포/웰의 NF- κ B/SEAP HEK-293 세포를 96 웰 평저형 마이크로플레이트 중 50 μ L 중에 플레이팅하고, 37°C 및 5% CO₂에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 이튿날, 각 정제된 가변 도메인에 대한 연속 희석액을 4 ng/mL hs-TNF-알파를 함유하는 50 μ L의 HEK 배지 중에 검정 농도의 2배되는 농도로 (삼중으로 수행하는 데 충분한 부피로) 셋업하였다. 가변 도메인 및 TNF-알파를 RT에서 1 h 동안 인큐베이션시키고, 50 μ L의 각 희석액을 검정 플레이트에 첨가하기 이전에 진탕시켰다. 37°C 및 5% CO₂에서 23 h 경과 후, 20 μ L의 각 상청액을 96 웰 평저형 플레이트 중에서 200 μ L의 미리 가온된 SEAP 배지와 함께 혼합하였다. 암실에서 진탕시키면서, 37°C에서 2 h 동안 인큐베이션시킨 후, 흡광도 620 nm에서 플레이트 판독기를 사용하여 SEAP 생산량을 측정하였다.
- [0504] 결과
- [0505] Q65B1 동중비헤드 유도체 (변이 K59H, K65H, K78S, K101H를 포함하는 것 포함)는 가용성 TNF-유도성 HEK293-NF- κ B-SEAP 리포터 검정법에서 동일한 강력한 효능을 보였고, 효과적이었으며, EC50 값은 0.02 nM - 0.03 nM이었다. 단량체와 비교하였을 때, Q65B1 동중비헤드의 효력은 대략 10배 증가되었다.
- [0506] (iii) ID32F, ID34F, ID37F, ID38F
- [0507] 효소에서 발견되는 경우, 폐환화된 N-말단 글루타메이트를 가지는 생성물이 생성될 수 있는 가능성을 막기 위해, Q65B1 기반 가변 도메인의 N-말단 아미노산의 글루탐산에서 아스파르트산 잔기로의 변이 (이는 폐환화에 감수성을 띠지 않는다)가 미치는 효과를 조사하였다. Q65B1로부터 돌연변이체를 생성하여 N-말단 D 잔기를 가지는 상응하는 Q65B1 및 상기 각각의 것을 바람직한 프로테아제 저항성 돌연변이와 조합하는 변이체를 제조하였다.
- [0508] NF- κ B/SEAP HEK-293 세포 리포터 검정법을 이용한 ID-32F, ID-34F, ID-37F, 및 ID-38F의 sTNF-알파 중화 능력
- [0509] ID-38F 및 ID-34F가 가용성 인간 TNF-알파를 중화시킨다는 것을 확인하기 위해, NF- κ B/SEAP HEK-293 세포성 리포터 검정법에서 시판용 항-TNF-알파 항체 인플릭시맵 (레키메이드)과의 비교로 상기 가변 도메인을 시험하였다. 다른 날 수행된 2개의 별개의 실험으로부터 결과를 수득하였다.
- [0510] 물질
- [0511] - HEK-293 NF- κ B/SEAP 세포 (임계박스): 50 μ L 중 10^4 개의 세포/웰
- [0512] - 멸균처리된 96 웰 플레이트
- [0513] - 10% FBS, Pen/Strep, 및 500 μ g/mL 제네티신 항생제 (G418, 인비트로젠, 10131027)로 보충된 DMEM (시그마, D6429)
- [0514] - 인간 TNF-알파 (인비트로젠, PHC3015) 농도: 2 ng/ml
- [0515] - 5개의 정제된 가변 도메인: ID-32F, ID-34F, ID-37F, ID-38F 및 Q65B1
- [0516] - 인플릭시맵 희석액: 10 nM - 1 pM (제1 실험); 2 nM - 1 pM (제2 실험)
- [0517] - 가변 도메인 희석액: 10 nM - 1 pM (제1 실험); 5 nM - 1 pM (제2 실험)
- [0518] - 인큐베이션 시간: 22 h
- [0519] - 판티블루 배지 (인비트로젠): 200 μ L; 시험된 상청액 부피: 20 μ L; 판독 시점: 2 h
- [0520] - 바이오레드 플레이트 판독기 (620 nm)
- [0521] 방법
- [0522] 10^4 개의 세포/웰의 NF- κ B/SEAP HEK-293 세포를 96 웰 멸균처리된 평저형 마이크로플레이트 중 50 μ L 중에 플레이팅하고, 37°C 및 5% CO₂에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 이튿날, 가변 도메인 및 인플릭시맵의 연속 희석액 (2.5배)을 4 ng/mL hs-TNF-알파를 함유하는 HEK 배지 중에 검정 농도의 2배되는 농도로 셋업하였다 (제1 실험의 경우). 제2 실험에서는 연속 희석액 (가변 도메인의 경우, 1.9배, 및 아달리무맵의 경우, 2.2배)을 120 μ L의 HEK 배지 중에 검정 농도의 4x인 농도로 셋업하였다. 이어서, 100 μ L의 각 희석액을, 8 ng/mL hsTNF-알파를 함

유하는 100 μ L의 HEK 배지로 1:1로 희석하여 (4x) 검정 농도의 2배되는 농도의 가변 도메인 및 TNF-알파를 수득하였다. 50 μ L의 각 희석액을 검정 플레이트에 첨가하기 이전에 RT에서 1 h 동안 진탕시키면서 가변 도메인 및 TNF를 인큐베이션시켰다. 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 22 h 동안 인큐베이션시킨 후, 20 μ L의 각 상청액을 96 웰 평저형 NUNC 플레이트 중에서 200 μ L의 미리 가온된 콰티블루 배지와 함께 혼합하였다. 암실에서 진탕시키면서, 37 $^{\circ}$ C에서 2 h 동안 인큐베이션시킨 후, 흡광도 620 nm에서 플레이트 판독기를 사용하여 SEAP 생산량을 측정하였다. 암실에서 진탕시키면서, 37 $^{\circ}$ C에서 2 h 동안 인큐베이션시킨 후, 620 nm에서 바이오래드 플레이트 판독기를 사용하여 SEAP 생산량을 측정하였다.

[0523]

결과

[0524]

실험 1의 결과는 도 4a에 제시되어 있고, 실험 2의 결과는 도 4b 및 도 4c에 제시되어 있다. 모든 가변 도메인은 완전한 sTNF-알파 중화 및 유사한 효력을 보이며, 여기서, EC50 값은 0.3 nM 및 0.5 nM이다. 가변 도메인 중의 돌연변이가 부가가 sTNF-알파를 중화시키는 상기 가변 도메인의 효력에는 어떤 영향도 미치지 않는다는 것은 명백하다. 인플릭시맵은 어느 실험에서도 완전한 sTNF-알파 중화를 일으키지 않았고, 거의 2 nM에서 ~80%의 최대 중화를 보이며, 거의 안정 상태에 이르는 용량 반응 곡선을 나타내었다.

[0525]

NF- κ B/SEAP HEK-293 세포성 리포터 검정법을 이용한 ID-34F, ID-38F, Q65B1, ID-8FEV, 아달리무맵, 및 인플릭시맵의 mTNF-알파 중화 활성

[0526]

ID-38F 및 ID-34F가 막 결합 TNF-알파를 중화시킨다는 것을 확인하기 위해, NF- κ B/SEAP HEK-293 세포성 리포터 검정법에서 2개의 선조체 (Q65B1 및 ID8F-EV)와의 비교로 상기 가변 도메인을 시험하였다. 2개의 시판용 항-TNF-알파 항체 (아달리무맵 및 인플릭시맵)를 참조를 위해 동일 검정법에서 시험하였다.

[0527]

물질:

[0528]

- NF- κ B/SEAP HEK-293 세포 (임계박스) 농도: 3.5×10^4 개의 세포/웰

[0529]

- 안정적인 TNF-알파_{DEL} 발현 Flp-In CHO 세포주 (인비트로젠 & 진아트(GeneArt), 라이프 테크놀로지즈(Life Technologies)): 25x103개의 세포/웰

[0530]

- 2개의 정제된 항-TNF-알파 돌연변이체 가변 도메인: ID-34F 및 ID-38F

[0531]

- 2개의 정제된 항-TNF-알파 가변 도메인: Q65B1 및 ID8F-EV

[0532]

- 2개의 항체: 아달리무맵 및 인플릭시맵

[0533]

- 가변 도메인/Ab 희석액: 300nM - 0.11 nM (2.2배 희석액)

[0534]

- 인큐베이션 시간: 24 h

[0535]

- 콰티블루 배지 (인비트로젠): 200 μ L; 시험된 상청액 부피: 10 μ L; 판독 시점: 2 h

[0536]

-바이오래드 플레이트 판독기 (620 nm)

[0537]

방법:

[0538]

0일째, 50 μ L 중의 3.5×10^4 개의 세포/웰의 NF- κ B/SEAP HEK-293 세포를 96 웰 평저형 마이크로플레이트 중에 플레이트링하고, 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 밤새도록 보관하였다. 1일째, 각 정제된 가변 도메인에 대한 연속 희석액을 50 μ L의 HEK 배지 중에 검정 농도의 3배되는 농도로 (삼중으로 수행하는 데 충분한 부피로) 셋업하였다. 50 μ L의 각 가변 도메인 희석액 (3x)을 검정 플레이트에 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 \leq 1 h 동안 보관하였다. HEK-배지 중에서 제조된 50 μ L의 m-TNF-알파 CHO 세포 (25,000개의 세포/50 μ L)를 HEK-검정 플레이트에 첨가하여 최종 가변 도메인 검정 농도 (1x)로 만들었다. 세포를 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂에서 24 h 동안 인큐베이션시켰다. 2일째, 10 μ L의 각 상청액을 200 μ L의 미리 가온된 콰티블루 배지 (인비트로젠)와 함께 혼합하였다. 암실에서 진탕시키면서, 37 $^{\circ}$ C에서 2 h 동안 인큐베이션시킨 후, 620 nm에서 바이오래드 플레이트 판독기를 사용하여 SEAP 생산량을 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어에 의해 생성된 용량 반응 곡선을 분석하였다.

[0539]

결과

표 4

항-TNF-알파 가변 도메인 및 시판용 항-TNF-알파 항체에 의한 mTNF-알파 중화

가변 도메인/항체	EC50 (nM)
ID-34F	4.71
ID-38F	5.16
Q65B1	8.72
ID8F-EV	7.69
아달리무맙	3.14
인플릭시맙	3.79

[0540]

[0541]

ID-34F 및 ID-38F는 막 결합 TNF-알파를 중화시키는 데 있어서 유사한 효력을 보이는데, 이는 가변 도메인의 N-말단 아미노산의 E에서 D로의 변이가 가변 도메인의 효력에는 어떤 영향도 주지 않는다는 것을 시사한다. ID-34F 및 ID-38F는 mTNF에 대하여 모체 단량체인 Q65B1 및 ID-8FEV보다 약간 더 큰 효력을 가지는 것으로 보인다. ID-34F 및 ID-38F는 mTNF-알파를 중화시키는 데 있어서 시판용 항체 아달리무맙 및 인플릭시맙보다 효력이 매우 조금 더 작다.

[0542]

ID38F의 TNFR1 ELISA 비교

[0543]

TNFR1은 또한 TNF-알파 병상에서 중요한 역할을 하는 것으로 간주되는 바, TNF의 TNFR1에의 결합을 방해하는 데 있어서 ID38F 및 아달리무맙의 능력을 시험하기 위해 ELISA를 수행하였다.

[0544]

방법

[0545]

평균 96 웰 마이크로타이터 플레이트를 4°C에서 밤새도록 50 ul 0.5 ug/ml hTNFR1 (R&D 시스템즈)/웰로 코팅하였다. 플레이트 세척기를 사용하여 PBST 중에서 플레이트를 세척하고, 200 ul 1% BSA/웰 중에서 1시간 동안 차단하였다. 각 항체에 대해 30 nM을 시작으로 3배 희석된 희석액 시리즈를 1시간 동안 2.5 ng/ml TNF-알파와 함께 인큐베이션시킨 후, 그 중 50 ul/웰을 세척된 플레이트에 첨가하고, 5시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 플레이트를 세척하고, 50 ul/웰의, 1% BSA 중 비오틴화된 토끼 알파-hTNF (페프로테크(Peprotech) P31AB7)의 1/1,000 희석액과 함께 인큐베이션시키고, 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고, 50 ul/웰의, 1% BSA 중 m아비딘 HRP의 1/1,000 희석액과 함께 인큐베이션시킨 후, 최종적으로 세척하고, 100 ul/웰 TMB 기질과 함께 인큐베이션시켰다. 20분 후, 50 ul/웰 0.5 M H₂SO₄를 이용하여 반응을 정지시키고, 450 nm에서 흡광도를 판독하였다. 그래프패드 프리즘으로 ELISA 데이터로부터 EC50 값을 산출하였다.

[0546]

결과

표 5

항-TNF 작용제	EC50 (pM)
ID38F	610.0
아달리무맙	200.5

[0547]

[0548]

ID38F는 나노몰 이하의 EC50에서 TNF-알파의 TNFR1에의 결합을 중화시킬 수 있다. 본 검정법에서 아달리무맙의 효력이 더 높다는 것은 상기 분자가 2가인 반면, ID38F는 1가라는 사실을 반영하는 것일 수 있다.

[0549]

TNFR2 ELISA 및 안정성 검정법

[0550]

TNFR2 ELISA에서의 가변 도메인 단량체의 TNF-알파-결합 활성 평가 결과, 가변 도메인의 N-말단 아미노산의 E에

서 D로의 변이가 유의적인 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

[0551] 상기와 같이 마우스 소장 및 인간 대변 상청액 중에 존재하는 프로테아제에 의한 불활성화에 대한 그의 저항성을 측정함으로써 가변 도메인 단량체의 안정성을 시험하였다. 가변 도메인의 N-말단 아미노산의 E에서 D로의 변이는 프로테아제 안정성에 대해 단지 아주 적은 정도로만 영향을 미쳤다.

[0552] 6.2.2 요약

[0553] 본 결과는, N-말단 서열이 DVQLV이고, 아미노산 변이 K59H 및 K101H를 가지는, Q65B1과 관련된 단량체 ("ID38F")는 특히 강력한 TNF-알파-중화 활성을 가지고, 소장 및 대변 프로테아제에 의한 불활성화에 대하여 탁월한 저항성을 보이며, 효모에서 발현되는 경우, 피로글루타메이트 부가 반응에 대하여 감수성을 띠지 않는 생성물을 생산할 수 있는 잠재능을 가지는 것으로 나타났다.

[0554] **실시예 7: 장 및 IBD 염증성 프로테아제에 대한 안정성**

[0555] 7.1 염증성 IBD 조직에 존재하는 프로테아제에 대한 안정성 입증

[0556] 치료학적 항체를 신속하게 분해시킬 수 있는 프로테아제 활성은 크론병에서 상향 조절된다 (MMP3, MMP12, 카텝신) (문헌 [Biancheri et al., ECCO, Dublin 2011 Abstract P007], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). 그러므로, 정제된 염증성 프로테아제의 존재하에서 및 더욱 복잡한 IBD 점막 조직 용해물 중에서 항-TNF-알파 가변 도메인의 안정성을 조사하는 것이 중요하였다.

[0557] 재조합 인간 MMP-3 및 재조합 인간 MMP-12를 상업적 공급업체, 예를 들어, R&D 시스템즈로부터 입수하였다 (각각 513-MP-010 및 917-MP-010). TCNB 검정법 완충제: 50 mM 트리스, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0.05% (w/v) 폴리옥시에틸렌 (23) 라우릴 에테르, 예를 들어, Brij-35 (pH 7.5) 중에서 효소 활성화 및 22시간 인큐베이션을 수행하였다. MMP를 주요 검정법에서 사용하기 이전에 미리 인큐베이션시켜 활성화시켰다. rhMMP-3을 활성화시키기 위해, 효소를 5 ug/mL 키모트립신을 함유하는 TCNB 중에 20 ug/mL로 희석시키고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 활성화 후, PMSF를 최종 농도 2 mM까지 첨가하여 키모트립신 활성을 억제시켰다. PMSF이 rhMMP-3 활성화에 불리한 영향을 주지 않아야 한다. rhMMP-12를 TCNB 중에 50 ug/mL로 희석시키고, 37°C에서 30시간 동안 인큐베이션시켜 활성화시켰다. rhMMP-12 활성화를 위해 어떤 추가의 첨가제 또는 억제제도 사용하지 않았다.

[0558] 물질

[0559] 단량체 ID34F, 비헤드 ID25F, 에타네르셉트, 아달리무맙 및 인플릭시맙.

[0560] 방법

[0561] TCNB 완충제 중에서 제조된 시험 화합물을 얼음 상에서 활성화된 rhMMP-3 및 rhMMP-12와 함께 혼합하였다. 시험 화합물은 검정법 시작시 30 ug/mL의 농도로 존재하였다. rhMMP-3은 12 ug/mL의 출발 검정 농도로 존재하였다. rh-MMP-12는 30 ug/mL의 출발 검정 농도로 존재하였다. 검정 경과에 따른 효소-비의존적 분해에 대해 체크하기 위해 각 화합물을 두 효소 모두 및 TCNB 완충제만 포함하는 대조군의 존재하에서 시험하였다. 효소를 또한 '화합물 무함유'를 제공하는 TCNB만 포함하는 대조군과 함께 인큐베이션시켰다. t = 0시간째의 모든 반응물의 최종 부피는 = 30 uL였다. t = 0시간째, 10 uL의 출발 검정 부피를 제거하고, 반응을 정지시키기 위해 얼음 상에서 프로테아제 정지 완충제 (1 x PBS 2% BSA, 5 mM EDTA, 실시예 5에 기술된 바와 같음) 중 10 uL 2x 프로테아제 억제제 용액에 첨가하였다. T = 0 샘플을 -80°C에서 냉동시켰다. 남은 20 uL 반응 부피를 PCR 검정 플레이트에 실링하고, 37°C에서 22시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0562] 22시간 동안의 인큐베이션 후, 대부분의 반응물은 ~20 uL인 것으로 나타났다. 프로테아제 정지 완충제 (1 x PBS 2% BSA, 5 mM EDTA) 중의 20 uL 2x 프로테아제 억제제 용액을 첨가하여 반응을 정지시켰다. T = 22 hr 샘플을 -80°C에서 냉동시켰다. 검정 샘플을 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. 샘플을 로드 염료 중 6.6 ng/uL 시험 화합물 등가물로 희석하고, 15 uL를 10% 비스-트리스 겔에 로딩하였다 (실험 경과에 따른 시험 화합물의 농도에는 변화가 없다는 가정하에 100 ng의 각 시험 화합물/레인). 등가 부피의 '시험 화합물 무함유' 대조군 또한 로딩하였다. 표준으로서 화학발광성 MW 단백질 래더, 예를 들어, 슈퍼 시그널(Super signal) (피어스 (Pierce))를 5 uL/레인으로 첨가하였다. 샘플을 SDS-MES 완충제 중에서 전기영동시키고, 반건조 블롯팅 장치, 예를 들어, i블롯(iBlot) 상에서 7분 전달 프로그램을 이용하여 니트로셀룰로스 막으로 옮겨 놓았다. 막을 차단 용액 (1% BSA, 2% 탈지 분유, 0.05% PEG20, 1xPBS pH 7.4) 중 4°C에서 밤새도록 차단시켰다. 1) 1차: 차단

용액 중 1/1,000의 토끼 폴리클로날 항-Q65B1(-Flag-6His) (말기 출혈 혈청) 및 2) 2차: 차단 용액 중 1/1,000의 HRP-접합된 폴리클로날 돼지-항-토끼 IgG 항체 + 1% 정상 염소 혈청을 사용하여 가변 도메인을 검출하였다. 차단 용액 중, 감마 쇠에 특이적인, 1/1,000의 피옥시다제-접합된 항-인간 IgG (다코(Dako), P0214)를 사용하여 에타네르셉트, 아달리무맙 및 인플릭시맙을 검출하였다 (2차 항체 사용되지 않음). 각 인큐베이션 단계 사이에 25 mL PBST (1xPBS, 0.1% PEG20) 중에서 6x 5분 동안 블롯을 세척하여 비특이적으로 결합한 항체를 제거하였다. 피어스 슈퍼 시그널 ECL (34087)을 사용하여 블롯을 발색시키고, 필요할 경우, 노출 시간을 달리하면서 이미지 관티(ImageQuant) (LAS4000)를 이용하여 시각화하였다.

[0563] 결과

[0564] ID34F (Q65B1 K59H 및 K101H 변이체) 및 ID25F (D34F의 동종비헤드)는 22시간 동안의 인큐베이션 후, 시험관내에서 rh-MMP3 및 rh-MMP12 둘 모두에 대하여 완전히 저항성을 띠는 것으로 보인다 (도 5a). 그에 반해, 임상적인 생물학적 작용제, 에타네르셉트, 아달리무맙, 및 인플릭시맙은 각각 전장인 분자의 부분적, 또는 전체적인 절단을 통해 더 낮은 MW 단편을 생성하게 된다 (도 5b 및 5c). 분석 결과, 처리 후 변함이 없는 단량체 (15 kDa) 및 비헤드 (30 kDa)에 반응하는 밴드가 나타났다.

[0565] 7.2 돼지 및 원숭이로부터의 장액 및 대변 추출물 중에서의 안정성 입증

[0566] ID32F, ID34F, ID8F-EV 및 Q65B1을 각각 (a) 5시간 30분 동안 돼지 십이지장으로부터의, (b) 5시간 30분 동안 마우스 소장으로부터의, (c) 21시간 동안 인간 대변으로부터의 상청액의 존재하에서 인큐베이션시켰다. 시험된 가변 도메인은 상이한 GI 영역으로부터의 이들 추출물 중에서 우수한 안정성을 보였다. 각 가변 도메인에 대한 반응하는 대략적 잔존율(%)은 하기와 같았다:

표 6

	돼지 십이지장	마우스 소장	인간 대변
ID32F	80	55	40
ID34F	90	70	70
ID8F-EV	120	80	60
Q65B1	90	60	60

[0567]

[0568] 7.3 원숭이 위장관의 상이한 영역으로부터의 관강내 내용물로부터 제조된 추출물 중에서의 ID8F-EV의 안정성

[0569] ID8F-EV를 위, 십이지장, 공장 및 회장 상청액 중에서 5시간 동안, 및 맹장 및 결장 상청액 중에서 16시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, ID8F-EV 이 잔존율(%)은 대략 60% 내지 90%였다.

[0570] **실시예 8: 경구 투여 후 면역글로불린 쇠 가변 도메인의 장관으로의 국소 전달 및 점막 고유층으로의 접근**

[0571] 본 발명의 가변 도메인은 무린 TNF-알파에 결합할 가능성은 없지만, IBD를 앓는 마우스 모델에서의 경구 투여 후 장관으로의 국소 전달 및 점막 고유층 침구에 관한 입증은 TNF-알파 중화가 장 염증 부위에서 달성될 수 있다는 증거를 제공한다.

[0572] 8.1 정상적인 마우스 및 DSS 결장염 마우스로부터 채취된 결장 세그먼트의 관강에서의 생체의 인큐베이션 후 Q65B1의 결장 상피 침투

[0573] 방법

[0574] 표준 프로토콜을 이용하여 2마리의 마우스에서 DSS 결장염을 유도하였다. 7일 동안 식수 중 2% 텍스트란 슬페이트 (MP 바이오메디칼(MP biomedical))를 투여하고, 이후, 마우스를 추가로 3일 동안 유지시켜 질환이 최고로 발생할 수 있도록 하였다. 이어서, 상기 마우스를 정상적인 2마리의 마우스와 함께 죽이고, 결장을 제거하였다. 결장 관강내 내용물을 PBS로 온화하게 세척한 후, 세그먼트를 실로 라이게이션시키고, 하기 제시되는 바와 같이 프로세싱하였다. 결장 세그먼트에 2% FCS 및 15 mM HEPES를 함유하는 RPMI 3 ug/ml Q65B1을 로딩한 후, 개방된 세그먼트 단부를 라이게이션시키고, RT에서 1.75 h 동안 배양 플라스크 중 RPMI + 2%FCS + 15 mM HEPES에서 온화하게 흔들면서 세그먼트를 인큐베이션시켰다. 이어서, 결장 세그먼트를 절단하고, 간단히 세척하고, 파라포름알데히드 중에 고정시키거나, 또는 최적의 절단 온도 화합물 (OCT) 중에 포매시키고, 급속 냉동시켰다. 인접 결장 조직으로부터 조직 절편을 수집하였다. 6 um 절편을 절단하고, 90초 동안 빙냉 아세톤

중에서 고정시켰다. 상기 절편을 대기 건조시키고, 검정시까지 -20℃에서 보관하였다. 각 항체 세트에 대해 염색하기 위해 각 마우스에 대하여 2개의 연속 절편을 사용하였다.

- [0575] 면역조직화학법
- [0576] 슬라이드를 해동시키고, 절편을 실온에서 30분 동안 PBS 중 3% 무지방산-BSA로 차단하였다. 습윤식 챔버에서 4℃에서 밤새도록 (~18시간) 1차 항체 인큐베이션 토끼 폴리클로날 항-가변 도메인, 또는 토끼 대조군 폴리클로날 항체(을) 수행하였다. 각 결장 조직 블록에 대하여 3개의 슬라이드로 이루어진 한 세트를 하기와 같이 염색하였다 (한 처리단 슬라이드 1개씩):
- [0577] - 비히클 (상기 기술된 바와 같은 PBS 중 3% FAF-BSA)
- [0578] - 10 ug/ml 친화도 정제된 토끼 폴리클로날 대조군 항체
- [0579] - 10 ug/ml 항-가변 도메인 친화도 정제된 토끼 폴리클로날 항체 (AB1219).
- [0580] 인큐베이션 후, 각 절편을 빙냉-PBS로 3분 동안 3회에 걸쳐 세척하였다. 모든 절편을 암실에서 실온하에 6시간 동안 비히클 중에서 20 ug/ml의 염소 항-토끼 IgG 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 594 항체 (몰레큘라 프로브즈 (Molecular Probes) A11037) 및 (세포 핵 확인을 위해) 1 ug/ml 핵스트(Hoescht) 33342로 염색하였다. 2차 항체와 함께 인큐베이션시킨 후, 절편을 앞서 기술된 바와 같이 세척한 후, 밀리 Q 워터(Milli Q water)로 최종적으로 세척하였다. 절편을 암실에서 대기 건조시키고, 페이딩 방지 매질 (시티플루오르(Citifluor), AF1)과 함께 탑재하고, 유리 커버슬립으로 덮었다. 슬라이드를 관찰할 때까지 암실에서 4℃에서 보관하였다. 다음날 올림푸스(Olympus) AX70 현미경을 이용하여 슬라이드를 관찰하고, 이미지 프로-플러스(Image Pro-Plus) (v7.0, 미디어 사이버네틱스(Media Cybernetics))를 사용하여 각 형광색소 (알렉사 플루오르 488 및 UV)에 대하여 영상을 순차적으로 포착하였다. 대조군, 또는 대조군 토끼 항체 폴리클로날로 처리된 DSS 마우스로부터의 절편을 사용하여 노출 수준을 설정하고, 각 동물로부터의 각 슬라이드로부터 적어도 2개의 무작위 시계를 포착하였다.
- [0581] 결과
- [0582] 정상적인 마우스 결장의 영상과 달리, 형광과 관련된 65B1은 DSS 결장염 마우스로부터의 결장 절편에서 크게 증가되어 있다. 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 절편은 광범위한 염증을 보였는데, 가정컨대, 이는 상피 장벽 기능을 심각하게 손상시켰고, 이를 통해 65B1은 하부 점막 고유층에 쉽게 접근할 수 있게 되었다. 정상적인 마우스로부터의 결장 세그먼트 중에서는 65B1의 상피를 통과하는 침투가 거의 없거나, 전혀 없었던 반면, DSS 결장염 마우스 결장 세그먼트에서는 광범위한 침투가 이루어졌다. 상기 관찰 결과는 질환에 의해 유도된 상피 장벽 기능의 변경이 가변 도메인이 점막하 조직으로 접근할 수 있도록 허용하였다는 것을 제안한다.
- [0583] 8.2 경구 위관영양 후 정상적인 마우스 및 DSS 결장염 마우스의 결장 점막 내로의 65B1의 침투에 관한 검사
- [0584] 물질 및 방법
- [0585] - Q65B1 (3.35 mg/ml = 222.3 uM)
- [0586] - 1 M 중탄산나트륨 용액
- [0587] - 분유 (마블),
- [0588] - 토끼 항-가변 도메인 항체, pAB 1219
- [0589] - 대조군 토끼 pAb
- [0590] - 염소 항-토끼 알렉사 594 nm (몰레큘라 프로브즈, A11037).
- [0591] 7일 동안 식수 중 2% 텍스트란 술페이트 (MP 바이오메디컬)를 투여하여 3마리의 C57BL/6 마우스에서 DSS 결장염을 유도하고, 이후, 마우스를 추가로 3일 동안 유지시켜 질환이 최고로 발생할 수 있도록 하였다. 투약 당일, DSS 결장염 마우스, 및 3마리의 정상적인 마우스 모두에게 100 ul의 0.1M NaHCO₃, 450 mg/ml 분유를 제공한 후, 이어서, ~10분 경과 후에 2마리의 정상적인 마우스 및 (체중 측정에 의해 판단되는 바) 가장 중증인 질환을 앓는 2마리의 DSS 결장염 마우스에 65B1, 33.6 uM 최종 농도 (76 ug과 등가) 및 450 mg/ml 분유를 함유하는 150 ul의 0.1 M NaHCO₃을 제공한 반면, 다른 2마리의 마우스 (1마리는 정상 및 1마리는 DSS 결장염을 앓는 것)에는 오직 비히클만 제공하였다. 65B1 투약 후 3.25 - 3.5 h째에 마우스를 죽이고, 위장관을 제거하였다. 결장을 단리시키고, 관강내 내용물을 온화하게 짜낸 후, 2% 우태아 혈청을 함유하는 RPMI 배지 중에서 간단히 세척한

후, 동봉된 프로토콜에 기술되어 있는 바와 같이 급속 냉동시켰다.

[0592]

결과

[0593]

65B1을 받지 않은 마우스로부터의 결장은, 65B1 특이 형광 판단의 기준이 되는 배경 형광을 확립하는 물질을 제공하였다. VHH 관련 형광은 적색을 띠는 반면, 핵스트 33342를 사용하여 표지된 세포 핵은 청색을 띠었다. 오직 비히클만을 받은 마우스 1은 결장 배경 형광을 보인 반면, 마우스 2 및 3은 65B1을 투여받았다. 예상대로, 3마리의 마우스로부터의 결장 사이에는 적색 형광에서의 차이는 있어도 극히 적었으며, 정상적인 마우스 결장의 65B1 침투는 무시해도 될 정도의 양인 것으로 나타났다. H&E 염색된 절편은 뚜렷한 염증 없이 전형적인 결장 구조를 보였다. 정상적인 마우스와 달리, 광범위한 염증 부위가 존재하였고, 일부 부위에서는 상당한 상피 손상이 발생하였다. 오직 비히클만을 받은 DSS 결장염 마우스와 비교하였을 때, 가변 도메인을 받은 DSS 결장염 마우스에서 65B1 관련 형광이 뚜렷히 증가된 것으로 나타났고, 이는 상피를 통과하여 점막 고유층 내로 침투되었다는 것을 시사하는 것이다.

[0594]

본 결과는 경구적으로 제공된 가변 도메인이 유도성 결장염을 앓는 마우스의 결장 점막하 부위로 접근할 수 있다는 것을 입증한다. IBD를 앓는 환자에서 상기 구획으로의 접근한 치료학적 효능을 위해 필요한 전체 조건이 된다.

[0595]

실시예 9: ID38F 및 인플릭시맙이 IBD 생검 조직의 생체의 배양물에 존재하는 신호전달 단백질의 인산화에 미치는 효과

[0596]

일반적으로, 예를 들어, 무린 TNF-알파와의 교차 반응성은 없는 항체 기반 항-TNF-알파 치료제에 기인하여, 마우스 기반의 임상전 IBD 모델에서 본 발명의 면역글로불린쇄 가변 도메인의 효능을 사정할 수 없었다. 그러나, 항-무린 TNF-알파 항체 도메인을 분비하는 락토바실(*Lactobacilli*)을 국소적으로 장으로 전달하는 것이 IBD 마우스 모델에서 결장 염증을 억제시키는 데 충분한 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Vandenbroucke et al., 2010 *Mucosal Immunology* 3(1):49-56], 상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 본 결과는 IBD의 예방 또는 치료를 위해 경구적으로 투여되는 항-인간 TNF 도메인 항체 기반의 접근법에 관한 개념에 대하여 임상전 확인을 한다.

[0597]

인플릭시맙은 IBD 치료에 효과적이다. 인플릭시맙은 주로 TNF의 생물학적 활성을 중화시켜 시토카인의 하류의 염증 유발성 효과를 억제시키는 것으로 여겨진다. 이환된 조직에 존재하는 다수의 상이한 세포 유형의 TNF 및 2차 염증성 매개인자에 의한 활성화는, 수용체, 단백질 키나제 및 전사 인자의 인산화를 일으키는 다중의 수용체 신호전달 경로를 포함한다. 실험 결과, (i) 단백질 인산화 패턴은 IBD 대 정상적인 장 조직에서 변경되고, (ii) 인산화 패턴은 특이적인 염증 유발성 기전의 억제제에 감수성이라는 것이 밝혀졌다.

[0598]

(i) ID38F의 TNF-중화 활성이 조직 단백질 인산화 패턴 변화에 기초하여 IBD 조직의 생체의 배양물 중에서 입증될 수 있는지 여부를 조사하고, (ii) ID38F의 효과를 임상적으로 효과적인 항-TNF mAb 인플릭시맙과 비교하기 위해 조사를 수행하였다.

[0599]

기관 배양물

[0600]

활동성 IBD를 앓는 환자로부터의 전체내시경(perendoscopic) 결장 생검 또는 외과적 회장 점막 표본을 24-웰 플레이트 (VWR 인터내셔널(VWR International): 영국 러터워스) 중 100 U/ml 페니실린 및 100 ug/ml 스트렙토마이신으로 보충된 300 ul 무혈청 HL-1 배지 (캠브렉스 바이오사이언스(Cambrex BioScience): 영국 오킹엄) 중 농고 (웰 1개당 생검 하나씩), 하기 자극과 함께 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다:

[0601]

- IgG1 10 ug/ml

[0602]

- 인플릭시맙 10 ug/ml

[0603]

- ID38F 4 ug/ml

[0604]

- 대조군 비-항-TNF-알파 면역글로불린쇄 가변 도메인) 4 ug/ml.

[0605]

48 h 동안 배양한 후, 생검 및 상청액을 급속 냉동시키고, -70°C에서 보관하였다.

[0606]

포스포-어레이 분석 방법

[0607]

포스포-단백질 함량 분석을 위해, IBD 조직 샘플을 해동시키고, 둘 모두 1%인 포스파타제 억제제 각테일 2 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich): 미국 미주리주 세인트 루이스) 및 프로테아제 억제제 각테일 (시그마-알드리치

치)로 보충된 RIPA 완충제 (시그마-알드리치) 중에서 용해시켰다. 바이로-래드 프로테인(Bio-Rad Protein) 검정법 (바이오-래드 라보라토리즈(Bio-Rad Laboratories): 영국 헤멜 험프스테드)에 의해 용해물의 단백질 농도를 측정하고, 샘플을 어레이 희석제 완충제 중에서 1.0 mg/ml로 희석시켰다. 패스스캔 RTK 시그널링 안티바디 어레이 키트((PathScan RTK Signalling Antibody Array Kits) (셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology), 화학발광성 판독 #7982 포함)를 사용하여 포스포-단백질 프로파일 분석을 수행하였다. 멀티플렉스 어레이는 샌드위치 면역검정법 원리를 토대로 한 슬라이드 기반 항체 어레이이다. 티로신 또는 다른 잔기에 인산화되었을 때, 어레이 키트를 통해 28개의 수용체 티로신 키나제 및 11개의 중요한 신호전달 노드를 동시에 검출할 수 있다 (하기 표 7a 참조). 표적 특이적 포획 항체, 비오틴화된 단백질 (양성 대조군) 및 비특이적 IgG (음성 대조군)을 니트로셀룰로스 코팅된 유리 슬라이드 상에 이중으로 스폿팅하였다. 제공된 시약을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 조직 용해물 분석을 수행하였다. 간략하면, 희석된 각 용해물을 슬라이드 상에서, 이어서, 비오틴화된 검출 항체 각테일 상에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 스트렙타비딘-접합된 HRP 및 루미GLO® 리에이전트(LumiGLO® Reagent)를 사용하여 화학발광에 의해 결합된 검출 항체를 시각화하였다. 표준 화학발광성 감광 필름 상에서 슬라이드 영상을 포착하였다. HP 레이저제트 프로 100(HP LaserJet Pro 100) 컬러 스캐너 상에서 스캐닝하여 필름 영상을 취득하고, 이미지J(ImageJ) 소프트웨어를 이용하여 스폿 강도를 정량화하였다.

[0608] <표 7a>

어레이 상에 포함된 표적 키나제 및 신호전달 단백질

수용체 티로신 키나제		신호전달 노드
EGFR/ErbB1 범-Tyr	PDGFR 범-Tyr	Akt/PKB/Rac Thr308
HER2/ErbB2 범-Tyr	c-Kit/SCFR 범-Tyr	Akt/PKB/Rac Ser473
HER3/ErbB3 범-Tyr	FLT3/Flk2 범-Tyr	p44/42 MAPK (ERK1/2) Thr202/Tyr204
FGFR1 범-Tyr	M-CSFR/CSF-1R 범-Tyr	S6 리보솜 단백질 Ser235/236
FGFR3 범-Tyr	EphA1 범-Tyr	c-Abl 범-Tyr
FGFR4 범-Tyr	EphA2 범-Tyr	IRS-1 범-Tyr
InsR 범-Tyr	EphA3 범-Tyr	Zap-70 범-Tyr
IGF-1R 범-Tyr	EphB1 범-Tyr	Src 범-Tyr
TrkA/NTRK1 범-Tyr	EphB3 범-Tyr	Lck 범-Tyr
TrkB/NTRK2 범-Tyr	EphB4 범-Tyr	Stat1 Tyr701
Met/HGFR 범-Tyr	Tyro3/Dtk 범-Tyr	Stat3 Tyr705
Ron/MST1R 범-Tyr	Axl 범-Tyr	
Ret 범-Tyr	Tie2/TEK 범-Tyr	
ALK pan-Tyr	VEGFR2/KDR pan-Tyr	

[0609]

[0610] 데이터 분석

[0611] 각 블롯에 대한 "배경" 신호를 측정하고, 이를 보정되지 않은 포스포-단백질 신호로부터 감산하였다. 일부 "배경이 감산된" 포스포-단백질 값에 대해서는 음수 값을 얻은 것으로 나타났다. 이는 가능하게는, X선 필름에의 노출, 및 광 출력을 직접 측정하기보다는 음영 상을 스캐닝하는 것을 포함한 어레이를 판독하는 데 사용된 방법에 기인하는 것일 수 있다. ID38F (또는 인플릭시맵)로 처리된 용해물 중의 포스포-단백질에 대하여 측정된 신호가 배경 보정 후 음수 값을 나타내었지만, 상응하는 대조군 비-항-TNF-알파 면역글로불린 쇠 가변 도메인 (또는 IgG) 처리에 대해서는 보정된 값이 양수인 경우, 억제 수준은 >50%인 것으로 스코어링되었다.

[0612] 어레이 데이터에 관한 시각적 사정 결과, ID38F 및 인플릭시맵, 둘 모두 조직 중 일부에서 포스포-단백질 중 일부에 대하여 억제성 효과를 발휘하는 것으로 나타났다. 항-TNF 처리가 각각의 상이한 포스포-단백질에 미치는 효과를 찾기 위해, ID38F 및 인플릭시맵 어레이로부터 받은 신호를 상응하는 대조군 가변 도메인 및 IgG 어레이로부터의 것과 직접 비교하고, 신호비 (ID38F/대조군 가변 도메인 및 인플릭시맵/IgG)를 산출하였다. 상이한 환자로부터의 조직 중에서 항-TNF 항체에 의한 억제가 일관된 패턴을 보였는지 여부를 사정하기 위해, 4명의 CD 환자 중 적어도 3명으로부터의 조직 중에서 ≥ 50%만큼 억제된 상기 포스포-단백질을 강조 표시하였다 (하기 표 7b 참조).

[0613] <표 7b>

ID38F 또는 인플릭시맵에 의해 (4개의 CD 생검 중 3개에서 >50%만큼) 억제된 포스포-단백질

생물학적 기능	(4개의 IBDD 생검 중 3개에서 >50%만큼) 억제된 포스포-단백질	
	ID38F 대 대조군 가변 도메인	인플릭시맵 대 IgG
대식세포 아포토시스성 세포 제거 T 세포 신호전달/부착	AXL TYRO3 EphA3 Lck	AXL - EphA3 ZAP70
혈관신생 통증/뉴런 조절	VEGFR2 TIE2 EphB4 EphB1	VEGFR2 TIE2 -
세포 활성화/생존/신호전달 조혈 작용	AKT ERK1/2 S6 리보솜 단백질 -	AKT ERK1/2 S6 리보솜 단백질 SRC ALK PDGFR FLT3
상피 세포 조절	EphA1 -	EphA1 EphA2

[0614]

[0615]

상기 기준에 기초하여, 원시 어레이 데이터 분석 결과, ID38F 처리는 일관되게 39개의 포스포-단백질 중 12개를 억제시킨 반면, 인플릭시맵은 39개의 포스포-단백질 중 14개를 억제시켰고, 그 중 8개는 ID38F와 공유되는 것으로 나타났다. 상기 단백질의 기능은 모두, 가능하게는 IBD 염증 및/또는 병상에서 중요한 것일 수 있는 신호전달 경로 및 면역학적 프로세스와 관련이 있다. "보정되지 않은" 데이터 및 "대조군에 대해 정규화된" 데이터를 사용하여 분석 결과를 비교하였을 때, ID38F에 의해 억제된 12개의 포스포-단백질 세트는 두 경우 모두에서 동일하였고; 인플릭시맵의 경우, 12개의 포스포-단백질은 두 분석 모두에 대하여 공통된 것으로 확인되었다.

[0616]

어레이 데이터를 추가로 분석하기 위해, ID38F 및 인플릭시맵 어레이로부터 구한 "대조군에 대해 정규화된" 값을 상응하는 대조군 가변 도메인 및 IgG 어레이로부터의 "대조군에 대해 정규화된" 값과 직접 비교하고, 상기와 같이 비를 산출하였다. 4명의 IBD 환자 중 적어도 3명으로부터의 조직 중에서 $\geq 50\%$ 만큼 억제된 상기 포스포-단백질에 기초하여 항-TNF 항체에 의한 억제가 일관된 패턴을 보인 것으로 다시 밝혀졌다 (표 7c 참조).

[0617] <표 7c>

각 어레이 상에서의 평균 양성 대조군 신호에 대해 정규화된 어레이 데이터로부터의 비의 산출에 의해 확인된 포스포-단백질

생물학적 기능	(4개의 CD 생검 중 3개에서 >50%만큼) 억제된 포스포-단백질	
	ID38F 대 대조군 가변 도메인	인플릭시맙 대 IgG
대식세포 아포토시스성 세포 제거	AXL TYRO3	AXL -
T 세포 신호전달/부작	EphA3 Lck	EphA3 -
혈관신생	VEGFR2 TIE2 EphB4	VEGFR2 TIE2 -
통증/뉴런 조절	EphB1	RET
세포 활성화/생존/신호전달	AKT ERK1/2 S6 리보솜 단백질 -	AKT ERK1/2 S6 리보솜 단백질 SRC PDGFR
조혈 작용		FLT3 cKit
상피 세포 조절	EphA1 -	EphA1 EphA2

[0618]

[0619]

ID38F 처리는 39개의 포스포-단백질 중 12개를 억제시킨 반면, 인플릭시맙은 39개의 포스포-단백질 중 14개를 억제시켰고, 그 중 8개는 ID38F와 공유되는 것으로 나타났다. "보정되지 않은" 데이터 및 "대조군에 대해 정규화된" 데이터를 사용하여 분석 결과를 비교하였을 때, ID38F에 의해 억제된 12개의 포스포-단백질 세트는 두 경우 모두에서 동일하였고; 인플릭시맙의 경우, 12개의 포스포-단백질은 두 분석 모두에 대하여 공통된 것으로 확인되었다.

[0620]

결론

[0621]

활동성 질환을 앓는 인간 환자로부터 채취된 염증이 생긴 IBD 조직의 배양물 중 생체외에서 ID38F로, 또는 임상적으로 효과적인 모노클로날 항체 인플릭시맙으로 처리하는 것이 수용체 티로신 키나제 및 세포 신호전달에 관여하는 표적을 포함하는 단백질 세트의 인산화를 억제시킬 수 있다. 구조적으로 상이한 항체를 이용하여 처리하였을 때, 4개의 조직 중 3개에서 8개의 단백질로 이루어진 거의 동일한 단백질 세트의 인산화가 억제되었다는 증거는 상기 두 항체의 효과가 내인성 TNF 유도 프로세스의 중화에 기인한다는 것을 제안한다. 4명의 IBD 환자 중 적어도 3명으로부터의 채취된 조직 생검 중에서 ID38F 또는 인플릭시맙에 의한 포스포-단백질 세트의 억제가 관찰되었다. IBD 조직 중 하나에서 특정 포스포-단백질 억제가 이루어지지 않은 것은 환자간 질환 차이 및/또는 상이한 염증 부위로부터 채취된 생검의 세포질 차이를 반영하는 것일 수 있다.

[0622]

본 연구는 ID38F에 의해 억제된 조직 포스포-단백질 패턴이 임상적으로 관련된 농도의 인플릭시맙을 사용하여 달성된 것과 거의 동일하다는 증거를 제공한다.

[0623]

실시예 10: ID38F (본 발명의 폴리펩티드)와 선행 기술의 항-TNF-알파 폴리펩티드의 중화 효력 비교

[0624]

하나의 동일한 검정법에서 ID38F의 중화 효력을 선행 기술의 하기 항-TNF-알파 폴리펩티드의 중화 효력과 비교하였다:

[0625]

TNF1 (WO2006122786에 개시된 VHH, 상기 문헌에서 서열번호 52)

[0626]

TNF3 (WO2006122786에 개시된 VHH, 상기 문헌에서 서열번호 60)

[0627]

TNF30 (WO2006122786에 개시된 VHH, 상기 문헌에서 서열번호 96)

[0628]

VHH#3E (WO2004041862에 개시된 VHH, 상기 문헌에서 서열번호 4)

- [0629] 아달리무맙 (상업적으로 이용가능한 인간 모노클로날 항체).
- [0630] 물질
- [0631] L929 세포 (10^4 개의 세포/웰)
- [0632] 96 웰 플레이트 (코스타)
- [0633] Pen/Strep + 2 mM L-글루타민으로 보충된 DMEM (인비트로젠)
- [0634] 인간 TNF-알파 (인비트로젠) 농도: 500 pg/ml
- [0635] 약티노마이신 D 농도 (시그마): 0.75 ug/mL
- [0636] 에스. 세레비시아에로부터 정제된 ID38F
- [0637] 이. 콜라이로부터 정제된, Flag-His 태그부착된 ID38F
- [0638] 아달리무맙
- [0639] 이. 콜라이로부터 정제된, Flag-His 태그가 있는 TNF1, TNF3, TNF30, VHH#4E
- [0640] 희석 범위: 5 pM - 30 nM (1:3 희석액)
- [0641] 인큐베이션 시간: 23 h
- [0642] 알라마르 블루(Alamar Blue) 세포 생존능 시약 (인비트로젠, DAL1100): 10 uL/웰
- [0643] 3% SDS
- [0644] 마이크로플레이트 판독기 (플루오스타 옵티마(Fluostar Optima)) (OD590 nm).
- [0645] 방법
- [0646] 0일째, 100 uL 중 10^4 개의 L929 세포/웰을 96 웰 마이크로플레이트 (코스타) 중 완전 DMEM 배지에 플레이팅하고, 37°C 및 5% CO₂에서 밤새도록 보관하였다. 1일째, 각 VHH/Ab에 대한 (DMEM + Act.D 중의) 1:3의 연속 희석액을, 최고 농도가 60 nM인 것을 시작으로 하여, 검정 농도의 2배되는 농도로 (삼중으로 수행하는 데 충분한 부피로) 셋업하였다. 이어서, 165 uL의 각 희석액을, DMEM + Act.D 중에 제조된 165 uL의 hTNF-알파 2x (1 ng/mL)를 이용하여 1:1로 희석하였다. 본 검정법에서 TNF만 포함하는 대조군을 포함하기 위해 0.9 mL의 TNF 2x를 0.9 mL의 CM + Act. D로 희석하였다. 검정 마이크로플레이트의 각 웰로부터 배지를 제거하고, 세포를 100 uL의 각 TNF + VHH 희석액, CM + act. D 또는 TNF만 포함하는 대조군과 함께 인큐베이션시켰다. 37°C 및 5% CO₂에서 23 h 동안 인큐베이션시킨 후, 10 uL의 알라마르 블루를 각 웰에 첨가하고, 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 2 h 동안 인큐베이션시킨 후, 이어서, 50 uL의 3% SDS를 각 웰에 첨가하였다. 이어서, 590 nm에서 플레이트를 판독하였다.
- [0647] 결과
- [0648] (4 파라미터 비-선형 회귀 곡선을 사용하여, 그래프패드 프리즘을 이용하여 작성된) 생성된 중화 곡선은 도 6에 제시되어 있다. EC50 값은 하기 표 8에 제시되어 있다.

표 8

항-TNF-알파 폴리펩티드	EC50 (nM)
TNF1	0.751
TNF3	0.631
TNF30	0.420
VHH#3E	1.110
ID38F-Flag-His (E. 콜라이 생산)	0.102
ID38F (S. 세레비시아에 생산)	0.127
아달리무맙	0.091

[0649]

[0650] VHH#3E가 L929 세포에서 인간 가용성 TNF-알파-유도성 세포독성을 중화시키는 데 있어서 최소로 강력한 항-TNF-알파 폴리펩티드였다는 것을 도 6 및 표 8로부터 알 수 있다. ID38F (이. 콜라이 및 에스. 세레비시아에 생산 둘 모두)는 선행 기술의 항-TNF-알파 VHH의 EC50보다 대략 4배 - 1 로그 더 낮은 EC50을 가졌다.

[0651] **실시예 11: 본 발명의 항-TNF-알파 ICVD의 제약 조성물로의 제제화**

[0652] 본원에 개시된 본 발명의 항-TNF-알파 ICVD 중 하나를 포함하는 고체 제약 조성물을 건식 과립화 및 압착에 의해 소형 정제 형태로 제조하였다. 상기 항-TNF-알파 ICVD는 115개의 아미노산으로 이루어진 12.6 kDa의 폴리펩티드로서, pI는 6.8이고, 수용해도는 30 mg/mL 초과이다. ICVD는 인간 및 시노몰구스 원숭이 TNF-알파에 고 친화도로 결합하고, 그에 대하여 강력한 중화 활성을 가진다.

[0653] 소형 정제는, 각 프리젠테이션이 상이한 크기의 캡슐 중에 상이한 정량의 소형 정제를 함유한 것인, 상이한 프리젠테이션으로 제공될 수 있다. 하기 설명되는 실시예에서 사용되는 주요 프리젠테이션은 15개의 장용 코팅된 소형 정제를 함유하는 사이즈 00HPMC 캡슐제였다 (총 185 mg의 제약상 활성을 띠는 결합 폴리펩티드). (코팅제의 두께를 뺀) 소형 정제 코어의 직경은 3 mm였다. 각 소형 정제에, 및 따라서, 캡슐제 중에 함유되어 있는 15개의 소형 정제 중에 함유되어 있는 성분은 하기 표 9에 열거되어 있다.

표 9

소형 정제 성분의 명칭	기능	조성물 중 %w/w	정량 (mg/캡슐제) 185 mg 용량 (15개의 소형 정제)	정량 (mg) 12 mg 용량 (1개의 소형 정제)
소형 정제 코어				
전체 폴리펩티드	활성 제약 성분 (API)	45.7	225	15
만넛톨	압착 보조제	12.0	59.25	3.95
미정질 셀룰로스	압착 보조제	14.6	72	4.8
크로스카르멜로스 소듐	초붕해제	3.1	15	1
스테아르산 마그네슘 서브코팅제	윤활제	0.8	3.75	0.25
히드록시프로필메틸 셀룰로스	중합체 코트	3.8	18.75	1.25
pH 감수성 장용 코팅제				
유드라짓® L100	장용 중합체 코트	11.7	57.76	3.85
트리에틸 시트레이트	가소화제	2.3	11.51	0.77
탈크	접착 방지제	5.9	28.93	1.93
소듐 라우릴 술페이트	계면활성제	0.04	0.20	0.01

[0654]

[0655] 조성물 중 전체 폴리펩티드의 순도는 대략 70-90%이고, 이로써, 225 mg의 폴리펩티드는 185 mg의 제약상 활성을 띠는 결합 폴리펩티드를 함유한다.

[0656] 소형 정제는 하기 방법에 의해 제조하였다.

[0657] 동결건조된 폴리펩티드를 만넛톨 및 소량의 스테아르산 마그네슘과 블렌딩하고, 건식으로 슬러깅하여 그의 밀도를 증가시켰다. 이어서, 상기 물질을 스크린을 통해 통과시키고, 다른 소형 정제 부형제 (미정질 셀룰로스, 크로스카르멜로스 소듐 및 나머지는 스테아르산 마그네슘)와 함께 블렌딩하고, 압착시켜 소형 정제를 수득하였다. 이어서, 소형 정제를 에탄올:물 80:20 중 5% 히드록시프로필 메틸 셀룰로스 용액으로 코팅하고, 건조시키고, 용매를 제거하여 서브코팅된 더욱 매끄러운 표면을 생성하였다. 이어서, 소형 정제를 이소프로필 알콜 및 물 중 유기 용액으로서, 트리에틸 시트레이트, 탈크 및 소듐 라우릴 술페이트와 함께 유드라짓(Eudragit)® L100 중합체로 코팅하고, 건조시켜 pH 감수성 장용 코트를 생성하였다. 이어서, 직경이 대략 3 mm인, 생성된 소형 정제를 상기 제공된 용량의 캡슐제 내로 충전시켰다. pH 감수성 장용 코팅제의 두께는 100-170 um였다. 본 체제에 사용된 본 발명의 항-TNF-알파 ICVD는 또한 하기에서 "제약상 활성을 띠는 결합 폴리펩티드," "ICVD" 및 "폴리펩티드"로도 지칭된다.

[0658] 실시예 12: 시노몰구스 원숭이에게로의 투여: 상이한 장관 구획 중 및 대변 중의 폴리펩티드 농도

[0659] 12.1 상이한 장관 구획 중의 폴리펩티드 농도

[0660] 암컷 시노몰구스 원숭이에게 경구적으로 투여되었을 때, 장관 영역을 통과하는, 실시예 11의 것과 유사한 조성

물의 방출 프로파일을 사정하는 연구를 수행하였다. 상이한 장관 구획 중의 폴리펩티드 농도를 분석함으로써 방출 프로파일을 사정하였다.

- [0661] 11개의 소형 정제를 함유하는 단일 캡슐제를 3마리의 시노몰구스 원숭이 각각 (원숭이는 M234, M236 및 M238로 지칭된다)에 경구적으로 투여하였다. 각 소형 정제는 추가의 1 mg의 메틸렌 블루 (염료) 및 141 mg 용량의 ICVD를 함유하였다는 점에서 소형 정제 조성물은 실시예 11의 것과는 상이하였다. 소형 정제 중 8개는 또한 0.7 mg의 이소프레날린을 함유하였다. 메틸렌 블루 염료는 위장 (GI) 관을 통과하는 용해된 소형 정제의 분포를 시각적으로 분석하기 위한 것이었고 (본원에서 논의되지 않음), 이소프레날린은 심박동수를 모니터링하는 연구에서 사용하기 위한 것이었다 (본원에서 논의되지 않음).
- [0662] 경구 투약 후 4시간 경과하였을 때, 동물을 도태시켰다. 위장관을 조심히 제거하고, 상이한 GI 구획을 라이게이션시킨 후, 이어서, 절단하고, 관강내 내용물 및 세척액을 수집하였다. 용해되지 않은 소형 정제 및 부분적으로 용해된 소형 정제의 개수를 기록하고, 상기 소형 정제를 제거하였다. 이어서, 샘플을 균질화시키고, 분석 시까지 냉동시켰다. 먼저, 10°C에서 5 min 동안 5,000 rpm으로 슬러리를 원심분리한 후, 각 샘플로부터 1 ml의 상청액을 제거하고, 소형 원심분리기에서 동일 온도하에 5 min 동안 13,300 rpm으로 원심분리하였다. 이어서, 상청액을 다시 동일 조건하에서, 단, 20 min 동안 원심분리한 후, 표준 휴미라 경쟁 ELISA를 사용하여 분석하였다. 1% BSA, 0.6 M NaCl, 1% 인간 AB 혈청, 0.05% 트윈 20 및 2x 프로테아제 억제제를 함유하는 PBS 중에서 샘플 및 휴미라 및 ICVD 표준의 모든 희석액을 제조하였다. 그래프패드 프리즘으로 4 파라미터, 비-선형 곡선 피팅 방정식을 이용하여 표준 곡선으로부터 ICVD 농도를 보간하였다. 희석되지 않은 GI 관 샘플 중의 ICVD 농도는 상청액 희석물을 곱한, 최적 보간 데이터의 평균을 구하여 도출해 내었다.
- [0663] M236 또는 M238의 위, 십이지장, 공장 또는 회장에서는 무손상 소형 정제가 관찰되지 않았다. M234의 경우, 위에서 4개의 무손상 소형 정제가 발견되었고, 십이지장에서 1개, 및 공장에서 1개가 발견되었다. 어느 원숭이의 어느 GI 관 영역에서도 부분적으로 용해된 소형 정제는 발견되지 않았다.
- [0664] 슬러리 상청액 제조는 필연적으로 ICVD를 희석시키는 다량의 완충제 첨가를 필요로 하였다. 도 7에는 ICVD의 관강내 농도 예상치가 제시되어 있다. 이는 관강내 GI 관 내용물의 비중이 1이라는 가정하에, 상청액 ICVD 농도에 완충제 첨가시 희석 배수를 곱함으로써 산출된 값이었다. 제시된 바와 같이, 매우 높은 ICVD 농도 (0.1 - > 1 mM)는 일부 원숭이의 GI 관 구획의 관강내에 존재할 가능성이 있다.
- [0665] ICVD는 오직 한 시노몰구스 원숭이 위 (M234)의 내용물에서만 검출되었다. ICVD는 또한 모든 원숭이의 회장, 맹장 및 상부 결장의 내용물에서도 발견되었다. 추가로, M234 및 M238은 공장의 내용물에서 고농도로 검출되었다 (도 7 참조).
- [0666] 최종적으로, 4 h째의 실제 용량은 오직 용해된 소형 정제에 의해서만 전달되었다는 가정하에 ICVD 회수율(%)을 산출하였다. 도 8에 제시된 바와 같이, ICVD 용량의 51.5% 내지 74.9%를 차지하였다.
- [0667] 본 연구를 통해, 본 발명의 항-TNF-알파 ICVD는 시노몰구스 원숭이의 하부 GI 관까지 고농도로 전달될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 일부 소형 정제는 투약 후 4 h째까지도 무손상인 상태 그대로 유지되었다는 관찰 결과는 상기 용량이 일정 기간 동안에 걸쳐 전달될 것이라는 것을 제안하고, 이는 장기간 노출될 수 있는 잠재능을 제공한다. 이러한 관찰 결과가 항-TNF-알파 결합 폴리펩티드를 사용할 때의 IBD 환자 치료에 반영된다면, 하부 GI 관에 노출되는 항-TNF-알파 폴리펩티드의 농도는 효과적인 TNF-알파 중화에 적절한 농도보다 더 클 것이라고 예상하는 것도 일리가 있다고 본다.
- [0668] 12.2 대변 중의 폴리펩티드 농도
- [0669] 11개의 소형 정제를 함유하는 단일 캡슐제를 3마리의 시노몰구스 원숭이 각각에 경구적으로 투여하였다. 각 소형 정제는 추가의 1 mg의 메틸렌 블루 (염료)를 함유하였고, 소형 정제 중 8개는 또한 0.7 mg의 이소프레날린을 함유하였다는 점에서 소형 정제 조성물은 실시예 11의 것과는 상이하였다. 메틸렌 블루 염료는 대변 중 소형 정제의 분포를 시각적으로 분석하기 위한 것이었고, 이소프레날린은 심박동수를 모니터링하는 연구에서 사용하기 위한 것이었다 (본원에서 논의되지 않음).
- [0670] 8, 12, 20, 24 및 36 h째에 원숭이로부터의 폴링된 대변을 수집하였다 (16 h째에는 샘플을 수집하지 않았다). 대변 샘플 중 어느 것에서도 소형 정제는 발견되지 않았다. 이를 추출 완충제 (PBS 중 0.1% BSA, 0.6M NaCl, 0.05% 트윈 20, 1x 프로테아제 억제제, 5 mM EDTA)와 함께 1 g 대변/4 ml 완충제로 혼합한 후, 균질화시키고, 슬러리를 분석 전 보관을 위해 -80°C에서 냉동시켰다. 시각적으로 검사한 결과, 12 h, 20 h, 24 h 및 36 h째의 슬러리에서 청색 착색이 나타났다. 이전 시험관내 실험 (나타내지 않음)에서는 소형 정제 용해시의 메틸렌 블루

루 농도 증가가 ICVD 농도와 밀접한 상관관계가 있는 것으로 입증되었다.

- [0671] 슬러리를 해동시키고, 5 min 동안 4,000 rpm (3,200 g) 원심분리하여 미립자 물질 벌크를 제거하였다. 약 1 ml의 각 상청액을 에펜도르프 튜브로 옮겨 놓고, 소형 원심분리기에서 10℃하에 5 min 동안 13.5 K로 원심분리한 후, 상청액을 새 튜브에 넣고, 10℃에서 20 min 동안 원심분리하였다. 이어서, 휴미라 경쟁 ELISA를 이용하여 ICVD를 측정하기 위해 상청액을 즉시 사용하였다.
- [0672] 상이한 대변 상청액에 대한 ELISA OD450 판독값은 도 9에 제시되어 있다. 데이터는 ICVD가 모든 시점에 대변 상청액 샘플 중에 존재한다는 것을 명확하게 나타내며, 여기서, 가능하게는 (비록 최저 희석률에서는 약간의 활성이 시각적으로 관찰될 수 있기는 하지만) 36 h째의 상청액에는 예외적으로 존재하지 않을 수 있다.
- [0673] 1 g의 대변은 1 mL 액체 부피와 같고, 폴리펩티드는 대변에 균일하게 분포되어 있다는 가정을 사용하여, 그래프패드 프리즘을 이용하여 ICVD에 대한 표준 곡선에 대해 상기 데이터를 보간하고, 첨가된 완충제의 희석률을 곱함으로써 각 대변 샘플 중의 ICVD 농도를 구하였다. 이는 도 10에 제시되어 있다.
- [0674] (1 g 대변 = 1 ml, + 추출을 위한 완충제의 부피에 기초하여 산출된) 슬러리 부피를 사용하여 각 샘플 중의 ICVD의 양 (μg)을 측정하였다 (도 11).
- [0675] 요약하면, 지효성인, 제약상 활성을 띠는 결합 폴리펩티드의 실질적인 농도는 8시간 초과 기간 동안 시노물구스 원숭이 장관을 통해 달성되었다.
- [0676] **실시예 13: 인간에게로의 투여: 회장-맹장 연결부에서 및 대변 중의 폴리펩티드 농도**
- [0677] 13.1 회장-맹장 연결부에서의 폴리펩티드 농도
- [0678] 본 연구의 목표는, 실시예 11의 조성물 내로 도입된 본 발명의 항-TNF-알파 ICVD가, 크론병의 경우, 주요 부위인 인간의 회장-맹장 연결부 및 다수 환자의 장에서 크론병 병변의 인접 부위에 고농도로 전달된다는 것을 입증하는 것이었다.
- [0679] 말단 회장조루술 백을 장착한 4명의 인간 지원자는 각각 사이즈 00 캡슐제 (총 9개의 캡슐제) 내부의 소형 정제로 제제화된 1,665 mg ICVD를 단일 용량으로 경구적으로 받았다. 다른 건강한 개체에서는, 말단 회장의 전체 내용물을 착탈식 외부 백으로 배출된다. 투약 후 매시간마다 전체 회장 배출물을 함유하는 장착된 백을 제거하고, 냉동시키고, 새 백을 장착하였다. 투약 후 12시간 기간 동안 매 시간마다 상기 방식으로 회장조루술 샘플을 수집하였다. 이 기간 후에는 투약 후 최대 24시간째까지 매 4시간마다 회장조루술 샘플을 수집하였다. 대조군으로서 투약 전 샘플 (-1일째) 또한 채취하였다. 오직 완전히 용해된 ICVD만을 분석하기 위하여 분석 이전에 백에서 관찰되는 임의의 부분적으로 용해된 소형 정제는 제거하였다. 회장 체액으로부터 ICVD를 추출하고, 1 g 회장 체액이 1 mL 액체 부피와 같다는 가정하에, 기능성 ELISA에 의해 활성 ICVD의 농도를 측정하였다.
- [0680] 데이터를 통해 200 nM 내지 최대 1 mM까지의 범위인 고농도의 활성 ICVD가 회장조루술 백에 존재하는 것으로 나타났다. 추가로, 각 대상체에 대한 수시간에 걸친 백 교체에서도 고농도가 관찰되었다 (하기 표 10 참조).

표 10

대상체	투약 후 경과 시간	회장 체액 중 ICVD 농도 (nM)
31001	2	406350
31001	3	305560
31001	4	791
31002	2	32780
31002	3	1130000
31002	4	792060
31002	5	81750
31002	6	12780
31002	7	1300
31002	8	422
31002	9	1410
31002	10	7520
31002	11	10080
31002	12	9210
31002	16	6980
31003	3	1060000
31003	4	496030
31003	5	7080
31003	8	46110
31003	9	75480
31003	10	16030
31003	11	72940
31003	12	15870
31003	16	881
31004	2	126190
31004	3	235
31004	4	11110
31004	5	3770
31004	6	6730

[0681]

[0682]

어느 대상체로부터의 투약 이전 (-1일째)의 샘플 중 어느 것에서도 ICVD는 검출되지 않았다.

[0683]

요약하면, 지효성의, 및 고농도의 제약상 활성을 띠는 결합 폴리펩티드가 상기 인간 지원자의 회장-맹장 연결부에서 달성되었다.

[0684]

13.2 대변 중의 폴리펩티드 농도

[0685]

연령이 18-45세인 건강한 남성 대상체에게 실시예 11에서 상세하게 설명된 조성물을 사용하여 62, 555, 1,665 또는 4,995 mg의 ICVD를 단일 용량으로 경구적으로 투약하였다. 1일째 8시 30분부터 12시 사이에 대상체 1명당 각각의 단일 용량을 투여하였다. 대변 샘플을 투약 이전 (-1일째, 또는 1일째 투약하기 전), 및 투약 후 이용 가능한 모든 시점에서부터 최대 4일째 오전 (연구 종료)까지 수집하였다. 대변으로부터 ICVD를 추출하고, 1 g 대변이 1 mL 액체 부피와 같고, 폴리펩티드는 대변에 균일하게 분포되어 있다는 가정하에, 기능성 ELISA에 의해 활성 ICVD의 농도를 측정하였다.

[0686]

대상체의 대변 중에서 180 nM 내지 724 μM 범위의 고농도가 수득되었다 (하기 표 11 참조).

표 11

대상체 ID	ICVD 용량 (mg)	대변 샘플 수집일	투약 이전 또는 투약 이후	대변 중 [ICVD] (nM)
11001	62	-1	투약 이전	0
11001		1	투약 이후	1013
13001	555	-1	투약 이전	0
13001		2	투약 이후	1052
13003	555	-1	투약 이전	0
13003		1	투약 이후	1938
13003		2	투약 이후	1511
14002	1665	-1	투약 이전	0
14002		1	투약 이후	5491
14002		2	투약 이후	558
14004	1665	-1	투약 이전	0
14004		2	투약 이후	27532
14006	1665	-1	투약 이전	0
14006		2	투약 이후	62579
15001	4995	-1	투약 이전	0
15001		1	투약 이후	10047
15001		2	투약 이후	135285

[0687]

15001		3	투약 이후	330
15004	4995	-1	투약 이전	0
15004		3	투약 이후	273
15005	4995	1	투약 이전	0
15005		1	투약 이후	724684
15005		2	투약 이후	258703
15005		3	투약 이후	3536
15006	4995	-1	투약 이전	0
15006		1	투약 이후	57120
15006		2	투약 이후	358
15006		2	투약 이후	186

[0688]

[0689]

크론병을 치료하기 위해 임상적으로 사용되는 항-TNF 작용제, 예컨대, 아달리무맙 (휴미라) 및 인플릭시맙 (레미케이드)은 정맥내 주입 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 문헌 [Ungar et al. (2016) *Clin Gastroenterol Hepatol.* 14(4):550-557]에는 IBD 환자 중 80%-90%의 점막 치유를 달성하는 데에는 아달리무맙의 경우, 56-83 nM (8-12 $\mu\text{g/mL}$), 및 인플릭시맙의 경우, 42-70 nM (6-10 $\mu\text{g/mL}$)인 최저점의 혈청 수준이 필요하고, 이것이 "치료창"인 것으로 간주될 수 있다고 서술되어 있다. 상기 최저점 혈청 수준은 또한 상기 포인트 12.1하에 확립된 시노물구스 원숭이 위장관 절편 중의 장관내 항-TNF-알파 ICVD 농도 산출치와 관련하여 도 7에 제시되어 있다.

[0690]

본 섹션에서의 임상 연구 동안 인간 지원자의 회장-맹장 연결부에 전달되고 (상기 섹션 13.1), 그의 대변에서 회수되는 항-TNF-알파 ICVD의 농도는 상기 수준보다 유의적으로 더 높았고, 따라서, 이는 크론병 치료법으로서 효과가 있을 것으로 예측된다. 이는 항-TNF-알파 ICVD의 장관 장관내 농도가 장관 점막 및 점막하 부위로의 접근/침투와 관련하여 시판되는 항-TNF 작용제의 혈청 농도와 유사하다고 추정한다. 그러나, 추가의 실험 연구에서는 (나타내지 않음), DSS 결장염을 앓는 마우스에서 경구적으로 투약된 본 발명의 본 항-TNF-알파 ICVD가, 마우스에서는 표적 (TNF) 개입이 부족함에도 불구하고, 그가 수시간 동안 체류하게 되는 점막 고유층으로 침투할

수 있다는 것이 입증되었다.

[0691] 상기 13.1하에 제시된 데이터와 함께 종합해 보면, 본 결과는 ICVD가 회장-맹장 연결부부터 항문까지 치료학적 수준으로 성공적으로 전달된다는 것을 입증한다.

[0692] **실시예 14: 인간에게로의 투여: 면역원성 연구**

[0693] 치료학적 항체를 비롯한, 단백질 약물은 환자에서 항체 반응을 유도할 수 있다. 단백질 약물의 에피토프를 인식하는, 환자에서 생산된 (다중 Ig 부류의) 항체는 항-약물 항체 (ADA)로 명명된다. ADA 존재는 약물 효능/효력을 감소시킬 수 있거나, 환자에서 유해한 효과를 일으킬 수 있다 (문헌 [van Schie et al., *Ann Rheum Dis* 2015 74:311-314]).

[0694] 인간에서의 실시예 11의 조성물의 지속적인 경구 투약이 ADA 반응을 유도하는지 여부를 사정하는 연구에 착수하였다. 실시예 11에 따라 소형 정제로 제제화된, 1,665 mg (1일 총 4,995 mg) ICVD 또는 위약을 함유하는 캡슐제를 이용하여 14일 동안 매일 3회에 걸쳐 18-45세의 건강한 남성 대상체에게 경구적으로 투약하였다. 투약 이전, 투약 후 7일 및 14일째, 및 최종적으로 28일째 (치료 중단 후 14일째) 대상체로부터 혈청 샘플을 채취하였다. 샌드위치 ELISA에 의해 ICVD 항-약물 항체 (ADA)의 존재에 대하여 상기 샘플을 분석하였다. 본 분석 결과, 비록 낮은 역가이기는 하였지만, 2명은 위약을 받은 것인 4명의 지원자로부터 혈청은 ADA 양성을 나타내었다. 상기의 모든 개체에서 ADA는 ICVD 투약 이전에 어느 정도의 수준으로는 존재하였다 (기존 ADA).

[0695] TNF-TNFR2 ELISA에서의 ICVD 효력 분석 결과, 모든 ADA 양성 인간 혈청 샘플이 5%로 존재하는 것은 TNF-알파에 대한 ICVD 활성화에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러므로, 어느 시점에도 어느 지원자의 혈청에서도 ICVD 중화 ADA의 증거는 관찰되지 않았다 (하기 표 12 참조).

표 12

대상체 ID	활성제 또는 위약	샘플	ADA 샌드위치 ELISA 스크리닝	ADA 역가/혈청 희석률	ICVD 중화
21001	활성제	투약 이전	음성		
21001	활성제	7일째	음성		
21001	활성제	14일째	음성		
21001	활성제	28일째	음성		
21002	활성제	투약 이전	음성		
21002	활성제	7일째	음성		
21002	활성제	14일째	음성		
21002	활성제	28일째	음성		
21003	활성제	투약 이전	음성		
21003	활성제	7일째	음성		
21003	활성제	14일째	음성		
21003	활성제	28일째	음성		
21004	위약	투약 이전	양성	64	없음
21004	위약	7일째	양성	64	없음
21004	위약	14일째	양성	64	없음
21004	위약	28일째	양성	64	없음
21005	활성제	투약 이전	양성	64	없음
21005	활성제	7일째	양성	32	없음
21005	활성제	14일째	양성	32	없음
21005	활성제	28일째	양성	32	없음
21006	활성제	투약 이전	음성		
21006	활성제	7일째	음성		

[0696]

21006	활성제	14일째	음성		
21006	활성제	28일째	음성		
21007	활성제	투약 이전	음성		
21007	활성제	7일째	음성		
21007	활성제	14일째	음성		
21007	활성제	28일째	음성		
21008	활성제	투약 이전	양성	4	없음
21008	활성제	7일째	양성	4	없음
21008	활성제	14일째	양성	8	없음
21008	활성제	28일째	양성	128	없음
21009	위약	투약 이전	양성	8	없음
21009	위약	7일째	양성	8	없음
21009	위약	14일째	양성	16	없음
21009	위약	28일째	양성	8	없음
21010	활성제	투약 이전	음성		
21010	활성제	7일째	음성		
21010	활성제	14일째	음성		
21010	활성제	28일째	음성		

[0697]

[0698]

조항

[0699]

본 발명 및 그의 바람직한 측면을 정의하는 조항 세트는 하기와 같다:

[0700]

1. TNF-알파에 결합하는 면역글로불린쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드로서, 여기서, 면역글로불린쇄 가변 도메인은 3개의 상보성 결정 영역 (CDR1-CDR3) 및 4개의 프레임워크 영역 (FR1-FR4)을 포함하고, 여기서, CDR1은 서열번호 1과 60% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하고, CDR2는 서열번호 2와 50% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하고,

[0701]

(a) CDR3은 서열번호 3과 80% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는

[0702]

(b) CDR3은 서열번호 3과 50% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하고, 여기서, 서열번호 3의 잔기 번호 3번에 상응하는 CDR3의 잔기가 R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y 또는 V인 것인 폴리펩티드.

[0703]

2. 제1항에 있어서, 서열번호 3의 잔기 번호 3번에 상응하는 CDR3의 잔기가 R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, V, L, W, P, M, C, F 또는 I인 것인 폴리펩티드.

[0704]

3. 제2항에 있어서, 서열번호 3의 잔기 번호 3번에 상응하는 CDR3의 잔기가 H인 것인 폴리펩티드.

[0705]

4. 제3항에 있어서, CDR3이 서열번호 3을 포함하는 것인 폴리펩티드.

[0706]

5. 제1항에 있어서, CDR3의 서열이 서열번호 3, 서열번호 70, 서열번호 71 또는 서열번호 72인 것인 폴리펩티드.

[0707]

6. 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CDR1이 서열번호 1과 80% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드.

[0708]

7. 제6항에 있어서, CDR1이 서열번호 1을 포함하는 것인 폴리펩티드.

[0709]

8. 제6항에 있어서, CDR1의 서열이 서열번호 1, 서열번호 59 또는 서열번호 60인 것인 폴리펩티드.

[0710]

9. 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, CDR2가 서열번호 2와 55% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 60% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 70% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 75% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 80% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 85% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 90% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하는 것인 폴리펩티드.

[0711]

10. 제9항에 있어서, CDR2가 서열번호 2를 포함하는 것인 폴리펩티드.

[0712]

11. 제9항에 있어서, CDR2의 서열이 열 번호: 61, 서열번호 62, 서열번호 2, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호

호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69인 것인 폴리펩티드.

- [0713] 12. 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 8과 50% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 55% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 60% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 65% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 70% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 75% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 80% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 85% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 90% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 95% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 96% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 97% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 98% 이상의 서열 동일성을 공유하는, 예컨대, 99% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하는 폴리펩티드.
- [0714] 13. 제12항에 있어서, 서열번호 8을 포함하는 폴리펩티드.
- [0715] 14. 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, VHH, VH, VL, V-NAR, Fab 단편 및 F(ab')₂ 단편으로 구성된 목록으로부터 선택되는 폴리펩티드.
- [0716] 15. 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로서, 여기서, 특히, 폴리뉴클레오티드는 서열번호 83 내지 88 중 어느 하나와 70% 이상의, 예컨대, 80% 이상의, 예컨대, 90% 이상의, 예컨대, 95% 이상의, 예컨대, 99% 이상의 서열 동일성을 공유하는 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성되거나, 또는 더욱 특히, 여기서, 폴리뉴클레오티드가 서열번호 83 내지 88 중 어느 하나를 포함하거나, 또는 그로 구성된 것인 폴리뉴클레오티드.
- [0717] **기타**
- [0718] 특허 및 특허 출원을 비롯한, 본 출원에서 언급된 모든 참고 문헌은 충분히 가능한 정도까지 본원에서 참조로 포함된다.
- [0719] 명세서 및 하기 특허청구범위 전역에 걸쳐, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, '포함하다(comprise)'라는 단어 및 예컨대, '포함하다(comprises)' 및 '포함하는'이라는 파생어는 임의의 다른 정수, 단계, 정수 군 또는 단계 군을 배제시키는 것이 아니라, 언급된 정수, 단계, 정수 군 또는 단계 군을 포함한다는 것으로 이해될 것이다.
- [0720] 상기 설명 및 특허청구범위가 일부를 형성하는 출원이 임의 후속 출원에 대한 우선권에 대한 기초로서 사용될 수 있다. 상기 후속 출원의 특허청구범위는 본원에 기술된 임의의 특징 또는 특징의 조합에 대한 것이다. 이는 생성물 청구항, 조성물 청구항, 방법 청구항 또는 용도 청구항의 형태를 취할 수 있고, 예로서, 및 제한 없이, 하기 특허청구범위를 포함할 수 있다.

서열

번호	명칭 (서열 번호)	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
5	평칭 (서열 번호)							
10	패밀리 1 서열							
	065F2 (23)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDEFS	SHWMY	WYRQAFCKGLEWYS	EINTNGLITSYDVSVKG	RFVSRDRAAANTLYLEMTSLEPEDTALYYCAR	NOKGLN	KGGGTQVTVSS
15	065F3 (24)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDEFS	SHWMY	WYRQAFCKGLEWYS	EINTNGLITKYIDSVRG	RFVSRDRAAANTLYLEMTNLEPEDTALYYCAR	NOKGLN	KGGGTQVTVSS
	062F2 (25)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDPN	SHWMY	WYRQAFCKGLEWYS	EINTNGLITNYDVSVKG	RFVSRDRAAANTLYLEMTSLKPEDTALYYCAR	NOKGLN	KGGGTQVTVSS
20	065G1 (26)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGPDFY	SHWMY	WYRQAFCKGLEWYS	EINTNGLITKYIDSVRG	RFVSRDRAAANTLYLEMTNLEPEDTALYYCAR	NOKGLN	KGGGTQVTVSS
	065H6 (27)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGPDFY	SHWMY	WYRQAFCKGLEWYS	EINTNGLITKYIDSVRG	RFVSRDRAAANTLYLEMTNLEPEDTALYYCAR	NOKGLN	KGGGTQVTVSS
25	065F1 (28)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPDFG	VHWMY	WYRQAFCKGLEWYS	EINTNGLITKYIDSVGG	RFVSRDRAANRLYLEMTNLEPEDTALYYCAR	NOMGLN	KGGGTQVTVSS
30	065D1 (29)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGPDFD	NHWMY	WYRQAFCKGLEWYS	EINTNGLITKYADSVKQ	RFVSRDRAAANTLYLQITRLKPEDTALYYCAR	NOKGLN	KGGGTQVTVSS
	065C7 (30)	EVQLVESGGGLVQPGRSRLSCTASGDEFS	SHWMY	WYRQAFCKGLEWYS	EINTNGLITKYADSVKQ	RFVSRDRAAANTLYLEITRLEPEDTALYYCAR	NOKGLN	KGGGTQVTVSS
35	065D3 (31)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGDEFS	SHWMY	WYRQAFCKGLEWYS	EINTNGLITKYADSVKQ	RFVSRDRAAANLNLEMTSLEPEDTALYYCAR	NERGLN	KGGGTQVTVSS
40	065B1 (32)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDEFS	SHWMY	WYRQAFCKELEWLS	EINTNGLITRYGDSVKQ	RFVSRDRAANKVYLELRLLEPEDTALYYCAR	NOKGLN	KGGGTQVTVSS
45	패밀리 2 서열							
	065F6 (33)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGPDFG	IHWMY	WYRQAFCKELEWVA	EINTNGLITLYSDSVRG	RFVSRDRAANALFLQMDLKFEDTAVYYCAK	SRNGMA	KGGGTQVTVSS

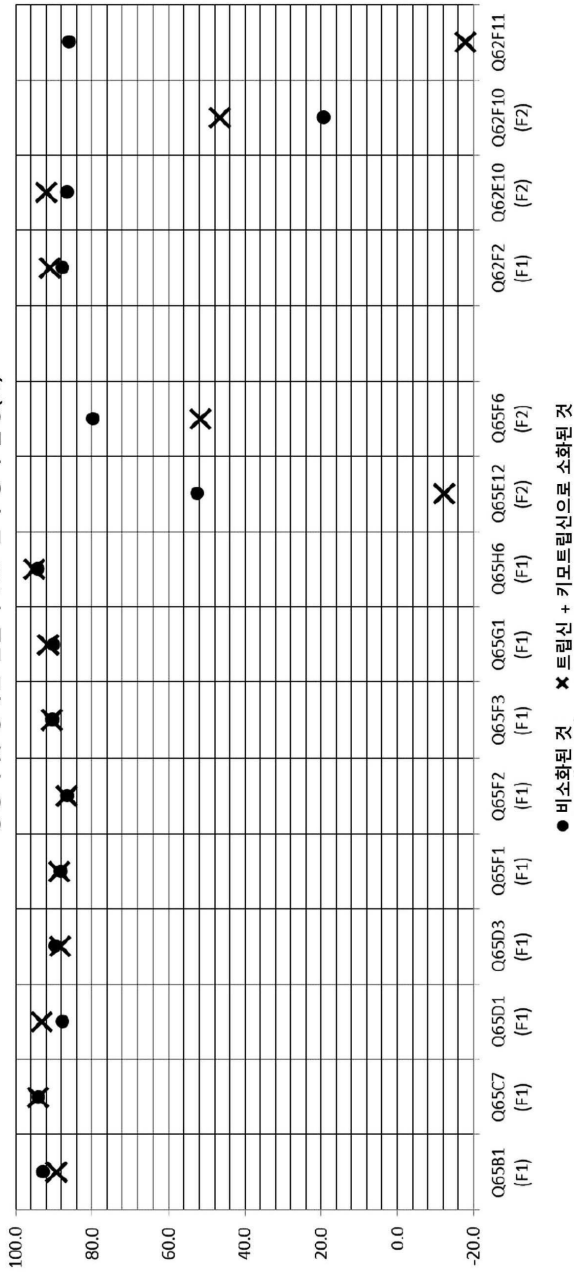
5	ID24F (49)	EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	KGQGTQVTVSS
10	ID25F (50)	EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	KGQGTQVTVSS
15	ID26F (51)	EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	KGQGTQVTVSS
20	ID27F (52)	EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	KGQGTQVTVSS
25	ID28F (53)	EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	KGQGTQVTVSS
30	ID29F (54)	EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	KGQGTQVTVSS
35	ID34F (55)	EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	KGQGTQVTVSS
40	ID38F (57)	DYOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	SHWY WYRQAPGKELEWLS EINTNGLITHYGDVYK RFTVSRNNAANKMYLEITRIEPEDEPTALYYCAR NQKGLN	KGQGTQVTVSS
45	바 표 예 Q62E11 (40)	QYOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG EVOLVESGGGLVQPGGSLIKLSCAASGFDPS	DYWG WFRQAPGKEBEFYG FIRWGLVTRYADVYK RFTISRDNARNTLSLOTIGLILAEPTAVYCAA SGGSGFPVWAGSYEY	WQGTQVTVSS	WQGTQVTVSS

[0723]

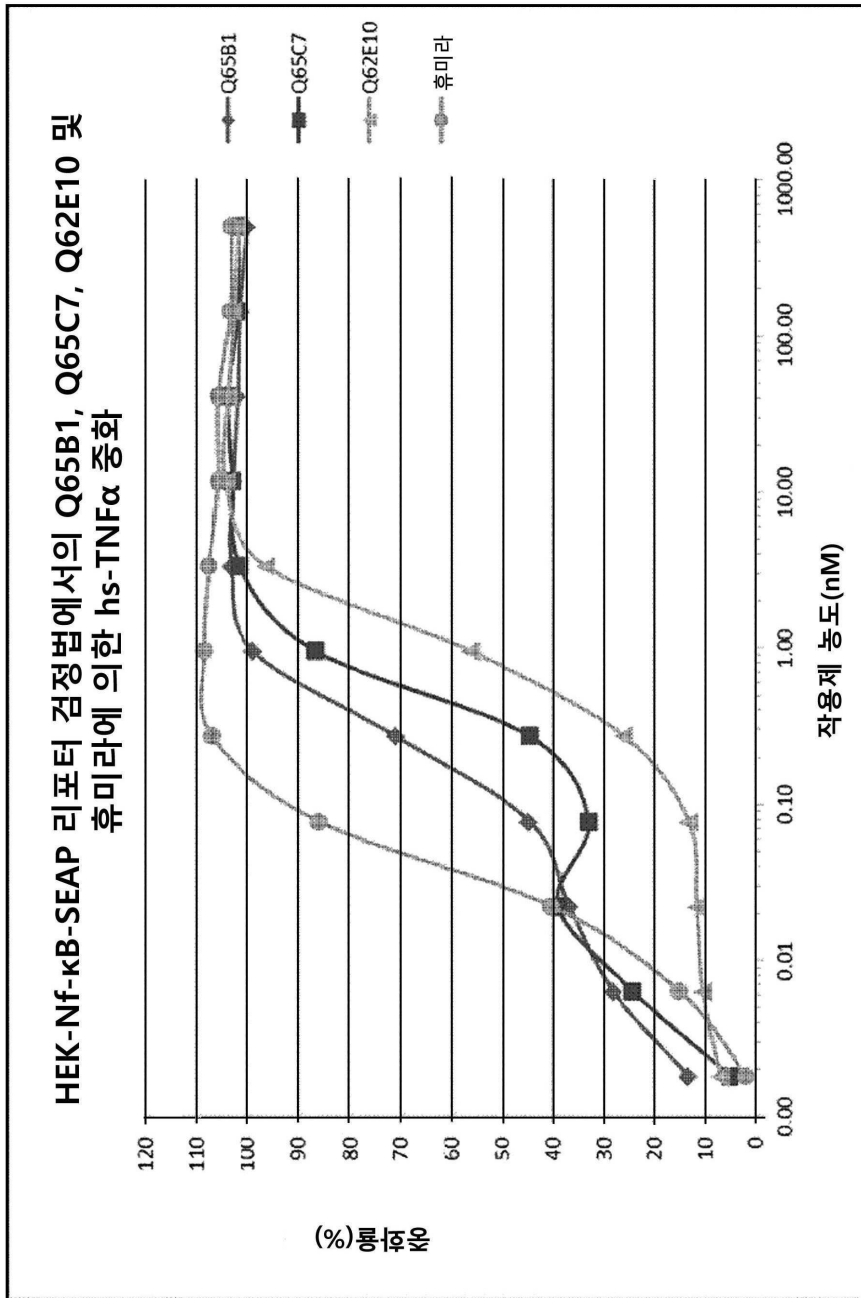
도면

도면1

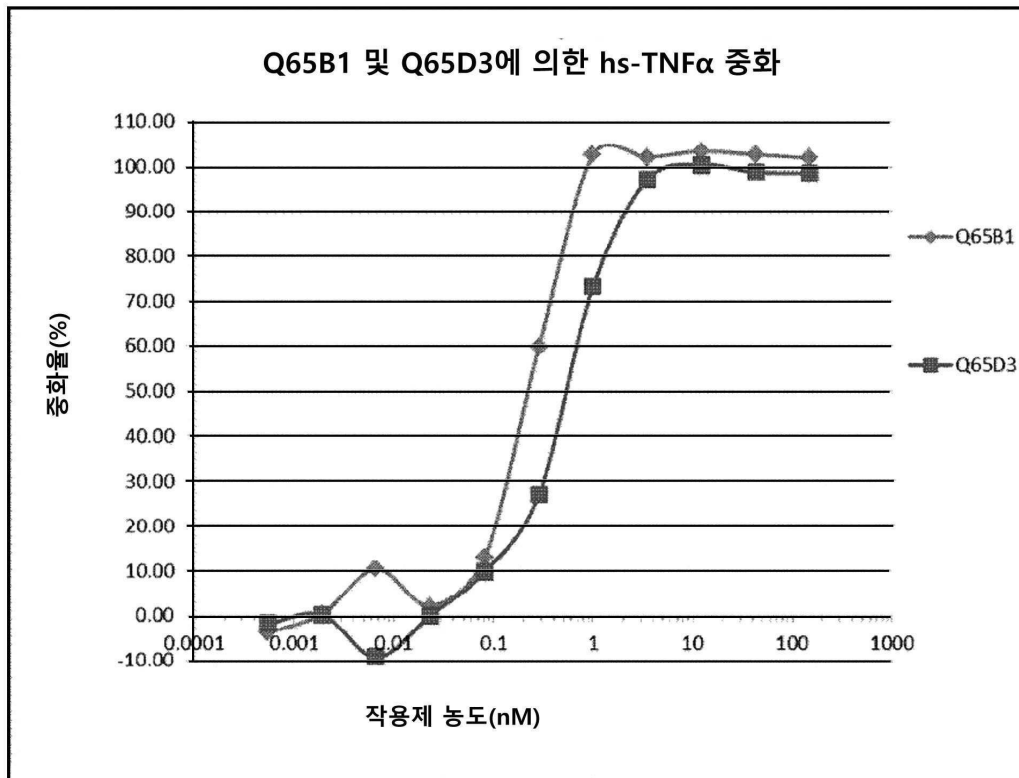
트립신 및 키모트립신에 노출되었을 때, 및 그에 노출되지 않았을 때의 주변세포질
상정액 및 정제된 샘플의 TNF-알파 증가 활성(%)



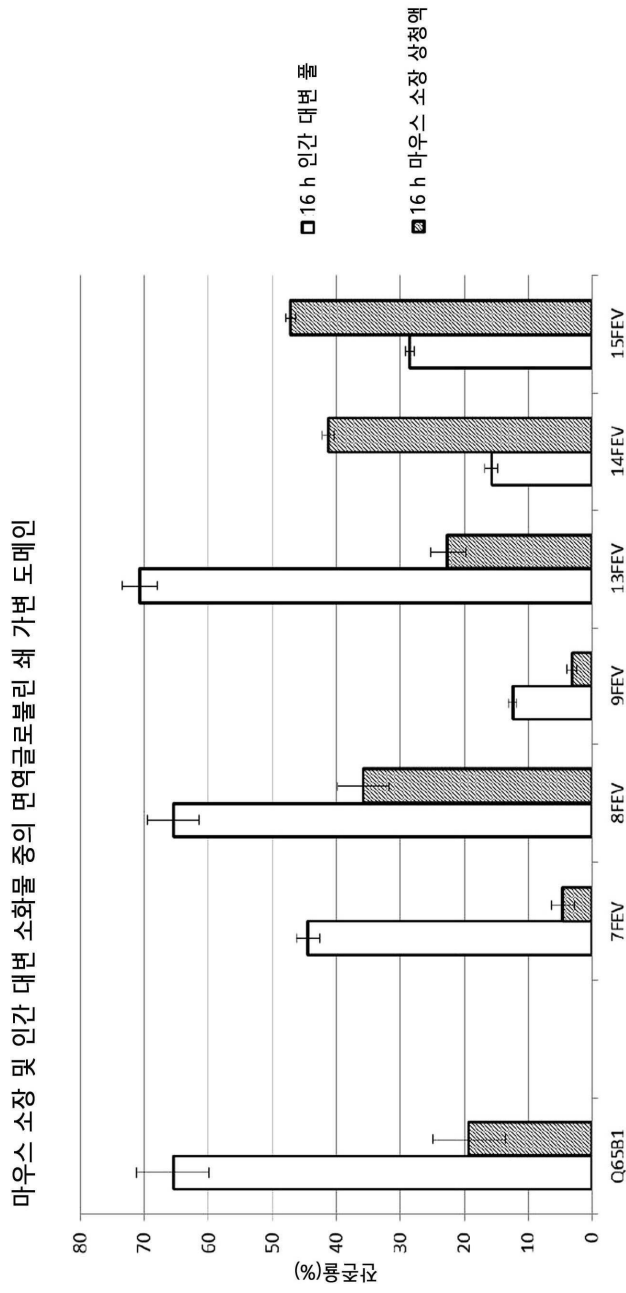
도면2a



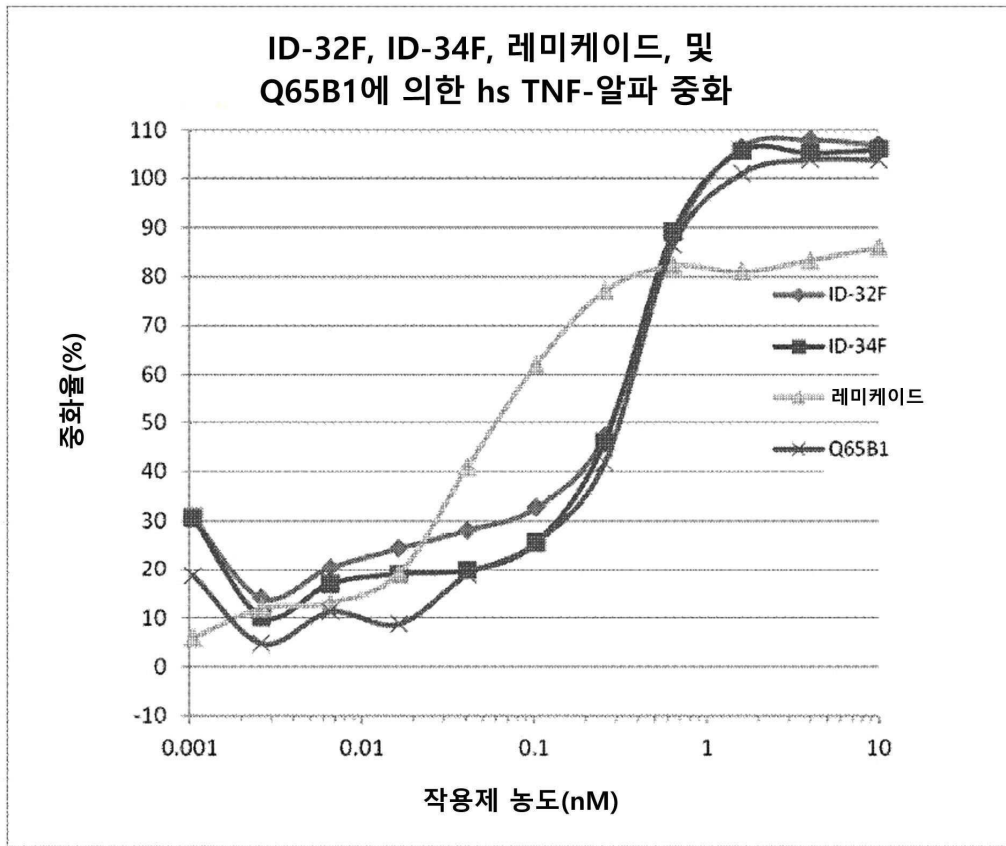
도면2b



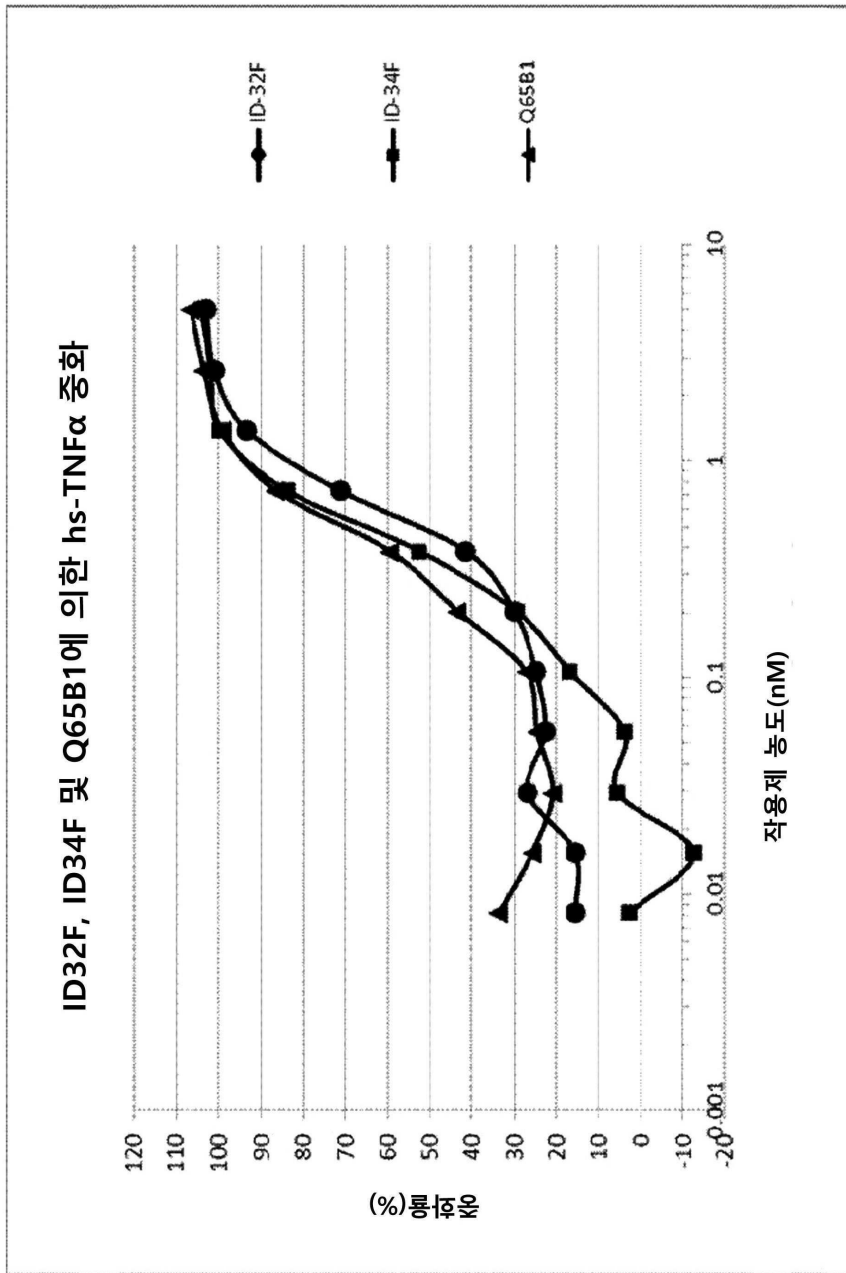
도면3



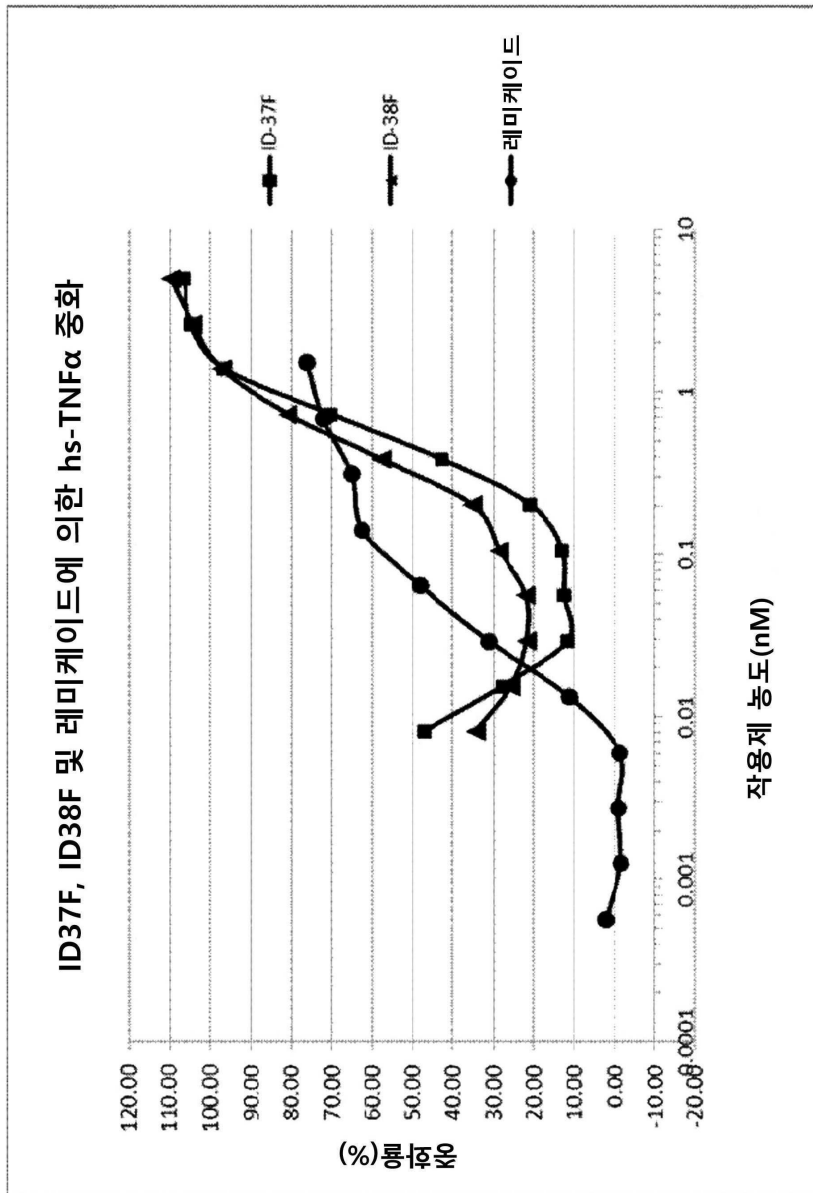
도면4a



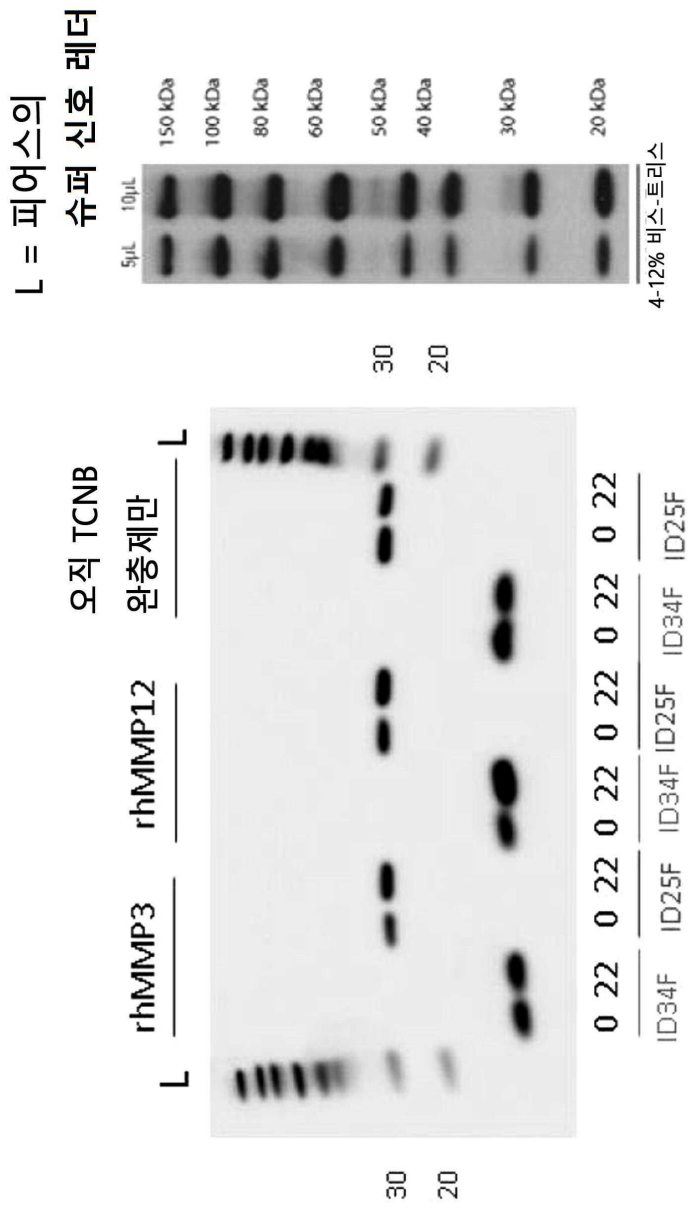
도면4b



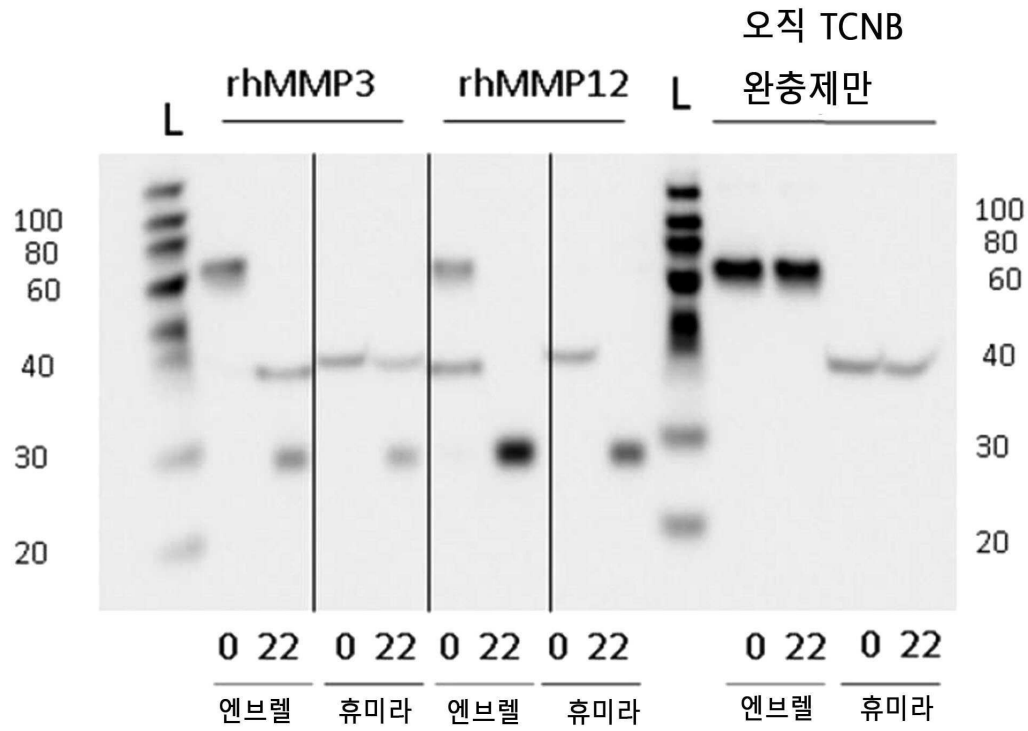
도면4c



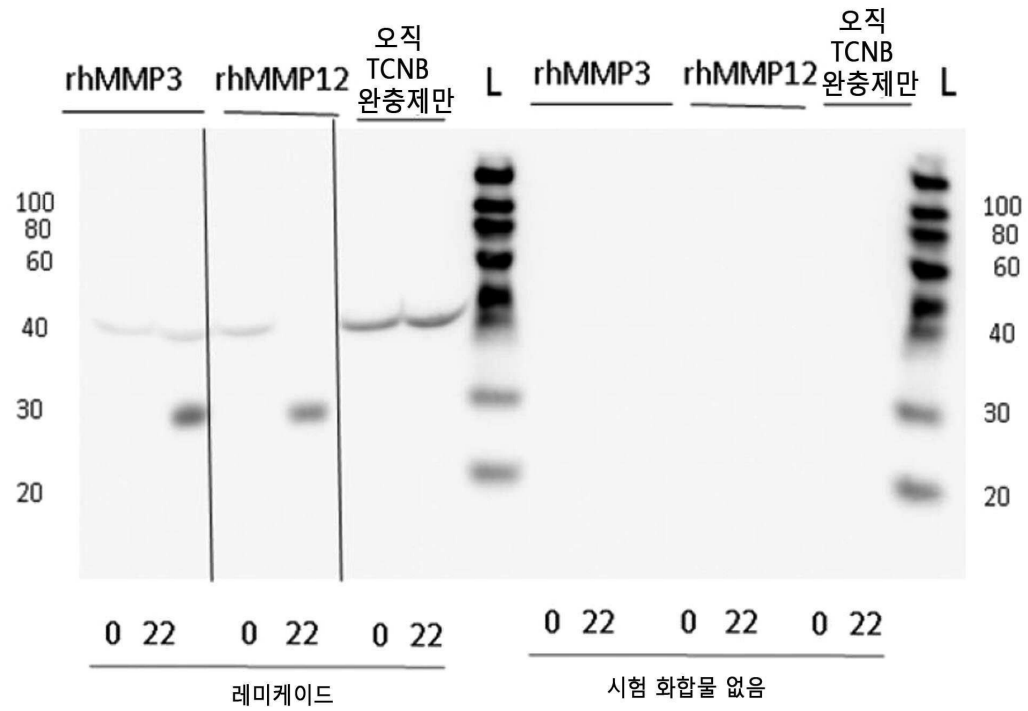
도면5a



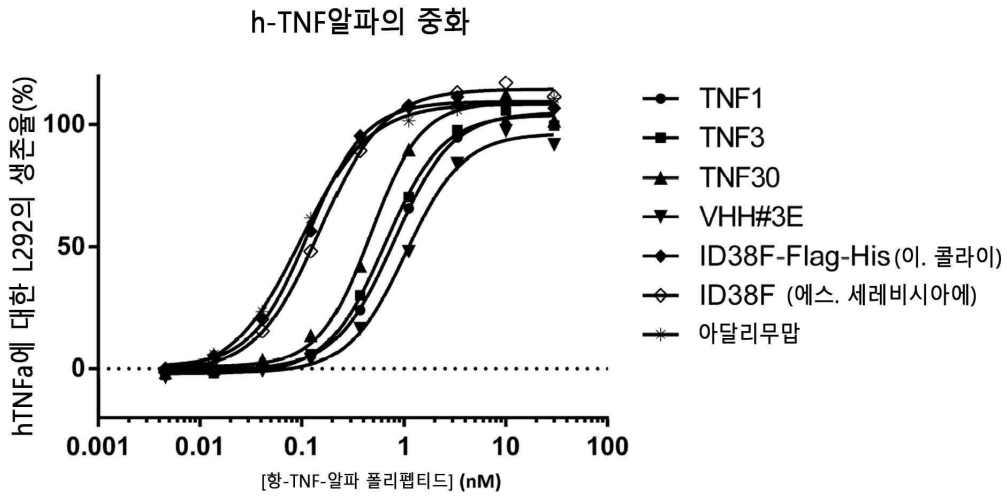
도면5b



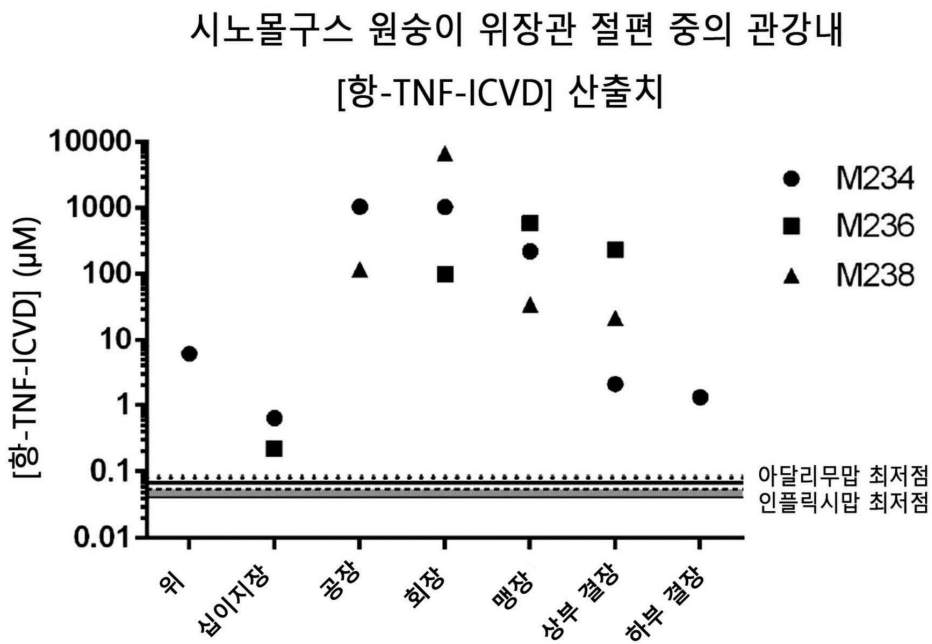
도면5c



도면6

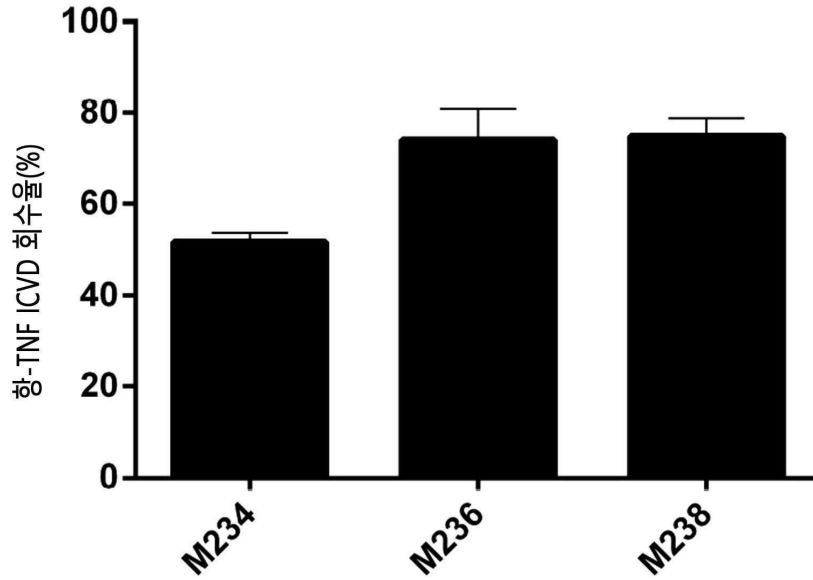


도면7



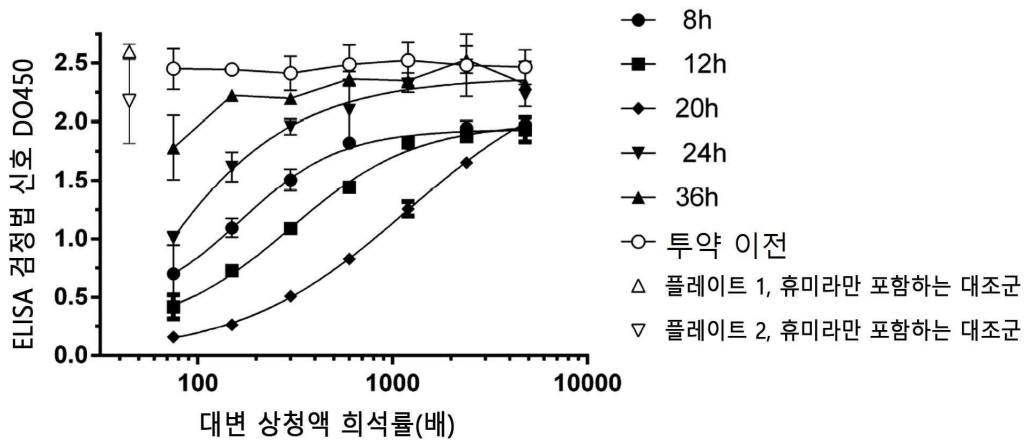
도면8

시노물구스 원숭이 위장관으로부터의 항-TNF
ICVD의 전체 회수율(%)



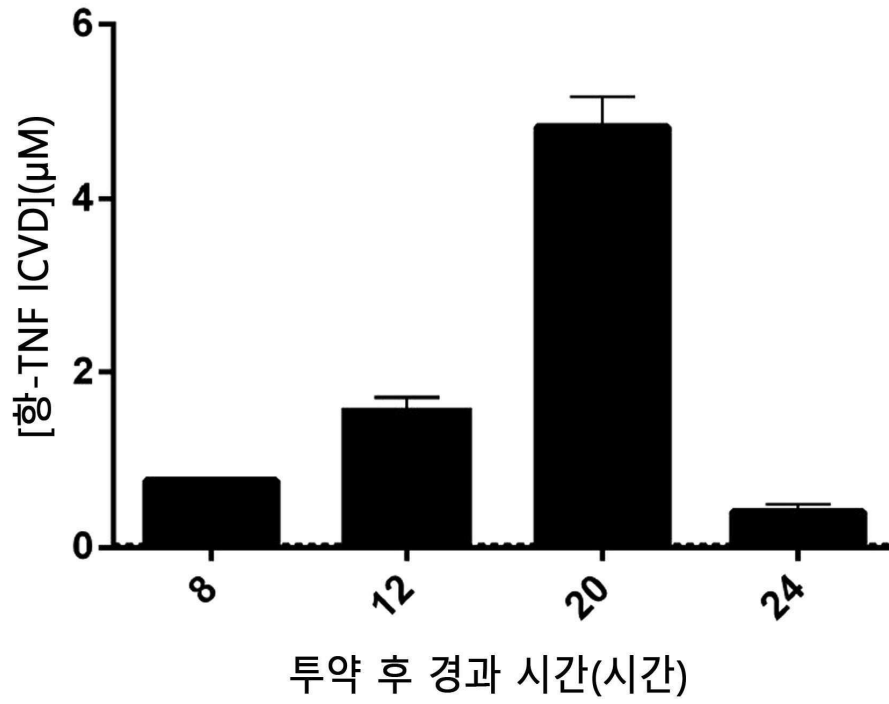
도면9

휴미라 경쟁 ELISA OD450 데이터



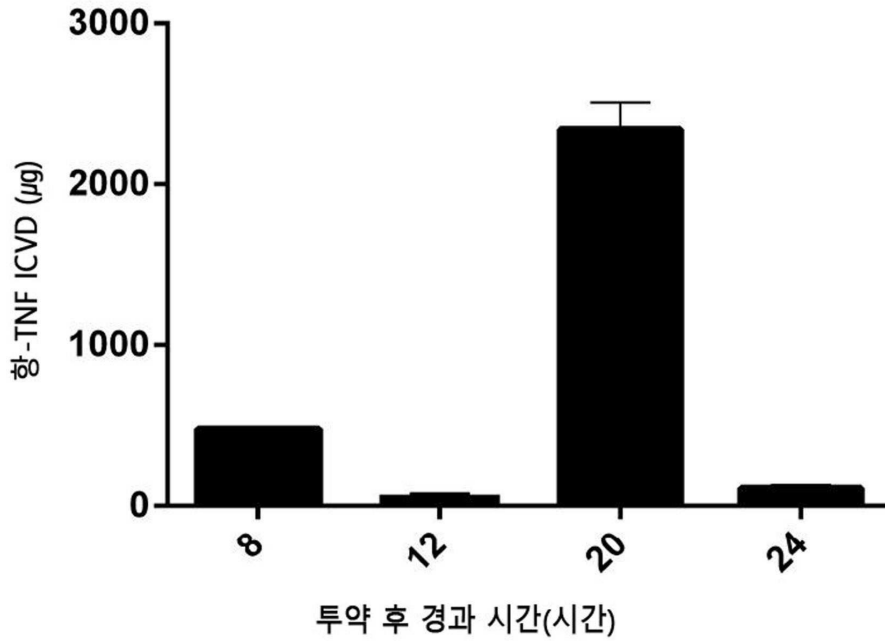
도면10

플링된 시노물구스 원숭이 대변 중의
항-TNF ICVD 농도



도면11

폴링된 시노몰구스 원숭이 대변으로부터 회수된 항-TNF ICVD의 산술치



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Vhsquared Limited

<120> Polypeptides

<130> IPA170915-GB

<150> EP15162112.5

<151> 2015-03-31

<160> 88

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID38F CDR1

<400> 1

Ser His Trp Met Tyr

1

5

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ID38F CDR2
 <400> 2
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ID38F CDR3
 <400> 3
 Asn Gln His Gly Leu Asn
 1 5

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ID38F FR1
 <400> 4
 Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
 20 25 30

<

210> 5
 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID38F FR2

<400> 5

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

1 5 10

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID38F FR3

<400> 6

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr Leu Glu

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID38F FR4

<400> 7

Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID38F

<400> 8

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
 20 25 30

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

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

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

Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 157

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Soluble human TNF-alpha

<400> 9

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser

115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly

130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala

145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro

165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu

180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu

195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly

210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu

225 230

<210> 11

<211> 157

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<220>

<223> Soluble cynomolgus monkey TNF-alpha

<400> 11

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val

1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg

20 25 30

Ala Asn Ala Leu Val Ala Asn Gly Val Glu Leu Thr Asp Asn Gln Leu

35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe

50 55 60

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

Lys Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro
 100 105 110
 Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly
 115 120 125
 Asp Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala
 130 135 140
 Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 14

<211

> 235

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> Membrane-bound mouse TNF-alpha

<400> 14

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

100 105 110
 Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu Val

115 120 125
 Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys

130 135 140
 Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg

145 150 155 160
 Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val Lys

165 170 175
 Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp

180 185 190
 Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp

195 200 205
 Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala Glu

210 215 220
 Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu

225 230 235

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62E10 CDR1

<400> 15

Ile His Trp Met Tyr

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62E10 CDR2

<400> 16

Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62E10 CDR3

<400> 17

Thr Gln Asn Gly Ala Ala

1 5

<210> 18

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62E10 FR1

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asp Phe Gly

 20 25 30

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62E10 FR2

<400> 19

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

1 5 10

<210> 20

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62E10 FR3

<400> 20

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

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62E10 FR4

<400> 21

Lys Gly Gln Gly Val Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 22

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62E10

<400> 22

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

Ala Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Asn Thr Gln Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Val Gln Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 23

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F2

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Met Thr Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F3

<400> 24

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ala Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Met Thr Asn Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

 85 90 95

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

 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 25

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62F2

<400> 25

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

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 26

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65G1

<400> 26

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

 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F1

<400> 28

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

<210> 29

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65D1

<400> 29

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

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 30

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65C7

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65D3

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Thr

 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Met Leu Asn

65 70 75 80

Leu Glu Met Thr Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

 85 90 95

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

 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65B1

<400> 32

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

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 33

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F6

<400> 33

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

 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ala Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Ala Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Arg Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 34

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F11

<400> 34

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

50 55 60

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

Val Ser Ser
 115

<210> 35

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65E12

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ile His

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Val Ser Ser

 115

<210> 36

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65C12

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Ile His

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Ser Arg Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65A6

<400> 37

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asp Phe Gly Ile His

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 38

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65A3

<400> 38

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asp Phe Gly Ile His

 20 25 30

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

 35 40 45

Ala Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ser Asn Thr Gln Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Val Gln Val Thr

 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62F10

<400> 39

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

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Asn Thr Gln Asn Gly Lys Thr Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 40

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62F11

<400> 40

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Ser
 65 70 75 80

Leu Gln Thr Ile Gly Leu Leu Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Ser Gly Gly Gly Ser Gly Pro Val Asn Ala Gly Ser Tyr Glu
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 41

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID7F-EV

<400> 41

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

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

Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID8F-EV

<400> 42

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 43

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID9F-EV

<400> 43

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 45

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID14F-EV

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 46

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID15F-EV

<400> 46

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 47

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID22F

<400> 47

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

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

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
 20 25 30

 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160

 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser
 165 170 175
 His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp
 180 185 190
 Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser
 195 200 205
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met
 210 215 220

 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val
 245 250 255
 Thr Val Ser Ser
 260
 <210> 49
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ID24F
 <400> 49
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser

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

Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Ser Met
 210 215 220
 Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val
 245 250 255

Thr Val Ser Ser
 260

<210> 50

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID25F

<400> 50

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

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser
 165 170 175

His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp
 180 185 190

Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser
 195 200 205

Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met
 210 215 220

Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val
 245 250 255

Thr Val Ser Ser
 260

<210> 51

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID26F

<400> 51

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

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

<210> 52

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID27F

<400> 52

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser
 165 170 175

His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp
 180 185 190

Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser
 195 200 205

Val His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met
 210 215 220

Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val
 245 250 255

Thr Val Ser Ser
 260

<210> 54

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID29F

<400> 54

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
 20 25 30

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

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

<220>

<223> Q62E10-DVQLV

<400> 55

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 56

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID34F

<400> 56

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 57

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID37F

<400> 57

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

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

Val Ser Ser

115

<210> 58

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' Primer with Spe site

<400> 58

tcttaactag tgaggagacg gtgacctg

28

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F1 CDR1

<400> 59

Val His Trp Met Tyr

1 5

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65D1 CDR1

<400> 60

Asn His Trp Met Cys

1 5

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID27F CDR2

<400> 61

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val His
 1 5 10 15
 Gly

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ID28F CDR2

<400> 62

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val His
 1 5 10 15
 Gly

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F2 CDR2

<400> 63

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Ser Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F3 CDR2

<400> 64

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

1 5 10 15
 Gly

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62F2 CDR2

<400> 65

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

1 5 10 15
 Gly

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F1 CDR2

<400> 66

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

1 5 10 15
 Gly

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65D1 CDR2

<400> 67

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Phe Val Lys

1 5 10 15
 Gly

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65D3 CDR2

<400> 68

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Thr Lys

1 5 10 15
 Gly

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65B1 CDR2

<400> 69

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

1 5 10 15
 Gly

<210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F2 CDR3

<400> 70

Asn Gln Lys Gly Leu Asn

1 5

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F1 CDR3

<400> 71

Asn Gln Met Gly Leu Asn

1 5

<210> 72

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65D3 CDR3

<400> 72

Asn Glu Arg Gly Leu Asn

1 5

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F6 CDR2

<400> 73

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

1 5 10 15

Gly

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F11 CDR2

<400> 74

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65C12 CDR2

<400> 75

Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65A6 CDR2

<400> 76

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

1 5 10 15

Gly

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65A3 CDR2

<400> 77

Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F6 CDR3

<400> 78

Ser Arg Asn Gly Ala Ala

1 5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q65F11 CDR3

<400> 79

Ala Arg Asn Gly Ala Ala

1 5

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Q62F10 CDR3

<400> 80

Thr Gln Asn Gly Lys Thr

1 5

<210> 81

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> M13.rev
 <400> 81
 caggaaacag ctatgac 17
 <210> 82
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> M13.fw
 <400> 82
 gtaaacgac ggccag 16
 <210> 83
 <211> 345
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220>
 <223> Polynucleotide coding sequence of ID38F, codon optimised for
 yeast expression
 <400> 83
 gatgttcaat tggttgaatc tgggtggtt ttggttcaac caggtgggtc ttgaaattg 60
 tcttgtgctg cttctggttt cgatttctct tctcattgga tgtactgggt tagacaagct 120
 ccaggtaaag aattggaatg gttgtctgaa atcaacacca acggtttgat taccattat 180
 ggtgattctg tcaagggtag attcactgtc tctagaaca atgctgctaa caagatgtac 240
 ttggaattga ccagattgga accagaagat actgccttgt attactgcgc tagaaatcaa 300

 catggtttga acaaagggtca aggtactcaa gttaccgttt cctca 345
 <210> 84
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide coding sequence of Q62E10, codon optimised for yeast expression

<400> 84

caagtccaat tgcaagaatc tgggtggtgt ttggttcaac caggtaggttc ttgagattg 60
 tcttgacta cttctggttt ggatttcggt atccattgga tgtactggtt tagacaagct 120
 ccaggtaaag aattggaatg ggttgctgaa atcaacacca atgctttgat taccaagtac 180
 gccgattctg ttaagggtag attcaccatt tctagagata acgctaagaa caccttggtc 240

ttgcaaatga acgacttgaa gtctgaagat accgctgttt actactgttc taacctcaa 300
 aatggtgctg ctaaagggtca aggtgtacaa gttactgttt cctcc 345

<210> 85

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide coding sequence of ID38F, codon optimised for E. coli expression

<400> 85

gatgttcagc tggttgaaag cggtaggtgt ctggttcagc ctggtggtag cctgaaactg 60
 agctgtgcag caagcgtttt tgattttagc agccattgga tgtattgggt tcgtcaggca 120
 ccgggtaaag aactggaatg gctgagcga ataacacca atggtctgat taccattat 180
 ggcatagcgc ttaaagggtc ttttaccgtt agccgtaata atgcagcaa caaatgtat 240
 ctggaactga cccgtctgga accggaagat accgcactgt attattgtgc acgtaatcag 300
 catggtctga ataaagggtca gggcacccag gttaccgtga gcagc 345

<210> 86

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide coding sequence of Q62E10, codon optimised for E. coli expression

<400> 86

caggttcagc tgcaagaaag cggtaggtgt ctggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg 60

agctgtacca ccagtggtct ggattttggt attcattgga tgtattggtt tcgtcaggca 120

ccgggtaaag aactggaatg ggttcagaa attaacacca atgcaactgat taccaaatat 180

gccgatagcg tgaagggtcg ttttaccatt agccgtgata atgccaaaaa taccctgttt 240

ctgcagatga acgatctgaa aagcgaagat accgcagtgt attattgtag caataccag 300

aatgggtcag caaaaggta ggggtgttcag gttaccgtta gcagc 345

<210> 87

<211> 501

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide consisting of ID38F open reading frame for E. coli
expression (PelB leader to c-myc-6His tag 2x stop codon)

<400> 87

atgaaatate tgetgccgac cgcagcagcg ggtctgetgc tgetggcagc acagcctgca 60

atggcagatg ttcagctggt tgaagcggg ggtggctctgg ttcagcctgg tggtagcctg 120

aaactgagct gtgcagcaag cggttttgat tttagcagcc attggatgta ttgggttcgt 180

caggcaccgg gtaaagaact ggaatggctg agcgaatta acaccaatgg tctgattacc 240

cattatggcg atagcgttaa aggtcgtttt accgtagcc gtaataatgc agccaacaaa 300

atgtatctgg aactgaccgg tctggaaccg gaagataccg cactgtatta ttgtgcacgt 360

aatcagcatg gtctgaataa aggtcagggc acccaggtta ccgtgagcag cgcagcagcc 420

agcggtagcc tggaacagaa actgattagc gaagaggatc tgaatggtgc agcacatcat 480

catcaccate atggtgccgc a 501

<210> 88

<211> 486

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide consisting of ID38F open reading frame for E. coli
expression (PelB leader to Flag-6His tag 2xstop codon)

<400> 88

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60

atggccgatg ttcagctggt tgaaagcggg ggtggctctgg ttcagcctgg tggtagcctg	120
aaactgagct gtcagcaag cggttttgat ttagcagcc attggatgta ttgggttcgt	180
caggcaccgg gtaagaact ggaatggctg agcgaaatta acaccaatgg tetgattacc	240
cattatggcg atagcgtaa aggtcgtttt accgttagcc gtaataatgc agccaacaaa	300
atgtatctgg aactgaccg tctggaaccg gaagataccg cactgtatta ttgtgcacgt	360
aatcagcatg gtctgaataa aggtcagggc acccaggtca ccgtctcctc agcggccgca	420
gactacaaag acgacgacga caaaggggct gcacatcacc atcatcacca cggggctgca	480
taataa	486