



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년09월22일
 (11) 등록번호 10-1443473
 (24) 등록일자 2014년09월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07K 16/18 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
 C12N 15/13 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7016031(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2012년07월22일
 심사청구일자 2012년07월19일

(85) 번역문제출일자 2012년06월20일
 (65) 공개번호 10-2012-0079179
 (43) 공개일자 2012년07월11일

(62) 원출원 특허 10-2007-7004055
 원출원일자(국제) 2005년07월22일
 심사청구일자 2008년05월27일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2005/002892
 (87) 국제공개번호 WO 2006/008548
 국제공개일자 2006년01월26일

(30) 우선권주장
 0416392.9 2004년07월22일 영국(GB)
 0511881.5 2005년06월10일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌
 W02002085945 A1

전체 청구항 수 : 총 5 항

(73) 특허권자
 에라스무스 유니버시티 메디컬 센터 로테르담
 네덜란드 3015 지이 로테르담 디알 몰레위터플레인 50
 크레이그, 로저, 킹돈
 영국, 체셔 씨더블유11 2엑스비, 샌드바흐, 스몰우드, 스펀 모스, 주빌리 하우스 팜

(72) 발명자
 크레이그 로저 킹돈
 영국 체셔 씨더블유11 2엑스비 샌드바흐 스몰우드 스펀 모스 주빌리 하우스 팜
 그로스벨드 프랭클린 게라르두스
 네덜란드 엔엘-3000 디알 로테르담 피.오. 박스 1738 뎀트먼트 오브 셀 바이알러지 앤드 체네틱스 에라스무스 유니버시티 메디컬센터 로테르담
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
 특허법인 원전

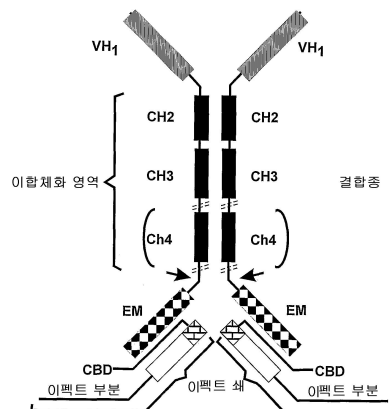
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **VH 결합 영역의 분리 방법**

(57) 요약

본 발명은 친화도 성숙을 수행하는 다양한 레퍼토리의 작용적 중쇄만의 항체의 제조 및 이들의 사용에 관련된다. 또한, 본 발명은 다양한 레퍼토리의 군-특이적 중쇄만의 항체의 제조 및 사용과, 항체 중쇄 작용성, 바람직하게는 항체 중쇄 결합 작용성, 불변 영역 이펙터 활성 및 선택적으로 추가적인 이펙터 작용을 가진 다가 폴리펩티드 복합체의 제조 및 사용에 관련된다. 또한, 본 발명은 항원 도전에 반응하는 형질전환 마우스에서 작용적 중쇄만의 항체의 생산 방법에 관련된다. 특히, 본 발명은 모든 군의 인간 항원 특이적, 고 친화도 중쇄만의 항체 또는 군들의 혼합물의 생산과, 완전 작용적 V_H 항원 결합 영역의 분리 및 발현 방법에 관련된다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

안센스 리차드 빌헬름

네덜란드 엔엘-3000 디알 로테르담 피.오. 박스
1738 뎀트먼트 오브 셀 바이알러지 앤드 제네틱스
에라스무스 유니버시티 메디컬센터 로테르담

드라메크 두브라브카

네덜란드 엔엘-3000 디알 로테르담 피.오. 박스
1738 뎀트먼트 오브 셀 바이알러지 앤드 제네틱스
에라스무스 유니버시티 메디컬센터 로테르담

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계들을 포함하는, 항원특이적 V_H 결합 영역을 생산하는 방법으로서, 상기 결합 영역은 용액 내에 존재하고, 생리학적 매질 중에서 활성인 것을 특징으로 하는 방법 :

- (a) 이형 V_H 중쇄 유전자좌를 발현하는 형질전환 설치류에 항원을 주입하는 단계;
- (i) 상기 V_H 중쇄 유전자좌는 적어도 하나의 자연적으로 발생하는 비카멜리드 V_H 유전자 단편, 적어도 하나의 인간 D 유전자 단편, 적어도 하나의 인간 J 유전자 단편을 포함하는 가변 영역과 적어도 하나의 중쇄 불변영역을 포함하고;
- (ii) 상기 이형 V_H 중쇄 유전자좌의 각 불변 영역의 C_H1 엑손이 결실되고;
- (iii) V_H 유전자 단편, D 유전자 단편 및 J 유전자 단편은 VDJ 코딩 서열을 형성하기 위해 재조합이 가능하며;
- (iv) 발현시 상기 재조합 V_H 중쇄 유전자좌는, 항원특이적 V_H 결합 영역 및 C_H1 영역이 결합된 불변 영역 이펙터를 포함하는, 용액 내에 존재하고, 생리학적 매질 중에서 활성인 중쇄만의 항체 형성이 가능하다;
- (b) 목적하는 항원 특이적인 중쇄만의 항체를 발현하는 세포 또는 조직을 분리하는 단계;
- (c) 상기 단계 (b)에서 분리된 세포 또는 조직으로부터 유래된 mRNA로부터 V_H 결합 영역(들)을 암호화하는 서열을 클로닝하는 단계;
- (d) 파아지 또는 유사한 라이브러리를 사용하여 클로닝된 서열에 의하여 코딩된 V_H 결합 영역을 디스플레이하는 단계;
- (e) 항원 특이적 V_H 결합 영역(들)을 확인하는 단계; 및
- (f) 세균류, 효모 또는 대체 발현 시스템에서 상기 V_H 결합 영역(들)을 단독으로 또는 융합 단백질로서 발현시키는 단계.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 설치류에 대해 내생의 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 결실 또는 사일런스되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 설치류에 대해 내생의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자좌는 결실 또는 사일런스되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 V_H 중쇄 유전자좌는 천연 인간 V_H , D 및 J 유전자 단편들을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 V_H 중쇄 유전자좌는 하나 이상의 V_H 유전자 단편, 하나 이상의 D 유전자 단편 및 하나 이상의 J 유전자 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

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

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 친화도 성숙(affinity maturation)을 수행하는 다양한 레퍼토리의 작용적 중쇄만의 항체(functional heavy chain-only antibody)의 제조 및 이들의 사용에 관련된다. 또한, 본 발명은 다양한 레퍼토리의 군-특이적(class-specific) 중쇄만의 항체의 제조 및 사용과, 항체 중쇄 작용성(functionality), 바람직하게는 항체 중쇄 결합 작용성, 불변 영역 이펙터(effector) 활성화 및 선택적으로 추가적인 이펙터 작용을 가진 다가 폴리펩티드 복합체의 제조 및 사용에 관련된다.

[0002] 또한, 본 발명은 항원 노출에 반응하는 형질전환 마우스에서 작용적 중쇄만의 항체의 생산 방법에 관련된다. 특히, 본 발명은 모든 군의 인간 항원 특이적, 고 친화도 중쇄만의 항체 또는 군들의 혼합물의 생산과, 완전 작용적 V_H 항원 결합 영역의 분리 및 발현 방법에 관련된다.

[0003] 또한, 본 발명은 중쇄 작용성, 바람직하게는 중쇄 이펙터 활성 및 다른 결합과 이펙터 작용을 포함하는 다가 폴리펩티드 복합체의 생산에 관련된다.

[0004] 또한, 본 발명의 방법을 사용하여 생산된 중쇄만의 항체 및 다른 다가 결합 복합체와 이들의 사용이 설명된다.

배경 기술

[0005] 단일클론항체(monoclonal antibodies) 또는 이들의 변종(variants)은 21세기들어 본격화된 신규 의약품의 많은 부분을 차지할 것이다. 단일클론항체 치료는 이미 류머티즘 관절염(rheumatoid arthritis)과 크론병(Crohn's disease)의 치료에 우수한 방법으로서 받아들여지고 있으며, 암 치료에서 급격한 진보를 나타내고 있다. 또한, 항체를 이용한 생산물은 심혈관성 질환과 감염성 질환의 치료를 위하여 개발되고 있다. 잘 알려진 단일클론항체 생산물은 표적 리간드(예를 들어, TNF- α) 상의 알려진 단일의 에피토프(epitope)를 인식하고 결합한다. 치료용 인간 단일클론항체의 제조는 포유류 세포의 배양에 의존적으로 관련된다. 두 개의 중쇄와 두 개의 경쇄로 구성되는 복합체(H₂L₂ 복합체)의 어셈블리(assembly) 및 순차적인 번역 후 당화 과정은 세균성 시스템을 사용하는 것을 불가능하게 한다. 포유류 세포 배양을 이용한 항체 제조를 위한 생산비와 시설비는 매우 높아서 허용가능한 대체 요법의 부재로 인해 우수한 항체 이용 치료가 제한된다. 다양한 형질전환 생물은 완전한 기능성 항체를 발현할 수 있다. 이러한 생물로는 식물, 곤충, 닭, 염소 및 소가 포함되지만, 아직 시판되는 치료용 생산물을 제조하기 위하여 사용되지는 않는다.

[0006] 기능성 항체 단편은 대장균(*E. coli*)에서 제조될 수 있지만, 제조된 생산물은 제조 과정 동안 PEG로 처리되지 않는다면 낮은 혈청 안정성을 가지게 된다.

[0007] 동일 또는 상이한 항원 상의 다른 두 개의 에피토프와 결합할 수 있는 이특이적 항체 복합체(bispecific antibody complexes)는 면역글로불린을 이용한 분자로부터 조작된다. 이특이적 결합 단백질 통합 항체 단독 또는 다른 결합제와의 조합은, 예를 들어 항원의 제거(Van Spriël 등, (1999) *J. Infect. Diseases*, 179, 661-669; Tacken 등, (2004) *J. Immunol*, 172, 4934-4940; US 5,487,890), 암의 치료(Glennie와 van der Winkel, (2003) *Drug Discovery Today*, 8, 503-5100), 및 면역 치료(Van Spriël 등, (2000) *Immunol. Today*, 21, 391-397; Segal 등, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6; Lyden 등, (2001) *Nat. Med.*, 7, 1194-1201)와 같은 획득된 인간 면역 기능이 치료적 효과를 발휘하게 되는 치료 양상에 대한 가능성을 보여준다.

[0008] 제조 결과는 혼합물이 되는데, 이특이적 항체 생산물은 2종 이상의 H₂L₂ 복합체를 기초로 한다. 예를 들어, 2세트의 중쇄 및 경쇄 유전자의 동시 발현은 최대 10가지의 다른 조합을 형성할 수 있으며, 이중 단지 하나가 원하는 이형이합체(heterodimer)이다(Suresh 등, (1986) *Methods Enzymol.*, 121, 210-228).

[0009] 이러한 결과를 얻기 위하여, 포유류 세포에서 중쇄 이펙터 기능(effector function)을 보유하는 전장 이특이성 IgG 형태(BsIgG)의 생산을 위한 수많은 전략이 개발되었다. BsIgG는 이형이합체 형성을 방지하기 위하여 조작된 "노브(knob) 및 홀(hole)" 중쇄를 요구하며, 경쇄 착오 쌍형성을 피하기 위하여 동일한 경쇄를 이용한다(Carter, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 7-15). 또한, 각각이 다른 항원을 인식하는 항체 단편으로부터 복합체를 생산하기 위한 대체적인 화학적 가교 전략(Ferguson 등, (1995) *Arthritis and Rheumatism*, 38, 190-200) 또는 예를 들어, 콜렉틴(collectin)과 같은 다른 결합 단백질과 항체 단편의 가교(Tacken 등, (2004) *J. Immunol.*, 172, 4934-4940)가 설명되었다.

[0010] 또한, 일반적으로 중쇄 이펙터 기능이 결핍된 디아바디(diabody) 또는 미니 항체(BsAb)의 개발은 이형이합체 중복성을 극복한다. 이러한 것들은 그들의 표적 항원 각각에 대해 단가(monovalent)인 2가(divalent)의 이특이적(bispecific) 항체를 형성하기 위하여 접혀지고 이합체화되는 VH 및 VL 결합 부위(scFv)를 통합한 최소 단일쇄 항체를 포함한다(Holliger 등, (1993) *PNAS*, 90, 6444-6448; Muller 등, (1998) *FEBS Lett.*, 422, 259-264). 한 예로서, CH1 및 경쇄 불변 영역은 이특이적 미니 항체 형성을 위한 이형이합화 영역으로서 사용되었다(Muller 등, (1998) *FEBS Lett.*, 259-264). BsAb의 생산을 위하여 대장균 발현 시스템상에 기초한 다양한 재조합 방법이 개발되었지만(Hudson, (1999) *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 548-557), 임상 등급의 다가(multivalent) 항체 물질의 생산비와 규모가 임상적 개발에 대한 기본적인 장애로 존재하는 것으로 나타났다(Segal 등, (2001) *J. Immunol. Methods*, 248, 1-6).

[0011] 최근에, BsAb 개념은 각각의 중쇄 및 경쇄 상의 V_H 및 V_L 영역이 가공된 scFv 결합 영역으로 대체된 이-디아바디인 4가(tetravalent)의 이특이적 항체를 포함하는 개념으로 확장되었다. 그러한 구조물들은 조작하는데 복잡하더라도 이형이합체 중복성이 없는 포유류 세포 배양에서 어셈블리될 수 있다(Lu 등, (2003) *J. Immunol.*

Methods, 279, 219-232).

- [0012] 면역글로불린의 구조는 당 분야에서 공지되어있다. 대부분의 천연의 면역글로불린은 두 개의 중쇄와 두 개의 경쇄를 포함한다. 중쇄는 각각의 중쇄의 약 절반 위치에 존재하는 힌지(hinge) 간의 이황화결합을 통하여 서로 연결된다. 경쇄는 힌지 영역의 N-말단의 각각의 중쇄와 회합(association)된다. 각각의 경쇄는 정상적으로 힌지 영역에 근접된 이황화결합에 의하여 그것의 각각의 중쇄와 결합된다.
- [0013] Ig 분자가 정확하게 접힐 때, 각각의 쇠는 많은 선형 폴리펩티드 서열에 의하여 연결된 수많은 뚜렷한 구형 영역 내로 접힌다. 예를 들어, 경쇄는 가변(V_L) 영역과 불변(C_L) 영역 내로 접힌다. 중쇄는 경쇄의 가변 영역에 인접한 한 가변 영역 V_H , 제1의 불변 영역, 힌지 영역 및 제2의 불변 영역 또는 제3의 불변 영역을 더 가진다. 중쇄 가변 영역(V_H)과 경쇄 가변 영역(V_L)의 상호작용은 항원 결합 영역(Fv)의 형성으로 결과된다. 일반적으로, 중쇄 이합체 및 아미노 말단 단편이 경쇄의 부재에서 활성을 보유하는 것으로 알려져 있지만, V_H 와 V_L 은 둘 모두 항원 결합에 요구된다(Jaton 등, (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195).
- [0014] 새로운 분자 생물학 기술의 출현과 함께, 중쇄만의 항체(경쇄 결핍)의 존재는 인간(중쇄 질환)과 뮤린(murine) 모델 시스템의 B 세포 증식 이상에서 확인되었다. 분자 수준에서 중쇄 질환의 분석은 계층 수준에서 변이와 결실이 경쇄와 결합하는 능력이 결핍된 중쇄만의 항체의 발현을 야기하는 중쇄 C_H1 영역의 부적절한 발현으로 결과될 수 있다는 것을 보여주었다(Hendershot 등, (1987) J. Cell Biol, 104, 761-767; Brandt 등, (1984) Mol. Cell. Biol., 4, 1270-1277).
- [0015] 파아지 라이브러리로부터 유래된 분리된 인간 V_H 영역에 대한 다른 연구는 V_H 영역의 항원 특이적 결합을 보여주지만, 이러한 V_H 영역은 낮은 용해성을 가지는 것으로 증명되었다. 나아가, 파아지 어레이(array) 상에 디스플레이되는 특이적 결합 특성을 가지는 인간 V_H 영역의 선별은 설계(engineering)된 항체에 대한 빌딩 블록(building block)을 형성할 수 있다는 것이 제안되었다(Ward 등, (1989) Nature, 341, 544-546).
- [0016] 다른 척추동물 종을 사용한 연구는, 자연적인 유전자 변이의 결과인 카멜리드(camelid)는 C_H1 경쇄 결합 영역의 부재에 기인한, 경쇄에 결합할 수 없는 작용적 IgG2와 IgG3 중쇄만의 이합체를 생산(Hamers- Casterman 등, (1993) Nature, 363, 446-448)하고, 상어와 같은 종은 포유동물 T 세포 수용체 또는 면역글로불린 경쇄와 관련된 것으로 보이는 유사 중쇄만의 결합 단백질 패밀리를 생산(Stanfield 등, (2004) Science, 305, 1770-1773)한다는 것을 보여주었다.
- [0017] 카멜리드 중쇄만의 항체의 특징은 인간 V_H 영역과 관련된 개선된 용해성을 제공하는 카멜리드 V_H 영역이다. 인간 V_H 는 개선된 용해성 특성(Davies와 Riechmann, (1996) Protein Eng., 9 (6), 531-537; Lutz와 Muylldermans, (1999) J. Immuno. Methods, 231, 25-38)을 위하여 설계될 수 있거나, 용해성은 생체 내(*in vivo*) 자연적 선택에 의하여 획득될 수 있다(Tanha 등, (2001) J. Biol. Chem., 276, 24774-24780). 그러나, V_H 결합 영역이 파아지 라이브러리로부터 유래되는 경우에, 예를 들어 친화도 핫 스팟 랜덤화(affinity hot spot randomisation)와 관련된 친화도 개선 전략의 적용에도 불구하고, 항원에 대한 본질적 친화도는 낮은 마이크로몰로부터 높은 나노몰 범위에 머무른다(Yau 등, (2005) J. Immunol Methods, 291, 213-224).
- [0018] 또한, 카멜리드 V_H 항체는 수식된 CDR3 고리(loop)로 특징되어진다. 이 CDR3 고리는 평균적으로 비카멜리드 항체에서 발견되는 것보다 길고, 카멜리드 중쇄만의 항체 중에서 V_L 영역의 부재에 대하여 보상하는 전체적 항원 친화도 및 특이성에 대한 주요한 영향을 주는 것으로 간주되는 특징이 있다(Desmyter 등, (1996) Nat. Struct. Biol., 3, 803-811; Riechmann과 Muylldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 23, 25-28). 카멜리드 항체에 대한 최근의 구조적인 연구는, 항체 다양성은 V(d)J 재조합 과정과 체세포 변이에 의존한 생체 내 변이 과정에 의하여 대부분 이루어진다는 것을 시사한다(De Genst 등, (2005) J. Biol. Chem., 280 (14), 14114-14121).
- [0019] 최근에, 형질전환 포유동물에서 중쇄만의 항체의 생산 방법이 개발되었다(W002/085945 및 W002/085944). 잠재적인 어떠한 군(IgM, IgG, IgD, IgA 또는 IgE) 및 (인간을 포함하는) 어떠한 포유동물로부터 유래된 작용성 중쇄만의 항체는 항원 노출의 결과로서 형질전환 포유동물(바람직하게는 마우스)로부터 생산될 수 있다.
- [0020] 정상 면역글로불린 중쇄 유전자좌는 복수의 V 유전자 단편, 수많은 D 유전자 단편 및 수많은 J 유전자 단편을 포함한다. 각각의 V 유전자 단편은 V 영역의 N 말단으로부터 거의 C 말단까지를 코딩한다. 각각의 V 영역의 C

말단은 D 유전자 단편 및 J 유전자 단편에 의하여 코딩된다. B 세포에서 VDJ 재배열 후 친화성 성숙은 V_H 결합 영역을 제공하고, 다음으로 V_L 결합 영역과 함께 항원 인식 부위 또는 결합 부위를 형성한다. 중쇄와 경쇄의 상호작용은 중쇄의 C_H1 영역과 경쇄의 κ 또는 λ 영역에 의하여 촉진된다.

- [0021] 중쇄만의 항체의 생산을 위하여, 생식계열 내의 중쇄 유전자좌는 가능한 불변 영역의 일부 또는 전부를 코딩하는 유전자 단편을 포함한다. 성숙 동안, 재배열된 V_H 결합 영역은 C_H1 영역을 결핍하여, 면역글로불린 경쇄와 회합될 수 없는 중쇄를 코딩하는 재배열된 유전자를 제공하기 위한 C_H2 불변 영역 코딩 단편상에 스플라이싱된다.
- [0022] 중쇄만의 단일클론항체는 표준 클로닝 기술에 의한 이자의 B 세포로부터 회수되거나, 파아지 디스플레이 기술에 의한 B 세포 mRNA로부터 회수될 수 있다(Ward 등, (1989) Nature, 341, 544-546). 카멜리드 또는 형질전환 동물로부터 유래된 중쇄만의 항체는 높은 친화도를 가진다. 정상 H_2L_2 4합체의 서열 분석은, 다양성은 VDJ 재배열과 체세포 초변이(hypermutation)의 조합으로부터의 우선적인 결과임을 나타낸다(Xu와 Davies, (2000) Immunity, 13, 37-45). 카멜리드에서 생산되든, 형질전환 동물에서 생산되든, 발현된 중쇄만의 mRNA의 서열 분석은 이 관찰을 지지한다(De Genst 등, (2005) J. Biol. Chem., 280, 14114-14121).
- [0023] 천연 카멜리드와 인간 V_H 영역의 중요하고, 공통적인 특징은, 각 영역은 최적의 용해성과 결합 친화도를 위하여 V_L 영역과의 이합체화와 관계없이 단량체로서 결합한다는 것이다. 이러한 특징은 블로킹제와 조직 침투제의 생산에 특히 적합한 것으로 이전에 인식되었다.
- [0024] 또한, 동형이합체 또는 이형이합체는 중쇄만의 항체의 효소적 절단 또는 합성 경로에 의하여 생산될 수 있다(Jaton 등, (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195 및 US2003/0058074 A1). 그러나, 단량체 항체 결합 영역의 이점은 시약, 치료제 및 진단제와 같은 다량체 단백질의 설계에 유리하게 사용되어야만 한다.
- [0025] 파아지 디스플레이 기술에 의하여 생산된 인간 V_H 또는 카멜리드 V_{HH} 는 체세포성 변이와 정상 항체 결합 위치의 CDR3 영역에서의 D와 J 영역 재조합에 의하여 제공된 추가적인 다양성의 결과로서의 개선된 특징의 이점이 없다(Xu와 Davies, (2000) Immunity, 13, 37-45). 인간 V_H 와 관련된 용해성에서의 이점이 나타났음에도 불구하고, 카멜리드 V_{HH} 는 인간에 항원성이고, 카멜리드의 면역화 또는 파아지 디스플레이 기술에 의하여 생산되어야만 한다.
- [0026] V_H 결합 영역의 통합은 특이성과 결합성(avidity)의 손실 가능성이 있는 V_H 와 V_L 영역으로부터 설계되어야 하는 scFv의 사용에 대한 분명한 이점을 가진다. 또한, T 세포 수용체 또는 상어 면역글로불린 패밀리와 같은 관련된 유전자 패밀리로부터 유래된 V_H 결합 영역은 이특이적 또는 다중 특이적 결합 부분자의 생산을 위하여 scFv에 대한 대체물을 제공한다. 또한, 예를 들어 가용성 수용체 단편을 포함하는 다른 자연적으로 발생하는 결합 단백질과 이들의 영역이 사용될 수 있다.
- [0027] 항체군은 그들의 생리적 작용에서 차이가 있다. 예를 들어, IgG는 성숙 면역 반응에서 우세한 역할을 한다. IgM은 보체 고정과 응집에 관련된다. IgA는 분비-눈물, 타액, 초유, 점액-에서의 Ig의 주요군이며, 국부 면역에 중요하게 작용한다. 다가 결합 복합체를 설계할 때에, 군 특이적 중쇄 불변 영역의 도입은 요구되는 작용성에 의존적인 생체 내 이펙터 작용의 치료적 이점을 제공한다. 또한, 개별적인 이펙터 영역의 설계는 작용성의 추가 또는 결실로 나타날 수 있다(Van Dijk와 van der Winkel, Curr. Opin. Chem. Biol., (2001) Aug 5 (4), 368-374). (인간 또는 카멜리드 또는 다른 기원이든) 고 친화도 V_H 결합 영역을 포함하는 중쇄만의 항체의 최적의 생산과 선별은, 생체 내 재조합과 친화도 성숙을 촉진시키지 못하는 랜덤화된 파아지 라이브러리로부터의 선택에 의존하는 접근법들에 대한 대체적 접근법으로부터 이점이 있을 것이다.
- [0028] 따라서, IgG1 불변 영역 작용성의 존재가 생체 내의 향상된 혈청 안정성을 제공함에도 불구하고, IgA 불변 영역 작용성의 포함은 항원에 대한 개선된 점액성 기능을 제공할 것이다(Leher, (1999) Exp. Eye. Res., 69, 75-84).
- [0029] 중쇄 C_H2 와 C_H3 불변 영역의 존재는 천연 항체에서 보여지는 바와 같이 안정한 이합체화를 위한 기초를 제공하고, 번역 후 당화를 위한 인식 부위를 제공한다. 또한, C_H2 와 C_H3 의 존재는 이특이적인 다가의 복합체가 시약과 진단시약으로 사용될 때, 2차 항체 인식을 가능하게 한다.

[0030] 분리되고, 전-재배치(pre-rearrangement)된 카멜리드 중쇄만의 가변 영역 서열은 힌지 영역 및 인간 IgG1 이펙터 영역의 앞에 먼저 클로닝되고, 벡터 내로 삽입되고, COS 세포에서 발현되어 항체를 생산한다. 이러한 시험관 내(in vitro) 환경에서 발현되는 항체는 이미 낙타의 생체 내 클래스(이소타입) 스위칭(switching)와 친화도 성숙의 과정을 겪었고, 항원에 결합할 수 있다(Riechmann과 Muylldermans, (1999) J. Immunol. Methods, 231, 25-38).

[0031] 본 기술 분야에서는 중쇄만의 항체 다양성과 생체 내에서의 B 세포 반응을 최대화하고, 특히 작용적 레퍼토리의 군 특이적 인간 중쇄만의 항체와 다양한 임상적, 산업적 및 연구용으로 사용되는 최대의 항원 결합 잠재력을 보유하는 작용적 V_H 중쇄만의 결합 영역을 생산하는 것이 요구된다.

[0032] 또한, 본 기술 분야에서는 항체 중쇄 단독 또는 생리학적으로 안정하고, 이펙터 작용을 가지는 이펙터 (경)쇄와의 조합의 적어도 일부분을 포함하는 가용성, 2가 또는 다가 폴리펩티드 결합 복합체를 생산하는 것이 요구된다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0033] **발명의 개요**

[0034] 본 발명은 형질전환 포유동물에서 이형 V_H 또는 카멜리드 $V_H(V_{Hm})$ 중쇄 유전자좌를 발현하는 단계를 포함하며, 상기 V_H 또는 카멜리드 $V_H(V_{Hm})$ 중쇄 유전자좌는 C_{H1} 영역을 코딩하지 않는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 유전자좌는, 발현될 때, 특정 군(class) 또는 군들의 중쇄만의 항체를 형성할 수 있는 것인, 형질전환 동물에서 V_H 중쇄만의 항체 또는 카멜리드 $V_H(V_{Hm})$ 중쇄만의 항체의 생산 방법을 제공한다.

[0035] 상기 V_H 또는 카멜리드 $V_H(V_{Hm})$ 중쇄 유전자좌는 하나 이상의 카멜리드 또는 비카멜리드 V 유전자 단편을 포함할 수 있다. 바람직하게, V 유전자 단편은 개선된 용해성 특성을 나타내는 것으로 선별되거나 설계된다. 바람직하게, V 유전자 단편은 인간 유래이다.

[0036] 중쇄 유전자좌의 중쇄 불변 영역은 $Ca1$ 및/또는 $Ca2$, $C\epsilon$, $C\delta$, $C\gamma$ 및/또는 $C\mu$ 중쇄 불변 영역 유전자를 포함할 수 있다. 나아가, 중쇄 유전자좌의 중쇄 불변 영역은 $Ca1$, $Ca2$, $C\epsilon$, $C\delta$, $C\gamma$, $C\mu$ 중쇄 불변 영역의 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0037] 바람직하게, V_H 중쇄 유전자좌는 적어도 한 인간 또는 카멜리드 V 유전자 단편, 적어도 한 D 단편 및 적어도 한 J 단편을 포함하는 가변 영역을 포함하고, 인간 또는 카멜리드 V 유전자 단편, D 유전자 단편 및 J 유전자 단편은 VDJ 코딩 서열을 형성하기 위하여 재조합될 수 있다. 바람직하게, 중쇄 유전자좌는 20개 이상의 D 유전자 단편 및/또는 5개 이상의 J 유전자 단편을 포함한다. 바람직하게, D 및 J 단편은 척추동물 기원이고, 보다 바람직하게는 인간 기원이다. CDR3 고리는 어떠한 척추동물 유래의 D 및 J 유전자 단편을 사용하여 유래될 수 있고, 바람직하게는 인간 D 및 J 유전자 단편이다.

[0038] 또한, V_H 중쇄 유전자좌는 중쇄 불변 영역 유전자와 직접적으로 J 유전자 단편이 재조합할 수 있는 재조합 서열 (rss)을 포함할 수 있다.

[0039] 이형 중쇄 유전자좌의 중쇄 불변 영역은 인간 기원 또는 척추동물 기원, 예를 들어 카멜리드 기원이다. 택일적으로, 불변 영역은 면역글로불린 중쇄 기원일 수 있다.

[0040] 바람직하게, 본 발명의 방법은 필수적으로 정상 B 세포 성숙을 초래한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 얻거나, 얻어질 수 있는 중쇄만의 항체 또는 이들의 단편 또는 중쇄만의 항체군의 혼합물을 제공한다. 이러한 중쇄만의 항체는 단일클론항체 또는 인간 또는 카멜리드 V_H 결합 영역과 같은 이들의 단편일 수 있다. 본 발명의 V_H 결합 영역은 연장된 유사 카멜리드 CDR3 고리를 결핍할 수 있거나, 택일적으로 연장된 유사 카멜리드 CDR3 고리를 포함할 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 본 발명의 이형 중쇄 유전자좌를 포함하는 벡터와 상기 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0042] 또한, 본 발명은 본 발명에서 설명된 이형 중쇄 유전자좌를 발현하는 형질전환 포유동물을 제공한다. 바람직하

게, 본 발명의 포유동물은 경쇄를 포함하는 항체를 생산하는 능력이 감소된다.

[0043] 또한, 본 발명은 면역 치료용 의약의 제조에서 본 발명에 따른 중쇄만의 항체 또는 이들의 단편의 사용을 제공한다. 또한, 본 발명의 중쇄만의 항체는 진단제, 시약, 항체효소 또는 저해제로서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 중쇄만의 항체 또는 이들의 단편 및 생리학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0044] 또한, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 중쇄만의 항체의 생산 및 선별 방법을 제공한다:

[0045] (a) 항원을 본 발명에서 설명된 형질전환 포유동물에 주입하는 단계;

[0046] (b) 목적하는 항원 특이적인 중쇄만의 항체를 발현하는 세포 또는 조직을 분리하는 단계;

[0047] (c) 단계 (b)의 세포 또는 조직으로부터 하이브리도마(hybridoma)를 생산하는 단계;

[0048] (d) 포유류, 식물류, 곤충류, 미생물, 균류 또는 대체 시스템과 같은 이중 발현 시스템에서의 생산을 위해 상기 하이브리도마로부터 중쇄만의 항체 mRNA를 선택적으로 클로닝하는 단계;

[0049] 다음으로, V_H 결합 영역은 단계 (c)의 클로닝된 mRNA로부터 항원 특이적 V_H 영역을 확인 및 분리하여 생산될 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명의 V_H 결합 영역은 다음의 단계에 의하여 생산될 수 있다:

[0051] (a) 항원을 본 발명에서 설명된 형질전환 포유동물에 주입하는 단계;

[0052] (b) 목적하는 항원 특이적인 중쇄만의 항체를 발현하는 세포 또는 조직을 분리하는 단계;

[0053] (c) 분리된 세포 또는 조직으로부터 유래된 mRNA로부터 V_H 유전자좌를 클로닝하는 단계;

[0054] (d) 파아지 또는 유사한 라이브러리를 사용하여 코딩된 단백질을 디스플레이하는 단계;

[0055] (e) 항원 특이적 V_H 영역(들)을 동정하는 단계; 및

[0056] (f) 세균류, 효모 또는 대체 시스템에서 V_H 영역(들)을 단독 또는 융합 단백질로서 발현시키는 단계.

[0057] **발명의 상세한 설명**

[0058] 본 발명의 발명자들은 종래 기술의 한계를 극복하였고, 형질전환 동물, 특히 마우스는 플라즈마(plasma) 또는 B 세포에 의하여 분비되는 군 특이적 중쇄만의 항체 또는 중쇄만의 항체의 다른 군들의 혼합물을 생산하기 위한 "마이크로 유전자좌(micro loci)"를 사용하여 생산될 수 있음을 보였다. 다음으로, 이러한 것들은 확립된 하이브리도마 기술을 사용하여 군 특이적 중쇄만의 항체의 안정된 공급을 제공하거나, 또는 작용적 카멜리드 $V_H(V_{HH})$ 결합 영역 또는 V_H 중쇄만의 결합 영역, 바람직하게는 이펙터 기능이 없지만, 결합 기능을 보유하는 인간 기원의 가용성 V_H 중쇄만의 결합 영역의 소스(source)로서 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명의 방법에 의하여 생산될 수 있는 (카멜리드 항체를 포함한) 중쇄만의 항체는 일반적으로 거대화된 CDR3 고리의 부재에서 V, D 및 J 유전자 단편 재배열과 체세포성 변이로부터의 결과인 높은 결합 친화도를 나타낸다. 필수적으로, 정상 B 세포 성숙은 (C_H1 영역이 재조합 유전자좌에 존재하는 모든 항체군들로부터 제거되었다는 조건하에) 분리된 플라즈마에 높은 수준의 중쇄만의 항체가 존재하는 것으로 관찰된다. B 세포 성숙과 어셈블리된 이합체(예를 들어, IgG) 또는 다합체(예를 들어, IgM)의 분비는 경쇄 유전자의 존재 또는 발현에 의존하지 않는다.

[0060] 형질전환 마우스 유래의 하이브리도마로부터 분리된 항원 특이적 중쇄를 코딩하는 항원 특이적 mRNA의 뉴클레오티드 서열 분석은, 중쇄 항체 다양성은 VDJ 재조합의 기본적인 작용이라는 것을 보여주었다. 나아가, 본 발명은, 항체 다양성은, V_H 영역에서의 체세포성 변이로부터 기인되는 것은 제한적이고, 중쇄만의 항체의 작용적 항원 결합 영역의 CDR3 영역에서 생성된다는 것을 보여주었다. 본 발명에서 설명된 방법을 사용하면, 작용적 V_H 영역은 항원 결합, 특이성 및 친화도를 완전하게 보유하는 V_H 결합 영역을 생산하는 세균 시스템에서 클로닝되고, 발현될 수 있다. 추가적으로, 군 특이적 중쇄 이합체 및 다합체는 하이브리도마 세포주 배양에 의하여 분비될 수 있다.

- [0061] 또한, 본 발명은, 형질전환 마우스는 항원 노출에 반응하여 바람직한 군의 중쇄만의 항체, 예를 들어, 단독 IgM 에 반대되는 것으로서의 단독 IgG 또는 예를 들어 IgA, IgG 및 IgM의 혼합물을 생산하도록 프로그램될 수 있다는 것을 보여준다.
- [0062] 이전에, 본 발명의 발명자들은 C_H1 엑손이 결핍되고, 인간 D 및 J 단편에 의해 두 개의 라마(Llama) V_H 유전자와 연결된 최소 인간 IgG 중쇄 불변 영역 유전자좌를 발현하는 형질전환 마우스의 생산을 설명하였다 (W002/085945 및 W002/085944). 이러한 것들은 항원에 노출되었을 때, 작용적 고 친화성 항원 특이적 IgG 중쇄만의 항체를 생산한다. 중쇄만의 항체군(IgM과 IgG)의 혼합물은 (모든 불변 영역 유전자는 C_H1 영역과 C_H4 영역이 결핍되어 있다는 조건하에) 일렬(tandem)로 중쇄 불변 영역에 통합된 유전자 구조물의 이용을 통하여 생체 내에서 클래스 스위칭하므로써 얻어질 수 있다.
- [0063] 또한, 본 발명에서 설명된 방법은, 인간 D 및 J 단편에 의해 2개의 라마 V_H 유전자와 연결된 동일한 IgG 불변 영역 유전자좌와, 동일한 인간 D 및 J 유전자 단편에 의해 2개의 라마 V_H 유전자와 연결된 C_H1 엑손이 결핍된 인간 IgM 불변 영역 유전자좌로 구축된 마우스가 높은 분자량 (다량체) IgM 중쇄만의 항체와 IgG (이합체) 중쇄만의 항체를 생산할 수 있다는 것을 보여주었다. 놀랍게도, 정상 B 세포 숙성과 항체 생산은 형질전환 유전자좌에 존재하는 각각의 중쇄 불변 영역으로부터의 C_H1 서열의 완전한 부재에 의존한다. 그러나, 만약 존재하더라도, C_H4 엑손의 제거를 요구하지는 않는다.
- [0064] 따라서, 예를 들어 동일한 인간 D 및 J 유전자 단편에 의하여 2개의 라마 V 유전자 단편과 연결된 작용적 C_H1 엑손을 갖는 인간 IgM 중쇄 유전자좌와, 동일한 인간 D 및 J 유전자 단편에 의하여 2개의 라마 V 유전자 단편과 연결된 C_H1 엑손이 결핍된 IgG 불변 중쇄 영역 유전자좌를 가지는 형질전환 동물은 매우 낮은 수준의 중쇄만의 항체를 생산하고, B 세포 숙성에 대한 증거가 없음을 보여준다.
- [0065] C_H4 영역을 포함하는 다른 이펙터 영역은, 이펙터 특징의 결과의 중쇄만의 항체로 통합되거나, 통합되지 않을 수 있고, 또는 원한다면, 결과의 중쇄만의 항체에 도입되거나, 제거될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 발명자들은, 항체의 효율적인 발현(즉, B 세포 성숙)은 구조 내에 존재하는 어떠한 V 유전자 단편의 사용으로부터 결과될 수 있다. B 세포 유래의 항체 mRNA의 분리 및 서열 결정은, D 및 J 유전자 단편 재조합은 CDR3 다양성을 생성하기 위하여 발생한다는 것을 보여준다. 결과의 V_H 영역의 서열 비교는, 친화성 성숙 과정은 재조합된 D 및 J 유전자 단편과 또한, 결과의 발현된 항체 mRNA의 V_H 영역에서 발생하였음을 나타내는 체세포 변이를 암시한다.
- [0067] 바람직한 구조물은 개선된 용해성을 위하여 선택되거나, 설계된 V 유전자 단편을 통합하고, 재조합과 CDR3 생산을 위한 D 및 J쇄 군집(cluster)에 연결된다. 바람직하게, VDJ 서열은 C_H1 엑손이 각각 결핍되어 일렬로 선택된 불변 이펙터 영역(들)에 연결된다.
- [0068] 본 발명은 인간 또는 카멜리드 군 특이적 중쇄만의 항체 또는 인간 V_H 결합 영역 (바람직하게는, 가용성 V_H 결합 영역) (단독 또는 선택된 이펙터 영역에 연결된) 인간 V_H 결합 영역의 유도 및 생산에 한정되는 것은 아니며, D와 J 유전자 단편에 연결된 (추가적으로 용해성 특성을 개선시키기 위하여 설계된) 척추동물 기원의 어떠한 V 유전자 단편의 키메릭성 조합물의 생산을 포함한다. 바람직하게, V 유전자 단편은 인간 기원이고, 카멜리드 유래의 V 유전자 단편이 아니다. 결과의 V_H 영역은, D 및 J 단편이 카멜리드로부터 유래되지 않는다면, 확장된 카멜리드 유사 CDR3 고리를 포함하지 않을 수 있다. 이것은 이펙터 불변 영역에 작동가능하게 연결된, CDR3 다양성과 친화도 성숙을 발현하는 V_H 영역을 생산한다. 후자는 선택된 부모 형질전환 척추동물에서의 작용적 분비 및 선택적인 어셈블리를 보장하고, 또한, 이것이 요구되는 순차적인 선택가능한 이펙터 작용을 제공한다.
- [0069] 이러한 관찰은, 군 특이적 중쇄만의 항체의 개선되고, 간소화된 설계와 체세포 변이를 통한 친화도 성숙을 통합하는 고 친화성 가용성 V_H 영역의 유도에 대한 중요한 암시를 보여준다. 선택된 중쇄 불변 영역 이펙터 작용물 (C_H1의 결핍) 또는 이들의 혼합물의 통합은 추가적인 항체 설계의 요구 없이 어떠한 클래스의 중쇄만의 항체 또는 중쇄만의 항체의 어떠한 혼합물의 생산을 가능하게 한다. V_H 영역은 세균 또는 다른 미생물 시스템에서 단독 또는 하이브리도마 또는 형질전환 세포 배양에 의하여 분비된 이펙터 영역을 통합한 작용적 중쇄만의 항체로서

발현될 수 있다. 인간 기원의 항체와 V_H 결합 영역은 농업, 환경 및 산업적 적용과 더불어 의학, 진단제 및 시약으로서의 보건 분야에서 광범위하게 적용된다.

[0070] 따라서, 본 발명의 제1의 관점은, 형질전환 포유동물에서 이형 V_H 중쇄 유전자좌를 발현하는 단계를 포함하는, 형질전환 포유동물에서 V_H 중쇄만의 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 바람직하게, V_H 중쇄 유전자좌는 C_H1 영역을 코딩하지 않는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 유전자좌는 발현될 때, 다양한 레퍼토리의 완전한 중쇄만의 항체를 형성할 수 있다.

[0071] 또한, 본 발명의 제1의 관점은, 형질전환 포유동물에서 카멜리드 V_H 중쇄 유전자좌를 발현하는 단계를 포함하며, 상기 V_H 중쇄 유전자좌는 C_H1 영역을 코딩하지 않는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 유전자좌는 발현될 때, 항원 노출에 반응하여 VDJ 재배열 및 친화도 성숙을 통합하는 다양한 레퍼토리의 완전한 중쇄만의 항체를 형성할 수 있는, 형질전환 포유동물에서 카멜리드 V_H 중쇄만의 항체의 생산 방법을 제공한다.

[0072] 중쇄 이펙터 분자들은 작용적 영역, 예를 들어 C-말단 C_H4 영역이 없는 것으로 설계될 수 있고, 상기 설계는 분비 메커니즘에 영향을 주지 않고, 세포 표면 어셈블리를 막아 B 세포 성숙을 방지한다. C_H1 엑손 단독은 이형 유전자좌로부터 결실되어, 상기 유전자좌에 부재이다. 예를 들어, 당화를 개선하거나, 기능을 추가하는 추가적인 특징이 유전자좌 내로 설계될 수 있다.

[0073] 바람직하게 이형 유전자좌는, 발현될 때, 작용적 IgA, IgE, IgG, IgD 또는 IgM 분자 또는 이들의 이소타입을 형성할 수 있다. 또한, 개별적 항체군들 또는 항체군들의 혼합물 또는 이들의 이소타입이 생산될 수 있다.

[0074] 따라서, 이형 중쇄 유전자좌는 필수적으로 정상적인 B 세포 성숙과 함께, 요구되는 항체군(들)에 의존하는 중쇄만의 항체의 바람직한 군들 또는 이들의 혼합물을 생산하기 위하여 설계된다. 카멜리드 V, D 및 J 유전자 단편과 카멜리드 이펙터 영역의 사용은 확장된 CDR3 고리와 같은 카멜리드에 특징적인 특징을 갖는 카멜리드 항체를 생산할 것이다. 향상된 용해성을 위하여 무작위로 선별되거나, 선별되거나, 설계된 V 유전자 단편을 포함하는 인간 V, D 및 J 유전자 단편의 사용은 작용적 인간 중쇄만의 항체를 생산할 것이다.

[0075] 본 발명에 따라 얻어진 항체는 종래 방법에 의하여 얻어진 것보다 나은 이점을 가지는데, 이들은 실질적으로 어떠한 단일 또는 공지된 군이고, 바람직하게는 인간 기원이다. 항체는 생체 내 VDJ 재조합 및 친화도 성숙으로부터 결과된 고 친화성이다. 항체와 이들의 단편은 당 분야에서 공지된 방법을 사용하여 분리되고, 특징화되고, 제조될 수 있다.

[0076] **이형 중쇄 유전자좌**

[0077] 본 발명에 있어서, 용어 "이형(heterologous)"은 본 발명에서 설명되는 뉴클레오티드 또는 유전자좌가 그것이 위치하는 장소가 포유동물에 내생적이지 않은 것을 의미한다.

[0078] 본 발명의 " V_H 중쇄 유전자좌"는 (C_H1 영역이 각각 결핍된) 하나 이상의 중쇄 이펙터 영역에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 V 유전자, 하나 이상의 D 유전자 및 하나 이상의 J 유전자를 포함하는 V_H 영역을 코딩하는 최소 마이크로-유전자좌와 관련된다. 바람직하게, 항체 레퍼토리 다양성의 1차적 소스는 V-D와 D-J 연결에 의한 D와 J 유전자 단편의 선별에 의하여 형성되는 CDR3 영역이다.

[0079] 본 발명의 이점은, 재배열된 V_H 유전자 서열로 얻어지는 항체 레퍼토리와 다양성은 복수의 D와 J 유전자 단편들의 사용을 통하여 최대화될 수 있다는 것이다. 다수의 V 유전자 단편 또는 V_L 과 L_C (경쇄) 면역글로불린 유전자좌에 대한 필요성이 없이 최소 유전자좌(마이크로-유전자좌)를 사용함에도 불구하고 순차적인 체세포 변이가 달성될 수 있다.

[0080] 바람직하게, V_H 중쇄 유전자좌는 어떠한 척추동물 중 유래의 2개 내지 5개(2, 3, 4 또는 5개)의 V 유전자 단편들을 포함한다.

[0081] 바람직하게, 상기 V 유전자 단편은 개선된 용해성을 위하여 선택적으로 선별되거나, 설계된 인간 기원이다.

[0082] 바람직하게, V_H 중쇄 유전자좌는 2개 내지 40개(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30 또는 40개) 이상의 D 유전자 단편을 포함한다. 상기 D 유전자 단편은 어떠한 척추동물 중으로부터 유래될 수 있지만,

바람직하게 상기 D 유전자 단편은 인간 D 유전자 단편(정상적으로 25개의 작용적 D 유전자 단편)이다.

- [0083] 바람직하게, V_H 중쇄 유전자좌는 2개 내지 20개(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 또는 20개) 이상의 J 유전자 단편을 포함한다. 상기 J 유전자 단편은 어떠한 척추동물 종으로부터 유래될 수 있지만, 바람직하게 상기 J 유전자 단편은 인간 J 유전자 단편(정상적으로 6개의 J 유전자 단편)이다.
- [0084] 바람직하게, V_H 중쇄 유전자좌는 2개 이상의 V 유전자 단편, 25개의 작용적 인간 D 유전자 단편 및 6개의 인간 J 유전자 단편을 포함한다.
- [0085] 용어 "V 유전자 단편(segment)"은 용해성과 같은 개선된 특징을 위하여 임의적으로 선별되거나, 변이화되거나, 또는 설계된 카멜리드와 인간을 포함하는 척추동물 유래의 자연적으로 발생하는 V 유전자 단편을 포함한다. 또한, V 유전자 단편은 상어와 같은 다른 종에서 발견되거나(Kokubu 등, (1988) *EMBO. J.*, 7, 3413-3422), 예를 들어 번역글로불린 경쇄 V_L 레퍼토리 또는 T 세포 수용체 V_H 레퍼토리에서 예시되는 결합 단백질의 분화된 V_H 유사 패밀리를 제공하기 위하여 진화되었다.
- [0086] V_H 영역의 용해성을 개선시키기 위한 바람직한 방법은 단지 랜덤한 수단과는 상반되는 합리적인 수단을 도입하며, Davies와 Reichmann, (1996) *Protein Eng.*, 9 (6), 531-537 및 Riechmann과 Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38에 예시되어 있다. 또한, 자연적 선택은 친화도 성숙과 V_H 유전자의 바람직한 변이의 통합 및 그에 이은 VDJ 재배열을 통하여 생체 내에서 발생할 수 있다.
- [0087] V 유전자 단편은, 핵산이 발현될 때, V_H 중쇄만의 항체를 생산하기 위한 본 발명에 따른 D 유전자 단편, J 유전자 단편 및 (몇몇 엑손을 포함하지만, C_H1 엑손이 배제된) 중쇄 불변 (이펙터) 영역과 재조합할 수 있어야 한다.
- [0088] 또한, 본 발명에 따른 V 유전자 단편은 그것의 범위 내의 상동물(homologue), 유도물(derivative) 또는 단백질 단편을 코딩하는 어떠한 유전자 서열을 포함하며, 본 발명에서 정의된 바와 같은 중쇄만의 항체를 생산하기 위한 본 발명에 따른 D 유전자 단편, J 유전자 단편 및 (하나 이상의 엑손을 포함하지만, C_H1 엑손이 배제된) 중쇄 불변 (이펙터) 영역과 재조합할 수 있어야 한다.
- [0089] 따라서, V_H 코딩 서열은 자연적으로 발생하는 소스로부터 유래할 수 있거나, 그들은 당 분야에서 통상적인 지식을 가진 자에게 공지된 방법을 사용하여 합성될 수 있다.
- [0090] 본 발명의 " V_H 영역"은, 상기 정의된 바와 같이, D 유전자 단편과 J 유전자 단편으로 재조합되었을 때, V 유전자 단편의 발현 산물을 나타낸다. 바람직하게, 본 발명에서 사용되는 것으로서 V_H 영역은 용액 내에 존재하고, 용해성을 유지하기 위하여 어떠한 다른 인자가 필요 없는 생리학적 배지에서 활성이 있다. 바람직하게, 항원에 결합하기 위한 가용성 V_H 영역의 능력은 VDJ 재조합과 체세포 변이에 의하여 개선되었다. 카멜리드 중에 특별한 확장된 CDR3 고리의 존재 또는 부재에는 영향받지 않는다. V_H 영역은 단량체로서 항원에 결합할 수 있고, 이펙터 불변 영역과 결합되었을 때, 사용된 이펙터 분자 (예를 들어, IgG, IgA, IgM 등)의 선택 및 설계 또는 이합체화 및 다합체화의 택일적 메카니즘에 의존한 모노-특이적, 이-특이적, 다중-특이적 2가 또는 다가 형태로 생산될 수 있다. 가용성 중쇄만의 항체 복합체의 부분으로서 발현될 때, V_L 영역과 결합할 가능성은 C_H1 엑손의 제거에 의하여 배제되었다(Sitia 등, (1990) *Cell*, 60, 781-790). 또한, V_H 영역 단독은 표적 치료 및 진단 목적을 위한 융합 단백질을 생산하기 위한 다양한 단백질 영역, 예를 들어 독신(toxin), 효소 및 영상제(imaging agent)로 설계될 수 있다.
- [0091] 본 발명에 있어서, 용어 "D 유전자 단편"과 "J 유전자 단편"은 자연적으로 발생하는 D 및 J 유전자 단편을 포함한다. 바람직하게, D와 J 유전자 단편은 동일한 척추동물 유래이며, 그것으로부터 V 유전자 단편이 유래되었다. 예를 들어, 만약 V 유전자 단편이 인간 유래이고, 용해되거나, 설계된다면, D 및 J 유전자 단편 또한 인간 유래인 것이 바람직하다. 택일적으로, V 유전자 단편이 예를 들어, 낙타로부터 유래될 수 있고, 역으로 D 및 J 유전자 단편은 인간 유래일 수 있다.
- [0092] 또한, 용어 D 유전자 단편과 J 유전자 단편은, 결과의 단편이 본 발명에서 설명되는 것과 같은 중쇄만의 항체를 생산하기 위하여 본 발명에서 설명되는 것과 같은 나머지 구성요소와 재결합할 수 있는 한, 그들의 범위 내의 유도체, 상동물 및 이들의 단편을 포함한다. D와 J 유전자 단편은 자연적으로 발생하는 소스로부터 유래될 수

있고, 이들은 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 공지되고, 본 발명에서 설명된 방법을 사용하여 합성될 수 있다. V, D 및 J 유전자 단편은 재조합할 수 있고, 바람직하게는 체세포 변이를 수행할 수 있다.

[0093] V, D 및 J 유전자 단편은 바람직하게 단일의 척추동물 종으로부터 유래된다. 이것은 어떠한 척추동물 종일 수 있으며, 바람직하게는 인간이다.

[0094] 추가적으로, 본 발명에 따른 이형 중쇄 유전자좌는 생체 내에서 이펙터 작용을 제공하는 중쇄 불변 영역을 코딩하는 DNA의 영역을 포함한다(예를 들어, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD 또는 이들의 이소타입).

[0095] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 의하여 얻어지거나, 얻어질 수 있는 항원 특이적 중쇄만의 항체를 제공한다.

[0096] **중쇄 불변 영역**

[0097] 작동가능하게, 중쇄 불변 영역은 B 세포에서 V 유전자 단편, D 유전자 단편 및 J 유전자 단편과 재조합할 수 있는 자연적으로 발생하거나, 설계된 유전자 단편으로 코딩된다. 바람직하게, 중쇄 불변 영역은 면역글로불린 유전자좌 유래이다.

[0098] 본 발명의 이러한 관점에 따르면, 각각의 중쇄 불변 영역은 작용적 C_H1 영역 없이 발현되어, 중쇄만의 항체를 생산할 수 있는 적어도 한 중쇄 불변 영역 유전자를 필수적으로 포함한다. 또한, 각각의 중쇄 불변 영역은 하나 이상의 추가적인 중쇄 불변 영역 엑손을 포함하고, 상기 추가적인 중쇄 불변 영역 유전자는 또한 작용적 C_H1 영역을 발현하지 않는다는 조건하에, 상기 중쇄 불변 영역은 C_δ, C_γ₁₋₄, C_μ, C_ε 및 C_α₁₋₂로 구성되는 군으로부터 선택된다. 중쇄 불변 영역 유전자 단편은 바람직한 항체 클래스 또는 요구되는 항체 클래스의 혼합물에 의존하여 선별된다. 선택적으로, 이형 중쇄 유전자좌는 C_μ- 및 C_δ-결핍이다.

[0099] 예를 들어, 클래스 M의 Ig 분자는 마크로파지와 보체 경로의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그것의 결합 위치의 밀접한 근접성 때문에, IgM은 바이러스를 포함하는 병원체에 대한 높은 결합력을 가진다. 그러나, 클래스 G의 Ig는 빠른 면역검정 기술을 쉽게 사용할 수 있는데 반하여, IgM은 이러한 기술의 사용이 어려운 것으로 알려져 있다. 이러한 용도에 따라, 바람직한 항체 클래스, 즉 IgG 또는 IgM을 선택하는 것이 유용할 수 있다.

[0100] C_H1 결핍 이형 중쇄 C_γ 유전자좌의 전체 또는 부분적 발현은 이형 IgG 유전자좌 내에 존재하는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 이소타입에 따라 약간의 또는 모든 IgG 이소타입을 선택적으로 생산할 것이다. 택일적으로 중쇄는 C_ε 유전자를 포함한다. 또한, 결과의 IgE 분자는 치료에 사용될 수 있다.

[0101] 택일적으로, 선택된 항체의 혼합물이 얻어질 수 있다. 예를 들어, IgA와 IgM은 중쇄 불변 영역이 C_α와 C_μ 유전자를 포함할 때, 얻어질 수 있다.

[0102] 바람직하게, 본 발명에 따른 중쇄 불변 영역은, 특히 중쇄 항체가 인간 치료에 적용되는 것으로 사용될 때 인간 기원이다. 중쇄 항체가 진단 또는 수의학적 목적으로 사용되는 경우, 중쇄 불변 영역은 진단 또는 수의학적 치료가 수행되는 표적 생물, 즉 척추동물 또는 포유동물 유래인 것이 바람직하다.

[0103] 발현되었을 때, 중쇄 불변 영역은 작용적 C_H1 영역을 결핍한다. C_H1 엑손과 선택적으로 C_μ와 C_δ 불변 영역은 변이, 결실 또는 치환될 수 있다. 예를 들어, 작용적 C_H1 영역을 가진 IgM의 존재는 B 세포 성숙을 저해하고, 결과적으로 B 세포 성숙이 저해되므로써, 동일한 유전자좌 내의 (C_H1 결핍) 중쇄만의 IgG의 생산을 위한 발현은 제한된다.

[0104] 본 발명에서 정의된 것으로 "중쇄 불변 영역 엑손(C_H 엑손)"은 자연적으로 발생하는 척추동물의 서열, 특히 포유동물 C_H 엑손을 포함한다. 이것은 클래스 특이적 방식으로 다양하다. 또한, 용어 "C_H 엑손"은 그것이 중쇄 불변 영역의 구성요소일 때, C_H 엑손이 본 발명에서 정의된 것과 같은 작용적 중쇄만의 항체를 형성하는 것이 가능한 한 그것의 범위 내의 유도체, 상동물 및 이들의 단편을 포함한다.

[0105] 선택적으로, 존재하는 경우, C_H4 또는 다른 작용적 영역은 세포 내 분비 과정, B 세포 성숙 또는 결과의 항체 펩티드의 결합능을 저해하지 않는 범위 내에서 형질전환유전자 내로 설계되거나, 결실될 수 있다.

[0106] **포유동물**

- [0107] 본 발명의 방법에서 사용된 형질전환 포유동물은 인간이 아니다. 포유동물은 바람직하게, 토끼, 돼지, 쥐 또는 마우스와 같은 설치류이다. 또한, 태일적으로, 염소, 양, 고양이, 개 또는 다른 동물과 같은 포유동물이 적용될 수 있다.
- [0108] 바람직한 형질전환 동물은 확립된 난세포 주입 기술과 ES 세포 기술 또는 클로닝을 사용하여 작출된다.
- [0109] 유리하게, 포유동물에 내생적인 면역글로불린 중쇄 유전자좌 및 선택적으로 경쇄 유전자좌는, 본 발명의 방법에 따라, 중쇄만의 항체가 발현될 때, 결실 또는 사일런스(silence)된다.
- [0110] 위에서 설명된 것과 같은 중쇄만의 항체를 생산하는 이러한 접근법은, 특히 항체 소스와는 다른 기원인 척추동물 중에 대한 항체 투여가 이러한 투여된 항체에 대항하여 면역 반응을 일으키는 결과와 같은, 인간 치료용 항체 생산에 사용될 수 있다.
- [0111] 따라서, 본 발명의 추가적인 관점은 본 발명에 따른 이형 중쇄 유전자좌를 발현하는 형질전환 포유동물을 제공하는 것이다.
- [0112] 형질전환 포유동물은 경쇄를 포함하는 항체를 생산하는데 있어서 감소된 능력을 가지는 것으로 설계될 수 있다.
- [0113] 항체 생산 세포는 본 발명에 따른 형질전환 동물로부터 유래될 수 있고, 예를 들어 본 발명에서 정의된 것과 같은 중쇄만의 항체의 생산을 위한 하이브리도마를 제조하여 사용될 수 있다. 추가적 또는 태일적으로, 핵산 서열은 본 발명에 따른 형질전환 포유동물로부터 분리될 수 있고, 당분야에서 통상의 지식을 가진 자에 공지된 재조합 DNA 기술을 사용하여 V_H 영역 중쇄만의 항체 또는 이들의 이특이적/이작용적 복합체를 생산하기 위해 사용될 수 있다.
- [0114] 태일적 또는 추가적으로, 항원 특이적 중쇄만의 항체는 본 발명에 따른 형질전환 동물의 면역화에 의하여 생산될 수 있다.
- [0115] 따라서, 본 발명의 더 나아간 관점은 본 발명에 따른 형질전환 포유동물을 항원으로 면역화하여 중쇄만의 항체를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0116] 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 포유동물은 마우스이다.
- [0117] **중쇄만의 항체 및 이들의 단편**
- [0118] 본 발명의 더 나아간 관점은 본 발명의 방법에 따라 얻어질 수 있는 중쇄만의 항체와 작용적 단편 및 이들의 유도체를 제공하는 것이다. V_H 결합 영역을 포함하는 단편은, 본 발명의 경쇄를 결핍한 중쇄만의 항체의 효소적 절단 또는 시아노젠 브로마이드 절단으로 유도될 수 있다(Jaton 등, (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195).
- [0119] 바람직한 작용적 단편은, 체세포 변이에 의하여 순차적으로 발생하는 단일의 V, D 및 J 유전자 단편 사이의 재조합의 결과로서 V_H 유전자좌에 의하여 발현되는 것과 같은 항원 특이적 중쇄만의 결합 영역, 즉 V_H 결합 영역이다. 본 발명의 이러한 관점에 따르면, V_H 유전자좌는, 예를 들어 상기 설명된 바와 같은 면역화된 형질전환 동물의 항체 생산 세포로부터 분리된 mRNA로부터 클로닝될 수 있다. 다음으로, 클로닝된 서열은 파이지(Ward 등, (1989) *Nature*, 341, 544-546) 또는 유사한 디스플레이 라이브러리, 예를 들어 효모를 이용한 시스템(Boder와 Wittrup, (1997) *Nat. Biotechnol.*, 15, 553-7)을 사용하여 디스플레이되고, 항원 특이적 V_H 결합 영역이 동정된다. 다음으로, 항원 특이적 중쇄 결합 영역은 조작가능한 세균, 효모 또는 대체적 발현 시스템에서 단독 또는 융합 단백질로서 제조될 수 있다. 또한, V_H 결합 영역을 코딩하는 서열은 면역화된 형질전환 마우스로부터 종래의 방법에 의하여 유도된 특징적인 하이브리도마로부터 클로닝될 수 있다. 다음으로 이러한 것들은 다른 이펙터 기능을 가진 특정된 항체 클래스(예를 들어, IgE 또는 IgA)와 이들의 변종의 설계를 포함하는 V_H 결합 영역과 이들의 유도체의 생산을 위하여 사용될 수 있다.
- [0120] 따라서, 또한 본 발명은 다음의 단계들을 포함하는 V_H 결합 영역을 생산하는 방법을 제공한다:
- [0121] a) 목적하는 항원 특이적 중쇄만의 항체 (바람직하게는, 가용성 항원 특이적 중쇄만의 항체)를 발현하는 세포 또는 조직을 분리하는 단계;
- [0122] b) 상기 분리된 세포 또는 조직으로부터 유래된 mRNA로부터 V_H 결합 영역을 코딩하는 서열을 클로닝하는 단계;

- [0123] c) 파아지 또는 유사한 라이브리리를 사용하여 코딩된 단백질을 디스플레이하는 단계;
- [0124] d) 항원 특이적 V_H 결합 영역을 확인하는 단계; 및
- [0125] e) 세균, 효모, 포유동물 또는 태일적 발현 시스템에서 V_H 결합 영역 또는 융합 단백질을 발현시키는 단계.
- [0126] 태일적으로, V_H 영역 포함 단편은 효소적 또는 화학적 절단 기술을 사용하여 본 발명의 중쇄만의 항체로부터 생산될 수 있고, 나머지 절단 산물로부터 V_H 영역 포함 단편의 순차적인 분리로부터 생산될 수 있다.
- [0127] V_H 결합 영역이 특성화된 하이브리도마로부터 분리되는 경우, mRNA로부터 유래된 클로닝된 V_H 결합 영역은 파아지 및 다른 디스플레이 시스템을 사용하는 추가적인 선별단계를 반복함이 없이 발현 벡터 내로 직접적으로 클로닝될 수 있다.
- [0128] 이펙터 영역을 통합한 중쇄만의 항체 생산 시스템은 생산기술을 적용하기에 적합한 포유동물세포 배양 (예를 들어, CHO 세포), 식물 (예를 들어, 옥수수), 형질전환 염소, 토끼, 소, 양, 닭 및 곤충의 유충을 포함한다. 바이러스 감염을 포함하는 다른 생산 시스템 (예를 들어, 곤충의 유충 및 세포주에서 베쿨로바이러스)은 세포 배양법과 생식계열 접근법에 대체되는 것들이다. 또한, 다른 생산 방법은 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 익숙할 것이다. 중쇄만의 IgA 또는 IgM 어셈블리를 요구하는 경우, "J쇄"의 동시 발현이 유리하다. 카멜리드 중쇄만의 항체 또는 V_H 결합 영역 단독 생산에 적합한 방법은 당 분야에 공지이다. 예를 들어, 카멜리드 V_H 결합 영역은 세균 시스템에서 생산되었고, 카멜리드 중쇄만의 동형이합체는 하이브리도마와 형질전환된 포유동물 세포에서 생산되었다(Reichmann과 Muyldermans, (1999) *J. Immunol. Methods*, 231, 25-38).
- [0129] 또한, 파아지 디스플레이 기술을 사용하여 유도된, 설계된 인간 V_H 결합 영역의 발현을 확립하는 방법은 공지이다(Tanha 등, (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 24774-24780 및 본 발명의 참고문헌).
- [0130] 형질전환 파리 계열로부터의 곤충의 유충은 포유동물 세포에 의하여 생산된 동일한 항체와 구별할 수 없는 특성을 가진 작용적 중쇄만의 항체 단편을 혈림프(haemolymph)에서 생산하는 것을 보여주었다(PCT/GB2003/0003319). 또한, 본 발명은 본 발명의 이러한 방법에 따라 얻어질 수 있는 항원 특이적 단량체 또는 이량체 V_H 결합 영역을 제공한다.
- [0131] 또한, 본 발명은 이형 중쇄 유전자좌, 본 발명의 중쇄만의 항체를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드 및 본 발명에 따른 중쇄만의 항체를 코딩하는 이형 중쇄 유전자좌 또는 이들의 단편 또는 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 구성되는 뉴클레오티드 서열을 제공한다.
- [0132] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 중쇄만의 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 이형 중쇄 유전자좌 또는 이들의 단편 또는 분리된 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0133] 본 발명의 제2의 관점에 있어서, 본 발명은 이펙터 활성을 제공하는 이펙터 부분에 부착된 본 발명에 따른 항원 특이적 V_H 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드 복합체를 제공한다. 이러한 이펙터 활성은 중쇄 불변 영역에 의하여 제공되는 것에 추가될 수 있고, 분자의 아미노 또는 카복시 말단에 위치될 수 있다. 이러한 폴리펩티드 복합체는 항원 특이적 V_H 결합 영역에 의하여 이펙터 부분의 추가적인 표적 또는 이펙터 기능과의 조합에 의해 부여되는 생리학적 작용을 보유한다. 이러한 폴리펩티드 복합체는 이펙터 부분의 설계와 상호작용에 따라서 작용적 단량체 또는 이량체, 4량체, 5량체, 다량체 또는 다른 V_H 결합 영역을 통합한 다른 복합체의 형태일 수 있으므로, 다가와 다특이성을 부여한다. V_H 결합 영역은 결합 분자의 아미노 또는 카복시 말단에 존재할 수 있다(이합체의 예는 도 1 참고).
- [0134] 만약, 이펙터 부분이 결합 영역을 포함한다면, 항원 특이적 V_H 결합 영역과는 다른 특이성을 가질 수 있다. 이러한 배열의 이점은, 폴리펩티드 복합체는 다른 표적의 교차 연결을 촉진할 수 있다는 것이다. 예를 들어, 이특이적 폴리펩티드 복합체는 세포-세포 상호작용과 세포-병원체 상호작용을 향상시키기 위하여 이용될 수 있다. 이러한 구체예에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드 복합체는, 예를 들어 병원체와 마크로파아지와 같은 2가지 세포 타입 사이를 연결하기 위하여 사용될 수 있다(Biburger 등, (2005) *J. Mol. Biol.*, 346, 1299-1311). V_H 결합 영역의 사용은 그러한 이특이적 설계에서 scFV 결합 영역의 용도로 바람직할 수 있다. V_H 결합 영역은 높은 결합 친화도를 가지고, 최소 벡터 구조를 가지고, 그들의 사량체 부모 분자에 관계된 scFV의 특이성과 친화도를

유지하기 위하여 필요한 설계를 고려함이 없이 그러한 폴리펩티드 복합체 내로 통합될 수 있다. 이량체 또는 다량체 폴리펩티드 복합체가 상정되면, 이합체화 영역들은 통합되는데, 예를 들어 면역글로불린 중쇄 불변 영역으로부터 유래된 C_H2와 C_H3 영역들이 포함된다(도 2).

[0135] 본 발명에서 사용되는 것으로서, 용어 "이펙터 부분(effector moiety)"은 세포에서 목표하는 생물학적 효과를 증대하는 어떠한 부분을 포함한다. 이펙터 부분은 바람직하게는 가용성이고, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질일 수 있으며, 비펩티드성 구조일 수 있다. 예를 들어, 이펙터 부분은 효소, 호르몬, 시토카인, 드러그, 프로드러그, 독신, 특히 단백질 독신, 킬레이팅 구조의 라디오토타이드, 결합 영역, 이합체화 또는 상호작용 영역, 영상제, 알부민 또는 저해제일 수 있다.

[0136] 알부민은 항원 특이적 V_H 결합 영역의 안정성 또는 약물동력학 및/또는 약물운동학적 특징을 증가시키기 위한 이펙터 부분으로서 사용될 수 있다(Sung 등, (2003) J. Interferon Cytokine Res., 23 (1): 25-36). 택일적으로, 이펙터 부분은 약물동력학적인 특성을 향상시키기 위하여 PEG화된 구조일 수 있거나, 자연적으로 당화된 구조일 수 있다.

[0137] 이펙터 부분은 항원 특이적 V_H 결합 영역에 결합된 펩티드일 수 있고, 그것은, 예를 들어 말레이미드 링커(maleimide linker)와 같은 화학적 연결 구조를 사용하여 항원 특이적 중쇄 V_H 영역에 화학적으로 결합될 수 있다. 택일적으로, 본 발명의 폴리펩티드 복합체는 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 그러한 것으로서, 또한 본 발명은 본 발명의 이형 중쇄 유전자와 또는 중쇄만의 항체를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드를 구성하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 리딩 프레임에 이펙터 부분을 코딩하는 하나 이상의 엑손(들)을 더 포함한다. 이 엑손은 폴리뉴클레오티드의 5' 또는 3' 말단에 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오티드는 리딩 프레임 내에 V_H 영역 및 결합 영역\이펙터 부분 유전자 단편을 이 순서로 포함할 수 있다. 유전적 융합의 경우에 있어서, 여러 가지 영역의 부착은 동일한 리딩 프레임에 위치하는 여러 가지 영역을 코딩하는 DNA를 가진 융합 단백질의 아미노산을 코딩하는 재조합 DNA 구조물을 사용하여 달성될 수 있다. 그러한 구조물은 진단제와 치료제로서 유용하다. 진단제로서, 이펙터 영역은 형광 단백질 (예를 들어, GFP) 또는 효소 (예를 들어, β-gal)일 수 있다. 택일적으로, 이펙터 영역은 형광 마커의 부착을 위한 위치로 작용할 수 있는 2차 항체 또는 류신 지퍼 또는 유사한 결합 영역에 대한 부착 위치를 제공하기 위하여 기질 (예를 들어, 폴리히스티딘 또는 비오틴), 항원에 대한 향상된 결합을 위한 태그일 수 있다.

[0138] **폴리펩티드 복합체**

[0139] 또한, 본 발명자들은, 항체 중쇄의 적어도 일부분을 단독으로, 또는 보충적 어셈블리 영역을 포함하고, 추가적인 이펙터 활성을 가지는 분리된 이펙터 (경)쇄와 조합하여 포함하는 2가 또는 다가 폴리펩티드 복합체를 생산하는 것이 가능하다는 것을 인식하였다. 본 발명에 따른 폴리펩티드 복합체는 이펙터 쇄와 회합된 추가적인 이펙터 부분과 조합된 중쇄 불변 영역에 의하여 부여된 생리학적 기능을 보유한다(도 3).

[0140] 본 발명의 제3의 관점에 있어서, 폴리펩티드 복합체는 하나 이상의 이펙터 쇄(경쇄)와의 조합으로 된 중쇄를 포함한다. 본 발명의 제2의 관점은 한 쌍의 중쇄와 한 쌍의 이펙터 쇄를 포함하며,

[0141] 상기 한 쌍의 중쇄는 각각 회합되고,

[0142] 한 이펙터 쇄는 한 중쇄와 회합되고, 나머지 이펙터 쇄는 다른 중쇄와 회합되고,

[0143] 각각의 중쇄는 결합 영역, 바람직하게는 적어도 C_H2, C_H3 및 선택적으로 C_H4 불변 영역을 포함하는 이합체화 영역 및 이펙터 쇄의 상보적인 어셈블리 영역에 결합할 수 있는 이펙터 부분을 포함하고,

[0144] 상기 이펙터 쇄는 이펙터 부분에 부착된 상보적인 어셈블리 영역을 포함하고,

[0145] 상기 어셈블리 영역과 상보적인 어셈블리 영역은 비공유 상호작용을 통하여 서로 회합되는 폴리펩티드 복합체를 제공한다.

[0146] 바람직하게, 상기 중쇄의 이펙터 부분은 상기 이펙터 쇄의 이펙터 부분과 다르다.

[0147] 선택적으로, 폴리펩티드 복합체는 어셈블리 영역에 연결되는 C_H3 영역 (또는, 만약 존재한다면 C_H4 영역)의 카복시 말단에 유연성이 있는 힌지 유사 영역을 포함한다. 바람직하게는, 상기 폴리펩티드 영역은 결합 영역과 C_H2 영역 사이에 천연의 힌지 영역 또는 유연성이 있는 설계된 힌지 유사 영역을 포함한다. 힌지 영역의 존재는 결

과적인 폴리펩티드 복합체에 결합 영역과 이펙터 부분의 독립적인 작용을 촉진한다.

[0148] 선택적으로, 제1의 폴리펩티드 중쇄에서의 이펙터 부분은 제2의 폴리펩티드 중쇄에서의 이펙터 부분의 특이성과는 다른 특이성을 가진다. 본 발명에 따르면, 상기 폴리펩티드 복합체의 이펙터 부분은 결합 영역에 의하여 대체될 수 있다. 바람직하게, 상기 결합 영역은 (본 발명의 제1의 관점에서와 같은) V_H 영역 또는 세포 수용체 결합 영역을 포함한다. 결과의 4가 이량체 결합 단백질 (폴리펩티드 복합체)는 최대 4개의 다른 이펙터 부분을 포함할 수 있다. 바람직하게, 중쇄의 아미노 말단에서의 이펙터 부분들은 동일하고, 카복시 말단에서의 이펙터 부분들은 동일하여 (그러나, 아미노 말단의 그것과는 다른 항원 또는 에피토프를 인식한다), 단일의 동형이합체의 어셈블리를 촉진한다. 그러한 분자는 적절한 중쇄 작용적 영역 (예를 들어, IgA 또는 IgM)의 포함에 의하여 제공되는 이펙터 작용성인 병원체의 포집에 이점이 있는 것으로 밝혀진다.

[0149] 본 발명의 제3의 관점에 따른 예시적인 폴리펩티드 복합체는 세포화학적 표지, 타겟팅 방법 또는 치료에 유용하다. 예를 들어, 이펙터 분자가 암세포 표면 마커를 타겟으로 하는 항원 특이적 V_H 결합 영역을 포함하고, 이펙터 부분이 프로드러그 전환 효소에 특이적인 결합 영역(이펙터 쇠)을 포함하는 경우이다. 항원 특이적 V_H 결합 영역은 표적에 결합하여, 이펙터 부분을 표적으로 매우 근접하게 가져와서 이펙터 쇠가 결합함에 따라, 프로드러그 (예를 들어, CB 1954를 가진 니트로리덕타아제)의 존재하에 표적에 대한 생물학적 효과를 발휘할 수 있다. 또한, 이합체화 영역으로서의 면역글로불린 중쇄 이펙터 기능의 포함은 표적 세포의 제거에 유용할 수 있다.

[0150] **이펙터 쇠**

[0151] 이펙터 쇠는 상보적인 결합 영역과 이펙터 부분을 포함하고, 이는 중쇄 이펙터 부분을 통해서 중쇄와 회합되어 어셈블리된 폴리펩티드 결합 복합체를 만든다. 이펙터 쇠 상보적 어셈블리 영역은 이펙터 부분의 통합적 요소 또는 단백질 또는 이펙터 부분에 융합되거나, 화학적으로 연결된 택일적 리간드일 수 있다. 어셈블리된 폴리펩티드 결합 복합체의 중쇄는 표적에 결합하여, 이펙터 (경)쇄 부분을 표적에 매우 근접하게 가져옴으로써 표적에 생물학적 효과를 일으킬 수 있다.

[0152] **이펙터 부분**

[0153] 본 발명에서 사용되는 것으로, 용어 "이펙터 부분"은 세포상에서 원하는 생물학적 효과를 중재하는 어떤 부분을 포함한다. 이펙터 영역은 세포, 예를 들면 T 세포, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질일 수 있거나, 비펩티드 구조일 수 있다. 예를 들면, 이펙터 영역은 효소, 드러그, 프로드러그, 독신, 특히 단백질 독신, 킬레이팅 구조의 라디오뉴클라이드(radionuclide) 또는 결합 영역일 수 있다. 상보적인 어셈블리 영역과 회합된 이펙터 부분은 목적하는 효과에 따라 천연의 세포성, 단백질성, 유기성 또는 무기성일 수 있다.

[0154] 본 발명의 상기 모든 관점과 관련하여, 본 발명에서 사용되는 용어 "결합 영역"은 생리학적 매질에서 활성적인 어떤 폴리펩티드 영역을 포함한다. 또한, 이러한 결합 영역은 생리학적 조건하에서 표적에 결합할 수 있는 능력을 가져야만 한다.

[0155] 이러한 결합 영역은 세포 표면에 결합 또는 부착을 중재할 수 있는 영역을 포함한다. 본 발명의 폴리펩티드 복합체에 사용될 수 있는 적합한 영역은 포유동물성, 원핵성 및 바이러스성 세포 부착 분자, 시토카인, 성장인자, 수용체 길항제 또는 작용제, 리간드, 세포 표면 수용체, 조절인자, 구조 단백질과 펩티드, 혈청 단백질, 분비 단백질, 플라스마렘마(plasmalemma) 회합 단백질, 바이러스성 항원, 박테리아성 항원, 원생동물 항원, 기생충 항원, 리포 단백질, 당단백질, 호르몬, 신경 전달물질, 응고인자, 설계된 단일쇄 Fvs 등이다. 바람직하게는, 결합 영역은 척추동물 V_H 영역이고, 더욱 바람직하게는 인간 V_H 영역과 같은 포유동물의 V_H 영역이다.

[0156] 결합 영역은 카멜리드 $V_H(V_{H\mu})$ 영역을 포함할 수 있거나, 비카멜리드로부터 얻어진 V_H 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 결합 영역은 인간 V_H 영역이다. V_H 결합 영역은 합성된 파아지 라이브러리로부터 유래된 V_H 영역에 반대되는 바의 형질전환 동물 또는 카멜리드로부터 유래된 B 세포 기원인 것이 바람직하며, 이는 상기 B 세포 기원의 것들은 VDJ 재배열과 체세포 변이를 통해서 생체 내에서 항원 도출에 반응하여 발생됨으로써 더 높은 친화성을 가질 것이기 때문이다.

[0157] 만일 이펙터 부분이 결합 영역을 포함한다면, 이는 중쇄 내에서 결합 영역과는 상이한 특성을 갖는 것이 바람직하다. 이 배열의 잇점은 폴리펩티드 복합체가 다른 표적들의 교차 결합을 용이하게 할 수 있거나, 표적 세포(예를 들어, 병원체)에서 다른 항원과 결합할 수 있다는 점이다.

[0158] 제1의 중쇄에서의 결합 영역은 제2의 중쇄에서의 결합 영역의 특성과는 다른 특성을 가질 수 있다. 이와 같이,

폴리펩티드 복합체는 적어도 2가일 수 있고, 다른 표적과 교차결합이 가능하고, 이펙터 영역은 양쪽의 표적에서 효과를 낼 수 있다. 다가의 폴리펩티드 복합체는 이들 4가의 중쇄와 상이한 특성(들)과 기능성을 지닌 이펙터 영역들을 포함하는 이펙터 쇠(들)와의 회합을 통해 작출될 수 있다. 또한, 제1의 중쇄에서 이펙터 부분은 제2의 중쇄의 이펙터 부분과는 상이한 특성을 가질 수 있고, 한 가지 이상의 이펙터 쇠를 포획할 수 있고, 각각은 상이한 작용성을 가진다.

[0159] **이펙터 부분에 결합하는 상보적인 어셈블리 영역**

[0160] 중쇄가 이펙터 쇠와 회합될 때, 본 발명에서 사용되는 용어 "이펙터 부분"과 "상보적인 어셈블리 영역"은 서로 간에 적어도 비공유 부착을 형성할 수 있는 어떤 부분들을 포함한다. 예를 들면, 이펙터 부분과 상보적인 어셈블리 영역은 면역글로블린 중쇄의 C_H1 영역과 면역글로블린 경쇄의 불변 영역; 류신 지퍼; VCAM과 VLA-4; 인테그린과 세포외성 매트릭스 단백질; 인테그린과 CD54 또는 CD102와 같은 세포 표면 분자; ALCAM과 SRCR 영역; scFv와 항원 또는 V_H 결합 영역과 항원 사이에서 보여지는 것과 같은 단백질-단백질 상호작용을 형성할 수 있는 단백질, 펩티드 단편 또는 컨센서스 서열일 수 있다.

[0161] **중쇄**

[0162] 중쇄의 이합체화 영역이 면역글로블린 중쇄 불변 영역을 포함하는 경우에, 불변 영역(C_H 엑손)은 폴리펩티드 결합 복합체에 대해 추가적인 생리학적 작용성을 제공할 수 있다. 특히, 면역글로블린 중쇄 불변 영역은 항체 불변 영역의 클래스 또는 서브클래스에 따라서, 그 중에서도 보체 고정, 마크로파지 활성화와 Fc 수용체에 대한 결합을 제공할 수 있다.

[0163] 위에서 논의된 바와 같이, 발현된 중쇄의 클래스는 생체 내에서 이펙터 기능에 있어서 중요한 역할을 갖는 것으로 잘 입증되었다. 확립된 세포주는 유용한 타겟팅(targeting)과 생물학적 효과를 갖는 폴리펩티드 복합체를 생산할 수 있지만, 중쇄 불변 영역은 진료학적 또는 치료학적으로 바람직하지 못한 클래스일 수 있거나, 유용성 있는 양으로 분비될 수 없다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 중쇄 불변 영역은 특별하게 변경되거나, 부분적으로 또는 완전히 면역글로블린 중쇄의 부분을 도입 또는 제거시키기 위하여 생략될 수 있다.

[0164] 예를 들어, M 클래스의 Ig 분자는 마크로파지와 보체 경로의 활성화시에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그것의 결합 부위의 매우 근접함 때문에, IgM은 바이러스를 포함하는 병원체에 대해 높은 친화력을 갖는다. 그러나, IgM은 신속한 면역검정 기술에는 사용하기가 어려운 것으로 알려진 반면에, G 부류의 Ig는 이 기술들에 쉽게 사용될 수가 있다. 이같은 사용을 위하여, 중쇄의 부류를 μ로부터 γ 영역에 이르게 스위치(switch)하는 것이 유용할 수도 있다.

[0165] 중쇄 C_γ 유전자좌 단독 발현은 IgG1, IgG2, IgG3와 IgG4 이소타입을 포함하는 IgG를 생성할 수가 있고, 이들 중의 다소는 보체를 활성화시킬 수가 있다. IgG 항체는 마크로파지와 과립성 백혈구와 결합하여 이들을 활성화시키고, 태반을 교차시킬 수 있다.

[0166] 여러 가지 항체 클래스의 부가적인 적용예들은 이미 논의되었다. 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 중쇄의 불변 영역은 여기에서 정의한 바와 같이 인간, 토끼, 쥐 또는 마우스 기원일 수 있다. 바람직하게는, 이들은 인간 기원이다.

[0167] 본 발명의 폴리펩티드 복합체는 이펙터 기능을 전혀 제공하지 않는 이합체화 영역을 사용하여 그들의 수용체에 대한 리간드의 결합을 블로킹하기 위하여 단독으로 사용될 수 있다. 다수의 수용체는 다특이적 폴리펩티드 복합체에 의해 블로킹될 수 있다.

[0168] 본 발명의 제4의 관점에서, 이펙터 분자는 이합체화 영역을 포함할 수 있으므로, 이펙터 분자는 각각의 이펙터 분자와 회합될 수 있다. 이 이합체화 영역은 하나 이상의 C_H2, C_H3 또는 C_H4 항체 불변 영역 및/또는 J쇄를 포함할 수 있다. 본 발명의 이 구체예에서, 두 가지 이상의 이펙터 분자는 이펙터 이합체 또는 다합체를 만들기 위하여 회합될 수 있다. 이펙터 분자는 동일(이펙터 분자 동형이합체 또는 동형다합체의 생성 가능) 또는 상이(이펙터 분자 이형이합체 또는 이형다합체의 생성 가능)할 수 있다. 바람직하게는, 이펙터 분자 이합체 또는 다합체는 2가 또는 다가이다. 바람직하게는, 두 가지 이상의 이펙터 분자를 위한 불변 영역(즉, 이합체화 영역)은 동일하고, 따라서 생성물 이종성의 가능성을 줄여준다.

[0169] 본 발명의 제4의 관점에 관하여, 제1의 폴리펩티드 중쇄와 제2의 폴리펩티드 중쇄로써 이루어진 이합체를 포함하는 폴리펩티드 복합체가 제공되고, 여기에서:

- [0170] 각각의 폴리펩티드 중쇄는 적어도 C_{H2}, C_{H3} 및 선택적으로 C_{H4} 항체 불변 영역을 포함하는 결합 영역과 이합체화 영역 및 선택적으로 이펙터 부분을 포함하고, 바람직하게는;
- [0171] 제1의 폴리펩티드 중쇄 내의 결합 영역은 제2의 폴리펩티드 중쇄 내의 결합 영역과 동일한 특이성을 가지고; 그리고
- [0172] 두 폴리펩티드 중쇄에 대한 불변 영역(이합체화 영역)은 동일하다.
- [0173] 바람직하게는, 제1 및 제2의 쇠는 동일한 이펙터 부분을 갖는다.
- [0174] 바람직하게는, 이합체화 영역은 적어도 C_{H2}, C_{H3} 및 선택적으로 C_{H4} 항체 불변 영역을 포함한다.
- [0175] 또한, 본 발명의 제4의 관점은, 다수의 폴리펩티드 중쇄 이합체와 J쇄를 포함하는 폴리펩티드 복합체를 제공하고, 여기에서:
- [0176] 다수의 폴리펩티드 중쇄 이합체는 J쇄에 의해 어셈블링되고;
- [0177] 각각의 폴리펩티드 중쇄는 결합 영역 및 동일한 μ , ϵ , α 또는 γ C_{H2}, C_{H3} 및 선택적으로 C_{H4} 영역을 포함하고; 그리고
- [0178] 폴리펩티드 복합체 내에 상이한 특성을 갖는 적어도 두 개의 결합 영역이 존재한다(도 4 및 도 5).
- [0179] 상기 발명의 제1의 관점에서 정의된 바와 같이, 각각의 중쇄 불변 영역은 바람직하게는 적어도 한 중쇄 불변 영역 유전자를 포함하고, 이는 작용적 C_{H1} 영역 없이도 발현되므로 중쇄만의 항체 생성이 일어날 수 있다. 또한, 각각의 중쇄 불변 영역은 하나 이상의 추가적인 불변 영역 유전자를 포함할 수 있고, 또한, 추가적인 중쇄 불변 영역 유전자가 작용적 C_{H1} 영역을 발현하지 않는다면, C δ , C γ_{1-4} , C μ , C ϵ 및 C α_{1-2} 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 중쇄 불변 영역 유전자는 바람직한 클래스 또는 필요한 항체 클래스의 혼합물에 따라서 선택된다.
- [0180] 바람직하게는, 발현된 IgA와 IgM 내에는 상이한 특성의 단지 두 가지의 결합 영역이 존재한다.
- [0181] 한 구체예에서, 각각의 중쇄는 C_{H4} 영역을 포함하고, 불변 영역은 α 영역이고, 폴리펩티드 복합체는 J쇄를 포함한다.
- [0182] 다른 구체예에서, 각각의 중쇄는 C_{H4} 영역을 포함하고, 불변 영역은 μ 영역이고, 항체는 J쇄를 포함한다.
- [0183] **폴리펩티드 복합체의 어셈블리**
- [0184] 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 모듈성 영역 배열은 폴리펩티드 복합체들을 다수의 가능한 조합으로 구성할 수 있도록 한다. 영역 구성과 폴리펩티드 복합체의 아미노산 서열에서 그러한 변화는 적절한 변이 또는 부분적인 합성과 상응하는 DNA 코딩 서열의 적절한 영역의 대체에 의해 달성될 수 있다. 대체 또는 추가적 영역은 적절한 재조합 DNA 서열들로부터 획득가능하다. 예를 들면, 중쇄는 결합 영역과 C_{H2} 영역의 아미노 말단 사이와 이펙터 영역과 중쇄(C_{H3} 또는 C_{H4})의 C-말단 사이의 양쪽에 자연적 힌지 또는 설계된 유연성 있는 폴리펩티드 영역을 포함할 수 있다.
- [0185] 본 발명의 폴리펩티드 복합체 내의 중쇄는 융합 단백질로서 발현된다. 본 발명의 이같은 관점의 폴리펩티드 복합체 내의 이펙터 쇠는 융합 단백질로서 발현가능하거나, 화학적 수단에 의해 어셈블링될 수 있거나, 자연적 세포라면, 혈액 또는 조직으로부터 분리가능하고, 또는 생체 내에서 포획가능하다(예를 들면, 알부민).
- [0186] 유전학적 융합의 경우, 여러 가지 영역의 부착은 동일한 리딩 프레임에 위치한 여러 가지 영역을 코딩하는 DNA와 함께, 융합 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 재조합 DNA 구조물을 사용해 이를 수 있다.
- [0187] 만약, 융합 단백질의 일부분으로서 존재한다면, 이펙터 부분은 상보적인 어셈블리 영역의 아미노 또한 카복시 말단 중 하나에 위치될 수 있다.
- [0188] 택일적으로, 이펙터 쇠의 영역은 융합 단백질로서 합성되는 것보다 오히려 당 기술분야에 이미 알려진 바와 같은, 정상적인 펩티드 화학적 방법에 의해 어셈블링이 가능하다.
- [0189] 연결은 펩티드 결합을 통해 또는 화학적 연결을 통해 이루어질 수 있다. 예를 들면, 이펙터 부분은 상보적 어셈블리 영역에 펩티드 결합될 수 있거나, 예를 들면, 말레이미드 링커와 같은 화학적 연결구조를 사용하여 상보적

어셈블리 영역에 화학적으로 결합될 수 있다.

[0190] 이펙터 부분은 중쇄의 어떤 장소에 위치될 수 있다. 예를 들면, 이펙터 부분은 중쇄의 C 터미널 말단에 놓여질 수 있거나, 결합 영역과 폴리펩티드 복합체의 C₄₂ 영역 또는 힌지 영역들 중 어느 한 곳에 놓여질 수 있다. 어셈블리 영역은 C₄₂와 C₄₃ 영역들 사이에 놓이지 않는 것이 바람직하는데, 이는 이들 사이에 위치하는 것이 이펙터 기능과 이합체화 영역을 손상시키기 때문이다. 바람직하게는, 이펙터 부분은 이펙터 부분의 독립적인 결합/기능을 용이하게 하기 위하여 펩티드 유연성 링커 또는 힌지 유사 영역을 통해서 중쇄의 아미노 말단 또는 카복시 말단에 부착된다.

[0191] **폴리뉴클레오티드 서열, 벡터 및 숙주 세포**

[0192] 또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 어떤 한 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열, 상기 설명된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터 및 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 중쇄를 코딩하는 벡터로서 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 바람직하게, 폴리뉴클레오티드는 발현된 중쇄가 숙주 세포가 성장되는 배지 내로 동형이합체로서 분비되도록 하는 서열을 포함한다. 숙주세포는 박테리아와 효모세포들을 포함하는 어떤 기원의 것일 수 있지만, 척추동물 숙주세포가 바람직하고, 더 바람직한 것은 포유동물 숙주세포이다.

[0193] 상이한 표적에 특이성을 지닌 결합 영역을 포함하는 중쇄를 코딩하는 제2의 벡터에 의한 동일한 숙주세포의 트랜스펙션(transfection)은 두 개의 구조물의 동시발현 및 동형이합체와 이형이합체의 혼합물로 된 어셈블리를 생성시킨다. 동형이합체는 동종의 항원에 대해 특이성을 보여줄 것이고, 이형이합체는 항원과 결합할 것이다.

[0194] 또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 적어도 한 이펙터 쇠를 코딩하는 벡터로서 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 숙주세포는 박테리아 또는 효모세포를 포함하는, 어떤 기원의 것일 수 있지만, 바람직하게는, 척추동물 숙주세포이고, 더 바람직한 것은 포유동물 숙주세포이다. 택일적으로, 이펙터 쇠는 당 기술분야에서 공지된 방법을 사용하여 합성가능하다.

[0195] 또한, 본 발명은 본 발명의 적어도 한 중쇄와 폴리펩티드 복합체의 적어도 한 이펙터 쇠를 코딩하는 벡터로서 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 숙주세포는 박테리아 또는 효모세포를 포함하는 어떤 기원의 것일 수 있지만, 바람직하게는 척추동물 숙주세포이고, 더 바람직한 것은 포유동물 숙주세포이다. 택일적으로, 쇠는 독립적으로 합성될 수 있고, 당 기술분야에서 공지된 방법을 사용하여 어셈블링될 수 있다.

[0196] 더구나, 본 발명은 본 발명의 적어도 한 중쇄 동형- 또는 이형-이합체 폴리펩티드 복합체를 발현하는 형질전환 생물체를 제공한다. 형질전환 생물체는 비인간 척추동물 또는 포유동물, 식물 또는 곤충일 수 있다.

[0197] 또한, 본 발명은 항원으로 본 발명의 형질전환 생물체를 면역화시키는 본 발명의 제1의 관점에 따른 클래스 특이적 중쇄만의 항체 및 이들의 V_H 영역 생산 방법을 제공한다.

[0198] 본 발명의 이같은 관점의 바람직한 구체예에서, 생물체는 마우스이다.

[0199] 보건 적용을 위한 항체와 폴리펩티드 복합체의 생산은 대규모의 제조 시스템을 필요로 하고, 이들의 예들은 위에서 상세히 논의되어 있다. 이러한 시스템은 집단 생육 기술을 위해 적합한 식물(예를 들어, 옥수수), 형질전환 소 및 양, 닭 및 곤충의 유충을 포함한다. 또한, 세포배양과 생식계열 접근방법에 대한 대안으로서, 바이러스 감염을 포함하는 다른 생산 시스템은 당업자들에게는 익숙할 것이다.

[0200] 이들 방법과 기술상 알려진 다른 적합한 방법은, 본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체의 생산을 위해 사용될 수 있다. 동형이합체 및/또는 이형이합체의 생산은 이 방법들을 사용하여 이룰 수 있다.

[0201] **본 발명의 중쇄만의 항체와 폴리펩티드 복합체의 사용**

[0202] 본 발명의 중쇄만의 항체와 폴리펩티드 결합 복합체는 다양한 적용성을 가진다.

[0203] 예를 들면, 본 발명의 중쇄만의 항체와 폴리펩티드 복합체는 2- 및 다-특이적 폴리펩티드 복합체를 포함한다. 이 복합체는 전염병의 예방과 치료를 위한 치료제로서 특히 이점이 있다. 본 발명의 중쇄만의 항체와 폴리펩티드 결합 복합체는 세포화학적 표지, 타겟팅 방법, 치료 및 진단을 위해 유용하다.

[0204] 모노-항체 치료에서, 예를 들면, 단일 결합 부위의 손실로 초래되는 변이로 기인되는 병원체 탈출은 항체의 치료 효과를 소멸시킬 수 있다. 동일한 병원체에 관하여 상이한 항원을 인정하는 이형이합체 폴리펩티드 복합체의 생산은 이 문제를 극복할 것이다. 본 발명의 폴리펩티드 복합체에서 상이한 특성을 갖는 적어도 두 가지 결합

영역의 사용은 세포-세포 상호작용과 세포/병원체 상호작용 모두를 강화시키는데 사용될 수 있다.

- [0205] 이 구체예에서, 본 발명의 폴리펩티드 복합체는 병원체와 마크로과아지 또는 종양세포와 T 세포와 같은 두 가지 세포유형 사이에서 폴리펩티드 복합체를 가교 역할하는데 이용될 수 있다. 택일적으로, 폴리펩티드 복합체는 중쇄 불변 영역 만에 의해 제공되는 이펙터 기능을 지닌 동일한 병원체 상에서 두 개 이상의 에피토프를 인식할 수 있다.
- [0206] 택일적으로, 이특이적 폴리펩티드 결합 복합체는 생체 내에서 세포들과 조직들을 타겟팅하기 위해 사용될 수 있고, 그 후에 순환하는 이펙터 분자 또는 영상제를 포획하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 이특이적 종양 타겟팅제는, 프로-드러그의 활성제로의 순차적인 국부적 전환을 위한 프로드러그 전환 복합체를 포획하는데 사용될 수 있다. 이펙터제와 조합으로 2- 및 다-특이적 결합 복합체는 결합 영역의 선택에 따라서 하나 이상의 병원체를 결합 및 파괴시키는데 사용될 수 있다. 택일적으로, 동일한 병원체에서 상이한 항원을 인식하는 두 개 이상의 결합 영역의 존재는 진료상의 이점을 제공하고, 병원체에서 변이의 결과인 병원체 탈출과 약제 파괴의 가능성을 감소시킨다.
- [0207] 본 발명은 중쇄만의 항체 또는 본 발명의 제1의 관점에 따르는 이들의 단편, 폴리펩티드 쇄와 본 발명의 제2의 관점에 따르는 복합체; 및 본 발명의 제3의 관점에 따르는 이펙터 쇄와 폴리펩티드 복합체를 제공한다. 이들 모두는 인간에서 약학적 사용을 위하여 적합하고, 따라서 본 발명은 본 발명의 중쇄만의 항체, 폴리펩티드 쇄, 이펙터 쇄 또는 폴리펩티드 복합체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 질병의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조시에 본 발명의 중쇄만의 항체, 폴리펩티드 쇄, 이펙터 쇄 또는 폴리펩티드 복합체의 사용을 제공한다. 중쇄와 이펙터 쇄는 투여방식과 약제의 활동방식에 따라서 함께 또는 따로 조제될 수 있다.
- [0208] 약학적 조성물과 약제는 환자들에게 투여 전에 전형적으로 조제될 것이다.
- [0209] 예를 들면, 중쇄만의 항체 또는 폴리펩티드 복합체는, 특히 이들이 동결건조된다면, 안정화제와 함께 혼합될 수 있다. 당(예를 들어, 만니톨, 수크로오스 또는 트레할로오스)의 첨가는 동결건조 동안에 안정성을 제공하기 위해 전형적이며, 바람직한 안정화제는 만니톨이다. 또한, 인간 혈청 알부민(바람직하게는 재조합물)은 안정화제로서 첨가될 수 있다. 또한, 당의 혼합물이 사용될 수 있고, 예를 들면 수크로오스와 만니톨, 트레할로오스와 만니톨 등이다.
- [0210] 완충액은 조성물에 첨가가능하고, 예를 들면, 트리스 완충액, 히스티딘 완충액, 글리신 완충액 또는 바람직하게는, 포스페이트 완충액(예를 들어, 소듐 디하이드로젠 포스페이트와 디소듐 하이드로젠 포스페이트를 포함)이다. pH 7.2와 7.8 사이를 제공하기 위한 완충액의 첨가가 바람직하고, 특히 바람직한 것은 약 pH 7.5이다.
- [0211] 동결건조 후, 재구성을 위하여, 주사용 살균수가 사용될 수 있다. 인간 혈청 알부민(바람직하게는 재조합물)을 포함하는 수성 조성물과 함께 냉동된 케이크로 재구성할 수도 있다.
- [0212] 일반적으로, 중쇄만의 항체와 폴리펩티드 복합체는 약학적으로 적절한 담체와 함께 정제된 형태로 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 환자에게 발명의 약학적 조성물 투여를 포함하는 환자 치료법을 제공한다. 바람직하게, 환자는 인간이고, 어린이(예를 들어, 유아 또는 신생아), 십대 또는 어른일 수 있지만, 일반적으로는 어른일 것이다.
- [0213] 또한, 본 발명은 약제로서의 사용을 위하여 본 발명의 중쇄만의 항체, 폴리펩티드 쇄, 이펙터 쇄 또는 폴리펩티드 복합체를 제공한다.
- [0214] 또한, 본 발명은 환자치료를 위한 약제의 제조시에 본 발명의 중쇄만의 항체, 폴리펩티드 쇄, 이펙터 쇄 또는 폴리펩티드 복합체의 사용을 제공한다.
- [0215] 이들 사용, 방법 및 약제는 다음의 질병 또는 질환 중 한 치료에 바람직하다: 상처 치료; 종양, 흑색종, 폐, 결장, 골육종, 직장, 난소, 육종, 자궁, 식도, 가슴, 췌장, 방광, 머리와 목 및 다른 고형암을 포함하는 세포증식 질환; 백혈병, 비-호지킨병 임파종, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 맥관형성질환, 카포시육종과 같은 골수증식 질환; 알레르기, 염증성 장질환, 관절염, 건선과 호흡기관염증, 천식, 면역성 질환 및 기관이식거부를 포함하는 자기면역/염증성 질환; 고혈압, 부종, 양기나, 동맥경화증, 혈전증, 패혈증, 쇼크, 재관류상해 및 국소빈혈을 포함하는 심장혈관과 혈관질환; 중추신경계질환, 알츠하이머질환, 뇌손상, 근위축측색경화증 및 통증을 포함하는 신경학상의 질환; 발달 장애; 당뇨병, 골다공증 및 비만을 포함하는 대사질환; AIDS 및 신장질환; 바이러스 감염, 박테리아 감염, 진균 감염 및 기생충 감염을 포함하는 감염증; 태반과 관련된 병리학적 증상 및 다른 병

리학적 증상 및 면역치료에 사용.

- [0216] 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은 진단, 의학적 예후 또는 치료용 영상제로서 본 발명의 중쇄만의 항체 또는 폴리펩티드 결합 복합체의 사용을 제공한다. 나아가, 본 발명은 치료용 영상제, 세포화학적 또는 진단시약으로서 본 발명의 중쇄만의 동형 또는 이형-이합체의 사용과 이들과 하나 이상의 이펙터(경)쇄의 조합물의 사용을 제공한다.
- [0217] 본 발명은 세포간 결합제 또는 항체효소로서 여기에서 설명된 바의 중쇄만의 항체 또는 이들의 단편의 사용을 제공한다. 바람직한 중쇄만의 항체 단편은 가용성 항원 특이적 V_H 결합 영역이다.
- [0218] 또한, 본 발명은 효소 저해제 또는 수용체 차단제로서 본 발명에 따르는 항원 특이적 단일쇄 항체 또는 V_H 결합 영역의 사용을 제공한다.
- [0219] 또한, 본 발명은 치료제, 영상제, 진단제, 항체효소 또는 시약으로서 사용을 위하여 이펙터 분자에 융합된 V_H 영역의 사용을 제공한다.
- [0220] **일반적인 기술**
- [0221] 다르게 정의가 되지 않는다면, 여기에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 당업자들에 의해 통상적으로 이해되는 바와 같은 동일한 의미를 갖는다(예를 들어, 세포 배지에서, 분자유전학, 핵산화학, 잡종형성기술 및 생화학). 표준 기술은 분자, 유전학 및 생화학적 방법(Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed.(1989) Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 및 Ausubel 등, *Short Protocols in Molecular Biology*(1999) 4th Ed., John Wiley & Sons, Inc.)과 화학적 방법을 사용하였다. 추가적으로, Harlow & Lane, *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.를 표준면역학적 기술에 대하여 참고하였다.
- [0222] 어떤 적당한 재조합 DNA 기술은 본 발명의 2가와 다가의 폴리펩티드 복합체, 단일 중쇄 항체 및 이들의 단편의 생산에 사용될 수 있다. 플라스미드와 같은 전형적인 발현 벡터는 폴리펩티드 복합체 또는 항체의 쇠 각각을 코딩하는 DNA 서열을 포함하여 구성된다. 면역글로불린의 효소적 절단 및 화학적 절단과 결과적으로 얻은 단편의 분리를 위한 어떤 적절한 확립된 기술이 사용될 수 있다.
- [0223] 또한, 본 발명은 형질전환 마우스에서 중쇄만의 항체의 발현과 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 구성과 발현을 위한 구조물을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0224] 단일 벡터는 더 많은 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 DNA 서열을 포함하여 구성될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들면, 두 개의 상이한 중쇄를 코딩하는 DNA 서열은 동일한 플라스미드의 상이한 위치에 삽입될 수 있다.
- [0225] 택일적으로, 각각의 폴리펩티드 쇠를 코딩하는 DNA 서열은 플라스미드에 개별적으로 삽입될 수 있으므로, 다수의 구성된 플라스미드를 생성하고, 각각은 특별한 폴리펩티드 쇠를 코딩한다. 바람직하게는, 서열들이 삽입되는 플라스미드들이 양립가능하다.
- [0226] 다음으로, 각각의 플라스미드는 숙주세포를 형질전환시키기 위해 사용되므로 각각의 숙주세포는 폴리펩티드 복합체 내에서 폴리펩티드 쇠의 각각을 코딩하는 DNA 서열들을 포함한다.
- [0227] 박테리아 시스템에서 클로닝을 위해 사용될 수 있는 적당한 발현벡터는 Col E1, pcR1, pBR322, pACYC184 및 RP4, 파아지 DNA 또는 이들 중의 어느 것의 유도체를 포함한다.
- [0228] 효모 시스템에서 클로닝하기 위하여, 적절한 발현벡터는 2 마이크로 오리진(2 micron origin)에 기초한 플라스미드를 포함한다.
- [0229] 적절한 포유동물 유전자 프로모터 서열을 포함하는 어떤 플라스미드는 포유동물 시스템에서 클로닝에 사용될 수 있다. 곤충 또는 배칼로바이러스 프로모터 서열은 곤충세포 유전자 발현을 위해 사용될 수 있다. 이러한 벡터들은, 예를 들면, pBR322, 소과의 유두종 바이러스, 레트로바이러스, DNA 바이러스 및 우두 바이러스로부터 유래된 플라스미드를 포함한다.
- [0230] 폴리펩티드 복합체 또는 항체의 발현을 위해 사용될 수 있는 적절한 숙주세포는 박테리아, 효모 및 곤충 또는 포유동물 세포주와 같은 진핵세포, 형질전환 식물, 곤충, 포유동물 및 다른 무척추동물 또는 척추동물 발현 시스템을 포함한다.
- [0231] **본 발명의 폴리펩티드 복합체와 단일 중쇄 항체**

- [0232] 또한, 본 발명의 용어 "폴리펩티드 복합체", "단일 중쇄 항체" 및 "이형 중쇄 유전자좌"는 어떤 소스, 예를 들면, 관련된 세포성 동종, 다른 종과 이들의 변종 또는 유도체로부터의 관련된 동종으로부터 얻어지는 동종 폴리펩티드와 핵산 서열을 포함한다.
- [0233] 따라서, 본 발명은 여기에서 설명된 바와 같은 폴리펩티드 복합체와 항체의 변종, 동종 또는 유도체를 포함한다.
- [0234] 본 발명에서, 상동 서열은 적어도 30, 바람직하게는 50, 70, 90 또는 100 아미노산을 넘는 아미노산 수준에서, 적어도 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9% 동일성, 바람직하게는 적어도 98% 또는 99% 동일성이 있는 아미노산 서열을 포함하도록 취해진다. 또한, 비록 상동성이 유사성의 용어(즉, 유사한 화학적 성질/기능을 갖는 아미노산 잔기)로 나타나지만, 본 발명에서, 서열 동일성의 용어로 상동성으로 표현하는 것이 바람직하다.
- [0235] 또한, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 복합체와 항체의 제조시에 사용하기 위한 구성된 발현 벡터와 형질전환된 숙주세포를 포함한다.
- [0236] 동일한 숙주세포 내에서 각각의 쇠의 발현 후, 이들은 완전한 폴리펩티드 복합체 또는 중쇄만의 항체를 활성 형태로 제공하도록 회수될 수 있다.
- [0237] 본 발명의 바람직한 형태에서, 개별적인 중쇄는 숙주세포에 의해 가공되어, 거기로부터 유리하게 분비되는 완전한 폴리펩티드 복합체 또는 항체를 만들 수 있다. 바람직하게, 이펙터 쇠는 숙주세포에 의해 또는 합성장치에 의해 각각 생성된다.
- [0238] 제조항체 폴리펩티드 복합체의 제조를 위한 기술은, 상기 참고내용에 설명되어 있고, 또한 EP-A-0 623 679; EP-A-0 368 684 및 EP-A-0 436 597에 설명되어 있다.
- [0239] **형질전환 생물의 면역화**
- [0240] 또 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 형질전환 생물에 항원을 투여하는 것을 포함하는 본 발명의 항체의 생산 방법을 제공한다.
- [0241] 본 발명의 형질전환 동물로부터 생산된 항체들과 폴리펩티드 복합체는 폴리클로날항체 및 단일클론항체와 이들의 단편을 포함한다. 폴리클로날항체를 원한다면, 형질전환 동물(예, 마우스, 토끼, 염소, 말 등)은 공지된 절차들에 의해 수집되고 처리된 면역화된 동물로부터의 항원과 혈청으로 면역시킬 수 있다. 폴리클로날항체를 포함하는 혈청이 다른 항원에 대한 항체를 포함한다면, 관심있는 폴리클로날항체는 당업자들에게는 친숙할 수 있는 면역친화성 크로마토그래피와 그와 유사한 기술들에 의해 정제될 수 있다. 또한, 폴리클로날 항혈청을 생산하고, 가공하기 위한 기술은 공지이다.
- [0242] **본 발명의 폴리펩티드 결합 복합체 및 항체의 사용**
- [0243] 본 발명의 폴리펩티드 복합체와 이들의 단편을 포함하는 항체는, 생체 내 치료와 예방에 적용, 시험관 내와 생체 내에서의 진단에 적용, 시험관 내 검정 및 시약 적용 등에 이용될 수 있다.
- [0244] 본 발명의 폴리펩티드 복합체와 항체의 치료 및 예방을 위한 사용은, 인간과 같은 수령(recipient) 포유동물에 이들의 투여를 포함한다.
- [0245] 적어도 90~95% 상동성을 갖는 이들의 단편을 포함하는 실질적으로 순수한 폴리펩티드 복합체와 항체는 포유동물에 투여하기에 바람직하고, 98~99% 이상의 상동성은 약학적 사용, 특히 포유동물이 인간일 때 가장 바람직하다. 목표하는 부분적으로 또는 균질하게 일단 정제된 여기에서 설명된 바의 폴리펩티드 복합체와 중쇄만의 항체는 (여분의 유형을 포함하는) 진단 또는 치료 또는 당업자에게 공지된 방법을 사용하는 검정 과정을 개발하고 수행하는데 사용될 수 있다.
- [0246] 일반적으로, 본 발명의 폴리펩티드 복합체와 항체는 약학적으로 적절한 담체와 함께 정제된 형태로서 이용가능하다. 전형적으로, 이 담체는 염수 및/또는 완충 배지를 포함할 수 있는 수성 또는 알코올/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 비경구적 운반체는 염화나트륨용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스 및 염화나트륨 및 젖산화 링거를 포함한다.
- [0247] 현탁액 내에서 폴리펩티드 복합체를 유지하는 것이 필요하다면, 적당한 생리학적으로 허용가능한 보조제들이 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴 및 알키네이트와 같은 농축제로부터 선택될 수 있다.

- [0248] 정맥용 운반체는 링거의 텍스트로오스에 기초를 둔 것들과 같은 유체와 영양보충제와 전해질 보충제를 포함한다. 또한, 항미생물제, 산화방지제, 킬레이팅제와 불활성 기체와 같은 방부제 및 다른 첨가제도 존재할 수 있다(Mack(1982) Remington's Pharmaceutical Science, 16th Edition).
- [0249] 본 발명의 폴리펩티드 복합체와 이들의 단편을 포함하는 항체는 따로 투여되는 조성물 또는 다른 약제들과 함께 사용가능하다. 이들은 시클로스포린, 메토티렉세이트, 아드리아마이신, 시스플라티늄 또는 이뮤노독신과 같은 여러 가지의 면역치료용 약제를 포함할 수 있다. 택일적으로, 폴리펩티드 복합체는 그들의 작용 부위에서 프로드러그의 전환을 위해 효소들과 함께 사용될 수 있다.
- [0250] 약학적 조성물은 본 발명의 선별된 항체와 결합한 여러 가지의 세포독성제 또는 다른 제제와의 "각테일" 또는 본 발명의 선별된 항체의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0251] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 당업자에게 통상적으로 공지된 것 중의 어느 것일 수 있다. 치료를 위하여, 면역치료를 제한 없이, 본 발명의 폴리펩티드 복합체 또는 항체는 표준기술에 따라서 어떤 환자에게도 투여될 수 있다. 투여는 비경구, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피부, 폐 경로 또는 적절한 카테터로 직접 투여하는 것을 포함하는 어떤 적절한 방법에 의해 이루어질 수 있다. 투여량과 빈도는 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라서 다른 약제의 동시 투여와 카운터-인디케이션(counter-indication) 및 의사에 의해 고려될 수 있는 다른 매개 변수에 따라 달라질 수 있다.
- [0252] 본 발명의 폴리펩티드 복합체와 항체는 저장을 위해 동결건조될 수 있고, 사용하기 전에 적당한 담체에서 재구성될 수 있다. 공지된 동결건조 및 재구성 기술이 적용될 수 있다. 동결건조 및 재구성은 기능 활성도 손실의 정도 변화를 초래할 수 있고, 사용수준이 보상되도록 상향 조절되어야 한다는 것을 당업자는 이해할 것이다.
- [0253] 추가적으로, 본 발명의 폴리펩티드 복합체와 항체는 진단목적으로 사용가능하다. 예를 들면, 여기에서 설명된 바의 항체는 질병상태 동안 특별히 발현되거나, 또는 질병상태 동안에 그 수준이 변화하는 항원에 대해 생성 또는 발생할 수 있다.
- [0254] 진단 또는 추적 목적과 같은 특정한 목적을 위하여, 표지가 첨가될 수 있다. 적절한 표지는 제한되지는 않지만, 다음 중의 어떤 것을 포함한다: 방사성 표지, NMR 스핀 표지 및 형광 표지. 표지의 검출 방법은 당업자들에게는 익숙할 것이다.
- [0255] 본 발명의 폴리펩티드 복합체와 항체 또는 이들의 각테일을 포함하는 조성물은 예방 및/또는 치료적 처치를 위해 투여될 수 있다.
- [0256] 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 복합체 또는 항체를 포함하는 조성물은 포유동물에서 선택 표적 세포 집단의 변화, 불활성화, 사멸 또는 제거를 도와주기 위한 예방과 치료 세팅에 이용될 수 있다. 추가적으로, 여기에서 설명된 폴리펩티드 복합체와 항체의 선택된 레퍼토리는 세포의 이종 집단으로부터 표적 세포 집단을 죽이거나, 고갈시키거나, 또는 그렇지 않으면 효과적으로 제거시키는데 생체 외 또는 시험관 내에서 선택적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0257] 도 1A 및 1B는 결합 영역(V_H) 이합체화 영역(선택적으로, C_H2 , C_H3 및 C_H4)과 이펙터 부분(EM)을 포함하는 폴리펩티드 복합체를 보여준다. 결합 영역과 이펙터 부분은 이합체화 영역의 아미노 또는 카복시 말단에 위치될 수 있다. 유연성 링커(\leftarrow)와 힌지(\int) 영역이 예시되어 있다.
- 도 2A 및 2B는 결합 영역의 상이한 배치와 또 다른 결합영역에 의한 이펙터 부분의 대체를 보여준다. A. 동형이합체가 생산되는 바람직한 옵션. 생성물의 분리가 필요없음. B. 동형이합체와 이형이합체 혼합물이 생성. 생성물의 분리가 필요.
- 도 3은 이펙터 쇄와 회합된 중쇄 폴리펩티드 복합체를 보여준다. 이펙터 쇄는 상보적인 결합 영역(CBD)과 이펙터 부분(EM)을 포함한다. 상보적 결합 영역(CBD)은 중쇄의 EM(이펙터 부분)에 의해 인식된다. CBD는 이펙터, 예를 들면 효소, 독신, 킬레이터, 영상제 또는 이들의 일부에 융합된다. 이펙터 쇄는 중쇄로부터 별도로 합성될 수 있다.
- 도 4는 J쇄와 회합된 2가의 분비성 IgA를 보여준다.
- 도 5는 J쇄를 통해 어셈블링된 다가의 중쇄만의 IgM-유사 폴리펩티드 복합체를 보여준다.

도 6은 IgG 유전자좌를 발현하는 형질전환 마우스의 생성을 위한 전략을 보여주고, 항원 노출의 결과로서 중쇄만의 항체들과 V_H 영역의 작용적 생성을 위한 전략을 보여준다.

도 7은 IgM 유전자좌를 발현하는 형질전환 마우스의 생성 전략을 보여주고, 항원 노출의 결과로서 중쇄만의 항체와 V_H 영역의 작용적 생성을 위한 전략을 보여준다.

도 8은 IgA 유전자좌를 발현하는 형질전환 마우스의 생성 전략을 보여주고, 항원 노출의 결과로서 중쇄만의 항체와 V_H 영역의 작용적 생성을 위한 전략을 보여준다.

도 9는 PCR 생산물의 서열 정렬은 C_H1을 제거하기 위해 카멜리드 스플라이스 변이를 갖는 불변 영역을 가지는 유전자좌를 포함하는 마우스로부터의 인간 C_γ2 프라이머와 조합된 V_H1과 V_H2 프라이머를 사용하여 골수 cDNA로부터 얻어졌다.

도 10~13은 V_H/카멜리드 V_H(V_H) 구조물의 구조이다. 1-n은 V_H 유전자 또는 D 또는 J 단편의 어떤 수(number)를 의미한다. 인간 유전자좌의 정상적인 상보물은 51개의 V 유전자, 25개의 작용적 D 단편(+ 2개의 비작용적 D 단편) 및 6개의 J 단편이다. (IgM에 대한) C_μ 또는 (IgE에 대한) C_ε 영역에서, H 영역은 없고, C_H3과 M1 사이에는 추가적인 C_H4 엑손이 있다. V_H 유전자(들)은 공개된 영역에서 설명된 바와 같이 용해도를 제공하기 위하여 변이되었다.

바람직하게, V_H 유전자, D와 J 단편 및 C 엑손은 인간이지만, 카멜리드를 포함하는 어떤 다른 종들로부터 일 수 있다. 후자의 경우에, 카멜리드 V_H(V_H) 유전자는 그들이 자연적으로 가용성이기 때문에 변이될 수 없다.

도 14는 대장균 HSP70에 대한 중쇄만의 IgG 생성을 위한 마우스 면역화 스케줄과 항체 검정을 나타낸다.

도 15는 형질전환 마우스 유래의 체장 세포에 대한 플로우 사이토메트릭 분석(Flow cytometric analysis)과 면역조직화학 결과(immunohistochemistry results)이다.

도 16은 DKTP 면역화된 형질전환 마우스의 ELISA 분석의 결과와, 결과의 항체 라이브러리의 서열 분석을 보여준다.

도 17은 면역화된 형질전환 마우스에서 나타난 체세포 변이와 VDJ 재배열의 예를 보여준다.

도 18은 A5 항체를 포함하는 반응 플라즈미드로써 트랜스펙션된 Tet-on 세포주의 면역염색 검정의 결과를 나타낸다.

도 19는 형질전환 마우스 계통 혈청의 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)의 결과를 나타낸다.

도 20은 IgM + IgG 유전자좌 마우스에 의해 생산된 인간 단일쇄 IgM과 혼합된 인간 IgM의 크기 분별을 나타낸다.

도 21은 인간 TNF α에 대한 단일쇄 IgM과 IgG 항체의 ELISA 분석의 결과를 나타낸다.

도 22는 HSP70과 αGAG에 대한 결합 친화성을 지닌 동형이합체 플라즈미드의 생성을 위한 전략을 보여준다.

도 23은 CHO 세포에서 동형이합체 폴리펩티드 복합체의 작용적 발현을 나타낸다.

도 24는 αGAG와 HSP70에 대한 동형이합체 폴리펩티드 복합체의 작용적 결합과 동시성을 나타낸다. 2가 이특이적 항체의 대표적인 도해. 제2의 가변 영역(V_H2는 gag를 향하고 있음)은 다른 특정(V_H1은 HSP70을 향하고 있음)을 포함하는 중쇄만의 항체의 카복시 말단으로 클로닝된다. C_H3와 V_H2 사이에 있는 힌지 영역은 링커 영역에 의해 대체되었고, 여기에서 모든 시스테인은 프롤린(화살표)에 의해 대체되었다. Gag로써 ELISA 플레이트를 코팅하고, PBS 중의 1% 밀크/ 1% BSA로써 블로킹하고, 처음에는 디아바디 배지(1:2로 희석), 다음으로 BI21 세포 용해물(HSP 70을 포함)(1:2로 희석)로 항온처리했다. 용리액은 시료완충액=2-머캅토에탄올로 단백질에 결합되었고, 8%겔상으로 흘려보냈다. Gag, 디아바디 및 HSP70에 대해 폴리/단일클론항체로 염색했다. α Gag: 토끼 폴리클로날/돼지 α 토끼-AP(청색). α HSP70: 단일클론/염소 α 인간 IgG-HRP(갈색). α 디아바디: 염소 α 인간 IgG-HRP(갈색). 레인 1: Gag/디아바디/BI21 세포 용해물. 레인 2: Gag/배지(디아바디 음성 대조군)/BI21. 레인 3: -밀크-BSA/디아바디/BI21. 레인 4: -밀크-BSA/배지/BI21. 레인 5: Gag/디아바디/-밀크-BSA. 레인 6:

Gag/배지/-밀크-BSA.

도 25는 선택적으로 IgA 이펙터 기능을 가지는 이펙터 쇄와 회합된 동형이합체 폴리펩티드 복합체의 생성을 위한 전략을 보여준다.

도 26은 선택적으로 IgA 이펙터 기능을 가지는 이펙터 쇄와 회합된 동형이합체 폴리펩티드 복합체의 생성을 위한 전략을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1

예비실험에서, 형질전환 마우스는 중쇄 유전자좌를 발현하도록 준비하였고, 여기에서 두 마리의 라마 V_H 엑손은 인간 중쇄 다양성(D) 및 결합(J) 단편과 연결하고, 이어서 C_μ, C_δ, C_γ2, C_γ3 인간 불변 영역 유전자와 인간 중쇄 면역글로불린 3' LCR에 연결하였다. 인간 C_γ2와 C_γ3 유전자는 G-A 스플라이싱 변이를 포함하였다. Frt 부위의 존재는 Flp 매개 재조합에 의해 다수의 카피(copy) 트랜스진 어레이(transgene array)로부터 단일 카피 형질전환 마우스의 생성을 가능케 했다. 그러나, G-A 스플라이싱 변이를 가진 형질전환 유전자좌로부터의 서열은 착오 스플라이싱을 보이고, 불완전한 C_H1 제거를 보여주었다(도 9).

구조물

이같은 문제를 극복하기 위하여, 게놈 코스미드 라이브러리는 표준 방법을 사용하여 V_H 유전자를 포함하는 클론에 대해 스크리닝 처리했다. 한 (또는 그 이상의) 상이한 생식계열 VHs는 그들의 서열에 바탕을 두고서 무작위로 선택되었다(인간 VHs의 경우에 5개씩 부류임). 친수성의 아미노산 코돈들이 IMGT 넘버링에 따른 42, 49, 50 및 52 위치에 도입되었다(Lefranc 등 (1999)). V_H 유전자는 주문 제작된 링커 또는 상동성 재조합을 사용하는 직접 클로닝과 같은 표준 방법에 의해 BAC 벡터내로 조합되었다.

두 개의 클론은 인간 게놈 Pac 라이브러리 RPCI-11(BACPAC Resource Center, USA)로부터 선별되었다: 인간 중쇄 D 및 J 단편, C_μ(IgM) 및 C_δ(IgD)를 포함하는 클론 1065 N8 및 C_γ3(IgG3) 유전자를 포함하는 클론 1115 N15. 다른 인간 게놈 라이브러리(Incyte Genomics, CA, USA)로부터의 Bac 클론 11771은 C_γ2(IgG2) 유전자와 면역글로불린 중쇄 LCR(Mills 등 (1997) J.EXP. Med., 15;186(6):845-58)의 소스로서 사용되었다.

표준 기술을 사용하여, C_γ3와 C_γ2 유전자는 분리되어 pFastBac 벡터(Invitrogen) 내로 서브클로닝되었다. 유사하게, 다른 Ig 불변 영역의 어떤 것도 이들 BACs(IgA, IgE)로부터 클론될 수 있다. C_H1엑손의 완전한 결실은 각각의 불변 영역의 C_H1 엑손 측면의 서열을 사용한 상동성 재조합(Imam 등, (2001))으로 이루어졌다. frt 부위는 표준 방법, 예를 들면, 육종에 의해 rosa-flp 마우스를 생체 내 flp 재조합효소로 처리하여 다중 카피 유전자좌로부터 단일 카피 유전자좌의 생성을 가능하게 하는 C_μ 스위치 지역의 전면에 선택적으로 도입될 수 있다(도 10).

분리된 V_H 유전자, D와 J 단편 및 C와 LCR 엑손은 전통적 제한효소 절단 및 라이게이션 또는 상동성 재조합 (또는 양자의 혼합) 또는 어떠한 클로닝 기술에 의하여 한 BAC내로 클로닝된다.

그 후에 추가의 구조물들이 생성될 수 있다.

IgM 만의 유전자좌

IgM 구조물을 얻기 위하여(도 11), 하나 이상의 V_H 유전자(바람직하게는, 용해성을 제공하도록 설계된 인간 V_H 유전자 또는 카멜리드 V_H 유전자)를 BAC에 클로닝하고, 뒤이어 인간 D와 J 중쇄 단편과 C_μ를 클로닝하였다. 이 경우에, C_μ 영역만이 최종의 BAC내로 클로닝되었다.

IgM + IgG 유전자좌(C_δ는 선택적)

IgM + IgG 구조물을 얻기 위하여(도 12), 하나 이상의 V_H 유전자(바람직하게는, 용해성을 제공하도록 설계된 인간 V_H 단편 또는 카멜리드 V_H 유전자)를 BAC내로 클로닝하고, 뒤이어 인간 D와 J 중쇄 단편, C_μ(C_H1은 없지만, C_H4 엑손이 존재), (선택적으로 C_δ)와 개량된 인간 C_γ2와 C_γ3 유전자 및 3' LCR을 클로닝하였다. IgG만의 유전자좌를 생성시키기 위하여, loxP 부위를 표준 클로닝 단계(위에 설명)에서 도입시키고, BAC는 294 Cre 대장균

중에서 성장시키고(Buscholz 등), cre 매개 재조합에 의해 IgG만의 유전자좌를 생산하는 세균을 획득하였다. 추가의 구조물에 대해서는 상기 내용을 참조.

[0270] **IgM + IgG 유전자좌(C δ 은 선택적)**

[0271] IgM + IgG 구조물을 얻기 위하여(도 13), 하나 이상의 V_H 유전자(바람직하게는, 용해성을 제공하도록 설계된 인간 V_H 단편 또는 카멜리드 V_H 유전자)를 BAC내로 클로닝하고, 뒤이어 인간 D와 J 중쇄 단편, (C_H1 및 C_H4를 가진)C _{μ} , (선택적으로 C δ)와 변형된 인간 C γ 2와 C γ 3 유전자 및 3' LCR을 클로닝하였다. IgG만의 유전자좌를 생성시키기 위하여, loxP 부위를 표준 클로닝 단계(위에 설명)에서 도입시키고, BAC는 294 Cre 대장균 중에서 성장시키고(Buscholz 등), cre 매개 재조합에 의해 IgG만의 유전자좌를 생산하는 세균을 획득하였다.

[0272] **형질전환 마우스, 육종 및 유전자형**

[0273] 최종의 BAC는 수정된 난자의 표준 마이크로인젝션 또는 앰브리오 줄기 세포 트랜스펙션 기술을 통하여 형질전환 마우스로 도입하였다.

[0274] 형질전환 유전자좌는 5'와 3' 말단 유전자좌 프로브를 사용하여 꼬리 DNA(tail DNA)의 서던 블랏 분석(Southern 1975)에 의해 통합성 및 카피의 숫자에 대해 체크했다. 파운더(founder)는 μ MT^{-/-}백그라운드에서 계통별로 육종되었다. 유전자형 분석은 각각의 다른 영역의 유전자좌에 대하여 프라이머를 사용하는 표준 PCR 분석에 의해 실시했다. C γ 2와 C γ 3 양쪽으로부터의 완전한 C_H1 엑손이 결실(HLL 계통을 지닌 하나와 C _{μ} 와 C δ 유전자가 없는 하나)된 형질전환 마우스의 BM cDNA로부터 유래된 RT-PCR 생성물의 서열분석은, 형질전환 유전자좌는 VDJ 재조합을 할 수 있을 뿐만 아니라, IgG 전사체는 라마와 낙타 HCab에서 발견되는 것과 유사함을 보여주었다.

[0275] **면역조직화학**

[0276] 췌장을 OCT 화합물에 묻어 두었다. 냉동된 5 μ m 박편(cryostat section)을 아세톤에서 고정시키고, 이미 설명한 바와 같이, 단일 또는 이중 표지로 처리했다(Leenen 등, 1998). 단일클론항체, 항 B220/RA3-6B2, 항 CD11c/N418(Steinman 등, 1997)을 하이브리도마 배양 상등액에 적용했다. 퍼옥시다아제가 커블링된 염소 항-인간 IgG 및 항-인간 IgM은 시그마 회사 제품이였다. 2단계 시약들은 퍼옥시다아제 표지가 붙은 염소 항-쥐 Ig(Dako, Glostrup, 덴마크) 또는 항-햄스터 Ig(Jackson Immuno Research Lab., Wect Grove., PA)와 염소 항-쥐 Ig 알칼라인 포스파타아제(Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA)였다.

[0277] 도 15는 μ MT^{-/-} 백그라운드에서 μ MT^{-/-}, WT 및 HLL 및 HLL-MD 형질전환 마우스로부터의 췌장의 동결된 5 μ m 박편의 면역조직화학적 분석결과를 보여준다. 박편은 B 세포에 대하여 항 B220(청색), 수지상 세포에 대하여 항 CD11c/N418(갈색)으로 염색되었다. 화살표들은 B-세포의 작은 덩어리의 위치를 나타낸다.

[0278] **플로우 사이토미터 분석(Flow Cytometric Analysis)**

[0279] 단일 세포 현탁액은 이미 설명된 바에 따라서 PBS 내의 임파성 기관으로부터 제조했다(Slieker 등, 1993). 약 1 $\times 10^6$ 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 96웰 플레이트 내의 PBS/0.5% BSA(bovine serum albumin) 내에서 항체와 함께 항온처리했다. 세포를 PBS/0.5% BSA로 2회 세척했다. 각각의 시료에 대하여 FAC Scan 분석기(Becton Dickinson, Sunnyvale, CA)를 사용하여 3 $\times 10^4$ 이벤트를 기록했다.

[0280] FACS 데이터를 셀 퀘스트 버전 1.0(Cell Quest version 1.0) 컴퓨터 소프트웨어를 사용해 분석했다. 4-색상 분석은 벡톤 디킨슨 FACS 칼리브(Becton Dickinson FACS Calibur) 상에서 실시되었다. 다음의 mAb는 BD Pharmingen(SanDiego, CA)으로부터 구입되었다: FITC 콘주게이션된 항 B220-RA3-6B2, PE 콘주게이션된 항 CD19. 항 CD19와 항 B220으로 염색된 췌장세포의 FACS 스캔 데이터는 도 15의 바닥 패널 내에 나타내었다.

[0281] 도 15의 좌측면 상에는, HLL 계열을 F1p ϵ R 형질전환 계열로 육종함에 의한 생체 내 F1p 재조합을 나타내고, 이는 상기 재조합체의 췌장 세포상의 FACS 스캔 데이터를 지지하고, 직접적으로 생성된 원래의 HLL-MD계통에서 보여지는 것과 같은 B 세포 구출을 보여준다. 도 15의 우측면 상에는 Cag Cre 형질전환 계열로 육종함에 의한 생체 내 Cre 재조합과 단일 카피 재조합체의 췌장 세포상의 FACS 데이터를 나타낸다.

[0282] **면역화 및 하이브리도마 생산(도 14)**

[0283] 두 마리의 라마 V_H 영역, 인간 D와 J 영역과 IgG2와 3 불변 영역(C_H1 영역이 없음)으로 이루어진 중쇄만의 항체

유전자좌를 포함하는 형질전환 마우스를 작출하였다.

- [0284] 8주 된 마우스를 대장균 열 충격 단백질 70(hsp70)으로 면역화했다. 스페콜 보조제(IDDLO, Lelystadt, NL)와 함께 20 또는 5 μ g의 항원을 0, 14, 28, 42일째에 피하주사하고, 50일째에 복강내 주사했다. 혈액을 0, 14 및 45일에 취했다. 3회 부스팅(boosting) 후 항원 특이적 항체의 낮은 적정치는 Hsp70 면역화된 HLL-MD1 마우스 3 마리 중 1 마리에서 검출되었다(도 14).
- [0285] 골수종 세포주를 이용한 표준 체장 세포 융합이 단일클론항체를 생산하기 위하여 수행되었고, 그 결과 hsp70 단백질에 대항하는 단일클론 하이브리도마 세포주가 생성되었다. 항-HSP 70HCAb는 인간 IgHD3-10 단편(기탁번호 X13972)과 인간 IgHJ4-02 단편(기탁번호 X86355)에 재조합된 D 영역(V_H 2)에 가장 근접한 라마 V_H 단편으로 구성된다. 고빈도는 아니지만, V_H은 생식계열 상과 비교시 도 9A에서 알 수 있듯이 아미노산 변화를 일으키는 다소의 변이를 갖는다. 또한, RT-PCR 분석은 하이브리도마에서 단지 한 생산적인 IgH 전사체가 보여지는데, 이것은 다른 전사체를 만들지 않는다는 것을 시사한다. α HSP70 IgG2항체는 중쇄만의 이합체로서 분비된다(변성겔(이합체)과 비변성겔(단량체)조건에서 웨스턴 블랏, 도 14). 체장세포는 제조자의 지시서에 따라 ClonalCell TM-HY 키트(StemCell Technologies, UK)를 사용하여 56일에 Sp2-O-Ag14 골수종 세포(R. Haperen으로부터 기증)와 융합되었다.
- [0286] 두 마리의 라마 V_H 영역, 인간 D와 J 영역, 인간 IgM과 IgG2와 3 불변 영역으로 이루어진 중쇄만의 항체 유전자좌를 포함하는 형질전환 마우스(모두 C_{H1} 영역이 없음. 도 12)를 TNF α 로써 면역화시켜, HC-IgM 항체를 얻었다. 3 마리 중 1 마리의 마우스는 표준 ELISA 분석평가에서 양성 혈청을 보여주었다. 표준 골수종 융합은 양성 IgM 하이브리도마를 생성시켰다(도 16). 비환원 조건하에서 세포파조 6B 상에서 겔 여과 후, 컬럼 내의 각각의 분액은 환원된 조건 하에서 겔로 로딩되고, α -인간 IgM-HRP에 의해 검출되었다(도 20). 비환원 조건 하에서의 분획은, HC-IgM은 인간 대조군 IgM과 같은 크기를 지닌 다량체 항체로서 분비됨을 보여주었다(HC-IgM으로부터 존재하지 않는 경쇄 및 C_{H1} 영역의 분자량을 뺀 후). 환원조건 하에서 각각의 컬럼 분액의 겔 분획은 (도 20)의 기대되는 단량체를 보여주었다.
- [0287] **혈청 Ig ELISA**
- [0288] 15~25주 된 마우스로부터의 혈액을 EDTA 피복된 튜브 내에 모으고, 실온에서 15분간 회전시키고, 상등액을 PBS 내에서 1:5로 희석했다. 96-웰 플레이트를 염소 항 인간 IgG(YES Biotechnology) 또는 염소 항 인간 IgM(시그마) 5mg/ml로써 2시간 동안 코팅하고, PBS로 세척하고, 블로킹용액(1.5% BSA/1.5% 밀크분말/0.1% Tween 20/PBS)으로 실온에서 1시간 동안 블로킹하고, PBS로써 3회 세척했다. 일련의 혈청시료와 표준물(인간 IgG2 또는 인간 IgM(시그마, Zwijndrecht, NL))의 희석물들을 넣고 2~4시간 동안 항온처리하고, 2차 항체(HRP(시그마, Zwijndrecht, NL)에 커플링된 1:2000으로 희석된 염소 항-인간 IgG 또는 염소 항 인간 IgM)를 첨가하기 전에 PBS로써 6회 플레이트를 세척했다. 모든 희석액들을 블로킹액 내에서 처리했다. 실온에서 1~2시간 항온처리 후에, PBS 내에서 세척하고, POD 기질(Roche)을 첨가했다.
- [0289] IgG2 파아지 라이브러리로부터 항원 특이적 가용성 sdAb의 감지를 위한 ELISA는 도 16에 설명되어 있다. 가용성 sdAb는 항원-피복된 플레이트 상에서 일차항체로 사용되었고, 이어서 마우스 α -myc 항체와 HRP 접합된 염소- α -마우스 항체가 사용되었다. POD는 기질로서 사용되었다. 패널의 아래는 백일해에 대한 sdAb를 코딩하는 5개의 다른 인서트를 보여주는 제한효소 Hinf I을 사용한 클론의 핑거프린팅을 나타낸다.
- [0290] **항체 라이브러리 구성과 스크리닝**
- [0291] 전체 RNA는 Ultraspec RNA 분리 시스템(Biotech Lab. Inc. Houston. Texas, USA)을 사용하여, DKTP 면역화된 단일 카피 IgG만의 마우스의 체장으로부터 분리했다(cre 처치 후, 도 12). cDNA는 올리고 dT를 사용하여 만들었다. VHHDJ 단편을 코딩하는 DNA 단편은 특별한 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다: hIgG2hingrev 프라이머(5'-AATCTGGGCAGCGCGCCTCGACACAACATTTGCGCTC-3')와 조합된 vh1 back Sfi I 프라이머. 증폭된 VHHDJ(~400bp)는 Sfi I/Not I 다이제스트되었고, 겔 정제되었고, Sfi I/Not I 다이제스트된 파아지미드 벡터 pHEN-1내로 클로닝되었다.
- [0292] TG1 일렉트로-컴피턴트(electro-competent) 세포로의 형질전환으로 인간 단일 영역 항체 라이브러리를 수득했다. 2회의 선별은 플라스틱(희석되지 않은 백신으로 코팅된 면역튜브) 상에 흡착된 백신 항원상에 패닝(panning)하여 수행되었다. 제한효소분석과 서열이 표준이 되었다.

[0293] **중쇄만의 유전자좌의 RT-PCR**

[0294] 다음으로, HLL-MD 유전자좌가 페이어 패치(Peyer's patch)로부터 cDNA 상에 IgG2와 IgG3 특이적 프라이머를 사용하여 얻어진 RT PCR 산물을 서열화시킴으로써 다양한 항체 레퍼토리를 생산하는데 있어서 정상적인 유전자좌로서 기능을 하는지에 대하여 조사했다. 도 17은 비면역화 마우스로부터 클론(왼쪽 패널)과 면역화 마우스로부터의 클론(우측패널)의 체세포 변이의 몇 가지 예들을 보여준다. 마우스는 IgG만의 유전자좌, 면역화된 대장균 hsp70, 백일해 용해물, 과산화물, 과산화물 특소이드였다. 회색 그림자는 ERKCCV로써 출발하는 IgG2 힌지 영역이었다.

[0295] 비록, 페이어 패치에 관한 RT-PCR 분석결과가 양쪽 모두의 V_H가 사용되는 것을 보여주었지만, 서열화된 모든 항체는 V_H2로 재배열되었다. 레퍼토리 가변성의 소스는 D와 J 단편의 선택 및 V-D와 D-J 결합에 의해 생성된 CDR3 영역이다. 인간 J 단편의 사용은 인간 재배열에서 보여준 것과 비슷하고, JH4와 JH6 단편이 가장 자주 사용된다.

[0296] 이 분석결과는 양쪽 모두의 V_H, 상이한 인간 D와 인간 J 단편의 모두가 다양한 항체 레퍼토리에 기여하도록 사용됨을 보여준다. 또한, 이것은 B 세포와 스위치된 IgG3의 존재와 각각의 재배열된 유전자와 그것의 생식계열 카운터파트, 즉 형질전환 구조물 내의 원래의 V_H(도 17)의 비교에 의해 체세포 변이의 발생을 보여주었다. 따라서, 인간 중쇄만의 IgG 항원 수용체는 B 세포 성숙을 위하여 필요한 시그널을 제공할 수 있다.

[0297] **면역염색**

[0298] 도 18은 A5 항체를 포함하는 반응 플라스미드로써 부가적으로 트랜스펙션된 Tet-on 세포주의 면역염색 결과를 보여준다(Dekker 등, 2003). 상부 패널은 세포질에서의 A5 항체의 독시시클린 유도 생산(적색)과 DAPI에 의한 세포의 핵염색(청색)을 보여준다. 하부 패널은 핵 내에서 rtTA를 발현하는 세포는 유도시에 A5를 생성하는 것임을 보여준다(상부패널). 염색은 아래에서 설명된 서열을 가진 rtTA(초록색)에 대한 인간 HCAB의 하나로써 실시되었다. FITC 콘주게이션된 염소 항-인간 IgG는 2차 단계로 사용되었다. A5는 Dekker 등 (2003)에 의해 이미 설명된 바에 따라 확인되었다. rTTA 항체는 다음의 서열을 지닌 IgG3이었다:

[0299] 241 AGACTCT
 [0300] 80 R L
 [0301] 301 CCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGTATCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTC
 [0302] 100 S C A A S G S I F S I N A M G W Y R Q A
 [0303] 361 CAGGAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGCTATTACTAGTGGTGGTAGCACAAGGTATGCAG
 [0304] 120 P G K Q R E L V A A I T S G G S T R Y A
 [0305] 421 ACTCCGTGAAGGGCCGATTCCACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGC
 [0306] 140 D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y L
 [0307] 481 AAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTTGATCTCTATGGTTC
 [0308] 160 Q M N S L K P E D T A V Y Y C L I S M V
 [0309] 541 GGGGAGCCCGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGAGCTCA
 [0310] 180 R G A R F D Y W G Q G T L V T V S S E L
 [0311] 601 AAACCCCACTT
 [0312] 200 K T P L

[0313] IgG3 힌지는 아미노산 198 ELKTP에서 출발한다. 비교를 위하여, 도 17에서 IgG2 힌지 영역을 참고.

[0314] **웨스턴 블랏 분석**

[0315] 도 19는 cre 처치 후(즉, IgM 결실, IgG만 남음), IgM + IgG 유전자좌(도 10)를 포함하는 상이한 형질전환 마우스 계통 혈청의 웨스턴 블랏을 보여준다. 혈청은 환원조건(도 19 오른쪽 패널)과 비환원조건(왼쪽 패널) 하에서 분획화된 prot G와 겔로 정제되었다. 대조군은 백그라운드 KO 마우스와 정상적인 인간 혈청 시료이다. 인간 중

쇄만의 IgG가 이합체인 것을 보여주는 두 개의 겔 사이에서의 크기 차이를 주목하라. 도 19에서 나타낸 시그널은 표준방법에 의해 항-인간 IgG 항체로써 검출되었다.

[0316] **IgM + IgG 유전자좌 마우스에 의해 생산된 인간 IgM의 크기 분획화**

[0317] IgM + IgG 마우스로부터의 혈청(도 13)은 대조군으로서의 인간 혈청 시료와 함께 혼합시킨 후 비환원조건 하에서 겔 여과에 의해 분획화되었다. 결과들은 도 20에 설명되어 있다. 컬럼 상에서 복합체의 분자량은 (각각의 분획을 나타내는) 각각의 레인(lane)에서 왼쪽으로부터 오른쪽으로 감소한다. 분획(각 레인)은 환원조건 하에서 겔 전기영동에 의해 분석되었다.

[0318] ELISA는 인간 TNF α 로써 면역화된 IgM + IgG(도 13) 유전자좌를 포함하는 마우스로부터 만든 다수의 하이브리도마에서 실시되었다. 결과들은 도 21에 설명되어 있다. 도 21에서 위의 2열은 항-인간 IgG로써 분석되었고, 다음의 두 열은 항-인간 IgM으로써 분석되었다. 혈청 샘플(화살표)은, 마우스는 IgG와 IgM 양쪽 모두의 항-TNF α 항체를 생성함을 보여준다. 웰(wells)은 상업적으로 이용성이 있는 인간 TNF α 로써 피복되었다. 모든 절차들은 표준이었다.

[0319] **실시예 2**

[0320] 이특이적, 2가 항체는 두 개의 중쇄만의 단일-특이적 항체들을 조합함으로써 생성되었다. 제1의 항체는 제1의 특성과 이펙터 기능(각각 가변 영역과 불변 영역)을 가져오는 기본 골격을 만든다. 이는 새로 디자인된 힌지를 통해서 제2의 특성을 지닌 제2의 항체와 조합된다. 이 힌지는 현존하는 IgG2 힌지 서열과 유사하지만, 항체 이합체 내에서 시스테인의 교차결합을 막기 위하여 프롤린으로 시스테인을 대체시킴으로써 변경되었고, 상기와 같이 변경되지 않았다면, 제2의 항체의 기능을 억제할수도 있는, 제2의 항체의 공간적인 한정을 막기 위하여 프롤린을 통해서 추가의 유연성이 제공된다.

[0321] 출발 기본 골격 항체는 대장균 HSP70 단백질에 대한 항체였다. HSP70 항원은 여기에서 설명된 바와 같이 중쇄만의 항체 유전자좌를 포함하는 형질전환 마우스로 주사되었다(위 도 14). 단일클론항체는 표준의 하이브리도마 융합기술(상기 참조)에 의해 이들 동물들로부터 생성된다. 다음으로, αHSP-항체를 코딩하는 cDNA는 표준 RT-PCR 재조합 DNA 방법들에 의해 클로닝되었고, 이로써 5' 말단으로부터 3' 말단에 이르기까지(N 말단으로부터 COOH 말단에 이르는 단백질에서), 시작코돈 ATG, 시그널 펩티드 서열, 가변 영역 V_H1(Janssens 등), 재조합된 D와 J 영역과 C_H2의 불변 영역(C_H1 영역이 결핍)을 포함하지만, 정지코돈과 폴리 A 부위(도 22 상부 왼쪽)를 포함하는 전장 cDNA를 포함하는 플라스미드가 얻어졌다. αHSP70 항체를 코딩하는 cDNA는 순방향 프라이머와 역방향 프라이머를 사용한 클로닝용 PCR에 의해 증폭되었다.

[0322] 순방향 프라이머는 클로닝 목적을 위한 EcoRI 부위(언더라인 표시), 효율적인 번역 시작 서열(볼드체) 및 정상적인 정지 코돈(회색 그림자 표시)을 제공하는 CTGGAATTC**TCA**ACCATGGAGCTGGGGCTGAGC이었다.

[0323] 역방향 프라이머는 HindIII 클로닝 부위(언더라인 표시)와 나머지는 정상적인 정지 코돈을 제공하는 GACAAGCTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC이었다.

[0324] 따라서, 증폭에 의해 EcoRI 부위(언더라인 표시), 효율적인 번역 시작 서열(볼드체) 및 αHSP 항체 유전자의 정상적인 시작 코돈(회색 그림자 표시, 도 22)을 포함하는 EcoRI/HindIII 단편이 얻어진다.

[0325] 역방향 3' 말단 프라이머는 HindIII 클로닝 부위(언더라인 표시)를 제공하고, 정상적인 정지 코돈이 제거된 GACAAGCTTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC이었다. 이로써 프로모터 서열 상에 클로닝하기 위한 EcoRI 부위와 발현 플라스미드 상에 5'말단과 신규의 힌지 서열 상에 3'말단을 클로닝하기 위한 HindIII 부위를 지닌 단편(도 22 왼쪽 상부로부터 두번째)이 얻어졌다. 마지막으로, 단편은 EcoRI과 HindIII로써 절단되어, 클로닝을 위한 적절한 단일의 가닥으로 된 말단을 제공한다.

[0326] 제2의 특이성을 가져오는 제2의 클론된 항체는 돼지 레트로 바이러스(PERV) gag 항원에 대한 라마 항체의 V_H 영역을 포함하였다(Dekker 등, (2003) J.Virol., 77(22); 12132-9, 도 22 상부 오른쪽). αgag는 다음의 프라이머를 사용하는 표준 PCR 증폭을 통해서 증폭되었다:

[0327] 순방향 프라이머: GTCCTCGAGGCCAGGTCCTCACTGCAGGAGTCTG 및

[0328] 역방향 프라이머: GTCGAATTCATTCATCCGAGGAGACGGTGACCTGGGTC. 이는 새로운 힌지(아래 참조)를 가진 프레임 내에서 5'말단을 클로닝하기 위한 XhoI 부위(회색 그림자 표시)와 발현 플라스미드 내로 3'말단을 클로닝하기 위한 EcoRI 부위(언더라인 표시)를 가진 증폭된 단편(도 22 우측 상부로부터 두번째)을 제공한다. 마지막으로, 상기

단편은 EcoRI과 XhoI으로 절단되어, 클로닝을 위한 단일 가닥 말단을 생성하였다.

- [0329] 두 항체 서열은 새로운 힌지를 통해 한 디아바디 서열로 조합되었다. 신규 힌지는 클로닝 목적을 위하여 5'과 3' 오버행(overhang) (각각 HindIII와 XhoI이 양립가능)을 가진 이중 가닥 올리고뉴클레오티드를 함께 만드는 두 개의 올리고뉴클레오티드로부터 생성되었다. αHSP70 서열의 말단과 αgag 서열의 시작을 가진 프레임이 되도록 설계되었다. 실과이드 브릿지의 생성은 인간의 IgG2 힌지 내에 정상적으로 존재하고, 이는 프롤린(언더라인 표시)으로 시스테인(회색 그림자 표시)을 대체시킴으로써 차단되었다. 프롤린은 힌지를 통해서 제1의 항체의 COOH 말단에 연결되는 제2의 항체 영역의 적절한 기능을 가능케 하도록 힌지에 추가의 유연성을 제공한다.
- [0330] 정상적인 IgG 힌지 서열(회색 그림자 표시 부분의 시스테인 코돈, 언더라인된 부분의 프롤린 코돈)은 GAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGTCCACCGTGCCCA이고, 그것의 상보물 **AGCTTCTGAGCGCAAACCACCAGTCGAGCCACCACCGCCACCAC**와 그것의 상보물 **TCGAGTGGTGGCGGTGGTGGCTCGACTGGTGGTTGCGCTCAGA**로 대체되었다. 또한, 이것은 클로닝 목적을 이루기 위하여 HindIII(볼드체)와 XhoI(이텔릭체) 부위와 양립가능한 2개의 단일 가닥 말단을 가진 단편(화이트박스 힌지, 도 22, 중앙)을 제공하였다.
- [0331] 3개 단편(αHSP70 IgG2, 힌지 및 αgag)은 표준 재조합 DNA 기술에 의해 닭 액틴 프로모터와 CMV 인핸서 서열(도 22, 발현 플라스미드)을 포함하는 bluescript(Pbluescript II sk+) 발현 플라스미드로 순차적으로 연결되었다. 이 플라스미드가 발현될 때(아래 참조), 도 22의 바닥에 도시된 디아바디가 생성된다.
- [0332] 디아바디 발현 플라스미드는 성장되고, CHO 세포 내로 표준 방법(Superfect)에 의해서 (트랜스펙션된 세포의 선별을 가능하게 하기 위하여) 플라스미드 pGK-hygro로 동시에 트랜스펙션되었다. 양성 클론은 하이그로마이신을 함유하는 배지에서 선별되었고, α인간 IgG-HRP 검출을 사용하여 CHO 세포에 의해 분비된 디아바디를 포함하는 성장배지의 표준 αgag ELISA(Dekker 등, J.Virol, 2003)를 수행하여 디아바디를 발현함으로써 양성적으로 확인되었다. α-gag 활성도에 대한 양성적인 테스트는, gag 특이성이 디아바디의 후위-말단(back -end) (COOH 말단)에 있기 때문에, 주어진 클론이 완전한 디아바디를 발현할 수 있도록 한다. 또한, 뒤따르는 HSP70에 대한 ELISA는 양성이었다. 비환원과 환원조건 하에서 클론을 선택하는 이들 ELISA의 웨스턴 블랏은, 55kD의 단량체와 비교시(비환원 및 환원조건과 웨스턴블랏, 도 23. 오른쪽), 플라스미드로부터 발현된 단백질이 110kD의 이합체(도 23의 아래에 도시)였음을 보여주기 위하여 수행되었다. 따라서, ELISA와 웨스턴 블랏은, 디아바디가 발현되고, 트랜스펙션된 CHO 세포에 의하여 이합체로서 배지 내로 분비(>70ng/ml)됨을 보여주고, 항체는 HSP70 및 gag 항원과 결합할 수 있음을 보여준다. 그러나, 동일한 이합체 디아바디 분자는 동시에 양쪽 항원과 결합할 수 있음을 보여주지는 못한다.
- [0333] 따라서, 후속실험이 수행되었다. 제1의 gag 항원은 프라스틱 웰(제1의 웰, 도 24 중앙)의 바닥에 고정되었다. 디아바디(도 24 상단)는 클론 1의 CHO 세포 상등액의 적용 후, 제1의 항원(gag)에 의해 포획되었다(제2의 웰, 도 24 중앙). 광범위한 세척을 수행하고, 그 후에 제2의 항원 적용 후(HSP70, 도 24 중앙, 제3의 웰), 다시 광범위한 세척이 이어진다. 만약, 디아바디 분자가 동시에 양쪽 항원에 결합할 수 있다면, 제1의 항원(gag)을 결합시켜 웰의 바닥에 포획하고, 다음으로 제2의 항원(HSP70)을 포획하여야만 할 것이다. 완전한 복합체가 웰로부터 순차적으로 용리될 때(도 24 중앙, 오른쪽 웰), 디아바디와 항원은 웨스턴 블랏 상에서 확인할 수 있다(도 24 아래).
- [0334] 분비된 디아바디를 수거하기 위하여, CHO 클론은 동일한 표준조건 하에서 하이브리도마로부터 항체 수거를 위하여 사용된 배지(SIGMA 하이브리도마 배지, 무혈청)에서 성장되었다.
- [0335] 방법: Nunc- Immuno plate(Maxisorp)의 웰을 4°C에서 정제된 재조합 gag 단백질(PBS 내의 12.5μg/μl)로 코팅하였다. PBS 내의 1% 밀크/1% BSA로 2 시간 동안 블로킹하였다. PBS-밀크-BSA 내에서 1/2로 희석된 CHO-DB 클론-1 배지 (또는 대조군)을 실온에서 3시간 동안 항온처리했다. PBS-밀크-BSA 내에서 1/2로 희석된 (HSP70 단백질을 포함하는) 박테리아 B121 세포 용해물을 실온에서 3시간 동안 항온처리하고, 세척했다. 결합된 단백질을 2-머캡토에탄올을 포함하는 램리(Laemmli)시료 완충액으로 용리시켰다. 시료를 웨스턴 블랏으로 분석하기 위하여, 10% SDS-PAGE에서 전기영동하여, 니트로셀룰로오스 멤브레인에 블라팅시켰다. 블랏은 PBS-밀크-BSA로써 2시간 동안 블로킹되었고, 일차항체로 항온처리했다. 생성물은 시각적 염색을 가능케 하는 효소들이 커플링된 2차 항체를 사용하는 표준방법에 의해 시각화되었다. 사용된 시약은 다음과 같다:
- [0336] αgag: 토끼 폴리클로날(1:2000) 실온 2시간.
- [0337] α디아바디: 염소 α 인간 IgG-HRP(1:2500) 실온 2시간.

- [0338] αHSP70: 모노클로날 G20-380 배지(1:2) 실온 2시간.
- [0339] 2차 항체는, HSP70 단일클론에 대하여 염소 α 토끼-AP(1:2000) 실온 2시간 및 염소 α 인간 IgG-HRP(1:2500) 실온 2시간이었다.
- [0340] 단백질 밴드를 확인하기 위하여, 알칼라인 포스파타아제(AP)와 반응을 하는 제1의 NBT/BCIP 기질(자주색)과 서양고추냉이 퍼옥시다아제(HRP)와 반응을 하는 제2의 DAB기질(갈색)을 사용하였다.
- [0341] 모든 세척단계는 PBS-0.05% Tween-20으로 수행하였다.
- [0342] 대조군은 성분 중 하나를 제외시키거나, 또는 디아바디를 생성하지 않는 CHO 세포를 첨가(도 24)하므로써 수행되는데; 즉 디아바디 적용을 결핍(트랜스펙션되지 않은 CHO 세포로부터의 배지)하여, 단지 gag 만을 가지고(라인 2); (밀크 단백질에 의하여 대체된) 웰의 바닥에 gag를 결핍하여, 어떠한 생성물도 가지지 못하고(라인 3); gag와 디아바디를 결핍하여, 어떠한 생성물도 가지지 못하고(라인 4); (밀크 항원에 의하여 대체된) HSP70 항원을 결핍하여, 디아바디와 gag만을 가지고(라인 5); HSP70과 디아바디를 결핍하여, gag만을 가진다(라인 6).
- [0343] 3가지 모든 성분들(디아바디 + 양 항원)은 3가지 모든 부분들을 수용하는 라인 1의 웰 내에서만 존재한다는 사실(도 24의 아래 설명)은 단일의 디아바디는 동시에 양 항원과 결합한다는 것을 보여준다.
- [0344] **이특이적 IgA 또는 다-특이적 IgM의 생성**
- [0345] 이특이적 IgA의 생성은 IgG(상기)에 대하여 설명된 것과 같이 필수적인 것이지만, 추가적으로 Vhsol, D와 J, 불변 영역 Cα의 사용은 IgA의 생성을 이끌었다(도 25).
- [0346] IgM의 생성은 매우 유사하지만, IgM 분자는 (J쇄를 가지거나, 가지지 않는) 거대한 다합체를 만들 수 있기 때문에, 추가적인 가능성을 제공한다. 따라서, 위에서 설명된 것들과 유사한 분자(도 26의 우측 아래, 다합체화 서열의 제거 후)를 추가하면, 다른 특이성을 갖는 IgM의 동시발현에 의한 다합체를 간단하게 생산할 수 있을 것이다(도 26 왼쪽 아래).
- [0347] **실시예 3**
- [0348] PSCA(전립선 줄기 세포 항원)에 결합하는 결합 영역, Jun의 류신 지퍼를 구성하는 어셈블리 영역 및 항체 힌지, C_H2와 C_H3 영역을 포함하는 중쇄; 및 FOS의 류신 지퍼 모티프로 이루어진 상보적인 어셈블리 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 폴리펩티드 복합체를 코딩하는 발현 벡터는 Sambrook 등((1989) Molecular Cloning- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press)에 설명된 바의 분자생물학 기술을 사용하여 구성된다.
- [0349] 다음으로 발현 벡터는 벡터의 최적화된 발현을 위한 트랜스펙션된 숙주세포를 생산하기 위하여 전래적인 기술들에 의해 적당한 숙주세포로 전달된다. 다음으로, 트랜스펙션된 숙주세포 또는 형질전환된 숙주세포는 당업자에 공지된 어떤 적당한 기술을 사용하여 배양되어, 본 발명의 폴리펩티드 복합체를 생산한다.
- [0350] 생성된 폴리펩티드 복합체는 크로스-플로우(cross-flow) 여과, 황산암모늄 침전 및 친화도 컬럼 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 당 기술의 표준절차에 의해 정제된다.
- [0351] 다음으로, 3,3'-디인도릴메탄(DIM)으로 이루어진 가용성 이펙터 영역은 당업자들에게 공지된 기술을 사용하여 상보적인 어셈블리 영역에 융합된다.
- [0352] **실시예 4**
- [0353] AFP(Alpha-Fetoprotein)에 결합하는 가용성 V_H 결합 영역과 Jun의 류신 지퍼 모티프를 구성하는 어셈블리 영역 및 항체 힌지, C_H2와 C_H3 영역을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 중쇄를 코딩하는 발현 벡터는 Sambrook 등에 설명된 바와 같은 분자생물학 기술을 사용해 구성된다.
- [0354] 또한, 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 경쇄를 코딩하는 제2의 발현 벡터가 구성된다. 이는 FOS의 류신 지퍼 모티프로 이루어진 상보적인 어셈블리 영역을 포함한다.
- [0355] 다음으로, 발현 벡터는 벡터의 최적화된 발현을 위한 동시에 트랜스펙션된 숙주세포를 생산하기 위하여 전래적인 기술들에 의해 적당한 숙주세포로 전달된다. 다음으로, 트랜스펙션된 숙주세포 또는 형질전환된 숙주세포는 당업자에 공지된 어떤 적당한 기술을 사용하여 배양되어, 본 발명의 폴리펩티드 복합체를 생산한다.

- [0356] 생성된 폴리펩티드 복합체는 크로스-플로우(cross-flow) 여과, 황산암모늄 침전 및 친화도 컬럼 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 당 기술의 표준절차에 의해 정제된다.
- [0357] 다음으로, 3,3'-디인도릴메탄(DIM)으로 이루어진 가용성 이펙터 영역은 당업자들에게 공지된 기술을 사용하여 상보적인 어셈블리 영역에 융합된다.
- [0358] **실시예 5**
- [0359] **VCAM 및 VLA-4**
- [0360] PSCA(전립선 줄기 세포 항원)에 결합한 결합 영역, VCAM으로 구성되는 어셈블리 영역 및 항체 힌지, C_H2와 C_H3 영역을 포함하는 중쇄; 및 리신 A 독신에 융합된 VLA-4로 구성되는 상보성 어셈블리 영역을 포함하는 경쇄는 Sambrook 등에 설명된 분자생물학 기술들을 사용하여 구성된다.
- [0361] 다음으로 발현 벡터는 벡터의 최적화된 발현을 위한 트랜스펙션된 숙주세포를 생산하기 위하여 전래적인 기술들에 의해 적당한 숙주세포로 전달된다. 다음으로, 트랜스펙션된 숙주세포 또는 형질전환된 숙주세포는 당업자에 공지된 어떤 적당한 기술을 사용하여 배양되어, 본 발명의 폴리펩티드 복합체를 생산한다.
- [0362] 생성된 폴리펩티드 복합체는 크로스-플로우(cross-flow) 여과, 황산암모늄 침전 및 친화도 컬럼 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 당 기술의 표준절차에 의해 정제된다.
- [0363] **실시예 6**
- [0364] PSCA(전립선 줄기 세포 항원)에 결합한 결합 영역, Jun의 류신 지퍼를 구성하는 어셈블리 영역 및 항체 힌지, C_H2와 C_H3 영역을 포함하는 중쇄; 및 FOS의 류신 지퍼 모티프로 구성되는 상보적 어셈블리 영역 및 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라아제를 코딩하는 가용성 이펙터 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 폴리펩티드 복합체를 코딩하는 발현 벡터는 Sambrook 등에서 설명된 분자생물학 기술을 사용하여 구성된다.
- [0365] 다음으로 발현 벡터는 벡터의 최적화된 발현을 위한 트랜스펙션된 숙주세포를 생산하기 위하여 전래적인 기술들에 의해 적당한 숙주세포로 전달된다. 다음으로, 트랜스펙션된 숙주세포 또는 형질전환된 숙주세포는 당업자에 공지된 어떤 적당한 기술을 사용하여 배양되어, 본 발명의 폴리펩티드 복합체를 생산한다.
- [0366] 생성된 폴리펩티드 복합체는 크로스-플로우(cross-flow) 여과, 황산암모늄 침전 및 친화도 컬럼 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 당 기술의 표준절차에 의해 정제된다.
- [0367] PNP는 플루다라빈(fludarabine)을 PNP 효소를 포함하는 세포들을 죽이고, 그 외에도 주변의 감염되지 않은 세포를 죽이기 위하여 확산되는 국부적 방관자 효과를 가진 독성 대사산물 2-플루오로아데닌으로 전환된다.
- [0368] **실시예 7**
- [0369] 당단백질 항원 gp120의 V3-PND 영역에 결합하는 가용성 V_H 결합 영역 및 Jun의 류신 지퍼 모티프로 구성되는 어셈블리 영역 및 항체 힌지, C_H2와 C_H3 영역을 포함하는 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 제1의 중쇄를 코딩하는 발현 벡터는 Sambrook 등에서 설명된 분자생물학 기술을 사용하여 구성된다.
- [0370] 또한, 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 제2의 중쇄를 코딩하는 제2의 발현 벡터는 GP-41에 결합한 가용성 V_H 결합 영역, Jun의 류신 지퍼 모티프로 구성되는 어셈블리 영역 및 항체 힌지, C_H2와 C_H3 영역을 포함하는 것으로 구성된다.
- [0371] 또한, 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 경쇄를 코딩하는 제3의 발현 벡터가 구성된다. 이것은 FOS의 류신 지퍼 모티프로 이루어진 상보적인 어셈블리 영역을 포함한다.
- [0372] 다음으로 발현 벡터는 벡터의 최적화된 발현을 위한 트랜스펙션된 숙주세포를 생산하기 위하여 전래적인 기술들에 의해 적당한 숙주세포로 전달된다. 다음으로, 트랜스펙션된 숙주세포 또는 형질전환된 숙주세포는 당업자에 공지된 어떤 적당한 기술을 사용하여 배양되어, 본 발명의 폴리펩티드 복합체를 생산한다.
- [0373] 생성된 폴리펩티드 복합체는 크로스-플로우(cross-flow) 여과, 황산암모늄 침전 및 친화도 컬럼 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 당 기술의 표준절차에 의해 정제된다.
- [0374] 다음으로, HIV-1 MN V3(PND) 펩티드 면역원으로 이루어진 가용성 이펙터 영역은 당업자들에게 공지된 기술을 사

용하여 상보적인 어셈블리 영역에 융합된다.

[0375] **실시예 8**

[0376] 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 제1의 중쇄를 코딩하는 발현 벡터는 Sambrook 등((1989) Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press)에 설명된 분자생물학 기술을 사용하여 구성된 당단백질 항원의 V3-PND 영역에 결합하는 가용성 V_{III} 결합 영역을 포함한다.

[0377] 또한, 본 발명의 폴리펩티드 복합체의 제2의 중쇄를 코딩하는 제2의 발현 벡터는 GP-41에 결합한 가용성 V_{III} 결합 영역을 포함하는 것으로 구성된다.

[0378] 두 중쇄는 동일한 μ , C_H2, C_H3 및 C_H4 영역을 포함하는 두 중쇄에 대한 불변 영역으로 특징된다.

[0379] 다음으로 발현 벡터는 벡터의 최적화된 발현을 위한 동시에 트랜스펙션된 숙주세포를 생산하기 위하여 전래적인 기술에 의해 J쇄를 구성적으로 발현하는 숙주세포로 전달된다. 다음으로, 트랜스펙션된 숙주세포 또는 형질전환된 숙주세포는 당업자에 공지된 어떤 적당한 기술을 사용하여 배양되어, 본 발명의 폴리펩티드 복합체를 생산한다.

[0380] 생성된 폴리펩티드 복합체는 크로스-플로우(cross-flow) 여과, 황산암모늄 침전 및 친화도 컬럼 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 당 기술의 표준절차에 의해 정제된다.

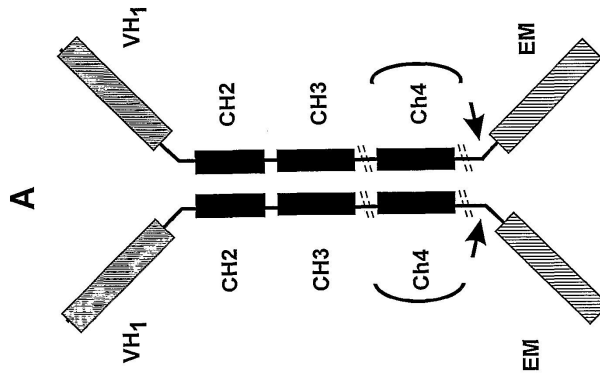
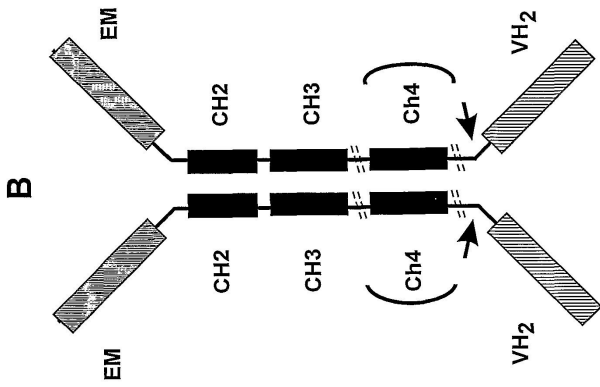
[0381] 다음으로, HIV-1 MN V3(PND) 펩티드 면역원으로 이루어진 가용성 이펙터 영역은 당업자들에게 공지된 기술을 사용하여 상보적인 어셈블리 영역에 융합된다.

[0382] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물은 참고문헌으로 본원에 통합된다.

[0383] 본 발명에서 설명된 방법 및 시스템의 여러 가지의 수식과 변경은 본 발명의 범위와 사상을 벗어나지 않고 당업자들에게 분명한 것이다. 비록, 본 발명이 특별한 바람직한 구체예와 관련하여 설명되었지만, 특허청구된 발명은 그와 같은 특별한 구체예에 과도하게 한정되지 않아야 한다는 것을 이해하여야 한다. 더구나, 생화학, 분자생물학 및 생물공학 또는 관련된 분야에서 당업자들에게 분명한 본 발명을 수행하기 위해 설명된 방법의 여러 가지의 변경은 다음의 청구범위의 범위 내인 것으로 의도된다.

도면

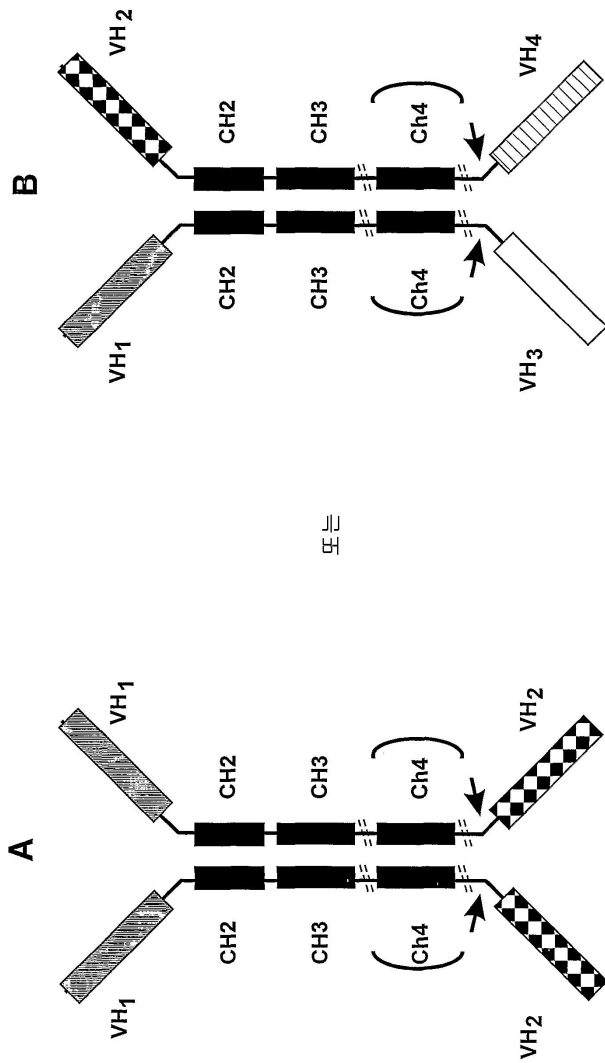
도면1



도면

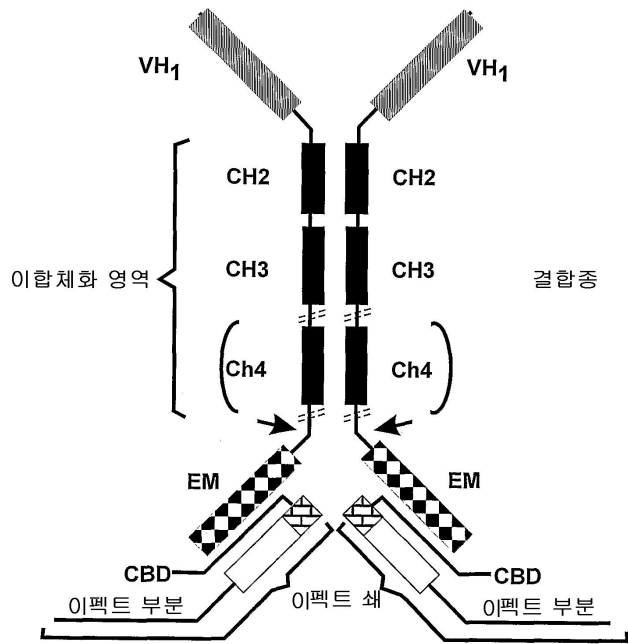
A와 B의 결합중

도면2



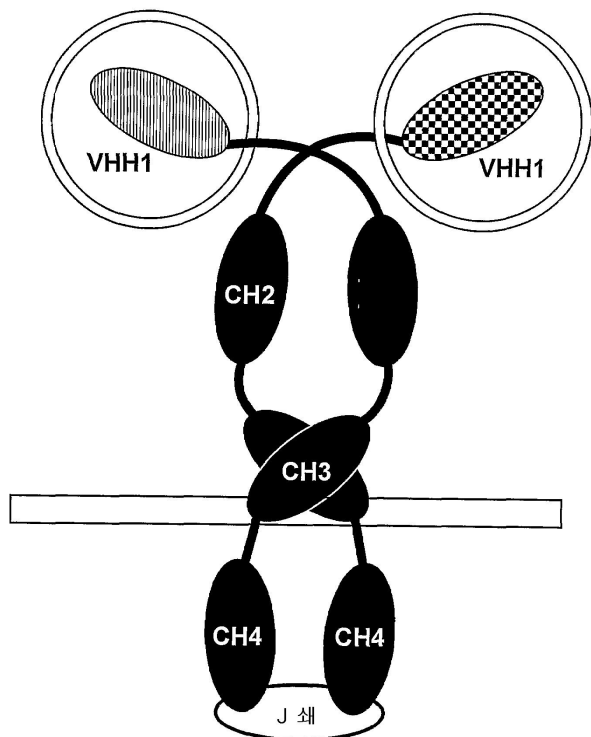
A 또는 B에 나타낸 예의 결합점

도면3



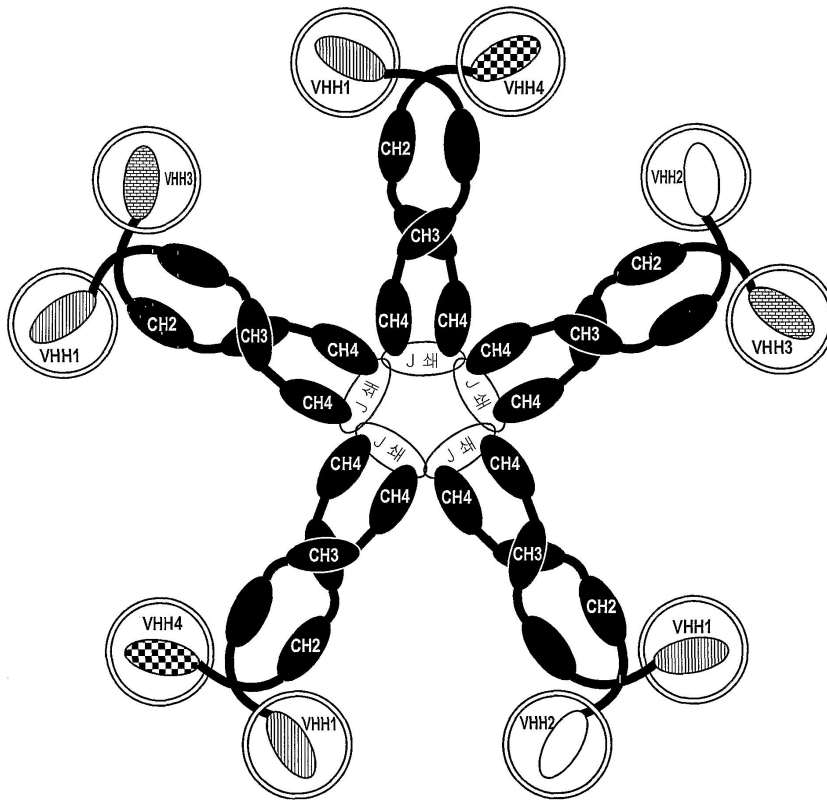
도면4

2가 분비성 IgA



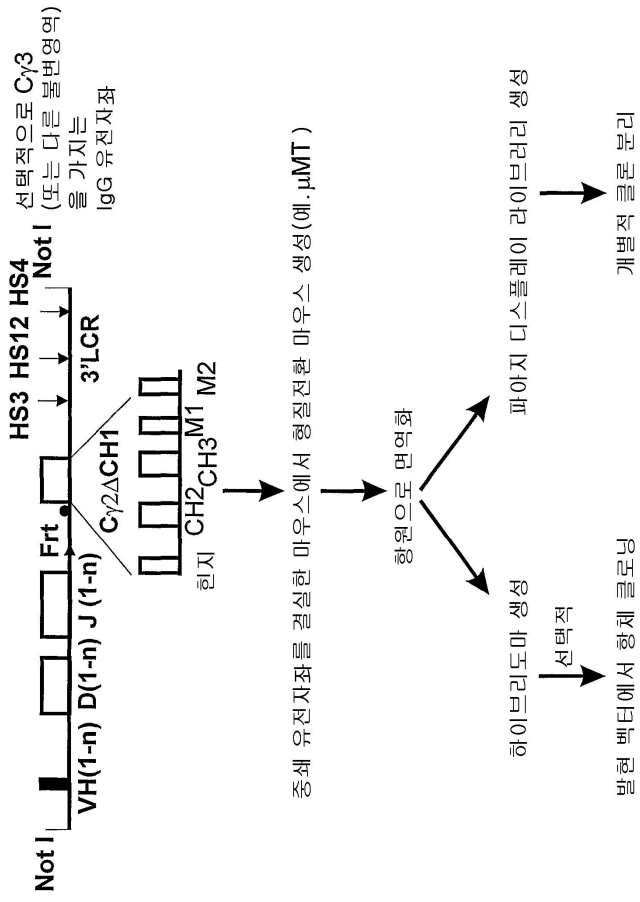
도면5

유사 다가 IgM



도면6

중쇄만의 IgG의 생성



중쇄 유전자좌를 결실한 마우스에서 형질전환 마우스 생성(예, μMT)

항원으로 면역화

하이브리도마 생성

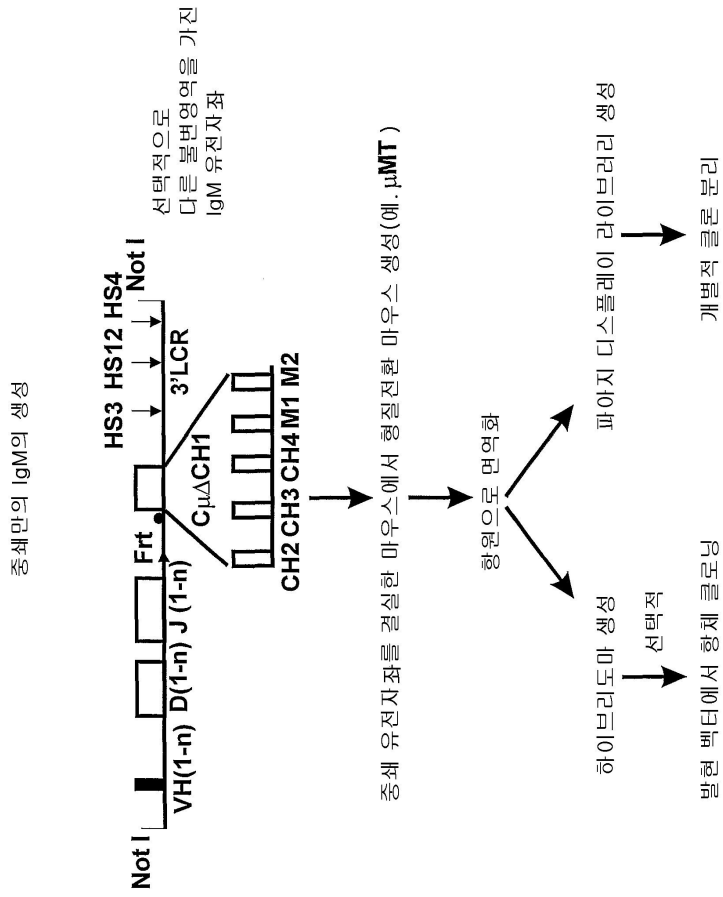
선택적

발현 벡터에서 항체 클로닝

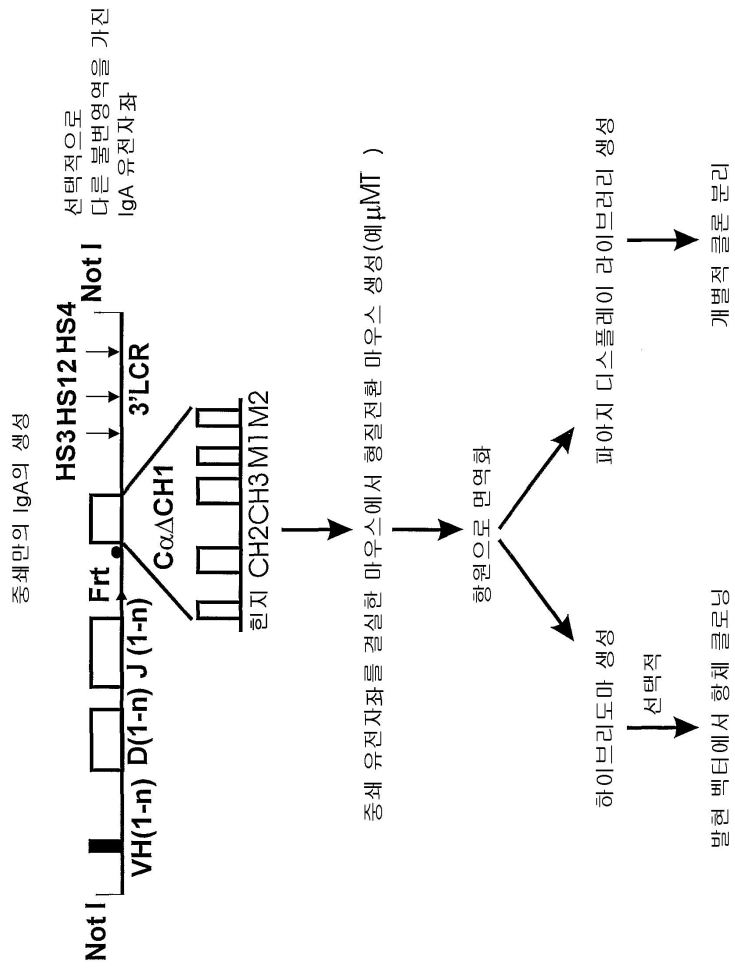
파아지 디스플레이 라이브러리 생성

개별적 클론 분리

도면7



도면8



도면9

	VHH	D	J
VDJg*1	GACACGGCCGTGTAGTACTCTGTAAGGCAGATGG.....		GGTAGTACTATGGTTTCG...GGGA.
VDJg*2	GAC.....		ATCCCACTTCGATC...T...
VDJg*3	GACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCCACTAGG.....		ATATTTTGACTGGTTAT...TATA.
VDJg*4	GACACGGCCGTCCAATCGGATACAG.....		CTATGGTTACGTACTTT
VDJg*5	GACACGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGATGTATTACTATGGTTTCGGGGAGCCTATAGCCTTACTACTACTACGGTATG.		

	J	CH1
VDJg*1	GTCCACCACCTGCGGGTAGAGGGCCAGGGACACTGGTCCGGGTGCAATCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCC	
VDJg*2CTGGGGCCGTGGCACCTGGTCACTGTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCC	
VDJg*3	GAC.....GCTACTGGGGCCAGGGACCTGGTCACTGTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCC	
VDJg*4	GACTA.....CTGGGGCCAGGGACCTGGTCACTGTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCC	
VDJg*5	GACGT.....CTGGGGCCAGGGACCTGGTCACTGTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCC	

	CH1
VDJg*1	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCGG
VDJg*2	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCGG
VDJg*3	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCGG
VDJg*4	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCGG
VDJg*5	CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCGG

	CH1
VDJg*1	TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
VDJg*2	TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
VDJg*3	TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
VDJg*4	TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
VDJg*5	TGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC

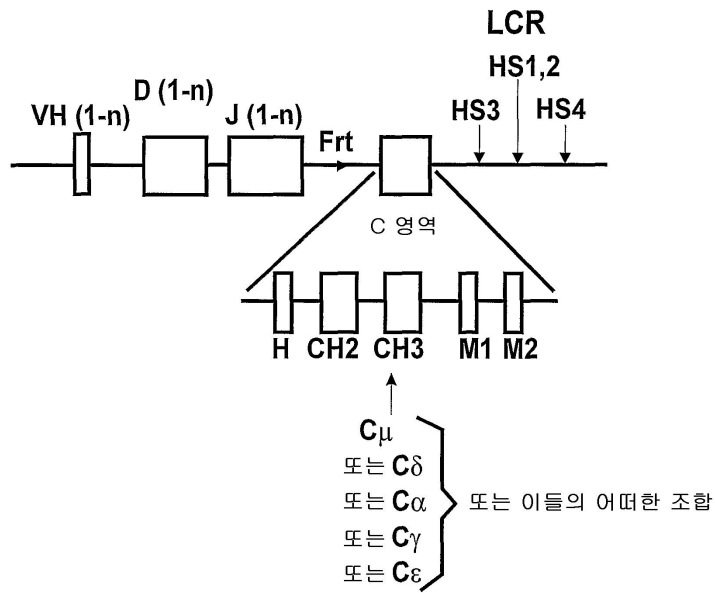
	CH1
VDJg*1	TCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
VDJg*2	TCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
VDJg*3	TCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
VDJg*4	TCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG
VDJg*5	TCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAG

CH1 ◆ 힌지

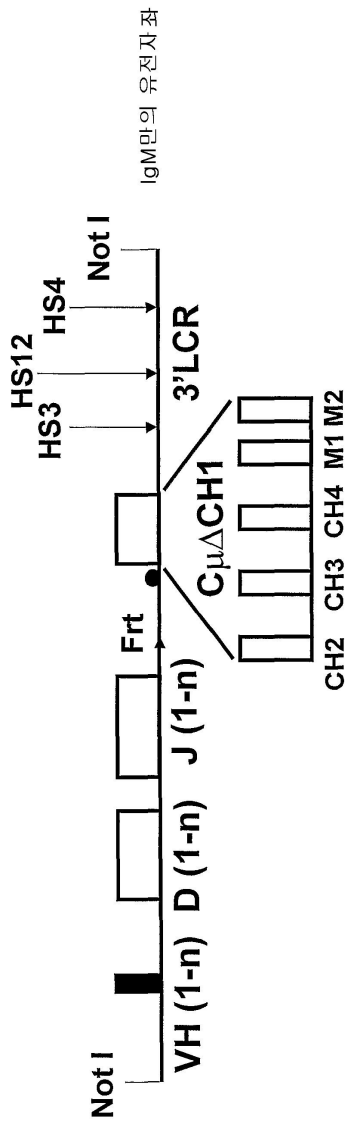
VDJg*1	CAACACCAAGAGCCAAATGTTGTCTCGAG
VDJg*2	CAACACCAAGAGCCAAATGTTGTCTCGAG
VDJg*3	CAACACCAAGAGCCAAATGTTGTCTCGAG
VDJg*4	CAACACCAAGAGCCAAATGTTGTCTCGAG
VDJg*5	CAACACCAAGAGCCAAATGTTGTCTCGAG

◆ GGTGGACAAGACAGTT

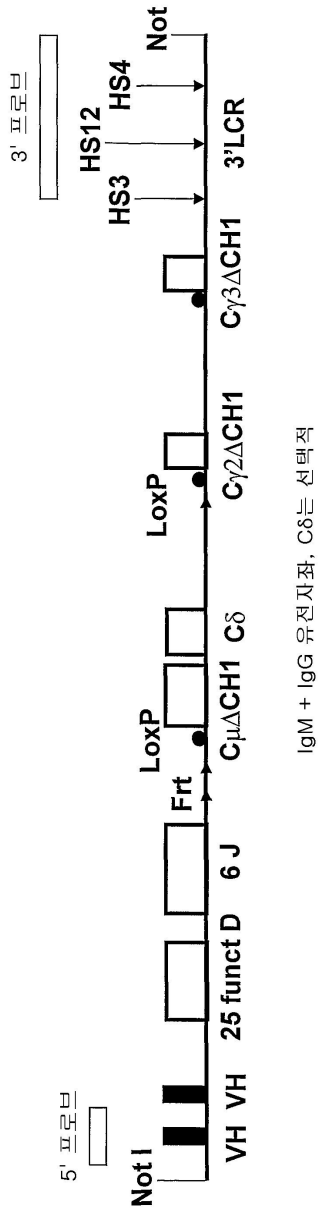
도면10



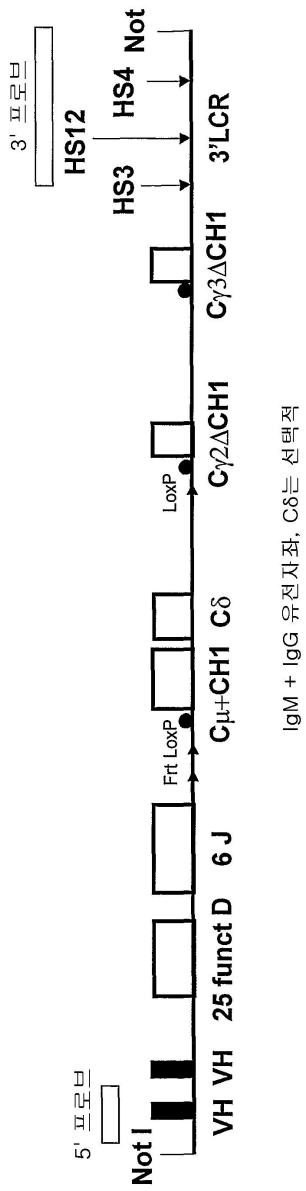
도면11



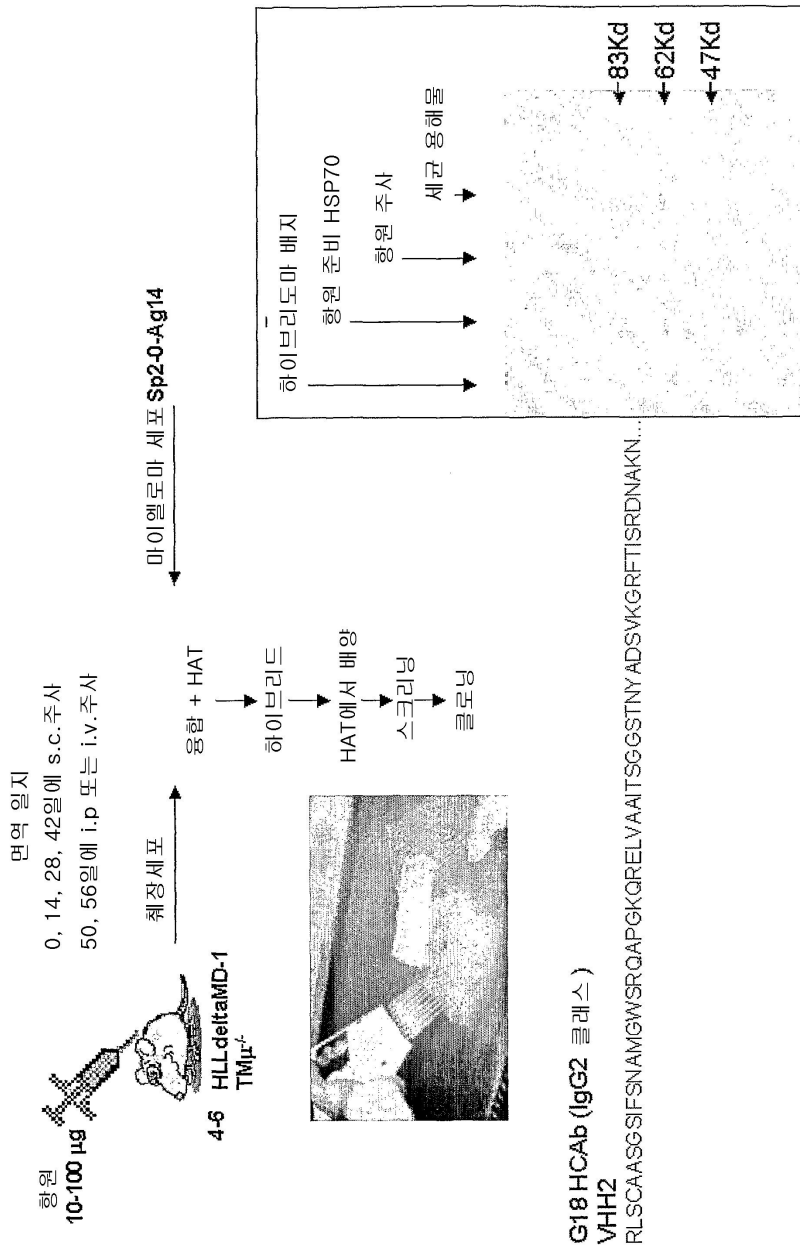
도면12



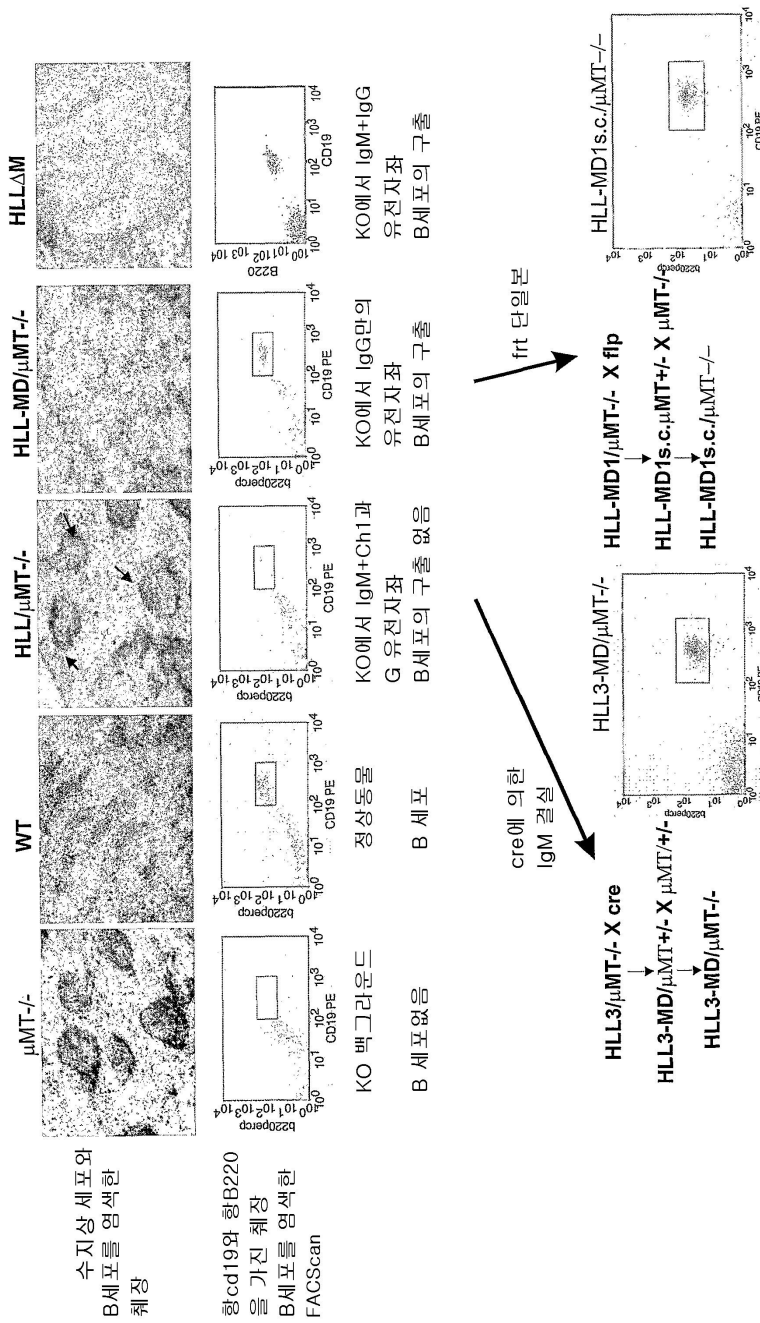
도면13



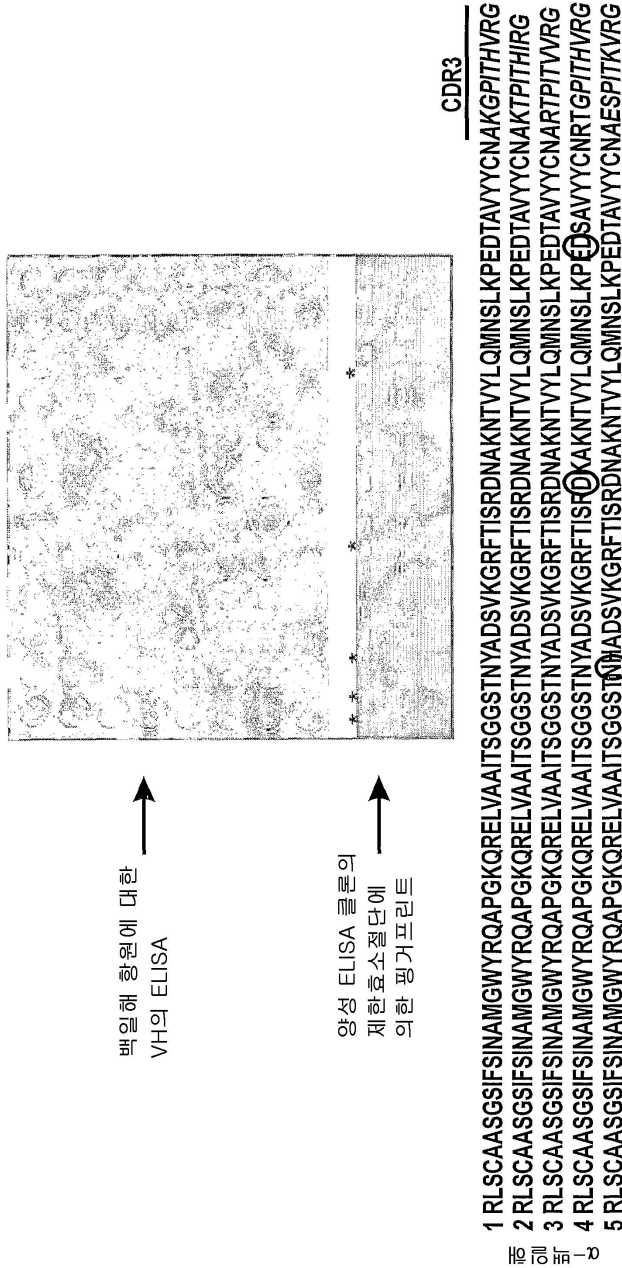
도면14



도면15



도면16



α-1
클론
번호

CDR3

인지

-VHYWGQGLTVSSERKCCV...
-VHHWGQGLTVSSERKCCV...
-VHYWGQGLTVSSERKCCV...
-VDYWGRTLVTVSSERKCCV...
-VSYWGQGLTVSSERKCCV...

핑거프린트에서 별표로 표시된 클론의 서열
 짧은 CDR3 영역을 주의

도면17

ne VHH1 RLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAEGEREGVSCISSDGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 1 RLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAEGEREGVSCISSDGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 2 RLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAEGEREGVSCISSDGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 3 RLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAEGEREGVSCISSDGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKN
 CDR1

ne VHH2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 1 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKN
 Clone 3 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKN
 CDR1

VHH2 생식계열 VHH2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVA ITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCN.....
 CDR1 CDR2 CDR3

1 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRG
 2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAKGPITHVRG
 3 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNARTPTIVVRG
 4 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNRTGPITHVRG
 5 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAESPITKVRG

1 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNAERAGDP....
 2 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCGVLWFGELSD..
 3 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNADCFWGSRW..
 4 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCNADTSPPRYFDW

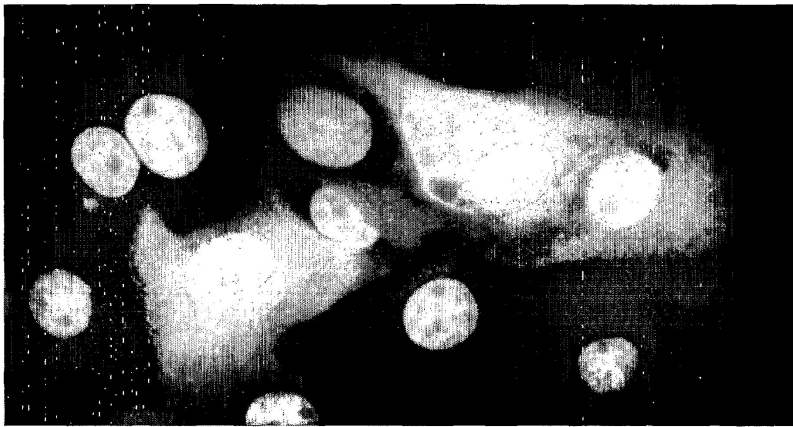
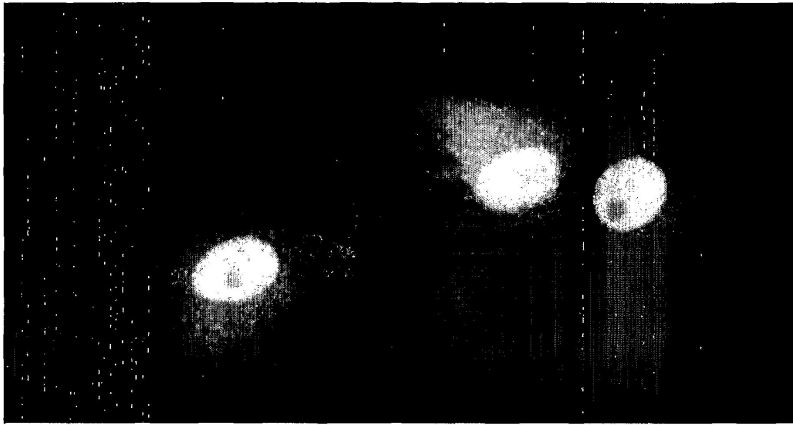
α-hsp70 RLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAITSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYHLQMNLSKPEDTAVYYCNAGNTMVRGVII

CDR3 HINGE
 1....VHHWGQGLTVSSERKCCV...
 2....VHHWGQGLTVSSERKCCV...
 3....VHYWGQGLTVSSERKCCV...
 4....VDYWGGRGLTVSSERKCCV...
 5....VSYWGQGLTVSSERKCCV...

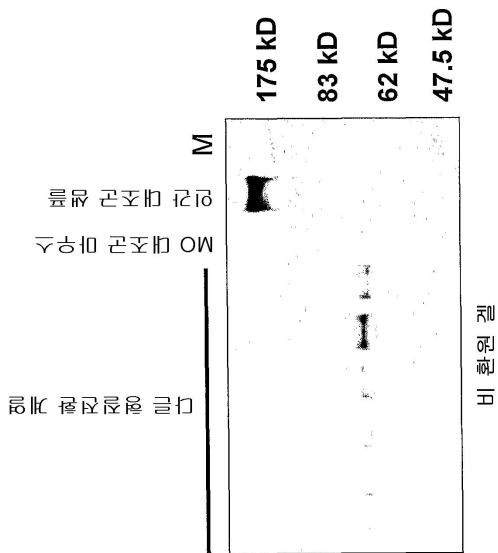
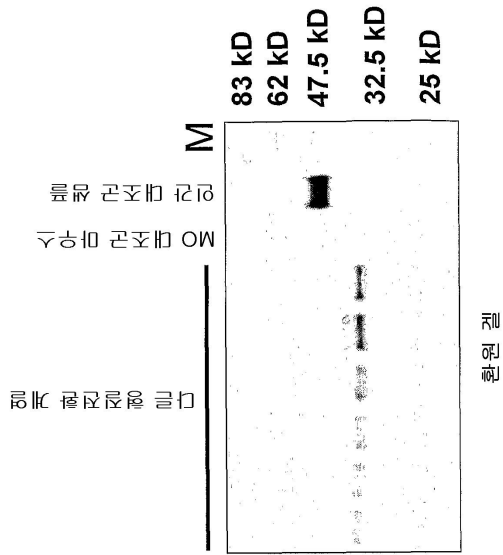
1FDYWGQGLTVSSERKCCV...
 2 ...WFDYWGQGLTVSSERKCCV...
 3 ...YFDHYWGRGLTVSSERKCCV...
 4 ...LPPDYWGQGLTVSSERKCCV...

α-hsp70KYRFDYWGQGLTVSSERKCCV...

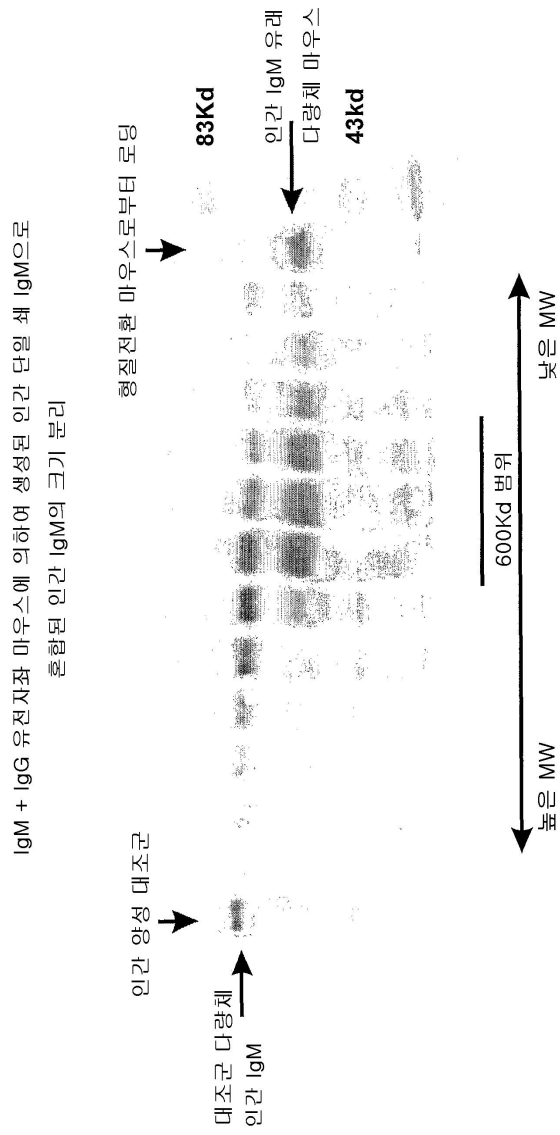
도면18



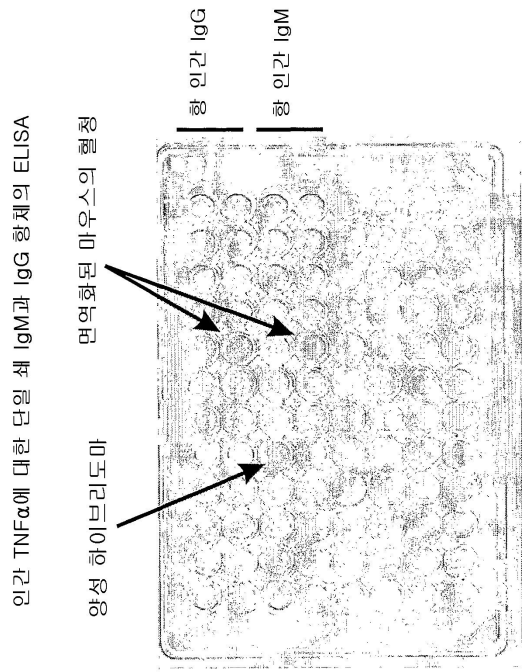
도면19



도면20

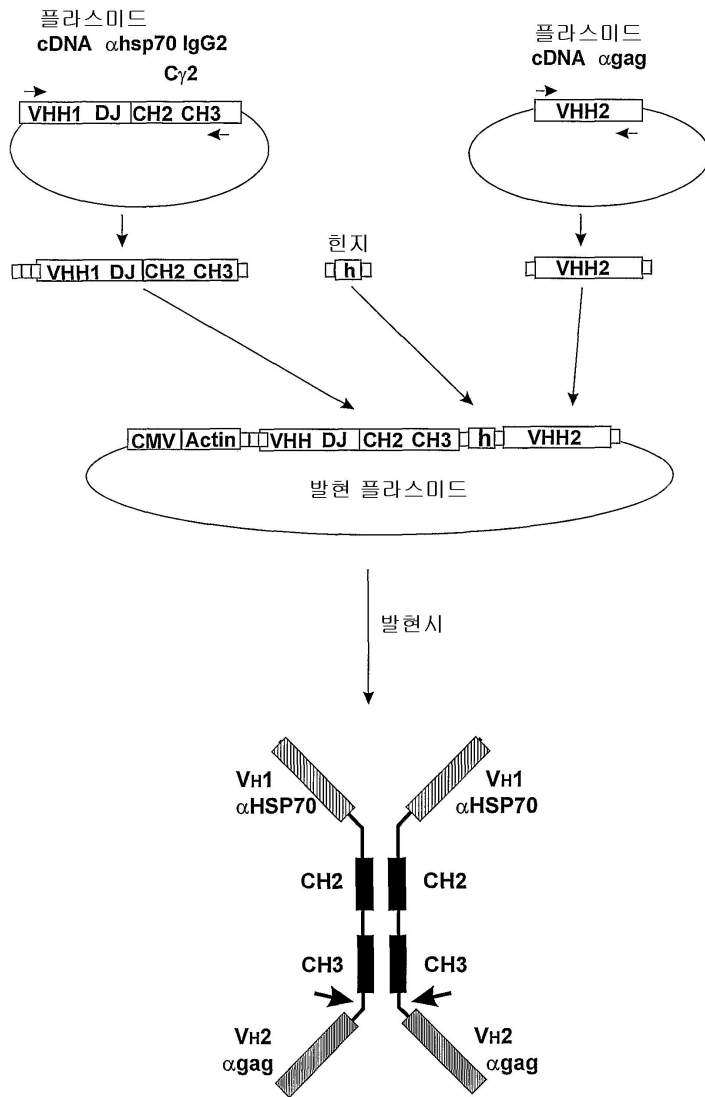


도면21



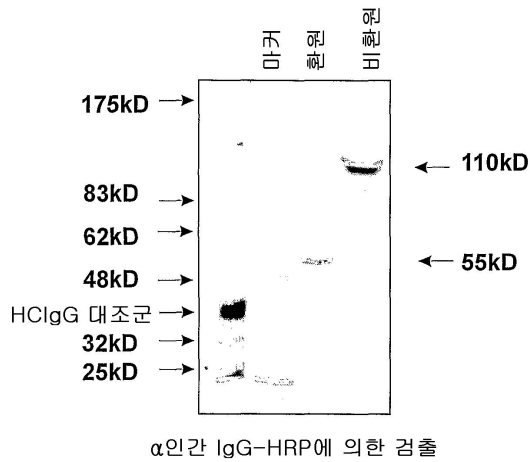
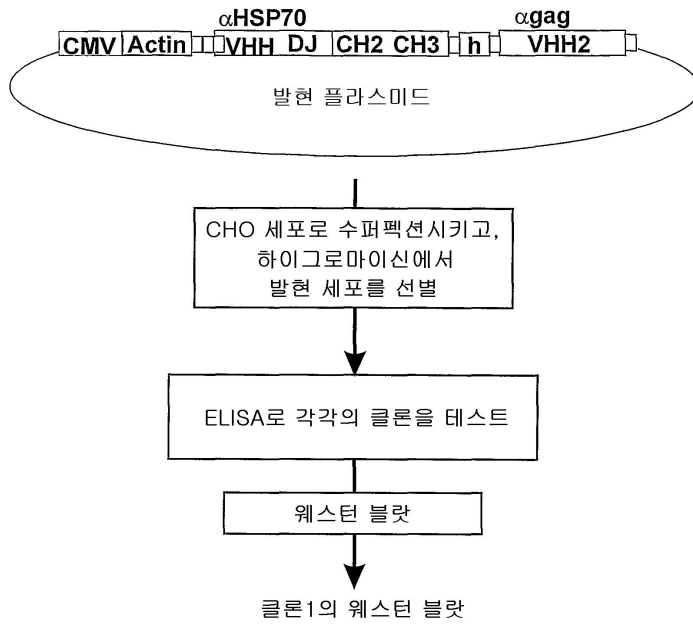
도면22

디아바디 발현 플라스미드의 생성

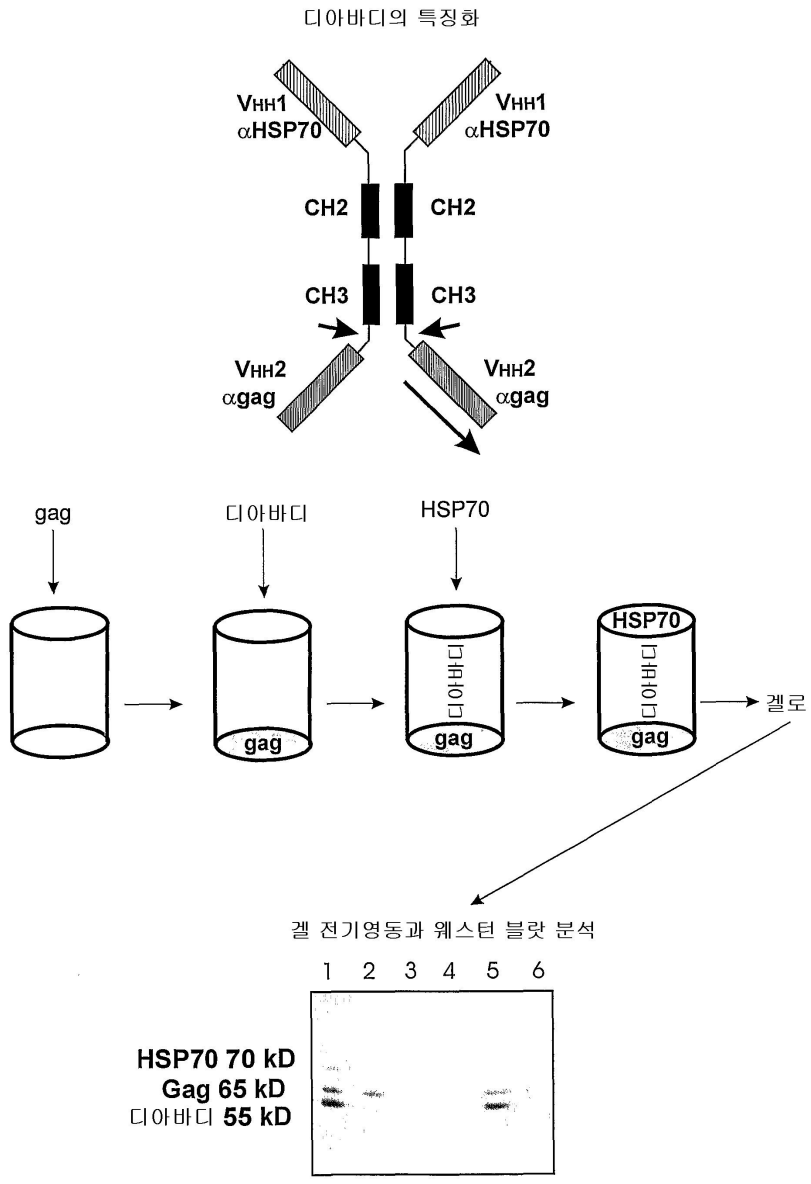


도면23

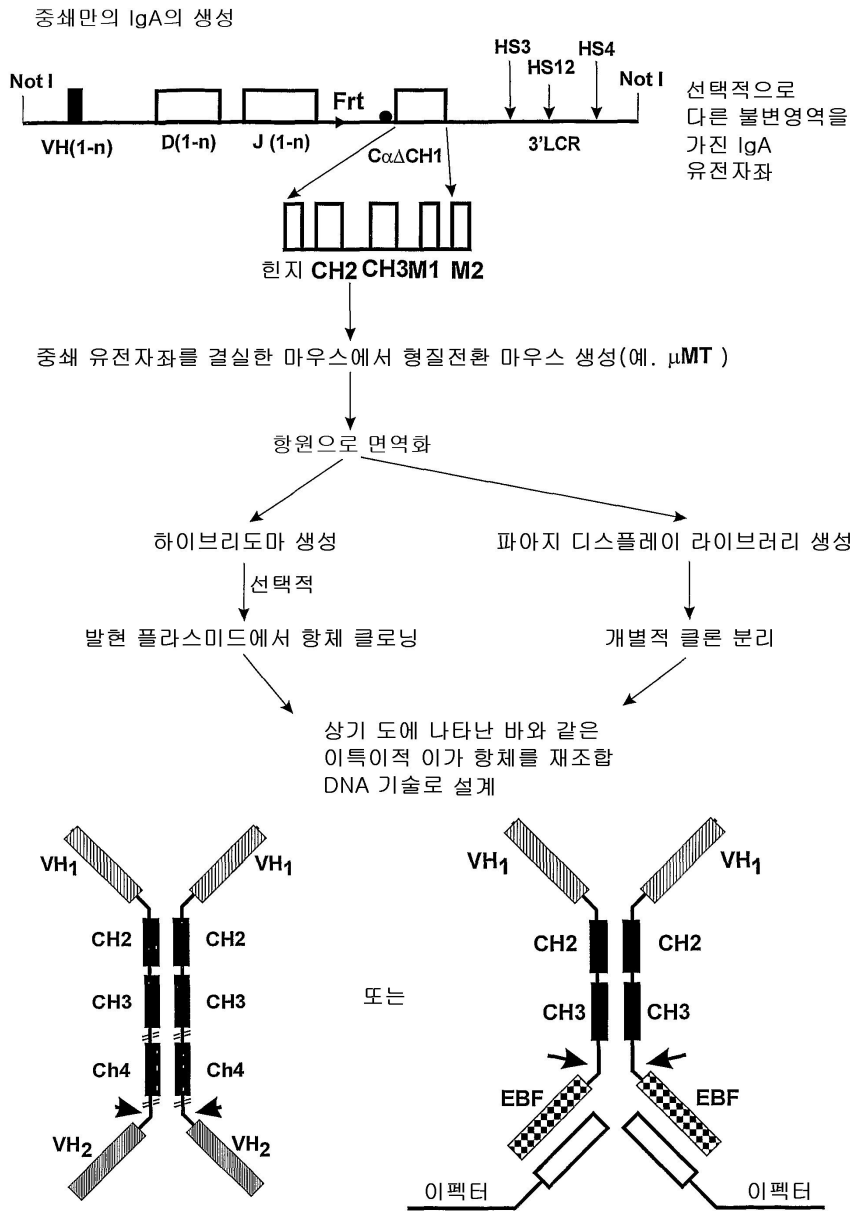
CHO 세포에서 HClgm의 발현



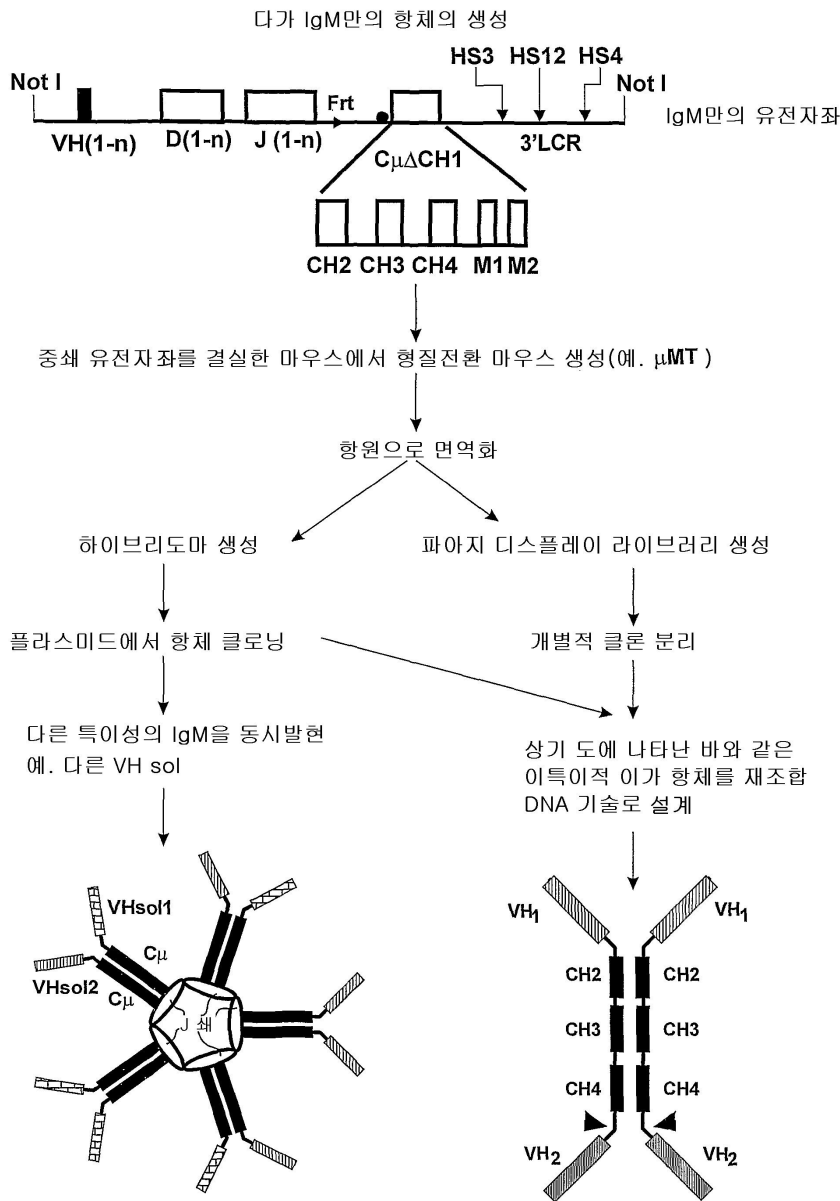
도면24



도면25



도면26



서열목록

- <110> ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTRE ROTTERDAM
- <120> BINDING MOLECULES
- <130> P038405W0
- <140> PCT/GB2005/002892
- <141> 2005-07-22
- <150> GB0416392.9
- <151> 2004-07-22
- <150> GB0511881.5
- <151> 2005-06-10
- <160> 35

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 1

aatctgggca gcggccgctc cgacacaaca ttgcgctc 39

<210> 2

<211> 318

<212> DNA

<213> Human HCAb (IgG3) against rtTA

<400> 2

agactctect gtgcagcctc tggaagcacc ttcagttatca atgcatggg ctggtaccgc 60

caggctccag ggaagcagcg cgagttggtc gcagctatta ctagtgggtg tagcacaagg 120

tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgcca gaacacggtg 180

tatctgcaaa tgaacagcct gaaacctgag gacacggccg tctattactg ttgatctct 240

atggttcggg gagcccgttt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 300

gagctcaaaa ccccactt 318

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Human HCAb (IgG3) against rtTA

<400> 3

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

gtcctcgagg cccaggtcca actgcaggag tctg	34
<210> 8	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 8	
gtcgaattct cattccgagg agacggtgac ctgggtc	37
<210> 9	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> IgG Hinge sequence	
<400> 9	
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgecca	36
<210> 10	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Replacement IgG hinge sequence	
<400> 10	
agcttctgag cgcaaaccac cagtcgagcc accaccgcca ccac	44
<210> 11	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Complement of replacement IgG hinge sequence	
<400> 11	
tcgagtgggtg gcggtgggtgg ctcgactggt ggtttgcgct caga	44
<210> 12	
<211> 404	
<212> DNA	
<213> VDJg*1	
<400> 12	
gacacggccg ttagtatct gtaaggcaga tgggtagta ctatggttcg gggagtccac	60
cactgcgget agaggggcca gggaacactg gtcgcggtgt catcagcctc caccaagggc	120

ccatcggctct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agcggcctg 180
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctgaggcct 240

ctgaccagcg gcgtgcacac ctcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 300
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac ttccggcacc agacctacac ctgcaacgta 360
 gatcacaagc ccagcaacac caagagcgca aatgttgtgt cgag 404

<210> 13
 <211> 352
 <212> DNA
 <213> VDJg*2
 <400> 13

gacattccca cttcgatctc tggggccgtg gcaccctggt cactgtctcc tcagcctcca 60
 ccaagggccc atcggctctc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag 120
 cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggt tcgtggaact 180

caggcgtctt gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc tcaggactct 240
 actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcaactt cggcaccag acctacact 300
 gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca agagcgcaaa tgttgtgtcg ag 352

<210> 14
 <211> 394
 <212> DNA
 <213> VDJg*3
 <400> 14

gacacggcgg tctattactg taatgccact acgatatttt gactggttat tatagacgct 60
 actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctcagcctc cgccaagggc ccatcggctct 120
 tccccctggc gcctgtctcc aggagcacct ccgagagcac agcggcctg ggctgcctgg 180

tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctgaggcct ctgaccagcg 240
 gcgtgcacac ctcccagct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg 300
 tgaccgtgcc ctccagcaac ttccggcacc agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc 360
 ccagcaacac caagagcgca aatgttgtgt cgag 394

<210> 15
 <211> 380
 <212> DNA
 <213> VDJg*4

<400> 15
gacacggccg tccaatcggg tacagctatg gttacgtact ttgactactg gggccagggg 60
accctggtea ccgtctcctc agcctccacc aagggcccat cggctctccc cctggcgccc 120

tgctccagga gcacctccga gagcacagcg gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 180
cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc 240
ccagctgtcc tacagtctc aggaactctac tcctcagca gcgtgggtgac cgtgcctcc 300
agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc aacgtagatc acaagcccag caacaccaag 360
agcgcaaatg ttgtgtcgag 380

<210> 16
<211> 417
<212> DNA
<213> VDJg*5
<400> 16
gacacggccg tctattactg taatgcagat gtattactat gggtcgggga gcctatagcc 60

ttactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc acggtcacccg tctcctcagc 120
ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcgcctctgc tccaggagca cctccgagag 180
cacacgggcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgtcgtg 240
gaactcaggc gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg 300
actctactcc ctacgacgg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta 360
cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagagc gcaaatgttg tgtcgag 417

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> alpha-B.pertussis 1
<400> 17
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
1 5 10 15
Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
20 25 30
Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
35 40 45
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met

1 5 10 15
 Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
 20 25 30

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

 100 105
 <210> 20
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> alpha-B.pertussis 4
 <400> 20

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

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

<210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> alpha-B.pertussis 5
 <400> 21

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met

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

Ser Pro Ile Thr Lys Val Arg Gly Val Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 85 90 95
 Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
 100 105

<210> 22
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> neVHH1 original
 <400> 22

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

<210> 23
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> neVHH1 clone 1
 <400> 23
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Ile
 1 5 10 15
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Glu Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys
 20 25 30

Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 35 40 45
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 50 55

<210> 24
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> neVHH1 clone 2
 <400> 24
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Val Ile
 1 5 10 15
 Gly Trp Phe Arg Gln Ala Glu Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys
 20 25 30

Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 35 40 45
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 50 55

<210> 25
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> neVHH1 clone 3
 <400> 25
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Glu Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ser Cys
 20 25 30

Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly
 35 40 45

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn
 50 55

<210> 26

<211> 58

<212> PRT

<213> neVHH2 original

<400> 26

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
 1 5 10 15

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

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35 40 45

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 50 55

<210> 27

<211> 58

<212> PRT

<213> neVHH2 clone 1

<400> 27

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
 1 5 10 15

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

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35 40 45

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 50 55

<210> 28
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> neVHH2 clone 2
 <400> 28
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Val Met
 1 5 10 15
 Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Gly
 20 25 30
 Val Thr Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35 40 45
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 50 55

<210> 29
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> neVHH2 clone 3
 <400> 29
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
 1 5 10 15
 Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Pro
 20 25 30
 Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35 40 45
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 50 55

<210> 30
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> VHH2 germline
 <400> 30
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
 1 5 10 15

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

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35 40 45

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 50 55 60

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
 65 70 75

<210> 31

<211> 105

<212> PRT

<213> alpha-Tetanus 1

<400> 31

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met
 1 5 10 15

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

Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35 40 45

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
 50 55 60

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Glu
 65 70 75 80

Arg Ala Gly Asp Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 85 90 95

Val Ser Ser Glu Arg Lys Cys Cys Val
 100 105

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> alpha-Tetanus 2

<400> 32

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

- <210> 33
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> alpha-Tetanus 3
- <400> 33

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

100 105
 <210> 34
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> alpha-Tetanus 4
 <400> 34
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met

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

<210> 35
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> alpha-hsp70
 <400> 35
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Asn Ala Met
 1 5 10 15
 Gly Trp Ser Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Ala
 20 25 30
 Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 35 40 45
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val His Leu Gln Met

