(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0042176
(43) 공개일자 2025년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/283 (2013.01)
A61K 47/6873 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2025-7006445
(22) 출원일자(국제) 2023년07월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/070934
(87) 국제공개번호 WO 2024/023271
국제공개일자 2024년02월01일
(30) 우선권주장
22306120.1 2022년07월27일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
아블린쓰
벨기에, 9052 간드, 테크놀로지에파크-쯔비나아르드 21
사노피
프랑스 75017 파리 아브뉘 드 라 그랑 아르메 46
(72) 발명자
판 보게르트, 톰
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔브이 페이턴트 디파트먼트 내
페르헬스트, 유디트
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔브이 페이턴트 디파트먼트 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **신생아 FC 수용체의 특정 에피토프에 결합하는 폴리펩타이드**

(57) 요 약

본 발명은 신생아 Fc 수용체(FcRn) 상의 특정 에피토프에 결합할 수 있는 폴리펩타이드에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 FcRn 상의 특정 에피토프에 결합할 수 있는 중쇄 단일 가변 도메인과 같은 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 포함하는 신규하고 개선된 폴리펩타이드에 관한 것이다. 본 개시내용은 FcRn 상의 특정 에피토프에 결합하는 이러한 ISVD 중 적어도 하나를 포함하는 작제물, 화합물, 분자 또는 화학적 독립체에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 이러한 폴리펩타이드의 생산 방법뿐만 아니라 치료제 화합물의 생체내 반감기의 연장 및/또는 질환 및/또는 장애, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 증식성 질환, 염증성 질환, 감염 질환 또는 자가면역질환의 예방 및/또는 치료를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 적용분야를 위한 이러한 폴리펩타이드의 용도에 관한 것이다.

대 표 도

인간 FcRn	서열번호 1	AESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLSYNSLRGEAEPCGAWVWENQVSWYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALG GKGPYTLQGLLGCELGPDNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAISQRWQQQDKAANKELTFLLFSCPHRLR EHLERGRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSFYPPELQLRFLRNGLAAGTGQGDFGPNSDGSFHASSSLTVKSGDE HHYCCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSS

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자
스텔렌스, 스테파니
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔브이 페이턴트 디파트먼트 내
보우톤, 카를로
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔브이 페이턴트 디파트먼트 내
데 비테, 빌베르트
벨기에 9052 겐트 테크놀로지파크-쯔비나아르드 21 아블린쓰 엔브이 페이턴트 디파트먼트 내
베르트랑, 토마스
프랑스 75017 파리 아브뉘 드 라 그랑 아르메 46 사노피 페이턴트 디파트먼트 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(immunoglobulin single variable domain: ISVD)을 포함하는 폴리펩타이드로서, 상기 에피토프가 서열번호 1에 따라 넘버링된 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P 중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 에피토프는 서열번호 1에 따라 넘버링된 다음의 아미노산 잔기의 조합:

a) 4H 및 5L, 및/또는

b) 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N, 및/또는

c) 167L, 171R, 174L, 175E 및 177K, 및/또는

d) 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P

중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 에피토프는 서열번호 1에 따라 넘버링된 다음의 아미노산 잔기의 조합:

a) 2E, 3S, 4H 및 5L, 및/또는

b) 97E, 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N, 및/또는

c) 98L, 99G, 100P, 101D, 102N 및 103T, 및/또는

e) 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K, 및/또는

d) 205P, 206P 및 207E, 및/또는

e) 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P

중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에피토프는 서열번호 1에 따라 넘버링된 다음의 아미노산 잔기의 조합:

a) 1A, 2E, 3S, 4H 및 5L, 및/또는

b) 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K, 및/또는

c) 204Y, 205P, 206P 및 230E, 및/또는

d) 205P, 206P, 207E 및 208L

중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에피토프는 적어도 서열번호 1에 따라 넘버링된 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 207E, 255Q, 256H, 257A,

259L, 260A 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에피토프는 적어도 서열번호 1에 따라 넘버링된 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에피토프는 적어도 서열번호 1에 따라 넘버링된 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)은 pH 5.0 내지 6.8에서의 결합 친화도가 pH 7.4에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높도록, 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)이 pH-의존적 방식으로 FcRn 상의 상기 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, FcRn 상의 상기 에피토프에 특이적으로 결합하는 상기 적어도 하나의 ISVD는 혈청 알부민에 대한 FcRn의 결합에 관련되지 않고/않거나 IgG에 대한 FcRn의 결합에 관련되지 않은 FcRn 상의 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는, 폴리펩타이드.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, FcRn 상의 상기 에피토프에 특이적으로 결합하는 상기 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고,

a) CDR1(AbM에 따름)이 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 11의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

b) CDR2(AbM에 따름)가 서열번호 12[= A I S S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 12의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

c) CDR3(AbM에 따름)이 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y S Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 13의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, FcRn 상의 상기 에피토프에 특이적으로 결합하는 상기 적어도 하나의 ISVD는 서열번호 14 또는 서열번호 15의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 (인간) 혈청 알부민에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 13

제12항에 있어서, 혈청 알부민에 특이적으로 결합하는 상기 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각

FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고,

CDR1이 SFGMS(서열번호 16)이고, CDR2가 SISGSGSDTLYADSVKG(서열번호 17)이고, CDR3이 GGSLSR(서열번호 18)이며(CDR이 Kabat 정의에 따라 결정됨); 그리고/또는 CDR1이 GFTFRSFGMS(서열번호 19)이고, CDR2가 SISGSGSDTL(서열번호 20)이며, CDR3이 GGSLSR(서열번호 21)(CDR은 AbM 정의에 따라 결정됨)인 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 면역글로불린(Ig)의 Fc 영역을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 치료제 표적에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 16

치료제 또는 진단제 화합물의 생체내 반감기를 연장시키기 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드의 용도.

청구항 17

질환 또는 장애의 치료를 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드의 생산 방법으로서, 적어도,

a. 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 또는 또 다른 적합한 발현 시스템에서 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 발현시키는 단계, 이어서 선택적으로,

b. 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 단리 및/또는 정제하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는, 핵산 서열.

청구항 20

제19항에 따른 핵산 서열을 포함하거나 제19항에 따른 핵산 서열을 발현시키는 벡터를 포함하는, 비인간 숙주 또는 숙주 세포.

청구항 21

요법에서 사용하기 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩타이드 또는 제17항의 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신생아 Fc 수용체(FcRn) 상의 특정 에피토프에 결합할 수 있는 폴리펩타이드에 관한 것이다.

[0002] 특히, 본 발명은 면역글로불린 단일 가변 도메인(immunoglobulin single variable domain: ISVD), 예컨대, FcRn 상의 특정 에피토프에 결합할 수 있는 중쇄 단일 가변 도메인을 포함하는 신규하고 개선된 폴리펩타이드에 관한 것이다. 본 발명은 FcRn 상의 특정 에피토프에 결합하는 이러한 ISVD 중 적어도 하나를 포함하는 작제물,

화합물, 분자 또는 화학적 독립체에 관한 것이다.

[0003] 본 발명은 추가로 이러한 폴리펩타이드의 생산 방법뿐만 아니라 치료제 화합물의 생체내 반감기의 연장 및/또는, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 증식성 질환, 염증성 질환, 감염 질환 또는 자가면역질환과 같은 질환 및/또는 장애의 예방 및/또는 치료를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 적용분야에 대한 이러한 폴리펩타이드의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 신생아 Fc 수용체(FcRn)는 독특하게, 주조직 적합 클래스 I(MHC-I) 패밀리와 구조적으로 관련된 베타(β)-2-마이크로글로불린(β2m) 연관 단백질이지만, T 세포에 항원성 펩타이드를 제시할 수는 없다. FcRn은 광범위하게 발현되며, 주로 실질, 내피 및 조혈 세포에서 발현된다. FcRn은 단핵구 또는 대식세포와 같은 면역 세포에서 높은 표면 수준이 검출되었지만 주로 세포 내에 국한되어 있다. FcRn은 함께 총 혈청 단백질의 거의 70%를 차지하는 2개의 알려진 리간드인 IgG 및 알부민을 갖는다.

[0005] IgG 아형은 면역 반응에서 기본적이지만, 알부민은 종양 혈압의 중요한 조절인자가 되는 것에 추가로 담체 단백질로서 작용한다. 이러한 차이에도 불구하고, IgG 및 알부민은 FcRn과 이들의 상호작용으로 인해 통상적으로 긴 혈청 반감기를 갖고, 이는 세포 재순환 메커니즘을 통해 세포내 분해로부터 이들을 구제한다. 이러한 재순환 메커니즘은 엄격하게 pH-의존적 방식으로 발생되며, FcRn에 대한 결합은 낮은 pH(pH 5 내지 6)에서 엔도솜 구획에서 흡수된 후 발생되고, 생리적 pH(전형적으로 약 7.4의 pH)에서 세포 표면에서 방출된다. FcRn의 다른 기능은 IgG를 모체로부터 자손으로 수송하여, 신생아의 미경험 및 미성숙 면역계에 성인 조상에서 발생된 경험 및 보호를 제공하는 것이다. 이 과정은 각각 뒤집힌 난황난 또는 태반을 통해 설치류 및 인간에서 출산 전에 발생되지만, 장 상피에서의 고수준의 FcRn 발현으로 인해 설치류의 출생 후 초기 생활에서 유의미한 수준으로 독특하게 계속된다는 점에서 발생적으로 조절된다. FcRn의 이러한 기능적 발현 및 IgG를 트랜스시토시스하는 이의 능력은 신생아로 제한되지 않고 평생 지속되며, 이러한 유형의 항체의 존재가 면역을 강화하는 부위로의 IgG의 표적화된 전달을 허용하며, 이는 IgG-기반 치료제에 의해 널리 이용되는 과정이다. 최종적으로, FcRn의 기능은 IgG가 단일 분자인지의 여부에 따라 차별적으로 결정되며, 따라서 단량체이거나, 면역 복합체로 존재한다. 후자의 경우, FcRn은 선천성 면역 반응뿐만 아니라 IgG 면역 복합체 내에 함유된 항원의 처리 및 제시를 결정적으로 조절하는 것으로 나타났다.

[0006] FcRn의 다수의 상이한 중요한 생리학적 역할로 인해, 치료적 적용을 위한 개선된 FcRn 결합제에 대한 명백한 필요성이 있다.

발명의 내용

[0007] 본 발명자들은 배경기술에 기재된 바와 같이 FcRn 결합제보다 여러 이점을 갖는 개선된 FcRn 결합 폴리펩타이드를 확인하였다.

[0008] 본 발명에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드의 유리한 특징 중 하나는 이들이 FcRn 상의 독특한 에피토프에 결합한다는 점이며, 이 에피토프는 알려진 천연 FcRn 리간드(즉, 혈청 알부민 및 IgG)에 의해 결합된 에피토프와 상이하다. 따라서, 본 발명자들은 FcRn에 존재하는 신규한 에피토프를 확인하였고, FcRn의 자연적인 생리학적 역할을 방해하지 않으면서 해당 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 개발하였다. 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드는 적어도 임의의 잠재적인 부작용의 발생을 피하거나 중증도를 제한하면서, FcRn에 의해 매개되거나 이를 수반하는 생물학적 경로가 중요한 역할을 하는 여러 예방적, 진단적 및 치료적 적용분야에 적용될 수 있다.

[0009] 제1 양상에서, 따라서 본 발명은 에피토프가 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P 중 적어도 하나(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 하는, FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0010] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 다음의 아미노산 잔기의 조합:

[0011] a) 4H 및 5L, 및/또는

[0012] b) 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N, 및/또는

[0013] c) 167L, 171R, 174L, 175E 및 177K, 및/또는

[0014] d) 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P

[0015] 중 적어도 하나(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기의 조합:

[0017] a) 2E, 3S, 4H 및 5L, 및/또는

[0018] b) 97E, 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N, 및/또는

[0019] c) 98L, 99G, 100P, 101D, 102N 및 103T, 및/또는

[0020] d) 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K, 및/또는

[0021] e) 205P, 206P 및 207E, 및/또는

[0022] f) 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P

[0023] 중 적어도 하나(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 소정의 또 다른 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 다음의 아미노산 잔기의 조합:

[0025] a) 1A, 2E, 3S, 4H 및 5L, 및/또는

[0026] b) 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K, 및/또는

[0027] c) 204Y, 205P, 206P 및 230E, 및/또는

[0028] d) 205P, 206P, 207E 및 208L

[0029] 중 적어도 하나(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하고, 것을 특징으로 한다.

[0030] 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 상기 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P (아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0031] 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0032] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0033] 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 산성 pH에서, 특히 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서 이들의 결합 친화도가 약 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높도록 pH-의존적 방식으로 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 신규한 에피토프에 결합한다. 이러한 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 FcRn에 대한 조건부 특이적 결합을 나타내며, 그 결과, 생체내 FcRn-매개 재순환 메커니즘을 사용함으로써, 연장된 생체내 혈청 반감기를 갖는다. 따라서 본 발명의 폴리펩타이드는 이들이 적합하게 연결, 결합 또는 융합된 관심의 치료 표적 또는 치료제 분자의 생체내 반감기를 연장시키기 위해 사용될 수 있다.

[0034] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 분자량이 적어도 30 kDa이고, 특히 분자량이 30 kDa 내지 100 kDa이다. 이러한 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 화합물은 여러 적용분야에, 특히 치료제 분자의 생체내 반감기 연장을 위해 가장 효과적 및 최적으로 적용될 수 있다.

[0035] 소정의 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 폴리펩타이드에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프가 혈청 알부민에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프와 상이한 것을 특징으로 하는 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 포함한다.

[0036] 소정의 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 폴리펩타이드에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프가

면역글로불린 G(IgG)에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프와 상이한 것을 특징으로 하는 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 포함한다.

[0037] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고,

[0038] a) CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 8의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0039] b) CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= A I S S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 9의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0040] c) CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y S Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 10의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0041] 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고,

[0042] a) CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 11의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0043] b) CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 12의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0044] c) CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y S Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 13의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0045] 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD가 서열번호 14 또는 서열번호 15의 서열, 또는 서열번호 14 또는 서열번호 15의 서열과 90%, 예컨대 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0046] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 FcRn, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 인간 FcRn 또는 cyno FcRn에 10^{3} nM 내지 10^{-2} nM 이하의 해리상수(K_D)로 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, K_D는 Kinexa, BLI 또는 SPR에 의해, 예를 들어, SPR에 의해 결정되는 바와 같이 결정된다.

[0047] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 10^{-3} nM^{-1} 내지 10^{2} nM^{-1}의 친화도(K_A)로 FcRn에 특이적으로 결합한다.

[0048] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 또는 BLI에 의해 측정 시, 적어도 약 10^{2} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{3} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{4} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{5} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{6} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{7} $M^{-1}s^{-1}$ 및 적어도 약 10^{8} $M^{-1}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택된 온-속도(on-rate) 상수(k_{on})로 FcRn에 특이적으로 결합한다.

[0049] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 또는 BLI로 측정 시, 최대 약 $10^{-1}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-2}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-3}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-4}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-5}s^{-1}$ 및 최대 약 $10^{-6}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택된 오프 속도(off-rate) 상수(k_{off})로 FcRn에 특이적으로 결합한다.

[0050] 특정 실시형태에서, 본 발명은 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD가 4개의 프레임워크 영역(각각

FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어는 것을 특징으로 하고,

[0051] a) CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 8의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0052] b) CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= A I S S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 9의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0053] c) CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y S Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 10의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0054] 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명은 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD가 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어는 것을 특징으로 하고,

[0055] a) CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 11의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0056] b) CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 12의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0057] c) CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y S Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 13의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0058] 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD가 서열번호 14 또는 서열번호 15의 서열을 갖거나, 서열번호 14 또는 서열번호 15의 서열과 90%, 예컨대 95%의 서열 동일성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0059] 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 이들이 pH-의존적 방식으로 FcRn에 결합하도록 하는 것이다.

[0060] 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 산성 pH에서, 특히 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서 결합 친화도가 약 7.4의 pH에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높도록 pH-의존적 방식으로 FcRn 상의 신규한 에피토프에 결합한다.

[0061] 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 10^{-3} nM^{-1} 내지 10^{2} nM^{-1}의 친화도(K_A)로 FcRn에 특이적으로 결합한다. 산성 pH, 바람직하게는 5.0 내지 6.8의 pH에서 FcRn에 대한 이들 폴리펩타이드의 친화도(K_A)는 약 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 FcRn에 대한 동일한 폴리펩타이드의 친화도(K_A)보다 적어도 3배 더 높다. 추가 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 약 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 동일한 폴리펩타이드의 FcRn에 대한 친화도(K_A)보다 적어도 10배 더 높은 친화도로 FcRn에 결합한다. 또한 추가 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 약 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 동일한 폴리펩타이드의 FcRn에 대한 친화도(K_A)보다 적어도 50배, 예컨대 적어도 100배 더 높은 친화도로 FcRn에 결합한다.

[0062] 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 ISVD가 약 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 적어도 하나의 ISVD가 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서 FcRn에 결합하는 친화도보다 적어도 3배, 예컨대, 적어도 10배, 예컨대, 적어도 50배, 예컨대, 적어도 100배 더 낮은 친화도로 FcRn에 결합하는 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0063] 특정 실시형태에서, 생리적 pH, 예컨대, 약 7.4의 pH에서, 적어도 하나의 ISVD는 10^{4} 리터/㏖보다 낮은 K_A 값으로 FcRn에 결합한다.

[0064] 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 ISVD가 FcRn에 검출 가능하게, 선택적으로 또는 특이적으로 결합하지 않거나, 중성 또는 생리적 pH에서, 예컨대, 약 7.4의 pH에서 FcRn에 대한 결합을 나타내지 않거나 본질적으로 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0065] 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 10^{3} nM 내지 10^{-2} nM 이하의 해리 상수(K_D)로 FcRn에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, K_D는 Kinexa, BLI 또는 SPR에 의해, 예를 들어, SPR에 의해 결정되는 바와 같이 결정된다.

[0066] 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 또는 BLI로 측정 시, 적어도 약 10^{2} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{3} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{4} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{5} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{6} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{7} $M^{-1}s^{-1}$, 및 적어도 약 10^{8} $M^{-1}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택된 온 속도 상수(k_{on})로 FcRn에 특이적으로 결합한다.

[0067] 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 또는 BLI로 측정 시, 최대 약 10^{-1} s^{-1}, 최대 약 10^{-2} s^{-1}, 최대 약 10^{-3} s^{-1}, 최대 약 10^{-4} s^{-1}, 최대 약 10^{-5} s^{-1} 및 최대 약 10^{-6} s^{-1}로 이루어진 군으로부터 선택된 오프 속도 상수(k_{off})로 FcRn에 특이적으로 결합한다.

[0068] 본 발명의 폴리펩타이드는 FcRn의 천연 리간드, 즉, 혈청 알부민 및 IgG에 의해 결합된 에피토프와 상이한 에피토프인 FcRn 상의 특정의 독특하고 신규한 에피토프에 결합한다.

[0069] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드는, 바람직하게는 이들이 FcRn 분자에 결합되거나 달리 회합될 때, 혈청 알부민 및/또는 IgG에 대한 FcRn 분자의 결합이 (유의미하게) 영향을 받거나, 감소되거나 저해되지 않도록 한다. 이런 특정 실시형태에서, (본 명세서에 기재된 바와 같은) 교차-차단 분석에서, FcRn 결합 폴리펩타이드가 FcRn 분자에 결합하거나 다르게는 이와 회합될 때, (예를 들어, ELISA 또는 Alphascreen 기반 경쟁 분석에서) 혈청 알부민의 변위는 40% 미만, 예컨대, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만이거나 본질적으로 변위가 검출되지 않는다. 이런 특정 실시형태에서, (본 명세서에 기재된 바와 같은) 교차-차단 분석에서, FcRn 결합 폴리펩타이드가 FcRn 분자에 결합하거나 다르게는 이와 회합될 때, (예를 들어, ELISA 또는 Alphascreen 기반 경쟁 분석에서) IgG의 변위는 40% 미만, 예컨대, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만이거나 본질적으로 변위가 검출되지 않는다.

[0070] 추가 특정 실시형태에서, 본 발명은 혈청 알부민 및/또는 IgG에 대한 FcRn의 결합에 관련되지 않은 FcRn 상의 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드를 제공한다. 이런 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드는 혈청 알부민에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프에 그리고/또는 IgG에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프에 포함되지 않은 아미노산 잔기를 포함하는 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함한다. 이런 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드는 혈청 알부민 및/또는 IgG에 의해 결합되지 않는 FcRn 상의 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함한다.

[0071] 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 바람직하게는 또한 FcRn에 대한 결합에 대해 서열번호 14 및/또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드와 경쟁하고/하거나 FcRn에 대한 서열번호 14 및/또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드에 의한 결합을 (본 명세서에 정의된 바와 같은) "교차-차단"하도록 한다.

[0072] 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 서열번호 14 및/또는 서열번호 15에 의해 결합된 것과 본질적으로 동일한 FcRn 상의 아미노산 잔기 및/또는 에피토프에 결합하고, 더욱 더 바람직하게는 서열번호 14 및/또는 서열번호 15에 의해 결합된 것과 본질적으로 동일한 아미노산과 FcRn의 상호작용을 공유하도록 한다. 이 목적을 위해, 특이적이지만 비제한적인 양상에 따라, 본 발명에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드는 바람직하게는 서열번호 14 및/또는 서열번호 15의 서열과 동일한 CDR을 갖거나, 서열번호 14 및/또는 서열번호 15의 서열과 비교하여 바람직하게는 이들의 CDR 내에서 여전히 서열번호 14 및/또는 서열번호 15와 FcRn의 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 상호작용을 겪게 하는 돌연변이(예컨대, 보존적 아미노산 치환)만을 포함한다.

[0073] 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명은 ISVD가 (단일) 도메인 항체, Nanobody® V_{HH}, V_{HH}, 인간화된 V_{HH}, 또는 낙타화 V_H인 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0074] 특정 실시형태에서, 본 발명은,

[0075] pH-의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD, 및

[0076] a) pH 5.0 내지 6.8에서의 결합 친화도가 약 7.4의 pH에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높도록, 적어도 하나의 ISVD가 pH-의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하고,

[0077] b) 폴리펩타이드는 분자량이 적어도 30 kDa

[0078] 인 것을 특징으로 하는 적어도 하나의 추가 모이어티를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0079] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 분자량이 약 30 kDa 내지 200 kDa, 예컨대, 약 30 kDa 내지 100 kDa이다.

[0080] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 단백질 모이어티, 예컨대, 혈청 단백질이다.

[0081] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 단백질 결합 모이어티, 예컨대, 혈청 단백질 결합 모이어티이다.

[0082] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 혈청 단백질 결합 모이어티, 예컨대, 혈청 알부민 결합 모이어티이다.

[0083] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 혈청 알부민 결합 모이어티는 FcRn에 대한 혈청 알부민의 결합에 관련되지 않는 혈청 알부민 상의 아미노산 잔기에 특이적으로 결합한다.

[0084] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 혈청 알부민 결합 모이어티가 혈청 알부민에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD, 예컨대, (단일) 도메인 항체, Nanobody® V_{HH}, V_{HH}, 인간화된 V_{HH}, 또는 낙타화 V_H인 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0085] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 혈청 알부민에 결합하는 적어도 하나의 ISVD이다.

[0086] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 본질적으로 이루어진 혈청 알부민에 결합하는 적어도 하나의 ISVD이며, 이때 CDR1은 SFGMS(서열번호 16)이고, CDR2는 SISGSGSDTLYADSVKG(서열번호 17)이고, CDR3은 GGSLSR(서열번호 18)이며, CDR은 Kabat 정의에 따라 결정되고; 그리고/또는 CDR1은 GFTFRSFGMS(서열번호 19)이고, CDR2는 SISGSGSDTL(서열번호 20)이며, CDR3은 GGSLSR(서열번호 21)이고, CDR은 AbM 정의에 따라 결정된다(Kontermann *et al.*, 2010).

[0087] 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 면역글로불린(Ig)의 Fc 영역이다. 따라서, 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명은 pH 의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD, 및

[0088] a) 적어도 하나의 ISVD는 pH 의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하여, 5.0 내지 6.8의 pH에서의 결합 친화도가 약 7.4의 pH에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높고,

[0089] b) 폴리펩타이드는 분자량이 적어도 30 kDa, 특히 약 30 kDa 내지 100 kDa이고, 그리고

[0090] c) 적어도 하나의 추가 모이어티는 면역글로불린(Ig)의 Fc 영역 또는 Fc 도메인

[0091] 인 것을 특징으로 하는 적어도 하나의 추가 모이어티를 제공한다.

[0092] 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 비-단백질 모이어티, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 폴리-에틸렌-글리콜(PEG) 모이어티이다.

[0093] 따라서, 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명은 pH 의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD, 및

[0094] a) 적어도 하나의 ISVD는 pH 의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하여, 5.0 내지 6.5의 pH에서의 결합 친화도가 약 7.4의 pH에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높고,

[0095] b) 폴리펩타이드는 적어도 30 kDa, 특히 약 30 kDa 내지 100 kDa의 분자량을 가지며,

[0096] c) 적어도 하나의 추가 모이어티는 비단백질 모이어티, 예컨대 폴리-에틸렌-글리콜(PEG) 모이어티(이로 제한되지 않음)

[0097] 인 것을 특징으로 하는 적어도 하나의 추가 모이어티를 제공한다.

[0098] 폴리펩타이드는 바람직하게는 하나 이상의 펩타이드 링커를 통해 임의로 연결된 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위를 추가로 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위가 없는 상응하는 폴리펩타이드에 비해 반감기가 증가된 폴리펩타이드를 제공한다.

[0099] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공하며, 상기 폴리펩타이드는 치료제 모이어티를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0100] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공하며, 상기 폴리펩타이드는 ISVD, 예컨대, (단일) 도메인 항체, Nanobody® V_{HH}, V_{HH}, 인간화 V_{HH} 또는 낙타화 V_H를 포함하는 치료제 모이어티를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0101] 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 또는 핵산 서열을 제공한다.

[0102] 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 또는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0103] 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 또는 핵산 서열로 또는 본 발명에 따른 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포를 제공한다.

[0104] 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 생산하는 방법 또는 과정을 제공하며, 상기 방법은 적어도 하기 단계들을 포함한다:

[0105] a. 적합한 (비인간) 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 또는 다른 적합한 발현 시스템에서, 핵산 서열을 발현시키는 단계; 선택적으로, 이어서:

[0106] b. 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 단리 및/또는 정제하는 단계.

[0107] 또한 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 폴리펩타이드, 또는 본 발명에 따른 과정에 의해 생산된 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0108] 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드, 또는 본 발명의 과정에 따라 생산된 폴리펩타이드를 이들을 필요로 하는 대상체를 치료하는 데 사용하기 위해 제공한다.

[0109] 추가 양상에서, 본 발명은 신체의 특정 위치, 조직 또는 세포 유형에 예방적 또는 치료적 폴리펩타이드를 전달하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명에 따른 과정에 의해 생산된 폴리펩타이드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0110] 추가 양상에서, 본 발명은 신체의 특정 위치, 조직 또는 세포 유형에 예방적 또는 치료적 폴리펩타이드를 전달하는 데 사용하기 위한, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 과정에 따라 생산된 폴리펩타이드를 제공한다.

[0111] 또한 추가 양상에서, 본 발명은 요법에서 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 과정에 따라 생산된 폴리펩타이드를 제공한다.

[0112] 또한 추가 양상에서, 본 발명은 증식성 질환, 염증성 질환, 감염 질환 및 자가면역질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환의 예방, 치료 또는 개선에 사용하기 위한, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 본 발명의 과정에 따라 생산된 폴리펩타이드를 제공한다.

[0113] 다른 양상에서, 본 발명은 적어도 본 발명의 폴리펩타이드, 또는 본 발명의 방법에 따라 생산된 폴리펩타이드를 증식성 질환, 염증성 질환, 감염 질환 및 자가면역질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환의 예방, 치료 또는 개선을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 상기 질환의 예방, 치료 또는 개선에 사용하기 위한 방법을 제공한다.

[0114] 추가 양상에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드, 본 발명의 핵산 또는 핵산 서열, 본 발명의 벡터 또는 본 발명의 숙주 세포를 포함하는 키트를 제공한다.

[0115] 달리 나타내거나 정의하지 않는 한, 사용된 모든 용어는 당업계에서 통상적인 의미를 가지며, 이는 당업자에게

명백할 것이다. 예를 들어, WO 08/020079의 46페이지의 단락 a)에 언급된 표준 핸드북을 참조한다.

[0116] 본 명세서에서 사용되는 단수형은 문맥에서 명백히 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시어를 포함함을 유념해야 한다. 따라서, 예를 들어, "시약"에 대한 언급은 한 가지 이상의 이러한 상이한 시약을 포함하고, "방법"에 대한 언급은, 변형될 수 있거나 본 명세서에서 기술된 방법을 대체할 수 있는 당업자에게 공지된 균등한 단계 및 방법에 대한 언급을 포함한다.

[0117] 달리 지시되지 않는 한, 일련의 요소에 선행하는 용어 "적어도"는 그 계열의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 단지 일상적인 실험을 사용하여, 본 명세서에 기재된 본 발명의 특정 실시형태에 대한 여러 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물을 본 발명에 포함시키고자 한다.

[0118] 본 명세서에 사용되는 용어 "및/또는"은 "및", "또는" 및 "상기 용어에 의해 연결된 구성요소 모두 또는 임의의 다른 조합"의 의미를 포함한다.

[0119] 본 명세서에 제공된 매개변수 또는 매개변수 범위와 관련하여 사용된 용어 "약"은 다음의 의미를 가질 것이다. 달리 표시되지 않는 한, 용어 "약"이 특정 값 또는 범위에 적용되는 경우, 값 또는 범위는 이를 측정하기 위해 사용되는 방법만큼 정확한 것으로 해석된다. 적용범위에서 오차 한계가 지정되지 않은 경우, 수치값의 마지막 소수점은 정확도를 나타낸다. 다른 오차 한계가 제공되지 않는 경우, 최대 한계는, 예를 들어, 약 pH 2.7의 pH 값에 대해 마지막 소수점에 반올림 규칙을 적용함으로써 확인되며, 오차 한계는 2.65 내지 2.74이다. 그러나, 다음의 매개변수의 경우에, 구체적인 한계를 적용할 것이다: 소수점 자리 없이 ℃로 명시된 온도는 ±1℃의 오차 한계를 갖고(예를 들어, 약 50℃의 온도 값은 50℃±1℃를 의미함); 시간(hour)으로 표시된 시간은 소수점 위치와 상관없이 0.1시간의 오차 한계를 가짐(예를 들어, 약 1.0시간의 시간 값은 1.0시간±0.1시간을 의미하고; 약 0.5시간의 시간 값은 0.5시간±0.1시간을 의미함).

[0120] 본 출원에서, 용어 "약"으로 표시된 임의의 매개변수는 또한 용어 "약" 없이 개시된 것으로 고려된다. 다시 말해서, 용어 "약"을 사용하는 매개변수에 관한 실시형태는 또한 상기 매개변수의 수치에 관한 실시형태를 기재할 것이다. 예를 들어, "약 pH 2.7"의 pH를 특정하는 실시형태는 또한 "pH 2.7"의 pH를 특정하는 실시형태를 개시할 것이고; 약 pH 2.7 내지 약 pH 2.1"의 pH 범위를 특정하는 실시형태는 또한 "pH 2.7 내지 pH 2.1"의 pH 범위를 특정하는 실시형태 등을 기재할 것이다.

[0121] 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 이어지는 본 명세서 및 청구범위 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다(comprise)" 및 "포함한다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 언급된 정수 또는 단계 또는 정수군 또는 단계군을 포함하되, 임의의 기타 정수 또는 단계 또는 정수군 또는 단계군을 배제하지 않는 것을 암시하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에서 사용될 때 용어 "포함하는"은 용어 "함유하는(containing)" 또는 "포함하는(including")"으로 대체될 수 있거나 때때로 본 명세서에서 사용될 때 용어 "갖는(having)"으로 대체될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0122] **도 1** 인간 FcRn의 서열로서, 본 발명의 폴리펩타이드의 적어도 하나에 결합하는 데 (직접적 또는 간접적으로) 관여하는 것으로 확인된 아미노산 잔기는 볼드체이고 밑줄 표시되어 있다.

도 2(A, B, C 및 D)는 FcRn(IgG 수용체 및 수송체의 Fc 단편(FcGRT)이라고도 함)의 알파 사슬의 3차원 단백질 구조를 나타내되, (A) 본 말명의 특정 실시형태에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드에 대한 에피토프는 어두운 음영이고, (B) IgG의 Fc 도메인에 대한 에피토프 및 (C) 혈청 알부민에 대한 에피토프는 밝은 음영이다. (D)에서, 본 발명의 특정 실시형태에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드에 대한 에피토프(중앙의 어두운 음영)와 IgG의 Fc 도메인에 대한 에피토프(우측의 밝은 음영) 및 혈청 알부민에 대한 에피토프(좌측 및 상단 중앙의 밝은 음영)를 조합하여 나타낸다.

도 3(A, B, C 및 D)은 이형-이량체 FcRn(IgG 수용체 및 수송체(FcGRT) 및 베타-2-마이크로글로불린의 Fc 단편이라고도 함)의 3차원 단백질 구조를 나타내되, (A) 본 발명의 특정 실시형태에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드에 대한 에피토프는 어두운 음영이고, (B) IgG의 Fc 도메인에 대한 에피토프 및 (C) 혈청 알부민에 대한 에피토프는 밝은 음영이다. (D)에서, 본 발명의 특정 실시형태에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드에 대한 에피토프(중앙의 어두운 음영)와 IgG의 Fc 도메인에 대한 에피토프(우측의 밝은 음영) 및 혈청 알부민에 대한 에피토프(좌측 및 상단 중앙의 밝은 음영)를 조합하여 나타낸다.

도 4 암컷 Tg32 마우스에서 1.9 mg/kg의 i.v. 볼루스 투여 후 대조군 ISVD(IRR) 및 알부민 결합

ISVD(ALB23002)를 포함하는 대조군 이중특이적 ISVD 작제물과 비교하여 FcRn 결합 ISVD 및 알부민 결합 ISVD(ALB23002)를 포함하는 다양한 시험 이중특이적 ISVD 작제물의 평균(+/- SD, n=2) 혈청 농도-시간 프로파일.

도 5 암컷 Tg32 마우스에서 1.9 mg/kg의 i.v. 볼루스 투여 후 대조군 ISVD(IRR) 및 알부민 결합 ISVD(ALB23002)를 포함하는 대조군 이중특이적 ISVD 작제물과 비교하여 모 V_{HH} T0263018B11 또는 이의 돌연변이체 및 알부민 결합 ISVD(ALB23002)를 포함하는 시험 이중특이적 ISVD 작제물의 평균(+/- SD, n=2) 혈청 농도-시간 프로파일.

도 6 암컷 Tg32 마우스에서의 i.v. 볼루스 투여 후 FcRn 결합 ISVD, 알부민-결합 ISVD 및 잠재적으로 관련된 치료 표적에 대해 유도된 추가 ISVD를 포함하는 다가 ISVD 시험 작제물의 평균(+/- SD, n=2) 혈청 농도-시간 프로파일.

도 7 암컷 Tg32 마우스에서 4.5 mg/kg으로 i.v. 볼루스 투여 후, 하나 이상의 FcRn 결합 ISVD 및 하나 이상의 대조군 ISVD를 포함하는 다가 ISVD 시험 작제물의 평균(+/- SD, n=2-3) 혈청 농도-시간 프로파일.

도 8 예를 들어, 실시예 14에 기재되는 바와 같은 융합 폴리펩타이드 작제물의 구조적 형식의 개략적 도면. 작제물의 Fc 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 노브 인 홀(knob in hole) 돌연변이를 갖는 IgG4 FALA Fc 골격 서열 변이체이다. 이러한 작제물 중 하나(즉, TP049)는 IgG Fc(IHH)로 표시된 바와 같은 Fc 골격 서열에서의 추가 아미노산 차이 또는 변이(즉, I253A, H310A, H435A)를 포함한다. 사용한 FcRn Nanobody® VHH는 각 경우에 본 명세서에 기재된 바와 같은 T0263018B11 서열(도면에서 FcRn ISVD 1)이었다. FcRn 또는 임의의 다른 고려되는 표적에 결합하지 않는 Nanobody® VHH는 도면에서 "대조군 ISVD"로 나타낸다. 이러한 융합 단백질에서 Nanobody® VHH 서열은 Fc 사슬의 *N*- 및/또는 *C*-말단에 대해 (본 명세서에 상세하게 기재된 바와 같은) 링커를 통해, 즉, 본 명세서에 기재된 바와 같이 각각 IgG1 힌지(예를 들어, 서열번호 126) 및/또는 GS 링커(예를 들어, 35GS 링커, 서열번호 48)를 통해 융합된다.

도 9 FcRn의 다양한 코팅 밀도(최대 5000 RU)를 사용하는 Biacore 8K+ 기기의 표면 플라스몬 공명(SPR) 센서그램. Nanobody® VHH-Fc 단백질은 pH 6.0(A) 및 pH 7.4(B)에서 인간 FcRn에 대한 친화도 측정에 의해 특성규명되었다.

도 10 암컷 Tg32 마우스에서 *i.v.* 볼루스 투여 후, FcRn-결합 ISVD 및 IgG4 FALA의 Fc 영역을 포함하는, ISVD-Fc 융합 단백질의 평균(+/- SD, n=4 내지 6) 혈청 농도-시간 프로파일.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0123] 본 발명자들은 FcRn의 천연 리간드, 예컨대, 혈청 알부민 및 IgG의 에피토프와 상이한 FcRn 상의 독특한 에피토프를 확인하였다. 또한, 더욱 더 중요하게는, 본 발명자들은 FcRn의 자연적인 생리적 역할을 방해하지 않으면서 FcRn의 해당 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 신규한 폴리펩타이드를 개발하였다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 폴리펩타이드는 인간 FcRn(서열번호 1) 또는 이의 (다형성) 변이체 또는 아이소폼에 결합하는 적어도 하나의 "면역글로불린 단일 가변 도메인"(ISVD)을 포함한다. 아이소폼은 단일 생물학적 사건에 의해 또는 모두 당업계에 알려진 바와 같은 대안의 프로모터 사용, 대안의 스플라이싱, 대안의 개시 및 리보솜 프레임시프트와 같은 생물학적 사건의 조합에 의해 동일한 유전자로부터 생성될 수 있는 대안의 단백질 서열이다.

[0124] 아미노산 잔기는 아래의 표 B-1에 언급되는 바와 같이, 표준 3문자 또는 1문자 아미노산 코드에 따라 본 명세서에서 상호 호환 가능하게 표시될 것이다.

[0125] [표 B-1]

통상적인 아미노산

1 문자 코드	3 문자 코드	아미노산 명칭
A	Ala	알라닌
C	Cys	시스테인
D	Asp	아스파르트산
E	Glu	글루탐산
F	Phe	페닐알라닌
G	Gly	글리신
H	His	히스티딘
I	Ile	아이소류신
K	Lys	리신
L	Leu	류신
M	Met	메티오닌
N	Asn	아스파라긴
P	Pro	프롤린
Q	Gln	글루타민
R	Arg	아르기닌
S	Ser	세린
T	Thr	트레오닌
V	Val	발린
W	Trp	트립토판
X	Xaa	지정되지 않음
Y	Tyr	티로신

[0126]

[0127] 아미노산 잔기가 "X" 또는 "Xaa"로 표시되는 경우, 문맥상 더 제한된 해석이 요구되지 않는 한, 아미노산 잔기가 지정되지 않음을 의미한다. 예를 들어, 설명이 아미노산 잔기(들) 중 하나(또는 그 이상)가 X로 표시되는 CDR의 아미노산 서열을 제공하는 경우, 설명은 아미노산 잔기(들)가 CDR의 특정 위치에 존재한다(할 수 있다)고 추가로 특정할 수 있다.

[0128] 아미노산은 자연 발생적 단백질에서 통상적으로 발견되는 해당 L-아미노산이고, 표 B-1에 열거되어 있다. D-아미노산을 포함하는 해당 아미노산 서열은 본 정의에 포괄되는 것으로 의도되지 않는다. 번역 후 변형된 아미노산을 함유하는 임의의 아미노산 서열은 변형된 위치와 함께 표 B-1에 표시된 기호를 사용하여 초기에 번역된 아미노산 서열로 기술될 수 있으며; 예를 들어, 하이드록실화 또는 글리코실화, 그러나 이러한 변형은 아미노산 서열에 명시적으로 표시되지 않아야 한다. 서열 변형 결합, 가교 및 말단 캡, 비-펩티딜 결합 등으로 발현될 수 있는 임의의 펩타이드 또는 단백질이 이 정의에 포함된다. 용어 "단백질", "펩타이드", "단백질/펩타이드" 및 "폴리펩타이드"는 본 명세서 전반에 걸쳐 상호 호환 가능하게 사용되며, 각각은 본 명세서의 목적을 위해 동일한 의미를 갖는다. 각 용어는 2개 이상의 아미노산의 선형 사슬로 이루어진 유기 화합물을 지칭한다. 화합물은 10개 이상의 아미노산; 25개 이상의 아미노산; 50개 이상의 아미노산; 100개 이상의 아미노산, 200개 이상의 아미노산, 심지어 300개 이상의 아미노산을 가질 수 있다. 당업자는 폴리펩타이드와 단백질을 구별하는 아미노산 수에 대한 당업계에서 인식된 컷오프 포인트는 없지만 폴리펩타이드가 일반적으로 단백질보다 더 적은 아미노산을 포함한다는 것; 폴리펩타이드가 화학적 합성 또는 재조합 방법에 의해 생성될 수 있다는 것; 및 당업계에 알려진 바와 같은 재조합 방법에 의해 시험관내 또는 생체내에서 일반적으로 제조된다는 것을 인식할 것이다.

[0129] 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열이 각각 다른 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열을 "포함하는 것", 또는 다른 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열로 "본질적으로 이루어지는 것"으로 언급될 때, 이는 후자의 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열이 각각 처음 언급된 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열에 혼입되었다는 것을 의미할 수 있지만, 더 보통으로는 이는 일반적으로, 처음 언급된 서열이 (예를 들어, 본

명세서에 기재된 임의의 적합한 방법에 의해) 실제로 생성되거나 얻어진 방법과 상관없이, 처음 언급된 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열이 각각 이의 서열 내에 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 신장부를 포함한다는 것, 후자의 서열과 동일한 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열을 각각 갖는다는 것을 의미한다. 비제한적 예로서, ISVD가 CDR 서열을 포함한다고 하는 경우, 이는 상기 CDR 서열이 ISVD에 혼입되었다는 것을 의미할 수 있으며, 더 보통으로는 이는 일반적으로 상기 ISVD가 생성되거나 얻어진 방법과 상관없이, ISVD가 이의 서열 내에 상기 CDR 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는 아미노산 잔기의 신장부를 포함한다는 것을 의미한다. 또한 후자의 아미노산 서열이 특정 생물학적 또는 구조적 기능을 갖는 경우, 이는 바람직하게는 처음 언급된 아미노산 서열에서 본질적으로 동일, 유사 또는 동등한 생물학적 또는 구조적 기능을 갖는다는 것을 유념해야 한다(다시 말해서, 처음 언급된 아미노산 서열은 바람직하게는 후자의 서열이 본질적으로 동일, 유사 또는 동등한 생물학적 또는 구조적 기능을 수행할 수 있도록 하는 것이다). 예를 들어, ISVD가 각각 CDR 서열 또는 프레임워크 서열을 포함한다고 할 때, CDR 서열 및 프레임워크는 바람직하게는 상기 ISVD에서 각각 CDR 서열 또는 프레임워크 서열로서 기능할 수 있다. 또한, 뉴클레오타이드 서열이 다른 뉴클레오타이드 서열을 포함한다고 하는 경우, 처음 언급된 뉴클레오타이드 서열은 바람직하게는 발현 산물(예를 들어, 폴리펩타이드)로 발현될 때, 후자의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열은 상기 발현 생성물의 일부를 형성하도록 한다(다시 말해서, 후자의 뉴클레오타이드 서열은 처음 언급된, 더 큰 뉴클레오타이드 서열과 동일한 리딩 프레임임).

[0130] 본 명세서에 사용된 바와 같이 용어 "도메인"은 일반적으로 항체 사슬의 구형 영역, 특히 중쇄 항체의 구형 영역, 또는 이러한 구형 영역으로 본질적으로 이루어진 폴리펩타이드를 지칭한다. 보통, 이러한 도메인은, 예를 들어, 시트로서 또는 이황화 결합에 의해 안정화된 펩타이드 루프(예를 들어, 3 또는 4개의 펩타이드 루프)를 포함할 것이다.

[0131] 본 기술과 관련하여, 특정 표적 분자에 "결합"하는 것은 항체 및 이들의 각각의 항원과 관련하여 이해되는 바와 같이 당업계에서 통상적인 의미를 갖는다.

[0132] 본 발명의 폴리펩타이드가 특이적으로 향하는 에피토프는 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P 중 적어도 하나를 포함하는 FcRn 상의 에피토프이고, 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기의 순서 또는 넘버링에 따라 넘버링된다.

[0133] 용어 "항원 결정소(antigenic determinant)"는 항원 결합 분자(예컨대, ISVD 또는 ISVD를 포함하는 폴리펩타이드)에 의해, 더 구체적으로는 상기 분자의 항원 결합 부위에 의해 인식되는 항원 상의 에피토프를 지칭한다. 용어 "항원 결정소" 및 "에피토프"는 또한 본 명세서에서 상호 호환 가능하게 사용될 수 있다. 특정 항원 결정소, 에피토프, 항원 또는 단백질에 (또는 적어도 일부, 이의 단편 또는 에피토프에) (특이적으로) 결합할 수 있고/있거나, 이에 대해 친화도를 갖고/갖거나 특이성을 갖는 항원 결합 분자(예컨대, 항체, ISVD, 본 발명의 폴리펩타이드, 또는 일반적으로 항원-결합 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 이의 단편)는 상기 항원 결정소, 에피토프, 항원 또는 단백질"에 대한" 또는 이들로 "향하는" 것으로 언급된다.

[0134] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 에피토프는 FcRn 1차 서열의 연속 아미노산 잔기의 신장부를 포함하는, 선형 에피토프이다.

[0135] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 에피토프는 FcRn 3차 서열에서 서로 가깝고 본 발명의 폴리펩타이드의 3차원 구조와 특이적 결합 표면을 형성하는 FcRn 1차 서열의 적어도 2개의 불연속 아미노산 잔기 및/또는 아미노산 잔기의 신장부를 포함하는, 입체구조 에피토프이다.

[0136] 소정의 특정 실시형태에 따르면, 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 향하는 본 명세서에 개시된 FcRn 상의 에피토프는 혈청 알부민이 향하는 FcRn 상의 에피토프와 상이한 것을 특징으로 한다(도 2 및 도 3 참조).

[0137] 소정의 특정 실시형태에 따르면, 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 향하는 본 명세서에 개시된 FcRn 상의 에피토프는 면역글로불린 G(IgG)가 향하는 FcRn 상의 에피토프와 상이한 것을 특징으로 한다(도 2 및 도 3 참조).

[0138] 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 이들이 결합하는 FcRn 상의 에피토프가 다음의 아미노산 잔기의 조합,

[0139] a) 4H 및 5L, 및/또는

[0140] b) 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N, 및/또는

[0141] c) 167L, 171R, 174L, 175E 및 177K, 및/또는

[0142] d) 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P

[0143] 중 적어도 하나를 포함하고,

[0144] 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기의 순서 또는 넘버링에 따라 넘버링되는 것을 특징으로 한다.

[0145] 소정의 추가 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 이들이 결합하는 에피토프가 다음의 아미노산 잔기의 조합

[0146] a) 2E, 3S, 4H 및 5L, 및/또는

[0147] b) 97E, 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N, 및/또는

[0148] c) 98L, 99G, 100P, 101D, 102N 및 103T, 및/또는

[0149] d) 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K, 및/또는

[0150] e) 205P, 206P 및 207E, 및/또는

[0151] f) 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P

[0152] 중 적어도 하나를 포함하고,

[0153] 아미노산 잔기가 서열번호 1의 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기의 순서 또는 넘버링에 따라 넘버링되는 것을 특징으로 한다.

[0154] 소정의 추가 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 이들이 결합하는 에피토프가 다음의 아미노산 잔기의 조합

[0155] a) 1A, 2E, 3S, 4H 및 5L, 및/또는

[0156] b) 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K, 및/또는

[0157] c) 204Y, 205P, 206P 및 230E, 및/또는

[0158] d) 205P, 206P, 207E 및 208L

[0159] 중 적어도 하나를 포함하고,

[0160] 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기의 순서 또는 넘버링에 따라 넘버링되는 것을 특징으로 한다.

[0161] 또한 추가 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 이들이 결합하는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P를 포함하며, 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기의 순서 또는 넘버링에 따라 넘버링되는 것을 특징으로 한다.

[0162] 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 이들이 결합하는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P를 포함하며, 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기의 순서 또는 넘버링에 따라 넘버링되는 것을 특징으로 한다.

[0163] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 이들이 결합하는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P를 포함하며, 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기의 순서 또는 넘버링에 따라 넘버링되는 것을 특징으로 한다(도 1, 도 2 및 도 3 참조).

[0164] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따

라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0165] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0166] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0167] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0168] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0169] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0170] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0171] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L 및/또는 260A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0172] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A 및/또는 259L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0173] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H 및/또는 257A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0174] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q 및/또는 255Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0175] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L 및/또는 209Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0176] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H,

5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0177] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0178] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L 및/또는 260A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0179] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0180] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A 및/또는 259L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0181] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A 및/또는 259L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0182] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A 및/또는 259L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0183] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A 및/또는 259L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0184] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0185] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및/또는 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0186] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H 및/또는 257A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0187] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H 및/또는 257A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는

것을 특징으로 한다.

[0188] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H 및/또는 257A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0189] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0190] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q 및/또는 256H(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0191] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q 및/또는 256H(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0192] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0193] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0194] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q 및/또는 255Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0195] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0196] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H 및 5L을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0197] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0198] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 167L, 171R, 174L, 175E 및 177K를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0199] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0200] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 167L, 171R, 174L, 175E 및 177K를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0201] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0202] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0203] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0204] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0205] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0206] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E 및 177K(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0207] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E 및 177K(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0208] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 177K, 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q, 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0209] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H 및 5L을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0210] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N인 것을 특징으로 한다.

[0211] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 98L, 99G, 100P, 101D, 102N 및 103T를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0212] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0213] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 205P, 206P 및 207E를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0214] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0215] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L 97E, 98L, 99G, 100P, 101D 및 102N을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0216] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0217] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 205P, 206P 및 207E를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0218] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L 98L, 99G, 100P, 101D, 102N 및 103T를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0219] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q, 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0220] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 205P, 206P 및 207E를 포함하는 것을 특징으로

한다.

[0221] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q, 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0222] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q, 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0223] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q, 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0224] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0225] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q, 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0226] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q, 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0227] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 255Q, 256H, 257ª, 259L, 260ª, 261Q, 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0228] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N 및 103T를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0229] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 205P, 206P 및 207E를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0230] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0231] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 205P, 206P 및 207E를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0232] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N 및 103T를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0233] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0234] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0235] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 177K, 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0236] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 177K, 205P, 206P 및 207E(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0237] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 are 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 177K, 205P, 206P 및 207E(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0238] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 230E, 205P, 206P, 207E, 208L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0239] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H 및 5L를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0240] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0241] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 204Y, 205P, 206P 및 230E를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0242] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 205P, 206P, 207E 및 208L을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0243] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H 5L, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E 및 177K를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0244] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H 5L, 204Y, 205P, 206P 및 230E를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0245] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H 5L, 205P, 206P, 207E 및 208L을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0246] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 204Y, 205P, 206P, 230E, 205P, 206P, 207E 및 208L을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0247] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L 204Y, 205P, 206P, 230E, 205P, 206P, 207E 및 208L을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0248] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 230E, 205P, 206P, 207E, 208L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0249] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P 및 230E(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0250] 다른 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P 및 230E(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0251] 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 상기 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 5L, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0252] 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 상기 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L 및 260A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0253] 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 상기 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0254] 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 상기 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 207E, 255Q, 256H, 257A 및 259L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0255] 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 상기 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 98L, 99G,

100P, 101D, 102N, 167L, 171R, 174L, 175E, 177K, 207E, 255Q, 256H, 257A 및 259L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0256] 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0257] 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 205P, 206P, 207E, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0258] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0259] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0260] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0261] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0262] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L 및 260A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0263] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L 및 260A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0264] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A, 261Q, 및 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0265] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A 및 259L(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0266] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L 및 260A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0267] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 262P(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0268] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H, 257A, 259L, 260A 및/또는 261Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0269] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q, 256H 및/또는 257A(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0270] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q, 255Q 및/또는 256H(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0271] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L, 209Q 및/또는 255Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0272] 또한 추가 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드는 에피토프가 적어도 다음의 아미노산 잔기 1A, 2E, 3S, 4H, 5L, 32P, 97E, 98L, 99G, 100P, 101D, 102N, 103T, 164R, 167L, 168E, 171R, 174L, 175E, 177K, 204Y, 205P, 206P, 207E, 208L 및/또는 209Q(아미노산 잔기는 서열번호 1에 따라 넘버링됨)를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0273] 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 FcRn 상의 해당 에피토프와 상호작용하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 통해 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0274] **5.1 면역글로불린 단일 가변 도메인**

[0275] "단일 가변 도메인"과 상호 호환 가능하게 사용되는 용어 "면역글로불린 단일 가변 도메인"(ISVD)은 항원 결합 부위가 단일 면역글로불린 도메인에 존재하거나 이에 의해 형성되는 면역글로불린 분자를 정의한다. 이는 "통상적인" 면역글로불린(예를 들어, 단클론성 항체) 또는 이들의 단편(예컨대, Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv, 다이-scFv) 외에도 면역글로불린 단일 가변 도메인을 지정하되, 2개의 면역글로불린 도메인, 특히 2개의 가변 도메인은 상호 작용하여 항원 결합 부위를 형성한다. 전형적으로, 통상적인 면역글로불린에서, 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 경쇄 가변 도메인(V_L)은 상호작용하여 항원 결합 부위를 형성한다. 이 경우에, V_H와 V_L 둘 모두의 상보성 결정 영역(CDR)은 항원 결합 부위에 기여할 것이며, 즉, 총 6개의 CDR은 항원 결합 부위 형성에 관련될 것이다.

[0276] 위의 정의를 고려하면, 통상적인 4쇄 항체(예컨대, IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 분자; 당업계에 알려짐)의 또는 Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, 예컨대, 이황화 연결된 Fv 또는 scFv 단편, 또는 이러한 통상적인 4쇄 항체로부터 유래된 디아바디(모두 당업계에 알려짐)의 항원-결합 도메인은 보통 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 간주되지 않으며, 이러한 경우에, 항원의 각 에피토프에 대한 결합은 보통 하나의 (단일) 면역글로불린 도메인이 아니라, 한 쌍의 (회합) 면역글로불린 도메인, 예컨대, 경쇄 및 중쇄 가변 도메인에 의해, 즉, 각 항원의 에피토프에 공동으로 결합하는 면역글로불린 도메인의 V_H-V_L 쌍에 의해 일어나기 때문이다.

[0277] 대조적으로, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 추가의 면역글로불린 가변 도메인과의 쌍 형성 없이 항원의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 면역글로불린 단일 가변 도메인의 결합 부위는 단일 V_H, 단일 V_{HH} 또는 단일 V_L 도메인에 의해 형성된다.

[0278] 이렇게 해서, 단일 가변 도메인은, 단일 항원 결합 단위(즉, 단일 항원 결합 도메인이 기능적 항원 결합 단위를

형성하기 위해 다른 가변 도메인과 상호작용할 필요가 없도록 단일 가변 도메인으로 본질적으로 이루어진 기능적 항원 결합 단위)를 형성할 수 있는 한, 경쇄 가변 도메인 서열(예를 들어, V_L-서열) 또는 이의 적합한 단편; 또는 중쇄 가변 도메인 서열(예를 들어, V_H-서열 또는 V_{HH} 서열) 또는 이의 적합한 단편일 수 있다.

[0279] 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)은, 예를 들어, 중쇄 ISVD, 예컨대, 낙타화 V_H 또는 인간화 V_{HH}를 포함하는 V_H, V_{HH}일 수 있다. 바람직하게는, 이는 낙타화 V_H 또는 인간화 V_{HH}를 포함하는 V_{HH}이다. 중쇄 ISVD는 통상적인 4쇄 항체 또는 중쇄 항체로부터 유래될 수 있다.

[0280] 예를 들어, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 단일 도메인 항체(또는 단일 도메인 항체로서 사용하는 데 적합한 아미노산 서열), "dAb" 또는 dAb(또는 dAb로서 사용하기에 적합한 아미노산 서열) 또는 Nanobody® 분자(본 명세서에 정의된 바와 같고, V_{HH}를 포함하지만, 이들로 제한되지 않음); 다른 단일 가변 도메인, 또는 이의 임의의 하나의 임의의 적합한 단편일 수 있다.

[0281] 특히, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 Nanobody® 면역글로불린 단일 가변 도메인(예컨대, 인간화 V_{HH} 또는 낙타화 V_H를 포함하는 V_{HH}) 또는 이의 적합한 단편일 수 있다. [주: Nanobody®는 Ablynx N.V.의 등록상표임]

[0282] V_{HH}s, V_{HH} 항체 단편 및 V_{HH} 항체로도 알려진 "V_{HH} 도메인"은 본래 "중쇄 항체"의(즉, "경쇄가 결여된 항체"의; Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363: 446-448, 1993) 항원 결합 면역글로불린 가변 도메인으로서 기재되어 있다. 용어 "V_{HH} 도메인"은 통상적인 4쇄 항체에 존재하는 중쇄 가변 도메인(본 명세서에서 "V_H 도메인"으로 지칭됨)으로부터 그리고 통상적인 4쇄 항체에 존재하는 경쇄 가변 도메인에 존재하는 경쇄 가변 도메인(본 명세서에서 "V_L 도메인"으로 지칭됨)으로부터 이들 가변 도메인을 구별하기 위해 선택되었다. V_{HH}의 추가 설명에 대해, Muyldermans의 검토 논문을 참조한다(Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001).

[0283] 일반적으로, 면역글로불린의 생성은 실험 동물의 면역화, 하이브리도마를 생성하기 위한 면역글로불린 생성 세포의 융합 및 원하는 특이성에 대한 선별을 포함한다. 대안적으로, 면역글로불린은 미경험 또는 합성 라이브러리의 선별에 의해, 예를 들어, 파지 디스플레이에 의해 생성될 수 있다.

[0284] 면역글로불린 서열, 예컨대, Nanobody® V_{HH}의 생성은 다양한 간행물에 광범위하게 기재되어 있으며, 그 중에서 WO 94/04678, 문헌[Hamers-Casterman *et al.* 1993 및 Muyldermans *et al.*, 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302, 2001)]이 예시될 수 있다. 이러한 방법에서, 낙타과는 표적 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 표적 항원으로 면역화된다. 상기 면역화로부터 얻어진 V_{HH}의 레퍼토리는 표적 항원에 결합하는 V_{HH}에 대해 추가로 선별된다.

[0285] 이러한 경우에, 항체의 생성은 면역화 및/또는 선별을 위해 정제된 항원을 필요로 한다. 항원은 천연 공급원으로부터, 또는 재조합 생산 과정에서 정제될 수 있다.

[0286] 면역글로불린 서열에 대한 면역화 및/또는 선별은 이러한 항원의 펩타이드 단편을 사용하여 수행될 수 있다.

[0287] 본 기술은 마우스, 래트, 토끼, 당나귀, 인간, 및 낙타과의 면역글로불린 서열을 포함하는 상이한 기원의 면역글로불린 서열을 사용할 수 있다. 본 기술은 또한 완전한 인간, 인간화, 또는 키메라 서열을 포함한다. 예를 들어, 본 발명 낙타과 면역글로불린 서열 및 인간화 낙타과 면역글로불린 서열 또는 낙타화 도메인 항체, 예를 들어, Ward 등에 의해 기재된 바와 같은 낙타화 dAb를 포함한다(예를 들어, WO 94/04678 및 문헌[Riechmann, Febs Lett., 339:285-290, 1994 및 Prot. Eng., 9:531-537, 1996]). 또한, 본 발명은 또한 융합된 면역글로불린 서열, 예를 들어, 다가 및/또는 다중특이적 작제물의 형성(하나 이상의 V_{HH} 도메인을 포함하는 다가 및 다중특이적 폴리펩타이드 및 이들의 제조에 대해, 또한 문헌[Conrath *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001]뿐만 아니라, 예를 들어 WO 96/34103 및 WO 99/23221을 참조), 및 본 기술의 면역글로불린 서열로부터 유래될 수 있는 태그 또는 다른 기능적 모이어티, 예를 들어, 독소, 표지, 방사성화학물질 등을 포함하는 면역글로불린 서열을 사용한다.

[0288] "인간화 V_{HH}"는 자연 발생적 V_{HH} 도메인의 아미노산 서열에 상응하지만, (예를 들어, 위에 나타낸 바와 같이) 상기 자연 발생적 V_{HH} 서열의 아미노산 서열에서(특히 프레임워크 서열에서) 하나 이상의 아미노산 잔기를 인간으

로부터의 통상적인 4쇄 항체로 V_H 도메인에서 상응하는 위치(들)에 생기는 아미노산 잔기 중 하나 이상으로 대체함으로써 "인간화된" 아미노산 서열을 포함한다. 이는 그 자체로 알려진 방식으로 수행될 수 있으며, 예를 들어, 본 명세서의 추가 설명 및 선행 기술(예를 들어, WO 2008/020079)에 기반하여 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 이러한 인간화 V_{HH}는 c그 자체로 알려진 임의의 적합한 방식으로 얻어질 수 있고, 따라서, 출발 물질로서 자연 발생적 V_{HH} 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 사용하여 얻은 폴리펩타이드로 엄격하게 제한되지 않는다는 점을 유념해야 한다.

[0289] "낙타화 V_H"는 자연 발생적 V_H 도메인의 아미노산 서열에 상응하지만, 통상적인 4쇄 항체로부터의 자연 발생적 V_H 도메인의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기를 중쇄 항체의 V_{HH} 도메인에서 상응하는 위치(들)에 생기는 아미노산 잔기 중 하나 이상으로 대체함으로써 "낙타화"된 아미노산 서열을 포함한다. 이는 그 자체로 알려진 방식으로 수행될 수 있으며, 예를 들어, 본 명세서의 추가 설명 및 선행 기술(예를 들어, WO 2008/020079)에 기반하여 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 "낙타화" 치환은 바람직하게는 본 명세서에 정의된 바와 같이 V_H-V_L 계면 및/또는 소위 낙타과 특질 잔기를 형성하고/하거나 이에 존재하는 아미노산 위치에 삽입된다(예를 들어 WO 94/04678 및 문헌[Davies and Riechmann (1994 and 1996)], 상기 참조). 바람직하게는, 낙타화 V_H를 생성하거나 설계하기 위한 출발 물질 또는 출발 시점으로서 사용한 V_H 서열은 바람직하게는 포유류로부터의 V_H 서열, 더 바람직하게는 인간의 V_H 서열, 예컨대, V_H3 서열이다. 그러나, 이러한 낙타화 V_H는 그 자체로 알려진 임의의 적합한 방식으로 얻어질 수 있고, 따라서, 출발 물질로서 자연 발생적 V_H 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 사용하여 얻어진 폴리펩타이드로 엄격하게 제한되지 않는다는 것을 유념해야 한다.

[0290] 면역글로불린 단일 가변 도메인 서열의 바람직한 구조는 당업계 및 본 명세서에서 각각 "프레임워크 영역 1"("FR1"); "프레임워크 영역 2"("FR2"); "프레임워크 영역 3"("FR3"); 및 "프레임워크 영역 4"("FR4")로 지칭되는 4개의 프레임워크 영역("FR")을 포함하는 것으로 간주될 수 있고, 프레임워크 영역은 당업계 및 본 명세서에서 각각 "상보성 결정 영역 1"("CDR1"); "상보성 결정 영역 2"("CDR2"); 및 "상보성 결정 영역 3"("CDR3")으로 지칭되는 3개의 상보성 결정 영역("CDR")에 의해 중단된다.

[0291] WO 08/020079(본 명세처에 참조에 의해 원용됨)의 58 및 59 페이지의 단락 q)에 추가로 기재된 바와 같이, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 아미노산 잔기는 문헌[Riechmann and Muyldermans, 2000]의 논문에서 낙타과의 V_{HH} 도메인에 적용되는 바와 같이 Kabat 등("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)에 의해 주어진 V_H 도메인에 대한 일반 넘버링에 따라 넘버링될 수 있다(문헌[J. Immunol. Methods 240 (1-2): 185-195]; 예를 들어, 본 간행물의 도 2 참조). V_H 도메인 및 V_{HH} 도메인에 대해 당업계에 알려진 바와 같이 - 각각의 CDR에서 아미노산 잔기의 총 수는 다양할 수 있고 Kabat 넘버링에 의해 표시된 아미노산 잔기의 총 수에 상응하지 않을 수도 있다는 것을 유념해야 한다(즉, Kabat 넘버링에 따른 하나 이상의 위치는 실제 서열에서 점유되지 않을 수도 있거나, 실제 서열은 Kabat 넘버링에 의해 허용되는 수보다 더 많은 아미노산 잔기를 포함할 수 있음). 이것은 일반적으로 Kabat에 따른 넘버링이 실제 서열에서 아미노산 잔기의 실제 넘버링과 일치하거나 일치하지 않을 수 있음을 의미한다. V_H 도메인 및 V_{HH} 도메인에서 아미노산 잔기의 총 수는 보통 110 내지 120, 종종 112 내지 115의 범위일 것이다. 그러나 더 작은 그리고 더 긴 서열이 또한 본 명세서에 기술된 목적에 적합할 수 있음을 유념해야 한다.

[0292] 본 출원에서 달리 표시되지 않는 한, CDR 서열은 문헌[Kontermann and Dübel (Eds. 2010, Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33-51)]에 기재된 바와 같이 AbM 넘버링에 따라 결정되었다. 이 방법에 따르면, FR1은 1 내지 25번 위치의 아미노산 잔기를 포함하고, CDR1은 위치 26 내지 35의 아미노산 잔기를 포함하고, FR2는 36 내지 49번 위치의 아미노산을 포함하고, CDR2는 50 내지 58번 위치의 아미노산 잔기를 포함하고, FR3은 59 내지 94번 위치의 아미노산 잔기를 포함하고, CDR3은 95 내지 102번 위치의 아미노산 잔기를 포함하고, FR4는 103 내지 113번 위치의 아미노산 잔기를 포함한다.

[0293] CDR 영역의 결정은 또한 상이한 방법에 따라 수행될 수 있다. Kabat에 따른 CDR 결정에서, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 FR1은 1 내지 30번 위치의 아미노산 잔기를 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR1은 31 내지 35번 위치의 아미노산 잔기를 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 FR2는 36 내지 49번 위치의 아미노산을 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR2는 50 내지 65번 위치의 아미노산 잔기를

포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 FR3은 66 내지 94번 위치의 아미노산 잔기를 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 CDR3은 95 내지 102번 위치의 아미노산 잔기를 포함하고, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 FR4는 103 내지 113번 위치의 아미노산 잔기를 포함한다.

[0294] 이러한 면역글로불린 서열에서, 프레임워크 서열은 임의의 적합한 프레임워크 서열일 수 있고, 적합한 프레임워크 서열의 예는 예를 들어 표준 핸드북 및 추가 개시내용 및 본 명세서에 언급된 선행 기술에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다.

[0295] 프레임워크 서열은 바람직하게는 (예를 들어, 인간화 또는 낙타화에 의해) 면역글로불린 프레임워크 서열로부터 유래된 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 프레임워크 서열(의 적합한 조합)이다. 예를 들어, 프레임워크 서열은 경쇄 가변 도메인(예를 들어, V_L-서열) 및/또는 중쇄 가변 도메인(예를 들어, V_H-서열 또는 V_{HH} 서열)로부터 유래된 프레임워크 서열일 수 있다. 하나의 특히 바람직한 양상에서, 프레임워크 서열은 V_{HH}-서열로부터 유래된 프레임워크 서열(상기 프레임워크 서열은 선택적으로 부분적 또는 완전히 인간화될 수 있음)이거나 낙타화된 통상적인 V_H 서열(본 명세서에 정의된 바와 같음)이다.

[0296] 특히, 본 발명에서 사용되는 ISVD 서열에 존재하는 프레임워크 서열은 ISVD 서열이 Nanobody® 분자, 예컨대, 인간화 V_{HH} 또는 낙타화 V_H를 포함하는 V_{HH}가 되도록 특질 잔기(본 명세서에 정의된 바와 같음) 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 이러한 프레임워크 서열(의 적합한 조합)의 일부 바람직하지만 비제한적인 예는 본 명세서의 추가 개시내용으로부터 명백해질 것이다.

[0297] 또한, 면역글로불린 서열에 대해 본 명세서에 일반적으로 기재된 바와 같이, 하나 이상의 프레임워크 서열(예를 들어, 이들 CDR 및 프레임워크 서열과 동일한 순서로 단편이 유래된 전체 크기 면역글로불린 서열에서 발생할 수 있음)에 의해 적합하게 측접되고/되거나 이를 통해 연결된 하나 이상의 CDR 서열을 함유하는 단편과 같은, 임의의 전술한 것의 적합한 단편(또는 단편의 조합)을 사용하는 것도 가능하다.

[0298] 그러나 본 발명은 ISVD 서열(또는 이를 발현하는 데 사용된 뉴클레오타이드 서열)의 유래나 ISVD 서열 또는 뉴클레오타이드 서열이 생성되거나 이를 얻은 (또는 생성되었거나 얻었던) 방식으로 제한되지 않는다는 것을 유념해야 한다. 따라서, ISVD 서열은 (임의의 적합한 종으로부터의) 자연 발생적 서열 또는 합성 또는 반합성 서열일 수 있다. 구체적이지만 비제한적 양상에서, ISVD 서열은 자연 발생적 서열(임의의 적합한 종으로부터 유래) 또는 합성 또는 반합성 서열이고, "인간화"(본 명세서에 정의된 바와 같음) 면역글로불린 서열(예컨대, 부분적 또는 완전히 인간화된 마우스 또는 토끼 면역글로불린 서열, 및 특히 부분적 또는 완전히 인간화된 V_{HH} 서열), "낙타화"(본 명세서에 정의된 바와 같음) 면역글로불린 서열뿐만 아니라 친화도 성숙(예를 들어, 합성, 무작위 또는 자연 발생적 면역글로불린 서열로부터 시작), CDR 접합, 베니어링(veneering), 상이한 면역글로불린 서열로부터 유래된 단편 조합, 중첩 프라이머를 사용하는 PCR 어셈블리, 및 당업자에게 잘 알려진 면역글로불린 서열을 조작하기 위한 유사한 기법과 같은 기법에 의해 얻은 면역글로불린 서열; 또는 임의의 앞서 언급한 것의 임의의 적합한 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0299] 유사하게, 뉴클레오타이드 서열은 자연 발생적 뉴클레오타이드 서열 또는 합성 또는 반합성 서열일 수 있고, 예를 들어, 적합한 자연 발생적 주형(예를 들어, 세포로부터 단리된 DNA 또는 RNA)으로부터 PCR에 의해 단리된 서열, 라이브러리(특히, 발현 라이브러리)로부터 단리된 뉴클레오타이드 서열, (미스매치 PCR과 같이 그 자체로 알려진 임의의 적합한 기법을 사용하여) 자연 발생적 뉴클레오타이드 서열에 돌연변이를 도입함으로써 제조된 뉴클레오타이드 서열, 중복 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 제조된 뉴클레오타이드 서열 또는 그 자체로 알려진 DNA 합성을 위한 기법을 사용하여 제조된 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.

[0300] 위에 기재한 바와 같이, ISVD는 Nanobody® V_{HH} 또는 이의 적합한 단편일 수 있다. ISVD에 대한 일반적인 설명은 아래의 추가 설명 및 본 명세서에서 인용된 선행 기술을 참고한다. 그러나 이와 관련하여, 본 명세서 및 선행기술은 소위 "V_H3 부류"의 ISVD(즉, V_H3 부류의 인간 생식계열 서열과 높은 정도의 서열 상동성을 갖는 ISVD, 예컨대DP-47, DP-51 또는 DP-29)를 주로 설명하였다는 것을 유념해야 한다. 그러나, 가장 넓은 의미에서 본 발명은 일반적으로 임의의 유형의 ISVD를 사용하고, 예를 들어, 또한, 예를 들어 WO 2007/118670에 기재된 바와 같이 소위 "V_H4 부류"에 속하는 ISVD(즉, V_H4 부류의 인간 생식계열 서열과 높은 정도의 상동성을 갖는 ISVD, 예컨대, DP-78)를 사용한다는 것을 유념해야 한다.

[0301] 일반적으로, ISVD(특히 (부분) 인간화 V_{HH} 서열 및 낙타화 V_H 서열을 포함하는 V_{HH} 서열)는 (또한 본 명세서에 추가로 기재되는 바와 같이) 프레임워크 서열 중 하나 이상에서 (본 명세서에 기재된 바와 같이) 하나 이상의 "특질 잔기"의 존재를 특징으로 할 수 있다. 따라서, 일반적으로, ISVD는 하기의 (일반) 구조를 갖는 면역글로불린 서열로서 정의될 수 있다,

[0302] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0303] (여기서, FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 나타내고, CDR1 내지 CDR3은 각각 상보성 결정 영역 1 내지 3을 나타내고, 특질 잔기 중 하나 이상은 본 명세서에 추가로 정의된 바와 같음).

[0304] 특히, ISVD는 다음과 같은 (일반) 구조를 갖는 면역글로불린 서열일 수 있다:

[0305] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0306] (여기서, FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 나타내고, CDR1 내지 CDR3은 각각 상보성 결정 영역 1 내지 3을 나타내고, 프레임워크 서열은 본 명세서에 추가로 정의된 바와 같음).

[0307] 보다 구체적으로, ISVD는 다음과 같은 (일반) 구조를 갖는 면역글로불린 서열일 수 있다:

[0308] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0309] (여기서, FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 나타내고, CDR1 내지 CDR3은 각각 상보성 결정 영역 1 내지 3을 나타내고,

[0310] Kabat 넘버링에 따른 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 및 108번 위치에서의 아미노산 잔기 중 하나 이상은 하기 표 A-0에 언급된 특질 잔기로부터 선택된다.

[0311] [표 A-0]

Nanobody® ISVD 에서의 특질 잔기

위치	인간 V_H3	특질 잔기
11	L, V; 주로 L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; 바람직하게는 L
37	V, I, F; 보통 V	$F^{(1)}$, Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, 바람직하게는 $F^{(1)}$ 또는 Y
44(8)	G	$E^{(3)}$, $Q^{(3)}$, $G^{(2)}$, D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; 바람직하게는 $G^{(2)}$, $E^{(3)}$ 또는 $Q^{(3)}$; 가장 바람직하게는 $G^{(2)}$ 또는 $Q^{(3)}$
45(8)	L	$L^{(2)}$, $R^{(3)}$, P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; 바람직하게는 $L^{(2)}$ 또는 $R^{(3)}$
47(8)	W, Y	$F^{(1)}$, $L^{(1)}$ 또는 $W^{(2)}$ G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; 바람직하게는 $W^{(2)}$, $L^{(1)}$ 또는 $F^{(1)}$
83	R 또는 K; 일반적으로 R	R, $K^{(5)}$, T, $E^{(5)}$, Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; 바람직하게는 K 또는 R; 가장 바람직하게는 K

[0312]

84	A, T, D; 주로 A	P(5), S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; 바람직하게는 P
103	W	W(4), R(6), G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P(6), E, C; 바람직하게는 W
104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; 바람직하게는 G
108	L, M, 또는 T; 대부분 L	Q, L(7), R, P, E, K, S, T, M, A, H; 바람직하게는 Q 또는 L(7)

주:

특히, 배타적인 것은 아니지만, 43 내지 46 번 위치에서 KERE 또는 KQRE 와 조합됨.

보통 44 내지 47 번 위치에서의 GLEW 와 같음.

보통 43 내지 46 번 위치에서의 KERE 또는 KQRE, 예를 들어, 43 내지 47 번 위치에서의 KEREL, KEREF, KQREL, KQREF, KEREG, KQREW 또는 KQREG 와 같음. 대안적으로, TERE(예를 들어, TEREL), TQRE(예를 들어, TQREL), KECE(예를 들어, KECEL 또는 KECER), KQCE(예를 들어, KQCEL), RERE(예를 들어, REREG), RQRE(예를 들어, RQREL, RQREF, 또는 RQREW), QERE(예를 들어, QEREG), QQRE(예를 들어, QQREW, QQREL, 또는 QQREF), KGRE(예를 들어, KGREG), KDRE(예를 들어, KDREV)와 같은 서열도 가능함. 일부 다른 가능하지만 덜 바람직한 서열에는 예를 들어 DECKL 및 NVCEL 이 포함됨.

44 내지 47 번 위치에 GLEW 가 있고 43 내지 46 번 위치에 KERE 또는 KQRE 가 있음.

종종 자연 발생적 V_{HH} 도메인의 83 내지 84 번 위치에서의 KP 또는 EP 와 같음.

특히, 배타적으로는 아니지만, 44 내지 47 번 위치에서의 GLEW 와 조합됨.

단, 44 내지 47 번 위치가 GLEW 일 때, 108 번 위치는 항상 103 번에 또한 W 를 포함하는 (비-인간화) V_{HH} 서열에서의 Q 이다.

GLEW 그룹은 또한 44 내지 47 번 위치에서의 GLEW-유사 서열, 예를 들어 GVEW, EPEW, GLER, DQEW, DLEW, GIEW, ELEW, GPEW, EWLP, GPER, GLER 및 ELEW 를 포함함

[0313]

[0314] **5.2 특이성**

[0315] 용어 "특이성", "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적 결합"은 특정 결합 단위, 예컨대, ISVD가 충분히 높은 친화도로 결합할 수 있는 동일한 유기체로부터의 항원과 같은 다양한 표적 분자의 수를 지칭한다(아래 참조). "특이성", "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적 결합"은 본 명세서에서 "선택성", "선택적으로 결합하는" 또는 "선택적 결합"과 상호 호환 가능하게 사용된다. ISVD와 같은 결합 단위는 바람직하게는 지정된 표적에 특이적으로 결합한다. 결합 단위의 특이성/선택성은 친화도를 기반으로 결정될 수 있다. 친화도는 분자의 상호 작용의 강도 또는 안정성을 나타낸다. 친화도는 통상적으로 몰/ℓ(또는 M) 단위로 표현되는 K_D 또는 해리 상수로 제공된다. 또한, 친화도는, $1/K_D$와 동일하며 (mol/ℓ)$^{-1}$(또는 M^{-1}) 단위로 표현되는 결합 상수 K_A로 나타낼 수 있다. 친화도는 모이어티와 표적 분자 상의 결합 부위 사이의 결합 강도에 대한 척도이다: K_D값이 낮을수록, 표적 분자와 표적 모이어티 사이의 결합 강도는 더 강하다. 전형적으로, 본 기술에서 사용되는 결합 단위(예컨대, ISVD)는 10^{-5} 내지 10^{-12} mol/리터 이하, 바람직하게는 10^{-7} 내지 10^{-12} mol/리터 이하 및 더 바람직하게는 10^{-8} 내지 10^{-1} mol/리터의 해리상수(K_D)(즉, 10^{5} 내지 10^{12} 리터/mol 이상, 바람직하게는 10^{7} 내지 10^{12} 리터/mol 이상, 더 바람직하게는 10^{8} 내지 10^{12} 리터/mol의 결합 상수(K_A))로 이들의 표적에 결합할 것이다. 10^{-4} mol/리터보다 큰 임의의 K_D 값(또는 10^{4} 리터/mol보다 낮은 임의의 K_A 값)은 일반적으로 비특이적 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 항원에 대한

면역글로불린 서열의 결합과 같은 생물학적 상호작용에 대한 K_D는 전형적으로 10^{-5} mol/리터(10000 nM 또는 10 μM) 내지 10^{-12} mol/리터(0.001 nM 또는 1 pM) 이하의 범위에서 특이적인 것으로 간주된다. 따라서, 특이적/선택적 결합은 - 동일한 측정 방법, 예를 들어, SPR을 사용하여 - 결합 단위(또는 이를 포함하는 폴리펩타이드)는 10^{-5} 내지 10^{-12} mol/리터 이하의 K_D 값으로 FcRn에 결합하고 10^{-4} mol/리터 초과의 K_D 값으로 관련 표적에 결합한다는 것을 의미할 수 있다. 따라서, ISVD는 바람직하게는 서열번호 14 또는 15의 아미노산으로 이루어진 ISVD와 비교하여 인간 FcRn의 적어도 절반의 결합 친화도, 더 바람직하게는 적어도 동일한 결합 친화도를 나타내되, 결합 친화도는 동일한 방법, 예컨대, SPR을 사용하여 측정된다. 특정 종으로부터의 특정 표적에 대한 특이적 결합은 결합 단위가 또한 상이한 종으로부터의 유사한 표적에 특이적으로 결합할 수 있다는 것을 제외하지 않는다. 예를 들어, 인간 FcRn에 대한 특이적 결합은 결합 단위(또는 이를 포함하는 폴리펩타이드)가 또한 사이노몰거스 원숭이로부터의 FcRn에 특이적으로 결합할 수 있다는 것을 제외하지 않는다. 지정된 표적에 대한 결합 단위의 특이적 결합은 예를 들어, 스캐차드 분석 및/또는 경쟁 결합 분석, 예를 들어 방사선 면역측정법(RIA), 효소 면역분석법(EIA) 및 샌드위치 경쟁 분석법, 및 당업계에서 그 자체로 알려진 이들의 다양한 변이형; 및 본 명세서에서 언급된 기타 기술을 비롯한, 그 자체로 알려진 임의의 적합한 방법에서 측정될 수 있다. 해리 상수는 당업자에게 명백하듯이 실제 또는 겉보기 해리 상수일 수 있다. 해리 상수를 측정하는 방법은 당업자에게 명확할 것이며, 예를 들어 하기에서 언급되는 기술을 포함한다. 이와 관련하여, 10^{-4} mol/리터 또는 10^{-3} mol/리터 초과(예를 들어, 10^{-2} mol/리터)의 해리상수를 측정하는 것은 가능하지 않을 수도 있다는 것이 또한 분명할 것이다. 선택적으로, 당업자에게 분명한 바와 같이, (실제 또는 겉보기) 해리 상수는 관계식 [$K_D = 1/K_A$]에 의해 (실제 또는 겉보기) 해리 상수(K_A)에 기반하여 계산될 수 있다. 두 분자 사이의 분자 상호작용의 친화도는 그 자체로 알려진 다양한 기법, 예컨대, 잘 알려진 표면 플라스몬 공명(SPR) 바이오센서 기법을 통해 측정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ober *et al.*, 2001, Intern. Immunology 13: 30 1551-1559] 참조). 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "표면 플라스몬 공명"은 바이오센서 기질 내의 단백질 농도 변경의 검출에 의해 실시간 생물특이적 상호작용의 분석을 가능하게 하는 광학 현상을 지칭하며, 여기서 하나의 분자가 바이오센서 칩 상에 고정되고, 다른 분자는 k_{on}, k_{off} 측정값 및 그에 따른 K_D(또는 K_A) 값을 산출하는 흐름 조건하에서 고정 분자 위로 통과된다. 이는 예를 들어 잘 알려진 BIAcore® 시스템(GE Healthcare 산하 BIAcore International AB, 스웨덴 웁살라 및 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용하여 수행될 수 있다. 추가 설명을 위해, Jonsson 등(1993, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26), Jonsson 등(1991 Biotechniques 11: 620-627), Johnsson 등(1995, J. Mol. Recognit. 8: 125- 131) 및 Johnnson 등(1991, Anal. Biochem. 198: 268-277)을 참조한다. 생체 분자 상호 작용의 친화도를 측정하기 위한 또 다른 잘 알려진 바이오 센서 기법은 생물층 간섭계(bio-layer interferometry: BLI)이다(예를 들어, 문헌[Abdiche *et al.*, 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217] 참조). 본 명세서에서 사용되는 용어 "생물층 간섭계" 또는 "BLI"는 두 표면, 즉, 내부 참조층(참조 빔) 및 바이오센서 팁 상의 고정된 단백질 층(신호 빔)으로부터 반사된 빛의 간섭 패턴을 분석하는 무표지 광학 기법을 지칭한다. 바이오센서의 팁에 결합된 분자 수의 변화는 간섭 패턴의 이동을 유발하며, 이는 파장 이동(nm)으로 보고되며, 그 규모는 바이오센서 팁 표면에 결합된 분자 수의 직접적인 척도이다. 상호 작용을 실시간으로 측정할 수 있으므로 결합 및 해리 속도와 친화도를 측정할 수 있다. BLI는 예를 들어 잘 알려진 Octet® 시스템(Pall Life Sciences의 사업부 ForteBio, Menlo Park, USA)을 사용하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 친화도는 KinExA® 플랫폼(Sapidyne Instruments Inc, 미국 보이시 소재)을 사용하여 동력학 배제 분석(Kinetic Exclusion Assay: KinExA)으로 측정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Drake *et al.*, 2004, Anal. Biochem., 328: 35-43] 참조). 본 명세서에서 사용되는 용어 "KinExA"는 변형되지 않은 분자의 진정한 평형 결합 친화도 및 동역학을 측정하기 위한 용액 기반 방법을 지칭한다. 항체/항원 복합체의 평형 용액이 항원(또는 항체)으로 미리 코팅된 비드가 있는 컬럼 위로 통과되어, 유리 항체(또는 항원)가 코팅된 분자에 결합하도록 한다. 이렇게 포획된 항체(또는 항원)의 검출은 항체(또는 항원)에 결합하는 형광 표지된 단백질로 달성된다. GYROLAB® 면역분석 시스템은 자동화된 생물분석 및 신속한 샘플 턴어라운드를 위한 플랫폼을 제공한다(Fraley *et al.*, 2013, Bioanalysis 5: 1765-74).

[0316] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 10^{6} M^{-1} 내지 10^{11} M^{-1}의 친화도(K_A)로 FcRn 상의 상기 기재된 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0317] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 10^{-6} nM 내지 10^{-11} M 이하의 해리 상수(K_D)로 FcRn 상의 위에 기재된 에피토프에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, K_D는 Kinexa, BLI 또는 SPR에 의해, 예를 들어, SPR에 의해 결정된 바와 같이 결정된다.

[0318] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 또는 BLI로 측정 시, 적어도 약 10^{2} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{3} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{4} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{5} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{6} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{7} $M^{-1}s^{-1}$ 및 적어도 약 10^{8} $M^{-1}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택된 온-속도 상수(k_{on})로 FcRn 상의 상기 기재된 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0319] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 또는 BLI로 측정 시, 최대 약 10^{-1} s^{-1}, 최대 약 10^{-2} s^{-1}, 최대 약 10^{-3} s^{-1}, 최대 약 10^{-4} s^{-1}, 최대 약 10^{-5} s^{-1} 및 최대 약 10^{-6} s^{-1}로 이루어진 군으로부터 선택된 오프 속도 상수(k_{off})로 FcRn 상의 상기 기재된 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0320] 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는, 특정 실시형태에서, 이들이 다음의 포유류 종, 즉, 마우스, 개, 래트, 토끼, 기니피그, 돼지, 양, 소 및 사이노몰거스 원숭이 중 적어도 하나, 바람직하게는 적어도 둘, 더 바람직하게는 적어도 셋 및 최대로는 본질적으로 모두로부터 인간 FcRn과 FcRn 사이에서 교차 반응성이 되게 한다.

[0321] ISVD가 다른 ISVD와 비교하여 "인간 및 비인간 영장류 FcRn에 대한 결합에 있어서 (개선된) 교차 반응성"을 보이는 것으로 언급되는 경우, 이는 상기 ISVD에 대해 인간 FcRn 및 비인간 영장류 FcRn에 대한 결합 활성의 비(예컨대, K_D 또는 k_{off}로 표현됨)는 동일한 분석에서 다른 ISVD에 대해 계산된 동일한 비보다 더 낮다는 것을 의미한다. 인간 및 비-인간 영장류 FcRn에 대한 결합에 있어서의 양호한 교차 반응성은 비인간 영장류에 대해 수행된 전임상 연구에서 본 발명에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드의 독성 평가를 가능하게 한다.

[0322] 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 이들이 인간 FcRn과 사이노몰거스 원숭이 FcRn 사이에서, 바람직하게는 또한 인간 FcRn 및/또는 사이노몰거스 원숭이 FcRn 중 어느 하나와, 다른 한편으로는 적어도 하나, 바람직하게는 래트 FcRn 및 돼지 FcRn 둘 다와 (적어도) 교차 반응성이 되도록 한다. 편의를 위해, FcRn의 서열에서, 본 발명의 폴리펩타이드의 추정 에피토프의 일부인 것으로 추정되는 아미노산의 신장부가 강조되었다. 임의의 특정 메커니즘 또는 가설에 제한되지 않고, 해당 포유류 FcRn 단백질의 아미노산 서열에 존재하는 아미노산 잔기의 상응하는 신장부(내의 하나 이상의 아미노산 잔기)에 (본질적으로) 결합할 수 있으며, 본 발명의 폴리펩타이드는 교차 반응성인 것으로 추정된다.

[0323] 일반적으로, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는, 500 nM 미만, 바람직하게는 200 nM 미만, 더 바람직하게는 10 nM 미만의 친화도로 인간 FcRn에 결합할 수 있을 때; 또한 500 nM 미만, 바람직하게는 200 nM 미만, 더 바람직하게는 10 nM 미만의 친화도로 위에 언급한 종으로부터의 FcRn에 결합할 수 있을 때, 둘 모두 SPR을 사용하여 결정 시, 인간 FcRn과 위에 언급된 다른 종 중 하나로부터의 FcRn 사이에서 교차 반응성인 것으로 간주될 수 있다.

[0324] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0325] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 2[= X_1 X_2 X_3 M Y]의 아미노산 서열을 갖거나, CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 5[=X_a X_b X_c F X_e X_1 X_2 X_3 M Y]의 아미노산 서열을 갖되,

[0326] X_a는 A, D, E, F, G, H, K, L, M, N, Q, S, T, W 또는 Y이고,

[0327] X_b는 F, I, L, M, V 또는 Y이며,

[0328] X_c는 A, E, G, I, L, M, N, P, S, T, V, W 또는 Y이고,

[0329] X_e는 D, E, G, K, M, N, P, Q, S 또는 T이며,

[0330] X_1은 A, D, E, G, K, N, Q, S, T 또는 V이고,

[0331] X_2는 A, F, L, M, N, Q, S, T, V 또는 Y이며, 그리고

[0332] X_3은 A, D, E, G, H, M, N, Q, S, T 또는 V이고,

[0333] 그리고

[0334] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 3[= A I X_3 X_4 G G G X_8 X_9 X_{10} Y A D S V K G]의 아미노산 서열을 갖거나, CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 6[=A I X_3 X_4 G G G X_8 X_9 X_{10}]의 아미노산 서열을 갖되,

[0335] X_3은 A, D, E, G, H, P, Q, R, S, T 또는 V이고,

[0336] X_4는 A, D, E, G, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이며,

[0337] X_8은 A, D, G, H, K, L, M, Q, S, T 또는 V이고,

[0338] X_9는 A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이고, 그리고

[0339] X_{10}은 A, D, E, H, S, T, V 또는 Y이고,

[0340] 그리고

[0341] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 4[= D X_2 X_3 X_4 T X_6 X_7 T X_9 Y X_{11} X_{12}]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 7[= D X_2 X_3 X_4 T X_6 X_7 T X_9 Y X_{11} X_{12}]의 아미노산 서열을 갖되,

[0342] X_2는 A, D, E, F, G, I, L, M, Q, S, T, V, W 또는 Y, 바람직하게는 A, E, F, G, I, L, M, Q, S, T, V, W 또는 Y이고,

[0343] X_3은 L 또는 N, 바람직하게는 L이며,

[0344] X_4는 F, L, W 또는 Y이고,

[0345] X_6은 A, D, E, K, L, M, Q, S 또는 W이며,

[0346] X_7은 L, M 또는 V이고,

[0347] X_9는 A, D, E, F, G, H, K, L, M, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이며,

[0348] X_{11}은 A, E, L, M, Q, S, T, V 또는 W이고, 그리고

[0349] X_{12}는 T 또는 Y이고,

[0350] 단, 아미노산

[0351] 서열번호 2의 X_1 및 X_3 및 서열번호 4의 X_6은 동시에 각각 E, D 및 D가 아니거나,

[0352] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3 및 서열번호 7의 X_6은 동시에 각각 T, E, D 및 D가 아니거나,

[0353] 서열번호 2의 X_1 및 X_3 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 E, D 및 K가 아니거나,

[0354] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, E, D 및 K가 아니거나,

[0355] 서열번호 2의 X_3 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 D 및 K가 아니거나,

[0356] 서열번호 5의 X_a 및 X_3 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, D 및 K가 아니거나,

[0357] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, Q, D 및 K가 아니거나,

[0358] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 서열번호 6의 X_4 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9은 동시에 각각 T, E, D, Q, D 및 K가 아니거나,

[0359] 서열번호 2의 X_1, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, Q, D 및 K가 아니거나,

[0360] 서열번호 5의 X_a 및 X_1, 서열번호 6의 X_4 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, Q, D 및 K가 아니거나,

[0361] 서열번호 2의 X_3 및 서열번호 4의 X_6는 동시에 각각 D, 및 D가 아니거나,

[0362] 서열번호 5의 X_a 및 X_3 및 서열번호 7의 X_6은 동시에 각각 T, D 및 D가 아니거나,

[0363] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6은 동시에 각각 E, D, Q 및 D가 아니거나,

[0364] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 서열번호 6의 X_4, 및 서열번호 7의 X_6은 동시에 각각 T, E, D, Q 및 D가 아니거나,

[0365] 서열번호 2의 X_1, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D 및 K가 아니거나,

[0366] 서열번호 2의 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, Q, D 및 K가 아니거나,

[0367] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 E, D, Q 및 K가 아니거나,

[0368] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 서열번호 6의 X_4 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, E, D, Q 및 K가 아니거나,

[0369] 서열번호 2의 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, D 및 K가 아니거나,

[0370] 서열번호 2의 X_3, 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 D 및 S이 아니거나,

[0371] 서열번호 5의 X_a 및 X_3, 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, D 및 S가 아니거나,

[0372] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, D 및 S가 아니거나,

[0373] 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D 및 K가 아니거나,

[0374] 서열번호 5의 X_a, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, D 및 K가 아니거나,

[0375] 서열번호 2의 X_1, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, Q, D 및 K가 아니거나,

[0376] 서열번호 2의 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, Q, D 및 S가 아니거나,

[0377] 서열번호 5의 X_a 및 X_3, 서열번호 6의 X_4, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, D, Q, D, 및 S가 아니거나,

[0378] 서열번호 2의 X_1, 서열번호 3의 X_4, 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, Q, D 및 S가 아니거나,

[0379] 서열번호 5의 X_a 및 X_1, 서열번호 6의 X_4, 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, Q, D 및 S가 아니거나,

[0380] 서열번호 2의 X_1 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D 및 K가 아니거나,

[0381] 서열번호 5의 X_a 및 X_1, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, D 및 K가 아니거나,

[0382] 서열번호 2의 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, D 및 K가 아니거나,

[0383] 서열번호 5의 X_a 및 X_3, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, D, D 및 K가 아니거나,

[0384] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, D 및 K가 아니거나,

[0385] 서열번호 2의 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, D 및 S가 아니거나,

[0386] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, Q, D 및 S가 아니거나,

[0387] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 서열번호 6의 X_4, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, D, Q, D 및 S가 아니거나,

[0388] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, Q, D 및 K이거나,

[0389] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, D, D 및 S가 아니거나,

[0390] 서열번호 2의 X_3, 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, D 및 S이거나,

[0391] 서열번호 5의 X_a 및 X_3, 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, D, D 및 S가 아니거나,

[0392] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 E, D 및 S가 아니거나,

[0393] 서열번호 3의 X_4, 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 Q 및 S가 아니거나,

[0394] 서열번호 5의 X_a, 서열번호 6의 X_4, 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, Q 및 S가 아니다.

[0395] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0396] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 2[= X_1 X_2 X_3 M Y]의 아미노산 서열을 갖거나, CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 5[=X_a X_b X_c F X_e X_1 X_2 X_3 M Y]의 아미노산 서열을 갖되,

[0397] X_a는 G 또는 T이고,

[0398] X_b는 F이며,

[0399] X_c는 T이고,

[0400] X_e는 S이며,

[0401] X_1은 S, D 또는 E이고,

[0402] X_2는 Y이며, 그리고

[0403] X_3은 A 또는 D이고,

[0404] 그리고

[0405] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 3[= A I X_3 X_4 G G G X_8 X_9 X_{10} Y A D S V K G]의 아미노산 서열을 갖거나, CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 6[=A I X_3 X_4 G G G X_8 X_9 X_{10}]의 아미노산 서열을 갖되,

[0406] X_3은 S이고,

[0407] X_4는 Q 또는 S이며,

[0408] X_8은 S이고,

[0409] X_9는 T이며, 그리고

[0410] X_{10}은 D이고,

[0411] 그리고

[0412] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 4[= D X_2 X_3 X_4 T X_6 X_7 T X_9 Y X_{11} X_{12}]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 7[= D X_2 X_3 X_4 T X_6 X_7 T X_9 Y X_{11} X_{12}]의 아미노산 서열을 갖되,

[0413] X_2는 T이고,

[0414] X_3은 L이며,

[0415] X_4는 Y이고,

[0416] X_6은 D, E 또는 S이며,

[0417] X_7은 L이고,

[0418] X_9는 K, R, S 또는 W이며,

[0419] X_{11}은 S이고, 그리고

[0420] X_{12}는 Y이며,

[0421] 단, 아미노산

[0422] 서열번호 2의 X_1 및 X_3 및 서열번호 4의 X_6은 동시에 각각 E, D 및 D가 아니거나,

[0423] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3 및 서열번호 7의 X_6은 동시에 각각 T, E, D 및 D가 아니거나,

[0424] 서열번호 2의 X_1 및 X_3 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 E, D 및 K가 아니거나,

[0425] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, E, D 및 K가 아니거나,

[0426] 서열번호 2의 X_3 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 D 및 K가 아니거나,

[0427] 서열번호 5의 X_a 및 X_3 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, D 및 K가 아니거나,

[0428] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, Q, D 및 K이거나,

[0429] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 서열번호 6의 X_4 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9은 동시에 각각 T, E, D, Q, D 및 K가 아니거나,

[0430] 서열번호 2의 X_1, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, Q, D 및 K가 아니거나,

[0431] 서열번호 5의 X_a 및 X_1, 서열번호 6의 X_4 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, Q, D 및 K가 아니거나,

[0432] 서열번호 2의 X_3 및 서열번호 4의 X_6는 동시에 각각 D, 및 D가 아니거나,

[0433] 서열번호 5의 X_a 및 X_3 및 서열번호 7의 X_6은 동시에 각각 T, D 및 D가 아니거나,

[0434] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6은 동시에 각각 E, D, Q 및 D가 아니거나,

[0435] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 서열번호 6의 X_4, 및 서열번호 7의 X_6은 동시에 각각 T, E, D, Q 및 D가 아니거나,

[0436] 서열번호 2의 X_1, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D 및 K가 아니거나,

[0437] 서열번호 2의 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, Q, D 및 K가 아니거나,

[0438] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 E, D, Q 및 K가 아니거나,

[0439] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 서열번호 6의 X_4 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, E, D, Q 및 K가 아니거나,

[0440] 서열번호 2의 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, D 및 K가 아니거나,

[0441] 서열번호 2의 X_3, 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 D 및 S이 아니거나,

[0442] 서열번호 5의 X_a 및 X_3, 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, D 및 S가 아니거나,

[0443] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, D 및 S가 아니거나,

[0444] 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D 및 K가 아니거나,

[0445] 서열번호 5의 X_a, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, D 및 K가 아니거나,

[0446] 서열번호 2의 X_1, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, Q, D 및 K가 아니거나,

[0447] 서열번호 2의 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, Q, D 및 S가 아니거나,

[0448] 서열번호 5의 X_a 및 X_3, 서열번호 6의 X_4, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, D, Q, D, 및 S가 아니거나,

[0449] 서열번호 2의 X_1, 서열번호 3의 X_4, 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, Q, D 및 S가 아니거나,

[0450] 서열번호 5의 X_a 및 X_1, 서열번호 6의 X_4, 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, Q, D 및 S가 아니거나,

[0451] 서열번호 2의 X_1, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D 및 K가 아니거나,

[0452] 서열번호 5의 X_a 및 X_1, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, D 및 K가 아니거나,

[0453] 서열번호 2의 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, D 및 K가 아니거나,

[0454] 서열번호 5의 X_a 및 X_3, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, D, D 및 K가 아니거나,

[0455] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, D 및 K가 아니거나,

[0456] 서열번호 2의 X_3, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, D 및 S가 아니거나,

[0457] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, Q, D 및 S가 아니거나,

[0458] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 서열번호 6의 X_4, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, D, Q, D 및 S가 아니거나,

[0459] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 서열번호 3의 X_4, 및 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 E, D, Q, D 및 K이거나,

[0460] 서열번호 5의 X_a, X_1 및 X_3, 및 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, E, D, D 및 S가 아니거나,

[0461] 서열번호 2의 X_3, 서열번호 4의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 D, D 및 S이거나,

[0462] 서열번호 5의 X_a 및 X_3, 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 동시에 각각 T, D, D 및 S가 아니거나,

[0463] 서열번호 2의 X_1 및 X_3, 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 E, D 및 S가 아니거나,

[0464] 서열번호 3의 X_4, 및 서열번호 4의 X_9는 동시에 각각 Q 및 S가 아니거나,

[0465] 서열번호 5의 X_a, 서열번호 6의 X_4, 및 서열번호 7의 X_9는 동시에 각각 T, Q 및 S가 아니다.

[0466] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0467] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 2의 아미노산 서열 [= X_1 X_2 X_3 M Y]을 갖거나, CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 5의 아미노산 서열[=X_a X_b X_c F X_e X_1 X_2 X_3 M Y]을 갖되,

[0468] X_a는 A, D, E, F, G, H, K, L, M, N, Q, S, T, W 또는 Y이고,

[0469] X_b는 F, I, L, M, V 또는 Y이며,

[0470] X_c는 A, E, G, I, L, M, N, P, S, T, V, W 또는 Y이고,

[0471] X_e는 D, E, G, K, M, N, P, Q, S 또는 T이며,

[0472] X_1은 A, D, E, G, K, N, Q, S, T 또는 V이고,

[0473] X_2는 A, F, L, M, N, Q, S, T, V 또는 Y이며, 그리고

[0474] X_3은 A, D, E, G, H, M, N, Q, S, T 또는 V이고,

[0475] 그리고

[0476] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= A I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열 또는 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고,

[0477] 그리고

[0478] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖는다.

[0479] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0480] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고,

[0481] 그리고

[0482] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 3의 아미노산 서열 [= A I X_3 X_4 G G G X_8 X_9 X_{10} Y A D S V K G]을 갖거나, CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 6의 아미노산 서열[=A I X_3 X_4 G G G X_8 X_9 X_{10}]을 갖되,

[0483] X_3은 A, D, E, G, H, P, Q, R, S, T 또는 V이고,

[0484] X_4는 A, D, E, G, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이며,

[0485] X_8은 A, D, G, H, K, L, M, Q, S, T 또는 V이고,

[0486] X_9는 A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이고, 그리고

[0487] X_{10}은 A, D, E, H, S, T, V 또는 Y이고,

[0488] 그리고

[0489] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖는다.

[0490] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0491] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고,

[0492] 그리고

[0493] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= A I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열 또는 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고,

[0494] 그리고

[0495] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 4[= D X_2 X_3 X_4 T X_6 X_7 T X_9 Y X_{11} X_{12}]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 7[= D X_2 X_3 X_4 T X_6 X_7 T X_9 Y X_{11} X_{12}]의 아미노산 서열을 갖고, 여기서,

[0496] X_2는 A, D, E, F, G, I, L, M, Q, S, T, V, W 또는 Y, 바람직하게는 A, E, F, G, I, L, M, Q, S, T, V, W 또는 Y이고,

[0497] X_3은 L 또는 N, 바람직하게는 L이며,

[0498] X_4는 F, L, W 또는 Y이고,

[0499] X_6은 A, D, E, K, L, M, Q, S 또는 W이며,

[0500] X_7은 L, M 또는 V이고,

[0501] X_9는 A, D, E, F, G, H, K, L, M, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이며,

[0502] X_{11}은 A, E, L, M, Q, S, T, V 또는 W이고, 그리고

[0503] X_{12}는 T 또는 Y이고,

[0504] 단, 서열번호 4의 아미노산 X_6 및 X_9는 각각 동시에 D 및 K가 아니거나, 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 각각 동시에 D 및 K가 아니다.

[0505] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0506] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 2[= X_1 X_2 X_3 M Y]의 아미노산 서열을 갖거나, CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 5[=X_a X_b X_c F X_e X_1 X_2 X_3 M Y]의 아미노산 서열을 갖되,

[0507] X_a는 G 또는 T이고,

[0508] X_1은 S, D 또는 E이고,

[0509] X_2는 Y이며, 그리고

[0510] X_3은 A 또는 D이고,

[0511] 그리고

[0512] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= A I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열 또는 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고,

[0513] 그리고

[0514] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖는다.

[0515] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0516] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고,

[0517] 그리고

[0518] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 3의 아미노산 서열[= A I X_3 X_4 G G G X_8 X_9 X_{10} Y A D S V K G]을 갖거나, CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 6의 아미노산 서열[=A I X_3 X_4 G G G X_8 X_9 X_{10}]을 갖고, 여기서,

[0519] X_3은 S이고,

[0520] X_4는 Q 또는 S이며,

[0521] X_8은 S이고,

[0522] X_9는 T이며, 그리고

[0523] X_{10}은 D이고,

[0524] 그리고

[0525] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖는다.

[0526] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0527] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고,

[0528] 그리고

[0529] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= A I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고,

[0530] 그리고

[0531] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 4[= D X_2 X_3 X_4 T X_6 X_7 T X_9 Y X_{11} X_{12}]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 7의 아미노산 서열[= D X_2 X_3 X_4 T X_6 X_7 T X_9 Y X_{11} X_{12}]을 갖고, 여기서,

[0532] X_2는 T이고,

[0533] X_3은 L이며,

[0534] X_4는 Y이고,

[0535] X_6은 D, E 또는 S이며,

[0536] X_7은 L이고,

[0537] X_9는 K, R, S 또는 W이며,

[0538] X_{11}은 S이고, 그리고

[0539] X_{12}는 Y이며,

[0540] 단, 서열번호 4의 아미노산 X_6 및 X_9는 각각 동시에 D 및 K가 아니거나, 서열번호 7의 X_6 및 X_9는 각각 동시에 D 및 K가 아니다.

[0541] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0542] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 가지며, 여기서,

[0543] 서열번호 8의 1번 위치 또는 서열번호 11의 6번 위치의 S가 A, D, E, G, K, N, Q, T, 또는 V로 변경되고, 그리고/또는

[0544] Y는 서열번호 8의 2번 위치 또는 서열번호 11의 7번 위치에서 A, F, L, M, N, Q, S, T, 또는 V로 변경되고, 그

리고/또는

[0545] A는 서열번호 8의 3번 위치 또는 서열번호 11의 8번 위치에서 D, E, G, H, M, N, Q, S, T, 또는 V로 변경되고, 그리고

[0546] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고,

[0547] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖는다.

[0548] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0549] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고,

[0550] 그리고

[0551] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖되,

[0552] 서열번호 9의 3번 위치 또는 서열번호 12의 3번 위치의 S가 A, D, E, G, H, P, Q, R, T, 또는 V로 변경되고, 그리고/또는

[0553] 서열번호 9의 4번 위치 또는 서열번호 12의 4번 위치의 S가 A, D, E, G, K, M, N, P, Q, R, T, V, W, 또는 Y로 변경되고, 그리고/또는

[0554] 서열번호 9의 8번 위치 또는 서열번호 12의 8번 위치의 S가 A, D, G, H, K, L, M, Q, T, 또는 V로 변경되고, 그리고/또는

[0555] 서열번호 9의 9번 위치 또는 서열번호 12의 9번 위치의 T는 A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, 또는 Y로 변경되고, 그리고/또는

[0556] 서열번호 9의 10번 위치 또는 서열번호 12의 10번 위치에서 D는 A, E, H, S, T, V 또는 Y로 변경되고, 및

[0557] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖는다.

[0558] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0559] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고,

[0560] 그리고

[0561] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= A I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고,

[0562] 그리고

[0563] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖되,

[0564] 서열번호 10의 2번 위치 또는 서열번호 13의 2번 위치에서 T가 A, D, E, F, G, I, L, M, Q, S, V, W 또는 Y로, 바람직하게는 A, E, F, G, I, L, M, Q, S, V, W 또는 Y로 변경되고/되거나

[0565] 서열번호 10의 3번 위치 또는 서열번호 13의 3번 위치에서 L이 N으로 변경되되, 바람직하게는 서열번호 13의 3번 위치에서의 아미노산은 L이고(즉, 변하지 않음), 그리고/또는

[0566] 서열번호 10의 4번 위치 또는 서열번호 13의 4번 위치에서 Y는 F, L, 또는 W로 변경되고/되거나,

[0567] 서열번호 10의 6번 위치 또는 서열번호 13의 6번 위치에서 S가 A, D, E, K, L, M, Q 또는 W로 변경되고/되거나

[0568] 서열번호 10의 7번 위치 또는 서열번호 13의 7번 위치에서 L이 M 또는 V로 변경되고/되거나

[0569] 서열번호 10의 9번 위치 또는 서열번호 13의 9번 위치에서 S가 A, D, E, F, G, H, K, L, M, Q, R, T, V, W 또는 Y로 변경되고/되거나

[0570] 서열번호 10의 11번 위치 또는 서열번호 13의 11번 위치에서 S가 A, E, L, M, Q, T, V 또는 W로 변경되고/되거나

[0571] 서열번호 10의 12번 위치 또는 서열번호 13의 12번 위치에서 Y가 T로 변경되고,

[0572] 단, 서열번호 10의 6 및 9번 위치 또는 서열번호 13의 6 및 9번 위치에서 아미노산은 동시에 각각 D 및 K로 변경되지 않는다.

[0573] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다:

[0574] CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖되,

[0575] 서열번호 8의 1번 위치 또는 서열번호 11의 6번 위치에서 S가 D 또는 E로 변경되고/되거나

[0576] 서열번호 8의 3번 위치 또는 서열번호 11의 8번 위치에서 D로 변경되고,

[0577] 그리고

[0578] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열 또는 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖되,

[0579] 서열번호 9의 4번 위치 또는 서열번호 12의 4번 위치에서 S는 Q로 변경되었고,

[0580] 그리고

[0581] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖되,

[0582] 서열번호 10의 6번 위치 또는 서열번호 13의 6번 위치의 S는 D 또는 E로 변경되었고/되거나,

[0583] 서열번호 10의 9번 위치 또는 서열번호 13의 9번 위치의 S는 K, R, 또는 W로 변경되었고,

[0584] 단, 서열번호 10의 6 및 9번 위치 또는 서열번호 13의 6 및 9번 위치에서 아미노산은 동시에 각각 D 및 K로 변경되지 않는다.

[0585] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같이 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다: CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖되,

[0586] 서열번호 8의 1번 위치 또는 서열번호 11의 6번 위치에서 S는 D 또는 E로 변경되고/되거나

[0587] 서열번호 8의 3번 위치 또는 서열번호 11의 8번 위치에서 A는 D로 변경되고,

[0588] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열 또는 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고,

[0589] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖는다.

[0590] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같이 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역

(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다: CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고,

[0591] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열 또는 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖되,

[0592] 서열번호 9의 4번 위치 또는 서열번호 12의 4번 위치의 S가 Q로 변경되고,

[0593] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖는다.

[0594] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같이 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 FcRn 결합 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 ISVD는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어지고, 하기를 특징으로 한다: CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖거나,

[0595] 그리고

[0596] CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= I S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열 또는 CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고,

[0597] CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖거나 CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y]의 아미노산 서열을 갖되,

[0598] 서열번호 10의 6번 위치 또는 서열번호 13의 6번 위치의 S는 D 또는 E로 변경되었고/되거나,

[0599] 서열번호 10의 9번 위치 또는 서열번호 13의 9번 위치의 S는 K, R, 또는 W로 변경되었고,

[0600] 단, 서열번호 10의 6 및 9번 위치 또는 서열번호 13의 6 및 9번 위치에서 아미노산은 동시에 각각 D 및 K로 변경되지 않는다.

[0601] 특정 실시형태에서, 본 발명은 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD가 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어는 것을 특징으로 하고, 하기를 특징으로 하는 폴리펩타이드를 제공한다:

[0602] a) CDR1(Kabat에 따름)은 서열번호 8[= S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 8의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0603] b) CDR2(Kabat에 따름)는 서열번호 9[= A I S S G G G S T D Y A D S V K G]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 9의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0604] c) CDR3(Kabat에 따름)은 서열번호 10[= D T L Y T S L T S Y S Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 10의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0605] 특정 실시형태에서, 본 발명은 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD가 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 이루어는 것을 특징으로 하고, 하기를 특징으로 하는 폴리펩타이드를 제공한다:

[0606] a) CDR1(AbM에 따름)은 서열번호 11[=G F T F S S Y A M Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 11의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0607] b) CDR2(AbM에 따름)는 서열번호 12[= A I S S G G G S T D]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 12의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖고; 그리고

[0608] c) CDR3(AbM에 따름)은 서열번호 13[= D T L Y T S L T S Y S Y]의 아미노산 서열을 갖고/갖거나 서열번호 13의 서열과 4, 3, 2 또는 단지 1개의 "아미노산 차이(들)"(본 명세서에 정의된 바와 같음)를 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0609] 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD가 서열번호 14 또는 서열번호 15의 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0610] 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD가 서열번호 14 또는 서열번호 15의 아미노산 서열과 적어도 80%, 예컨대, 90% 또는 심지어 95%의 서열 동일성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0611] 특정 실시형태에서, 본 발명은 ISVD가 (단일) 도메인 항체, Nanobody® V_{HH}, V_{HH}, 인간화된 V_{HH}, 또는 낙타화 V_H인 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0612] 특정 실시형태에서, 1, 2, 3 또는 4개의 아미노산(들) 차이가 있는 하나 이상의 CDR을 갖는 ISVD를 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이 없이 CDR을 포함하는 아미노산 서열 또는 폴리펩타이드에 의한 결합과 비교하여 거의 동일한 친화도로 FcRn에 결합하고, 상기 친화도는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된다.

[0613] 2개의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 비교할 때, 용어 "아미노산 차이"는 제2 서열과 비교하여 제1 서열의 위치에서의 단일 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 지칭하며; 2개의 면역글로불린 단일 가변 도메인이 1, 2개 이상의 이러한 아미노산 차이를 포함할 수 있다는 것이 이해된다.

[0614] 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 다른 아미노산 서열, 예컨대, 본 발명의 폴리펩타이드 등을 비교하는 목적을 위해, 제1 아미노산 서열과 제2 아미노산 서열 사이의 "서열 동일성" 백분율(본 명세서에서 "아미노산 동일성"으로도 지칭됨)은 WO 08/020079(본 명세서에 참조에 의해 원용됨)의 49 및 50 페이지 단락 f)에 기재된 바와 같이, 예컨대, [제2 아미노산 서열의 상응하는 위치에서의 아미노산 잔기와 동일한 제1 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기의 수]를 [제1 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기의 총 수]로 나누고 [100%]을 곱해서 계산 또는 결정될 수 있으며, 이때, - 제1 아미노산 서열과 비교하여 - 제2 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기의 각 결실, 삽입, 치환 또는 첨가는 단일 아미노산 잔기(위치)에서의 차이로서, 즉, 본 명세서에 정의된 바와 같은 "아미노산 차이"로서 간주되며; 대안적으로, 두 아미노산 서열 사이의 서열 동일성 정도는 표준 설정을 사용하여 NCBI Blast v2.0과 같은 서열 정렬을 위한 알려진 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 계산될 수 있다. 일부 다른 기법, 컴퓨터 알고리즘 및 서열 동일성 정도를 결정하기 위한 설명은, 예를 들어, WO 04/037999, EP 0 967 284, EP 1 085 089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 및 GB 2 357 768-A에 기재되어 있다.

[0615] 통상적으로, 본 명세서의 위에서 개략적으로 설명된 계산 방법에 따라 2개의 아미노산 서열 사이의 "서열 동일성"의 백분율을 결정하기 위하여, 가장 많은 수의 아미노산 잔기를 가진 아미노산 서열을 "제1" 아미노산 서열로 취할 것이고, 다른 아미노산 서열을 "제2" 아미노산 서열로 취할 것이다.

[0616] 또한, 2개의 면역글로불린 단일 가변 도메인 사이의 서열 동일성의 정도를 결정하는 데 있어서, 당업자는 소위 "보존적" 아미노산 치환을 고려할 수 있는데, 이는 일반적으로 아미노산 잔기가 유사한 화학적 구조의 또 다른 아미노산으로 대체되고 폴리펩타이드의 기능, 활성 또는 기타 생물학적 특성에 대해 거의 또는 본질적으로 전혀 영향을 주지 않는 아미노산 치환으로 설명될 수 있다. 이러한 보존적 아미노산 치환은 예를 들어 WO 04/037999, GB-A-3 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 및 WO 01/09300로부터 당업계에 잘 알려져 있으며; 이러한 치환의 (바람직한) 유형 및/또는 조합은 WO 04/037999와 WO 98/49185 및 본 명세서에서 인용된 추가의 참고문헌으로부터 적절한 교시 내용을 기초로 하여 선택될 수 있다. 보존적 치환의 예는 본 명세서에서 아래에 추가로 기재된다.

[0617] 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드에 적용된 임의의 아미노산 치환은 또한 문헌[Schulz *et al.*, 1978 (Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)]에 의해 개발된 다양한 종의 상동성 단백질 사이의 아미노산 변이 빈도의 분석, 문헌[Chou and Fasman 1975 (Biochemistry 13: 211) 및 1978 (Adv. Enzymol. 47: 45-149)]에 의해 개발된 구조 형성 가능성의 분석, 및 문헌[Eisenberg *et al.*, 1984 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 140-144), Kyte & Doolittle 1981 (J Molec. Biol. 157: 105-132) 및 Goldman *et al.*, 1986 (Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353)]에 의해 개발된 단백질에서의 소수성 패턴의 분석에 기반할 수 있으며, 이들 모두는 본 명세서에 전문이 참조에 의해 원용된다. ISVD의 1차, 2차 및 3차 구조에 대한 정보는 본 명세서의 설명

및 위에서 인용된 일반적인 배경에 제공된다. 또한 본 목적을 위해, 라마로부터의 V_{HH} 도메인의 결정 구조는, 예를 들어, 문헌[Desmyter *et al*. 1996 (Nature Structural Biology, 3: 803), Spinelli *et al*. 1996 (Natural Structural Biology 3: 752-757) 및 Decanniere *et al*., 1999 (Structure, 7: 361)]에 의해 제공된다. 통상적인 V_H 도메인에서 V_H/V_L 계면을 형성하는 일부 아미노산 잔기 및 이러한 위치에서 가능한 낙타화 치환에 대한 추가 정보는 위에서 인용된 선행 기술에서 찾을 수 있다. 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 핵산 서열은 이들의 전체 길이에 걸쳐 (본 명세서에 정의된 바와 같이) 100% 서열 동일성을 갖는 경우에 "정확하게 동일한" 것으로 언급된다.

[0618] 서열번호 14 및/또는 15의 서열과 비교하여, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 바람직하게는 또한 (적어도) 하기를 포함한다, 하나 이상의 인간화 치환;

[0619] 및/또는

[0620] 기존의 항체에 의한 결합을 감소시키는 하나 이상의 돌연변이(즉, 아미노산 치환, 결실 또는 첨가, 특히 치환); 선택적으로 본 명세서에 기재된 바와 같이 하나 이상의 추가 돌연변이를 (예를 들어, FcRn 결합 폴리펩타이드의 화학적 안정성을 개선시키기 위해) 포함할 수 있다.

[0621] 적합한 인간화 치환(및 이들의 적합한 조합)을 위해, 예를 들어, WO 09/138519(또는WO 09/138519에 인용된 선행기술) 및 WO 08/020079(또는 WO 08/020079에 인용된 선행기술)뿐만 아니라 WO 08/020079로부터의 표 A-3 내지 A-8(가능한 인간화 치환을 보여주는 목록임)을 참조한다. 이러한 인간화 치환의 일부 바람직하지만, 비제한적인 예는 Q108L 및 A14P 또는 이들의 적합한 조합이다. 이러한 인간화 치환은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 다른 돌연변이와 (예컨대, 기존의 항체에 의한 결합을 감소시키는 하나 이상의 돌연변이와) 적합하게 조합될 수 있다.

[0622] 기존의 항체에 의한 결합을 감소시킬 수 있는 적합한 돌연변이(및 이러한 돌연변이의 적합한 조합)의 경우에, 예를 들어, WO 2012/175741 및 WO 2015/173325 및 또한 예를 들어, WO 2013/024059 및 WO 2016/118733을 참조한다.

[0623] 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드 또는 ISVD의 아미노산 서열 변형이 고려된다. 예를 들어, 폴리펩타이드 또는 ISVD의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드 또는 ISVD의 아미노산 서열 변이체는 폴리펩타이드 또는 ISVD를 암호화하는 핵산에 적절한 뉴클레오타이드 변화를 도입함으로써, 또는 펩타이드 합성에 의해 제조된다.

[0624] 이러한 변형은, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드 또는 ISVD 내의 잔기로부터의 결실, 및/또는 이것에 삽입 및/또는 이의 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합은 최종 작제물이 목적하는 특징을 갖는다는 조건하에서 최종 작제물에 도달하도록 이루어진다. 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치 변화와 같이 결합 분자의 번역 후 과정을 변경시킬 수 있다. 바람직하게는, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산은 CDR에서 치환될 수 있지만, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 25개의 아미노산은 프레임워크 영역(FR)에서 치환될 수 있다. 치환은 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바와 같은 보존적 치환이다. 추가로 또는 대안적으로, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산은 각각의 CDR에서 삽입 또는 결실될 수 있지만(물론, 이들의 길이에 따라 다름), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 25개의 아미노산이 각각의 FR에 삽입 또는 결실될 수 있다.

[0625] 돌연변이유발에 대해 바람직한 위치인 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드 또는 ISVD의 특정 잔기 또는 영역의 확인을 위한 유용한 방법은 문헌[Cunningham and Wells 1989 (Science 244: 1081-1085)]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 본 명세서에서, 결합 분자 내의 표적 잔기 또는 표적 잔기의 그룹(예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대, Arg, Asp, His, Lys 및 Glu)은 확인되고, 아미노산과 에피토프의 상호작용에 영향을 미치는 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체된다. 이어서, 치환에 대한 기능적 민감성을 보여주는 해당 아미노산 위치는 치환 부위에서 또는 치환 부위에 대해 추가 또는 다른 변이체를 도입함으로써 개선된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 사전결정되지만, 돌연변이 자체의 특성이 사전결정될 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발이 표적 코돈 또는 영역에서 수행되고, 발현된 결합 분자 변이체는 목적하는 활성에 대해 선별된다.

[0626] 바람직하게는, 아미노산 서열 삽입은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 잔기부터 100개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩타이드의 길이 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합을 포함한다.

[0627] 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체는 아미노산 서열, ISVD 또는 폴리펩타이드에서 바람직하게는 (적어도) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된다. 치환 돌연변이유발에 대한 가장 큰 관심 부위는 CDR, 특히 초가변 영역을 포함하지만, FR 변경이 또한 고려된다. 예를 들어, CDR 서열이 6개의 아미노산을 포괄하는 경우에, 이러한 아미노산 중 1, 2 또는 3개가 치환되는 것으로 여겨진다. 유사하게, CDR 서열이 15개의 아미노산을 포괄하는 경우에, 이러한 아미노산 중 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개가 치환되는 것으로 여겨진다.

[0628] 일반적으로, 아미노산이 하나 이상의 또는 모든 CDR에서 치환되는 경우, 이때 얻어진 "치환된" 서열은 "본래의" CDR 서열과 적어도 60%, 더 바람직하게는 65%, 더욱 더 바람직하게는 70%, 특히 바람직하게는 75%, 더욱 특히 바람직하게는 80% 또는 심지어 90% 초과로 동일한 것이 바람직하다. 이는 "치환된" 서열과 동일한 정도로 CDR의 길이에 따른다는 것을 의미한다. 예를 들어, 5개의 아미노산을 갖는 CDR은 적어도 하나의 아미노산이 치환되도록 하기 위해 이의 치환된 서열과 바람직하게는 80% 동일하다. 따라서, 아미노산 서열, ISVD 또는 폴리펩타이드의 CDR은 이들의 치환된 서열과 상이한 정도의 동일성을 가질 수 있고, 예를 들어, CDR1은 80%를 가질 수 있지만, CDR3은 90%를 가질 수 있다.

[0629] 바람직한 아미노산 치환은 보존적 치환이다. 일부 보존적 치환은 바람직하게는 다음의 그룹 (a) 내지 (e) 내의 하나의 아미노산이 동일한 그룹 내의 다른 아미노산 잔기로 치환되는 치환이다: (a) 작은 지방족, 비극성 또는 약각 극성의 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro, 및 Gly; (b) 극성의, 음으로 하전된 잔기 및 이들의 (하전되지 않은) 아마이드: Asp, Asn, Glu, 및 Gln; (c) 극성의, 양으로 하전된 잔기: His, Arg, 및 Lys; (d) 큰 지방족의, 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val, 및 Cys; 및 (e) 방향족 잔기: Phe, Tyr, 및 Trp. 추가 바람직한 보존적 치환은 다음과 같다: Ala에서 Gly 또는 Ser으로; Arg에서 Lys으로; Asn에서 Gln 또는 His으로; Asp에서 Glu으로; Cys에서 Ser으로; Gln에서 Asn으로; Glu에서 Asp으로; Gly에서 Ala 또는 Pro으로; His에서 Asn 또는 Gln로; Ile에서 Leu 또는 Val으로; Leu에서 Ile 또는 Val로; Lys에서 Arg, Gln 또는 Glu으로; Met에서 Leu, Tyr 또는 Ile으로; Phe에서 Met, Leu 또는 Tyr으로; Ser에서 Thr으로; Thr에서 Ser으로; Trp에서 Tyr으로; Tyr에서 Trp으로; 및/또는 Phe에서 Val, Ile 또는 Leu으로 치환됨. 그러나, 임의의 치환(비보존적 치환 포함)은 폴리펩타이드가 본 명세서에 기재된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 친화도로(예를 들어, 10^{-6} 내지 10^{-11} M의 K_D로) 산성 pH(예컨대, pH 5.0 내지 6.8)에서 FcRn에 특이적으로 결합하고/하거나, 이의 CDR이 "본래" CDR 서열과 적어도 60%, 더 바람직하게는 65%, 더욱 더 바람직하게는 70%, 특히 바람직하게는 75%, 더욱 특히 바람직하게는 80%의 동일성을 갖는 것으로 여겨진다.

[0630] 실시예 부문에 제시된 바와 같이, 철저한 선별 및 선택 방법 후에만, 본 발명자들은 pH-의존적 방식으로 FcRn에 결합하는 ISVD를 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명은 서열번호 14 및 15로 이루어진 군으로부터 선택된 산성 pH에서 FcRn에 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 폴리펩타이드에 관한 것이다(표 A-1).

[0631] 바람직한 CDR 서열은 표 A-1에서 서열번호 8 내지 13 및 104 내지 105에서 도시된다. 서열 분석은 CDR에 다수의 가능한 서열 변이가 있다는 것을 추가로 나타냈다(표 A-1의 서열번호 2 내지 7 참조).

[0632] [표 A-1]

바람직한 ISVD 및 CDR 서열의 서열 ID

Nanobody® ISVD ID	서열 번호	서열
T0263018B11-모체	14	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISSGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM

[0633]

		NSLRPEDTALYYCAADTLYTSLTWYSYWGQGTLVTVSS
T0263018B11-W100cS	15	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAP GKGLEWVSAISSGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRPEDTALYYCAADTLYTSLTSYSYWGQGTLVTVSS
T0263018B11-모체/W100cS (CDR1 – AbM)	11	GFTFSSYAMY
T0263018B11-모체/W100cS (CDR2 – AbM)	12	AISSGGGSTD
T0263018B11-모체 (CDR3 – AbM)	105	DTLYTSLTWYSY
T0263018B11-W100cS (CDR3 – AbM)	13	DTLYTSLTSYSY
T0263018B11-모체/W100cS (CDR1 – Kabat)	8	SYAMY
T0263018B11-모체/W100cS (CDR2 – Kabat)	9	AISSGGGSTDYADSVKG
T0263018B11-모체 (CDR3 – Kabat)	104	DTLYTSLTWYSY
T0263018B11-W100cS (CDR3 – Kabat)	10	DTLYTSLTSYSY
CDR1 (가변 서열 -Kabat)	2 일	X_1 X_2 X_3 M Y, 여기서, X_1 은 A, D, E, G, K, N, Q, S, T 또는 V 이고, X_2 는 A, F, L, M, N, Q, S, T, V 또는 Y 이며, 그리고 X_3 은 A, D, E, G, H, M, N, Q, S, T 또는 V 이고
CDR2 (가변 서열 -Kabat)	3	A I X_3 X_4 G G G X_8 X_9 X_{10} Y A D S V K G, 여기서 X_3 은 A, D, E, G, H, P, Q, R, S, T 또는 V 이고, X_4 는 A, D, E, G, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 또는 Y 이며, X_8 은 A, D, G, H, K, L, M, Q, S, T 또는 V 이고, X_9 는 A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 또는 Y 이고, 그리고 X_{10} 은 A, D, E, H, S, T, V 또는 Y 이고,
CDR3 (가변 서열 -Kabat)	4	D X_2 X_3 X_4 T X_6 X_7 T X_9 Y X_{11} X_{12}, 여기서, X_2 는 A, D, E, F, G, I, L, M, Q, S, T, V, W 또는 Y 이고, 바람직하게는 X_2 는 A, E, F, G, I, L, M, Q, S, T, V, W 또는

[0634]

		Y이고 X_3은 L 또는 N이고, 바람직하게는 X_3은 L이며, X_4는 F, L, W 또는 Y이고, X_6은 A, D, E, K, L, M, Q, S 또는 W이며, X_7은 L, M 또는 V이고, X_9는 A, D, E, F, G, H, K, L, M, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이며, X_{11}은 A, E, L, M, Q, S, T, V 또는 W이고, X_{12}는 T 또는 Y임
CDR1 (가변 서열 - AbM)	5	$X_a X_b X_c$ F $X_e X_1 X_2 X_3$ M Y, 여기서 X_a는 A, D, E, F, G, H, K, L, M, N, Q, S, T, W 또는 Y이고, X_b는 F, I, L, M, V 또는 Y이며, X_c는 A, E, G, I, L, M, N, P, S, T, V, W 또는 Y이고, X_e는 D, E, G, K, M, N, P, Q, S 또는 T이며, X_1은 A, D, E, G, K, N, Q, S, T 또는 V이고, X_2는 A, F, L, M, N, Q, S, T, V 또는 Y이며, X_3은 A, D, E, G, H, M, N, Q, S, T 또는 V임
CDR2 (가변 서열 - AbM)	6	A I $X_3 X_4$ G G G $X_8 X_9 X_{10}$, 여기서 X_3은 A, D, E, G, H, P, Q, R, S, T 또는 V이고, X_4는 A, D, E, G, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이며, X_8은 A, D, G, H, K, L, M, Q, S, T 또는 V이고, X_9는 A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이고, X_{10}은 A, D, E, H, S, T, V 또는 Y임
CDR3 (가변 서열 - AbM)	7	D $X_2 X_3 X_4$ T $X_6 X_7$ T X_9 Y $X_{11} X_{12}$, 여기서, X_2는 A, D, E, F, G, I, L, M, Q, S, T, V, W 또는 Y이고, 바람직하게는 X_2는 A, E, F, G, I, L, M, Q, S, T, V, W 또는 Y이며, X_3은 L 또는 N이고, 바람직하게는 X_3은 L이며, X_4는 F, L, W 또는 Y이고, X_6은 A, D, E, K, L, M, Q, S 또는 W이며, X_7은 L, M 또는 V이고, X_9는 A, D, E, F, G, H, K, L, M, Q, R, S, T, V, W 또는 Y이며, X_{11}은 A, E, L, M, Q, S, T, V 또는 W이고, X_{12}는 T 또는 Y임

[0635]

[0636] 본 발명의 폴리펩타이드는 FcRn의 천연 리간드, 즉, 혈청 알부민 및 IgG에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프와 상이한 에피토프인 FcRn 상의 특정 독특하고 신규한 에피토프에 결합한다(도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같음).

[0637] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드는, 이들이 FcRn 분자에 결합되거나 달리 회합될 때, 혈청 알부민 및/또는 IgG에 대한 FcRn 분자에 의한 결합이 (유의미하게) 영향을 받거나, 감소되거나 저해되지 않도록 한다.

[0638] 추가 특정 실시형태에서, 본 발명은 혈청 알부민 및/또는 IgG에 대한 FcRn의 결합에 관련되지 않은 FcRn 상의 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩타이드를 제공한다. 적어도 하나의 ISVD, 혈청 알부민 및/또는 IgG에 대한 결합에서 FcRn 상의 아미노산 잔기의 관여는, 예를 들어, FcRn 상의 아미노산 잔기와 적어도 하나의 ISVD 상의 아미노산 잔기, 혈청 알부민 상의 아미노산 잔기 및/또는 IgG 상의 아미노산 잔기와의 상호작용을 결정함으로써, 예를 들어, 결정학적 연구에 의해 결정될 수 있다. 이런 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드는 혈청 알부민에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프에 그리고/또는 IgG에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프에 포함되지 않은 아미노산 잔기를 포함하는 FcRn 상의 에피토프에 특이

적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함한다. 이런 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드는 혈청 알부민 및/또는 IgG에 의해 결합되지 않는 FcRn 상의 아미노산 잔기에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함한다.

[0639] 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 바람직하게는 또한 FcRn에 대한 결합에 대해 서열번호 14 및/또는 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드와 경쟁하고/하거나 FcRn에 대한 서열번호 14 및/또는 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드의 결합을 (본 명세서에 정의된 바와 같은) "교차-차단"하도록 한다.

[0640] 용어 "교차-차단", "교차-차단된" 및 "교차-차단"은 표적에 대한 리간드의 결합, 예컨대, 수용체(들)에 대한 천연 리간드의 결합을 방해하는 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩타이드의 능력을 의미하기 위해 본 명세서에서 상호 호환 가능하게 사용된다. 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩타이드가 표적에 대한 천연 리간드와 같은 다른 화합물의 결합을 방해하는 정도 및 그에 따라 본 발명에 따라 교차-차단하는 것으로 언급될 수 있는지의 여부는 경쟁 결합 분석을 사용하여 결정될 수 있다. 하나의 특히 적합한 정량적 교차-차단 분석은 표적에 대한 결합에 관해 본 발명에 따른 표지된(예를 들어, His 태그 또는 바이오티닐화된) 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩타이드와 다른 결합제 사이의 경쟁을 측정하기 위해 FACS- 또는 ELISA-기반 접근 또는 Alphascreen을 사용한다. 결합 분자가 폴리펩타이드를 교차-차단하거나 교차 차단할 수 있는지의 여부를 결정하기 위한 적합한 FACS-, ELISA- 또는 Alphascreen-변위 기반 분석은 잘 알려져 있다. 이러한 분석이 본 명세서에 기재된 임의의 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 다른 결합제와 함께 사용될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 따라서, 일반적으로, 분석 동안 제2 폴리펩타이드의 존재하에 또는 천연 리간드의 존재하에, 본 발명에 따른 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩타이드의 보고된 변위가 0.01 mM 이하의 양으로 존재하는 교차 차단제가 잠재적으로 시험되는 것에 의해 최대 이론 변위(예를 들어, 교차 차단될 필요가 있는 차 가운(예를 들어, 비표지된) 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩타이드에 의한 변위)의 (예를 들어, ELISA/Alphascreen 기반 경쟁 분석에서) 60% 내지 100% 또는 (예를 들어, FACS 기반 경쟁 분석에서) 80% 내지 100%가 되도록, 본 발명에 따른 교차-차단 폴리펩타이드가, 예를 들어, 위의 교차-차단 분석에서 표적에 결합하는 것이다.

[0641] 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 서열번호 14 및/또는 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드에 의해 결합된 아미노산 잔기 및/또는 에피토프와 본질적으로 동일한 FcRn 상의 아미노산 잔기 및/또는 에피토프에 결합하도록, 더욱 더 바람직하게는 서열번호 14 및/또는 15의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드와 본질적으로 동일한 아미노산 상호작용을 공유하도록 한다. 이 목적을 위해, 특이적이지만 비제한적인 양상에 따라, 본 발명에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드는 바람직하게는 서열번호 14 및/또는 서열번호 15의 서열과 동일한 CDR을 갖거나, 서열번호 14 및/또는 서열번호 15의 서열과 비교하여 바람직하게는 이들의 CDR 내에서 여전히 서열번호 14 및/또는 서열번호 15의 서열을 갖는 폴리펩타이드와 FcRn의 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 상호작용을 겪게 하는 돌연변이(예컨대, 보존적 아미노산 치환)만을 포함한다.

[0642] 특정 실시형태에서, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드는 산성 pH에서, 특히 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서 이들의 결합 친화도가 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높도록 pH-의존적 방식으로 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 독특한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 이러한 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 FcRn에 대한 조건부 특이적 결합을 나타내며, 그 결과, 생체내 FcRn-매개 재순환 메커니즘을 사용함으로써, 생체내 혈청 반감기가 연장된다. 따라서 본 발명의 폴리펩타이드는 이들이 적합하게 연결, 결합 또는 융합된 관심의 치료 표적 또는 치료제 분자의 생체내 반감기를 연장시키기 위해 사용될 수 있다.

[0643] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 5.0 내지 6.8의 pH는 산성 생리적 pH를 의미하며, 예를 들어, 5.0 또는 6.8보다 작거나 더 큰 pH 값일 수 있고/있거나, 5.0 내지 6.8 범위의 임의의 pH 값, 예컨대, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 또는 6.7 또는 조금 더 크거나 조금 더 작은 pH 값일 수 있었다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 7.4의 pH는 중성 생리적 pH를 의미하며, 예를 들어, 이는 7.2 내지 7.4의 pH(약간 더 크거나 더 작을 수 있음)일 수 있다.

[0644] 본 발명의 특정 실시형태에서 FcRn 결합 폴리펩타이드와 FcRn의 pH-의존적 상호작용은 이러한 폴리펩타이드가 엔소솜의 산성 환경에서 최적으로 신속하게 포획되며 다시 pH 7.4에 직면할 때(즉, 엔도솜 외부) 재순환된 후에 효율적으로 방출되는 것을 보장한다.

[0645] 이런 방법에서, 본 발명자들은 본 발명의 특정 양상에 따른 폴리펩타이드가 pH-의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합함으로써 생체내에서 증가된 반감기를 나타낸다는 것을 입증할 수 있었다(본 명세서에 추가로 기재된 실시예에 의해 입증되는 바와 같음).

[0646] 본 발명에 따른 폴리펩타이드, 이를 포함하는 융합 단백질, 작제물 또는 화합물(본 명세서에 추가로 기재됨)의 반감기는 일반적으로, 예를 들어, 서열 또는 화합물의 분해 및/또는 천연 메커니즘에 의한 서열 또는 화합물의 클리어런스 또는 격리로 인해 아미노산 서열, 화합물 또는 폴리펩타이드의 혈청 농도가 50%로 감소되는 데 걸리는 시간으로서 일반적으로 정의될 수 있다. 특히, 반감기는 WO 2009/068627에 정의된 바와 같을 수 있다.

[0647] 본 발명에 따른 폴리펩타이드, 또는 이를 포함하는 융합 단백질, 작제물 또는 화합물(본 명세서에 추가로 기재됨)의 생체내 반감기는 그 자체로 알려진 임의의 방식으로, 예컨대, 약물동력학 분석에 의해 결정될 수 있다. 적합한 기법은 당업자에게 분명할 것이고, 예를 들어, 일반적으로 온혈 동물(즉, 인간 또는 다른 적합한 포유류, 예컨대, 마우스, 토끼, 래트, 돼지, 개 또는 영장류, 예를 들어, 마카카 속(Macaca)의 마카카 원숭이(예컨대, 특히, 사이노몰거스 원숭이(마카카 파시쿠랄리스(*Macaca fascicularis*)) 및/또는 레서스 원숭이(마카카 뮬라타(*Macaca mulatta*)) 및 개코원숭이(파피오 우르시누스(*Papio ursinus*)))에게 적합한 용량의 본 발명의 아미노산 서열, 화합물 또는 폴리펩타이드를 적합하는 투여하는 단계; 다른 동물로부터의 혈액 샘플 또는 다른 샘플을 수집하는 단계; 상기 혈액 샘플 중 본 발명의 아미노산 서열, 화합물 또는 폴리펩타이드의 수준 또는 농도를 결정하는 단계; 및 이렇게 얻어진 데이터(의 플롯)로부터 본 발명의 아미노산 서열, 화합물 또는 폴리펩타이드의 수준 또는 농도가 투여 시 초기 수준에 비해 50%로 감소될 때까지의 시간을 계산하는 단계를 수반할 수 있다. 예를 들어, 아래의 실험 부분뿐만 아니라 표준 핸드북, 예컨대, 문헌[Kenneth, *A et al.*, Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists 및 Peters *et al.*, Pharmacokinete analysis: A Practical Approach (1996)]을 참조한다. 또한 문헌["Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982)]을 참조한다. 반감기는 t1/2-알파, t1/2-베타 및 곡선하면적(AUC)과 같은 맥변수를 사용하여 표현될 수 있다. 예를 들어, 아래의 실험 부분뿐만 아니라 표준 핸드북, 예컨대, 문헌[Kenneth *et al.*, 1996 (Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists) 및 Peters *et al.*, 1996 (Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach)]을 참조한다. 또한 문헌[Gibaldi & Perron 1982 (Pharmacokinetics, Dekker M, 2nd Rev. edition)]을 참조한다. 본 명세서에서, "반감기 증가"는 이들 매개변수 중 임의의 하나, 예컨대, 이들 매개변수 중 임의의 둘, 또는 본질적으로 셋 모두의 이들 매개변수의 증가를 지칭한다. 용어 "반감기 증가" 또는 "증가된 반감기"는 특히 t1/2-알파 또는 AUC 또는 둘 모두의 증가 유무와 상관없이 t1/2-베타의 증가를 지칭한다.

[0648] 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명에 따르고 본 명세서에 개시된 바와 같이 FcRn 상의 독특한 에피토프에 결합하는 적어도 하나의 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 본 발명에 따른 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질, 작제물 및 화합물(본 명세서에 추가로 기재됨)은 선행기술에 기재된 바와 같은 알려진 FcRn 결합 폴리펩타이드, (융합) 단백질, 작제물 또는 화합물에 비해 증가된 반감기를 가질 것이다.

[0649] 일반적으로, 본 발명에 따른 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질, 작제물 및 화합물(본 명세서에 추가로 기재됨)은 바람직하게는 (인간 또는 적합한 동물, 예컨대, 마우스 또는 사이노몰거스 원숭이에서 측정 시) 선행 기술의 아미노산 서열 및 단백질에 결합하는 알려진 FcRn의 적어도 1.5배, 바람직하게는 적어도 2배, 예컨대, 적어도 5배, 예를 들어 적어도 10배 또는 20배 초과 또는 또는 반감기 초과의 반감기를 갖는다.

[0650] 또한, 본 발명에 따른 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질, 작제물 및 화합물(본 명세서에 추가로 기재됨)은 바람직하게는 (인간 또는 적합한 동물, 예컨대, 마우스 또는 사이노몰거스 원숭이에서 측정 시) 선행 기술의 아미노산 서열 및 단백질에 결합하는 알려진 FcRn의 반감기에 비해 적어도 30%, 적어도 50%, 적어도 75%, 예를 들어 적어도 100%로 증가되거나, 200% 초과, 예컨대, 300% 초과, 400% 초과, 500% 이상 증가된 반감기를 갖는다.

[0651] 또한, FcRn 상의 독특한 에피토프에 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하고 다른 모이어티, 예컨대, 치료제 모이어티 또는 모이어티들에 융합된 본 발명에 따른 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질, 작제물 및 화합물(본 명세서에 추가로 기재됨)은 다른 모이어티, 예컨대, 치료제 모이어티 또는 모이어티들 그 자체에 비해 증가된 반감기를 가질 것이다.

[0652] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 작제물 또는 융합 단백질은 바람직하게는 (인간 또는 적합한 동물, 예컨대, 마우스 또는 사이노몰거스 원숭이에서 측정 시) 상응하는 다른 모이어티, 예컨대, 치료제 모이어티 그 자체의 반감기의 적어도 1.5 times, 바람직하게는 적어도 2배, 예컨대, 적어도 5배, 예를 들어, 적어도 10배 또는 20배 이상인 반감기를 갖는다.

[0653] 언급된 바와 같이, 일 양상에서, 본 발명의 FcRn 결합제는 (하나 이상의) 면역글로불린 단일 가변 도메인, 예컨

대, 도메인 항체, 단일 도메인 항체, "dAb", V_{HH} 또는 Nanobody® V_{HH}(예컨대, V_{HH}, 인간화 V_{HH} 또는 낙타화 V_H, 예컨대, 낙타화 인간 V_H)의 반감기를 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0654] 또한, 본 발명에 의해 제공된 FcRn 결합 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 융합 단백질, 작제물 및 화합물(본 명세서에 추가로 기재됨)은 바람직하게는 1시간 초과, 바람직하게는 2시간 초과, 더 바람직하게는 6시간 초과, 예컨대, 12시간 초과, 및, 예를 들어, 약 1일, 2일, 1주, 2주 및 최대 인간에서의 혈청 알부민 또는 IgG의 반감기(대략 19일로 추정됨)인 인간에서의 반감기(t1/2 베타로 정의됨)를 갖지만, 후자는 덜 중요할 수 있다.

[0655] 본 발명의 상이한 실시형태에 따른 FcRn 결합 폴리펩타이드는 바람직하게는 또한 하기가 되도록 한다:

[0656] 이들이 6시간 초과, 바람직하게는 12시간 초과, 더 바람직하게는 24시간 초과, 더욱 더 바람직하게는 72시간 초과; 예를 들어, 약 1주, 2주 및 최대 인간에서의 혈청 알부민 또는 IgG의 반감기(대략 19일로 추정됨)인 인간에서의 혈청 반감기(t1/2 베타로 표현됨)가 되도록 그리고/또는: 이들의 치료제 모이어티 또는 독립체에 연결될 때, 이들이 본 발명의 결과 폴리펩타이드에 6시간 초과, 바람직하게는 12시간 초과, 더 바람직하게는 24시간 초과, 더욱 더 바람직하게는 72시간 초과; 예를 들어, 약 1주, 2주 및 최대 인간에서의 혈청 알부민 또는 IgG의 반감기(대략 19일로 추정됨)인 인간에서의 혈청 반감기(t1/2 베타로 표현됨)를 부여하도록 한다.

[0657] 인간 이외의 포유류 종에서의 반감기는 특히 상기 포유류 종으로부터의 FcRn에 대한 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드의 결합 특성(예컨대, 친화도)뿐만 아니라 상기 종에서의 천연 혈청 알부민의 반감기에 주로 따를 것이다. 본 발명의 바람직한 실시형태에 따르면, 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드가 인간 FcRn과 다른 포유류종으로부터의 FcRn 사이에서 교차 반응성(본 명세서에 정의된 바와 같음)일 때, 상기 종에서 결정된 바와 같은 본 발명의 FcRn 결합 폴리펩타이드(및/또는 상기 FcRn 결합 폴리펩타이드를 포함하는 본 발명의 화합물)의 반감기는 바람직하게는 상기 종에서의 혈청 알부민의 반감기의 적어도 5%, 예컨대, 적어도 10%, 더 바람직하게는 적어도 25%, 예를 들어, 약 50%, 및 가능하게는 최대 100%이다.

[0658] 특정 실시형태에서, 산성 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 10^{-3} nM^{-1} 내지 10^{2} nM^{-1}의 친화도(K_A)로 FcRn에 특이적으로 결합한다. 산성 pH, 바람직하게는 pH 5.0 내지 6.8에서 FcRn에 대한 이들 폴리펩타이드의 친화도(K_A)는 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 FcRn에 대한 동일한 폴리펩타이드의 친화도(K_A)보다 적어도 3배 더 높다.

[0659] 추가 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 동일한 폴리펩타이드의 FcRn에 대한 친화도(K_A)보다 적어도 10배 더 높은 친화도로 FcRn에 결합한다. 또한 추가 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 동일한 폴리펩타이드의 FcRn에 대한 친화도(K_A)보다 적어도 50배, 예컨대 적어도 100배 더 높은 친화도로 FcRn에 결합한다.

[0660] 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 ISVD가 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 적어도 하나의 ISVD가 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서 FcRn에 결합하는 친화도보다 적어도 3배, 예컨대, 적어도 10배, 예컨대, 적어도 50배, 예컨대, 적어도 100배 더 낮은 친화도로 FcRn에 결합하는 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0661] 특정 실시형태에서, 생리적 pH, 예컨대, 7.4의 pH에서, 적어도 하나의 ISVD는 10^{4} 리터/㏖보다 낮은 K_A 값으로 FcRn에 결합한다.

[0662] 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 ISVD가 FcRn에 검출 가능하게, 선택적으로 또는 특이적으로 결합하지 않거나, 중성 또는 생리적 pH에서, 예컨대, 7.4의 pH에서 FcRn에 대한 결합을 나타내지 않거나 본질적으로 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0663] 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 10^{-6} M 내지 10^{-11} M 이하의 해리 상수(K_D)로 FcRn에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, K_D는 Kinexa, BLI 또는 SPR에 의해, 예를 들어, SPR에 의해 결정되는 바와 같이 결정된다.

[0664] 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 10^{3} nM 내지 10^{-2} nM 이하의

해리 상수(K_D)로 FcRn에 특이적으로 결합한다. 산성 pH에서, 바람직하게는 pH 5.0 내지 6.8에서 FcRn에 대한 이러한 아미노산 서열 및 폴리펩타이드의 해리 상수(K_D)는 약 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 FcRn에 대한 동일한 아미노산 서열 및 폴리펩타이드의 해리 상수(K_D)보다 적어도 3배 더 양호하다(즉, 값이 더 낮다). 추가 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 약 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 동일한 폴리펩타이드의 FcRn에 대한 친화도(K_D)보다 적어도 10배 더 높은/양호한 친화도로 FcRn에 결합한다. 또한 추가 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 약 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 동일한 폴리펩타이드의 FcRn에 대한 친화도(K_D)보다 적어도 50배, 예컨대 적어도 100배 더 높은/양호한 친화도로 FcRn에 결합한다.

[0665] 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 ISVD가 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 적어도 하나의 ISVD가 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서 FcRn에 결합하는 친화도보다 적어도 3배, 예컨대, 적어도 10배, 예컨대, 적어도 50배, 예컨대, 적어도 100배 더 낮은/불량한 친화도로 FcRn에 결합하는 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0666] 특정 실시형태에서, 생리적 pH, 예컨대, 7.4의 pH에서, 적어도 하나의 ISVD는 10^{-4} mol/리터보다 큰 K_D 값으로 FcRn에 결합한다.

[0667] 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 ISVD가 FcRn에 검출 가능하게, 선택적으로 또는 특이적으로 결합하지 않거나, 중성 또는 생리적 pH에서, 예컨대, 7.4의 pH에서 FcRn에 대한 결합을 나타내지 않거나 본질적으로 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0668] 따라서, 본 발명은 1000 nM 및 10 pM, 예컨대, 900 nM 이하의 평균 K_D 값, 더욱 더 바람직하게는 800 nM 이하, 예컨대, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 nM 미만 또는 심지어, 예컨대, 40, 30, 20, 10, 5, 1 nM 미만, 예컨대, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 pM 이하 또는 그 이하, 예컨대, 10 pM 미만의 평균 K_D 값으로 FcRn에 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드에 관한 것이다. 바람직하게는, K_D는 Kinexa, BLI 또는 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 결정되고, 예를 들어, SPR에 의해 결정된다. 바람직하게는, 평균 K_D는 재조합 단백질에 대해 SPR에 의해 측정된다.

[0669] 본 발명은 또한 1000 nM 내지 1 pM의 EC50 값, 예컨대, 1000 nM 이하의 평균 EC50 값, 더욱 더 바람직하게는 900 nM 이하, 예컨대, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 nM 미만 또는 그 이하, 예컨대, 40, 30, 20, 10, 5 또는 1 nM 미만 또는 그 이하, 예컨대, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 pM 미만 또는 그 이하, 예컨대, 4 pM 미만의 평균 EC50 값으로 산성 pH에서 FcRn에 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드에 관한 것이다.

[0670] 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 또는 BLI로 측정 시, 적어도 약 10^{2} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{3} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{4} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{5} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{6} $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^{7} $M^{-1}s^{-1}$, 및 적어도 약 10^{8} $M^{-1}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택된 온 속도 상수(k_{on})로 FcRn에 특이적으로 결합한다.

[0671] 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는, 바람직하게는 표면 플라스몬 공명 또는 BLI로 측정 시, 최대 약 $10^{-1}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-2}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-3}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-4}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-5}s^{-1}$ 및 최대 약 $10^{-6}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택된 오프 속도 상수(k_{off})로 FcRn에 특이적으로 결합한다.

[0672] 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 최대 약 $10^{-1}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-2}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-3}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-4}s^{-1}$, 최대 약 $10^{-5}s^{-1}$ 및 최대 약 $10^{-6}s^{-1}$로 이루어진 군으로부터 선택된 오프 속도 상수(k_{off})로 FcRn에 특이적으로 결합한다. 산성 pH에서, 바람직하게는 pH 5.0 내지 6.8에서 FcRn에 대한 이러한 아미노산 서열 및 폴리펩타이드의 오프 속도 상수(k_{off})는 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 FcRn에 대한 동일한 아미노산 서열 및 폴리펩타이드의 해리 상수(k_{off})보다 적어도 3배 더 낮다. 추가 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 동일한 폴리펩타

이드의 FcRn에 대한 오프 속도 상수(k_{off})보다 적어도 10배 더 낮은 오프 속도 상수(k_{off})로 FcRn에 결합한다. 또한 추가 특정 실시형태에서, 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 동일한 폴리펩타이드의 FcRn에 대한 오프 속도 상수(k_{off})보다 적어도 50배 더 낮은, 예컨대 적어도 100배 더 낮은 오프 속도 상수(k_{off})로 FcRn에 결합한다.

[0673] 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 ISVD가 7.4의 중성 또는 생리적 pH에서 적어도 하나의 ISVD가 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서 FcRn에 결합하는 오프 속도 상수(k_{off})보다 적어도 3배, 예컨대, 적어도 10배, 예컨대, 적어도 50배, 예컨대, 적어도 100배 더 높은 오프 속도 상수(k_{off})로 FcRn에 결합하는 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0674] 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 하나의 ISVD가 FcRn에 검출 가능하게, 선택적으로 또는 특이적으로 결합하지 않거나, 중성 또는 생리적 pH에서, 예컨대, 7.4의 pH에서 FcRn에 대한 결합을 나타내지 않거나 본질적으로 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0675] 따라서, 본 발명은 (기존의 또는 장래의) 치료제 화합물의 생체내 반감기를 연장시키는 것을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는 다양한 적용분야에 사용될 수 있는 개선된 FcRn 결합제를 제공한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 혈청 알부민 및 IgG에 의해 결합된 FcRn 상의 에피토프와 상이한 FcRn 상의 독특한 입체구조 에피토프에 대해 높은 친화도를 갖는다.

[0676] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 5.0 내지 6.8의 산성 pH에서 FcRn 상의 특정 에피토프에 높은 친화도를 가지면서, 7.4의 생리적 또는 중성 pH에서 FcRn에 대한 감소된 결합을 나타내거나 임의의 검출 가능, 선택적 및/또는 특이적 결합을 나타내지 않는다.

[0677] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 분자량이 적어도 30 kDa이고, 특히 분자량이 30 kDa 내지 100 kDa이다. 이러한 특정 실시형태에 따르면, 본 발명의 화합물은 여러 적용분야에, 특히 치료제 분자의 생체내 반감기 연장을 위해 가장 효과적 및 최적으로 적용될 수 있다.

[0678] 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은,

[0679] pH 의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD, 및

[0680] a) pH 5.0 내지 6.8에서의 결합 친화도가 pH 7.4에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높도록, 적어도 하나의 ISVD가 pH-의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하고,

[0681] b) 폴리펩타이드는 분자량이 적어도 30 kDa인

[0682] 것을 특징으로 하는, 적어도 하나의 추가 모이어티를 포함하는, 폴리펩타이드를 제공한다.

[0683] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드는 분자량이 약 30 kDa 내지 200 kDa, 예컨대, 약 30 kDa 내지 100 kDa이다.

[0684] **5.3 다중특이적 폴리펩타이드**

[0685] 일반적으로, 단일 빌딩블록, 단일 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 단일 Nanobody® ISVD를 포함하거나 이들로 본질적으로 이루어진 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 본 명세서에서 각각 "1가" 단백질 또는 폴리펩타이드, "1가 작제물", "1가 빌딩블록", "1가 면역글로불린 단일 가변 도메인", "1가 Nanobody® ISVD" 또는 "1가 Nanobody® V_{HH}"로 지칭될 것이다.

[0686] 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인(예컨대, 본 발명의 적어도 2개의 면역글로불린 단일 가변 도메인)을 포함하거나 이들로 본질적으로 이루어진 폴리펩타이드는 본 명세서에서 "다가" 폴리펩타이드, (융합) 단백질, 화합물 또는 "다가 작제물"로 지칭될 것이다. 이러한 다가 작제물의 일부 비제한적 예는 본 명세서의 추가 설명으로부터 분명하게 될 것이다.

[0687] 적어도 하나의 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH}가 제1 항원으로(즉, 제1 표적, 예컨대, FcRn으로) 향하고, 적어도 하나의 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH}가 제2 항원으로(즉, 제1

표적, 예컨대, FcRn 이외의 혈청 알부민 또는 치료제 표적과 상이한 제2 표적으로) 향하는 적어도 2개의 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH}를 포함하는 본 발명의 폴리펩타이드는 또한 본 발명의 "다중특이적" 폴리펩타이드로 지칭될 것이고, 이러한 폴리펩타이드에 존재하는 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH}는 또한 본 명세서에서 "다가 형식" 또는 "다중특이적 형식"으로 지칭될 것이다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 "이중특이적" 폴리펩타이드는 제1 표적(예를 들어, FcRn)으로 향하는 적어도 하나의 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH} 및 제2 표적으로 향하는(즉, 상기 제1 표적, 예컨대, 혈청 알부민과 상이한 제2 표적으로 향하는) 적어도 하나의 추가 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH}를 포함하는 폴리펩타이드인 반면, 본 발명의 "삼중특이적" 폴리펩타이드는 제1 표적(예를 들어, FcRn)으로 향하는 적어도 하나의 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH}, 상기 제1 표적(예를 들어, 혈청 알부민)과 상이한 제2 표적으로 향하는 제2 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH} 및 제3 항원(즉, 제1 표적과 제2 표적 둘 모두와 상이함, 예컨대, FcRn 및 혈청 알부민 이외의 치료제 표적)으로 향하는 적어도 하나의 추가 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH} 등을 포함하는 폴리펩타이드이다. 설명으로부터 명백한 바와 같이, 본 발명은, 본 발명의 다중특이적 폴리펩타이드가 제1 표적 및/또는 제2 표적와 각각 동일 또는 상이할 수 있는 적어도 제1 표적에 대한 제1 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH}, 제2 표적에 대한 제2 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH} 및 하나 이상의 표적으로 향하는 다수의 빌딩블록, ISVD, Nanobody® ISVD 또는 Nanobody® V_{HH}를 포함할 수 있다는 점에서, 이중특이적 폴리펩타이드로 제한되지 않는다.

[0688] 용어 이중특이적 폴리펩타이드, 이중특이적 형식, 이중특이적 작제물, 이중특이적 Nanobody® 작제물, 이중특이적 및 이중특이적 ISVD 작제물은 본 명세서에서 상호 호환 가능하게 사용된다.

[0689] 상기 및 본 명세서의 추가 설명으로부터 명백해지는 바와 같이, 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물 또는 작제물(예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 본 명세서에 기재된 본 발명의 2가/3가/4가/다가 및 이중/삼중/사중/다중특이적 폴리펩타이드)을 형성하기 위해, 예를 들어, 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위와 적합하게 조합함으로써, 본 발명의 폴리펩타이드를 형성하는 "빌딩블록"으로서 사용되어 하나의 분자 내에서 하나 이상의 목적하는 특성 또는 생물학적 기능을 조합한다.

[0690] 추가 특정 실시형태에서, 본 발명은 폴리펩타이드를 제공하되, 상기 적어도 하나의 ISVD 및 상기 적어도 하나의 추가 결합 모이어티는 서로 직접 연결되거나, 링커를 통해 연결된다.

[0691] 본 발명의 화합물, 작제물 또는 폴리펩타이드는 일반적으로, 본 발명의 화합물, 작제물 또는 폴리펩타이드를 제공하기 위해, 본 발명의 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 하나 이상의 추가 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위에, 선택적으로 하나 이상의 적합한 링커를 통해 적합하게 연결시키는 적어도 하나의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드는 또한 일반적으로 적어도 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 제공하는 단계, 적합한 방식으로 상기 핵산을 발현시키는 단계 및 본 발명의 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 명백하게 될 그 자체로 알려진 방식으로, 예를 들어, 본 명세서에 추가로 기재되는 방법 및 기법에 기반하여 수행될 수 있다. 본 발명의 적어도 하나의 ISVD를 포함하는 폴리펩타이드로부터 출발하여 본 발명의 화합물, 작제물 또는 폴리펩타이드를 설계/선택 및/또는 제조하는 과정은 또한 본 명세서에서 본 발명의 상기 폴리펩타이드를 "형식화"하는 것으로 지칭되고; 본 발명의 화합물, 작제물 또는 폴리펩타이드로 이루어진 본 발명의 폴리펩타이드는 본 발명의 상기 화합물, 작제물 또는 폴리펩타이드를 "형식화"하거나 "이의 형식"이 되는 것으로 언급된다. 본 발명의 폴리펩타이드가 형식화될 수 있는 방법의 예 및 이러한 형식의 예는 본 명세서의 개시내용에 기반하여 당업자에게 명백할 것이고; 이러한 형식화된 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩타이드는 본 발명의 추가 양상을 형성한다.

[0692] 예를 들어, 화합물 또는 작제물이 (융합) 단백질 또는 (융합) 폴리펩타이드가 되도록, 이러한 추가 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 하나 이상의 추가 면역글로불린일 수 있다. 바람직하지만, 비제한적인 양상에서, 상

기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)이다. 훨씬 더 바람직하게는, 상기 하나 이상의 다른기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 도메인 항체, 도메인 항체로서 사용하기에 적합한 면역글로불린 단일 가변 도메인, 단일 도메인 항체, 단일 도메인 항체로서 사용하기에 적합한 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD), "dAb"', dAb로서 사용하기에 적합한 면역글로불린 단일 가변 도메인, V_{HH}, 인간화 V_{HH}, 낙타화 V_H 또는 Nanobody® V_{HH}로 이루어진 군으로부터 선택된다. 대안적으로, 이러한 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 예를 들어 화학기, 잔기, 모이어티일 수 있으며, 이는 그 자체로 생물학적 및/또는 약리학적 활성을 가질 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, 이러한 기는 본 명세서에 추가로 기재되는 바와 같이, ISVD 또는 본 발명의 폴리펩타이드의 "유도체"를 제공하기 위해 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 본 발명의 폴리펩타이드와 연결될 수 있다.

[0693] 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 유도체를 포함하거나 이들로 본질적으로 이루어지고, 선택적으로 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위를 더 포함하고, 선택적으로 하나 이상의 링커를 통해 연결된 화합물 또는 작제물은 본 발명의 범주 내이다. 바람직하게는, 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 면역글로불린 단일 가변 도메인이다. 상기 기재된 화합물 또는 작제물에서, 본 발명의 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 상기 하나 이상의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 서로 및/또는 하나 이상의 적합한 링커 또는 스페이서를 통해 직접 연결될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위가 면역글로불린 단일 가변 도메인일 때, 링커는 또한 면역글로불린 단일 가변 도메인일 수 있고, 따라서 얻어진 화합물 또는 작제물은 융합 단백질 또는 융합 폴리펩타이드이다.

[0694] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 적어도 본 명세서에 개시된 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 적어도 본 명세서에 개시된 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 본질적으로 이루어진다. 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 "본질적으로 이루어진" 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인에 더하여 추가 면역글로불린 단일 가변 도메인을 갖지 않는 폴리펩타이드이다. 예를 들어, 2개의 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 본질적으로 이루어진 폴리펩타이드는 임의의 추가적인 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하지 않는다. 그러나, 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 본질적으로 이루어진 폴리펩타이드는 추가 작용기, 예컨대, 표지, 독소, 하나 이상의 링커, 결합 서열 등을 포함할 수 있다는 것이 인식되어야 한다. 이러한 추가 작용기는 아미노산 기반 기와 비아미노산 기반 기를 둘 다 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인으로 이루어진다. (문맥에 달리 명백하게 표시되지 않는 한) 용어 "폴리펩타이드 작제물" 및 "폴리펩타이드"는 본 명세서에서 상호 호환 가능하게 사용될 수 있다는 것이 인식되어야 한다.

[0695] 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 다가 또는 다중특이적 작제물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 하나 이상의 항체-기반 스캐폴드 및/또는 비항체 기반 스캐폴드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드는 혈청 결합 단백질 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 혈청 결합 단백질 모이어티는 면역글로불린 단일 가변 도메인이다. 일부 실시형태에서, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 Nanobody® V_{HH}이다.

[0696] 폴리펩타이드 상의 빌딩블록의 순서, 예컨대, 제1 빌딩블록, 제2 빌딩블록, 제3 빌딩블록 등(배향)은 당업자의 필요뿐만 아니라 폴리펩타이드에서의 이러한 빌딩블록의 위치에 따라 다를 수 있는 상대 친화도에 따라 선택될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 폴리펩타이드가 링커를 포함하는지의 여부는 설계 선택의 문제이다. 그러나, 링커 유무와 상관없이 일부 배향은 다른 배향에 비해 바람직한 결합 특징을 제공할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드에서 제1 및 제2 빌딩블록의 순서는 (*N*-말단에서 *C*-말단으로): (i) 제1 빌딩블록(예를 들어, 제1 ISVD, 예컨대, 제1 Nanobody® V_{HH}) - [링커] - 제2 빌딩블록(예를 들어, 제2 ISVD, 예컨대, 제2 Nanobody® V_{HH}); 또는 (ii) 제2 빌딩블록(예를 들어, 제2 ISVD, 예컨대, 제2 Nanobody® V_{HH}) - [링커] - 제1 빌딩블록(예를 들어, 제1 ISVD, 예컨대, 제1 Nanobody® V_{HH}); (여기서, 링커는 선택적임)일 수 있다. 모든 배향은 본 발명에 의해 포괄된다.

[0697] 적어도 하나의 ISVD 및 적어도 하나의 다른 결합 모이어티를 포함하는 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 적어도 하나의 ISVD 및 적어도 하나의 다른 결합 모이어티가 서로 직접 연결되거나 링커, 예컨대, 펩타이드 링커를 통해 연결되도록 한다. 둘 이상의 (폴리)펩타이드를 연결하기 위한 링커의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 펩타이드 링커의 자주 사용되는 부류 중 하나는 "Gly-Ser" 또는 "GS" 링커로 알려져 있다. 이들은 본질적으로 글리

신(G) 및 세린(S) 잔기로 이루어지고, 일반적으로 GGGGS(서열 번호 86) 모티프와 같은 펩타이드 모티프의 하나 이상의 반복부를 포함하는 링커이다(예를 들어, 식 $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$(식 중, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 그 이상일 수 있음)을 나타냄). 이러한 GS 링커의 일부 자주 사용되는 예는 9GS 링커(GGGGSGGGS, 서열번호 87), 15GS 링커(n=3), 및 35GS 링커(n=7)이다. 예를 들어, 문헌[Chen *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 2013 Oct 15; 65(10): 1357-1369; 및 Klein *et al.*, Protein Eng. Des. Sel. (2014) 27 (10): 325-330]을 참조한다. 특정 그러나 비제한적인 실시형태에서, 링커는 3A, 3GS, 5GS, 7GS, 9GS, 10GS, 15GS, 18GS, 20GS, 25GS, 30GS 및 35GS(서열번호 37 내지 48)의 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 특정 실시형태에서, 링커는 IgG1 힌지 영역과 같은 IgG 힌지 영역(서열번호 50 또는 126)일 수 있다. 바람직하게는, 링커는 IgG1 짧은 힌지 영역(서열번호 126) 및/도는 35GS 링커(서열번호 48)일 수 있다.

[0698] [표 A-2]

링커 서열("ID"는 본 명세서에 사용된 바와 같은 서열번호를 지칭함)

명칭	ID	아미노산 서열
3A 링커	37	AAA
5GS 링커	38	GGGGS
7GS 링커	39	SGGSGGS
8GS 링커	40	GGGGSGGS
9GS 링커	41	GGGGSGGGS
10GS 링커	42	GGGGSGGGGS
15GS 링커	43	GGGGSGGGGSGGGGS
18GS 링커	44	GGGGSGGGGSGGGGSGGS
20GS 링커	45	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS 링커	46	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS 링커	47	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS 링커	48	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
40GS 링커	49	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
G1 힌지	50	EPKSCDKTHTCPPCP
9GS-G1 힌지	51	GGGGSGGGSEPKSCDKTHTCPPCP
라마 상부 긴 힌지 서열	52	EPKTPKPQPAAA
G3 힌지	53	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCP
짧은 G1 힌지	126	DKTHTCPPCP

[0699]

[0700] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 단백질 모이어티, 예컨대, 추가 ISVD이다.

[0701] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 단백질 모이어티, 예컨대, 혈청 단백질, 특히, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 혈청 알부민이다.

[0702] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 단백질 결합 모이어티, 예컨대, 혈청 단백질 결합 모이어티, 예컨대, 혈청 알부민 결합 모이어티, 특히 혈청 단백질 결합 ISVD, 더 구체적으로는 혈청 알부민 결합 ISVD이다.

[0703] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 혈청 알부민 결합 모이어티는 FcRn에 대한 혈청 알부민의 결합에 관련되지 않는 혈청 알부민 상의 아미노산 잔기에 특이적으로 결합한다.

[0704] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 본 발명은 혈청 알부민에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD가 (단일) 도메인 항체, V_{HH}, Nanobody® V_{HH}, 인간화 V_{HH}, 또는 낙타화 V_H인 것을 특징으로 하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공한다.

[0705] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 혈청 알부민에 결합하는 적어도 하나의 ISVD이

다.

[0706] 소정의 추가 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 4개의 프레임워크 영역(각각 FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각 CDR1 내지 CDR3)으로 본질적으로 이루어진 혈청 알부민에 결합하는 적어도 하나의 ISVD이며, 이때 CDR1은 SFGMS(서열번호 16)이고, CDR2는 SISGSGSDTLYADSVKG(서열번호 17)이고, CDR3은 GGSLSR(서열번호 18)이며, CDR은 Kabat 정의에 따라 결정되고; 그리고/또는 CDR1은 GFTFRSFGMS(서열번호 19)이고, CDR2는 SISGSGSDTL(서열번호 20)이며, CDR3은 GGSLSR(서열번호 21)이고, CDR은 AbM 정의에 따라 결정된다(Kontermann *et al.*, 2010).

[0707] 국제특허출원 공개 WO 06/122787은 (인간) 혈청 알부민에 결합하는 다수의 ISVD를 기재하고 있다. 이러한 ISVD에는 Alb-1(WO 06/122787의 서열 번호 52)로 불리는 Nanobody® V_{HH} 및 Alb-8(WO 06/122787의 서열 번호 62)과 같은 이의 인간화 변이체가 포함된다. 또한, WO 2012/175400은 Alb-23으로 지칭되는 Alb-1의 추가 개선된 버전을 기재하고 있다.

[0708] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 바와 같이 FcRn 상의 에피토프에 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하고, WO 2012/175400의 페이지 7 내지 9에 나타낸 바와 같은 Alb-1, Alb-3, Alb-4, Alb-5, Alb-6, Alb-7, Alb-8, Alb-9, Alb-10 및 Alb-23, 바람직하게는 Alb-8 또는 Alb-23 또는 이의 변이체로부터 선택된 혈청 알부민 결합 모이어티 및 WO 2012/175741, WO 2015/173325, WO 2017/080850, WO 2017/085172, WO 2018/104444, WO 2018/134235, WO 2018/134234에 기재된 알부민 결합제를 더 포함한다. 일부 바람직한 혈청 알부민 결합제는 또한 표 A-3에 제시되어 있다.

[0709] [표 A-3]

혈청 알부민 결합 ISVD 서열("ID"는 본 명세서에서 사용된 바와 같은 서열번호를 나타냄)

명칭	ID	아미노산 서열
Alb8	22	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23	23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb129	24	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb132	25	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb11	26	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb11 (S112K)-A	27	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
Alb82	28	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb82-A	29	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb82-AA	30	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAA
Alb82-AAA	31	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSAAA
Alb82-G	32	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG
Alb82-GG	33	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG
Alb82-GGG	34	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG
Alb23002	35	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb223	36	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA

[0710]

[0711] 본 발명의 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 바와 같은 FcRn 상의 에피토프에 결합하는 적어도 하나의 ISVD를 포함하고, ALB23002의 전체 아미노산 서열을 갖는 혈청 알부민 결합 ISVD를 더 포함한다(서열번호 35, 표 A-3 참조).

[0712] 또한 바람직한 실시형태에서, 인간 혈청 알부민에 결합하는 ISVD의 아미노산 서열은 서열번호 35와 90% 초과, 예컨대, 95% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성을 가질 수 있되, 선택적으로 CDR은 서열번호 16 내지 18(Kabat에 따름) 또는 서열번호 19 내지 21(AbM에 따름)로 위에 정의된 바와 같다. 특히, 인간 혈청 알부민에 결합하는 ISVD는 바람직하게는 서열번호 35의 아미노산 서열을 갖는다.

[0713] 인간 혈청 알부민에 결합하는 이러한 ISVD가 상응하는 참조 CDR 서열(위에 정의된 바와 같이 서열번호 16 내지 18(Kabat에 따름) 또는 서열번호 19 내지 21(AbM에 따름))에 비해 적어도 하나의 CDR에서 2 또는 1개의 아미노산 차이를 가질 때, ISVD는 바람직하게는 작제물 ALB23002로서의 인간 혈청 알부민에 대해 적어도 절반의 결합 친화도, 바람직하게는 적어도 동일한 결합 친화도를 갖되, 결합 친화도는 SPR과 같은 동일한 방법을 사용하여 측정된다.

[0714] 인간 혈청 알부민에 결합하는 이러한 ISVD가 C 말단 위치를 갖는 경우, 이는 C 말단 알라닌(A) 또는 글리신(G) 연장부를 나타낼 수 있고 바람직하게는 서열번호 24, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34 및 36으로부터 선택된다(표 A-3 참조). 바람직한 실시형태에서, 인간 혈청 알부민에 결합하는 ISVD는 C 말단 위치 이외의 다른 위치를 갖고(즉, 본 발명의 폴리펩타이드의 C 말단 ISVD가 아님), 서열번호 22, 23, 26, 28 및 35로부터 선택된다(표 A-3 참조).

[0715] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 적어도 제1 및 적어도 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 포함하되, 상기 적어도 제1 ISVD는 산성 pH에서 FcRn에 높은 친화도를 갖고/특이적으로 결합하고, 상기 적어도 제2 ISVD는 혈청 알부민에 높은 친화도를 갖고/특이적으로 결합한다. 본 발명의 특정 실시형태에 따른 폴리펩타이드, 폴리펩타이드 작제물, ISVD 빌딩블록의 바람직한 서열 및 CDR 서열 및 FR 서열의 조합은 표 A-4 내지 표 A-8에 나타낸다.

[0716] [표 A-4]

본 발명의 특정 실시형태에 따른 다가 ISVD 작제물의 입체배치

명칭	서열번호	빌딩블록 1	링커	빌딩블록 2
T0263018B11 (모체)-9GS-ALB23002	122	T0263018B11	35GS	ALB23002
T0263018B11 (W100cS)-9GS-ALB23002	123	T0263018B11 (W100cS)	35GS	ALB23002
ALB23002-9GS-T0263018B11 (모체)	124	ALB23002	35GS	T0263018B11
ALB23002-9GS-T0263018B11 (W100cS)	125	ALB23002	35GS	T0263018B11 (W100cS)

[0717]

[0718] [표 A-5]

본 발명에 따른 다중특이적 폴리펩타이드 내에서 사용된 상이한 1가 VHH 빌딩블록의 아미노산 서열
("ID"는 본 명세서에 사용된 바와 같은 서열번호를 지칭함)

명칭	ID	아미노산 서열
T0263018B11 (모체)	14	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRPEDTALYYCAADTLYTSLTWYSYWGQGTLVTVSS
T0263018B11 (W100cS)	15	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRPEDTALYYCAADTLYTSLTSYSYWGQGTLVTVSS
ALB23002	35	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS

[0719]

[0720] [표 A-6]

AbM 넘버링에 따른 CDR 및 프레임워크의 서열("ID"는 주어진 서열번호를 지칭함)

빌딩블록	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4	ID
T0263018B11 (모체)	14	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS	114	GFTFSSYAMY	11	WVRQAPGKGLEWVS	115	AISSGGGSTD	12	YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAA	116	DTLYTSLTWYSY	105	WGQGTLVTVSS	117
T0263018B11 (W100cS)	15	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS	114	GFTFSSYAMY	11	WVRQAPGKGLEWVS	115	AISSGGGSTD	12	YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAA	116	DTLYTSLTSYSY	13	WGQGTLVTVSS	117
ALB23002	35	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS	118	GFTFRSFGMS	19	FGMSWVRQAPGKGPEWVS	119	SISGSGSDTL	20	YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI	120	GGSLSR	21	SSQGTLVTVSS	121

[0721]

[0722] [표 A-7]

Kabat 넘버링에 따른 CDR 및 프레임워크의 서열("ID"는 주어진 서열번호를 지칭함)

빌딩블록	ID	FR1	ID	CDR1	ID	FR2	ID	CDR2	ID	FR3	ID	CDR3	ID	FR4	ID
T0263018B11 (모체)	14	EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS	106	SYAMY	8	WVRQAPG KGLEWVS	107	AISSG GGSTD YADSV KG	9	RFTISRDNSK NTLYLQMNS LRPEDTALYY CAA	108	DTLYTSLT WYSY	104	WGQGTLV TVSS	109
T0263018B11 (W100cS)	15	EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS	106	SYAMY	8	WVRQAPG KGLEWVS	107	AISSG GGSTD YADSV KG	9	RFTISRDNSK NTLYLQMNS LRPEDTALYY CAA	108	DTLYTSLTS YSY	10	WGQGTLV TVSS	109
ALB23002	35	EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFR	110	SFGMS	16	WVRQAPG KGPEWVS	111	SISGSG SDTLY ADSVK G	17	RFTISRDNSK NTLYLQMNS LRPEDTALYY CTI	112	GGSLSR	18	SSQGTLVT VSS	113

[0723]

[0724] [표 A-8]

선택된 다가 폴리펩티드의 아미노산 서열("ID"는 주어진 서열번호를 나타냄)

명칭	ID	아미노산 서열
T0263018B11 (모체)-9GS-ALB23002	122	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGS TDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAADTLYTSLTWYSYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSW VRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAL YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
T0263018B11 (W100cS)-9GS-ALB23002	123	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGS TDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAADTLYTSLTSYSYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGS EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSW VRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
ALB23002-9GS-T0263018B11 (모체)	124	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS GGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAPGKG LEWVSAISSGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAAD TLYTSLTWYSYWGQGTLVTVSS
ALB23002-9GS-T0263018B11 (W100cS)	125	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS GGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMYWVRQAPGK GLEWVSAISSGGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAA DTLYTSLTSYSYWGQGTLVTVSS

[0725]

[0726] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공하며, 상기 폴리펩타이드는 (단일) 도메인 항체, Nanobody® V_{HH}, V_{HH}, 인간화 V_{HH} 또는 낙타화 V_H를 포함하는 치료제 모이어티를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0727] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 적어도 제1, 적어도 제2 및 적어도 제3 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISVD)을 포함하되, 상기 적어도 제1 ISVD는 산성 pH에서 FcRn에 높은 친화도를 갖고/특이적으로 결합하며; 상기 적어도 제2 ISVD는 혈청 알부민에 높은 친화도를 갖고/특이적으로 결합하고, 상기 적어도 제3 ISVD는 FcRn 및 혈청 알부민 이외의 치료적으로 관련된 항원에 높은 친화도를 갖고/특이적으로 결합한다.

[0728] (또한 실시예 부문에서 입증되는 바와 같이) FcRn에 결합하는 ISVD 및 혈청 알부민에 결합하는 ISVD 및/또는 FcRn 및 알부민 이외의 치료제 표적에 결합하는 ISVD가 본 발명의 폴리펩타이드에서 임의의 순서로 위치될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 더 구체적으로는, 일 실시형태에서, FcRn에 결합하는 ISVD는 *N*-말단에 위치되고, 다른 항원에 결합하는 ISVD는 *C*-말단에 위치된다. 다른 실시형태에서, 다른 항원에 결합하는 ISVD는 *N*-말단에

위치되고, ISVD 결합 FcRn은 *C*-말단에 위치된다.

[0729] 본 발명은 하나 이상의 ISVD 또는 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하거나 이것으로 본질적으로 이루어지고, 선택적으로 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위를 더 포함하는 화합물 또는 작제물, 및 특히 단백질 또는 폴리펩타이드를 추가로 제공한다. 본 명세서의 추가 개시내용으로부터 당업자에게 명백하게 되는 바와 같이, 이러한 추가 기, 잔기, 모이어티, 결합 단위 또는 아미노산 서열은 본 발명의 폴리펩타이드에 (및/또는 이것이 존재하는 화합물 또는 작제물에) 추가적인 기능성을 제공할 수도 있고 제공하지 않을 수도 있고, 본 발명의 폴리펩타이드의 특성을 변형시킬 수도 있고 변형시키지 않을 수도 있다.

[0730] 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 면역글로불린(Ig)의 Fc 영역이다. 따라서, 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명은 pH 의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD, 및 적어도 하나의 추가 모이어티를 제공하며, 하기를 특징으로 한다:

[0731] a) pH 5.0 내지 6.8에서의 결합 친화도가 pH 7.4에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높도록, 적어도 하나의 ISVD가 pH-의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하고,

[0732] b) 폴리펩타이드는 적어도 30 kDa, 특히 약 30 kDa 내지 100 kDa의 분자량을 가지며,

[0733] c) 적어도 하나의 추가 모이어티는 면역글로불린(Ig)의 Fc 영역 또는 Fc 도메인이다.

[0734] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 추가 모이어티는 면역글로불린 G(IgG)의 Fc 영역 또는 Fc 도메인이다. 추가 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 추가 모이어티는 면역글로불린 G 4형 (IgG4)의 Fc 영역 또는 Fc 도메인이다.

[0735] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공하되, 적어도 하나의 추가 모이어티는 면역글로불린 A(IgA)의 Fc 영역 또는 Fc 도메인이다.

[0736] 일부 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 면역글로불린의 야생형 Fc 도메인이다. 야생형 Fc 도메인은 500 nM 초과, 예를 들어, 600 nM 초과의 K_D 값으로 FcRn에 결합할 수 있다.

[0737] 소정의 다른 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 (예를 들어, pH 5.0 내지 6.8에서) 약 550, 525, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125 또는 100 nM 미만의 K_D 값으로 FcRn에 결합하는 면역글로불린의 돌연변이체 Fc 도메인일 수 있다. 소정의 다른 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 FcRn에 검출 가능하게, 선택적으로 또는 특이적으로 결합하지 않거나, 5.0 내지 6.8의 pH에서도, 중성 또는 생리적 pH, 예컨대, 7.4의 pH에서도 FcRn에 대한 결합을 나타내지 않거나 본질적으로 나타내지 않는 돌연변이체 Fc 도메인일 수 있다.

[0738] 본 발명에 따른 적어도 하나의 폴리펩타이드 및 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함하는 적합한 작제물 및 형식은 본 명세서의 추가 설명으로부터 명백하게 될 것이다. 적합한 Fc 도메인의 돌연변이 변이체뿐만 아니라 Fc 도메인 작제물의 적합한 형식은 당업계에 잘 알려져 있으며, 특히 특허 출원 공개 EP 2654790, US 10239944, US 20120251531, US 9133274, WO 2014065945, WO 2015150447 및 WO 2021016571에 기재되어 있다.

[0739] 따라서, 위에 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 IgG의 Fc 도메인을 추가로 포함한다. IgG의 Fc 도메인은 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 G 중쇄의 *C*-말단의 비항원 결합 영역을 지칭한다. 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 천연 Fc 영역일 수 있으며, 즉, 천연 항체에서 발생되는 것과 같거나, 이는 천연 Fc 도메인에 비해 하나 이상의 변경, 돌연변이 또는 변이를 포함하는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 특정 실시형태에서, IgG의 Fc 도메인은 또한 천연 Fc 도메인의 단편 또는 변이체 Fc 도메인의 단편일 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드는 인간 IgG의 천연 Fc 도메인, 예컨대, 바람직하게는 인간 IgG4의 천연 Fc(예를 들어, Uniprot 서열 P01861, 서열번호 129)를 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 비변형 모체 Fc 분자에 비해 Fc 리간드에 대해 변경된 결합 특성을 갖는 변이체 Fc 도메인을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호 및 제5,648,260호(둘 다 Winter 등)에 기재된 바와 같이 변이체 Fc 영역이 효과기 리간드, 예를 들어, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분에 대해 변경된 친화도를 갖도록, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드는 상이한 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322 중 하나 이상을 갖는 Fc 영역을 포함할 수 있다.

[0740] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 감소된 효과기 기능을 갖는 Fc 변이체 도메인, 특히 잔기 234 및

235의 알라닌으로의 치환을 갖는 소위 "FALA" 또는 "LALA" Fc 돌연변이체를 포함한다. 추가 선택적 돌연변이는 아르기닌 잔기 409의 리신으로의 치환, 리신 잔기 447의 결실을 포함한다. 다른 실시형태에서, Fc 변이체 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 소위 "FALA" 돌연변이 및 돌연변이 S228P을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 "pFALA"로 지칭된다.

[0741] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 천연 Fc 도메인에 비해 FcRn 수용체에 대해 개선된 결합을 나타내는 Fc 변이체 도메인을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기 259, 308, 428 및 434 중 하나 이상에서 치환을 갖는 것을 포함한다. FcRn에 결합하는 Fc를 증가시키는 다른 변이체는 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L(Hinton *et al.*, 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton *et al.*, 2006, Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A(Shields *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604)를 포함한다.

[0742] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 Fc 변이체 도메인을 포함하되, 메티오닌 428은 리신으로 치환되고, 아스파라긴 434는 세린으로 치환된다.

[0743] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 천연 Fc 도메인에 비해 FcRn 수용체에 대해 감소된 결합을 나타내거나 결합을 나타내지 않는 Fc 변이체 도메인을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기 253, 310 및 453 중 하나 이상에서 치환을 갖는 것을 포함한다.

[0744] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 Fc 변이체 도메인을 포함하되, 아이소류신 428은 알라닌으로 치환되고, 히스티딘 310은 알라닌으로 치환되고, 히스티딘 453은 알라닌으로 치환되며, 선택적으로 히스티딘 453이 알라닌으로 치환되는 것과 조합된다.

[0745] 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 추가 모이어티는 비-단백질 모이어티, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 폴리-에틸렌-글리콜(PEG) 모이어티이다.

[0746] 따라서, 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명은 pH 의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 ISVD, 및 적어도 하나의 추가 모이어티를 제공하며,

[0747] a) pH 5.0 내지 6.5에서의 결합 친화도가 pH 7.4에서의 결합 친화도보다 적어도 3배 더 높도록, 적어도 하나의 ISVD가 pH-의존적 방식으로 FcRn에 특이적으로 결합하고,

[0748] b) 폴리펩타이드는 적어도 30 kDa, 특히 약 30 kDa 내지 100 kDa의 분자량을 가지며,

[0749] c) 적어도 하나의 추가 모이어티는 비단백질 모이어티, 예컨대 폴리-에틸렌-글리콜(PEG) 모이어티인 것을 특징으로 한다.

[0750] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드를 제공하며, 상기 폴리펩타이드는 치료제 모이어티를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0751] 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 치료제 모이어티는 치료제 단백질, 폴리펩타이드, 화합물, 인자 또는 다른 독립체를 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어진다. 바람직한 실시형태에서, 치료제 모이어티는 목적하는 항원 또는 표적으로 향하고, 목적하는 항원에 결합할 수 있고(특히 목적하는 항원에 특이적으로 결합할 수 있고), 그리고/또는 목적하는 표적과 상호작용할 수 있다. 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 치료제 모이어티는 치료제 단백질 또는 폴리펩타이드를 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어진다. 추가 실시형태에서, 적어도 하나의 치료제 모이어티는 결합 도메인 또는 결합 단위, 예컨대, 면역글로불린 또는 면역글로불린 서열(면역글로불린의 단편을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않음), 예컨대, 항체 또는 항체 단편(ScFv 단편을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않음), 또는 다른 적합한 단백질 스캐폴드, 예컨대, 단백질 A 도메인(예컨대, Affibodies™), 텐다미스타트(tendamistat), 피브로넥틴, 리포칼린, CTLA-4, T-세포 수용체, 설계된 안키린 반복부, 아비머(avimer) 및 PDZ 도메인(Binz *et al.*, Nat. Biotech 2005, Vol 23: 1257), 및 DNA 또는 RNA 압타머를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 DNA 또는 RNA에 기반한 결합 모이어티(Ulrich *et al.*, Comb Chem High Throughput Screen 2006 9(8):619-32)를 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어진다.

[0752] 또 다른 양상에서, 적어도 하나의 치료제 모이어티는 항체 가변 도메인, 예컨대, 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어진다.

[0753] 바람직한 양상에서, 적어도 하나의 치료제 모이어티는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 예컨대, 도메인 항체, 단일 도메인 항체, "dAb" 또는 V_{HH}(예컨대, Nanobody® V_{HH}, 인간화 V_{HH} 또는 낙타화 V_H) 또는 IgNAR

도메인을 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어진다.

[0754] 예를 들어, 제한 없이, 본 발명의 이러한 폴리펩타이드, 화합물 또는 작제물은 하기를 포함할 수 있다:

[0755] - 치료제 표적에 대한 본 발명의 적어도 하나의 FcRn 결합제 및 적어도 하나의 ISVD(및 바람직하게는 Nanobody® V_{HH}); 또는

[0756] - 치료제 표적에 대한 본 발명의 적어도 하나의 FcRn 결합제 및 적어도 하나의 혈청 알부민 결합제(본 명세서에 기재된 바와 같음) 및 적어도 하나의 ISVD(및 바람직하게는 Nanobody® V_{HH}); 또는

[0757] - 치료제 표적에 대한 본 발명의 적어도 하나의 FcRn 결합제 및 적어도 하나의 면역글로불린의 Fc 영역(본 명세서에 기재된 바와 같음) 및 적어도 하나의 ISVD(및 바람직하게는 Nanobody® V_{HH}); 또는

[0758] - 치료제 표적에 대한 본 발명의 적어도 하나의 FcRn 결합제 및 적어도 하나의 혈청 알부민 결합제(본 명세서에 기재된 바와 같음) 및 적어도 하나의 면역글로불린의 Fc 영역(본 명세서에 기재된 바와 같음) 및 적어도 하나의 ISVD(및 바람직하게는 Nanobody® V_{HH}).

[0759] 본 발명의 이러한 폴리펩타이드, 화합물 또는 작제물에서, 둘 이상의 빌딩블록, ISVD 또는 Nanobody® V_{HH} 및 선택적으로 하나 이상의 폴리펩타이드, 하나 이상의 다른 기, 약물, 제제, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 서로 직접 연결될 수 있고(예를 들어, WO 99/23221에 기재된 바와 같음) 그리고/또는 하나 이상의 적합한 스페이서 또는 링커, 또는 이들의 임의의 조합을 통해 서로 연결될 수 있다.

[0760] 다가 및 다중특이적 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 스페이서 또는 링커는 당업계에게 명백할 것이며, 일반적으로 아미노산 서열을 연결하기 위해 당업계에서 사용되는 임의의 링커 또는 스페이서일 수 있다. 바람직하게는, 상기 링커 또는 스페이서는 약제학적 용도로 의도된 단백질 또는 폴리펩타이드를 작제하는데 사용하기에 적합하다.

[0761] 예를 들어, 링커는 적합한 아미노산 서열, 특히 1 내지 50개, 바람직하게는 1 내지 30개, 예컨대 1 내지 10개 아미노산 잔기의 아미노산 서열일 수 있다. 이러한 아미노산 서열의 일부 바람직한 예는 gly-ser 링커, 예를 들어, $(gly_xser_y)_z$ 유형, 예컨대 (예를 들어, WO 99/42077에 기재된 바와 같이 $(gly_4ser)_3$ 또는 $(gly_3ser_2)_3$, 및 본 명세서에 언급된 Ablynx에 의한 출원에 기재된 30GS, 15GS, 9GS 및 7GS 링커(예를 들어 WO 06/040153 및 WO 06/122825)뿐만 아니라 힌지-유사 영역, 예컨대, 자연 발생적 중쇄 항체 또는 유사한 서열의 힌지 영역(예컨대 WO 94/04678에 기재됨)을 포함한다. 바람직한 링커는 표 A-2에 도시된다.

[0762] 일부 다른 특히 바람직한 링커는 폴리-알라닌(예컨대, AAA)뿐만 아니라 링커 GS30(WO 06/122825에서 서열번호 85) 및 GS9(WO 06/122825에서 서열번호 84)이다.

[0763] 다른 적합한 링커는 일반적으로 유기 화합물 또는 중합체, 특히 약제학적 용도를 위한 단백질에 사용하기에 적합한 것을 포함한다. 예를 들어, 폴리(에틸렌글리콜) 모이어티는 항체 도메인을 연결하기 위해 사용되어 왔고, 예를 들어 WO 04/081026을 참조한다.

[0764] 사용된 링커(들)의 길이, 유연성의 정도 및/또는 다른 특성(비록 ScFv 단편에서 사용되는 링커에 대해 일반적으로 중요하지는 않지만)이 FcRn 또는 하나 이상의 다른 항원에 대한 친화도, 특이성 또는 결합력을 포함하지만 이에 제한되지 않는 본 발명의 최종 폴리펩타이드의 특성에 대해 어느 정도 영향을 미칠 수 있다는 것은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 명세서의 개시내용에 기초하여, 당업자는 선택적으로 일부 제한된 일상적 실험 후에, 본 발명의 특정 폴리펩타이드에서 사용하기 위한 최적의 링커(들)를 결정할 수 있을 것이다.

[0765] 예를 들어, 제1 및 제2 표적으로 향하는 빌딩블록, ISVD 또는 Nanobody V_{HH}를 포함하는 본 발명의 다가 폴리펩타이드에서, 링커의 길이 및 가요성은 바람직하게는 폴리펩타이드에 존재하는 본 발명의 각각의 빌딩블록, ISVD 또는 Nanobody V_{HH}가 이의 동족 표적, 예를 들어, 표적 각각에 대한 항원 결정소에 결합하는 것을 가능하게 한다. 또한, 본 명세서의 개시내용에 기반하여, 당업자는 선택적으로 일부 제한된 일상적 실험 후에, 본 발명의 특정 폴리펩타이드에서 사용하기 위한 최적의 링커(들)를 결정할 수 있을 것이다.

[0766] 또한 사용된 링커(들)가 본 발명의 폴리펩타이드에 하나 이상의 다른 유리한 특성들 또는 기능성을 부여하고/하

거나, 유도체 형성 및/또는 작용기의 부착을 위한 하나 이상의 부위를 제공하는 것도 본 기술의 범위 내에 있다(예를 들어, ISVD의 유도체 또는 본 발명의 폴리펩타이드에 대해 본 명세서에 기술된 바와 같음). 예를 들어, 하나 이상의 하전된 아미노산 잔기를 함유하는 링커는 개선된 친수성을 제공할 수 있는 반면, 작은 에피토프 또는 태그를 형성하거나 함유하는 링커는 검출, 식별 및/또는 정제 목적으로 사용될 수 있다. 또한, 본 명세서의 개시내용에 기반하여, 당업자는 선택적으로 일부 제한된 일상적 실험 후에, 본 발명의 특정 폴리펩타이드에서 사용하기 위한 최적의 링커를 결정할 수 있을 것이다.

[0767] 마지막으로, 본 발명의 폴리펩타이드에 2개 이상의 링커가 사용되는 경우, 이들 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. 또한, 본 명세서의 개시내용에 기반하여, 당업자는 선택적으로 일부 제한된 일상적 실험 후에, 본 발명의 특정 폴리펩타이드에서 사용하기 위한 최적의 링커를 결정할 수 있을 것이다.

[0768] 보통, 발현 및 생산의 용이함을 위해, 본 발명의 폴리펩타이드는 선형 폴리펩타이드일 것이다. 그러나, 가장 넓은 의미의 본 발명은 이것으로 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드가 3개 이상의 빌딩블록, ISVD 또는 Nanobody V_{HH}를 포함하는 경우, 3개 이상의 "아암"이 있는 링커를 사용하여 이들을 연결할 수 있으며, 각각의 "아암"은 빌딩블록, ISVD 또는 Nanobody V_{HH}에 연결되어, "별 형상의" 작제물을 제공할 수 있다. 또한 보통 덜 바람직하기는 하지만, 원형 작제물을 사용할 수 있다.

[0769] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 및 작제물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 및 작제물은 본 명세서의 추가 설명으로부터 당업자에게 명백할 바와 같이 알려진 방식 그 자체로 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 및 작제물은 항체 제조를 위해 그리고 특히 항체 단편((단일) 도메인 항체 및 ScFv 단편을 포함하지만, 이들로 제한되지 않음)의 제조를 위해 알려진 임의의 방식 그 자체로 제조될 수 있다. 폴리펩타이드 및 작제물을 제조하기 위한 일부 바람직하지만, 비제한적인 방법은 본 명세서에 기재된 방법 및 기법을 포함한다.

[0770] 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 및 작제물을 생산하는 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다:

[0771] 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서(또한 본 명세서에서 "본 발명의 숙주"로서 지칭됨) 또는 본 발명의 상기 ISVD, 폴리펩타이드 또는 단백질 작제물을 암호화하는 핵산의 다른 적합한 발현 시스템에서의 발현 단계, 선택적으로, 이어서:

[0772] 이렇게 얻어진 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 및 작제물을 단리 및/또는 정제하는 단계.

[0773] 특히, 이러한 방법은 하기 단계들을 포함할 수 있다:

[0774] 본 발명의 상기 숙주 세포 또는 숙주 유기체가 본 발명의 적어도 하나의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 및/또는 작제물을 발현 및/또는 생성하도록 하는 조건하에서 본 발명의 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 배양 및/또는 유지하는 단계; 선택적으로, 이어서:

[0775] 이렇게 얻어진 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 및/또는 작제물을 단리 및/또는 정제하는 단계.

[0776] **5.2 핵산 서열 및 유전자 작제물**

[0777] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 ISVD, 폴리펩타이드, 화합물, (융합) 단백질 또는 (다중특이적) 작제물을 암호화하는 핵산 또는 뉴클레오타이드 서열(또한 "본 발명의 핵산" 또는 "본 발명의 뉴클레오타이드 서열"로 지칭됨)에 관한 것이다. 본 발명의 핵산은 단일 또는 이중가닥 DNA 또는 RNA 형태일 수 있고, 바람직하게는 이중가닥 DNA 형태이다. 예를 들어, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 게놈 DNA, cDNA 또는 합성 DNA(예컨대, 의도된 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 발현에 특이적으로 적합하게 된 코돈사용빈도를 갖는 DNA)일 수 있다.

[0778] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 본 발명의 핵산은 본 명세서에 정의된 바와 같이 본질적으로 단리된 형태이다. 본 발명의 핵산은 또한 본질적으로 단리된 형태일 수 있는, 예를 들어, 플라스미드, 코스미드 또는 YAC와 같은 벡터의 형태일 수 있고/있거나, 이들에 존재하고/하거나 이들의 일부일 수 있다. 핵산 서열은 - 예를 들어, 이로부터 얻어진 천연 생물학적 공급원 및/또는 반응 배지 또는 배양 배지에 비해 - 상기 공급원 또는 배지에서 보통 관련된 적어도 하나의 다른 성분, 예컨대, 다른 핵산, 다른 단백질/폴리펩타이드, 다른 생물학적 성분 또는 거대분자 또는 적어도 하나의 오염물질, 불순물 또는 소량의 성분으로부터 분리되었을 때, "본질적으로 단리된 (형태)"인 것으로 간주된다. 특히, 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 적어도 2배, 특히 적어도 10배, 더 구체적으로는 적어도 100배, 및 최대 1000배 이상 정제되었을 때 "본질적으로 단리된" 것으로 간주된다. "본질적으로 단리된 형태"인 핵산 서열은, 적합한 기법, 예컨대, 적합한 크로마토그래피 기법, 예컨대, 폴리아크릴

아마이드-겔 전기영동을 사용하여 결정된 바와 같이, 바람직하게는 본질적으로 균질하다.

[0779] 2개 이상의 뉴클레오타이드 서열을 비교하기 위해, 제1 뉴클레오타이드 서열과 제2 뉴클레오타이드 서열 사이의 "서열 동일성" 백분율은 [제2 뉴클레오타이드 서열의 상응하는 위치에서의 뉴클레오타이드와 동일한 제1 뉴클레오타이드 서열에서의 뉴클레오타이드의 수]를 [제1 뉴클레오타이드 서열에서의 뉴클레오타이드의 총 수]로 나누고 [100%]을 곱해서 계산될 수 있고, 이때 제1 뉴클레오타이드 서열과 비교하여 - 제2 뉴클레오타이드 서열에서의 뉴클레오타이드의 각 결실, 삽입, 치환 또는 첨가는 단일 뉴클레오타이드(위치)의 차이로 간주된다.

[0780] 대안적으로, 둘 이상의 뉴클레오타이드 서열 사이의 서열 동일성 정도는 표준 설정을 사용하여 NCBI Blast v2.0과 같은 서열 정렬을 위한 알려진 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 계산될 수 있다. 서열 동일성 정도를 결정하기 위한 일부 다른 기법, 컴퓨터 알고리즘 및 설명은, 예를 들어, WO 04/037999, EP 0 967 284, EP 1 085 089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 및 GB 2 357 768-A에 기재되어 있다. 통상적으로, 본 명세서의 위에서 개략적으로 설명된 계산 방법에 따라 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 "서열 동일성"의 백분율을 결정하기 위하여, 가장 많은 수의 뉴클레오타이드를 가진 뉴클레오타이드 서열을 "제1" 뉴클레오타이드 서열로 취할 것이고, 다른 뉴클레오타이드 서열을 "제2" 뉴클레오타이드 서열로 취할 것이다.

[0781] 본 발명의 핵산은 본 명세서에 제공된 본 발명의 폴리펩타이드 또는 단백질 작제물에 대한 정보에 기반하여 알려진 방식 그 자체로 제조되거나 얻을 수 있고/있거나, 적합한 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 또한, 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 발명의 핵산을 제조하기 위해 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 암호화하는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열 및, 예를 들어, 하나 이상의 링커를 암호화하는 핵산과 같은 여러 뉴클레오타이드 서열이 적합한 방식으로 함께 연결될 수 있다.

[0782] 본 발명의 핵산을 생성하는 기술은 당업자에게 명확할 것이며, 예를 들어, 자동화된 DNA 합성; 부위-지정 돌연변이유발; 2개 이상의 자연 발생 및/또는 합성 서열(또는 이의 2개 이상의 부분)을 결합하고, 절단된 발현 생성물의 발현을 유도하는 돌연변이의 도입; (예를 들어, 적절한 제한 효소를 사용하여 쉽게 소화 및/또는 결찰될 수 있는 카세트 및/또는 영역을 생성하기 위해) 하나 이상의 제한 부위의 도입, 및/또는 하나 이상의 "미스매치된" 프라이머를 사용한 PCR 반응에 의한 돌연변이의 도입을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 이들 및 기타 기법은 당업자에게 명백할 것이고, 본 명세서에 언급된 문헌[Sambrook et al. 및 Ausubel *et al.*]과 같은 표준 핸드북뿐만 아니라 아래의 실시예를 또한 참조한다.

[0783] 본 발명의 핵산은 또한 당업자에게 명백할 바와 같이 유전자 작제물의 형태일 수 있고/있거나 이에 존재할 수 있고/있거나 이의 일부일 수 있다. 이러한 유전자 작제물은 알려진 유전자 작제물 그 자체의 하나 이상의 요소, 예를 들어, 하나 이상의 적합한 조절 요소(예컨대, 적합한 프로모터(들), 인핸서(들), 종결자(들) 등) 및 본 명세서에 지칭된 유전자 작제물의 추가 요소에 선택적으로 연결된 본 발명의 적어도 하나의 핵산을 일반적으로 포함한다. 본 발명의 적어도 하나의 핵산을 포함하는 이러한 유전자 작제물은 또한 본 명세서에서 "본 발명의 유전자 작제물"로 지칭될 것이다.

[0784] 본 발명의 유전자 작제물은 DNA 또는 RNA일 수 있고, 바람직하게는 이중가닥 DNA이다. 본 발명의 유전자 작제물은 또한 의도된 숙주 세포 또는 숙주 유기체의 형질전환에 적합한 형태, 의도된 숙주 세포의 게놈 DNA에 통합하기에 적합한 형태 또는 의도된 숙주 유기체에서 독립적 복제, 유지 및/또는 유전에 적합한 형태일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 유전자 작제물은 벡터, 예컨대, 플라스미드, 코스미드, YAC, 바이러스 벡터 또는 트랜스포존의 형태일 수 있다. 특히, 벡터는 발현 벡터, 즉, 시험관내 및/또는 생체내에서(예를 들어, 적합한 숙주 세포, 숙주 유기체 및/또는 발현 시스템에서) 발현을 제공할 수 있는 벡터일 수 있다.

[0785] 바람직하지만, 비제한적인 실시형태에서, 본 발명의 유전자 작제물은,

[0786] a) 본 발명의 적어도 하나의 핵산(하기에 작동 가능하게 연결됨)

[0787] b) 하나 이상의 조절 요소, 예컨대, 프로모터 및 선택적으로 적합한 종결자; 및 선택적으로 또한

[0788] c) 그 자체로 알려진 유전자 작제물의 하나 이상의 추가 요소(이때 용어 "조절 요소", "프로모터", "종결자" 및 "작동 가능하게 연결된"은 (본 명세서에 추가로 기재되는 바와 같이) 당업계에서의 이들의 보통의 의미를 갖고; 유전자 작제물에 존재하는 상기 "추가 요소"는, 예를 들어, 3'- 또는 5'-UTR 서열, 리더 서열, 선택 마커, 발현 마커/리포터 유전자 및/또는 형질전환 또는 통합(의 효율)을 촉진시키거나 증가시킬 수 있는 요소일 수 있음)를 포함한다. 이러한 유전자 작제물에 대한 이들 및 다른 적합한 요소는 당업자에게 명백할 것이며, 예를 들어, 사용되는 작제물의 유형; 의도되는 숙주 세포 또는 숙주 유기체; (예를 들어, 구성적, 일시적 또는 유도성 발현을 통해) 본 발명의 관심 뉴클레오타이드 서열이 발현되는 방식; 및/또는 사용될 형질전환 기법에 따를 수 있다.

예를 들어, 항체 및 항체 단편((단일) 도메인 항체 및 ScFv 단편을 포함하지만, 이들로 제한되지 않음)의 발현 및 생산을 위한 그 자체로 알려진 조절 서열, 프로모터 및 종결자는 본질적으로 유사한 방식으로 사용될 수 있다.

[0789] 바람직하게는, 본 발명의 유전자 작제물에서, 본 발명의 상기 적어도 하나의 핵산 및 상기 조절 요소, 및 선택적으로 상기 하나 이상의 추가 요소는 서로 "작동 가능하게 연결"되어 있으며, 이는 이들이 서로 기능적 관계에 있음을 일반적으로 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 암호화 서열의 전사 및/또는 발현을 개시 또는 다르게는 제어/조절할 수 있는 경우 상기 프로모터는 암호화 서열에 "작동 가능하게 연결"된 것으로 간주된다(상기 암호화 서열은 상기 프로모터의 "제어 하"에 있다고 이해되어야 한다). 일반적으로, 2개의 뉴클레오타이드 서열이 작동 가능하게 연결되어 있을 때, 이들은 동일한 배향으로 있을 것이고 또한 일반적으로 동일한 리딩 프레임에 있을 것이다. 이들은 또한 통상 본질적으로 연속적일 것이지만, 이는 또한 필수가 아닐 수도 있다.

[0790] **5.3 숙주 및 숙주 세포**

[0791] 본 발명의 핵산 및/또는 본 발명의 유전자 작제물은 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 형질전환하기 위해, 즉, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 단백질 작제물의 발현 및/또는 생산을 위해 사용될 수 있다. 숙주는 바람직하게는 비인간 숙주이다. 적합한 숙주 또는 숙주 세포는 당업자에게 명백할 것이며, 예를 들어, 임의의 적합한 진균, 원핵 또는 진핵 세포 또는 세포주 또는 임의의 적합한 진균, 원핵 또는 진핵 유기체, 예를 들어, 그램 음성 균주, 예컨대, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*); 프로테우스(Proteus), 예를 들어 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*); 슈도모나스, 예를 들어, 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)의 균주; 및 그램 양성 균주, 예컨대, 바실러스, 예를 들어, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 브레비스(*Bacillus brevis*); 스트렙토마이세스(Streptomyces), 예를 들어, 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*); 스타필로코커스(Staphylococcus), 예를 들어, 스타필로코커스 카르노서스(*Staphylococcus carnosus*); 및 락토코커스(Lactococcus), 예를 들어, 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)의 균주를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 박테리아 균주; 트리코더마(Trichoderma), 예를 들어, 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*); 뉴로스포라(Neurospora), 예를 들어, 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 소르다리아(Sordaria), 예를 들어, 소르다리아 마크로스포라(*Sordaria macrospora*); 아스페르길루스(Aspergillus), 예를 들어, 아스페르길루스 니거(*Aspergillus niger*) 또는 아스페르길루스 소자에(*Aspergillus sojae*); 또는 다른 사상균의 종으로부터의 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 진균 세포; 사카로마이세스(Saccharomyces), 예를 들어, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*); 쉬조사카로마이세스(Schizosaccharomyces), 예를 들어, 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 피키아(Pichia), 예를 들어, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 또는 피키아 메타놀리카(*Pichia methanolica*); 한세눌라(Hansenula), 예를 들어, 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*); 클루이베로마이세스(Kluyveromyces), 예를 들어, 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*); 아르술라(Arxula), 예를 들어, 아르술라 아데니니보란스(*Arxula adeninivorans*); 야로위아(Yarrowia), 예를 들어, 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)의 종으로부터의 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 효모 세포; 양서류 세포 또는 세포주, 예컨대, 제노푸스(Xenopus) 난모세포; 곤충-유래 세포 또는 세포주, 예컨대, 스포돕테라 SF9 및 Sf21 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 인시목으로부터 유래된 세포/세포주 또는 초파리로부터 유래된 세포/세포주, 예컨대 슈나이더(Schneider) 및 Kc 세포; 식물 또는 식물 세포, 예를 들어, 담배; 및/또는 포유류 세포 또는 세포주, 예를 들어, 인간으로부터 유래된 세포 또는 세포주, CHO-세포, BHK-세포(예를 들어 BHK-21 세포) 및 인간 세포 또는 세포주, 예컨대, HeLa, COS(예를 들어 COS-7) 및 PER.C6 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 포유류로부터의 세포 또는 세포주뿐만 아니라 당업자에게 명백하게 될 항체 및 항체 단편((단일) 도메인 항체 및 ScFv 단편을 포함하지만, 이들로 제한되지 않음)의 발현 및 생성을 위한 그 자체로 알려진 모든 다른 숙주 또는 숙주 세포일 수 있다. 본 명세서에서 위에 인용된 일반적인 배경기술뿐만 아니라, 예를 들어, WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; 문헌[Frenken *et al*. 1998 (Res. Immunol. 149: 589-99); Riechmann and Muyldermans 1999 (J. Immunol. Met. 231: 25-38); van der Linden 2000 (J. Biotechnol. 80: 261-70); Joosten *et al*. 2003 (Microb. Cell Fact. 2: 1); Joosten *et al*. 2005 (Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 384-92)]; 및 본 명세서에 인용된 추가 참고문헌을 또한 참조한다.

[0792] 세포에서 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 또는 작제물의 발현을 위해, 이들은 또한, 예를 들어, WO 94/02610, WO 95/22618 및 US 7004940; WO 03/014960; 문헌[Cattaneo and Biocca 1997 (Intracellular Antibodies: Development and Applications. Landes and Springer-Verlag); 및 Kontermann 2004 (Methods 34: 163-170)]에 기재된 바와 같이, 소위 "인트라바디"로 표현될 수 있다.

[0793] 본 발명의 하나의 바람직하지만, 비제한적인 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, (융합)단백질 또는 작제물은 박테리아 세포, 특히 대규모 약제학적 생산에 적합한 박테리아 세포, 예컨대, 위에 언급된 균주의 세포에서 생산된다.

[0794] 본 발명의 다른 바람직하지만, 비제한적인 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, (융합)단백질 또는 작제물은 효모 세포, 특히 대규모 약제학적 생산에 적합한 효모 세포, 예컨대, 위에 언급된 종의 세포에서 생산된다.

[0795] 본 발명의 다른 바람직하지만, 비제한적인 실시형태에 따르면, 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, (융합)단백질 또는 작제물은 포유류 세포에서, 특히 인간 세포 또는 인간 세포주의 세포에서, 더 구체적으로는 대규모 약제학적 생산에 적합한 인간 세포 또는 인간 세포주의 세포, 예컨대, 본 명세서에서 위에 언급한 세포주에서 생산된다.

[0796] 본 발명의 숙주 또는 숙주 세포를 형질전환하기 위한 적합한 기술은 당업자에게 명백할 것이며, 의도된 숙주 세포/숙주 유기체 및 사용될 유전자 작제물에 따라 달라질 수 있다. 위에 언급된 핸드북 및 특허 출원을 다시 참조한다.

[0797] 형질전환 후, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열/유전자 작제물로 성공적으로 형질전환된 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 검출 및 선택하는 단계가 수행될 수 있다. 이것은 예를 들어 본 발명의 유전자 작제물에 존재하는 선택 가능한 마커에 기반한 선택 단계 또는 예를 들어 특정 항체를 사용하여 본 발명의 폴리펩타이드의 검출을 포함하는 단계일 수 있다.

[0798] 형질전환된 숙주 세포(형태 또는 안정한 세포주일 수 있음) 또는 숙주 유기체(안정한 돌연변이 계통 또는 균주의 형태일 수 있음)는 본 발명의 추가 양상을 형성한다.

[0799] 바람직하게는, 이들 숙주 세포 또는 숙주 유기체는 본 발명의 ISVD, 폴리펩타이드, 화합물, (융합) 단백질 또는 작제물을 (그리고 숙주 유기체의 경우: 적어도 하나의 세포, 부분, 조직 또는 기관에서) 발현하거나 (예를 들어, 적합한 조건 하에) (적어도) 발현할 수 있도록 한다. 본 발명은 또한, 예를 들어, 세포 분열 또는 유성 또는 무성 생식에 의해 얻어진 본 발명의 숙주 세포 또는 숙주 유기체의 추가 세대, 자손 및/또는 후손을 포함한다.

[0800] 따라서, 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 발명의 ISVD, 폴리펩타이드, (융합) 단백질 또는 작제물을 발현시키고 (또는 적합한 환경 하에서 발현시킬 수 있고)/시키거나, 이를 암호화하는 핵산을 함유하는 숙주 또는 숙주 세포에 관한 것이다. 이러한 숙주 또는 숙주 세포의 일부 바람직하지만 비제한적인 예는 WO 04/041867, WO 04/041865 또는 WO 09/068627에 일반적으로 기재된 바와 같을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 ISVD, 폴리펩타이드, (융합) 단백질 및 작제물은 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 균주와 같은 효모 균주에서 유리하게 발현, 생산 또는 제조될 수 있다. 또한 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 이를 포함하는 폴리펩타이드의 피치아 및 다른 숙주/숙주 세포에서의 발현/생산을 기재하는 WO 04/25591, WO 10/125187, WO 11/003622 및 WO 12/056000을 참조한다.

[0801] 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, (융합) 단백질 또는 작제물의 발현을 생산/수득하기 위해, 형질전환된 숙주 세포 또는 형질전환된 숙주 유기체는 일반적으로 본 발명의 (목적하는) ISVD, 폴리펩타이드, (융합) 단백질 또는 작제물이 발현/생산되도록 하는 조건 하에서 계속 있고, 유지 및/또는 배양될 수 있다. 적합한 조건은 당업자에게 명백할 것이고, 일반적으로 사용된 숙주 세포/숙주 유기체뿐만 아니라 본 발명의 (관련) 뉴클레오타이드 서열의 발현을 제어하는 조절 요소에 따라 달라질 것이다. 또한, 본 발명의 유전자 작제물에 대한 단락에서 위에 언급된 핸드북 및 특허 출원을 참조한다.

[0802] 일반적으로, 적합한 조건에는 적합한 배지의 사용, 적합한 식품 공급원 및/또는 적합한 영양소의 존재, 적합한 온도의 사용, 및 선택적으로 적합한 유도 인자 또는 화합물의 존재(예를 들어, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열이 유도성 프로모터의 제어하에 있는 경우)가 포함될 수 있으며; 이들 모두는 당업자에 의해 선택될 수 있다. 다시, 이러한 조건 하에서, 본 발명의 ISVD, 폴리펩타이드, (융합) 단백질 또는 작제물은 구성적 방식으로, 일시적인 방식으로, 또는 적합하게 유도될 때만 발현될 수 있다.

[0803] 또한, 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, (융합)단백질 또는 작제물은 (위에 언급된 바와 같이) (먼저) 미성숙 형태로 생성될 수 있고, 이어서 사용되는 숙주 세포/숙주 유기체에 따라 번역 후 변형될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, (융합)단백질 또는 작제물은 사용된 숙주 세포/숙주 유기체에 따라 다시 글리코실화될 수 있다.

[0804] 이어서, 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, (융합)단백질 또는 작제물은 숙주 세포/숙주 유기체 및/또는 상기 숙주 세포 또는 숙주 유기체가 배양된 배지로부터 (분취) 크로마토그래피 및/또는 전기영동 기술, 차등 침전 기술, 친화도 기술(예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드 도는 작제물과 융합된 특이적이고 절단 가능한 아미노산 서열을 사용함) 및/또는 분취 면역학적 기술(즉, 단리될 아미노산 서열에 대한 항체를 사용함)과 같은, 당업자에게 공지된 단백질 단리 및/또는 정제 기술을 사용하여 단리될 수 있다.

[0805] 폴리펩타이드 또는 단백질은 - 예를 들어, 이로부터 얻어진 천연 생물학적 공급원 및/또는 반응 배지 또는 배양 배지에 비해 - 상기 공급원 또는 배지에서 보통 관련된 적어도 하나의 다른 성분, 예컨대, 다른 단백질/폴리펩타이드, 다른 생물학적 성분 또는 거대분자 또는 적어도 하나의 오염물질, 불순물 또는 소량의 성분으로부터 분리되었을 때, "본질적으로 단리된 (형태)"인 것으로 간주된다. 특히, 폴리펩타이드 또는 단백질은 적어도 2배, 특히 적어도 10배, 더 구체적으로는 적어도 100배, 및 최대 1000배 이상 정제되었을 때 "본질적으로 단리된" 것으로 간주된다. "본질적으로 단리된 형태"인 폴리펩타이드 또는 단백질은, 적합한 기법, 예컨대, 적합한 크로마토그래피 기법, 예컨대, 폴리아크릴아마이드-겔 전기영동을 사용하여 결정된 바와 같이, 바람직하게는 본질적으로 균질하다.

[0806] ### 5.4 치료 및/또는 예방의 약제학적 조성물, 백신 및 방법

[0807] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD 화합물 또는 작제물(다중특이적 폴리펩타이드)을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 의학에서의 (의약으로서) 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD 화합물 또는 작제물 (다중특이적 폴리펩타이드) 및/또는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다. 따라서, 본 발명은 의학에서 (의약으로서) 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD 화합물 또는 작제물 (다중특이적 폴리펩타이드) 및/또는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 치료 및/또는 예방적 적용을 위한(즉, 치료 및/또는 예방적 치료 방법에서의) 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD 화합물 또는 작제물 (다중특이적 폴리펩타이드) 및/또는 약제학적 조성물의 용도에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 치료 및/또는 예방적 치료 방법에서 사용하기 위한(즉, 치료 및/또는 예방적 적용을 위한) 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD 화합물 또는 작제물(다중특이적 폴리펩타이드) 및/또는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0808] 위의 방법에서, 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 또는 작제물 및/또는 이들을 포함하는 조성물은 사용될 특정 약제학적 제형 또는 조성물에 따라서 임의의 적합한 방식으로 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 또는 작제물 및/또는 이들을 포함하는 조성물은, 예를 들어, 경구, 복강내, 정맥내, 피하, 근육내로, 또는 위장관을 둘러싸는 임의의 다른 투여 경로를 통해, 비강내, 경피, 국소, 좌약에 의해, 흡입에 의해, 또한 사용될 특정 약제학적 제형 또는 조성물에 따라 투여될 수 있다. 임상의는 예방 또는 치료될 질환 또는 장애 및 임상의에게 잘 알려진 다른 인자에 따라 적합한 투여 경로 및 이러한 투여에서 사용될 적합한 약제학적 제형 또는 조성물을 선택할 것이다.

[0809] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료제"는 과증식성 세포 장애, 예를 들어, 암 또는 이들의 하나 이상의 증상과 같은 질환 또는 장애의 예방(방지), 치료 및/또는 관리에서 사용될 수 있는 임의의 제제를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 용어 "치료제"는 본 발명의 다중특이적 폴리펩타이드를 지칭한다. 바람직하게는, 치료제는 질환 또는 장애, 또는 이들의 하나 이상의 증상의 치료, 예방 및/또는 관리에서 유용한 것으로 알려져 있거나, 이를 위해 사용되었거나 현재 사용되고 있는 제제이다.

[0810] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 본 문맥에서 "치료적 유효량"은 질환 및/또는 장애의 치료 및/또는 관리에서 치료적 이점을 제공하는 요법 단독 또는 다른 요법과 조합된 양을 지칭한다. 일 양상에서, 치료적 유효량은 질환 및/또는 장애, 또는 이들의 하나 이상의 증상을 치유하거나, 변형하거나, 안정화시키거나, 제어하는 데 충분한 요법의 양을 지칭한다. 다른 양상에서, 치료적 유효량은 질환 및/또는 장애의 증상을 감소시키는 데 충분한 요법의 양을 지칭한다. 다른 양상에서, 치료적 유효량은 질환 및/또는 장애의 확산을 지연 또는 최소화하는 데 충분한 요법의 양을 지칭한다. 본 발명의 다중특이적 폴리펩타이드의 양과 관련하여 사용될 때, 상기 용어는 전체 요법을 개선시키거나, 원치않는 효과를 감소시키거나 피하거나, 다른 요법의 치료적 효능 또는 상승효과를 향상시키는 양을 포괄할 수 있다. 일 실시형태에서, 요법의 치료적 유효량은 당업계에 알려진 또는 본 명세서에 기재된 분석에서 대조군에 비해 적어도 5%, 바람직하게는 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%로 원치않는 효과를 감소시키거나 피하거나, 다른 요법의 치료적 효능 또는 상승효과를 향상시킨다.

[0811] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "요법"은 질환 및/또는 장애 또는 이들의 증상의 치료, 방지(예방) 및/

또는 관리에서 사용될 수 있는 프로토콜, 방법 및/또는 제제를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 용어 "요법들" 및 "요법"은 질환 및/또는 장애, 또는 의료인과 같은 당업자에게 알려진 이의 하나 이상의 증상의 치료, 예방 및/또는 관리에 유용한 생물학적 요법, 지지 요법 및/또는 기타 요법을 지칭한다.

[0812] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 요법(들)을 대상체에게 투여하는 맥락에서, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 질환 또는 장애의 진행, 중증도 및/또는 지속기간의 감소 또는 개선, 및/또는 하나 이상의 요법(하나 이상의 예방 또는 치료제의 투여를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)의 투여로 인한 하나 이상의 증상의 완화를 지칭한다. 본 발명과 관련하여, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 치료적 및/또는 예방적(방지적) 치료에 관한 것일 수 있다. 용어 "예방적 치료"는 임상 병태에 대한 감수성을 감소시키는 요법을 지칭한다. 따라서, 용어 "치료하다", "치료", "치료하는" 및 이들의 동등한 용어는 인간을 포함하는 포유류에서 병리학적 병태, 질환 또는 장애의 임의의 치료를 아우르는 목적하는 약리학적 또는 생리적 효과를 얻는 것을 지칭한다. 상기 효과는 병리학적 병태, 질환 또는 장애 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 방지한다는 측면에서 예방적일 수 있고/있거나, 병리학적 병태, 질환 또는 장애 및/또는 병리학적 병태, 질환 또는 장애에 기인하는 유해 작용에 대한 부분 또는 완전 치유 측면에서 치료적일 수 있다. 즉, "치료"는 (1) 대상체에서 병리학적 병태, 질환 또는 장애가 발생 또는 재발하는 것을 방지하는 것, (2) 병리학적 병태, 질환 또는 장애를 저해하는 것, 예컨대, 이의 발생을 저지하는 것, (3) 숙주가 더 이상 병리학적 병태, 질환 또는 장애 또는 이의 증상의 퇴행을 야기하는 것과 같이 병리학적 병태, 질환 또는 장애 또는 이의 증상을 앓지 않도록, 병리학적 병태, 질환 또는 장애 또는 적어도, 이와 관련된 증상을 중단 또는 종결시키는 것, 또는 (4) 병리학적 병태, 질환 또는 장애, 또는 이와 관련된 증상을 경감, 완화 또는 개선시키는 것을 포함하며, 여기서 개선시키는 것은 염증, 통증 또는 면역 결핍증과 같은 매개변수 규모의 적어도 감소를 지칭하기 위해 넓은 의미로 사용된다.

[0813] 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 또는 작제물 및 이들을 포함하는 조성물은 예방 또는 치료될 질환 및/또는 장애를 예방 및/또는 치료하는 데 적합한 치료 요법에 따라 투여된다. 임상의는 일반적으로 치료될 질환 및/또는 장애의 병기, 치료될 질환 및/또는 장애의 중증도 및/또는 이의 증상의 중증도, 사용될 본 발명의 특정 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 또는 작제물, 특정 투여 경로 및 사용될 약제학적 제형 또는 조성물, 환자의 연령, 성별, 체중, 식이요법, 일반적 상태, 및 임상의에게 잘 알려진 유사한 인자와 같은 인자에 따라서 적합한 치료 요법을 결정할 것이다.

[0814] 일반적으로, 치료 요법은 1회 이상의 약제학적으로 유효한 양 또는 용량으로 본 발명의 하나 이상의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 또는 작제물, 또는 이들을 포함하는 하나 이상의 조성물의 투여를 포함할 것이다. 투여될 구체적인 양(들) 또는 용량은 또한 위에 인용된 인자에 기반하여 임상의에 의해 결정될 수 있다.

[0815] 보통, 위의 방법에서, 본 발명의 단일 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 또는 작제물이 사용될 것이다. 그러나, 본 발명의 둘 이상의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 및/또는 작제물을 조합하여 사용하는 것은 본 발명의 범위 내이다.

[0816] 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 또는 작제물은 또한 하나 이상의 추가 약제학적 활성 화합물 또는 원리와 조합하여, 즉, 상승 효과를 유발할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있는 병용 요법으로서 사용될 수 있다. 또한, 임상의는 위에 인용된 인자 및 전문가의 판단에 따라 적절한 조합 치료 요법뿐만 아니라 이러한 추가 화합물 또는 원리를 선택할 수 있다.

[0817] 특히, 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD, 화합물 또는 작제물은 본 명세서에 인용된 질환 및/또는 장애의 예방 및/또는 치료를 위해 사용되거나 사용될 수 있는 다른 약제학적 활성 화합물 또는 원리와 함께 사용될 수 있으며, 그 결과 상승 효과를 얻을 수도 있고 얻지 못할 수도 있다. 이러한 화합물 및 원리의 예뿐만 아니라 이들을 투여하기 위한 경로, 방법 및 약제학적 제형 또는 조성물은 임상의에게 명백할 것이다.

[0818] 2개 이상의 물질 또는 원리가 조합 요법의 일부로 사용될 때, 이들은 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로를 통해, 본질적으로 동시에 또는 상이한 시간에(예를 들어, 본질적으로 동시에, 연속적으로 또는 교대 요법에 따라) 투여될 수 있다. 물질 또는 원리가 동일한 투여 경로를 통해 동시에 투여될 때, 당업자에게 명백한 바와 같이 이들은 상이한 약제학적 제형 또는 조성물 또는 조합된 약제학적 제형 또는 조성물의 일부로서 투여될 수 있다.

[0819] 일 양상에서, 본 개시내용은 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩타이드, 화합물 및/또는 작제물을 포함하는 이의 폴리펩타이드 작제물의 투여 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩타이드, 화합물 및/또는 작제물은 약제학적 조성물로서 투

여된다. 약제학적 조성물은, 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 이의 폴리펩타이드 작제물에 추가로, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

[0820] 본 발명의 화합물 또는 폴리펩타이드는 증가된 반감기를 갖기 때문에, 이들은 순환계에 투여된다. 이렇게 해서, 이들은 본 발명의 화합물 또는 폴리펩타이드가 순환계에, 예컨대, 정맥내로, 주사 또는 주입을 통해, 또는 임의의 다른 적합한 방식으로(경구 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 피부를 통한 투여, 비강내 투여, 폐를 통한 투여 등을 포함함) 들어가게 하는 임의의 적합한 방식으로 투여될 수 있다. 적합한 투여 방법 및 경로는 당업자에게, 또한, 예를 들어, Ablynx N.V의 공개된 특허 출원, 예를 들어, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 또는 WO 2009/068627의 교시로부터 명백하게 될 것이다.

[0821] 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은 본 명세서에서, 합리적인 유해/유익비에 상응하는, 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하는 데 적합한, 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭하기 위해 사용된다.

[0822] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 어구 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 신체의 하나의 기관 또는 부분으로부터 신체의 또 다른 기관 또는 부분으로 대상 화합물을 운반 또는 수송하는 데 관여하는, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 또는 용매 캡슐화 물질과 같은 약제학적으로 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다. 각각의 담체는 제형의 다른 성분과 혼용될 수 있고 환자에게 해롭지 않다는 의미에서 "허용가능"해야 한다.

[0823] 이러한 제형 또는 조성물을 제조하는 방법은 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩타이드 작제물을 담체 및 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩타이드 작제물을 액체 담체 또는 미세하게 분할된 고체 담체, 또는 둘 다와 균일하고 밀접하게 결합시킨 다음, 필요한 경우 생성물을 성형하여 제조된다.

[0824] 본 발명은 백신으로서 또는 면역원성 조성물로서 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD 화합물 또는 작제물(다중특이적 폴리펩타이드) 및/또는 약제학적 조성물을 추가로 제공한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩타이드, ISVD 화합물 또는 작제물(다중특이적 폴리펩타이드) 및/또는 약제학적 조성물을 포함하는 백신을 추가로 제공한다.

[0825] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "백신"은 면역 기억을 포함하는 적응 면역 반응을 유도함으로써 특정 질환에 대한 면역을 확립하거나 개선시키는 물질 또는 조성물, 즉, 대상체에게 유효량으로 투여될 때, 보호 항체 또는 보호 T-세포 반응의 생산을 자극하는 물질 또는 조성물을 지칭한다. 백신은 예방제 또는 치료제일 수 있다. 일 양상에서, 본 발명의 백신은 예방제 백신이다.

[0826] 본 발명의 백신은 "아쥬반트"를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "아쥬반트"는 면역원성 제제에 첨가될 때, 혼합물에 노출 시 수용 숙주에서 제제에 대한 면역 반응을 비특이적으로 향상시키거나 강력하게 하는 물질을 지칭한단.

[0827] 도면, 서열목록 및 실험 부분/실시예는 단지 본 발명을 추가로 설명하기 위해 제공되며, 본 명세서에서 달리 명확하게 표시되지 않는 한, 본 발명 및/또는 첨부되는 청구범위의 범위를 제한하는 것으로 이해되거나 해석되어서는 안 된다.

[0828] 본 명세서에서 예시되고 논의된 실시형태는 발명자들에게 알려져 있는 최선의 방법을 단지 당업자에게 발명을 만들고 이용하도록 교시하고자 한 것이다. 위의 교시 내용을 고려하여 당업자가 인식하는 바와 같이, 본 발명의 위에서 기술된 구현예의 변경 및 변형은 본 발명을 벗어나지 않고도 가능하다. 따라서, 청구범위 및 그들의 균등물의 범위 내에서, 달리 구체적으로 기술되지 않더라도 본 발명이 실시될 수 있음이 이해된다.

[0829] 본 발명을 이제 다음의 비 제한적인 바람직한 양태, 실시예 및 도면에 의해 추가로 설명한다.

[0830] 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌(문헌 참고, 공고 특허, 공개 특허 출원, 및 동시계류 중인 특허 출원 포함)의 전체 내용은 특히 위에서 참조된 교시 내용에 대해 본 명세서에 명백하게 참조로 포함된다.

[0831] ## 6. 실시예

[0832] ### 6.1 실시예 1: 파지 디스플레이를 통한 FcRn-특이적 ISVD의 선택

[0833] FcRn 결합 ISVD 클론을 합성 라이브러리로부터 확인하였다. 합성 ISVD 라이브러리에서, ISVD 서열의 CDR에 서열 다양성(길이와 아미노산 조성 둘 다)을 도입하였다. DNA 라이브러리를 pAX319 벡터에 클로닝하였다. pAX319는 상업적으로 입수 가능한 플라스미드 벡터 pUC119로부터 유래된 발현 벡터이다. ISVD 단백질 암호화 서열과

함께, 벡터는 *C*-말단의 FLAG3-태그 및 His_6-태그에 대해 암호화한다. pAX319는 pIII 단백질과의 융합 단백질로서 개개 ISVD 단백질을 나타내는 파지 입자의 생산을 가능하게 하였다. 표준 프로토콜에 따라 파지를 제조하였고(예를 들어, 본 명세서에 인용된 Ablynx N.V.에 의한 선행기술 및 출원), 추가 사용을 위해 4℃에서 멸균 여과 후에 저장하였다. 선택 라운드를 번갈아가며, 재조합 바이오티닐화된 인간 FcRn/b2M(hFcRn; Immunitrack ITF01 or ACRO FCM-H82W4) 및 cyno FcRn/b2M(cFcRn; Immunitrack ITF05 또는 ACRO FCM-C82W5)를 사용하여, 라이브러리를 이용하였다. 라이브러리 파지 입자를 1 μM 인간 b2M(Sino Biologicals 11976-H08H)의 존재하에, 5 μM 인간 혈청 알부민(HSA; Albumin Bioscience 9803)의 존재 또는 부재하에 2시간 동안 0.05 nM 내지 50 nM 바이오티닐화된 hFcRn 또는 cFcRn과 함께 인큐베이션시켰고, 후속적으로 스트렙타비딘 또는 - 뉴트라비딘 코팅 자기 비드 또는 뉴트라비딘 코팅 플레이트 상에서 포획하였다. 비결합 파지를 CPA pH 5.5 또는 PBS pH 6.0 완충제(비드를 사용할 때 0.05% Tween-20으로 보충)로 세척하였고, 5 또는 15분 동안 트립신(PBS 중 1 mg/mℓ), CPA pH 7.4 또는 PBS pH 7.4 완충제의 첨가에 의해 결합된 파지를 용리시켰다. 0.8 mM 프로테아제 저해제 AEBSF의 최종 농도를 첨가함으로써 트립신 프로테아제 활성을 즉시 중화시켰다. 대조군으로서, 항원이 없는 선택을 병행하여 수행하였다. 파지 구제(rescue)를 위해 기하급수적으로 성장하는 이콜라이(*E. coli*) TG-1 세포를 감염시키기 위해 용리된 파지를 사용하였다. 선택된 산출물로부터 제조한 파지를 후속 선택 라운드에서 입력물로 사용하였다. 선별을 위해 상이한 선택 조건으로부터의 클론을 96-웰 마스터 플레이트에 개별적으로 선택하였다. 표준 프로토콜에 따라 주변 세포질 추출물을 제조하였다(예를 들어, WO 03/035694, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551 및 본 명세서에 인용된 Ablynx N.V.에 의해 출원된 다른 선행 기술 및 출원).

[0834] ## 6.2 실시예 2: 선별 및 서열 분석

[0835] ### 6.2.1 실시예 2.1. ELISA에서 인간 FcRn/b2M에 대한 결합

[0836] ELISA에서 인간 FcRn/b2M에 대한 결합을 CPA pH 5.5, PBS pH 6.0 또는 PBS pH 7.4에서 수행하였다(0.05% Tween20 및 0.1% 카세인을 보충함). 이를 위해, 높은-결합 384 웰 스펙트라플레이트(Spectraplate)(Perkin Elmer)를 밤새 4℃에서 2 ㎍/mℓ 뉴트라비딘으로 코팅하였고, 다음 날 RT에서 적어도 1시간 동안 차단 완충제(PBS + 1% 카세인) 중에서 차단시켰다. 바이오티닐화된 FcRn/b2M(20 nM; 인간: ACRO(FCM-H82W4))을 1시간 동안 실온(RT)에서 포획하였다. $Flag_3$-His_6 태그가 있는 ISVD를 함유하는 주변 세포질 추출물을 0.05% Tween20 + 0.1% 카세인을 보충한 분석 완충제에서 1:10 또는 1:50로 희석시켰고, RT에서 1 내지 2시간 동안 코팅 웰 상에서 인큐베이션시켰다. 비결합 ISVD를 세척하였고, 색원체 기질 esTMB(SDT 시약)의 전환을 촉매하는 마우스 항-FLAG-HRP(Sigma; 카탈로그 번호 A8592)를 사용하여 결합된 ISVD를 검출하였다. Tecan Infinite M1000 또는 Clariostar - BMG 상에서 450/620 nm에서의 흡광도를 판독하였다(데이터 미제시). 산성 pH에서 인간 FcRn에 대한 결합을 나타낸 ISVD 클론을 Sanger 서열분석을 이용하는 통상적으로 알려진 절차(Pardon *et al.*, 2014)에 따라 서열분석하였다.

[0837] ### 6.2.2 실시예 2.2. 표면 플라스몬 공명(SPR)을 통한 오프 속도 결정

[0838] 서열분석 후에, 독특한 서열을 재배열하였고, 새로운 주변 세포질 추출물을 생성하였다. 200 ㎕ Phytips(Phynexus)를 사용하여 IMAC에 의해 $FLAG_3$-His_6-태그된 ISVD 단백질을 정제하였다.

[0839] ProteOn XPR36(BioRad Laboratories, Inc.), MASS-2(Sierra sensors, Gmbh) 또는 SPR-32(Bruker Corporation) 상에서 모든 동력학 측정을 수행하였다. ProteOn NLC 센서(BioRad Laboratories, 1765021) 또는 MASS-2 바이오틴-태그 포획(Bruker Corporation, 1862620) 칩 상에서 오프 속도 측정을 위해, 바이오티닐화된 hFcRn/hb2M 또는 cFcRn/cb2M을 포획하였다. phytip 정제된 주변 세포질 추출물을 실행 완충제(pH 5.5, pH 6.0 또는 pH 7.4에서 CPA + 150 mM NaCl + 0.005% Tw20) 중에서 1:10으로 희석시켰고, 리간드 표면(결합: 45 ㎕/분으로 120 s; 해리: 45 ㎕/분으로 600s 내지 3600 s)을 거쳐서 주사하였다. 25℃에서 실험을 수행하였다. pH 7.4에서 검출 가능한 오프 속도를 나타내지 않거나, pH 7.4 내지 pH 5.5 또는 pH 6.0의 오프 속도에서 적어도 10배 차이를 나타낸 ISVD 클론을 정제를 위해 선택하였다. 클론의 선택에 대해 얻은 오프-속도를 표 1에 나타낸다.

표 1

pH 5.5 및 pH 7.4에서 인간 및 cyno FcRn에 대한 ISVD 클론의 오프 속도

ISVD 명칭	kd (1/s) cyno FcRn			kd (1/s) 인간 FcRn		
	pH 5.5	pH 7.4	pH 7.4/5.5	pH 5.5	pH 7.4	pH 7.4/5.5
T0263002A04	7,7E-04	4,4E-02	58	5,0E-04	3,2E-02	64
T0263002A06	1,3E-03			1,6E-03		
T0263002C10	3,8E-03			8,9E-04		
T0263002D03	1,8E-03	*8,4E-02*	47	1,5E-03	6,7E-02	44
T0263002D09	3,5E-03	*3,6E-02*	10	1,6E-03	*1,8E-02*	11
T0263002F08	9,4E-05			5,1E-05		
T0263002F11	3,5E-04	2,9E-02	82	1,7E-04	2,2E-02	129
T0263002G09	3,4E-03			6,9E-04		
T0263002G10	2,5E-03			1,3E-03	2,6E-02	20
T0263004A11	1,6E-02			1,5E-02		
T0263004F02	2,3E-02			2,2E-02		
T0263005A09	2,8E-04			1,7E-04		
T0263005A12	2,6E-04			2,6E-04		
T0263005C03	7,6E-03			7,5E-03		
T0263005C12	*9,0E-03*			1,1E-02		
T0263005D10	4,5E-04	1,1E-02	25	3,1E-04	5,4E-03	17
T0263005E05	*4,7E-03*			*4,9E-03*		
T0263005E06	2,9E-04	2,7E-02	94	1,6E-04	1,7E-02	102
T0263005E10	2,5E-03	*2,9E-02*	11	4,0E-03		
T0263005F02	6,0E-03			2,9E-03		

[0840]

T0263005F06	3,6E-03			2,9E-03		
T0263005G02	2,8E-04			2,8E-04		
T0263008E03	3,2E-03	*4,3E-02*	14	*1,9E-03*	*1,6E-02*	8
T0263010G05	1,5E-02			2,6E-02		
T0263011A09	7,5E-03			7,3E-03		
T0263011C12	5,0E-03			5,6E-03		
T0263012A07	8,9E-04			1,0E-03		
T0263012F05	4,4E-04			*4,1E-04*		
T0263017A07	2,0E-03			1,4E-03		
T0263017C01	7,7E-03			1,1E-02		
T0263017E07	1,3E-04			1,6E-04		
T0263017F08	1,2E-03			1,1E-03		
T0263017G03	1,9E-04	6,0E-03	32	4,9E-05	1,6E-03	33
T0263018A08	3,6E-04			3,2E-04		
T0263018B11	3,3E-04	6,5E-02	198	5,0E-04	8,9E-02	177
T0263018F03	*2,0E-03*	*4,8E-02*	24	*1,1E-03*	2,5E-02	22

[0841] 빈 세포: 검출된 오프 속도 없음; *이탤릭체 및 밑줄 표시* : 표시 값

[0842] 6.3 실시예 3: ISVD 생산, 정제 및 특성규명

[0843] pH 7.4 대 pH 5.5 또는 6.0에서 $k_d(1^{-s})$의 10배 초과의 차이에 대해 선별에 의해 얻은 pH 의존적 결합을 갖는 ISVD(또한 pH 5.5 또는 6.0에서 특이적 결합을 나타내지만 pH 7.4에서 검출 가능한 오프 속도를 갖지 않는 ISVD를 유지하는 것을 포함함)를 발현시켰고, 무태그 단백질로서 정제하였다. 이들의 최적의 pH-의존적 FcRn 결합 특징(pH 5.5 또는 6.0 내지 7.4 사이의 가장 큰 오프 속도 차이 및 pH 5.5 또는 6.0에서의 가장 큰 친화도)에 기반하여 제한된 수의 ISVD를 최적으로 발현되고 중간 내지 대규모로 생산되는 이들의 능력과 조합하여 최종적으로 추가로 선택하였다. ISVD의 선택을 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 cyno FcRn에 대한 친화도 결정에 의해 특성규명하였다. 추가로, 이러한 결합제를 이들의 가능한 FcRn 에피토프에 기반하여 그룹화하고(데이터 미제시), 산성 pH에서 세포-발현 FcRn에 대한 결합을 확인하기 위해 HSA 경쟁 FACS에서 특성규명하였다.

[0844] 6.3.1 실시예 3.1 ISVD 발현 작제물 및 단백질 발현의 생성

[0845] 각각 독특한 제한 부위를 지니는 정방향 FR1 및 역방향 FR4 프라이머의 특정 조합을 이용하는 PCR에 의해 얻은 ISVD-함유 DNA 단편을 적절한 제한 효소로 분해하고, (아래에 기재하는 바와 같이) ISVD 발현 벡터의 매칭 클로닝 카세트에 결찰시켰다. 이어서, 결찰 혼합물을 사용하여 전기천공적격(electrocompetent) 또는 화학적 적격 에스케리키아 콜라이 TG1(Lucigen, 각각 카탈로그 번호 60502 또는 주문 제작) 또는 TOP10(ThermoFisher Scientific, 각각 카탈로그 번호 C404052 또는 C4081201) 세포를 형질전환하였고, 이를 적절한 항생제 선택 압력(카나마이신 또는 제오신) 하에 성장시켰다. 플라스미드 DNA의 Sanger 서열분석(LGC Genomics)에 의해 내성 클론을 확인하였다.

[0846] 이콜라이 TG1 세포(Lucigen, 카탈로그 번호 60502)에서 1가 ISVD를 발현시켰다. 또한 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 이를 포함하는 폴리펩타이드의 이콜라이 및 다른 숙주/숙주 세포에서의 발현/생산을 기재하는 WO 04/25591, WO 10/125187, WO 11/003622, 및 WO 12/056000을 참조한다.

[0847] 다가 ISVD 작제물을 피치아 파스토리스에서 발현시켰다. 효모 발현 벡터는 AOX1 프로모터 및 종결자, 제오신에 대한 내성 유전자, 및 사카로마이세스 세레비시애 α-교배 인자 신호 펩타이드에 대한 암호화 정보를 포함한다. ISVD 빌딩블록을 GS 링커와 결합하고, Golden Gate 클로닝을 통해 발현 벡터에서 클로닝하였다(Engler C, Marillonnet S. Golden Gate cloning. Methods Mol Biol. 2014; 1116:119-31). 발현 벡터는 하나 또는 다수의 벡터에 포함된 GS 링커와 함께 PCR 증폭 1가 ISVD를 클로닝하기 위한 2개의 BpiI 제한 부위를 함유한다. 이러한 모든 요소는 BpiI 부위에 측접된다. 클로닝 카세트의 각 위치에 대한 고유한 뉴클레오타이드 돌출부의 사용은 사전 정의된 순서로 원활한 결찰을 가능하게 한다. Sanger 서열 확인 후, 이콜라이 TOP10에서 유래된 플라스미드 DNA를 선형화하고, 전기천공을 통해 사내 제조 초적격 피치아 파스토리스, 균주 NRRL Y-11430(ATCC 76273)으로 형질전환시켰다.

[0848] 6.3.2 실시예 3.2 ISVD 정제

[0849] 당업계에 알려진 방법에 의해 His_6-태그된 ISVD를 정제하였고, 당업계에 알려진 바와 같은 단백질 A 크로마토그래피에 의해 무태그 ISVD를 정제하였고, OD280/OD340 측정을 통해 농도를 결정하였다. 품질 관리는 SDS-PAGE 및 질량 분광법으로 수행하였다.

[0850] 6.3.3 실시예 3.3 1가 및 2가 ISVD의 표면 플라스몬 공명(SPR)을 통한 친화도 결정

[0851] 선택된 ISVD를 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 FcRn에 대한 친화도 결정에 의해 특성규명하였다.

[0852] 1가 정제된, 무태그 ISVD의 친화도를 ProteOn XPR36(BioRad Laboratories, Inc.), MASS-2(Sierra sensors, Gmbh) 또는 SPR-32(Bruker Corporation) 기기 상에서 인간 FcRn에 대해 결정하였다. 동일한 방법으로, 정제된, 무태그 ISVD의 동일한 1가 빌딩블록 중 둘을 포함하는 2가 ISVD 작제물의 친화도를 ProteOn XPR36(BioRad Laboratories, Inc.), MASS-2(Sierra sensors, Gmbh) 또는 SPR-32(Bruker Corporation) 기기 상에서 인간 FcRn에 대해 결정하였다. 친화도 측정을 위해, 대략 1000 내지 3000RU(hFcRn/hb2M; ACRO Biosystems FCM-H82W4)를 ProteOn NLC 센서(ProteOn) 또는 바이오틴-태그 포획 칩 또는 고용량 아민 칩(뉴트라비딘에 의해 사전 고정됨; MASS-2) 상에서 포획하였다. ISVD를 6개의 상이한 농도(1 내지 4000nM)로 주사하였고, 120s 동안 45 ㎕/분으로 결합시키고, 600 s 내지 3600 s 동안 45 ㎕/분으로 해리시켰다. pH 7.4에서의 보다 낮은 결합으로 인해 pH 5.5 또는 6.0과 비교되는 pH 7.4에서의 친화도를 결정하기 위해 보다 높은 ISVD 농도를 사용하였다. 센서그램의 평가는 온 속도 및 오프 속도를 동시에 적합화는 1:1 Langmuir 해리 모델에 기반하였다. 일부 선택된 ISVD

의 경우, pH 6.0 및 pH 7.4에서의 인간 FcRn에 대한 친화도를 표 2에 나타낸다.

표 2

pH 6.0 및 pH 7.4에서의 인간 FcRn에 대한 1가 및 2가 ISVD의 친화도

ISVD 명칭	형식	K_D (M) 인간 FcRn		
		pH 6.0	pH 7.4	pH 7.4/6.0
T0263002A06	1가	2.5E-08	1.6E-06	62
	2가	2.1E-08	1.1E-06	50
T0263002F11	1가	7.9E-10	4.7E-08	60
	2가	1.5E-09	9.6E-08	66
T0263018B11	1가	8.3E-09	5.4E-07	65
	2가	1.9E-08	1.0E-06	54
T0263012A07	1가	3.3E-08	1.1E-05	323
	2가	7.9E-08	3.8E-06	48
T0263018A08	1가	2.5E-08	4.9E-06	198

[0853]

[0854] **6.4 실시예 4: T0263018B11의 조작**

[0855] ELISA를 PBS 중에서 pH 6.0(주변 세포질 추출물의 희석은 1:1000임) 및 pH 7.4(주변 세포질 추출물의 희석은 1:10임)에서 실시예 2.1에 기재한 바와 같이 수행하였다. 선별 및 서열분석 후에, phytip 정제된 주변 세포질 추출물을 206개의 독특한 클론(FLAG3-His6 태그를 포함)에 대해 생산하였고, pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 cyno FcRn 상의 이들 클론의 오프 속도를 실시예 2.2에 기재한 바와 같이 결정하였다(표 3 참조). 모체 T0263018B11에 비교하여 pH 7.4 대 pH 6.0에서 kd의 더 큰 배수 차이를 갖는 16개의 치환을 무태그 ISVD 단백질로서 서브클로닝 및 정제를 위해 선택하였고(실시예 3.1 및 3.2에 기재한 바와 같음), 친화도 결정에 의해 특성규명하였다(표 4 참조).

표 3

pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 cyno FcRn에 대한 TO263018B11 단일 치환 변이체의 오프 속도

치환 (Kabat)	인간 FcRn			cynoFcRn		
	pH 6.0	pH 7.4	pH 7.4/6.0	pH 6.0	pH 7.4	pH 7.4/6.0
	k_d (s^{-1})	k_d (s^{-1})	비	k_d (s^{-1})	k_d (s^{-1})	비
모체	**8.8E-04**	**2.8E-02**	**32**	**6.5E-04**	**2.5E-02**	**38**
G26D	1.2E-03	6.3E-02	53	9.5E-04	5.8E-02	61
G26E	9.5E-04	4.2E-02	44	8.1E-04	5.0E-02	62
G26F	7.8E-04	3.1E-02	40	6.6E-04	3.6E-02	55
G26L	1.0E-03	4.1E-02	41	8.7E-04	5.4E-02	62
G26S	9.1E-04	4.7E-02	52	7.9E-04	5.3E-02	67
G26T	1.8E-03	1.3E-01	72	1.5E-03	1.8E-01	120
G26Y	6.5E-04	2.7E-02	42	5.5E-04	2.8E-02	51
G26A	6.8E-04	3.7E-02	55	2.4E-04	2.8E-02	116
G26H	5.5E-04	3.4E-02	62	1.6E-04	2.6E-02	159
G26K	6.1E-04	3.4E-02	55	2.5E-04	2.5E-02	101
G26M	6.3E-04	3.3E-02	52	7.1E-05	2.5E-02	349
G26N	8.1E-04	4.2E-02	53	3.7E-04	3.2E-02	86
G26Q	6.5E-04	3.4E-02	53	1.3E-05	2.6E-02	2008
G26W	5.0E-04	2.7E-02	55	ND	ND	ND
F27L	1.3E-03	5.0E-02	38	1.0E-03	4.8E-02	48
F27V	1.9E-03	9.6E-02	51	1.3E-03	7.7E-02	59
F27I	1.0E-03	4.5E-02	45	3.6E-04	3.1E-02	85
F27M	8.3E-04	3.9E-02	47	4.0E-04	2.8E-02	69
F27Y	1.2E-03	5.4E-02	45	4.2E-04	3.9E-02	93
T28E	2.8E-03	1.4E-01	50	1.9E-03	1.3E-01	68
T28L	1.8E-03	7.3E-02	41	1.3E-03	6.2E-02	48
T28P	1.5E-03	3.9E-02	26	1.2E-03	3.3E-02	28
T28A	1.0E-03	4.6E-02	44	5.2E-04	3.3E-02	65
T28G	7.5E-04	3.8E-02	51	2.0E-04	2.8E-02	138
T28I	1.1E-03	4.9E-02	46	4.4E-04	3.3E-02	75
T28M	7.2E-04	3.3E-02	47	3.7E-04	2.4E-02	64
T28N	1.9E-03	9.7E-02	51	9.0E-04	6.9E-02	77

[0856]

T28S	6.1E-04	3.0E-02	48	2.5E-04	2.1E-02	85
T28W	4.1E-04	2.4E-02	59	1.7E-04	1.4E-02	80
T28Y	1.2E-03	7.1E-02	59	5.3E-04	4.2E-02	79
T28V	3.2E-03	1.2E-01	38	2.2E-03	9.2E-02	42
F29D	3.6E-03	1.4E-01	39	2.8E-03	1.5E-01	54
F29G	3.3E-03	1.5E-01	45	2.5E-03	1.4E-01	56
F29H	3.9E-03	1.4E-01	36	3.1E-03	1.3E-01	42
F29I	2.0E-03	1.0E-01	50	1.5E-03	8.3E-02	55
F29L	2.3E-03	1.2E-01	52	1.7E-03	1.1E-01	65
F29P	2.6E-03	1.1E-01	42	1.9E-03	1.1E-01	58
F29Q	2.1E-03	9.3E-02	44	1.7E-03	8.8E-02	52
F29S	1.6E-03	6.6E-02	41	1.3E-03	5.9E-02	45
F29T	2.1E-03	1.0E-01	48	1.6E-03	8.6E-02	54
F29V	2.1E-03	8.9E-02	42	1.6E-03	8.6E-02	54
F29Y	1.5E-03	6.0E-02	40	1.2E-03	5.4E-02	45
S30D	3.2E-03	1.3E-01	41	2.6E-03	1.7E-01	65
S30E	1.9E-03	7.1E-02	37	1.6E-03	7.3E-02	46
S30T	1.6E-03	5.9E-02	37	1.4E-03	6.2E-02	44
S30G	6.6E-04	2.5E-02	38	5.4E-04	1.9E-02	35
S30K	7.8E-03	6.9E-02	9	3.0E-03	5.5E-02	18
S30M	7.4E-04	3.1E-02	42	6.9E-04	2.2E-02	32
S30N	1.9E-03	8.2E-02	42	1.3E-03	6.1E-02	46
S30P	6.1E-04	2.5E-02	40	4.3E-04	1.8E-02	41
S30Q	8.5E-04	3.5E-02	42	5.5E-04	2.6E-02	47
S31E	1.5E-03	1.0E-01	67	1.2E-03	1.0E-01	83
S31G	1.4E-03	6.7E-02	48	1.1E-03	6.4E-02	58
S31K	1.3E-03	4.8E-02	37	1.1E-03	4.4E-02	40
S31P	8.8E-04	4.3E-02	49	7.3E-04	4.3E-02	59
S31A	4.1E-04	2.0E-02	47	2.3E-04	1.4E-02	61
S31N	3.4E-03	1.7E-01	50	1.8E-03	1.2E-01	69
S31Q	3.8E-04	1.7E-02	43	1.6E-04	1.3E-02	79
S31T	5.2E-04	2.4E-02	46	3.0E-04	1.8E-02	60
S31V	2.9E-04	1.3E-02	47	1.1E-04	9.5E-03	89
Y32A	2.7E-03	1.3E-01	48	2.3E-03	1.6E-01	70
Y32T	4.5E-03	1.9E-01	42	3.5E-03	2.1E-01	60
Y32F	6.6E-04	2.6E-02	39	4.2E-04	1.9E-02	46
Y32L	1.3E-02	6.1E-01	49	8.4E-03	3.9E-01	46

[0857]

Y32M	6.0E-03	2.3E-01	39	2.5E-03	1.8E-01	72
Y32N	2.5E-03	1.1E-01	42	1.8E-03	8.3E-02	47
Y32Q	2.3E-03	1.4E-01	60	1.3E-03	9.9E-02	75
Y32S	5.4E-03	1.9E-01	35	2.8E-03	1.4E-01	52
Y32V	4.0E-03	4.8E-02	12	2.2E-03	1.3E-01	60
A33D	1.4E-03	1.8E-01	129	1.8E-03	3.4E-01	189
A33E	3.2E-03	1.9E-01	59	5.1E-03	5.0E-01	98
A33G	1.3E-03	3.4E-02	26	1.1E-03	4.0E-02	36
A33P	1.0E-03	4.1E-02	41	9.9E-04	4.5E-02	45
A33Q	1.8E-03	6.5E-02	36	2.7E-03	1.3E-01	48
A33S	1.5E-03	5.9E-02	39	1.3E-03	6.5E-02	50
A33H	7.6E-04	3.1E-02	41	7.7E-04	3.7E-02	48
A33M	2.3E-03	1.1E-01	48	2.1E-03	1.5E-01	71
A33N	1.6E-03	6.5E-02	40	1.6E-03	7.7E-02	49
A33T	1.1E-04	3.8E-03	36	1.1E-04	5.8E-03	54
A33V	2.2E-04	8.2E-03	37	2.4E-04	1.3E-02	53
Y35F	4.3E-03	1.4E-01	33	3.5E-03	1.6E-01	46
S52A	1.1E-03	3.1E-02	28	9.8E-04	3.6E-02	37
S52G	3.9E-04	1.2E-02	32	4.0E-04	1.1E-02	27
S52H	3.2E-03	1.5E-01	46	2.2E-03	1.1E-01	48
S52Q	6.7E-03	1.5E-01	22	5.5E-03	1.4E-01	26
S52R	2.3E-02	4.4E-01	20	1.6E-02	3.8E-01	24
S52T	1.9E-03	4.5E-02	24	1.7E-03	4.2E-02	25
S52V	2.4E-03	5.8E-02	24	2.5E-03	6.4E-02	25
S52aD	1.0E-03	4.4E-02	44	8.9E-04	5.1E-02	57
S52aE	8.7E-04	3.6E-02	41	7.7E-04	3.9E-02	51
S52aK	5.2E-03	3.9E-01	75	3.5E-03	3.9E-01	111
S52aQ	1.5E-03	7.0E-02	47	1.1E-03	6.8E-02	62
S52aT	1.6E-03	6.2E-02	39	1.2E-03	5.9E-02	49
S52aV	2.7E-03	8.1E-02	30	2.1E-03	9.5E-02	45
S52aA	6.8E-04	2.9E-02	43	4.3E-04	2.2E-02	51
S52aG	8.8E-04	3.4E-02	39	6.0E-04	3.1E-02	51
S52aM	4.8E-04	1.8E-02	36	2.7E-04	1.3E-02	48
S52aN	1.2E-03	6.3E-02	51	7.9E-04	4.7E-02	60
S52aP	5.4E-04	2.9E-02	53	3.0E-04	2.1E-02	71
S52aR	2.3E-03	1.3E-01	56	1.5E-03	9.1E-02	61
S52aW	1.5E-03	6.2E-02	41	8.0E-04	4.3E-02	54

[0858]

S52aY	8.3E-04	3.5E-02	42	5.2E-04	2.3E-02	44
S52D	4.4E-03	1.4E-01	32	3.1E-03	1.9E-01	61
S52E	2.6E-03	4.2E-02	16	2.3E-03	4.7E-02	20
S52P	1.1E-03	3.0E-02	27	1.3E-03	4.8E-02	37
G53E	1.5E-03	5.7E-02	38	1.1E-03	5.5E-02	50
G53P	1.1E-03	3.1E-02	28	9.5E-04	3.2E-02	34
G54D	2.2E-03	6.2E-02	28	2.2E-03	9.0E-02	41
G54E	1.6E-03	4.6E-02	29	1.6E-03	6.2E-02	39
G54H	1.2E-03	3.8E-02	32	1.3E-03	5.0E-02	38
G54L	1.6E-03	4.1E-02	26	1.7E-03	6.0E-02	35
G54P	1.6E-03	3.3E-02	21	1.7E-03	4.1E-02	24
G54T	1.6E-03	4.5E-02	28	1.7E-03	6.0E-02	35
G54V	1.6E-03	3.6E-02	23	1.7E-03	5.2E-02	31
G55D	1.7E-03	7.0E-02	41	1.3E-03	7.0E-02	54
G55E	1.9E-03	6.6E-02	35	1.4E-03	6.7E-02	48
S56A	1.3E-03	5.1E-02	39	1.0E-03	4.5E-02	45
S56E	2.6E-03	1.1E-01	42	1.9E-03	1.0E-01	53
S56Q	2.2E-03	6.7E-02	30	1.8E-03	6.8E-02	38
S56G	4.7E-04	1.9E-02	40	2.7E-04	1.4E-02	54
S56H	1.6E-03	5.5E-02	35	1.3E-03	4.6E-02	36
S56K	2.1E-03	5.3E-02	25	1.8E-03	4.4E-02	25
S56L	7.5E-04	2.0E-02	26	4.5E-04	1.3E-02	28
S56M	1.1E-03	3.2E-02	31	7.8E-04	2.3E-02	30
S56T	1.3E-03	5.5E-02	42	1.0E-03	4.7E-02	47
S56V	1.3E-03	4.4E-02	34	1.0E-03	3.8E-02	37
T57F	9.9E-04	3.3E-02	33	8.4E-04	3.6E-02	43
T57G	1.3E-03	3.8E-02	29	1.1E-03	4.0E-02	36
T57I	1.5E-03	4.9E-02	33	1.4E-03	6.0E-02	43
T57P	1.5E-03	4.5E-02	30	1.3E-03	5.4E-02	42
T57Y	1.0E-03	3.3E-02	33	8.4E-04	3.5E-02	42
T57A	9.3E-04	3.7E-02	40	6.4E-04	2.3E-02	36
T57D	7.3E-04	3.1E-02	43	6.3E-04	2.6E-02	41
T57E	7.6E-04	3.1E-02	41	5.5E-04	2.4E-02	43
T57H	8.4E-04	3.3E-02	40	5.9E-04	2.4E-02	41
T57K	8.2E-04	3.3E-02	40	5.8E-04	2.3E-02	40
T57L	1.1E-03	4.0E-02	37	9.0E-04	3.5E-02	39
T57M	9.8E-04	3.8E-02	39	7.0E-04	2.7E-02	39

[0859]

T57N	8.6E-04	3.7E-02	43	6.2E-04	3.0E-02	48
T57Q	7.4E-04	3.0E-02	40	5.6E-04	1.9E-02	34
T57R	8.6E-04	3.8E-02	44	7.1E-04	2.6E-02	37
T57S	1.1E-03	4.1E-02	39	7.1E-04	2.9E-02	41
T57V	7.7E-04	3.4E-02	44	6.4E-04	2.7E-02	42
T57W	9.0E-04	3.3E-02	37	7.3E-04	2.8E-02	38
D58E	2.4E-03	8.0E-02	33	1.2E-03	3.8E-02	32
D58A	8.9E-03	8.4E-02	9	2.6E-03	3.6E-02	14
D58H	1.2E-02	7.9E-02	7	2.0E-03	2.2E-02	11
D58S	9.9E-03	9.8E-02	10	4.0E-03	4.7E-02	12
D58T	1.8E-02	1.8E-01	10	5.8E-03	6.0E-02	10
D58V	1.5E-02	1.4E-01	9	2.5E-03	2.7E-02	11
D58Y	1.0E-02	8.9E-02	9	2.0E-03	2.5E-02	12
A93T	2.5E-03	1.1E-01	44	1.9E-03	1.2E-01	63
A93V	3.0E-03	1.5E-01	50	2.1E-03	1.4E-01	67
A94S	1.3E-03	4.6E-02	35	1.1E-03	4.7E-02	43
T96A	3.9E-03	1.4E-01	36	2.9E-03	1.6E-01	55
T96F	3.1E-03	1.6E-01	52	2.4E-03	2.0E-01	83
T96L	1.2E-03	4.6E-02	38	1.1E-03	5.7E-02	52
T96Q	2.6E-03	9.1E-02	35	2.0E-03	9.2E-02	46
T96S	1.6E-03	5.3E-02	33	1.2E-03	5.3E-02	44
T96E	1.2E-02	결합 없음	ND	9.3E-03	결합 없음	ND
T96G	1.4E-02	2.9E-01	21	8.4E-03	2.1E-01	25
T96I	6.9E-04	3.6E-02	52	4.2E-04	2.4E-02	57
T96M	1.6E-03	6.7E-02	42	9.7E-04	4.7E-02	49
T96V	4.7E-04	2.1E-02	45	3.6E-04	1.4E-02	40
T96W	2.4E-03	9.6E-02	40	1.3E-03	7.0E-02	54
T96Y	5.4E-04	2.4E-02	45	3.5E-04	1.7E-02	50
Y98F	5.3E-04	4.0E-02	75	2.6E-04	2.2E-02	84
Y98L	1.4E-03	4.0E-02	28	8.6E-04	3.1E-02	36
Y98W	2.2E-03	1.2E-01	55	1.3E-03	5.8E-02	45
S100D	4.4E-03	2.8E-01	64	2.0E-03	1.4E-01	70
S100A	2.5E-04	1.1E-02	45	2.1E-04	9.9E-03	48
S100E	3.1E-03	결합 없음	ND	1.3E-03	3.2E-01	253
S100K	3.2E-03	1.8E-01	54	1.2E-03	8.3E-02	69
S100L	7.8E-04	4.3E-02	55	4.5E-04	2.8E-02	62
S100M	5.6E-04	3.2E-02	57	2.4E-04	1.6E-02	68

[0860]

S100Q	1.9E-03	1.3E-01	68	8.4E-04	5.8E-02	69
S100W	6.2E-04	3.1E-02	49	2.9E-04	1.5E-02	51
L100aM	1.5E-02	6.2E-01	42	1.3E-02	5.1E-01	41
L100aV	9.3E-04	3.7E-02	40	*7.0E-04*	2.7E-02	39
T100bE	7.1E-04	3.2E-02	45	4.9E-04	2.5E-02	51
T100bL	3.7E-03	1.4E-01	38	3.2E-03	1.8E-01	56
W100cA	1.0E-02	5.0E-01	50	6.2E-03	5.0E-01	81
W100cE	7.5E-03	3.5E-01	47	4.2E-03	3.0E-01	71
W100cF	3.6E-03	1.6E-01	44	2.4E-03	1.5E-01	63
W100cG	9.2E-03	4.2E-01	46	5.1E-03	3.8E-01	75
W100cH	1.0E-02	2.9E-01	29	7.1E-03	2.8E-01	39
W100cK	4.6E-03	4.6E-01	100	5.0E-03	3.5E-01	70
W100cL	6.4E-03	4.6E-01	72	5.1E-03	4.3E-01	84
W100cQ	9.0E-03	5.0E-01	56	5.9E-03	5.0E-01	85
W100cS	3.7E-03	2.1E-01	57	2.2E-03	1.6E-01	73
W100cT	3.5E-03	1.8E-01	51	2.3E-03	1.5E-01	65
W100cY	2.1E-03	9.0E-02	43	1.5E-03	7.5E-02	50
W100cD	7.3E-03	1.4E-01	19	3.0E-03	1.3E-01	45
W100cM	9.6E-03	5.3E-01	55	1.8E-03	1.1E-01	59
W100cR	8.0E-03	3.1E-01	39	1.4E-03	4.6E-02	33
W100cV	8.2E-03	5.0E-01	61	2.4E-03	1.8E-01	76
Y100dF	2.3E-03	6.0E-02	26	1.7E-03	5.7E-02	34
S101A	1.7E-03	6.2E-02	36	1.3E-03	5.8E-02	45
S101E	1.8E-04	7.8E-03	44	9.4E-05	3.4E-03	36
S101L	2.5E-03	1.0E-01	40	1.5E-03	7.7E-02	52
S101M	1.1E-03	4.8E-02	44	6.8E-04	3.7E-02	54
S101Q	5.5E-04	2.5E-02	45	3.8E-04	1.6E-02	43
S101T	5.7E-04	2.5E-02	44	3.6E-04	1.9E-02	54
S101V	7.3E-04	3.2E-02	43	5.8E-04	2.6E-02	45
S101W	7.0E-05	1.2E-03	17	9.7E-05	8.6E-04	9
Y102T	1.7E-03	6.5E-02	38	1.2E-03	6.0E-02	50

[0861] ND: 결정되지 않음

표 4

pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 cyno FcRn에 대한 T0263018B11 단일 치환 변이체의 친화도(K_D 값)

ISVD 명칭	치환 (Kabat)	인간 FcRn			Cyno FcRn			형식화 및 생체내 시험을 위한 선택
		pH 6.0	pH 7.4	pH 7.4/6.0	pH 6.0	pH 7.4	pH 7.4/6.0	
		K_D (M)	K_D (M)	비	K_D (M)	K_D (M)	비	
T0263018B11	모체	7.3E-09	6.0E-07	82	7.2E-09	4.3E-07	60	
T026301028	T96L	1.5E-08	1.1E-06	73	1.1E-08	7.5E-07	68	
T026301029	S52aK	7.4E-08	7.2E-06	97	4.9E-08	5.1E-06	104	
T026301030	S31E	1.9E-08	2.5E-06	132	1.4E-08	1.0E-06	71	
T026301031	A33E	3.3E-08	7.0E-06	212	5.0E-08	3.5E-05	700	
T026301032	F29L	2.1E-08	2.1E-06	100	1.6E-08	1.4E-06	88	
T026301033	S100D	9.0E-08	4.7E-05	522	6.7E-08	ND	NA	
T026301034	W100cT	6.4E-08	5.8E-06	91	4.4E-08	2.9E-06	66	
T026301035	G55E	2.1E-08	1.8E-06	86	1.9E-08	1.3E-06	68	
T026301036	G26T	2.1E-08	3.0E-06	143	1.9E-08	2.3E-06	121	
T026301037	W100cK	3.1E-07	ND	NA	1.7E-07	ND	NA	
T026301038	S52aQ	1.5E-08	1.7E-06	113	1.2E-08	8.6E-07	72	예
T026301039	W100cS	4.9E-08	6.1E-06	125	3.3E-08	1.2E-06	36	예
T026301040	A33D	1.7E-08	5.6E-06	329	3.3E-08	2.8E-05	848	
T026301041	F27V	1.9E-08	1.8E-06	95	1.6E-08	1.1E-06	69	
T026301042	T28E	3.6E-08	3.2E-06	89	3.3E-08	2.1E-06	64	
T026301043	G53E	1.5E-08	1.3E-06	87	1.6E-08	8.6E-07	54	

ND: 결정되지 않음

NA: 이용 가능하지 않음

[0862]

[0863] 친화도 데이터에 기반하여, 모두 6개의 위치에 대해 모체 아미노산을 포함하는 돌연변이 G26T, S31E, A33D, S52aQ, S100D, W100cS 및 W100cK의 모든 가능한 조합을 포함하는 일련의 무태그 ISVD 조합 변이체를 생성하였다. 또한, 동일한 Kabat 위치 상의 일부 추가 단일 변이체, 즉, S31D, S100E 및 W100cR을 연구하였다. 이러한 무태그 ISVD 변이체를 포함하는 주변 세포질 추출물이 생성되었고, pH 6.0에서 오프 속도를 결정하였다(표 5 참조). 정제, 및 pH 6.0 및 pH 7.4에서의 친화도 결정(표 6 참조) 및 TSA(나타내지 않음)에 의한 추가 특성규명을 위해 19개의 변이체를 선택하였다. 친화도 데이터에 기반하여, 형식화 및 생체내 특성규명을 위해 FcRn ISVD T0263018B11의 5개 변이체(단일 및 조합 변이체 포함)를 선택하였다(실시예 8 및 10).

표 5

pH 6.0에서 인간 FcRn에 대한 T0263018B11의 조합 변이체의 오프 속도 분석

ISVD 명칭	치환 (Kabat)	pH 6.0 에서 인간 FcRn에 대한 koff (1/s)
T0263018B11	모체	8.0E-04
T026301049	G26T,S31E,A33D,S100D	결합 없음
T026301050	G26T,S52aQ,S100D	2.9E-02
T026301051	A33D,S100D	1.2E-02
T026301052	G26T,S31E,A33D	5.6E-03
T026301053	G26T,S31E,A33D,W100cK	결합 없음
T026301054	G26T,S31E,S52aQ,S100D	4.1E-02
T026301055	G26T,A33D,W100cK	결합 없음
T026301056	G26T,S31E,A33D,S52aQ,S100D,W100cK	결합 없음
T026301057	S31E,S52aQ,W100cS	1.6E-02
T026301058	G26T,S31E,S52aQ,S100D,W100cK	결합 없음
T026301059	S31E,A33D,S52aQ,S100D,W100cS	3.9E-02
T026301060	S31E,S100D,W100cS	3.4E-02
T026301061	G26T,S100D	1.1E-02
T026301062	G26T,A33D,S100D	결합 없음
T026301063	G26T,S52aQ	5.0E-03
T026301064	A33D,S52aQ	4.6E-04
T026301065	G26T,S31E,A33D,S52aQ,S100D	결합 없음
T026301066	S31E,S100D,W100cK	결합 없음
T026301067	G26T,A33D,S52aQ,W100cK	6.1E-03
T026301068	A33D,S52aQ,S100D,W100cK	결합 없음
T026301069	A33D,S52aQ,W100cS	1.7E-03
T026301070	S31E,A33D,S52aQ,W100cS	4.6E-03
T026301071	G26T,S31E,S100D,W100cS	4.9E-02
T026301072	A33D,S52aQ,S100D,W100cS	1.5E-02
T026301073	S100E	3.2E-03
T026301074	G26T,S31E,S100D	1.3E-02
T026301075	G26T,S31E	2.3E-03
T026301076	A33D,S52aQ,W100cK	3.0E-03
T026301077	G26T,S31E,A33D,S52aQ,W100cK	결합 없음
T026301078	S31E,A33D,S52aQ,S100D	9.5E-03
T026301079	S52aQ,W100cS	6.5E-03
T026301080	A33D,W100cS	5.1E-03
T026301081	G26T,W100cS	8.8E-03
T026301082	G26T,S100D,W100cS	5.4E-02
T026301083	S31E,S52aQ,S100D,W100cS	6.7E-02

[0864]

ISVD 명칭	치환 (Kabat)	pH 6.0 에서 인간 FcRn에 대한 koff (1/s)
T026301084	S100D,W100cS	2.1E-02
T026301085	S52aQ,S100D	6.6E-03
T026301086	S31E,A33D,S100D	1.3E-02
T026301087	S31E,A33D,S52aQ	1.1E-03
T026301088	A33D,W100cK	9.3E-03
T026301089	S100D,W100cK	2.8E-02
T026301090	G26T,S52aQ,W100cK	3.3E-02
T026301091	S31E,A33D,W100cS	6.2E-03
T026301092	A33D,S100D,W100cK	결합 없음
T026301093	G26T,A33D,W100cS	결합 없음
T026301094	G26T,S31E,A33D,S52aQ,W100cS	1.0E-02
T026301095	S31E,A33D,S100D,W100cS	결합 없음
T026301096	S52aQ,S100D,W100cS	3.4E-02
T026301097	G26T,S31E,S52aQ	6.7E-03
T026301098	S31D	1.3E-02
T026301099	S31E,A33D	1.5E-03
T026301100	A33D,S52aQ,S100D	3.9E-03
T026301101	G26T,S100D,W100cK	결합 없음
T026301102	S31E,A33D,W100cK	1.1E-02
T026301103	G26T,S52aQ,W100cS	2.1E-02
T026301104	S31E,S52aQ,S100D,W100cK	결합 없음
T026301105	G26T,S31E,W100cS	1.1E-02
T026301106	G26T,A33D,S52aQ,S100D,W100cS	결합 없음
T026301107	G26T,A33D,S52aQ,W100cS	4.5E-03
T026301108	G26T,S31E,S52aQ,S100D,W100cS	결합 없음
T026301109	G26T,A33D,S52aQ	1.3E-03
T026301110	S31E,S52aQ,S100D	1.4E-02
T026301111	S31E,S52aQ	3.2E-03
T026301112	S31E,A33D,S52aQ,W100cK	7.2E-03
T026301113	S31E,S52aQ,W100cK	2.1E-02
T026301114	G26T,S31E,S100D,W100cK	결합 없음
T026301115	G26T,A33D,S100D,W100cK	결합 없음
T026301116	S31E,A33D,S100D,W100cK	결합 없음
T026301117	S31E,W100cS	6.7E-03
T026301118	A33D,S100D,W100cS	결합 없음
T026301119	G26T,S52aQ,S100D,W100cS	1.1E-01

[0865]

ISVD 명칭	치환 (Kabat)	pH 6.0 에서 인간 FcRn에 대한 koff (1/s)
T026301120	G26T,S31E,A33D,S52aQ,S100D,W100cS	결합 없음
T026301121	G26T,S31E,A33D,S52aQ	1.8E-03
T026301122	W100cR	5.7E-03
T026301123	G26T,A33D	5.4E-03
T026301124	G26T,S31E,S52aQ,W100cK	5.9E-02
T026301125	S31E,W100cK	8.2E-03
T026301126	G26T,W100cK	1.0E-02
T026301127	G26T,S31E,A33D,W100cS	9.5E-03
T026301128	S52aQ,S100D,W100cK	3.2E-02
T026301129	S31E,A33D,S52aQ,S100D,W100cK	결합 없음
T026301130	G26T,S31E,A33D,S100D,W100cS	결합 없음
T026301131	G26T,A33D,S100D,W100cS	결합 없음

[0866]

표 6

pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 cyno FcRn에 대한 T0263018B11 조합 변이체의 친화도

ISVD 명칭	치환 (Kabat)	인간 FcRn			Cyno FcRn			형식화 및 생체내 시험을 위한 선택
		pH 6.0	pH 7.4	pH 7.4/6.0	pH 6.0	pH 7.4	pH 7.4/6.0	
		K_D (M)	K_D (M)	비	K_D (M)	K_D (M)	비	
T026301057	S31E, S52aQ, W100cS	3.9E-07		NA	2.6E-07		NA	
T026301063	G26T, S52aQ	6.2E-08		NA	4.1E-08		NA	
T026301064	A33D, S52aQ	*9.4E-09*	*3.7E-06*	394	3.8E-09	2.4E-06	632	
T026301069	A33D, S52aQ, W100cS	5.5E-08		NA	2.3E-08		NA	
T026301070	S31E, A33D, S52aQ, W100cS	1.5E-07		NA	1.4E-07		NA	
T026301073	S100E	1.2E-07		NA	5.9E-08		NA	예
T026301075	G26T, S31E	4.7E-08	*5.6E-06*	119	2.1E-08	3.1E-06	148	
T026301076	A33D, S52aQ, W100cK	1.2E-07		NA	3.7E-08		NA	
T026301079	S52aQ, W100cS	*1.2E-07*		NA	7.6E-08	5.9E-06	78	
T026301080	A33D, W100cS	1.5E-07		NA	1.3E-07		NA	
T026301087	S31E, A33D,	2.5E-08		NA	2.0E-08		NA	

[0867]

	S52aQ							
T026301091	S31E, A33D, W100cS	2.5E-07		NA	1.6E-07		NA	예
T026301098	S31D	*2.0E-07*		NA	1.4E-07		NA	
T026301099	S31E, A33D	3.0E-08		NA	3.0E-08		NA	
T026301100	A33D, S52aQ, S100D	1.4E-07		NA	9.8E-08		NA	
T026301103	G26T, S52aQ, W100cS	2.9E-07		NA	1.3E-07		NA	예
T026301111	S31E, S52aQ	*7.7E-08*	*5.4E-06*	70	4.8E-08	5.0E-06	104	
T026301117	S31E, W100cS	1.7E-07		NA	1.1E-07		NA	
T026301122	W100cR	1.6E-07		NA	8.1E-08		NA	
T0263018B11	모체	7.3E-09	6.0E-07	82	7.2E-09	4.3E-07	60	예

빈 세포: 낮은 결합으로 인해 친화도 결정이 가능하지 않음; *이탤릭체 및 밑줄 표시*: 표시 값; NA: 해당 없음.

[0868]

[0869] ## 6.5 실시예 5: 5가 ISVD의 표면 플라스몬 공명(SPR)을 통한 친화도 결정

[0870] T0263018B11 ISVD 빌딩블록의 특정 얻어진 돌연변이체를 하나 이상의 참조 ISVD 빌딩블록("REF", FcRn에 결합하지 않음)과의 연결에 의한 추가 형식화를 위해 선택하여 5가 ISVD 형식을 생성하였다. 인간 및 cyno FcRn에 대한 정제된, 5가 ISVD 작제물의 친화도를 유사한 분석에 의해 실시예 3에서 1가 ISVD에 대해 기재한 것과 동일한 조건 하에 결정하였다. 친화도를 표 7에 나타낸다.

표 7

pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 cyno FcRn에 대한 5가 ISVD 형식의 친화도

5가 ISVD 작제물 명칭	작제물에 존재하는 FcRn 결합 ISVD 빌딩블록 (FcRn)	형식	인간 FcRn에 대한 K_D(M)		cyno FcRn에 대한 K_D(M)	
			pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4
T026301220	T0263018B11(E1D,G26T,S52aQ,W100cS)	(T0263018B11(E1D,G26T,S52aQ,W100cS))$_2$-(REF)$_3$	3.7E-08	*9.9E-07*	2.6E-08	*6.7E-07*
T026301230	T0263018B11(E1D,W100cS)	T0263018B11(E1D,W100cS)-(REF)$_4$	1.0E-07	*6.7E-07*	5.4E-08	*5.8E-07*
T026301233	T0263018B11(E1D,G26T,S52aQ,W100cS)	T0263018B11(E1D,G26T,S52aQ,W100cS)-(REF)$_4$	4.9E-07	*7.5E-07*	2.7E-07	*4.2E-07*
T026301234	T0263018B11(E1D)	T0263018B11(E1D)-(REF)$_4$	2.6E-08	7.4E-07	1.4E-08	4.9E-07

이탤릭체 및 밑줄 표시: 표시 데이터

[0871]

[0872] ## 6.6 실시예 6: FcRn 결합 ISVD T0263018B11과 FcRn의 구조적 상호작용

[0873] FcRn 결합 ISVD T0263018B11과 인간 FcRn(24-297;N125Q)/b2M(21-119)의 상호작용 구조를 복합체의 공결정화를 통해 결정하였다. 인간 FcRn(24-297;N125Q)/b2M(21-119) 단백질을 포유류 세포에서 생산하였고, 단백질의 *N*-글리코실화를 피하기 위해 N125Q 돌연변이를 포함한다.

[0874] 복합체를 10 mM 히스티딘, 150 mM NaCl pH 6에서 9.5 mg/mℓ로 농축시켰다. 시팅 드롭법(sitting drop method)을 이용하여 결정화를 하였다. 18% PEG80000, 200 mM NaCl, 19℃에서 50 mM TRIS pH 8.0, 25% 에틸렌 글리콜을 동결보호제로서 냉동 전에 포함시켰다. EIGRR-X 6M 검출기(Dectris Ltd.) 상의 싱크로트론 SOLEIL로부터의 빔라인(beamline) Proxima1에서 결정 둘 다로부터 데이터세트를 수집하였다. 결정은 동일한 공간 그룹 C2에 속하며

1.64 Å으로 회절된다. 오토프로(Vonrhein, C., Flensburg, C., Keller, P., Sharff, A., Smart, O., Paciorek, W., Womack, T. & Bricogne, G. (2011). Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. Acta Cryst. D67, 293-302.)를 사용하여 데이터를 처리하였고, 이는 XDS(Kabsch, W. XDS. Acta Cryst. D66, 125-132 (2010)) 및 Aimless(P.R.Evans and G.N.Murshudov, 'How good are my data and what is the resolution?' Acta Cryst. D69, 1204-1214 (2013))에 따른다. 참조로서 pdb 구조 4N0U를 사용하여 FcRn(24-297;N125Q)/b2M(21-119)의 모델을 얻었다. Maestro(Schrodinger Release 2021-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021)에서 FcRn 결합 ISVD T0263018B11의 모델을 작제하였다. CCP4 세트(Winn *et al,* Acta Cryst D67 (2011), 235-242)의 Phaser(Coy *et al*, J. Appl. Cryst. (2007) 40, 658-674)를 사용하여 분자 대체를 수행하였다. 구조를 1.64 Å에서 Buster 주기(Buster-TNT 2.11.5, Global Phasing Ltd)를 사용하여 개선시킨 후에 COOT(Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Acta Cryst. D60, 2126-2132.)에서 최종 Rfree 24.3% 및 Rfactor 20.7%로 수동 보정하였다.

[0875] Rsym 및 Rmerge - 둘 모두에 대한 식은 다음과 같다:

[0876] $$R = \frac{\sum_{hkl} \sum_j |I_{hkl,j} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl,j}}$$

[0877] 고유 반사의 대칭- (또는 Friedel-) 관련 관찰의 평균이다.

[0878] R 및 Rfree:

[0879] $$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{hkl}^{obs} - F_{hkl}^{calc}|}{\sum_{hkl} F_{hkl}^{obs}}$$

[0880] F_{hkl}^{obs} 및 F_{hkl}^{calc} 는 서로에 관해 크기가 조정되어야 한다. R 및 Rfree는 이들이 (https://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/ccp4wiki/index.php?title=R-factors)로부터 계산된 반사 세트에서 다르다.

[0881] 에피토프-파라토프에 관련된 잔기는 소프트웨어 세트(Schrodinger Release 2021-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021)로 결정하였다. T0263018B11에 의해 결합된 FcRn 에피토프를 PDB에 존재하는 천연 리간드 HSA 및 IgG에 의해 결합된 에피토프와 비교하였다(Protein Database) ID: 4N0U 및 분자 표면 표현을 도 2 및 도 3에 나타낸다(PyMOL 2.3.0).

[0882] **6.7 실시예 7: 혈청 알부민 결합 ISVD ALB23002를 포함하는 다가 ISVD 작제물의 생성 및 표면 플라스몬 공명(SPR)을 통한 친화도 결정**

[0883] pH 6.0 및 pH 7.4에서 FcRn 친화도에 기반하여, HSA 결합 ISVD 빌딩블록 ALB23002(서열번호 35)로 형식화하기 위해 다중 ISVD를 선택하였다. FcRn 결합 ISVD 빌딩블록을 35GS 링커(서열번호 48)에 의해 ALB23002에 연결하였고, *C*-말단의 알라닌을 첨가하였다. 특정 형식에서, 추가 표적 ISVD 빌딩블록(X,Y)를 또한 첨가하여 가능한 장래의 치료적 우위를 나타냈다. 이러한 형식을 피치아 파스토리스에서 발현시켰고, 실시예 3.1 및 3.2에 기재한 바와 같이 정제하였다.

[0884] 인간 및 cyno FcRn에 대한 정제된, 다가 ISVD 작제물의 친화도를 MASS-2(Sierra sensors, Gmbh) 기기에서 결정하였다. hFcRn/hb2M 및 cFcRn/cb2M을 바이오틴-태그 포획 칩 또는 고용량 아민 칩(뉴트라비딘에 의해 사전 고정) 상에서 포획하였다. ISVD 작제물을 6개의 상이한 농도(1 내지 4000 nM)에서 주사하였고, 120 s 동안 45 ㎕/분에서 결합시키고, 600 s 내지 3600 s 동안 45 ㎕/분에서 해리시켰다. pH 7.4에서의 보다 낮은 결합으로 인해 pH 6.0과 비교되는 pH 7.4에서의 친화도를 결정하기 위해 보다 높은 ISVD 작제물 농도를 사용하였다. 센서그램의 평가는 온 속도 및 오프 속도를 동시에 적합화는 1:1 Langmuir 해리 모델에 기반하였다. 친화도를 표 8 및 표 9에 나타낸다.

표 8

pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 cyno FcRn에 대한 FcRn 결합 ISVD(FcRn) 및 혈청 알부민 결합 ISVD(ALB23002)를 포함하는 작제물의 친화도

ISVD 작제물의 명칭 (FcRn-35GS-ALB23002-A)	작제물에서 사용한 FcRn 결합 ISVD 빌딩블록	인간 FcRn에 대한 K_D (M)		cyno FcRn에 대한 K_D (M)	
		pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4
T026301161	T0263046C05(E1D)	*6.8E-09*	NA	*6.7E-09*	NA
T026301163	T0263089E01(E1D)	2.1E-07	NA	1.7E-07	NA
T026301168	T0263091G06(E1D)	1.8E-06	NA	8.1E-07	NA
T026301170	T0263018B11(E1D)	1.2E-08	4.5E-07	7.9E-09	2.9E-07
T026301185	T0263066B10(E1D)	*2.5E-07*	6.5E-06	5.7E-08	8.4E-07
T026301192	T0263018B11(E1D,S100E)	2.5E-07	매우 낮은 결합	1.4E-07	*4.8E-07*
T026301195	T0263018B11(E1D,S31E,A33D,W100cS)	6.8E-07	결합 없음	6.7E-07	결합 없음
T026301196	T0263018B11(E1D,G26T,S52aQ,W100cS)	1.0E-06	매우 낮은 결합	5.1E-07	매우 낮은 결합
T026301197	T0263018B11(E1D,S52aQ)	7.1E-08	*2.6E-06*	4.1E-08	*2.4E-06*
T026301198	T0263018B11(E1D,W100cS)	1.1E-07	*2.5E-06*	6.7E-08	*2.9E-06*

NA: 이용 가능하지 않음; *이탤릭체 및 밑줄 표시*: 표시 값

[0885]

표 9

pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 cyno FcRn에 대한 FcRn 결합 ISVD(FcRn), 혈청 알부민 결합 ISVD(ALB23002), 및 추가 표적 결합 ISVD 빌딩블록(X,Y)을 포함하는 작제물의 친화도

ISVD 작제물의 명칭	작제물에서 사용한 FcRn 결합 ISVD 빌딩블록	형식	인간 FcRn에 대한 K_D(M)		cyno FcRn에 대한 K_D(M)	
			pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4
T026301257	T0263018B11	X-Y-FcRn-35GS-ALB23002	3.4E-08	1.2E-06	2.0E-08	7.1E-07
T026301259	T0263018B11	X-Y-FcRn-ALB23002	2.5E-08	8.3E-07	1.5E-08	4.8E-07
T026301266	T0263018B11	X-FcRn-Y-ALB23002	4.1E-08	1.6E-06	2.6E-08	8.8E-07
T026301366	T0263018B11(W100cS)	X-Y-FcRn-35GS-ALB23002	3.1E-07	NA	1.8E-07	NA

NA: 이용 가능하지 않음

[0886]

[0887] 인간 및 마우스 혈청 알부민(각각 HSA 및 MSA)에 대한 정제된, 다가 ISVD 작제물의 친화도를 ProteOn XPR36(BioRad Laboratories, Inc.) 기기 상에서 결정하였다. HSA/MSA(HSA: Sigma-Aldrich - Sigma, 카탈로그 번호 A8763; MSA: Albumin Bioscience, 카탈로그 번호 2601)를 ProteOn GLC 센서 칩(Biorad Laboratories, 1765011) 상에 고정하였다. ISVD 작제물을 6개의 상이한 농도(1 내지 500 nM)에서 주사하였고, 120 s 동안 45 ㎕/분에서 결합시키고, 600 s 내지 3600 s 동안 45 ㎕/분에서 해리시켰다. 센서그램의 평가는 온 속도 및 오프 속도를 동시에 적합화는 1:1 Langmuir 해리 모델에 기반하였다. 친화도를 표 10 및 표 11에 나타낸다.

표 10

pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 마우스 혈청 알부민에 대한 FcRn 결합 ISVD(FcRn) 및 혈청 알부민 결합 ISVD(ALB23002)를 포함하는 작제물의 친화도

ISVD 작제물의 명칭(FcRn-35GS-ALB23002-A)	작제물에서 사용한 FcRn 결합 ISVD 빌딩블록	HSA에 대한 K_D (M)		MSA에 대한 K_D (M)	
		pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4
IRR00122	참조 Nanobody 클론	5.4E-09	1.2E-08	5.8E-08	9.0E-08
T026301161	T0263046C05(E1D)	7.1E-09	1.5E-08	7.4E-08	1.3E-07
T026301163	T0263089E01(E1D)	6.6E-09	1.3E-08	9.6E-08	1.3E-07
T026301168	T0263091G06(E1D)	8.5E-09	1.6E-08	1.0E-07	1.4E-07
T026301170	T0263018B11(E1D)	6.1E-09	1.3E-08	6.7E-08	8.5E-08
T026301185	T0263066B10(E1D)	5.0E-09	1.0E-08	6.7E-08	9.6E-08
T026301192	T0263018B11(E1D,S100E)	5.7E-09	1.2E-08	6.4E-08	8.7E-08
T026301195	T0263018B11(E1D,S31E,A33D,W100cS)	6.1E-09	1.3E-08	7.7E-08	1.2E-07
T026301196	T0263018B11(E1D,G26T,S52aQ,W100cS)	7.4E-09	1.5E-08	8.9E-08	1.2E-07
T026301197	T0263018B11(E1D,S52aQ)	5.1E-09	1.1E-08	5.7E-08	6.9E-08
T026301198	T0263018B11(E1D,W100cS)	7.3E-09	1.5E-08	8.9E-08	1.2E-07

이탤릭체 및 밑줄 표시: 표시 값

[0888]

표 11

pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 및 마우스 혈청 알부민에 대한 FcRn 결합 ISVD(FcRn), 혈청 알부민 결합 ISVD(ALB23002), 및 추가 표적 결합 ISVD 빌딩블록(X,Y)을 포함하는 작제물의 친화도 및 오프 속도

Nanobody® ISVD 작제물의 명칭 (FcRn-35GS-ALB23002-A)	작제물에서 사용한 FcRn 결합 Nanobody® ISVD 빌딩블록 FcRn Nanobody® 클론	형식	HSA에 대한 K_D (M)		MSA에 대한 k_d (1/s)	
			pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4
T026301257	T0263018B11	X-Y-FcRn-35GS-ALB	1.4E-08	1.1E-08	5.6E-02	5.2E-02
T026301259	T0263018B11	X-Y-FcRn-ALB	9.8E-09	732E-09	3.8E-02	3.7E-02
T026301266	T0263018B11	X-FcRn-Y-ALB	1.2E-08	8.6E-09	5.3E-02	4.8E-02
T026301366	T0263018B11(W100cS)	X-Y-FcRn-35GS-ALB	1.0E-08	7.5E-09	3.4E-02	3.5E-02

[0889]

[0890] 6.8 실시예 8: 혈청 PK 분석의 개발 및 최적화

[0891] 혈청 알부민결합 ISVD(ALB23002, 서열번호 35) 단독 또는 추가 표적 결합 ISVD(X, Y)와 조합하여, 또는 대조군 ISVD(REF)에 유전자 융합된 pH-의존적 FcRn 결합 ISVD의 반감기를 평가하기 위해 TG32(B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT) 32Dcr/Dcr) 마우스에서 약물동력학 실험을 개시하였다. 마우스 혈청에서 모든 작제물의 농도를 측정하기 위해 특이적이고 민감한 리간드 결합 분석을 개발하였다.

[0892] 스트렙타비딘-코팅 MSD GOLD 96-웰 SMALLSPOT® 플레이트(Meso Scale Discovery)를 30분 동안 RT에서

Superblock T20™(Thermo Scientific)로 차단하였다. 이어서, 플레이트를 세척하였고, 다양한 ISVD 빌딩블록의 프레임워크로 향하는 1.0 μg/mℓ 바이오티닐화된 일반 mAb와 함께 RT 및 600 rpm에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 풀링한 마우스 혈청에서 캘리브레이터 및 QC를 준비하였다. 플레이트를 세척한 후에, 캘리브레이터, QC 및 샘플을 PBS 0.1% 카세인 중 20의 MRD로 플레이트에 적용하였고, RT 및 600 rpm에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 후에, 플레이트를 평가 중인 형식에 따라 특정 ISVD 빌딩블록으로 향하는 2.0 μg/mℓ 설포-표지된 mAb와 함께 1시간 동안 RT 및 600 rpm에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척한 후에, 2x MSD 판독 완충제(Meso Scale Discovery)를 첨가하였고, 플레이트를 Sector Imager Quickplex SQ 120(Meso scale Discovery) 상에서 판독하였다.

[0893] 인간 IgG의 혼합물(hIVIG; Privigen®)을 사용하여 내인성 IgG 경쟁을 모방하는 생체내 실험을 위해, hIgG 분석 간섭을 평가하였다.

[0894] ### 6.9 실시예 9: 유전자이식 마우스에서의 이중특이적 ISVD 작제물의 약물동력학

[0895] 6 내지 8마리의 Tg32 마우스(B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT) 32Dcr/DcrJ)에 1.9 mg/kg 이중특이적 ISVD 작제물을 꼬리에 정맥내로 주사하였다. 이중특이적 ISVD 작제물은 2개의 유전자 융합된 ISVD 도메인, 즉, 음성 대조군(IRR) ISVD 또는 FcRn-표적화 ISVD(FcRn)인 *N*-말단의 하나의 도메인 및 알부민-표적화 ISVD인 *C*-말단의 다른 하나의 도메인(Alb23002)으로 이루어진다.

[0896] 다양한 시점(시점당 2마리 마우스)에서 혈액을 채취하였고, 혈청을 준비하였다. 실시예 8에 기재한 바와 같이 이중특이적 ISVD 작제물의 존재에 대해 ELISA에 의해 혈청 샘플을 분석하였다. 결과는 도 4에 제시되어 있다.

[0897] 기계론적 모델에서 생체내 엔도솜 FcRn 친화도를 추정함으로써 반감기 값을 얻었고, 표 12에 보고하였다.

[0898] 본 발명자들은 FcRn-결합 및 알부민 결합 ISVD를 포함하는 이중특이적 ISVD의 반감기가 알부민 결합 ISVD만을 포함하는 작제물에 비해 유의미하게 개선될 수 있다는 결과로부터 결론을 내릴 수 있다. 대조군(IRR-Alb23002)에 대한 2.4일에 비교하여 FcRn-Alb23002 이중특이적 ISVD에 대해 최대 8.2일의 반감기(T026301170의 경우, FcRn 결합 ISVD T0263018B11을 포함함)가 관찰되었다.

표 12

이중특이적 ISVD 작제물 (항-FcRn-Alb23002 형식)의 계산된 반감기(일수)

[0899]

	IRR00122	T026301170	T026301185	T026301168	T026301163	T026301161
$T_{1/2}$(일수)	2.4	8.2	5.3	2.7	2.1	1.2

[0900] ### 6.10 실시예 10: T0263018B11의 돌연변이 변이체를 포함하는 이중특이적 ISVD 작제물의 마우스에서의 약물동력학

[0901] 2 내지 8마리의 Tg32 마우스(B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT) 32Dcr/DcrJ)에 1.9 mg/kg 이중특이적 ISVD 작제물을 꼬리에 정맥내로 주사하였다. 이중특이적 ISVD 작제물은 2개의 유전자 융합된 ISVD 도메인, 즉, 음성 대조군(IRR) ISVD 또는 FcRn-표적화 ISVD(FcRn)인 *N*-말단의 하나의 도메인 및 알부민-표적화 ISVD인 *C*-말단의 다른 하나의 도메인(ALB23002)으로 이루어진다. FcRn-표적화 ISVD는 중성 pH에서 감소된 친화도를 갖는 모체 서열 또는 돌연변이체였다(실시예 4 참조).

[0902] 다양한 시점(시점당 2마리 마우스)에서 혈액을 채취하였고, 혈청을 준비하였다. 실시예 8에 기재한 바와 같이 이중특이적 ISVD 작제물의 존재에 대해 ELISA에 의해 혈청 샘플을 분석하였다. 결과는 도 5에 제시되어 있다. 기계론적 PBPK 모델에서 생체내 엔도솜 FcRn 친화도를 추정함으로써 반감기 값을 얻었고, 표 13에 보고하였다.

[0903] 본 발명자들은 T0263018B11 및 알부민 결합 ISVD의 돌연변이체를 포함하는 이중특이적 ISVD 작제물에서, 대조군(IRR-Alb23002-IRR0122) ISVD에 비해 반감기가 유의미하게 개선되었다는 결과로부터 결론을 내릴 수 있다.

[0904] 모든 평가한 돌연변이체의 경우, 반감기는 대조군(IRR-Alb)에 비해 적어도 2.2배 및 최대 3.7배 개선되었다.

표 13

이중특이적 ISVD 작제물(T0263018B11-Alb23002 형식의 항-FcRn T0263018B11-Alb23002 형식 또는 돌연변이체)의 계산된 반감기

	IRR00122	T026301170	T026301192	T026301195	T026301196	T026301197	T026301198
$T_{1/2}$ (일수)	2.4	8.2	7.5	5.4	6.2	7.7	8.8

[0905]

[0906] **6.11 실시예 11: FcRn 결합 ISVD(FcRn), 혈청 알부민 결합 ISVD(ALB23002) 및 추가 표적 결합 ISVD 빌딩블록(X,Y)을 포함하는 다가 ISVD 작제물의 약물동력학**

[0907] hIgG와의 관련 경쟁을 모방하기 위해, Tg32 마우스(B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT) 32Dcr/DcrJ)에 정제한 hIgG(hIVIG; Privigen®)의 혼합물을 미리 부하하였다. Privigen®을 1주 1회 정맥내로 투여하였고, 제1 투여는 PK 연구 개시의 2일 전이었다. 전체적으로, 250 mg/kg의 3회의 Privigen® 주사를 투여하여, 연구 기간 동안 생리학적으로 관련된 hIgH 혈청 농도를 산출했습니다(데이터 미제시). 모든 그룹은 Privigen® 치료를 받았고, Privigen®를 투여하지 않은 하나의 추가 그룹을 포함시켰다. 이 그룹은 FcRn 결합 ISVD 및 IgG Fc의 동일한 에피토프에 대한 경쟁의 경우에 예상할 수 있는 PK에 대한 hIgG의 영향을 평가를 허용하였다.

[0908] 제1 Privigen® 투여 2일 후에, 4 내지 6마리의 Tg32 마우스(B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT) 32Dcr/DcrJ)에 3 내지 4개의 유전적으로 융합된 ISVD 도메인으로 이루어진 등몰량의 다가 ISVD 작제물을 꼬리에 정맥내로 주사하였다(이러한 작제물에서 사용한 형식 및 빌딩블록은 위의 실시예 7에 기재함). 각 작제물은 알부민-결합 ISVD(Alb23002) 단독(3가) 또는 FcRn-결합 ISVD(FcRn)와 알부민-결합 ISVD(Alb23002)(4가)의 조합에 융합된 다양한 잠재적인 치료적으로 관련된 표적(X,Y)으로 향하는 2개의 ISVD 도메인을 포함하였다. 또한, 3개의 비표적화 ISVD(IRR) 및 1개의 알부민-결합 ISVD(Alb23002)를 포함하는 4가 대조군 ISVD를 투여하였다(IRR00164).

[0909] 다양한 시점(시점당 2마리 마우스)에서 혈액을 채취하였고, 혈청을 준비하였다. 실시예 7에 기재한 바와 같이 다중특이적 ISVD 작제물의 존재에 대해 ELISA에 의해 혈청 샘플을 분석하였다.

[0910] 결과는 도 6에 도시되어 있다. 기계론적 PBPK 모델에서 생체내 엔도솜 FcRn 친화도를 추정함으로써 반감기 값을 얻었고, 표 14에 보고하였다.

[0911] 잠재적으로 관련된 치료적 표적에 대해 ISVD 도메인을 포함하는 다가 ISVD 작제물에서, FcRn 결합 ISVD와 알부민 결합 ISVD의 조합은 알부민 결합 ISVD만을 포함하는 대조군 ISVD 작제물에 비해 반감기가 유의미하게 개선되었다. FcRn 결합 ISVD의 위치뿐만 아니라 FcRn 결합 ISVD와 알부민 결합 ISVD 사이의 링커 길이는 작제물의 약물동력학 특성(반감기)에 영향을 미치지 않았다. 또한, 반감기는 관련 수준의 hIgG의 존재에 의해 영향을 받지 않는데, 이는 IgG Fc에 의해 결합된 에피토프에 비교하여 상이한 에피토프가 FcRn 결합 ISVD에 의해 결합된다는 것을 시사한다. 모든 평가한 다가 ISVD 작제물의 경우, 반감기는 대조군 ISVD 형식에 비해 2배 개선되었다.

표 14

Tg32 마우스에서 평가한 다가 ISVD 작제물의 형식 및 계산된 반감기

	IRR00164	F027301978	T02601257*	T026301259	T026301266	T026301366$
형식	IRR-IRR-IRR-Alb23002	X-Y-Alb23002	X-Y-FcRn-Alb23002	X-Y-FcRn-Alb23002	X-FcRn-Y-Alb23002	X-Y-FcRn-Alb23002
FcRn-Alb 사이의 링커	NA	NA	35GS	9GS	NA	35GS
$T_{1/2}$ (일수)	1.5	2.4	4.9	4.4	5.3	4.1

* T02601257 은 Privigen®의 존재하 및 부재하 모두에서 평가하였다

$ T026301366 은 FcRn-결합 VHH 18B11 의 pH-조작된 변이체를 포함하였다

[0912]

[0913] 6.12 실시예 12: T0263018B11의 pH-조작 변이체를 포함하는 다가 FcRn 결합 ISVD 작제물의 약물동력학

[0914] 6 내지 9마리의 Tg32 마우스(B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT) 32Dcr/DcrJ)에 4.5 mg/kg 다중특이적 ISVD 작제물을 꼬리에 정맥내로 주사하였다. 다가 ISVD 작제물은 1 또는 2개의 FcRn-표적화 ISVD(FcRn) 및 음성 대조군(IRR) ISVD 또는 음성 대조군(IRR) ISVD(IRR00245)만을 포함하는 대조군 작제물을 포함하는 5개의 유전적으로 융합된 ISVD 도메인으로 이루어졌다. FcRn-표적화 ISVD는 생리적 pH에서 감소된 친화도를 갖는 모체 서열 또는 돌연변이체였다(실시예 4 참조).

[0915] 다양한 시점(시점당 2 내지 3마리 마우스)에서 혈액을 채취하였고, 혈청을 준비하였다. 실시예 8에 기재한 바와 같이 ISVD 작제물의 존재에 대해 ELISA에 의해 혈청 샘플을 분석하였다. 결과는 도 7에 도시되어 있다. 기계론적 PBPK 모델에서 생체내 엔도솜 FcRn 친화도를 추정함으로써 반감기 값을 얻었고, 표 15에 보고하였다.

[0916] T0263018B11 또는 T0263018B11의 돌연변이체를 포함하는 다가 ISVD 작제물은 대조군(IRR00245) ISVD 작제물에 비해 개선된 반감기를 나타냈다.

표 15

Tg32 마우스에서 평가한 다가 ISVD 작제물의 형식 및 계산된 반감기

	IRR00245	T02601230	T02601233	T026301234	T026301220
형식	$(IRR)_5$	FcRn-$(IRR)_4$	FcRn-$(IRR)_4$	FcRn-$(IRR)_4$	$(FcRn)_2$-$(IRR)_3$
$T_{1/2}$ (시간)	15	48	41	102*	49

* 불량한 곡선 적합도로 인해 불확실성 정도가 더 높음

[0917]

[0918] 6.13 실시예 13: 본 발명의 폴리펩타이드 작제물의 조성물

[0919] 6.13.1 본 발명의 특정 실시형태에 따른 폴리펩타이드에서의 Fc 도메인

[0920] 본 발명에 따른 폴리펩타이드(다중특이적 폴리펩타이드, 위에 기재한 바와 같음)는 본 명세서에 기재한 바와 같이 IgG의 Fc 도메인을 더 포함할 수 있다. IgG의 Fc 도메인은 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 G 중쇄의 C-말단의 비항원 결합 영역을 지칭한다. 특정 실시형태에서, Fc 도메인은 천연 Fc 영역일 수 있으며, 즉, 천연 항체에서 발생되는 것과 같거나, 이는 천연 Fc 도메인에 비해 하나 이상의 변경, 돌연변이 또는 변이를 포함하는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 특정 실시형태에서, IgG의 Fc 도메인은 또한 천연 Fc 도메인의 단편 또는 변이체 Fc 도메인의 단편일 수 있다.

[0921] 6.13.1.1. 면역글로불린 G(IgG)의 천연(즉, 야생형) Fc 도메인

[0922] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드는 인간 IgG의 천연 Fc 도메인, 예컨대, 바람직하게는 인간 IgG4의 천연 Fc(예를 들어, Uniprot 서열 P01861, 서열번호 129)를 포함한다. 적어도 하나의 이러한 천연 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하였고, 유리한 PK 특성에 대해 시험한다.

[0923] 6.13.1.2. 감소된 효과기 기능을 갖는 변이체 Fc 도메인

[0924] 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 비변형 모체 Fc 분자에 비해 Fc 리간드에 대해 변경된 결합 특성을 갖는 변이체 Fc 도메인을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호 및 제5,648,260호(둘 다 Winter 등)에 기재된 바와 같이 변이체 Fc 영역이 효과기 리간드, 예를 들어, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분에 대해 변경된 친화도를 갖도록, 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드는 상이한 아미노산 잔기로 치환되는 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322 중 하나 이상을 갖는 Fc 영역을 포함할 수 있다.

[0925] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 감소된 효과기 기능을 갖는 Fc 변이체 도메인, 특히 잔기 234 및 235의 알라닌으로의 치환을 갖는 소위 "FALA" 또는 "LALA" Fc 돌연변이체를 포함한다. 추가 선택적 돌연변이는 아르기닌 잔기 409의 리신으로의 치환, 리신 잔기 447의 결실을 포함한다. 다른 실시형태에서, Fc 변이체 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 소위 "FALA" 돌연변이 및 돌연변이 S228P을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 "pFALA"로 지칭된다.

[0926] 위의 돌연변이를 갖는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하였고, 아래의 실시예 16에 기재하는 바와 같이 유리한 PK 특성에 대해 시험한다.

[0927] 6.13.1.3. FcRn 수용체에 대해 개선된 결합 친화도를 갖는 IgG의 변이체 Fc 도메인

[0928] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 천연 Fc 도메인에 비해 FcRn 수용체에 대해 개선된 결합을 나타내는 Fc 변이체 도메인을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기 259, 308, 428 및 434 중 하나 이상에서 치환을 갖는 것을 포함한다. FcRn에 결합하는 Fc를 증가시키는 다른 변이체는 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L(Hinton *et al.*, 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton *et al.*, 2006, Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A(Shields *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604)를 포함한다.

[0929] 소정의 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 Fc 변이체 도메인을 포함하되, 메티오닌 428은 리신으로 치환되고, 아스파라긴 434는 세린으로 치환된다.

[0930] 위의 돌연변이를 갖는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하고, 같이 유리한 PK 특성에 대해 시험한다.

[0931] 6.13.1.4. FcRn 수용체에 대해 감소된 결합을 갖거나 결합이 없는 IgG의 변이체 Fc 도메인

[0932] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 천연 Fc 도메인에 비해 FcRn 수용체에 대해 감소된 결합을 나타내거나 결합을 나타내지 않는 Fc 변이체 도메인을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기 253, 310 및 453 중 하나 이상에서 치환을 갖는 것을 포함한다.

[0933] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 Fc 변이체 도메인을 포함하되, 아이소류신 428은 알라닌으로 치환되고, 히스티딘 310은 알라닌으로 치환되고, 히스티딘 453은 알라닌으로 치환되며, 선택적으로 히스티딘 453이 알라닌으로 치환되는 것과 조합된다.

[0934] 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 생산하였고, 유리한 PK 특성에 대해 시험한다.

[0935] 6.14 실시예 14: FcRn 결합 ISVD 및 IgG4 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질 작제물의 생성 및 발현

[0936] 당업계에 통상적으로 알려진 노브-인-홀(Knob-in-Hole) 기술을 사용하여 IgG4의 Fc 도메인에 연결된 FcRn 결합 Nanobody®VHH(ISVD)의 비대칭 융합 단백질을 생성하였다(예를 들어, Genentech에 의한 특허 공개 WO 1996/27011뿐만 아니라 문헌[Ridgway, J B *et al.*, "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization." Protein engineering 9,7 (1996): 617-21 및 Merchant *et al.*, "*An efficient route to human bispecific IgG*" Nature Biotechnology 16, (1998): 677-681]에 의한 과학적 간행물에 기재된 바와 같음).

[0937] 특정 BpiI 제한 부위를 각각 지니는 정방향 및 역방향 프라이머의 특정 조합에 의한 PCR에 의해 얻은 IgG4의 FcRn 결합 Nanobody® VHH 및/또는 대조군 Nanobody® VHH 및 Fc 도메인의 DNA 단편을 Golden Gate 클로닝을 통해 적절한 발현 벡터에서 클로닝하였다(Engler C, Marillonnet S. Golden Gate cloning. Methods Mol Biol. 2014;1116:119-31). Sanger 서열 확인 후에, 이어서, 단백질 생산을 위해 플라스미드 DNA를 CHOEBNALT85 세포(QMCF Technology)에 형질감염시켰다. Nanobody®VHH-Fc 융합 단백질을 단백질 A 포획 단계 다음에 이온 교환

및/또는 크기 배제 크로마토그래피 정제 단계를 사용하여 세포 상청액으로부터 정제하였다.

[0938] 작제물에서 Fc 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 노브 인 홀 돌연변이를 갖는 IgG4 pFALA Fc 골격 서열 변이체(소위 FALA 돌연변이 및 돌연변이 S228P을 갖는 Fc 변이체)인 반면, 사용한 FcRn Nanobody®VHH는 각 경우에 본 명세서에 기재한 바와 같은 T0263018B11 서열이었다. 이러한 융합 단백질에서 Nanobody® VHH 서열을 링커(본 명세서에서 상세하게 기재한 바와 같음)를 통해 Fc 사슬의 *N*- 및/또는 *C*-말단에, 즉, IgG1 힌지(즉, 각각 서열번호 126 및/또는 GS 링커, 즉, 35GS, 서열번호 48 참조(도 8 참조))를 통해 융합시켰다. 이러한 작제물 중 하나(즉, TP049)는 도 8에서 IgG Fc(IHH)로 표시된 바와 같은 Fc 골격 서열에서의 추가 아미노산 차이 또는 변이(즉, I253A, H310A, H435A)를 포함한다. Fc 도메인을 통해 FcRn에 대한 결합을 나타내지 않는 작제물을 시험하기 위해 이런 Fc 서열 변이체를 제조하였고, 비결합 Fc-변이체로서 본 명세서에서 추가로 언급할 것이다. 대조군으로서, FcRn에 결합하는 Nanobody® VHH를 FcRn 또는 임의의 다른 예상되는 표적에 결합하지 않는 Nanobody® VHH(즉, FcRn에 결합하지 않는 2개의 Nanobody®VHH에 연결된 IgG4 pFALA Fc 골격 서열의 변이체, 예를 들어, 도 8, 작제물 TP003 및 TP008 참조)로 대체한 것을 제외하고, 동일한 조성의 시험 작제물을 포함하는 Nanobody®VHH-Fc 융합 단백질을 생성하였다.

[0939] **6.15 실시예 15: Nanobody®VHH(ISVD)-Fc 융합 폴리펩타이드 작제물(IgG4 pFALA)의 FcRn 결합 연구**

[0940] 위에 기재된 바와 같이 상응하는 시험 작제물(TP003, TP008, TP048, TP049 및 TP050)과 유사한 크기(즉, 분자량)를 생성하기 위해 (i) FcRn에 특이적으로 결합하는 Nanobody® VHH(SVD) 및 (ii) FcRn 또는 임의의 다른 예상되는 표적에 결합하지 않지만 폴리펩타이드 작제물에만 포함된 Nanobody® VHH(ISVD)에 연결된 IgG4 Fc 도메인으로 전형적으로 이루어진 일련의 Nanobody®VHH (ISVD)-Fc 융합 단백질을 생성하였다.

[0941] Nanobody®VHH-Fc 단백질을 Biacore 8K+ 기기 상에서 pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 FcRn에 대한 친화도 측정에 의해 특성규명하였다. 친화도 측정을 위해, 대략 80 RU의 바이오티닐화된 인간 FcRn을 Series S 센서 칩 SA 상에서 포획하였다. Nanobody®VHH-Fc 융합 단백질을 9개의 상이한 농도(0.5 내지 1500 nM)에서 주사하였고, 120s 동안 30 ㎕/분으로 결합시키고, 600 s 동안 해리시켰다. 센서그램의 평가는 Bivalent Analyte 적합화에 기반하였다. pH 6.0 및 pH 7.4에서 인간 FcRn에 대한 친화도를 표 16 및 표 17에 나타낸다. 모든 작제물은 pH 6.0 및 pH 7.4에서 FcRn에 대한 특이적 결합을 나타냈다.

표 16

pH 6.0에서 **Nanobody®VHH (ISVD)-Fc** 융합 작제물의 FcRn 친화도

[0942]

단일 주기 동력학 1 용액	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	ka2 (1/RUs)	kd2 (1/s)	KD1 (M)	KD2 (M)
TP003	1.4E+05	2.2E-01	8.3E-05	4.9E-04	1.5E-06	5.9E+00
TP048	3.0E+04	9.0E-03	4.0E+01	5.5E+01	3.0E-07	1.4E+00
TP049	1.3E+04	1.8E-03	1.1E-03	3.2E-02	1.4E-07	2.9E+01
TP050	2.3E+04	5.2E-03	2.1E+01	2.5E+01	2.2E-07	1.2E+00

표 17

pH7.4에서 **Nanobody®VHH (ISVD)-Fc** 융합 작제물의 FcRn 친화도

단일 주기 동력학 1 용액	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	ka2 (1/RUs)	kd2 (1/s)	KD1 (M)	KD2 (M)
TP003	*9.3E+05*	*1.8E+01*	*5.4E-05*	*2.3E-04*	*1.9E-05*	*4.3E+00*
TP048	1.6E+04	5.6E-02	1.2E-05	7.8E-04	3.5E-06	6.4E+01
TP049	8.6E+03	5.0E-02	1.1E-06	1.2E-06	5.8E-06	1.1E+00
TP050	7.5E+03	6.0E-02	4.1E-05	3.7E-04	8.0E-06	9.1E+00

이탤릭체 및 밑줄 표시: 표시 값

[0943]

[0944] FcRn의 다양한 코팅 밀도(대략 80, 대략 500, 대략 1500, 대략 3000, 대략 5000 RU)를 사용하여 Biacore 8K+ 기기 상에서 pH 6.0 및 pH 7.4에서 오프 속도 분석을 수행하였다. FcRn 결합 Nanobody® VHH T0263018B11 및 무손상 Fc(작제물 TP048 및 TP050)를 포함한 Fc-융합 작제물의 경우에, 표면 상의 FcRn 밀도가 증가된 경우에(최대 5000 RU, 도 9 참조) 오프 속도(kd1)는 더 느렸고, 이는 Nanobody® VHH T0263018B11 및 Fc 도메인에 의한 동시 FcRn 결합을 통한 결합활성 효과를 시사한다. 이런 더 느린 오프 속도는 비결합 Fc-변이체 도메인을 포함하는 TP049에 대해서는 검출되지 않았다(표 18 및 표 19).

표 18

pH 6.0에서 인간 FcRn의 다양한 밀도에 대해 결정한 **Nanobody®VHH-Fc** 융합 작제물의 오프 속도

	~80 RU		~500 RU		~1500 RU		~3000 RU		~5000 RU	
	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})
TP048	9.0E-03	5.5E+01	5.6E-04	3.2E+01	2.1E-04	2.2E-02	8.1E-05	7.7E-03	3.2E-05	1.7E-02
TP049	1.8E-03	3.2E-02	1.7E-03	3.9E-02	9.3E-04	1.5E-04	9.3E-04	6.4E-06	7.5E-04	1.0E-04
TP050	5.2E-03	2.5E+01	5.8E-04	2.9E+01	3.8E-04	1.5E+00	1.8E-04	4.3E-03	2.4E-05	2.0E-02
TP008	6.5E-01	1.9E-02	2.0E-02	5.1E+01	1.3E-02	6.4E-04	5.7E-03	2.1E-03	5.6E-03	2.5E+00

[0945]

표 19

pH 7.4에서 인간 FcRn의 다양한 밀도에 대해 결정한 **Nanobody®VHH-Fc** 융합 작제물의 오프 속도

	~80 RU		~500 RU		~1500 RU		~3000 RU		~5000 RU	
	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})	kd1 (s^{-1})	kd2 (s^{-1})
TP048	5.6E-02	7.8E-04	4.1E-02	1.4E-03	1.1E-02	2.3E-03	5.6E-03	2.4E-03	2.8E-03	6.6E-06
TP049	5.0E-02	1.2E-06	5.1E-02	9.9E-02	4.9E-02	9.8E-05	4.1E-02	2.8E-03	4.6E-02	2.5E-01
TP050	6.0E-02	3.7E-04	*1.1E-03*	*2.5E+00*	1.2-E-02	1.4E-03	6.4E-03	2.3E-03	3.4E-03	6.4E-07
TP008	*4.5E-03*	*2.5E+00*	2.6E-01	3.2E-04	1.9E-01	3.7E-04	2.2E-01	1.7E-03	*2.3E-02*	*2.6E-02*

이탤릭체 및 밑줄 표시: 표시 값

[0946]

[0947] 6.16 실시예 16: 혈청 PK 분석의 개발 및 최적화

[0948] 6.16.1 실시예 16.1. 마우스 혈청에서 ISVD-IgG4 Fc 융합 폴리펩타이드의 검출을 위한 분석

[0949] Nanobody®VHH(ISVD)-IgG4 Fc 융합 폴리펩타이드를 검출하기 위해 사내에서 특이적이고 민감한 리간드-결합 분석을 개발하였다. 스트렙타비딘-코팅 MSD GOLD 96-웰 SMALLSPOT® 플레이트(Meso Scale Discovery)를 30분 동안 RT에서 Superblock T20™(Thermo Scientific)로 차단하였다. 이어서, 플레이트를 세척하였고, 각 작제물에서 사용한 ISVD 모이어티의 프레임워크로 향하는 2.0 μg/mℓ 바이오티닐화된 일반 mAb와 함께 RT 및 600 rpm에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 풀링한 마우스 혈청에서 캘리브레이터 및 QC를 준비하였다. 플레이트를 세척한 후에, 캘리브레이터, QC 및 샘플을 PBS 0.1% 카세인 중 20 내지 100(작제물에 따름)의 MRD로 적용하였고, RT 및 600 rpm에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 후에, 플레이트를 평가 중인 형식에 따라 특정 ISVD 모이어티로 향하는 2.0 μg/mℓ 설포-표지된 mAb와 함께 1시간 동안 RT 및 600 rpm에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척한 후에, 2x MSD 판독 완충제(Meso Scale Discovery)를 첨가하고, 플레이트를 Sector Imager Quickplex SQ 120(Meso scale Discovery) 상에서 판독한다. 인간 IgG의 혼합물(hIVIG; Privigen®)을 사용하여 내인성 IgG 경쟁을 모방하는 생체내 실험을 위해, hIgG 분석 간섭을 평가하였다.

[0950] 6.16.2 실시예 16.2. ISVD - IgG4 Fc 융합체에 의한 마우스에서의 약물동력학

[0951] 4 내지 6마리의 Tg32 마우스(B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT) 32Dcr/DcrJ)에 5 mg/kg ISVD-Fc 융합체를 꼬리에 정맥내로 주사하였다. ISVD-Fc 작제물은 FcRn 결합을 없애는 돌연변이 I253A, H310A, H435A(IHH)를 갖는 TP049를 제외하고, 동일한 IgG Fc로 이루어졌다. Fc 작제물을 2개의 ISVD 도메인, 즉, 2개의 비표적화 ISVD(음성 대조군; TP003) 또는 1개의 비표적화 ISVD 및 1개의 FcRn-표적화 ISVD(TP048, TP049 및 TP050, 도 8 및 실시예 14 참조)에 유전적으로 융합시켰다.

[0952] 다양한 시점(시점당 2마리 마우스)에서 혈액을 채취하였고, 혈청을 준비하였다. 실시예 15에 기재한 바와 같이 Nanobody®VHH-Fc 융합체의 존재에 대해 리간드 결합 분석에 의해 혈청 샘플을 분석하였다. 결과를 도 10에 나타낸다.

[0953] Plasma 데이터 모듈을 사용하여 Phoenix WinNonlin®(버전 8.2.2.227. Certara)에서 비구획 분석으로부터 PK 매개변수를 얻었다. 반감기 값을 표 20에서 보고한다.

[0954] 본 발명자들은 IgG Fc 도메인에 대한 FcRn-결합 ISVD의 *N*- 또는 *C*-말단의 융합체가 Fc 도메인의 반감기를 유의미하게 연장시킨다는 결과로부터 결론을 내릴 수 있다. 대조군 작제물(TP003)에 대한 134시간과 비교하여 FcRn ISVD(각각 TP048 및 TP050)를 포함하는 작제물의 경우 174 내지 185시간의 반감기가 관찰되었다. Fc 도메인에 돌연변이 I253A, H310A, H435A(IHH)를 갖는 항체는 FcRn에 대해 극적으로 감소된 결합 및 결과적으로 매우 짧은

생체내 반감기(TP049)를 나타낸다. FcRn에 결합하지 않도록 변형된 Fc(IHH 돌연변이된 Fc)에 대한 FcRn-결합 ISVD의 융합체는 Fc 치료제와 일치되는 반감기가 회복된다.

표 20

Tg32 마우스에서 평가한 ISVD-Fc 작제물의 형식 및 계산된 반감기.

	TP003	**TP049**	**TP048**	**TP050**
Fc	IgG4	IgG4(IHH)	IgG4	IgG4
$T_{1/2}$ (시간)	134	92.8	174	185

[0955]

[0956] **7. 산업상 이용가능성**

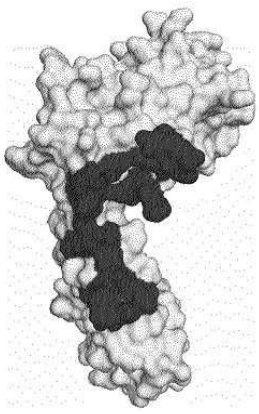
[0957] 본 발명은 산업상 활용 가능하다. 산업상 응용 및 실제 활용은 당업자의 일반적 지식에 의해 본 설명으로부터 도출될 수 있다.

도면

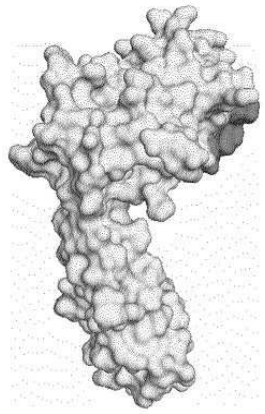
도면1

인간 FcRn	서열번호 1	**AESHL**SLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLG**P**QQYLSYNSLRGEAEPCGAWVWENQVSWYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALG GKGPYTLQGLLGC**ELGPDNT**SVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAISQRWQQQDKAANKELTFLLFSCPHRL**R** EH**L**ERG**R**GN**L**EW**K**EPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSF**YPPELQ**LRFLRNGLAAGTGQGDFGPNSDGSFHASSSLTVKSGDE HHYCCIV**QHA**G**LAQP**LRVELESPAKSS

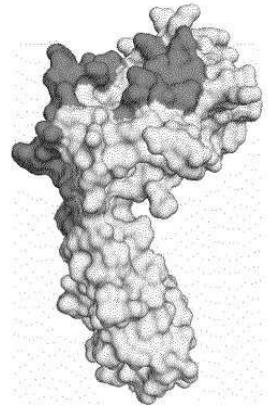
도면2a



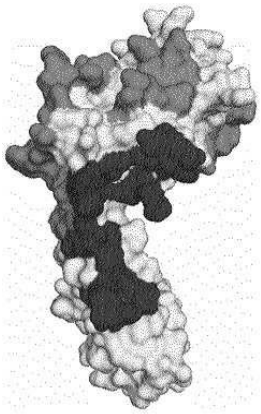
도면2b



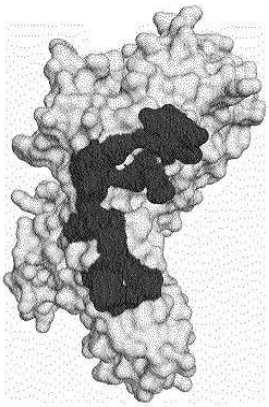
도면2c



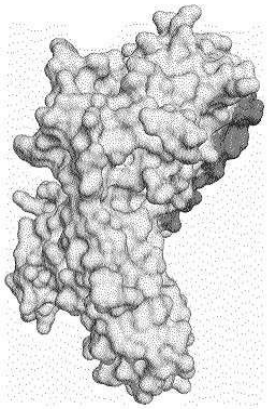
도면2d



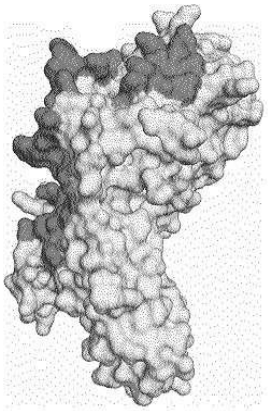
도면3a



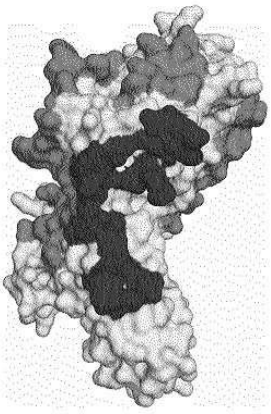
도면3b



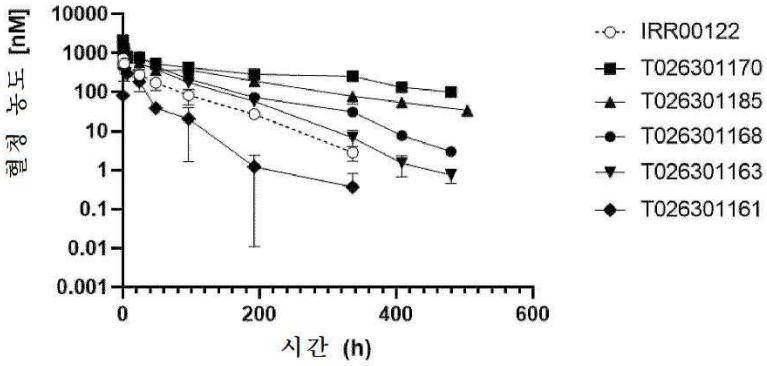
도면3c



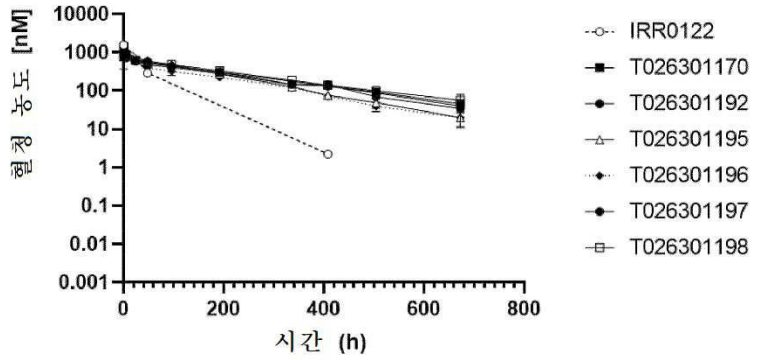
도면3d



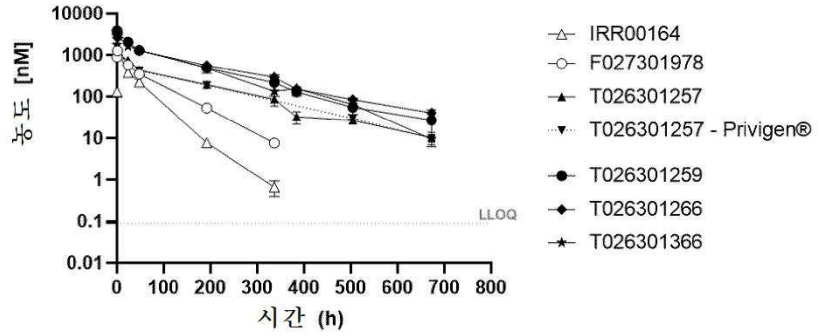
도면4


혈청 농도 [nM]
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
200
400
600
시간 (h)
IRR00122
T026301170
T026301185
T026301168
T026301163
T026301161

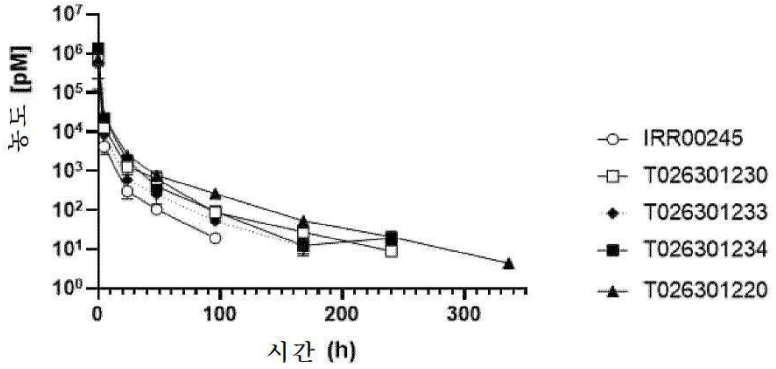
도면5


혈청 농도 [nM]
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
200
400
600
800
시간 (h)
IRR0122
T026301170
T026301192
T026301195
T026301196
T026301197
T026301198

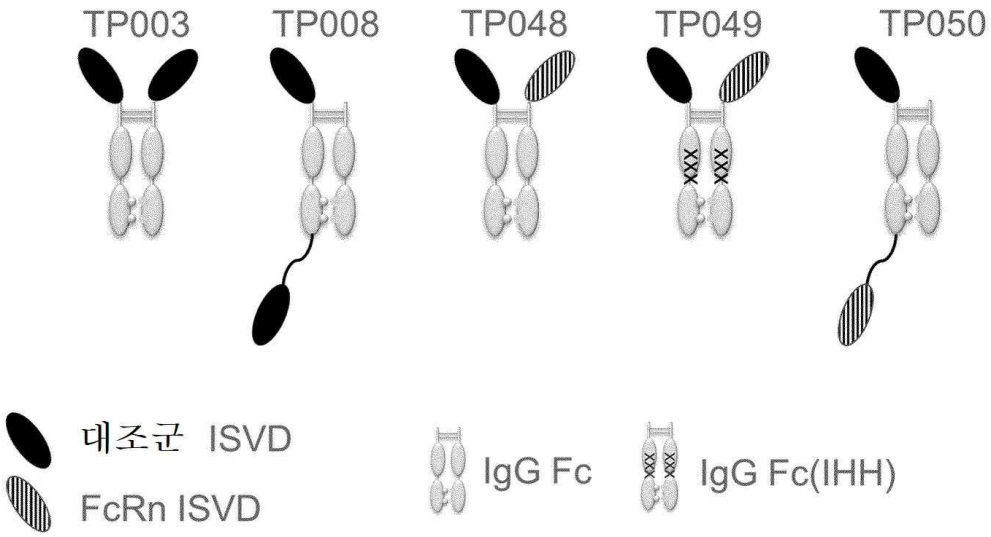
도면6


농도 [nM]
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
LLOQ
0 100 200 300 400 500 600 700 800
시간 (h)
IRR00164
F027301978
T026301257
T026301257 - Privigen®
T026301259
T026301266
T026301366

도면7

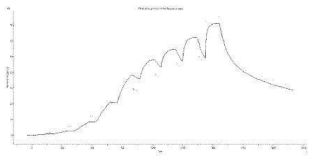
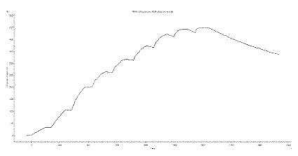
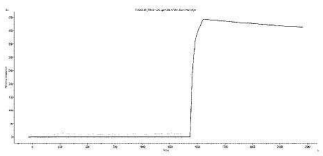
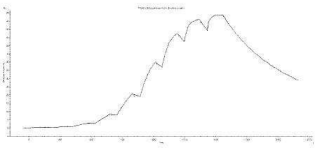
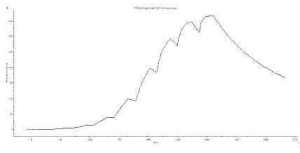
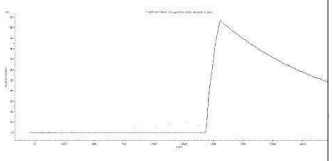

농도 [pM]
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0 100 200 300
시간 (h)
IRR00245
T026301230
T026301233
T026301234
T026301220

도면8

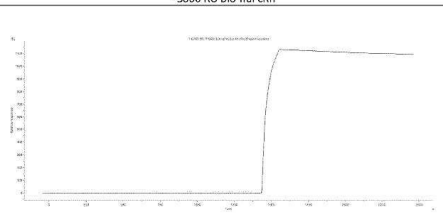
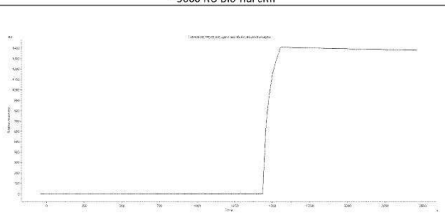
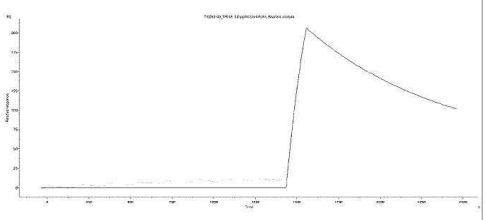
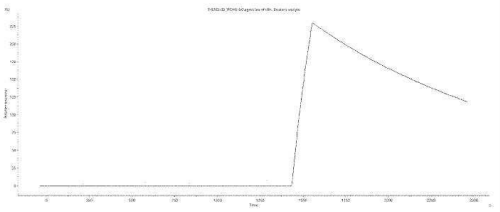

TP003
TP008
TP048
TP049
TP050
대조군 ISVD
FcRn ISVD
IgG Fc
IgG Fc(IHH)

도면9aa

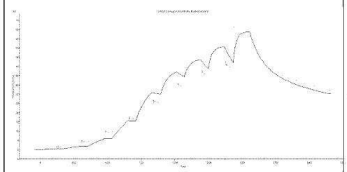
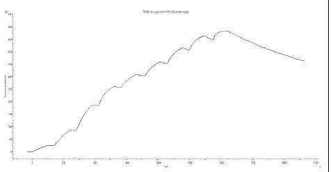
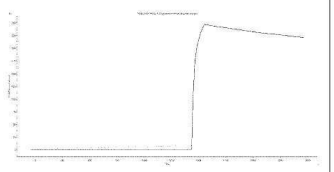
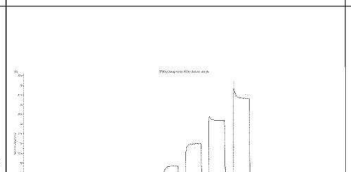
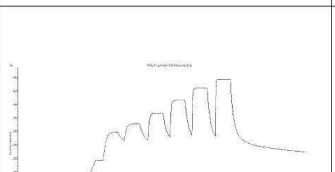
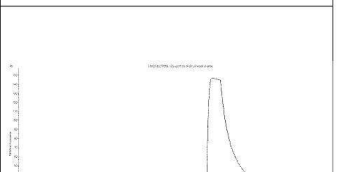
실험 1: CP pH 6.0

	~80 RU Bio-huFcRn (65 내지 110 RU 범위)	~500 RU Bio-huFcRn	~1500 RU Bio-huFcRn
TP048			
	8.98E-03 1/s (5.50E+01 1/s)	5.59E-04 1/s (3.18E+01 1/s)	2.08E-04 1/s (2.15E-02 1/s)
TP049			
	1.81E-03 1/s (3.15E-02 1/s)	1.69E-03 1/s (3.94E-02 1/s)	9.29E-04 1/s (1.49E-04 1/s)

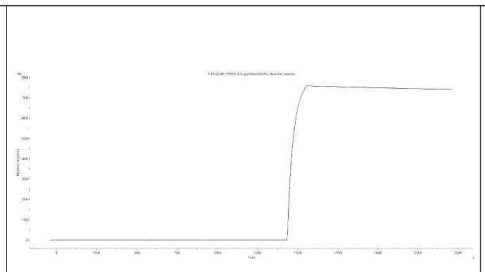
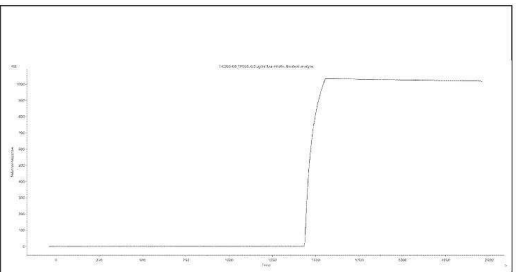
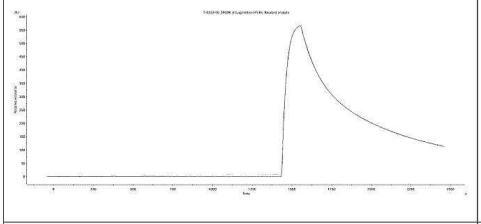
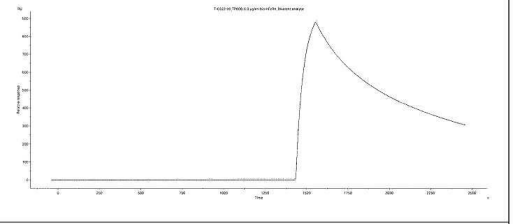
도면9ab

	~3000 RU Bio-huFcRn	~5000 RU Bio-huFcRn
TP048		
	8.05E-05 1/s (7.70E-03 1/s)	3.18E-05 1/s (1.66E-02 1/s)
TP049		
	9.32E-04 1/s (6.40E-06 1/s)	7.51E-04 1/s (1.01E-04 1/s)

도면9ac

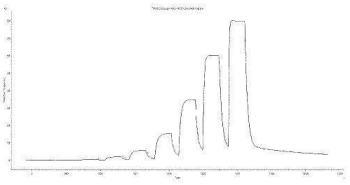
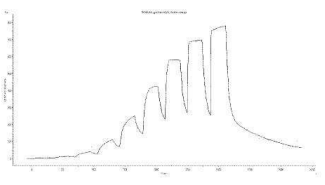
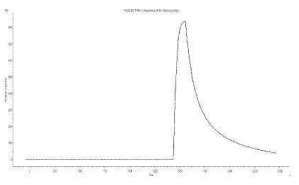
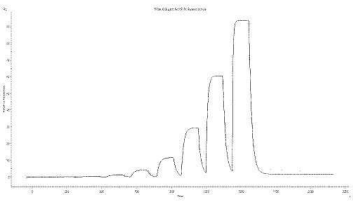
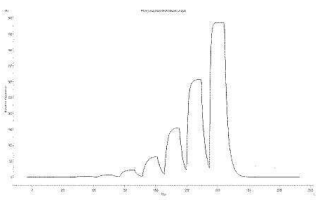
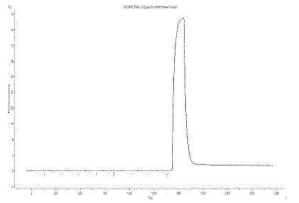
TP050			
	5.22E-03 1/s (2.52E+01 1/s)	5.75E-04 1/s (2.87E+01 1/s)	3.77E-04 1/s (1.54E+00 1/s)
TP008			
	6.45E-01 1/s (1.86E-02 1/s)	1.98E-02 1/s (5.11E+01 1/s)	1.30E-02 1/s (6.44E-04 1/s)

도면9ad

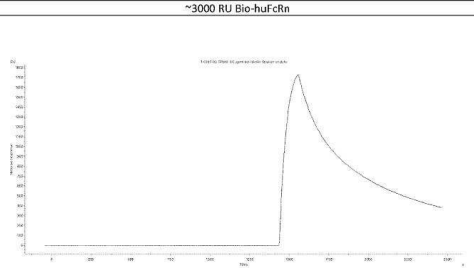
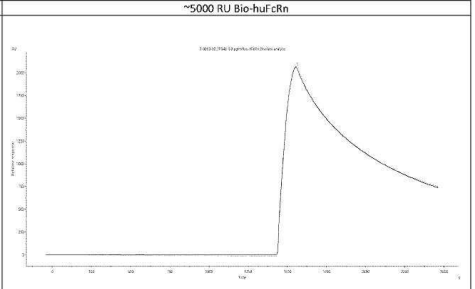
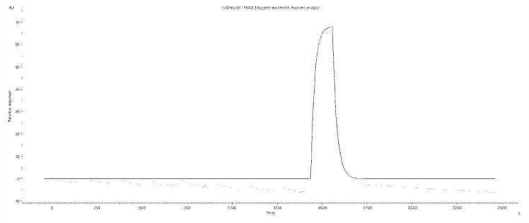
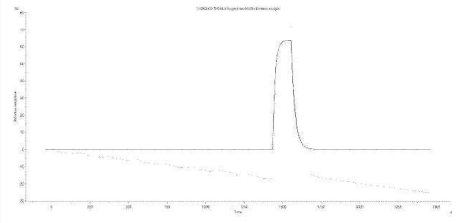
TP050		
	1.80E-04 1/s (4.29E-03 1/s)	2.40E-05 1/s (1.95E-02 1/s)
TP008		
	5.68E-03 1/s (2.13E-03 1/s)	5.60E-03 1/s (2.47E+00 1/s)

도면9ba

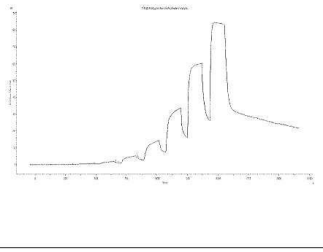
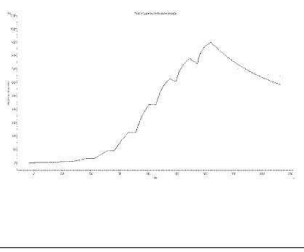
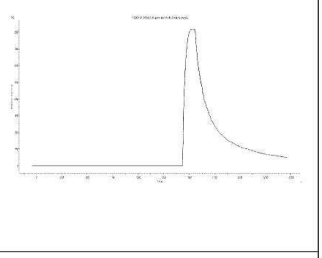
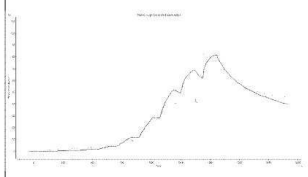
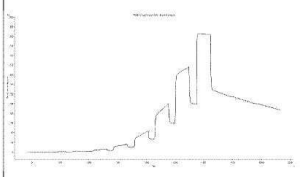
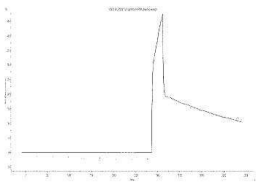
실험 1: CP pH 7.4

	~80 RU Bio-huFcRn (65 내지 110 RU 범위)	~500 RU Bio-huFcRn	~1500 RU Bio-huFcRn
TP048			
	5.55E-02 1/s (7.79E-04 1/s)	4.13E-02 1/s (1.41E-03 1/s)	1.14E-02 1/s (2.33E-03 1/s)
TP049			
	4.98E-02 1/s (1.21E-06 1/s)	5.10E-02 1/s (9.89E-02 1/s)	4.93E-02 1/s (9.82E-05 1/s)

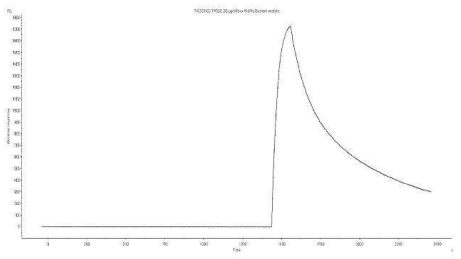
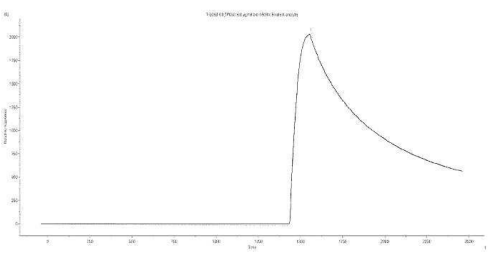
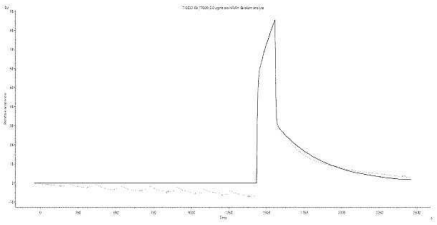
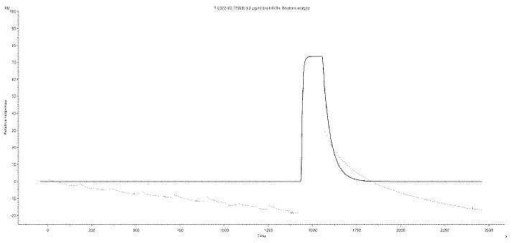
도면9bb

	~3000 RU Bio-huFcRn	~5000 RU Bio-huFcRn
TP048		
	5.58E-03 1/s (2.43E-03 1/s)	2.82E-03 1/s (6.61E-06 1/s)
TP049		
	4.08E-02 1/s (2.83E-03 1/s)	4.25E-02 1/s (2.49E-01 1/s)

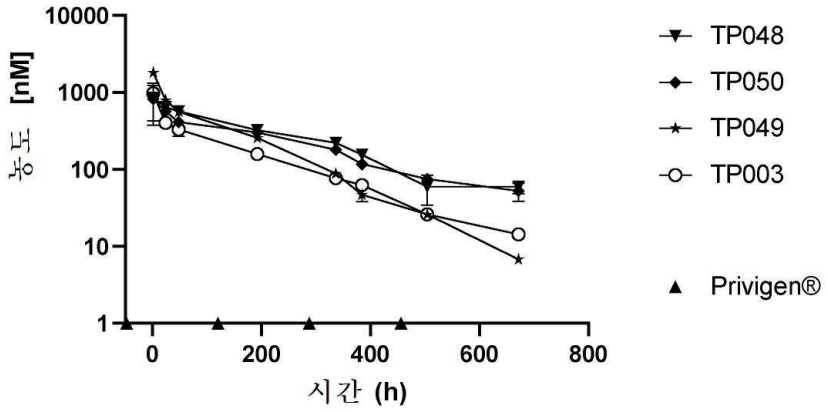
도면9bc

TP050			
	5.97E-02 1/s (3.73E-04 1/s)	1.08E-03 1/s (2.45E+00 1/s)	1.22-E-02 1/s (1.43E-03 1/s)
TP008			
	4.46E-03 1/s (2.48E+00 1/s)	2.61E-01 1/s (3.24E-04 1/s)	1.90E-01 1/s (3.67E-04 1/s)

도면9bd

TP050		
	6.37E-03 1/s (2.31E-03 1/s)	3.37E-03 1/s (6.41E-07 1/s)
TP008		
	2.22E-01 1/s (1.66E-03 1/s)	2.25E-02 1/s (2.59E-02 1/s)

도면10


10000
1000
100
10
1
농도 [nM]
0
200
400
600
800
시간 (h)
TP048
TP050
TP049
TP003
Privigen®

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.