



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0112497  
(43) 공개일자 2014년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)  
A61K 47/48 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-7018724  
(22) 출원일자(국제) 2013년01월10일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2014년07월07일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/021041  
(87) 국제공개번호 WO 2013/106577  
국제공개일자 2013년07월18일  
(30) 우선권주장  
61/585,039 2012년01월10일 미국(US)

(71) 출원인  
바이오젠 아이텍 엠에이 인코포레이티드  
미국 매사추세츠 02142 캠프리지 캠프리지 센터 14  
(72) 발명자  
파랑턴 그라함 케이.  
미국 01720 매사추세츠주 액턴 앨콘퀸 로드 1  
시스크 윌리엄 피.  
미국 01719 매사추세츠주 박스보로우 조셉 로드 280  
(74) 대리인  
김성기, 김진희

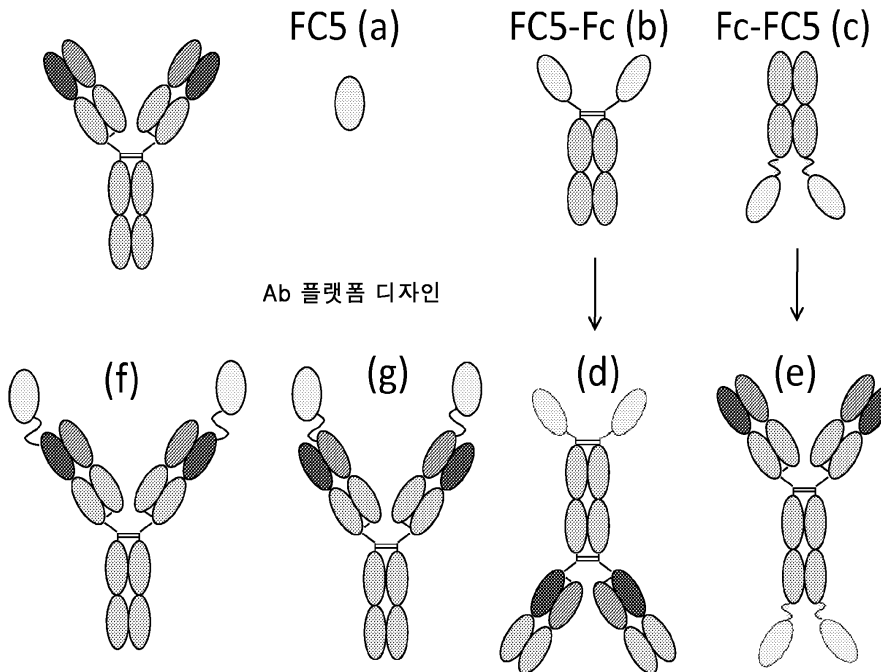
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **뇌혈관 장벽을 통한 치료학적 분자의 수송 개선법**

(57) 요약

본 발명은 적어도 부분적으로, BBB 이전 (transmigrating) 항체 (예: TMEM30A (CDC-50A) 결합 항체, FC5)의 이합체성 버전이 1가 FC5 V<sub>H</sub>에 비교하는 경우 BBB를 통한 수송을 상당히 개선하는 것으로 밝혀진 발견을 기반으로 한다. 본 발명은 특히, 뇌혈관 장벽을 통해 약물학적 활성 제제의 수송을 증가시키는 분자, 뇌혈관 장벽을 통해 수송을 증가시키는 방법, 및 신경학적 요소를 갖는 장애 또는 질환의 치료 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

적어도 하나의 약물학적 활성 제제(pharmacologically active agent) 및 TMEM30A에 결합되는 적어도 하나의 결합 부위를 포함하고, 여기서 TMEM30A에 결합되는 적어도 하나의 결합 부위는 Fc 잔기의 N-말단에 i) 직접적으로 또는 ii) 개재 아미노산 서열(intervening amino acid sequence)을 통해 융합되는 결합 분자.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 결합 분자가 적어도 두 개의 결합 부위를 포함하는 결합 분자.

### 청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 적어도 하나의 결합 부위가 FC5 아미노산 서열을 포함하는 결합 분자.

### 청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 적어도 하나의 결합 부위가 FC5 아미노산 서열로 이루어지는 결합 분자.

### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 결합 분자가 TMEM30A에 결합되는 적어도 두 개의 결합 부위를 포함하는 결합 분자.

### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 결합 분자가 TMEM30A에 결합되는 적어도 세 개의 결합 부위를 포함하는 결합 분자.

### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 결합 분자가 TMEM30A에 결합되는 적어도 네 개의 결합 부위를 포함하는 결합 분자.

### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 TMEM30A 결합 부위가 Fc 잔기에 유전적으로 직접 융합되는 결합 분자.

### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 TMEM30A 결합 부위가 펩티드 링커를 포함하는 개재 아미노산 서열을 통해 Fc 잔기에 유전적으로 융합되는 결합 분자.

### 청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 TMEM30A 결합 부위가 펩티드 링커로 이루어진 개재 아미노산 서열을 통해 Fc 잔기에 유전적으로 융합되는 결합 분자.

### 청구항 11

청구항 2에 있어서, 두 개의 TMEM30A 결합 부위가 펩티드 링커를 포함하는 아미노산 서열을 통해 완전한 Fc 영역의 두 개의 상이한 Fc 잔기의 N 말단에 융합되는 결합 분자.

### 청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 TMEM30A 결합 부위가 scFc 분자의 N 말단에 융합되는 결합 분자.

### 청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제가 Fc 영역의 C-말단에 융합되는 결합 분자.

**청구항 14**

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제가 작은 화학적 기능체 (chemical entity)인 결합 분자.

**청구항 15**

청구항 13에 있어서, 상기 작은 화학적 기능체가 시스테인 잔기에서 결합 분자에 융합되는 결합 분자.

**청구항 16**

청구항 14에 있어서, 상기 시스테인 잔기가 조작된(engineered) 시스테인 잔기인 결합 분자.

**청구항 17**

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제가 폴리펩티드인 결합 분자.

**청구항 18**

청구항 17에 있어서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제가 항원 결합 부위를 포함하는 결합 분자.

**청구항 19**

청구항 18에 있어서, 상기 항원 결합 부위가 비-TMEM30 결합 항체로부터 유래되는 결합 분자.

**청구항 20**

청구항 19에 있어서, 상기 약물학적 활성 제제가 scFv 분자, Fab 분자 및 단일 도메인 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 결합 분자.

**청구항 21**

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제가 결합 분자에 유전적으로 융합되는 결합 분자.

**청구항 22**

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제가 결합 분자에 공유결합되는 결합 분자.

**청구항 23**

청구항 1에 있어서, 상기 결합 부위가 항체 분자의 VH 도메인을 포함하는 개재 아미노산 서열을 통해 유전적으로 융합되는 결합 분자.

**청구항 24**

청구항 1에 있어서, 상기 결합 부위가 항체 분자의 VL 도메인을 포함하는 개재 아미노산 서열을 통해 유전적으로 융합되는 결합 분자.

**청구항 25**

청구항 23에 있어서, 상기 적어도 하나의 TMEM30A 결합 부위가 온전한(intact) 항체 분자의 VH 도메인의 N 말단에 유전적으로 융합되는 결합 분자.

**청구항 26**

청구항 24에 있어서, 상기 적어도 하나의 TMEM30A 결합 부위가 온전한 항체 분자의 VL 도메인의 N 말단에 유전적으로 융합되는 결합 분자.

**청구항 27**

청구항 1에 있어서, 두 개의 결합 부위가 온전한 항체 분자의 VH 도메인 및 VL 도메인의 N 말단에 유전적으로

융합되는 결합 분자.

**청구항 28**

청구항 23 또는 청구항 24에 있어서, 상기 개재 아미노산 서열이 펩티드 링커를 추가로 포함하는 결합 분자.

**청구항 29**

청구항 1에 있어서, 상기 억제학적 활성 제제가 신경활성 펩티드, 작은 화학적 기능체, 및 중추신경계에서 표적에 결합되는 항체의 가변 영역으로 이루어진 균으로부터 선택되는 결합 분자.

**청구항 30**

대상자에 청구항 1 내지 청구항 29 중 어느 한 항의 결합 분자를 투여함을 포함하는 신경학적 장애의 치료 방법.

**청구항 31**

청구항 30에 있어서, 상기 신경학적 장애가 축적 장애 (storage disorder)인 방법.

**청구항 32**

청구항 30에 있어서, 상기 신경학적 장애가 만성 통증인 방법.

**청구항 33**

청구항 30에 있어서, 상기 신경학적 장애가 간질인 방법.

**청구항 34**

청구항 30에 있어서, 상기 신경학적 장애가 다발성 경화증인 방법.

**청구항 35**

청구항 30에 있어서, 상기 신경학적 장애가 프로테이노포시 (proteinopathy)인 방법.

**청구항 36**

청구항 30에 있어서, 상기 장애가 탈수초성 장애인 방법.

**청구항 37**

신경학적 장애 치료용 약제의 제조에 있어서의 청구항 1 내지 청구항 29 중 어느 한 항의 결합 분자의 용도.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 특히, 뇌혈관 장벽을 통해 약물학적 활성 제제의 수송을 증가시키는 분자, 뇌혈관 장벽을 통해 수송을 증가시키는 방법, 및 신경학적 요소를 갖는 장애 또는 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 신체를 통한 거대분자들의 분포는 모세혈관 맥관구조의 고도로 유창된(fenestrated; 다수의 원형 소공을 갖는) 내피세포를 통해 조직으로 확산되는 혈액 중 거대분자에 의해 매개되는 일반적인 확산이다. 거대분자의 자유 확산은 상당히 혈관화된 뇌에는 존재하지 않는다. 뇌의 모세혈관 내피세포들은 순환계의 나머지에서 보여지는 유창들이 결여되어 있고, 상당히 전문화된 내피세포를 단단히 조이는 세포내 연결을 갖는다. 이들 단단한 연결은 모세혈관의 루미날(luminal)로부터 암루미날(abluminal) 면까지 400 kDa을 초과하는 분자의 자유 확산을 방지하는 작용을 한다. 또한, 모세혈관들은 다양한 수송체 시스템, 예를 들면, 내피세포를 통해 달리 확산될 수도 있는 분자의 수송 구배를 활발히 형성하는 유기 음이온 수송체(Organic Anion Transporters) (OATS) 및 다중-약물 내성(Multi-Drug Resistance) (MDR) 시스템을 함유한다. 제한적 장벽의 조합은 치료학적 기능체(entity)의 확산을 제한할 뿐만 아니라, 예를 들면, 독소 및 바이러스를 포함한, 우발적인 제제의 도입

을 방지한다. 또한, 이들 제한적인 뇌혈관 장벽 (BBB)은 잠재적으로 치료학적 단백질, 펩티드 및 소분자의 약물학적으로 치료학적 용량으로 뇌실질로의 수동 전달을 효과적으로 차단한다.

[0003] BBB 내피세포를 통해 치료학적 분자의 수송을 성취하는 한 성공적인 전략은 수용체 매개성 트랜스시토시스 (receptor mediated transcytosis)(RMT)를 이용해 왔다. 이 전략은 BBB 내피세포를 통한 분자의 수송에 통상 관여되는 BBB 내피세포 상의 단백질에 특이적으로 결합되는 항체 또는 분자들을 이용한다. 상기 항체들은 BBB 내피세포를 통해 트랜스시토시스를 수행하면서, 결합된 탑재물을 전달하는 셔틀 분자로서 사용된다. 이 기술의 적용 예는 트랜스페린 수용체 및 인슐린 수용체에 대한 항체의 이용을 포함한다(Yu et al. 2011. Science Translational Medicine. Volume 3). 이들 두 경우에, RMT 항체들은 치료학적 단백질 도메인에 C-말단으로 융합되었고, BBB를 통해 분자를 수송하는 것으로 밝혀졌다. 불행히도, 통상 사용되는 RMT 표적인 트랜스페린 및 인슐린 수용체들은 수많은 조직에서 고도로 광범위하게 발현된다. 이러한 광범위한 표적 발현으로 순환 반감기가 단축되고, 결국 BBB 내피세포에 대한 노출 시간 및 이에 의한 뇌로 분자의 투여를 제한한다. 또한, 이들 항체는 대사적으로 엄격한 세포 기능을 목표로 함으로써, 잠재적인 안전성 위험을 일으킨다.

[0004] 상기 BBB를 가로지르기 위하여 활성 BBB 수송 분자를 이용하는 개선된 표적 잔기, 예를 들면, 상기 BBB를 통해 이전하는 항체 분자로부터 유래된 결합 부위가 뇌로 치료제를 전달하는데 상당히 유용하다.

### 발명의 내용

[0005] 발명의 요약

[0006] 본 발명은 적어도 부분적으로, 뇌혈관 장벽(BBB) 이전 항체, 예를 들면, TMEM30A (CDC-50A) 결합 항체(예: 단일 도메인 항체 FC5)를 포함하는 융합 단백질이 1가  $V_{HH}$ 에 비하여 상기 BBB를 통한 수송을 상당히 개선하는 것으로 밝혀진 발견을 근거로 한다. 초기 결합 및 BBB 내피 수송 실험들은 FC5, 램다 단일 도메인  $V_{HH}$  항체(sdAb)가 BBB 내피세포층을 통한 수송을 용이하게 할 수 있다고 제시하였다(참조예: 미국 특허 7,943,129).  $V_{HH}$ 의 순환 반감기는 저분자량 및 Fc 도메인의 결여로 인하여 단축되는 것으로 알려져 있다(Jain, M., Kamal, N., and Batra, S. K. (2007) Trends in biotechnology 25(7), 307-316; Batra, S. K., Jain, M., Wittel, U. A., Chauhan, S. C., and Colcher, D. (2002) Current opinion in biotechnology 13(6), 603-608). 놀랍게도, 이 작제물의 순환 반감기는 인간 Fc의 N-말단에 BBB-이전 단일 도메인 항체를 융합시켜 2가 항체 유사 작제물을 생성함으로써 상당히 개선시켰다. Fc 작제물로 상기 결합 부위의 혼입은 세포 표면에서 발현되는 추정 표적(예: TMEM30A)에 결합되는 각각의 결합 잔기를 2가 결합하기 위한 잠재력을 갖는 2가 분자를 생성한다. 2가 결합은 결합활성 효과로 인하여 겉보기 결합 친화성(apparent binding affinity)에 있어서 중요한 변화를 유도할 수 있다(Reynolds, J. A. (1979) Biochemistry 18(2), 264-269; Hubble, J. (1999) Molecular immunology 36(1), 13-18). 본원에서 보여준 바와 같이, 상호작용의 친화성이 증가되었다. 이러한 친화성이 증가됨에 따라, 2가 분자를 형성하기 위한 Fc의 부가로 BBB를 통한 수송이 상당히 증가되었다는 발견은 예상하지 못했다. 증가된 수송은 예상하지 못했는데, 그 이유는 비록 Fc 도메인의 부가가 증가된 질량으로 인하여 베타-상 약동학을 확장시켜 FcRn에 대한 결합에 의해 분자의 신장 여과 및 생체내 항체 재순환의 축진을 방지함에도 불구하고, 개선된 겉보기 친화성은 또한 고도로 발현된 표적에 대한 결합시 순환 결합 분자의 제거로 인하여 반대 효과를 가질 수 있었기 때문이다. 그러나 본원에서 보여준 바와 같이, 가장 놀랍게도, 결합 부위-Fc 형태(아미노로부터 카복시 말단까지, 즉, Fc의 N-말단에 융합된 결합 부위)인 융합 단백질이 Fc-결합 부위 형태(Fc의 C-말단에 융합된 결합 부위)인 것들보다 활성이 더 큰 것으로 밝혀졌다. 이는 Fc-결합 부위 융합 단백질(Fc의 C-말단에 융합된 결합 부위)이 시험관내 초기 실험 수행시 내피세포에 대해 증가된 결합을 나타내었다는 사실에도 불구하고 사실이었다. 결합 부위-Fc 작제물의 1가 버전이 또한 제공된다.

[0007] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 적어도 하나의 약물학적 활성 제제 및 TMEM30A에 결합되는, 적어도 하나의 결합 부위, 예를 들면, BBB 이전 결합 부위를 포함하는 결합 분자에 관한 것으로, 여기서 TMEM30A에 결합되는 적어도 하나의 결합 부위는 Fc 잔기의 N-말단에 i) 직접적으로 또는 ii) 개재 아미노산 서열(intervening amino acid sequence)을 통해 융합된다.

[0008] 한 구현예에서, 결합 분자는 적어도 두 개의 결합 부위를 포함한다.

[0009] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 결합 부위는 FC5 아미노산 서열을 포함한다. 한 구현예에서, 상기 결합 분자는 TMEM30A에 결합되는 적어도 2개 또는 적어도 3개(예를 들면, 2 또는 3개)의 결합 부위를 포함한다. 한

구현예에서, 상기 결합 분자는 TMEM30A에 결합되는 적어도 3개 또는 적어도 4개(예를 들면, 3 또는 4개)의 결합 부위를 포함한다.

- [0010] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 BBB 이전 부위 (예를 들면, BBB를 통해 이전되는 항체 분자로부터 유래된 결합 부위)는 Fc 잔기에 직접 유전적으로 융합된다.
- [0011] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 BBB 이전 부위 (예를 들면, BBB를 통해 이전되는 항체 분자로부터 유래된 결합 부위)는 펩티드 링커를 포함하는 개재 아미노산 서열을 통해 Fc 잔기에 유전적으로 융합된다.
- [0012] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 BBB 이전 부위 (예를 들면, BBB를 통해 이전되는 항체 분자로부터 유래된 결합 부위)는 펩티드 링커로 이루어진 개재 아미노산 서열을 통해 Fc 잔기에 유전적으로 융합된다.
- [0013] 한 구현예에서, 두 개의 BBB 이전 부위 (예를 들면, BBB를 통해 이전되는 항체 분자로부터 유래된 결합 부위)는 펩티드 링커를 포함하는 아미노산 서열을 통해 완전한 Fc 영역의 상이한 두 Fc 잔기의 N 말단에 융합된다.
- [0014] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 BBB 이전 부위 (예를 들면, BBB를 통해 이전되는 항체 분자로부터 유래된 결합 부위)는 scFc 분자의 N 말단에 융합된다.
- [0015] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제는 Fc 영역의 C-말단에 융합된다.
- [0016] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제는 작은 화학적 기능체(chemical entity)이다.
- [0017] 한 구현예에서, 상기 작은 화학적 기능체는 시스테인 잔기에서 결합 분자에 융합된다. 한 구현예에서, 상기 시스테인 잔기는 조작된(engineered) 시스테인 잔기이다.
- [0018] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제는 폴리펩티드이다.
- [0019] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제는 항원 결합 부위 (예를 들면, 비-BBB 이전 항체로부터 유래된 항원 결합 부위)를 포함한다.
- [0020] 한 구현예에서, 상기 약물학적 활성 제제는 scFv 분자, Fab 분자 및 단일 도메인 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0021] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제는 유전적으로 결합 분자에 융합된다.
- [0022] 한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 약물학적 활성 제제는 결합 분자에 공유결합된다.
- [0023] 한 구현예에서, 상기 BBB 이전 부위는 항체 분자의 VH 도메인을 포함하는 개재 아미노산 서열을 통해 유전적으로 융합된다.
- [0024] 한 구현예에서, 상기 BBB 이전 부위는 항체 분자의 VL 도메인을 포함하는 개재 아미노산 서열을 통해 유전적으로 융합된다.
- [0025] 한 구현예에서, 적어도 하나의 BBB 이전 부위는 온전한 항체 분자의 VH 도메인의 N 말단에 유전적으로 융합된다.
- [0026] 한 구현예에서, 적어도 하나의 BBB 이전 부위는 온전한 항체 분자의 VL 도메인의 N 말단에 유전적으로 융합된다.
- [0027] 한 구현예에서, 두 개의 BBB 이전 부위는 온전한 항체 분자의 VH 도메인 및 VL 도메인의 N 말단에 유전적으로 융합된다.
- [0028] 한 구현예에서, 상기 개재 아미노산 서열은 펩티드 링커를 추가로 포함한다.
- [0029] 한 구현예에서, 약제학적 활성 제제는 신경활성 펩티드, 작은 화학적 기능체 및 중추신경계의 표적에 결합되는 항체의 가변 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0030] 한 구현예에서, 본 발명은 대상체에 본 발명의 결합 분자를 투여함을 포함하는, 신경학적 장애의 치료 방법에 관한 것이다.
- [0031] 한 구현예에서, 상기 신경학적 장애는 축적 장애이다. 한 구현예에서, 상기 신경학적 장애는 만성 통증이다. 한 구현예에서, 상기 신경학적 장애는 간질이다. 한 구현예에서, 상기 신경학적 장애는 다발성 경화증이다. 한 구현예에서, 상기 신경학적 장애는 프로테이노포시 질환(disease proteinopathy)이다. 한 구현예에서, 상

기 장애는 탈수초성 장애이다.

[0032] 한 구현예에서, 본 발명은 신경학적 장애 치료용 약제의 제조에 있어서의 본 발명의 결합 분자의 용도에 관한 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0033] 도 1은 억제학적 활성 잔기(d, e)로서 비-BBB 이전 도메인이 포함된 가능한 항체-유사 작제물뿐만 아니라, 인간 IgG1 agly Fc 도메인에 (a) 단독으로, (b) N-말단으로(FC5-Fc) 또는 (c) C-말단으로(Fc-FC5) 융합된 FC5 단일 중쇄 도메인 항체의 다이어그램 표시를 나타낸다. 분자 (f) 및 (g)는 완전 항체 분자에 대한 FC5 단일 중쇄 도메인 항체의 부가를 예시하며; 단일 중쇄 도메인 항체는, 예를 들면, VL 또는 VH 도메인이나, 이 둘 모두에 융합될 수 있다.

도 2. 4-12% Bis-Tris SDS PAGE 상에서 각각 정제된 단백질 2.5 ug의 전기영동이 제시되어 있다. 10-220 kD으로부터의 SDS PAGE 분자량 표준이 각각의 겔 위에 표시된다. 패널 A에는 비환원성 (1) 및 환원성 라인 (2) FC5가 제시되어 있고, 패널 B는 비환원성 (1) 및 환원성 라인 (2) FC5-Fc이며, 패널 C는 비환원성 (1) 및 환원성 라인 (2) Fc-FC5이다.

도 3. 대조군 항체 12F6A (hIgG1), CRL2434 (mIgG1) 및 C37H (단지 V<sub>H</sub>만)에 비하여, 시험관내 SV40 래트 BBB 형질전환된 내피세포주에 대한 FC5Fc, FcFC5 및 FC5의 증가된 수송 속도를 나타낸다.

도 4a-c. 패널 4(a)는 SV40 래트 BBB 형질전환된 내피세포주에 대한 huFc agly 도메인(V<sub>H</sub>-Fc) (△)의 N-말단에 융합된 FC5-Fc (○), Fc-FC5 (■) 또는 무관한 대조군 카멜리드 V<sub>H</sub>의 결합을 나타낸다. 패널 (4b)는 원발성 래트 BBB 내피세포주에 대한 FC5-Fc (○) 및 Fc-FC5 (■)의 결합을 나타낸다. 패널 4c는 EBNA293 세포에서 일시적으로 발현된 래트 (□) 또는 인간 (◇)에 대한 FC5-Fc 및 래트 (▲) 또는 인간 (●) TMEM30A에 대한 Fc-FC5의 결합을 나타낸다.

도 5a-c. 패널 5a는 하그리브즈(Hargreaves) 동물 모델에서 통증을 억제하는, Dalargin에 공유 가교-결합된 FC5(FC5-Dal)의 능력을 나타낸다. 발 회피율(paw withdrawal rate)은 20초 시간 프레임을 기준으로 한 최대 가능 효과(maximum possible effect) 퍼센트 (%MPE)로서 나타낸다. 네가티브 대조군은 대축성 비-염증성 대조군 발에 대한 발 회피율 (●)을 나타내고, 포지티브 대조군은 래트에 PBS 단독과 함께 IV를 주사하는 경우 염증성 발의 신속한 발 회피율 (○)을 나타낸다. 21 mg/Kg (mpk)인 FC5-Dal의 단일 IV 용량 (■)의 효능은 하그리브즈 동물에서 발 회피율을 억제하기 위한 7mpk에서 FC5-Dal의 3개 IV 용량 (□)과 비교한다. 패널 5b는 각각의 평가되는 발에 대해 시간에 대한 %MPE 반응에 대한 곡선 아래에 평균 면적을 나타낸다. 패널 5c는 무관한 V<sub>H</sub>H -Dal (회색 박스) 또는 FC5 단독 (개방형 박스)의 7 mpk와 함께 0, 1시간 및 2시간째에 3개 용량과 함께 IV를 주사한 부가의 네가티브 대조군 실험을 나타낸다. 대축성 대조군 발이 또한 제시되어 있다(밀폐된 원). 발 회피율의 억제에 대한 %MPE는 하그리브즈 동물에서 측정하였다.

도 6a-d. Fc-FC5-Dal의 효능은 하그리브즈 모델에서 평가하였다. 패널 6a에서는 래트에 0시간째에, 그리고 패널 6B에서는 0 및 2시간째에 2mpk로 IV를 투여했다. 패널 6C 및 6D에서, 각각의 래트에 0시간째에 6.5 mpk로 IV를 투여했다.

도 7a-d. FC5-Fc-Dal의 하그리브즈 모델에서 효능은 네가티브 대조군 Fc-Dal과 비교했다. 0시간째에 래트에 0.5, 2.5 또는 6.0 mpk로 FC5-Fc-Dal 또는 Fc-Dal의 단일 농도와 함께 IV를 투여했다. 데이터는 패널 7a 및 7b에서 제시된 시간에 % 최대 가능 효과(MPE) 퍼센트로서 또는 패널 7c 및 7d에서는 곡선 아래 % 면적으로서 제시된다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0034] 발명의 상세한 설명

[0035] 예를 들면, TMEM30A (CDC-50A) (예: FC5 단일 도메인)에 결합되는 적어도 하나의 BBB 이전 단일 도메인 항체를 포함하는 융합 단백질이 1가 V<sub>H</sub>에 비하여 BBB에 대한 수송을 상당히 개선하는 것으로 밝혀졌다. 특히 결합 부위-Fc 형태(아미노산으로부터 카르복시 말단까지)가 개선된 활성을 입증했다. 적어도 부분적으로, 이러한 의미있게 증가된 수송을 근거로 하여, 뇌혈관 장벽을 통한 수송이 증가된 분자, 뇌혈관 장벽을 통한 수송의

증가 방법, 및 상기 분자를 사용하는 치료 방법이 본원에 기술되어 있다.

- [0036] 본 발명의 추가 설명 전에, 편의상, 특정 용어가 하기에 기술되어 있다:
- [0037] I. 정의
- [0038] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 둘 이상의 천연 아미노산 또는 비-천연 아미노산의 중합체를 의미한다.
- [0039] 용어 "아미노산"은 알라닌 (Ala 또는 A); 아르기닌 (Arg 또는 R); 아스파라긴 (Asn 또는 N); 아스파르트산 (Asp 또는 D); 시스테인 (Cys 또는 C); 글루타민 (Gln 또는 Q); 글루탐산 (Glu 또는 E); 글리신 (Gly 또는 G); 히스티딘 (His 또는 H); 이소류신 (Ile 또는 I); 류신 (Leu 또는 L); 리신 (Lys 또는 K); 메티오닌 (Met 또는 M); 페닐알라닌 (Phe 또는 F); 프롤린 (Pro 또는 P); 세린 (Ser 또는 S); 트레오닌 (Thr 또는 T); 트립토판 (Trp 또는 W); 티로신 (Tyr 또는 Y); 및 발린 (Val 또는 V)을 포함한다. 비-전통적인 아미노산이 또한 본 발명의 범위 내에 속하며, 노르류신, 오미틴, 노르발린, 호모세린 및 문헌(Elman 등 Meth. Enzym. 202:301-336 (1991))에 기술된 것들과 같은 다른 아미노산 잔기 유사체를 포함한다. 상기 비-천연으로 존재하는 아미노산 잔기를 생성하기 위하여, 노렌 (Noren) 등 Science 244:182 (1989) 및 상기 Elman 등의 방법이 사용될 수 있다. 간단히, 이들 방법은 억제인자 tRNA를 비-천연으로 존재하는 아미노산 잔기로 화학적으로 활성화시킨 다음, RNA의 시험관내 전사 및 번역을 포함한다. 비-전통적인 아미노산의 도입은 또한 당해 분야에 공지된 펩티드 화학을 사용하여 성취할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "극성 아미노산"은 순제로 전하(net zero charge)를 갖지만, 그들의 측쇄의 상이한 부분에 비-제로 부분 전하를 갖는 아미노산(예: M, F, W, S, Y, N, Q, C)을 포함한다. 이들 아미노산은 소수성 상호작용 및 정전기적 상호작용에 참여할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "하전된 아미노산(charged amino acid)"은 그들의 측쇄에 비-제로 순 전하를 가질 수 있는 아미노산(예: R, K, H, E, D)을 포함한다. 이들 아미노산은 소수성 상호작용 및 정전기적 상호작용에 참여할 수 있다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "링커 펩티드(linker peptide)"는 두 개의 폴리펩티드 서열을 결합하거나 연결시키는, 예를 들면, 아미노산 서열이 본래 두 개의 폴리펩티드 도메인을 자연적으로 결합하거나 연결시키지 못하는, 두 개의 폴리펩티드 도메인을 결합시키는 아미노산 서열을 의미한다. 한 구현예에서, 링커 펩티드는 합성된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "합성적(synthetic)"은 천연으로 존재하지 못하는 아미노산 서열을 의미한다.
- [0041] 본 발명의 링커 펩티드는 펩티드 결합을 통해 두 개의 아미노산 서열을 연결한다. 한 구현예에서, 링커 펩티드는 제2 잔기, 예를 들면, Fc 잔기 도메인 또는 영역에 BBB 이전 잔기를 연결시킨다. 한 구현예에서, 본 발명의 링커 펩티드는 선형 서열인 제2 잔기, 예를 들면, BBB 이전 잔기 또는 Fc 잔기 도메인 또는 영역인 제2 잔기에 약물학적 활성 잔기를 결합시킨다. 다른 구현예에서, 링커 펩티드는 두 개의 약물학적 활성 잔기를 결합시킨다. 한 구현예에서, 링커 펩티드는 비-Fc 잔기에 하나 이상의 Fc 잔기 도메인 또는 영역을 결합시키거나 유전적으로 융합시킨다.
- [0042] 폴리펩티드의 맥락에서, "선형 서열 (linear sequence)" 또는 "서열"은 서열에서 서로 이웃하는 잔기가 폴리펩티드의 1차 구조에서 근접하는 아미노 내지 카르복실 말단 방향의 폴리펩티드의 아미노산 순서이다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "연결된(linked)", "융합된(fused)" 또는 "융합(fusion)"이 상호교환적으로 사용된다. 이들 용어는 화학적 콘주게이션 또는 재조합 방법을 포함한 어떠한 방법에 의해서도 둘 이상의 원소 또는 성분들을 함께 결합시킴을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "공유적으로 융합된(covalently fused)" 또는 "공유적으로 커플링된(covalently coupled)"은 명시된 잔기들이 서로 직접 공유결합되거나, 그 밖에 개재 잔기 또는 잔기들(예: 링커 펩티드 또는 잔기)을 통해 서로 간접적으로 공유결합됨을 의미한다. 한 바람직한 구현예에서, 잔기들은 공유적으로 융합된다. 공유결합의 한 형태는 펩티드 결합이다. 화학적 콘주게이션 방법(예: 헤테로이관능성 가교결합제를 사용함)이 당해 분야에 공지되어 있다. 융합된 잔기들은 또한 유전적으로 융합시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전적으로 융합된(genetically fused)", "유전적으로 연결된(genetically linked)" 또는 "유전적 융합"은 이들 단백질, 폴리펩티드 또는 단편을 암호화하는 단일 폴리뉴클레오티드 분자의 유전적 발현을 통한, 그들의 개재 펩티드 골격을 통해 둘 이상의 단백질, 폴리펩티드 또는 이의 단편의 공-선형, 공유 결합 또는 부착을 의미한다.
- [0044] 상기 유전적 융합은 단일 인접 유전 서열의 발현을 일으킨다. 바람직한 유전적 융합은 프레임에 존재한다, 즉 둘 이상의 개방 판독 프레임 (ORFs)이 융합되어 본래 ORFs의 정확한 판독 프레임을 유지하는 방식으로, 인접



한 보다 긴 ORF를 형성한다. 따라서, 생성된 재조합 융합 단백질은 본래 ORFs (절편들이 본래 통상적으로 그렇게 결합되지 않은)에 의해 암호화되는 폴리펩티드에 상응하는 둘 이상의 단백질 절편을 함유하는 단일 폴리펩티드이다. 이 경우에, 단일 폴리펩티드는 두 개의 폴리펩티드 쇄를 포함하는 이합체성 분자를 수득하기 위하여 처리 도중 절단한다.

[0045] 본 폴리펩티드는 적어도 하나의 약물학적 활성 잔기를 포함한다. 약물학적 활성 잔기는 생물학적 맥락으로 작용 또는 반응을 수행할 수 있는 잔기를 의미한다. 예를 들면, 용어 "약물학적 활성 잔기"는 생물학적 시스템의 성분들(예: 생물학적 유체 중 또는 세포 표면에 또는 세포 기질의 단백질)에 결합되고, 이 결합은 생물학적 효과 (예: 그것이 결합되는 활성 잔기 및/또는 성분의 변화 (예: 그것이 결합되는 활성 잔기 및/또는 성분의 절단, 신호 전송, 또는 세포나 대상에서 생물학적 반응의 완화 또는 억제)에 의해 측정되는 바와 같은)를 일으키는 약물학적 활성 분자 또는 이의 부분을 의미한다. 바람직한 약제학적 활성 잔기는 치료학적 잔기이다.

[0046] 예시적인 약물학적 활성 잔기는, 예를 들면, 약물, 항체 분자 또는 이의 부분의 항원 결합 단편 (예: F(ab), scFv, VH 도메인, 또는 VL 도메인) (예: 생물학적 반응을 부여, 유도 또는 차단하기 위한), 수용체의 리간드 결합 부분 또는 리간드의 수용체 결합 부분, 효소 등을 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 약물학적 활성 잔기는 성숙한 형태의 단백질을 포함한다. 다른 구현예에서, 약물학적 활성 잔기는 생물학적 활성을 유지하는 전장 단백질의 일부를 포함한다. 다른 예시적 약물학적 활성 잔기는 이로써 제한되는 것은 아니지만, 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 탄수화물 및 지질을 포함한, 치료학적으로 유용한 아미노산, 펩티드, 단백질, 핵산을 포함한다. 본 발명의 예시적 약물학적 활성 잔기는 신경성장촉진 인자, 성장인자, 효소, 항체, 신경전달 물질, 신경조절 물질, 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 영상화 또는 검출성 제제, 동위원소, 및 화학요법제 등을 포함한다. 본 발명의 약물학적 활성 잔기는 또한 치료학적 제제를 표적 조직으로 전달하는 경우에 활성화될 수 있는 약물, 프로드러그 및 전구체를 포함한다. 용어 "약물학적 활성 잔기"는 BBB 이전 잔기를 포함함을 의미하지 않는다. 약물학적 활성 제제는 비-BBB 이전 잔기이다.

[0047] 본 발명의 결합 분자는 "키메라(chimeric)" 또는 "융합" 단백질이다.

[0048] 상기 단백질은 본래 자연적으로 결합되지 않는 제2 아미노산 서열에 결합되는 제1 아미노산 서열을 포함한다. 아미노산 서열은 통상 융합 폴리펩티드로 함께 보내지는 별도의 단백질로 존재할 수 있거나, 그들은 통상 동일한 단백질로 존재할 수 있지만, 융합 폴리펩티드에서 새로운 배열로 배치된다. 키메라 단백질은 당해 분야에 잘 공지된 방법을 사용하여, 예를 들면, 화학적 합성에 의해, 또는 펩티드 영역이 원하는 관계로 암호화되는 폴리뉴클레오티드를 생성하고 번역함으로써 생성할 수 있다.

[0049] 본 발명의 폴리펩티드는, 즉, BBB-이전 항체로부터 유래되는 결합 도메인 또는 결합 부위를 포함하는 결합 분자이다. BBB 이전 항체는 BBB를 통한 이에 부착된 잔기의 이전을 용이하게 한다. 예시적인 BBB 이전 항체 결합 부위가 미국 특허 제7,943,129호에 기술되어 있다. 한 구현예에서, BBB 이전 항체는 TMEM30A에 결합된다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "결합 도메인" 또는 "결합 부위"는 표적 분자와의 특정 결합을 매개하는 폴리펩티드의 부분, 영역 또는 부위 (예: TMEM30A 결합 부위 또는 BBB 이전을 용이하게 하는 다른 부위)를 의미한다. 예시적인 결합 도메인은 항원 결합 부위 (예: VH 및/또는 VL 도메인) 또는 상기 결합 부위를 포함하는 분자 (예: 항체 또는 단일 도메인 항체)를 포함한다.

[0050] 본 발명의 폴리펩티드는 BBB 이전 잔기에 대해 1가 또는 다가이며, 예를 들면, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상의 BBB 이전 잔기를 포함한다.

[0051] 본원에 기술된 바와 같은 약물학적 활성 잔기는 또한, 예를 들면, 항체 분자로부터 유래된 바와 같은 결합 도메인 또는 결합 부위 (예: BBB를 통해 이전되지 않는 항체로부터의 VH 및/또는 VL 도메인), 상기 결합 부위를 포함하는 분자 (예: 항체 또는 단일 도메인 항체), 리간드의 수용체 결합 도메인, 수용체의 리간드 결합 도메인 또는 촉매적 도메인을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "리간드 결합 도메인"은 네이티브 수용체 (예를 들면, 세포 표면 수용체) 또는 상응하는 네이티브 수용체의 적어도 정성적 리간드 결합 능력, 및 바람직하게는 생물학적 활성을 유지하는 이의 영역 또는 유도체를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "수용체 결합 도메인"은 네이티브 리간드 또는 상응하는 네이티브 리간드의 적어도 정성적 수용체 결합 능력, 및 바람직하게는 생물학적 활성을 유지하는 이의 영역 또는 유도체를 의미한다.

[0052] 한 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 개질된 항체이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "개질된 항체(modified antibody)"는 그들이 천연으로 존재하지 않도록 변화된 합성 형태의 항체, 예를 들면, 적어도 두 개의 중쇄 부분을 포함하지만 두 개의 완전한 중쇄는 아닌 항체 (예: 도메인 결실 항체 또는 미니바디); 들

이상의 상이한 항원에, 예를 들면, Fc 잔기, 도메인, 영역 또는 scFc 영역에 결합된 TMEM30A 및 치료학적으로 관련성이 있는 표적 결합 부위에) 결합되도록 변화된 다중특이적 형태의 항체 (예: 이중특이적, 삼중특이적 등)를 포함한다.

- [0053] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 영역"은 네이티브 면역글로불린의 Fc 영역에 상응하는, 즉 그의 두 중쇄의 각각의 Fc 도메인 (또는 Fc 잔기)의 이합체성 결합에 의해 형성되는 바와 같은 폴리펩티드의 부분으로서 정의될 것이다. 네이티브 Fc 영역은 동종이합체성이고, 두 개의 폴리펩티드 쇄를 포함한다. 대조적으로, 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "유전적으로-융합된 Fc 영역" 또는 "단일-쇄 Fc 영역" (scFc 영역)은, 예를 들면, 미국 특허출원 제20110243966호에 기술된 바와 같은 단일 폴리펩티드 쇄 (즉, 단일 인접 유전 서열로 암호화된) 내에 유전적으로 연결된 Fc 도메인 (또는 Fc 잔기)로 구성된 합성 이합체성 Fc 영역을 의미한다. 한 구현예에서, scFc 영역이 사용되는 경우에, 결합 분자는 BBB 이전 잔기에 대해 1가이다.
- [0054] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 도메인"은 파파인(papain) 절단 부위의 바로 상류 힌지(hinge) 영역에서 시작되고 (즉, 중쇄 불변부의 제1 잔기를 114로 고려하여, IgG에서 잔기 216), 항체의 C-말단에서 끝나는 단일 면역글로불린 중쇄의 부분을 의미한다. 따라서, 완전 Fc 도메인은 적어도 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 영역"은 네이티브 항체의 Fc 영역을 닮은 이합체성 Fc 도메인 (예: 전통적인 두 폴리펩티드 쇄 포맷으로 또는 단일 쇄 Fc 영역으로서 제조되었든지 간에)을 의미한다.
- [0055] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 도메인 부분" 또는 "Fc 잔기"는 Fc 도메인의 또는 Fc 도메인으로부터 유래되는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, Fc 잔기는: 힌지 (예: 상부, 중간 및/또는 하부 힌지 영역) 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, CH4 도메인 또는 그의 변이체, 부분 또는 단편 중 적어도 하나를 포함한다. 다른 구현예에서, Fc 잔기는 완전한 Fc 도메인 (즉, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인)을 포함한다. 한 구현예에서, Fc 잔기는 CH3 도메인 (또는 그의 부분)에 융합된 힌지 도메인 (또는 그의 부분)을 포함한다. 다른 구현예에서, Fc 잔기는 CH3 도메인 (또는 그의 부분)에 융합된 CH2 도메인 (또는 그의 부분)을 포함한다. 다른 구현예에서, Fc 잔기는 CH3 도메인 또는 그의 부분을 포함한다. 다른 구현예에서, Fc 잔기는 힌지 도메인 (또는 그의 부분) 및 CH3 도메인 (또는 그의 부분)으로 이루어진다. 다른 구현예에서, Fc 잔기는 CH2 도메인 (또는 그의 부분) 및 CH3 도메인 (또는 그의 부분)으로 이루어진다. 다른 구현예에서, Fc 잔기는 힌지 도메인 (또는 그의 부분) 및 CH2 도메인 (또는 그의 부분)으로 이루어진다. 한 구현예에서, Fc 잔기는 CH2 도메인의 적어도 한 부분이 결여되어 있다 (예: 모두 또는 일부의 CH2 도메인).
- [0056] 한 구현예에서, 본 발명의 결합 분자는 하나의 폴리펩티드 쇄 (scFc 분자)로서 또는 두 폴리펩티드 쇄로서 야생형 형태로 존재하든지 간에, 완전 Fc 영역을 포함한다.
- [0057] 특이적으로 결합됨은 생리학적 조건하에 비교적 안정한 복합체를 형성하는 두 분자를 의미한다. 특이적 결합은 대개 보통 내지 높은 용량을 가지면서 저친화성을 갖는 비특이적 결합과 구분되는 바와 같이 고친화성이고, 낮은 내지 보통 용량을 특징으로 한다. 통상적으로, 결합은 친화상수  $KA$ 가  $10^6 M^{-1}$ 보다 높거나, 보다 바람직하게는  $10^8 M^{-1}$ 보다 높은 경우에 특이적이라 여겨진다. 필요에 따라, 비-특이적 결합은 결합 조건을 변화시킴으로써 특이적 결합에 실질적으로 영향없이 감소시킬 수 있다. 분자 농도, 용액의 이온강도, 결합에 허용되는 시간, 차단제 (예: 혈청 알부민, 우유 카제인)의 농도 등과 같은 적절한 결합 조건이 통상적인 기술을 사용하여 숙련가에 의해 최적화될 수 있다.
- [0058] 한 구현예에서, 본 발명의 Fc 잔기는 신생아 수용체 (FcRn) 결합 파트너로서 본원에 언급된, FcRn 결합에 필요한 것으로 당해 분야에 공지된 Fc 분자의 적어도 부분을 포함한다. FcRn 결합 파트너는 FcRn 결합 파트너의 FcRn 수용체에 의한 후속 활성 수송과 함께 FcRn 수용체에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 분자 또는 그의 부분이다.
- [0059] 본 발명의 FcRn 결합 파트너는 전체 IgG, IgG의 Fc 단편 및 FcRn 수용체의 완전한 결합 영역을 포함하는 다른 단편을 포함한 FcRn 수용체에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 분자를 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 결합 분자의 Fc 잔기 도메인 또는 영역은 FcRn에 대해 감소되거나, 최소한의 결합이거나 결합이 없음을 나타내도록 개질된다. FcRn 수용체에 결합되는 IgG의 Fc 부분의 영역은 X-선 결정학을 근거로 기술되어 왔다 (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). FcRn과 Fc의 주요 접촉 구역은 CH2 및 CH3 도메인의 결합에 근접한다. Fc-FcRn 접촉은 단일 Ig 중쇄 내에 모두 존재한다. FcRn 결합 파트너는 전체 IgG, IgG의 Fc 단편 및 FcRn의 완전한 결합 영역을 포함하는 IgG의 다른 단편을 포함한다. 주요 접촉 부위는 CH2 도메인의 아미노산

잔기 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, 및 314와, CH3 도메인의 아미노산 잔기 385-387, 428, 및 433-436을 포함한다. 면역글로불린 또는 면역글로불린 단편, 또는 영역의 아미노산 넘버링은 문헌(Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md)을 근거로 하는 모든 것을 참조한다.

[0060] IgG의 Fc 영역은 FcRn에 의해 결합될 개질된 IgG 또는 Fc 단편이나 그의 부분을 수득하기 위하여 부위 지정 돌연변이(site directed mutagenesis)와 같은 잘 인지된 방법에 따라 개질시킬 수 있다. 상기 개질은 FcRn에 대한 결합을 보존하거나 심지어 개선하는 접촉 부위 내에 개질뿐만 아니라, FcRn 접촉 부위로부터 먼 개질을 포함한다. 예를 들면, 인간 IgG1 Fc (Fc $\gamma$ 1)에서 하기의 단일 아미노산 잔기가 FcRn에 대한 Fc 결합 친화성의 중요한 손실없이 치환될 수 있다: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, 및 K447A (여기서, 예를 들면, P238A는 238번 위치에서 알라닌에 의해 치환된 야생형 프롤린을 나타낸다).

[0061] 상기 돌연변이 중 특정한 것이 Fc 잔기에 대한 새로운 관능성을 부여할 수 있다. 예를 들면, 한 구현예는 고도로 보존된 N-글리코실화 부위가 제거된, N297A를 포함한다. 이 돌연변이의 효과는 글리코실화를 감소시킴으로써, 작용(effector) 기능 및/또는 면역원성을 감소시킨다. 상기 기술된 돌연변이로부터 유발되는 새로운 관능성의 추가 예로서, FcRn에 대한 친화성은 일부 경우에 야생형의 것을 넘어서 증가될 수 있다. 이러한 증가된 친화성은 증가된 "온(on)" 속도, 감소된 "오프(off)" 속도 또는 증가된 "온(on)" 속도와 감소된 "오프(off)" 속도 모두를 반영할 수 있다. FcRn에 대한 증가된 친화성을 부여하는 것으로 여겨지는 돌연변이는 T256A, T307A, E380A, 및 N434A를 포함한다 (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

[0062] 한 구현예에서, FcRn 결합 파트너는 서열 PKNSSMISNTP (서열확인번호: )를 포함하고, 임의로 HQSLGTQ (서열확인번호: ), HQLNSDGG (서열확인번호: ), HQNISDGG (서열확인번호: ), 또는 VISSLHGQ (서열확인번호: )로부터 선택된 서열을 추가로 포함하는 폴리펩티드이다 (미국 특허 제5,739,277호).

[0063] 당해 분야의 숙련가는 변화된 작용 기능 및/또는 FcRn 결합을 나타내는 많은 다른 Fc 돌연변이체 또는 그의 유사체에 친숙할 것이다. 또한, 면역글로불린 불변 영역 (예: 페길레이트화), 또는 그의 단편을 화학적으로 개질시키는 방법 (참조 예: Aslam and Dent 1998, Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmillan Reference, London)이 당해 분야에, 예를 들면, 미국 특허출원 제20120003210호에 잘 공지되어 있다.

[0064] 한 구현예에서, BBB 이전 잔기가 부착되는 Fc 잔기, 도메인 또는 영역은 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들면, 정상적으로 글리코실화되는 잔기를 돌연변이시키거나, 글리코실화가 일어나지 않도록 폴리펩티드의 발현을 변화시킴으로써 비글리코실화시킨다. 한 예로서, 한 특정 구현예는 보존된 N-글리코실화 부위가 제거된, N297A 돌연변이를 포함한다. 다른 구현예에서, Fc 잔기는 299번 위치의 돌연변이, 예를 들면, 미국 특허 제7,863,419호에 기술된 바와 같은 다른 아미노산에 대한 T299 돌연변이를 포함한다. 알라닌 이외에, 다른 아미노산이 Fc 기능을 감소시키기 위하여 상기 명시되거나 당해 분야에 공지된 위치에서 야생형 아미노산 대신 치환될 수 있다.

[0065] 다른 구현예에서, 문헌 (Armour, K.L., Clark, M.R., Hadley, A.G. & Williamson L.M. (1999), Eur J Immunol 29: 2613-2624)에 기술된 돌연변이를 본 결합 분자로 도입시킬 수 있다.

[0066] 돌연변이는 네이티브 Fc와 구별되는 100개 초과 Fc 잔기를 생성하는 Fc로 개별적으로 도입시킬 수 있다. 또한, 이들 개별 돌연변이 중 2, 3개 또는 그 이상의 조합이 함께 도입되어 수백 개 이상의 잠재적인 Fc 영역을 생성할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 작제물의 Fc 잔기 중 하나가 돌연변이될 수 있고, 다른 Fc 잔기는 전혀 돌연변이되지 않거나, 그들 모두가 상이한 돌연변이로 돌연변이될 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명의 키메릭 단백질에 사용하기 위하여 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부의 펩티드 모방체(mimetics), 예를 들면, Fc 단편의 펩티드 모방체 또는 FcRn 결합 파트너의 펩티드 모방체가 시도되었다. 한 구현예에서, 펩티드 모방체는 파지 디스플레이를 사용하여 또는 화학적 라이브러리 스크리닝을 통해 확인된다

(참조 예: McCafferty et al. 1990, Nature 348:552, Kang et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363; EP 0 589 877 B1).

- [0068] 다른 구현예에서, 본 발명의 Fc 영역 (예를 들면, scFc 영역)은 Fc $\gamma$ R 결합에 필요한 것으로 당해 분야에 공지된 Fc 분자의 적어도 부분을 포함한다.
- [0069] 한 구현예에서, 본 발명의 Fc 영역 (예를 들면, scFc 영역)은 단백질 A 결합에 필요한 것으로 당해 분야에 공지된 Fc 분자의 적어도 부분을 포함한다. 한 구현예에서, 본 발명의 Fc 영역 (예를 들면, scFc 영역)은 단백질 G 결합에 필요한 것으로 당해 분야에 공지된 Fc 분자의 적어도 부분을 포함한다. 한 구현예에서, 상기 분자는 FcRn에 결합되지 않는다.
- [0070] 본원에 제시된 바와 같이, Fc 도메인은 또한 야생형 Fc 잔기로부터 아미노산 서열이 변화되도록 하나 이상의 아미노산 변화 (치환, 부가 또는 결실)에 의해 개질시킬 수 있음을 당해 분야의 통상의 숙련자 중 누군가는 이해하게 될 것이다. 많은 이러한 변화 또는 변형이 당해 분야에 공지되어 있다. 특정한 예시적 구현예에서, Fc 잔기는 작용 기능 (예: Fc $\gamma$ R 결합)을 유지하며, 특정 구현예에서, Fc 잔기는 작용 기능이 결여되거나 감소되었다.
- [0071] 본 발명의 폴리펩티드의 Fc 도메인 또는 잔기는 임의의 이소타입 (A, E, G 또는 M)으로부터 존재할 수 있고, 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드의 Fc 도메인 또는 잔기는 IgG1 분자로부터 유래된 CH2 및/또는 CH3 도메인 및 IgG3 분자로부터 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 예로, Fc 도메인 또는 잔기는 부분적으로, IgG1 분자로부터 및 부분적으로, IgG3 분자로부터 유래된 키메릭 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 예로, Fc 도메인 또는 잔기는 부분적으로, IgG1 분자로부터 및 부분적으로, IgG4 분자로부터 유래된 키메릭 힌지 영역을 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 링커 펩티드를 포함하는 폴리펩티드는 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 "재조합적으로 제조된다(recombinantly produced)", 즉 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조된다. 본 발명의 폴리펩티드를 제조하기 위한 예시적 기술이 본원에 보다 상세히 제시되어 있다.
- [0073] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용되는 담체 (pharmaceutically acceptable carrier)"는 활성 성분이 함해될 수 있고, 조합에 이어서, 활성 성분을 대상자에게 투여하기 위해 사용될 수 있는 화학적 조성물 또는 화합물을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생리학적으로 허용되는(physiologically acceptable)" 에스테르 또는 염은 조성물이 투여될 대상자에게 유해하지 않은, 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분과 혼화성인 활성 성분의 에스테르 또는 염 형태를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체"는 또한, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 부형제; 계면활성제; 분산제, 불활성 희석제; 과립화 및 봉쇄제; 결합제; 운환제; 감미제; 향미제; 착색제; 보존제; 생리학적 분해 가능한 조성물 (예: 젤라틴); 수성 비히클 및 용매; 유성 비히클 및 용매; 현탁제; 분산 또는 습윤제; 유화제, 완화제; 완충제; 염; 농후화제; 충전제; 유화제; 항산화제; 안정화제 및 약제학적으로 허용되는 중합체성 또는 소수성 물질. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 다른 "부가 성분들"이 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 본원에 참조로 포함된 문헌 (Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa.)에 기술되어 있다.
- [0074] 본원에 사용된 바와 같이, "유효량"은 치료학적 반응을 일으키기에 충분한 양이다.
- [0075] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "프로테이노패시(proteinopathy)"는 이 장애가 유전적 요소를 갖는 잘못 접힌 단백질(misfolded proteins) 또는 응집 단백질을 특징으로 하는 장애를 의미한다.
- [0076] II. BBB 이전 항체(BBB Transmigrating antibodies)
- [0077] 한 구현예에서, BBB 이전 잔기가 미국 특허 제7,943,129호에 기술되어 있다. 예를 들면, 한 구현예에서, BBB 이전 잔기는 미국 특허 제7,943,129호에 제시된 바와 같은 서열확인번호: 58 (FC5), 서열확인번호: 86 (FC44) 및 서열확인번호: 87 (FC7)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 한 구현예에서, BBB 이전 잔기는 FC5 잔기이다. FC5는 카멜리드로부터 유래된 중쇄 항체 (HCA, 2-쇄, 2-쇄 중쇄 항체, V<sub>H</sub>, 또는 단일 도메인 항체로서 또한 언급됨)이다. 카멜리드에 의해 또한 생성되는, IgG-형의 통상적인 4-쇄 면역글로불린과 비교시, 이들 항체는 통상적인 면역글로불린의 경쇄 및 CH1 도메인이 결여되어 있다. 이

들 천연으로 존재하는 중쇄 항체의 가장 두드러진 특징 중 하나는 각각, 그들의 가변 도메인 ( $V_H$ )로서 표시됨)의 VL 계면 위치 44, 45 및 47번 (카바트 넘버링)에 Glu, Arg 및 Gly의 압도적인 존재이다. 통상적인 4-쇄 항체 ( $V_H$ 로 표시됨)의 중쇄 가변 도메인에 동일한 위치는 거의 Gly, Leu 및 Trp으로 오로지 채워진다. 이들 차이는 통상적인 4-쇄 항체의  $V_H$  도메인의 상대적 불용성과 비교시, 카멜리드 HCA 가변 도메인 ( $V_H$ )의 높은 용해도 및 안정성에 관여하는 것으로 여겨진다. 카멜리드  $V_H$  도메인의 둘 이상의 주요 특징은 CDRs에서 그들의 비교적 더 긴 CDR3 및 높은 시스테인 쌍의 발생률이다. 시스테인 쌍은 디설파이드 브릿지의 형성을 매개하므로, 항체 결합 부위의 표면 토폴로지를 조절하는데 관여하는 것으로 나타난다. 카멜리드 sdAb-리소자임 복합체의 결정 구조에서, sdAb로부터 돌출되고 CDR 디설파이드 결합에 의해 부분적으로 안정화된 단단한 루프는 결합 부위로부터 확장되어, 리소자임 활성 부위로 깊숙이 침투된다(Desmyter et al., Nature Struct. Biol., 3, 803-811 (1996)).

[0078] 한 구현예에서, BBB 이전 항체는 TMEM30A (C6orf67, CDC50A)에 결합된다. TMEM30A에 결합되는 예시적 잔기는 공지되어 있거나, 당해 분야에 잘 알려진 방법들을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, TMEM30A 또는 그의 부분의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열은 TMEM30A 아미노산 서열을 특이적으로 인지하는 항체를 제조하거나, 결합 부위의 라이브러리로부터 TMEM30A에 특이적으로 결합되는 결합 잔기에 대해 스크리닝하기 위하여 사용될 수 있다. 상기 항체로부터의 또는 라이브러리로부터 유래된 결합 부위는 본 발명의 결합 분자에 사용될 수 있다. TMEM30A의 아미노산 서열이 하기에 제시되어 있다:

[0079] 10            20            30            40            50            60

[0080] MAMNYNAKDE VDGPPCAPG GTAKTRRPDN TAFKQQLPA WQPILTAGTV LPIFFIIGLI

[0081] 70            80            90            100           110           120

[0082] FIPIGIGIFV TSNNIREIEI DYTGTEPSSP CNKCLSPDVT PCFCTINFTL EKSFEQNVFM

[0083] 130           140           150           160           170           180

[0084] YYGLSNFYQN HRRYVKSRDD SQLNGDSSAL LNPSKECEPY RRNEDKPIAP CGAIANSFMF

[0085] 190           200           210           220           230           240

[0086] DTLELFLIGN DSYPIPIALK KKGIAWWDK NVKFRNPPGG DNLEERFKGT TKPVNWLKPV

[0087] 250           260           270           280           290           300

[0088] YMLDSDPDNN GFINEDFIWV MRTAALPTFR KLYRLIERKS DLHPTLPAGR YSLNVTYNYP

[0089] 310           320           330           340           350           360

[0090] VHYFDGRKRM ILSTISWGG KNPFLGIAYI AVGSISFLG VLLVINHKY RNSNTADIT

[0091] 본 발명의 폴리펩티드는 당해 분야에 인지된 프로토콜을 사용하여 TMEM30A에 결합되는 항체로부터 유래된 가변 영역 또는 그의 부분 (예를 들면 VL 및/또는 VH 도메인)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 가변 도메인은 포유동물을 항원 또는 그의 단편으로 면역화시킴으로써 비-인간 포유동물, 예를 들면, 쥐과 동물(murine), 기니 피그, 영장류, 토끼 또는 래트에서 제조된 항체로부터 유래될 수 있다. 모든 목적을 위해 참조로 포함된 상기 Harlow & Lane을 참조하라. 면역글로불린은 관련 항원 (예: 정제된 종양 관련 항원 또는 세포나, 상기 항원을 포함하는 세포 추출물) 및 보조제의 다중 피하 또는 복강내 주사에 의해 생성될 수 있다. 이러한 면역화는 통상 활성화된 비장세포 또는 림프구로부터 항원-반응성 항체의 생성을 포함하는 면역반응을 나타낸다.

[0092] 가변 영역이 면역화된 포유동물의 혈청으로부터 하베스트된 폴리클로날 항체로부터 유래될 수 있지만, 종종 이로부터 원하는 가변 영역이 유래되는 모노클로날 항체(MAbs)의 균질한 제제를 제공하기 위하여 비장, 림프 결절 또는 말초 혈액으로부터 개별 림프구를 분리하는 것이 바람직하다. 토끼 또는 기니 피그는 통상 폴리클로날 항체를 제조하기 위하여 사용된다. 마우스는 통상 모노클로날 항체를 제조하기 위하여 사용된다. 모노클로날 항체는 항원 단편을 마우스로 주사하고, "하이브리도마"를 제조하여, 항원에 특이적으로 결합되는 항체에 대한 하이브리도마를 스크리닝함으로써 단편에 대해 제조할 수 있다. 이렇게 잘 알려진 방법 (Kohler 등, (1975), Nature, 256:495)에서, 항원으로 주사된 마우스로부터 비교적 짧게-살거나 치명적인 림프구는 불멸 종양 세포주 (예를 들면 골수종 세포주)와 융합시킴으로써, 모두 불멸이고 B 세포에 의해 유전적으로 암호화된 항체를 생성할 수 있는 하이브리드 세포 또는 "하이브리도마"를 생성한다. 생성된 하이브리드는 단일 항체

의 형성에 대해 특이적인 유전자를 포함하는 각각의 개별 균주에 의한 선택, 희석 및 재성장에 의해 단일 유전적 균주로 분리된다. 그들은 원하는 항원에 대해 균질한 항체를 생성하며, 그들의 순수한 유전적 혈통과 관련하여 "모노클로날"이라 부른다.

[0093] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포는 바람직하게는 비융합, 부모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적절한 배지에 씨딩하여 성장시킬 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 하이브리도마의 형성, 선택 및 성장을 위한 시약, 세포주 및 배지가 수많은 공급처로부터 시판되고 있으며, 표준화된 프로토콜이 잘 성립되어 있음을 이해할 것이다. 일반적으로, 하이브리도마 세포가 성장하는 배지는 원하는 항원에 대한 모노클로날 항체의 제조에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침강법에 의해 또는 시험관내 검정법, 예를 들면, 방사면역측정법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착분석법(ELISA)에 의해 결정된다. 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후, 클론은 희석 방법을 제한하여 서브클론화시키고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp 59-103 (Academic Press, 1986)). 서브클론에 의해 분리된 모노클로날 항체는 통상적인 정제 방법, 예를 들면, 친화성 크로마토그래피 (예: 단백질-A, 단백질-G, 또는 단백질-L 친화성 크로마토그래피), 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동 또는 투석에 의해 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 분리시킬 수 있음을 또한 이해할 것이다.

[0094] 임의로, 항체는 항원의 다른 비중복 단편에 대한 결합없이 항원의 특정 영역 또는 원하는 단편에 대한 결합에 대해 스크리닝할 수 있다. 후자의 스크리닝은 항원의 결실 돌연변이의 수집에 대한 항체의 결합을 측정하고, 결실 돌연변이가 항체에 결합되는 것을 측정함으로써 성취할 수 있다. 결합은, 예를 들면, 웨스턴 블롯 (Western blot) 또는 ELISA에 의해 평가할 수 있다. 항체에 대해 특이적 결합을 나타내는 가장 작은 단편은 항체의 에피토프(epitope)를 정의하는 것이다. 이와 달리, 에피토프 특이성은 시험 및 참조 항체가 항원에 대한 결합에 대해 경쟁하는 경쟁 검정법에 의해 측정할 수 있다. 시험 및 참조 항체가 경쟁한다면, 이어서 그들은 한 항체의 결합이 다른 것의 결합을 방해하도록 충분히 근접한 동일한 에피토프 또는 에피토프들에 결합된다.

[0095] 원하는 모노클로날 항체를 암호화하는 DNA는 불변 영역 도메인 서열의 분리에 대해 상기 기술된 통상적인 방법 중 임의의 것 (예: 쥐 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합될 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써)을 사용하여 용이하게 분리하고 서열화시킬 수 있다. 분리되고 서브클론화된 하이브리도마 세포는 상기 DNA의 바람직한 공급원으로서 사용된다. 보다 특히, 분리된 DNA (이는 본원에 기술된 바와 같이 합성될 수 있음)는 본 발명의 폴리펩티드에 포함시키기 위한 원하는 가변 영역 서열을 클론하는데 사용될 수 있다.

[0096] 다른 구현예에서, 결합 부위는 완전 인간 항체로부터 유래된다. 인간 또는 실질적으로 인간 항체는 내인성 면역글로불린을 생성할 수 없는 형질전환 동물 (예: 마우스)에서 생성될 수 있다(참조 예: 미국 특허 제 6,075,181호, 제5,939,598호, 제5,591,669호 및 제5,589,369호, 이들 각각은 참조로 본원에 포함된다). 예를 들면, 키메릭 및 배아주 돌연변이가 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역의 동중첩 결합 결실로 내인성 항체 생성의 완전한 억제를 유발한다고 기술되어 왔다. 인간 면역글로불린 유전자 배열의 상기 배아주 돌연변이가 마우스로의 전달로 항원 켈린지시 인간 항체의 생성을 유발할 것이다. SCID 마우스를 사용하여 인간 항체를 생성하는 다른 바람직한 방법이 본원에 참조로 포함된다, 미국 특허 제5,811,524호에 기술되어 있다. 이들 인간 항체와 관련된 유전적 물질은 또한 본원에 기술된 바와 같이 분리시켜 조작할 수 있음을 이해하게 될 것이다.

[0097] 재조합 항체를 생성하는 또 다른 상당히 효율적인 방법이 문헌 (Newman, Biotechnology, 10: 1455-1460 (1992)에 기술되어 있다. 특히, 이 기술은 원숭이 가변 도메인 및 인간 불변 서열을 함유하는 영장류화 항체의 생성을 일으킨다. 이 참조문헌은 본원에 그의 전문이 참조로 포함된다. 더욱이, 이 기술은 또한 통상적으로 부여된 미국 특허 제5,658,570호, 제5,693,780호 및 제5,756,096호에 기술되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0098] 다른 구현예에서, 림프구는 마이크로조작 및 분리된 다양한 유전자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들면, 말초 혈액 단핵 세포는 면역화된 포유동물로부터 분리하여, 시험관내에서 약 7일간 배양시킬 수 있다. 배양물은 스크리닝 범위에 부합되는 특정 항체에 대해 스크리닝할 수 있다. 포지티브 웰로부터의 세포를 분리할 수 있다. 개별 Ig-생성 B 세포는 FACS에 의해 또는 보체-매개 용혈성 플라크 측정법으로 그들을 확인하여 단리시킬 수 있다. Ig-생성 B 세포는 튜브로 마이크로조작하고, VH 및 VL 유전자는, 예를 들면, RT-PCR을 사용하여 증폭시킬 수 있다. VH 및 VL 유전자는 항체 발현 벡터로 클론화시키고, 발현을 위해 세포 (예: 진행세포 또는 원핵

세포)로 형질감염시킬 수 있다.

[0099] 이와 달리, 가변 (V) 도메인은 선택된 동물로부터의 가변 유전자 서열의 라이브러리로부터 획득될 수 있다. 도메인, 예를 들면,  $V_H$  및/또는  $V_L$  도메인의 라이브러리 발현 랜덤 조합은 원하는 결합 특성을 갖는 요소를 확인하기 위하여 원하는 항원으로 스크리닝할 수 있다. 상기 스크리닝 방법이 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 항체 유전자 레퍼토리는  $\lambda$  박테리오파지 발현 벡터로 클론화시킬 수 있다 (Huse, WD 등 (1989), Science, 2476:1275). 또한, 그들의 표면 상에 세포 (Francisco et al. (1994), PNAS, 90:10444; Georgiou 등 (1997), Nat. Biotech., 15:29; Boder and Wittrup (1997) Nat. Biotechnol. 15:553; Boder 등(2000), PNAS, 97:10701; Daugherty, P. 등 (2000) J. Immunol. Methods. 243:211) 또는 바이러스 (예를 들면, Hoogenboom, HR. (1998), Immunotechnology 4:1; Winter 등 (1994). Annu. Rev. Immunol. 12:433; Griffiths, AD. (1998). Curr. Opin. Biotechnol. 9:102) 발현 항체가 스크리닝될 수 있다.

[0100] 당해 분야의 숙련가는 또한 DNA 암호화 항체 가변 도메인이 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 파지, 효모 또는 세균에서 발현된 항체 라이브러리로부터 또한 유래될 수 있음을 이해할 것이다. 예시적 방법, 예를 들면, EP 제368 684 B1호; 미국 특허 제5,969,108호; Hoogenboom 등(2000) Immunol. Today 21:371; Nagy 등 (2002) Nat. Med. 8:801; Huie 등 (2001), PNAS, 98:2682; Lui 등 (2002), J. Mol. Biol. 315:1063에 제시되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. 몇몇 문헌 (예를 들면, Marks 등 (1992), Bio/Technology 10:779-783)은 큰 파지 라이브러리를 작제하기 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 재조합뿐만 아니라, 쇠셔플링(chain shuffling)에 의한 고친화성 인간 항체의 생성을 기술하였다. 다른 구현예에서, 리보솜 디스플레이는 디스플레이 플랫폼으로서 박테리오파지를 대체하기 위하여 사용될 수 있다 (참조, 예를 들면, Hanes, 등 (1998), PNAS 95:14130; Hanes and Pluckthun. (1999), Curr. Top. Microbiol. Immunol. 243:107; He and Taussig. (1997), Nuc. Acids Res., 25:5132; Hanes et al. (2000), Nat. Biotechnol. 18:1287; Wilson et al. (2001), PNAS, 98:3750; or Irving et al. (2001) J. Immunol. Methods 248:31).

[0101] 스크리닝을 위한 예시적 라이브러리는 인간 가변 유전자 라이브러리이다. 비-인간 공급원으로부터의  $V_L$  및  $V_H$  도메인이 또한 사용될 수 있다. 라이브러리는 면역화된 대상 또는 반-합성으로부터 자연 그대로일 수 있다 (Hoogenboom and Winter. (1992). J. Mol. Biol. 227:381; Griffiths et al. (1995) EMBO J. 13:3245; de Kruif et al. (1995). J. Mol. Biol. 248:97; Barbas et al. (1992), PNAS, 89:4457). 한 구현예에서, 보다 더 큰 이종성을 갖는 핵산 분자의 라이브러리를 생성하기 위하여 면역글로불린 도메인에 돌연변이를 일으킬 수 있다 (Thompson 등 (1996), J. Mol. Biol. 256:77; Lamminmaki 등 (1999), J. Mol. Biol. 291:589; Caldwell and Joyce. (1992), PCR Methods Appl. 2:28; Caldwell and Joyce. (1994), PCR Methods Appl. 3:S136). 표준 스크리닝 방법이 고친화성 변이체를 선택하기 위하여 사용될 수 있다. 다른 구현예에서,  $V_H$  및  $V_L$  서열에 대한 변화가, 예를 들면, 당해 분야에 공지된 기술을 사용하는 결정 구조로부터 획득된 정보를 사용하여 항체 결합 활성을 증가시키기 위하여 수행될 수 있다.

[0102] 다른 예시적 라이브러리는 단일 도메인 항체를 포함하는 카멜리드 라이브러리이다. 예시적 단일 도메인 분자는 항체의 단리된 중쇄 가변 도메인 ( $V_H$ ), 즉 경쇄 가변 도메인이 없는 중쇄 가변 도메인, 및 항체의 단리된 경쇄 가변 도메인 ( $V_L$ ), 즉 중쇄 가변 도메인이 없는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 본 발명의 결합 분자에 사용되는 예시적 단일-도메인 항체는, 예를 들면, 문헌 (Hamers-Casterman, et al., Nature 363:446-448 (1993), and Dumoulin, et al., Protein Science 11:500-515 (2002))에 기술된 바와 같은 카멜리드 중쇄 가변 도메인 (약 118 내지 136번 아미노산 잔기)을 포함한다. 다른 예시적 단일 도메인 항체는 Dabs® (Domantis Ltd., Cambridge, UK)로서 또한 공지된, 단일  $V_H$  또는  $V_L$  도메인을 포함한다. 또 다른 단일 도메인 항체는 상어 항체 (예: 상어 Ig-NARs)를 포함한다. 상어 Ig-NARs는 1개의 가변 도메인 (V-NAR) 및 5개의 C-유사 불변 도메인 (C-NAR)의 동종이합체를 포함하며, 여기서 다양성은 길이가 5 내지 23개 잔기로 변하는 신장된 CDR3 영역에 집중된다. 카멜리드 중 (예: 라마)에서,  $V_H$ 로서 언급되는, 중쇄 가변 영역은 전체 항원-결합 도메인을 형성한다. 카멜리드  $V_H$  가변 영역과 통상적인 항체 ( $VH$ )로부터 유래된 것들 사이에 주요 차이는 (a)  $V_H$ 에서 상응하는 영역에 대해 비교시,  $VH$ 의 경쇄 접촉 표면에 보다 소수성인 아미노산, (b)  $V_H$ 에 보다 긴 CDR3, 및 (c)  $V_H$ 에서 CDR1과 CDR3 사이에 디설파이드 결합의 빈번한 발생을 포함한다. 단일 도메인 결합 분자의 제조 방법이 미국 특허 제6,005,079호 및 제6,765,087호에 기술되어 있으며, 이 둘 모두는 본원에 참조로 포함된다.  $V_H$  도메인을 포함하는 예시적 단일 도메인 항체는 Nanobodies® (Ablynx NV, Ghent, Belgium)를 포

함한다.

[0103] 더욱이, 본 발명의 폴리펩티드의 제조에 유용한 가변 영역 서열은 수많은 상이한 공급원으로부터 수득할 수 있다. 예를 들면, 상기 논의된 바와 같이, 다양한 인간 유전자 서열이 공개적으로 접근가능한 기탁의 형태로 이용가능하다. 항체 및 항체-암호화 유전자 (예: 임상적으로 유용한 특성을 갖는 것으로 공지된 항체)의 많은 서열이 공개되었고, 적절한 가변 영역 서열 (예: VL 및 VH 서열)은 당해 분야에 인지된 기술을 사용하여 이들 서열로부터 합성할 수 있다.

[0104] 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드의 결합 도메인은, 예를 들면,  $V_L$  쇠의 부재하에 안정한, 카멜리드로부터 유래된,  $V_H$  도메인으로 이루어진다 (Hamers-Casterman 등 (1993). Nature, 363:446; Desmyter et al. (1996). Nat. Struct. Biol. 3: 803; Decanniere et al. (1999). Structure, 7:361; Davies et al. (1996). Protein Eng., 9:531; Kortt et al. (1995). J. Protein Chem., 14:167).

[0105] 본 발명의 폴리펩티드는 완전 쥐과 동물, 완전 인간, 키메라, 인간화, 비-인간 영장류 또는 영장류화 항체로부터 유래된 가변 도메인 또는 CDR(들)을 포함할 수 있다. 비-인간 항체, 또는 그의 단편이나 도메인은 당해 분야 인지된 기술을 사용하여 그들의 면역원성을 감소시키기 위하여 변화시킬 수 있다. 인간화 항체는 모 항체의 결합 특성을 유지하거나 실질적으로 유지하기 위하여 개질시켰지만, 모, 비-인간 항체보다 인간에서 면역원성이 덜한, 비-인간 항체로부터 유래된 항체이다. 인간화 표적 항체의 경우에, 이는 (a) 전체 비-인간 가변 도메인을 인간 불변 영역으로 이식시켜 키메라 표적 항체를 생성하고; (b) 하나 이상의 비-인간 상보성 결정 영역(complementarity determining regions: CDRs)의 적어도 일부를 엄격한 프레임워크 잔기의 유지하에 또는 유지없이 인간 프레임워크 및 불변 영역으로 이식시키고; (c) 전체 비-인간 가변 도메인을 이식하되, 단 그들을 표면 잔기의 치환에 의해 인간-유사 섹션으로 "클로킹(cloaking)"시킴을 포함하는, 다양한 방법에 의해 성취할 수 있다. 상기 방법들이 문헌 (Morrison 등, (1984), PNAS. 81: 6851-5; Morrison et al., (1988), Adv. Immunol. 44: 65-92; Verhoeyen et al., (1988), Science 239: 1534-1536; Padlan, (1991), Molec. Immun. 28: 489-498; Padlan, (1994), Molec. Immun. 31: 169-217); 및 미국 특허 제5,585,089호, 제5,693,761호 및 제5,693,762호에 기술되어 있고, 이들 모두는 그들의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0106] 탈-면역화는 또한 본 발명의 폴리펩티드의 면역원성을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "탈-면역화(de-immunization)"는 T 세포 에피토프의 개질을 포함한다 (참조 예: W09852976A1, W00034317A2). 예를 들면, VH 및 VL 서열을 분석하고, 인간 T 세포 에피토프는 상보성 결정 영역(CDRs)과 관련된 에피토프의 위치를 나타내는 각각의 V 영역으로부터 "맵핑(mapping)"하며, 서열 내에 다른 주요 잔기 생성된다. T 세포 에피토프 맵으로부터 개별 T 세포 에피토프는 최종 항체의 활성 변화 위험을 낮게하면서 대안적인 아미노산 치환을 확인하기 위하여 분석한다. 아미노산 치환의 조합을 포함하는 대안적인 VH 및 VL 서열의 범위를 디자인하고, 이들 서열은 이어서 기능에 대해 시험하는 본 발명의 폴리펩티드의 범위로 포함시킨다. 통상적으로, 12 내지 24개 변이 항체가 생성되어 시험한다. 그 다음에, 개질된 V 및 인간 C 영역을 포함하는 완전한 중쇄 및 경쇄 유전자는 발현 벡터로 클론화시키고, 후속 플라스미드는 전체 항체의 제조를 위해 세포주로 도입시킨다. 이어서, 항체들은 적절한 생화학적 및 생물학적 검정으로 비교하고, 최적의 변이체를 확인한다.

[0107] 한 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드에 사용되는 가변 도메인은 하나 이상의 CDRs의 적어도 부분적인 치환에 의해 변화시킨다. 다른 구현예에서, 가변 도메인은 임의로, 예를 들면, 부분적인 프레임워크 영역 치환 및 서열 변화에 의해 변화시킬 수 있다. 인간화 가변 영역의 제조시, CDRs은 프레임워크 영역이 유래되는 항체와 동일한 그룹 또는 심지어 서브그룹의 항체로부터 유래되지만, CDRs이 상이한 그룹의 항체로부터 및 바람직하게는 상이한 종으로부터의 항체로부터 유래될 것으로 보여진다. 한 가변 도메인의 항원 결합능을 다른 것으로 전달하기 위하여 도너 가변 영역으로부터의 완전한 CDRs로 모든 CDRs을 대체할 필요는 없을 수 있다. 오히려, 결합 도메인의 활성을 유지할 필요가 있는 잔기들을 단지 전달할 필요는 있을 수 있다. 미국 특허 제5,585,089호, 제5,693,761호 및 제5,693,762호에 제시된 설명에 비추어, 그것은 면역원성이 감소된 기능적 항원 결합 부위를 수득하기 위하여 통상적인 실험을 수행하거나, 시행착오 시험의 수행에 의해 당해 분야의 숙련가의 권한 내에서 잘 이루어질 것이다.

[0108] FC5는 본 발명의 폴리펩티드로 포함될 수 있는 예시적 TME30A 결합 잔기이다. FC5의 아미노산 서열이 하기에 제시되어 있다:

[0109] E V Q L Q A S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G F K I T H Y T M



[0110] G W F R Q A P G K E R E F V S R I T W G G D N T F Y S N S V K G R F  
 [0111] T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A D Y Y C A A G S T S  
 [0112] T A T P L R V - - - D Y W G K G T Q V T V S S

[0113] III. 임의의 링커 펩티드

[0114] 본 발명의 폴리펩티드는 임의로 적어도 하나의 링커 펩티드를 포함한다. 한 구현예에서, 두 개 이상의 링커 펩티드가 본 발명의 폴리펩티드의 폴리펩티드에 존재한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 링커 펩티드를 포함한다.

[0115] 본 발명의 링커 펩티드는 제시된 위치에 한번 존재할 수 있거나, 재조합 폴리펩티드의 제시된 위치에 여러번 (즉, 링커 펩티드의 서열이 서열에서 x회 반복될 수 있다) 존재할 수 있다. 예를 들면, 한 구현예에서, 본 발명의 링커 펩티드는 폴리펩티드의 제시된 위치에 1 내지 10회 (포괄됨) 반복된다. 다른 구현예에서, 링커 펩티드는 폴리펩티드의 제시된 위치에 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 존재한다.

[0116] 본 발명의 링커 펩티드는 다양한 길이로 존재할 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 링커 펩티드는 약 5 내지 약 75개 아미노산 길이로 존재한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 링커 펩티드는 약 5 내지 약 50개 아미노산 길이로 존재한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 링커 펩티드는 약 10 내지 약 40개 아미노산 길이로 존재한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 링커 펩티드는 약 15 내지 약 35개 아미노산 길이로 존재한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 링커 펩티드는 약 15 내지 약 20개 아미노산 길이로 존재한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 링커 펩티드는 약 15개 아미노산 길이로 존재한다.

[0117] 링커 펩티드는 그들이 합성 생물학에서 표준 어셈블리 파트가 되도록 단백질 공학에서 빈번히 사용된다 (참조 예: Anderson, J.C., et al. Journal of Biological Engineering 2010. 4:1 및 유전 작제물에 사용되는 표준 생물학적 파트를 제시한 parts registry web site).

[0118] 링커 펩티드에 대해 현재, 당해 분야 인지된 용도의 일부 예는: scFv 분자 (Freund et al. FEBS 1993. 320:97); 단일쇄 면역글로불린 분자 (Shu et al. 1993. PNAS.USA 90:7995); 미니바디 (Hu et al. 1996 Cancer Res 56:3055); CH2 도메인 결실 항체 (Mueller, B.M., et al. 1990 PNAS USA. 87:5702); 단일쇄 이중 특이적 항체 (Schlereth et al. 2005 Cancer Res. 65:2882); 전장 IgG-유사 이중특이적 항체 (Marvin, J.S. et al. 2005 Acta Pharmacol Sin 26:649 및 그 안에 인용된 참조문헌, 및 Michaelson, J.S., et al. 2009 MAbs.1:128과 Orcutt K.D. et al. 2010 Protein Eng Des Sel. 23:221); scFv 융합 단백질 (deGraaf et al. 2002 British Journal of Cancer 86:811); 단백질-단편 상보성 검정의 개발 (Remy, I. et al. 2007 BioTechniques 42:137)에 있어서의 용도를 포함한다.

[0119] 다른 예시적 링커 펩티드는 환원 크실로스 (예: PCT/US11/66947에 기술된 바와 같은)가 본 결합 분자에 사용될 수 있는 것들을 포함한다.

[0120] 링커 펩티드는 그들이 결합되는 폴리펩티드의 N 또는 C 말단 (또는 이 둘 모두)에 결합될 수 있다.

[0121] IV. 예시 약제학적 활성 잔기

[0122] 표적이 되는 질환 또는 장애나 병태에 따라, 다양한 약물 카고(drug cargoes), 예를 들면, 약제학적 활성 체제 또는, 동등하게 약제학적 활성 잔기가 본 발명의 결합 분자, 예를 들면, 본 발명에 따르는 BBB 이전 부위를 포함하는, 예를 들면, TMEM30A를 표적으로 하는 결합 분자를 생체내 사용하여 성공적으로 전달될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적 활성 잔기" 및 "약물학적 화합물"은 질환 또는 장애의 효과를 치료하거나 완화시키는데 유용한 임의의 잔기 또는 화합물을 의미할 것이다. 예를 들면, 신경변성 질환, 예를 들면, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측삭경화증(ALS, 루게릭병), 통증성 간질, 저장성 질환 및 다발성 경화증을 포함한 질환 또는 장애들이 표적이 될 수 있다.

[0123] 예시적인 약제학적 활성 분자는: 신경성장인자 (NGF), 뇌 유래 신경영양인자 (BDNF), 모양체 신경영양인자 (CNTF), 신경교 세포주 신경영양인자 (GDNF) 및 인슐린-유사 성장인자 (IGF)를 포함한다. 또한, 치료학적 잠재력을 갖는 것으로 제시되었고 본 발명의 항체에 의해 전달될 수 있는 다른 화합물은, 이로써 제한되는 것은

아니지만, 물질 P, 뉴로펩티드 Y, 달라르긴, 알파 시누클레인, 혈관활성장펩티드 (VIP), 감마-아미노-부티르산 (GABA), 도파민, 콜레시스토키닌 (CCK), 엔도프린, 엔케팔린 및 티로트로핀 방출 호르몬 (TRH)을 포함한, 뉴로펩티드이다. 추가의 예시적 치료제는, 예를 들면, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 간질, 발작 장애, 졸중 및 뇌혈관 장애, 뇌염 및 뇌수막염, 기억 및 인지 장애, 급성 또는 만성 통증 (예: 난치성) 및 신체적 외상뿐만 아니라, 정신의학적 병, 예를 들면, 불안, 우울증, 정신분열증 및 수면 장애를 포함한, 이러한 신경 장애에 사용될 수 있는 소간섭 RNAs(small-interfering RNA)를 포함한, 사이토킨, 불안완화제, 항경련제, 폴리뉴클레오티드 및 이식 유전자를 포함할 수 있다.

[0124] 한 구현예에서, 약제학적 활성 잔기는 TMEM30A에 결합되지 않는 항원 결합 부위를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 생물학적 효과를 매개하는 비-TMEM30A 표적 분자에 대해 특이적인 적어도 하나의 결합 부위를 갖는다. 한 구현예에서, 결합 부위는 세포 활성화 또는 억제 (예: 세포 표면 수용체에 결합되어 활성화 또는 억제 신호의 전달을 유발함으로써)를 조절한다. 한 구현예에서, 결합 부위는 세포사를 일으키거나 (예: 세포 신호 유도 경로에 의해, 결합 분자 상에 존재하는 페이로드 (예: 독성 페이로드)에 보체 고정 또는 노출에 의해) 또는 대상자의 질환 또는 장애를 조절하는 (예를 들면, 세포 살해를 매개 또는 촉진하거나, 피브린 피의 분해를 촉진하거나 피 형성을 촉진하거나, 또는 생체이용 가능한 물질의 양을 조절함으로써) 신호의 형질도입을 개시할 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 감소 또는 제거를 위해 표적이 되는 항원, 예를 들면, 세포 표면 항원 또는 가용성 항원에 대해 특이적인 적어도 하나의 결합 부위를 갖는다.

[0125] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 신경학적 질환 또는 장애를 치료하는데 유용한 분자에 결합된다. 예를 들면, 폴리펩티드는 신경세포 (예를 들면, 뉴론, 신경교세포 또는 ) 상에 항원에 결합될 수 있다. 특정 구현예에서, 신경학적 장애와 관련된 항원은 상기 기술된 자가면역 또는 염증성 장애일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "신경학적 질환 또는 장애"는 신경계가 변성된 장애 또는 병태 (예: 신경계가 적절히 발전하지 못하거나 이어지는 손상, 예를 들면, 척수 손상이 재생되지 않는 장애뿐만 아니라, 신경변성 장애)를 포함한다. 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 진단되거나, 예방되거나 치료될 수 있는 신경학적 장애의 예는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 다발성 경화증, 헌팅톤병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 신경병성 통증, 외상성 뇌손상, 갈랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome) 및 만성 염증성 탈수초성 다발성신경병증(CIDP)을 포함한다.

[0126] 부가의 예시적인 약물학적 활성 잔기가 하기에 추가로 논의된다:

[0127] i. 항원 결합 부분

[0128] 특정 구현예에서, 약제학적 활성 잔기는, 예를 들면, 항체 또는 단일 도메인 항체의 항원 결합 부분 (결합 부위)를 적어도 하나 포함한다. 한 구현예에서, 항원 결합 부분은 특별한 세포 형태 또는 조직에 대한 조성물을 표적으로 한다.

[0129] 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기의 결합 부위는 항원 결합 부분 또는 단편을 포함할 수 있다. 용어 "항원-결합 부분"은 항원이 결합되거나 항원 결합 (즉, 특이적 결합)을 위해 온전한 항체와 (즉, 그들이 유래된 온전한 항체와) 경쟁하는 면역글로불린, 항체 또는 항체 변이체의 폴리펩티드 단편을 의미한다. 예를 들면, 항원 결합 단편은 상기 기술된 항체 또는 항체 변이체로부터 유래될 수 있다. 항원 결합 부분은 당해 분야에 잘 공지된 재조합 또는 생화학적 방법들에 의해 제조할 수 있다. 예시적인 항원-결합 단편은 VH 및/또는 VL (각각의 가변 영역이 단독으로 항원을 결합하기에 충분하다면), Fv, Fab, Fab' 및 (Fab')<sub>2</sub>를 포함한다.

[0130] 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 단일 쇠 결합 분자 (예를 들면, 단일 쇠 가변 영역 또는 scFv)로부터의 결합 부위를 포함할 수 있다. 단일 쇠 항체의 제조에 대해 기재된 기술 (미국 특허 제 4,694,778호; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston 등., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); and Ward 등., Nature 334:544-554 (1989))은 단일 쇠 결합 분자를 제조하기 위해 채택될 수 있다. 단일 쇠 항체는 아미노산 브릿지를 통해 Fv 영역의 중쇄 및 경쇄 단편을 결합시켜 형성함으로써, 단일 쇠 항체가 생성된다. 이 콜라이(E. coli)에서 기능적 Fv 단편의 어셈블리를 위한 기술이 또한 사용될 수 있다 (Skerra 등., Science 242:1038-1041 (1988)).

[0131] 특정 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 단일 쇠 가변 영역 서열 (scFv)을 포함하거나 이것으로 이루어진 하나 이상의 결합 부위 또는 영역을 포함한다. 단일 쇠 가변 영역 서열은 하나 이상의 항원 결합

부위, 예를 들면,  $V_H$  도메인에 링커 펩티드에 의해 결합된  $V_L$  도메인을 갖는 단일 폴리펩티드를 포함한다.  $V_L$  및/또는  $V_H$  도메인은 당해 분야에 공지된 항체 또는 그의 변이체로부터 유래될 수 있다. scFv 분자는  $V_H$ -링커- $V_L$  배향 또는  $V_L$ -링커- $V_H$  배향으로 작제될 수 있다.

- [0132] 특정 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기에 사용되는 scFv 분자는 안정화된 scFv 분자이다. 한 구현예에서, 안정화된 scFv 분자는  $V_H$  도메인과  $V_L$  도메인 사이에 끼어든 링커 펩티드를 포함할 수 있으며, 여기서  $V_H$  및  $V_L$  도메인은  $V_H$  의 아미노산 및  $V_L$  도메인의 아미노산 사이에 디설파이드 결합에 의해 결합된다. 다른 구현예에서, 안정화된 scFv 분자는 최적화된 길이 또는 조성을 갖는 scFv 링커를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 안정화된 scFv 분자는 적어도 하나의 안정화된 아미노산 치환(들)을 갖는  $V_H$  또는  $V_L$  도메인을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 안정화된 scFv 분자는 적어도 두 개의 상기 제시된 안정화 특징을 가질 수 있다.
- [0133] 안정화된 scFv 분자는 작동가능하게 연결된 폴리펩티드에 대한 개선된 단백질 안정성을 갖거나 이에 개선된 단백질 안정성을 부여한다. 본 발명의 폴리펩티드에 존재할 수 있는 예시적인 안정화된 scFv 분자가 2007년 3월 19일자로 출원된 미국 특허출원 제11/725,970호에 기술되어 있으며, 이는 각각 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0134] 특정 예시적 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 Fc 영역의 C-말단 및/또는 N-말단에 링커 펩티드를 통해 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 scFv 분자를 포함한다.
- [0135] 한 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 원하는 표적을 인지하는 항체로부터의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 원하는 표적을 인지하는 항체로부터의 적어도 두 개의 CDRs을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 원하는 표적을 인지하는 항체로부터의 적어도 세 개의 CDRs을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 원하는 표적을 인지하는 항체로부터의 적어도 네 개의 CDR을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 원하는 표적을 인지하는 항체로부터의 적어도 다섯 개의 CDRs을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 원하는 표적을 인지하는 항체로부터의 여섯 개 CDRs 모두를 포함한다. 한 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 원하는 표적을 인지하는 항체 분자의 완전한 아미노산 서열을 포함한다 (예: 이중특이적, 사가 항체 분자의 경우에).
- [0136] 결합 부위가 본 발명의 약제학적 활성 잔기에 사용하기 위해 유래될 수 있는 예시적 항체가 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 치료에 사용하기 위해 FDA에 의해 현재 승인된 항체가 결합 부위를 얻기 위해 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 예시적 결합 부위는 항-링고(anti-Lingo) 항체로부터 유래된다 (참조 예: PCT/US2008/000316).
- [0137] 다른 양태에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 개질된 항체 분자 또는 항체의 개질된 형태로부터 유래된 항원 결합 부위 (또는 그의 부분)을 포함할 수 있다. 예시적인 상기 형태는, 예를 들면, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 나노바디, 카멜리드, Dabs, 4가 항체, 인트라바디(intradiabodies) (예: Jendreyko et al. 2003. J. Biol. Chem. 278:47813), 융합 단백질 (예: 항체 사이토킨 융합 단백질, Fc 수용체의 적어도 부분에 융합된 단백질) 및 이중특이적 항체를 포함한다. 다른 개질된 항체가, 예를 들면, 미국 특허 제4,745,055호; EP 제256,654호; Faulkner et al., Nature 298:286 (1982); EP 제120,694호; EP 제125,023호; Morrison, J. Immun. 123:793 (1979); Kohler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980); Raso et al., Cancer Res. 41:2073 (1981); Morrison et al., Ann. Rev. Immunol. 2:239 (1984); Morrison, Science 229:1202 (1985); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984); EP 제255,694호; EP 제266,663호; 및 WO 88/03559에 기술되어 있다. 재분류된 면역글로불린 쇄가 또한 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제 4,444,878호; WO 88/03565; 및 EP 68,763과, 본원에 인용된 참조문헌을 참조하라.
- [0138] 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 디아바디인 항원 결합 부위 또는 영역이나, 이로부터 유래되는 항원 결합 부위를 포함한다. 디아바디는 각각 scFv 분자와 유사한 폴리펩티드를 갖지만, 대개 동일한 폴리펩티드 쇄 상에  $V_L$  및  $V_H$  도메인이 상호작용할 수 없도록, 두 가변 도메인을 연결하는 짧은 (예: 10개 미만 및 바람직하게는 1 내지 5개) 아미노산 잔기 링커를 갖는 이합체성, 4가 분자이다. 대신에, 한 폴리펩티드 쇄의  $V_L$  및  $V_H$  도메인은 제2 폴리펩티드 쇄 상의  $V_H$  및  $V_L$  도메인과 (각각) 상호작용한다 (참조, 예: WO 02/02781). 한 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 적어도 하나의 유전적으로-융합된 Fc 영역 (즉,

scFc 영역)의 N-말단 및/또는 C-말단에 작동가능하게 연결된 디아바디를 포함한다.

- [0139] 특정 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 비-BBB 이전 항체 결합 부위 (예: 비-TEME30A 결합 단일 도메인 결합 분자, 예를 들면, 단일 도메인 항체)를 포함한다.
- [0140] ii. 비-면역글로불린 결합 분자
- [0141] 특정한 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 비-면역글로불린 결합 분자로부터 유래된 하나 이상의 결합 부위를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비-면역글로불린 결합 분자"는 면역글로불린이 아닌 다른 폴리펩티드로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 항체 분자로부터 유래되지 않은 결합 부위를 포함하는 결합 분자의 예는 아래에 보다 상세히 논의되는 수용체 결합 부위 및 리간드 결합 부위를 포함한다.
- [0142] 비-면역글로불린 약제학적 활성 잔기는 면역글로불린이 아닌 면역글로불린 슈퍼그룹의 구성원 (예: T-세포 수용체 또는 세포-부착 단백질 (예: CTLA-4, N-CAM, 텔로킨))으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 아미노산 서열은 면역글로불린 폴드(fold)를 기반으로 하지 않지만, 그럼에도 불구하고 표적에 특이적으로 결합될 수 있는 단백질 토폴로지 (예: 안키린 반복 단백질 또는 피브로넥틴)를 포함할 수 있다.
- [0143] 비-면역글로불린 기반 약제학적 활성 잔기는 인공적으로 다각화된 결합 부위를 갖는 결합 분자의 라이브러리로부터 표적-결합 변이체의 분비 또는 단리에 의해 확인할 수 있다. 다각화된 라이브러리는 완전히 랜덤한 접근법 (예: 실수-유발 PCR(error-prone PCR), 엑손 셔플링(exon shuffling) 또는 유도 진화)을 사용하여 생성하거나, 당해 분야-인지된 디자인 전략에 의해 보조할 수 있다. 예를 들면, 대개 결합 부위가 그의 동족 표적 분자와 상호작용하는 경우에 판여되는 아미노산 위치는 결합 부위를 암호화하는 핵산 내에 상응하는 위치에 변성 코돈, 트리뉴클레오티드, 랜덤펩티드, 또는 전체 루프의 삽입에 의해 랜덤화시킬 수 있다 (참조: 예를 들면, 미국 특허공보 제20040132028호). 아미노산 위치의 장소는 표적 분자와의 복합체 중 결합 부위의 결정 구조를 조사함으로써 확인할 수 있다. 랜덤화를 위한 후보 위치는 결합 부위의 루프, 평평한 표면, 나선 및 결합 공동을 포함한다. 특정 구현예에서, 다각화를 위해 후보가 될 것 같은 결합 부위 내에 아미노산은 면역글로불린 폴드와 그들의 상동성에 의해 확인할 수 있다. 예를 들면, 피브로넥틴의 CDR-유사 루프 내의 잔기는 피브로넥틴 결합 분자의 라이브러리를 생성하기 위하여 랜덤화시킬 수 있다 (참조, 예: Koide et al., J. Mol. Biol., 284: 1141-1151 (1998)). 랜덤화될 수 있는 결합 부위의 다른 부분은 평평한 표면을 포함한다. 선택은 과지 디스플레이, 효소 디스플레이, 또는 리보솜 디스플레이와 같은 당해 분야-인지된 방법들에 의해 성취할 수 있다.
- [0144] 한 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 피브로넥틴 결합 분자로부터의 결합 부위를 포함한다. 피브로넥틴 결합 분자 (예: 피브로넥틴 I, II 또는 III 형 도메인을 포함하는 분자)는 면역글로불린과 대조적으로, 쇠내 디설파이드 결합에 의존하지 않는 CDR-유사 루프를 디스플레이한다. 피브로넥틴 폴리펩티드의 제조 방법이, 예를 들면, WO 01/64942 및 미국 특허 제6,673,901호, 제6,703,199호, 제7,078,490호, 및 제 7,119,171호에 기술되어 있으며, 이들은 참조로 본원에 포함된다. 한 예시적인 구현예에서, 피브로넥틴 폴리펩티드는 AdNectin® (Adnexus Therapeutics, Waltham, MA)이다.
- [0145] 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 아피바디(Affibody)® (Abcam, Cambridge, MA)로부터의 결합 부위를 포함한다. 아피바디는 스타필로코칼 단백질 A (staphylococcal Protein A)(SPA)의 면역글로불린 결합 도메인으로부터 유래된다 (참조, 예를 들면, Nord et al., Nat. Biotechnol., 15: 772-777 (1997)). 아피바디 결합 부위의 제조 방법이 미국 특허 제6,740,734호 및 제6,602,977호와 WO 00/63243에 기술되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.
- [0146] 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 안티칼린(Anticalin)® (Pieris AG, Friesing, Germany) 으로부터의 결합 부위를 포함한다. 안티칼린 (리포칼린으로서 또한 공지됨)은 이의 기능이 그들의 배럴/루프 영역에 표적 분자를 결합시키는 것인 상이한  $\beta$ -배럴 단백질 그룹의 구성원이다. 리포칼린 결합 부위는 배럴의 가닥을 연결하는 루프 서열을 랜덤화함으로써 조작할 수 있다 (참조 예: Schlehuber et al., Drug Discov. Today, 10: 23-33 (2005); Beste et al., PNAS, 96: 1898-1903 (1999)). 본 발명의 결합 분자에 사용된 안티칼린 결합 부위는 피에리스 브라시카(Pieris brassica)의 빌린-결합 단백질 (BBP)의 아미노산 위치 28 내지 45, 58 내지 69, 86 내지 99 및 114 내지 129번을 포함하는 선형 폴리펩티드 서열의 서열 위치에 상응하는 4개의 절편에서 돌연변이된 리포칼린 그룹의 폴리펩티드로부터 시작하여 수득할 수 있다. 안티칼린 결합 부위를 제조하는 다른 방법이 WO99/16873 및 WO 05/019254에 기술되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

- [0147] 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 시스테인-풍부 폴리펩티드로부터의 결합 부위를 포함한다. 본 발명의 실행시 사용되는 시스테인-풍부 도메인은 통상  $\alpha$ -나선,  $\beta$  시트, 또는  $\beta$ -배럴 구조를 형성하지 않는다. 통상적으로, 디설파이드 결합은 3차원 구조로 도메인의 폴딩을 촉진한다. 대개, 시스테인-풍부 도메인은 적어도 2개의 디설파이드 결합, 보다 통상적으로는 적어도 3개의 디설파이드 결합을 갖는다. 예시적인 시스테인-풍부 폴리펩티드는 A 도메인 단백질이다. A-도메인 (종종 "보체-형 반복체"로 불리움)은 약 30 내지 50 또는 30 내지 65개의 아미노산을 함유한다. 일부 구현예에서, 도메인은 약 35 내지 45개의 아미노산 및 일부 경우에, 약 40개의 아미노산을 포함한다. 30 내지 50개 아미노산 내에, 약 6개의 시스테인 잔기가 존재한다. 6개의 시스테인 중, 디설파이드 결합은 통상 다음의 시스테인 사이에서 발견된다: C1 및 C3, C2 및 C5, C4 및 C6. A 도메인은 리간드 결합 잔기를 구성한다. 도메인의 시스테인 잔기는 치밀하고, 안정한, 기능적으로 독립된 잔기를 형성하기 위하여 디설파이드 결합된다. 이들 반복체의 클러스터는 리간드 결합 도메인을 구성하며, 미분화된 클러스터링(clustering)은 리간드 결합에 대해 특이성을 부여할 수 있다. A-도메인을 함유하는 예시적 단백질은, 예를 들면, 보체 성분 (예: C6, C7, C8, C9, 및 인자 I), 세린 프로테아제 (예: 엔테로캡티다제, 마트립타제 및 코린), 막관통 단백질 (예: ST7, LRP3, LRP5 및 LRP6) 및 식균작용 수용체 (예: 소르틸린-관련 수용체, LDL-수용체, VLDLR, LRP1, LRP2, 및 ApoER2)를 포함한다. 원하는 결합 특이성의 A 도메인 단백질의 제조 방법이, 예를 들면, WO 02/088171 및 WO 04/044011에 기술되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.
- [0148] 다른 구현예에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 반복 단백질로부터의 결합 부위를 포함한다. 반복 단백질은 인접 도메인을 형성하기 위하여 함께 적층되는 작은 (예: 약 20 내지 약 40개 아미노산 잔기) 구조적 단위 또는 반복체의 연속 카피를 함유하는 단백질이다. 반복 단백질은 단백질의 반복체 수를 조절함으로써 특별한 표적 결합 부위에 적합하도록 개질시킬 수 있다. 예시적인 반복 단백질은 디자인된 안키린 반복 단백질 (Designed Ankyrin Repeat Proteins) (즉, DARPins®, Molecular Partners, Zurich, Switzerland) (참조 예: Binz et al., Nat. Biotechnol., 22: 575-582 (2004)) 또는 류신-풍부 반복 단백질 (즉, LRRPs) (참조 예: Pancer et al., Nature, 430: 174-180 (2004))을 포함한다. 지금까지 결정된 모든 안키린 반복 단위의 3차 구조는  $\beta$ -헤어핀에 이어서, 2개의 반대로 평행한  $\alpha$ -나선으로 구성되고, 반복 단위와 다음 것을 연결하는 루프 로 종결되는 특징을 공유한다. 안키린 반복 단위로 구성된 도메인은 연장된 곡선 구조로 반복 단위들을 적층시켜 형성한다. 바다 칠성장어 및 다른 무악어의 적응 면역계 일부로부터의 LRRP 결합 부위는 그들이 림프구 돌연변이 도중 일련의 류신-풍부 반복 유전자의 재조합에 의해 형성되는 항체와 비슷하다. DARP인 또는 LRRP 결합 부위의 제조 방법이 WO 02/20565 및 WO 06/083275에 기술되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.
- [0149] 본 발명의 결합 분자에 사용될 수 있는 다른 비-면역글로불린 결합 부위는 Src 상동성 도메인 (예: SH2 또는 SH3 도메인), PDZ 도메인, 베타-락타마제, 고친화성 프로테아제 억제제 또는 작은 디설파이드 결합 단백질 스캐폴드 (예: 전갈 독소)로부터 유래된 결합 부위를 포함한다. 이들 분자로부터 유래된 결합 부위의 제조 방법이 당해 분야에 기술되어 있다 (참조 예: Silverman et al., Nat. Biotechnol., 23(12): 1493-4 (2005); Panni et al, J. Biol. Chem., 277: 21666-21674 (2002), Schneider et al., Nat. Biotechnol., 17: 170-175 (1999); Legendre et al., Protein Sci., 11:1506-1518 (2002); Stoop et al., Nat. Biotechnol., 21: 1063-1068 (2003); and Vita et al., PNAS, 92: 6404-6408 (1995)). 또 다른 결합 부위는 EGF-유사 도메인, Kringle-도메인, PAN 도메인, Gla 도메인, SRCR 도메인, Kunitz/소 웨장 트립신 억제제 도메인, Kazal-형태 세린 프로테아제 억제제 도메인, Trefoil (P-형태) 도메인, 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자 C형 도메인, 아나필라톡신-유사 도메인, CUB 도메인, 티로글로불린 I형 반복체, LDL-수용체 그룹 A 도메인, 스시 (Sushi) 도메인, 링크 도메인, 트롬보스폰딘 I형 도메인, 면역글로불린-유사 도메인, C-형 렉틴 도메인, MAM 도메인, 폰 빌레브란트 인자 A형 도메인, 소마토메딘 B 도메인, WAP-형 4 디설파이드 코어 도메인, F5/8 C형 도메인, 헤모팩신 도메인, 라미닌-형 EGF-유사 도메인, C2 도메인, CTLA-4 도메인 및 당해 분야의 통상적인 숙련자에게 공지된 다른 상기 도메인들, 및 그의 유도체 및/또는 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 결합 도메인으로부터 유래될 수 있다. 부가의 비-면역글로불린 폴리펩티드는 Avimers® (Avidia, Inc., Mountain View, CA -참조 국제 PCT 공보 제WO 06/055689호 및 미국 특허공보 제2006/0234299호), Telobodies® (Biotech Studio, Cambridge, MA), Evibodies® (Evogenix, Sydney, Australia - 참조 미국 특허 제7,166,697호), 및 Microbodies® (Nascacell Technologies, Munich, Germany)를 포함한다.
- [0150] iii. 수용체 또는 리간드의 결합 부분
- [0151] 다른 양태에서, 본 발명의 약제학적 활성 잔기는 수용체의 리간드 결합 부분 및/또는 리간드의 수용체 결합

부분이다.

- [0152] 다른 예시적 구현예에서, 본 발명의 억제학적 활성 잔기는 하나 이상의 하기 단백질로부터 유래되는 하나 이상의 리간드 결합 도메인 또는 수용체 결합 도메인을 포함할 수 있다:
- [0153] a. 사이토킨 및 사이토킨 수용체
- [0154] 사이토킨은 림프구의 증식, 미분화, 및 기능적 활성화에 대한 다면적 효과를 갖는다. 다양한 사이토킨, 또는 그의 수용체 결합 부분이 본 발명의 융합 단백질에 이용될 수 있다. 예시적인 사이토킨은 인터류킨 (예를 들면 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, 및 IL-18), 콜로니 자극 인자 (CSFs) (예를 들면 과립구 CSF (G-CSF), 과립구-대식세포 CSF (GM-CSF), 및 단핵구 대식세포 CSF (M-CSF)), 종양괴사인자 (TNF) 알파 및 베타, 세포독성 T 림프구 항원 4 (CTLA-4), 및 인터페론 (예: 인터페론- $\alpha$ ,  $\beta$ , 또는  $\gamma$  (미국 특허 제4,925,793호 및 제4,929,554호))을 포함한다.
- [0155] 사이토킨 수용체는 통상 리간드-특이적 알파 쇄 및 통상의 베타 쇄로 이루어진다. 예시적인 사이토킨 수용체는 GM-CSF, IL-3 (미국 특허 제5,639,605호), IL-4 (미국 특허 제5,599,905호), IL-5 (미국 특허 제5,453,491호), IL10 수용체, IFN  $\gamma$  (EP0240975), 및 수용체의 TNF 그룹 (예: TNF  $\alpha$  (예를 들면 TNFR-1 (EP 417,563), TNFR-2 (EP 417,014) 림프독소 베타 수용체)에 대한 것들을 포함한다.
- [0156] b. 부착 단백질
- [0157] 부착 분자는 세포가 서로 상호작용할 수 있도록 하는 막-결합 단백질이다. 백혈구 회귀 수용체(leukocyte homing receptors) 및 세포 부착 분자, 또는 그의 수용체 결합 부분을 포함하는 다양한 부착 단백질이 본 발명의 융합 단백질로 포함될 수 있다. 백혈구 회귀 수용체는 염증 동안 백혈구 세포 표면 상에 발현되며, 세포 외 기질 성분에 대한 결합을 매개하는  $\beta$ -1 인테그린 (예를 들면 VLA-1, 2, 3, 4, 5, 및 6) 및 혈관 내피 상에 세포 부착 분자 (CAMs)를 결합하는  $\beta$ 2-인테그린 (예를 들면 LFA-1, LPAM-1, CR3, 및 CR4)을 포함한다. 예시적인 CAM은 ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, 및 MAdCAM-1을 포함한다. 다른 CAM은 E-셀렉틴, L-셀렉틴 및 P-셀렉틴을 포함한 셀렉틴 그룹의 것들을 포함한다.
- [0158] c. 케모킨
- [0159] 감염 부위쪽으로 백혈구의 이동을 자극하는 화학주성 단백질인, 케모킨이 또한 본 발명의 융합 단백질로 포함될 수 있다. 예시적인 케모킨은 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1- $\alpha$  및 MIP-1- $\beta$ ), 호중구 화학주성 인자, 및 RANTES (통상 T-세포 발현되고 분비되는 활성화에 대해 조절되는)를 포함한다.
- [0160] d. 호르몬
- [0161] 본 발명의 융합 단백질에서 약물학적 활성 잔기로서 사용하기 위한 예시적인 성장 호르몬은 레닌, 인간 성장 호르몬 (HGH; 미국 특허 제5,834,598호), N-메티오닐 인간 성장 호르몬; 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬 (PTH); 갑상선 자극 호르몬 (TSH); 티록신; 프로인슐린 및 인슐린 (미국 특허 제 5,157,021호 및 제6,576,608호); 여포 자극 호르몬 (FSH); 갈시토닌, 황체형성 호르몬 (LH), 랩틴, 글루카곤; 붐베신; 소마트로핀; 물레리안-억제 물질; 렐락신 및 프로렐락신; 고나도트로핀-관련 펩티드; 프로락틴; 태반 락토겐; OB 단백질; 또는 물레리안-억제 물질을 포함한다.
- [0162] e. 수용체 및 리간드
- [0163] 한 구현예에서, 본 발명의 억제학적 활성 잔기는 리간드 또는 수용체의 결합 부위(들) (예: 수용체의 세포의 도메인 (ECD))과 적어도 하나의 유전적으로-융합된 Fc 영역 (즉, scFc 영역)을 결합시킨다. 특정 구현예에서, 수용체의 리간드-결합 부분의 결합 부위 또는 도메인은 항체 또는 항체 변이체에 의해 결합된 수용체로부터 유래될 수 있다. 다른 구현예에서, 수용체의 리간드 결합 부분은 면역글로불린 (Ig) 슈퍼패밀리의 수용체 (예: 가용성 T-세포 수용체, 예를 들면, mTCR® (Medigene AG, Munich, Germany), 상기 기술된 TNF 수용체 슈퍼패밀리의 수용체 (예: 면역접합체의 가용성 TNF  $\alpha$  수용체), 신경교세포-유래 신경영양인자 (GDNF) 수용체 그룹 (예: GFR  $\alpha$ 3), G-단백질 결합 수용체 (GPCR) 슈퍼패밀리의 수용체, 티로신 키나제 (TK) 수용체 슈퍼패밀리의 수용체, 리간드-작동성 (Ligand-Gated; LG) 슈퍼패밀리의 수용체, 케모킨 수용체 슈퍼패밀리의 수용체, IL-1/톨-유사 수용체(TLR) 슈퍼패밀리, 및 사이토킨 수용체 슈퍼패밀리로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체로부터 유래된다.
- [0164] 다른 구현예에서, 리간드의 수용체-결합 부분의 결합 부위 또는 도메인은 항체 또는 항체 변이체에 의해 결합되는 리간드로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, 리간드는 면역글로불린 (Ig) 슈퍼패밀리의 수용체, TNF 수용

체 수퍼패밀리의 수용체, G-단백질 결합 수용체 (GPCR) 수퍼패밀리의 수용체, 티로신 키나제 (TK) 수용체 수퍼패밀리의 수용체, 리간드-작동성 (LG) 수퍼패밀리의 수용체, 케모킨 수용체 수퍼패밀리의 수용체, IL-1/톨-유사 수용체 (TLR) 수퍼패밀리, 및 사이토킨 수용체 수퍼패밀리로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체를 결합할 수 있다. 한 예시적 구현예에서, 리간드의 수용체-결합 부분의 결합 부위는 TNF 리간드 수퍼패밀리에 속하는 리간드 (예를 들면, CD40L)로부터 유래된다.

[0165] 성장 인자 또는 그들의 수용체 (또는 그의 수용체 결합 또는 리간드 결합 부분)이 본 발명의 융합 단백질로 포함될 수 있다. 예시적인 성장인자는 혈관 내피성장인자 (VEGF) 및 그의 이소형태 (미국 특허 제5,194,596호); aFGF 및 bFGF를 포함한, 섬유아세포 성장인자 (FGF); 심방나트륨이노인자 (ANF); 간 성장인자 (HGFs; 미국 특허 제5,227,158호 및 제6,099,841호), 신경영양인자, 예를 들면, 골-유래 신경영양인자 (BDNF), 신경교세포 유래 신경영양인자 리간드 (예: GDNF, 뉴트린, 아르테민, 및 페르세핀), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5, 또는 NT-6), 또는 신경성장인자 (예: NGF-β 혈소판-유래 성장인자 (PDGF) (미국 특허 제4,889,919호, 제4,845,075호, 제5,910,574호, 및 제5,877,016호); 형질전환 성장인자 (TGF), 예를 들면, TGF-알파 및 TGF-베타 (WO 90/14359), 골형성 단백질 (BMP)을 포함한 골유도 인자; 인슐린-유사 성장인자-I 및 II (IGF-I 및 IGF-II; 미국 특허 제6,403,764호 및 제6,506,874호); 에리트르포이에틴 (EPO); 트롬보포이에틴 (TPO; 줄기-세포인자 (SCF), 트롬보포이에틴 (TPO, c-Mpl 리간드), 및 Wnt 폴리펩티드 (미국 특허 제6,159,462호)를 포함한다.

[0166] 본 발명의 약물학적 활성 잔기로서 사용될 수 있는 예시적 성장인자 수용체는 EGF 수용체; VEGF 수용체 (예를 들면 Flt1 또는 Flk1/KDR), PDGF 수용체 (WO 90/14425); HGF 수용체 (미국 특허 제5,648,273호, 및 제5,686,292호), 및 NGF, BDNF, 및 NT-3을 결합하는 p75<sup>NTR</sup> 또는 p75로서 또한 언급되는 저친화성 수용체 (LNGFR), 및 수용체 티로신 키나제의 trk 그룹의 구성원 (예: trkA, trkB (EP 455,460), trkC (EP 522,530))인 고친화성 수용체를 포함하는 신경영양 수용체를 포함한다.

[0167] f. 약물

[0168] 다른 구현예에서, 약물학적 활성 제제는 질환의 치료, 치유, 예방 또는 진단에 사용되거나, 신체적 또는 정신적 행복을 달리 개선하는데 사용되는 약물 물질이다. 상기 약물은 화학적 기능체일 수 있고, 상기 기능체는 본원에 보다 상세히 기술된다.

[0169] 본 발명은 신경계에 영향을 주는 장애 치료를 위해 다른 제제를 전달하기 위해 적용될 수 있고, 그것은 또한 진단 목적으로 적용될 수 있다. CNS 장애 치료를 위한 바람직한 제제 그룹은 다음을 포함한다:

[0170] 시냅스 및 신경작용(neuroeffector) 접합 부위에 작용하는 약물; 포괄적 및 국부 진통제와 마취제 (예: 아편계 마취제 및 길항제); 최면제 및 진정제; 우울증, 정신분열증과 같은 정신의학적 장애 치료용 약물; 항간질제 및 항경련제; 헌팅톤병, 노화 및 알츠하이머병; 신경보호제 (예: 흥분성 아미노산 길항제 및 신경영양인자) 및 신경재생 제제; 영양인자 (예: 뇌유래 신경영양인자, 섬모 신경영양 인자, 또는 신경성장인자); CNS 외상 또는 줄종의 치료가 목표인 약물; 중독 및 약물 남용 치료용 약물; 오타코이드 및 항염증제; 기생충 감염 및 미생물 질환용 화학요법제; 면역억제제 및 항암제; 호르몬 및 호르몬 길항제; 중금속 및 중금속 길항제; 비-금속성 독성 제제용 길항제; 암 치료용 세포증식 억제제; 핵의학에 사용하기 위한 진단 물질, 및 방사선요법 면역활성 및 면역반응성 제제; 및 수많은 다른 제제 (예: 전달물질 및 그들 각각의 수용체-효능제 및 -길항제, 그들 각각의 전구체 또는 대사물질); 항생제, 진정제, 항히스타민제, 진토제, 이완제, 흥분제, "센스" 및 "안티센스" 올리고뉴클레오티드, 대뇌 확장제, 항정신제, 항조제, 혈관 확장제 및 수축제, 항고혈압제, 편두통 치료제, 최면제, 고- 또는 저-혈당 제제, 무기물 또는 영양제, 항비만 약물, 동화촉진제 및 항천식제.

[0171] 통상적인 활성 성분 (예: 약물)은 신경계에 영향을 주거나 신경계의 진단 시험에 사용되는 임의의 물질일 수 있다. 이들은 길만(Gilman) 등 (1990)에 의해, 문헌("Goodman and Gilman's--The Pharmacological Basis of Therapeutics", Pergamon Press, New York)에 기술되어 있으며, 하기의 제제를 포함한다:

[0172] 아세틸콜린 및 합성 콜린 에스테르, 천연으로 존재하는 콜리노미메틱 알칼로이드 및 그들의 합성 동종체, 항콜린에스테라제 제제, 신경절 흥분제, 아트로핀, 스코폴라민 및 관련 항무스카린성 약물, 카테콜아민 및 교감신경작용제 (예: 에피네프린, 노레피네프린 및 도파민), 교감신경 효능제, 교감신경 길항제, 전달물질 (예: GABA, 글리신, 글루타메이트, 아세틸콜린, 도파민, 5-하이드록시트립타민, 및 히스타민), 신경활성 펩티드;

[0173] 진통제 및 마취제 (예: 아편계 진통제 및 길항제); 전마취제 및 마취제 (예: 벤조디아제핀, 바르비투레이트,

항히스타민제, 페노티아진 및 부틸페논); 아편양 제제; 진토제; 항콜린성 약물 (예: 아트로핀, 스코폴라민 또는 글리코피롤레이트); 코카인; 클로랄 유도체; 에트클로르비놀; 글루테티미드; 메티프릴론; 메프로바메이트; 파라알데히드; 디설피람; 모르핀, 펜타닐 및 날록손;

- [0174] 중추적으로 활성인 진해거담제;
- [0175] 정신의학적 약물, 예를 들면, 페노티아진, 티옥산텐 및 다른 헤테로사이클릭 화합물 (예: 할페리오돌); 트리사이클릭 항우울증제 (예: 데시미프라민 및 이미프라민); 이례적인 항우울증제 (예: 플루옥세틴 및 트라조돈), 모노아민 옥시다제 억제제 (예: 이소카르복사지드); 리튬염; 항불안제 (예: 클로르디아제폭시드 및 디아제팜);
- [0176] 히단토인, 항경련성 바르비투레이트, 이미노스틸빈 (예: 카르바마제핀), 석신이미드, 발프로산, 옥사졸리딘디온 및 벤조디아제핀을 포함한 항간질약.
- [0177] 항-파킨슨 약물, 예를 들면, L-DOPA/CARBIDOPA, 아포모르핀, 아만타딘, 에르골린, 셀레겔린, 로피노롤, 브로모크립틴 메실레이트 및 항콜린성 제제;
- [0178] 항경련성 제제, 예를 들면, 바클로펜, 디아제팜 및 단트롤렌;
- [0179] 신경보호제, 예를 들면, 흥분성 아미노산 길항제, 신경영양인자 및 뇌유래 신경영양인자, 섬모 신경영양인자, 또는 신경성장인자; 뉴로트로핀(NT) 3 (NT3); NT4 및 NT5; 강글리오시드; 신경변성 제제;
- [0180] 중독 및 약물 남용 치료용 약물은 아편계 길항제 및 항우울증제를 포함한다;
- [0181] 오토코이드 및 항염증성 약물, 예를 들면, 히스타민, 브라디키닌, 칼리딘 및 그들 각각의 효능제와 길항제;
- [0182] 기생충 감염 및 미생물 질환을 위한 화학요법 제제;
- [0183] 알킬화제 (예: 니트로소우레아) 및 항대사제; 질소 머스타드, 에틸렌아민 및 메틸멜라민; 알킬설포네이트; 엽산 동족체; 피리미딘 동족체, 푸린 동족체, 빈카 알칼로이드; 및 항생제를 포함한 항암제.
- [0184] 본 발명은 또한 진토제, 이완제, 흥분제, "센스" 및 "안티센스" 올리고뉴클레오티드, 대뇌 확장제, 항정신제, 혈관 확장제 및 수축제, 항고혈압제, 편두통 치료제, 고- 또는 저-혈당 제제, 무기물 또는 영양제, 항비만 약물, 동화촉진제 및 항천식제, 항염증성 약물 (예: 페닐부타존, 인도메타신, 나프록센, 이부프로펜, 플루르비프로펜, 디클로페낙, 텍사메타손, 프레드니손 및 프레드니솔론); 뇌혈관 확장제, 예를 들면, 솔록티딜륨, 빈카민, 나프티드로푸릴 옥살레이트, 코-데르코크린 메실레이트, 시클란텔레이트, 파파베린, 니코틴산, 항감염제 (예: 에리트로마이신 스테아레이트 및 세팔렉신)의 전달에 유용하다.
- [0185] 부신피질자극 호르몬, 아데노신 데아미나제 리보뉴클레아제, 알칼리성 포스파타제, 안지오텐신, 항체, 아르기나제, 아르기닌 데아미네아제, 아스파라기나제, 세룰레인, 칼시토닌, 케모트립신, 콜레시스토키닌, 응혈인자, 디노르핀, 엔도르핀, 엔도르핀, 엔케팔린, 엔케팔린, 에리트로포이에틴, 가스트린-방출 펩티드, 글루카곤, 헤모글로빈, 시상하부 방출인자, 인터페론, 카타칼신, 모틸린, 뉴로펩티드 Y, 뉴로텐신, 비-천연으로 존재하는 아편양 제제, 옥시토신, 과파인, 부갑상선 호르몬, 펩티드 프롤락틴, 가용성 CD-4, 소마토메딘, 소마토스타틴, 소마토스타틴, 소마토트로핀, 수퍼옥사이드 디스무타제, 갑상선 자극 호르몬, 조직 플라즈미노겐 활성화제, 트립신, 바소프레신, 및 상기 펩티드의 동족체, 및 다른 적합한 효소, 호르몬, 단백질, 폴리펩티드, 효소-단백질 접합체, 항체-합텐 접합체, 바이러스 에피토프 등.

[0186] V. 폴리펩티드의 예시적 포맷

[0187] 본 발명의 결합 분자의 예시적 포맷이 첨부되는 도면에 제시되어 있다.

[0188] 예를 들면, 도 1은 약제학적 활성 잔기가 항체 결합 부위인 구현예뿐만 아니라, 약제학적 활성 잔기가 제시되지 않은 구현예 (예: 약제학적 활성 잔기가 부가될 수 있는 FC5Fc 및 FcFC5 스캐폴드)를 포함한다. 예를 들면, 한 구현예에서, 본 발명의 결합 분자의 스캐폴드 (즉, 약제학적 활성 잔기가 부가될 수 있는 작제물)는 Fc 영역, 도메인 또는 잔기에 공유결합된 (예: 유전적으로 융합된) 두 개의 BBB 이전 잔기를 포함한다. BBB 이전 잔기는 직접 또는 링커 펩티드를 통해 결합될 수 있다. 바람직한 구현예에서, BBB 이전 잔기가 Fc 영역, 도메인 또는 잔기의 N 말단에 연결될 수 있다. 한 구현예에서, 부가의 결합 잔기 (예: scFv 분자의 형태인 비-TMEM30A 약물학적 활성 잔기)가 또한 Fc 영역, 도메인 또는 잔기의 C 말단에 연결될 수 있다.



- [0189] 다른 구현예에서, 부가의 BBB 이전 잔기가 Fc 영역, 도메인 또는 잔기의 C 말단에 연결될 수 있다. BBB 이전 잔기는 직접 또는 링커 펩티드를 통해 결합될 수 있다.
- [0190] 다른 구현예에서, 본 발명의 결합 분자는 온전한 항체 분자의 VH 도메인에 N-말단으로 융합된 BBB 이전 잔기를 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 결합 분자는 온전한 항체 분자의 VL 도메인에 N-말단으로 융합된 BBB 이전 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 결합 분자는 온전한 항체 분자에 C 말단으로 융합된 두 개의 BBB 이전 잔기를 포함한다. BBB 이전 잔기는 직접 또는 링커 펩티드를 통해 결합될 수 있다.
- [0191] 약제학적 활성 잔기 (또는 부가의 약물학적 활성 잔기)는 당해 분야에 공지된 방법들을 사용하여 이들 작제물 중 임의의 것에 부착될 수 있음을 이해하게 될 것이다.
- [0192] 한 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 단지 하나의 약제학적 활성 잔기 (약제학적 활성 잔기에 대해 단량체 성이지만, BBB 이전 잔기에 대해서는 다합체성 (예: 이합체성)인 분자를 생성하는)를 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 1개 초과 약물학적 활성 잔기, 예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 약물학적 활성 잔기를 포함한다. 약제학적 활성 잔기는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0193] 본 발명의 한 구현예에서, 약제학적 활성 잔기는 Fc 도메인, 영역, 또는 잔기의 N-말단에 링커 펩티드를 통해 작동가능하게 연결된다. 다른 구현예에서, 약물학적 활성 잔기는 Fc 도메인, 영역, 또는 잔기의 C-말단에 링커 펩티드를 통해 작동가능하게 연결된다.
- [0194] 다른 구현예에서, 두 개 이상의 약제학적 활성 잔기가 일련으로 서로 (예를 들면, 링커 펩티드를 통해) 연결된다. 한 구현예에서, 약제학적 활성 잔기의 탠덤 어레이(tandem array)는 Fc 영역, 도메인 또는 잔기의 C-말단 또는 N-말단에 링커 펩티드를 통해 작동가능하게 연결된다.
- [0195] 약물학적 활성 화합물에 대한 단백질의 접합, 연결 및 커플링의 다른 방법이 본 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌 (Wu A M, Senter P D, Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates, Nat. Biotechnol. 2005 September; 23(9):1137-46 and Trail P A, King H D, Dubowchik G M, Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer, Cancer Immunol Immunother. 2003 May; 52(5):328-37; Saito G, Swanson J A, Lee K D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, Adv Drug Deliv Rev. 2003 Feb. 10; 55(2):199-215)을 참조하라.
- [0196] 또한, 본 발명의 항체는 약제학적 활성 화합물이 부하된 리포솜, 나노입자 또는 다른 유사 캐리어와 조합되어 제공될 수 있다. 상기 조성물의 제조 방법이 본 분야에 공지되어 있다 (참조, 예를 들면, Sugano et al., Antibody Targeting of Doxorubicin-loaded Liposomes Suppresses the Growth and Metastatic Spread of Established Human Lung Tumor Xenografts in Severe Combined Immunodeficient Mice Cancer Research 60, 6942-6949, Dec. 15, 2000 and Martin et al., Nanomaterials in Analytical Chemistry, Analytical Chemistry News & Features, May 1, 1998; pp. 322 A-327 A).
- [0197] 많은 이펙터 분자는 결합 폴리펩티드가 연결될 수 있는 적절한 작용기가 결합되어 있다. 한 구현예에서, 이펙터 분자, 예를 들면, 약물 또는 프로드러그는 결합 분자를 통해 폴리펩티드에 부착된다. 한 구현예에서, 연결 분자(linking molecule)는 특별한 부위에서 세포독성의 활성화를 허용하는 화학적 결합을 함유한다. 적절한 화학적 결합이 당해 분야에 잘 공지되어 있고, 디설파이드 결합, 산 불안정성 결합, 광불안정성 결합, 펩티다제 불안정성 결합, 설프히드릴과 말레이미드 그룹 사이에 형성된 티오에테르 결합, 및 에스테라제 불안정성 결합을 포함한다. 가장 바람직하게는, 연결 분자는 디설파이드 결합 또는 티오에테르 결합을 포함한다. 본 발명에 따라, 연결 분자 p는 바람직하게는 반응성 화학적 그룹을 포함한다. 특히 바람직한 반응성 화학적 그룹은 N-석신이미딜 에스테르 및 N-설포석신이미딜 에스테르이다. 바람직한 구현예에서, 반응성 화학적 그룹은 티올 그룹 사이에 디설파이드 결합을 통해 이펙터에 공유결합될 수 있다. 한 구현예에서, 이펙터 분자는 티올 그룹을 포함하도록 개질된다. 당해 분야의 통상의 숙련가중 하나는 티올 그룹이 수소 원자에 결합된 황 원자를 함유하며, 통상 "--SH" 또는 "RSH"로서 나타낼 수 있는, 설프히드릴 그룹으로서 당해 분야에 또한 언급됨을 이해할 것이다.
- [0198] 한 구현예에서, 연결 분자는 본 발명의 폴리펩티드와 이펙터 분자를 연결하기 위해 사용될 수 있다. 결합 분자는 절단 가능하거나 절단 불가능할 수 있다. 한 구현예에서, 절단 가능한 연결 분자는 세포질 및 유리 설프히드릴 그룹을 갖는 농도가 더 높은 분자가 있는 다른 영역과 같이, 연결 분자가 더 낮은 산화환원 전위를 갖는 환경에서 절단될 수 있도록 산화환원-절단 가능한 연결 분자이다. 산화환원 전위의 변화로 인하여

절단될 수 있는 연결 분자의 예는 디설파이드를 함유하는 것들을 포함한다. 절단 자극은 세포질의 보다 낮은 산화환원 전위가 연결 분자의 절단을 용이하게 하는 본 발명의 결합 단백질의 세포내 흡수시 제공될 수 있다. 다른 구현예에서, pH의 감소는 메이탄시노이드 카고를 표적 세포로 방출하는 것을 트리거한다. pH의 감소는 엔도솜 트래피킹(trafficking), 중앙성장, 염증 및 심근허혈과 같은, 많은 생리학적 및 병리학적 과정에 관련된다. pH는 엔도솜에서는 생리학적 7.4로부터 5-6으로 또는 리소솜에서는 4-5로 강해진다. 암세포의 리소솜 또는 엔도솜을 표적으로 하는데 사용될 수 있는 산 민감성 연결 분자의 예는 아세탈, 케탈, 오르토에스테르, 히드라존, 트리틸, 시스-아코니틸 또는 티오카르바모일에서 발견되는 것들과 같은 산-절단 가능한 결합을 갖는 것을 포함한다 (참조 예를 들면, Willner et al., (1993), *Bioconj. Chem.*, 4: 521-7; 미국 특허 제 4,569,789호, 제4,631,190호, 제5,306,809호, 및 제5,665,358호). 다른 예시적 산-민감성 연결 분자는 디펩티드 서열 Phe-Lys 및 Val-Lys을 포함한다 (King et al., (2002), *J. Med. Chem.*, 45: 4336-43). 절단 자극은 낮은 pH 엔도솜 구획으로 트래피킹되는 세포내 흡수시 제공될 수 있다. (예를들면 리소솜). 다른 예시적 산-불안정성 연결 분자는 둘 이상의 메이탄시노이드의 부착을 위해 둘 이상의 산 절단 가능한 결합을 함유하는 분자이다 (King et al., (1999), *Bioconj. Chem.*, 10: 279-88; WO 98/19705).

[0199] 절단 가능한 연결 분자는 특별한 표적 세포, 예를 들면, 리소솜 또는 중앙-관련 효소와 관련된 생물학적으로 공급된 절단 제제에 민감할 수 있다. 효소적으로 절단될 수 있는 연결 분자의 예는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 펩티드 및 에스테르를 포함한다. 예시적인 효소 절단 가능한 연결 분자는 카텝신 B 또는 플라스민과 같은 중앙-관련 프로테아제에 민감한 것들을 포함한다 (Dubowchik 등(1999), *Pharm. Ther.*, 83: 67-123; Dubowchik et al., (1998), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 3341-52; de Groot et al., (2000), *J. Med. Chem.*, 43: 3093-102; de Groot et al., (1999) *m* 42: 5277-83). 카텝신 B-절단 가능한 부위는 디펩티드 서열 발린-시트룰린 및 페닐알라닌-리신을 포함한다 (Doronina 등(2003), *Nat. Biotech.*, 21(7): 778-84; Dubowchik 등(2002), *Bioconj. Chem.*, 13: 855-69). 다른 예시적인 효소-절단 가능한 부위는 호중구, 대식 세포 및 다른 과립구에 의해 우선적으로 방출되는 효소인, 티메트 올리고펩티다제 (Thimet Oligopeptidase) (TOP)와 같은, 트라우즈 프로테아제에 의해 인지되는 4 내지 16개 아미노산의 올리고펩티드 서열 (예를 들면, Suc-β-Ala-Leu-Ala-Leu)에 의해 형성되는 것들을 포함한다.

[0200] 특정한 특별 양태에서, 본 발명의 결합 폴리펩티드는 다중특이적이다, 예를 들면, 제1 분자 또는 분자의 에피토프에 결합되는 적어도 하나의 결합 부위 및 제2 분자 또는 제1 분자의 제2 에피토프에 결합되는 적어도 하나의 제2 결합 부위를 갖는다. 본 발명의 다중특이적 결합 분자는 적어도 두 개의 결합 부위를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 다중특이적 결합 분자의 적어도 두 개의 결합 부위는 BBB 이전 부위이다.

[0201] VI. 결합 분자의 합성

[0202] 본 발명의 폴리펩티드 포맷을 선택하여, 다양한 방법들이 폴리펩티드를 제조하는데 유용하다. 상기 방법들은, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 화학적 합성 기술 및 재조합 DNA 발현 기술을 포함한다.

[0203] 한 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물에 관한 것이다. 결결의 변성으로 인하여, 다양한 핵산 서열이 폴리펩티드의 아미노산 서열을 암호화할 것으로 이해될 것이다. 원하는 폴리뉴클레오티드는 당해 분야에 공지된 방법들을 사용하여 제조할 수 있다 (예: 새로운 고체-상 DNA 합성에 의해 또는 표적 폴리펩티드를 암호화하는 앞서 제조된 폴리뉴클레오티드의 PCR 돌연변이 유발에 의해).

[0204] 올리고뉴클레오티드-매개 돌연변이유발은 아미노산 치환을 암호화하는 코돈을 (예를 들면, Fc 변이체 잔기로) 도입시키기 위해 치환, 프레임 삽입(in-frame insertion) 또는 변화 (예를 들면, 변화된 코돈)를 생성하는 한 방법이다. 예를 들면, 출발 폴리펩티드 DNA는 단일가닥 DNA 주형으로 원하는 돌연변이를 암호화하는 올리고뉴클레오티드를 하이브리드화시켜 변화시킨다. 하이브리드화 후, DNA 폴리머라제는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 내포한 주형의 전체 제2 상보성 가닥을 합성하기 위하여 사용한다. 한 구현예에서, 유전공학, 예를 들면, 프라이머-기반 PCR 돌연변이유발이 본 발명의 폴리펩티드를 암호화한 폴리뉴클레오티드를 제조하기 위해, 본원에 정의한 바와 같은, 변화를 내포시키기에 충분하다.

[0205] 재조합 제조를 위해, 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 적절한 발현 비히클로, 즉 삽입된 암호화 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소, 또는 RNA 바이러스 벡터의 경우에는, 복제 및 번역을 위해 필요한 요소를 함유하는 벡터로 삽입시킨다.

- [0206] 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 적절한 리딩 프레임의 벡터로 삽입시킨다. 그 다음에, 발현 벡터는 폴리펩티드를 발현할 적절한 표적 세포로 형질감염시킨다. 당해 분야에 공지된 형질감염 기술은, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 인산칼슘 침전법 (Wigler et al. 1978, Cell 14 : 725) 및 전기천공법 (Neumann et al. 1982, EMBO, J. 1 : 841)을 포함한다. 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 진핵세포 중 본원에 기술된 폴리펩티드를 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 진핵세포는 포유동물 세포 (예: CHO, BHK, Cos, HeLa 세포)를 포함한 동물 세포이다. 폴리펩티드가 진핵세포에서 발현되는 경우에, 폴리펩티드를 암호화하는 DNA도 또한 폴리펩티드가 분비되도록 허용할 신호 서열을 암호화할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는 단백질이 번역되는 반면에, 신호 서열은 성숙 폴리펩티드를 형성하기 위하여 세포에 의해 절단됨을 이해할 것이다. 한 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 링커 펩티드를 포함하는 성숙 폴리펩티드에 관한 것이다. 이와 달리, 신호 서열이 포함되지 않는 경우에, 폴리펩티드는 세포를 용해시켜 회수할 수 있다.
- [0207] 본 발명의 폴리펩티드는 또한 형질전환 동물 (예: 설치류, 염소, 양, 돼지 또는 소)에서 합성할 수 있다. 용어 "형질전환 동물(transgenic animals)"은 외래 유전자가 그들의 계놈으로 내포된 비-인간 동물을 의미한다. 이 유전자가 배아주 조직에 존재하기 때문에, 부모로부터 새끼로 지나간다. 외인성 유전자는 단일-세포 배아로 도입시킨다 (Brinster et al. 1985, Proc. Natl. Acad.Sci. USA 82 : 4438). 형질전환 동물의 제조 방법이 면역글로불린 분자를 제조하는 형질전환을 포함하여, 당해 분야에 공지되어 있다 (Wagner et al. 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6376; McKnight et al. 1983, Cell 34 : 335; Brinster et al. 1983, Nature 306: 332; Ritchie et al. 1984, Nature 312: 517; Baldassarre et al. 2003, Theriogenology 59 : 831 ; Robl et al. 2003, Theriogenology 59: 107; Malassagne et al. 2003, Xenotransplantation 10 (3): 267).
- [0208] 발현 벡터는 재조합적으로 제조된 폴리펩티드의 용이한 정제 또는 확인을 위해 허용하는 태그를 암호화할 수 있다. 그 예는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 서열을 암호화하는 본원에 기술된 폴리펩티드가 lac z 암호화 영역을 갖는 프레임의 벡터로 결합되어 하이브리드 단백질이 제조되는 벡터 pUR278 (Ruther et al. 1983, EMBO J. 2: 1791)을 포함하며; pGEX 벡터는 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (GST) 태그를 갖는 단백질을 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 이들 단백질은 대개 가용성이고, 글루타티온-아가로스 비이드에 대한 흡착에 이어서, 유리 글루타티온의 존재하에 용출시켜 세포로부터 용이하게 정제할 수 있다. 벡터는 정제 후 태그의 제거에 용이한 절단 부위 (예: PreCission 프로테아제 (Pharmacia, Peapack, N.J.))를 포함한다.
- [0209] 본 발명의 목적을 위해, 수많은 상이한 당해 분야 인지된 발현 벡터 시스템이 사용될 수 있다.
- [0210] 이들 발현 벡터는 통상 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 통합 부분으로서 숙주 유기체에서 복제될 수 있다. 발현 벡터는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 프로모터 (예를 들면, 자연적으로-결합되거나 이중 프로모터), 인핸서(enhancer), 신호 서열, 스플라이스 신호, 인핸서 요소, 및 전사 종결 서열을 포함하는, 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 발현 제어 서열은 진핵생물 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터의 진핵생물 프로모터 시스템이다. 발현 벡터는 또한 소유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백신 바이러스, 바칼로바이러스, 레트로바이러스 (RSV, MMTV 또는 MOMLV), 사이토메갈로바이러스 (CMV), 또는 SV40과 같은 동물 바이러스로부터 유래되는 DNA 요소를 이용할 수 있다. 다른 것은 내부 리보솜 결합 부위가 있는 폴리시스트론성(polycistronic) 시스템의 사용을 포함한다.
- [0211] 통상, 발현 벡터는 원하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출을 허용하기 위하여 선택 마커 (예를 들면, 암피실린-내성, 하이그로마이신-내성, 테트라사이클린 내성 또는 네오마이신 내성)를 함유한다 (참조, 예를 들면, Itakura 등., 미국 특허 제4,704,362호). 그들의 염색체로 DNA를 통합시킨 세포는 형질감염된 숙주 세포를 선택할 수 있는 하나 이상의 마커를 도입시킴으로써 선택할 수 있다. 마커는 영양요구성 숙주에 대한 원형양성, 살생물제 내성 (예: 항생제) 또는 중금속 (예: 구리)에 대한 내성을 위해 제공될 수 있다. 선택할 수 있는 마커 유전자는 발현될 DNA 서열에 직접 연결하거나, 동시형질전환에 의해 동일한 세포로 도입시킬 수 있다.
- [0212] 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 폴리시스트론성 작제물을 사용하여 발현시킬 수 있다. 이들 발현 시스템에서, 관심있는 다중 유전자 생성물 (예: 다합체 결합 단백질의 다중 폴리펩티드)은 단일 폴리시스트론성 작제물로부터 제조될 수 있다. 이들 시스템은 진핵생물 숙주 세포에서 비교적 높은 수준의 본 발명의 폴리펩티드를 제공하기 위하여 내부 리보솜 유입 부위 (IRES)를 유용하게 이용한다. 혼화성 IRES 서열은 본원에 또한 내포된 미국 특허 제6,193,980호에 기술되어 있다. 당해 분야의 숙련가들은 상기 발현 시스템이 본 출원에 기술된 전 범위의 폴리펩티드를 효과적으로 제조하기 위하여 사용될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0213] 보다 일반적으로, 폴리펩티드를 암호화하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조되었다면, 발현 벡터를 적절한 숙주 세

포로 도입시킬 수 있다. 즉, 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있다. 숙주 세포로 플라스미드의 도입은 당해 분야의 숙련자에게 잘 공지된 다양한 기술에 의해 성취할 수 있다. 이들은, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 형질감염 (전기영동 및 전기천공법 포함), 원형질체 융합, 인산칼슘 침전법, 외피보유 DNA와의 세포 융합, 미량 주사, 및 온전한 바이러스에 의한 감염을 포함한다. 참조, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). 가장 바람직하게는, 숙주로 플라스미드 도입은 전기천공법을 통해서이다. 형질전환된 세포는 경쇄 및 중쇄의 제조에 적합한 조건하에 성장시키고, 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성에 대해 검정한다. 예시적인 검정 기술은 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA), 방사면역측정법 (RIA), 또는 형광-활성 세포분류 분석법 (FACS) 및 면역조직화학법 등을 포함한다.

[0214] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "형질전환(transformation)"은 유전자형을 변화시켜, 결과적으로 수용 세포의 변화를 일으키는 수용 숙주 세포로 DNA의 도입을 의미한다.

[0215] 이들 동일한 세포주에 따라, "숙주 세포"는 재조합 DNA 기술을 사용하고, 적어도 하나의 이중 유전자를 암호화하는 작제된 벡터로 형질전환시킨 세포를 의미한다. 재조합 숙주로부터 폴리펩티드의 단리 방법의 기술에 있어서, 용어 "세포" 및 "세포 배양액(cell culture)"은 달리 확실히 명시하지 않는 한 폴리펩티드의 공급원을 나타내기 위하여 상호교환적으로 사용된다. 환언하면, "세포"로부터 폴리펩티드의 회수는 스피운 다운된 (spun down) 전체 세포로부터, 또는 배지 및 현탁된 세포를 모두 함유하는 세포로부터를 의미할 수 있다.

[0216] 단백질 발현에 사용되는 숙주 세포주는 가장 바람직하게는 포유동물 기원이며; 당해 분야의 숙련가는 그 안에서 발현될 원하는 유전자 생성물에 가장 적합한 특별한 숙주 세포를 우선적으로 결정하는 능력에 의해 인정받게 된다. 예시적인 숙주 세포주는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, DG44 및 DUXB11 (차이니스 햄스터 난소 세포주, DHFR minus), HELA (인간 자궁경부암), CVI (원숭이 신장 세포주), COS (SV40 T 항원에 의한 CVI의 유도체), R1610 (차이니스 햄스터 섬유아세포) BALBC/3T3 (마우스 섬유아세포), HAK (햄스터 신장 세포주), SP2/O (마우스 골수종), P3x63-Ag3.653 (마우스 골수종), BFA-1c1BPT (소 내피세포), RAJI (인간 림프구) 및 293 (인간 신장)을 포함한다. CHO 세포가 특히 바람직하다. 숙주 세포주는 통상 상용 서비스인 ATCC(the American Tissue Culture Collection)로부터 또는 공개된 문헌으로부터 이용가능하다.

[0217] 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 유전자는 또한 비-포유동물 세포 (예: 세균 또는 효모나 식물 세포)에서 발현시킬 수 있다. 이와 관련하여, 다양한 단세포 비-포유동물 미생물 (예: 세균)이 또한 형질전환될 수 있다, 즉 그것들은 배양 또는 발효로 성장시킬 수 있음을 이해할 것이다. 형질전환되기 쉬운 세균은 장내세균 (예: 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli) 또는 살모넬라(Salmonella)); 간균과 (예: 바실러스 서브틸리스 (Bacillus subtilis)); 폐렴균(Pneumococcus); 연쇄상구균(Streptococcus) 및 헤모필루스 인플루엔자 (Haemophilus influenzae)의 구성원을 포함한다. 세균에서 발현되는 경우에, 폴리펩티드는 통상 포함체 (inclusion body)의 일부가 됨을 또한 이해하게 될 것이다. 폴리펩티드는 단리되고, 정제된 다음, 기능적 분자로 어셈블리되어야 한다.

[0218] 원핵생물 이외에, 진핵 미생물이 또한 사용될 수 있다. 사카로마이세스 세레비시아(Saccharomyces cerevisiae), 또는 통상의 빵 효모는 수많은 다른 균주가 통상 이용가능함에도 불구하고, 진핵 미생물 중에 가장 통상적으로 사용된다. 사카로마이세스에서 발현을 위해, 예를 들면, 플라스미드 YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980))이 통상 사용된다. 이 플라스미드는 이미 트립토판에서 성장되는 능력이 결여된 효모의 돌연변이 균주에 대한 선택 마커를 제공하는 TRP1 유전자, 예를 들면, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1을 함유한다 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). 이어서 효모 숙주 세포 계놈의 특징으로서 trp1 병변의 존재는 트립토판 부재하의 성장에 의한 형질전환을 검출하는데 효과적인 환경을 제공한다. 피치아(Pichia) 같은 다른 효모 숙주가 또한 사용될 수 있다. 발현 제어 서열 (예를 들면, 프로모터), 복제 기원 및 종결 서열 등을 갖는 효모 발현 벡터가 원하는 경우 가능하다. 통상적인 프로모터는 3-포스포글리세레이트 키나제 및 다른 당분해 효소를 포함한다. 유도성 효모 프로모터는 다른 것들 중, 알콜 데하이드로게나제, 이소사이토크롬 C, 및 메탄올, 말토스 및 갈락토스 이용에 관여하는 효소로부터의 프로모터를 포함한다.

[0219] 이와 달리, 폴리펩티드-암호화 뉴클레오티드 서열은 형질전환된 동물의 계놈으로 도입 및 형질전환 동물의 우유에서 후속 발현을 위해 이식유전자(transgene)로 내포시킬 수 있다 (참조, 예를 들면, Deboer 등., US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489, 및 Meade 등., US 5,849,992). 적절한 이식유전자는 포유동물 선 특이적 유전자 (예: 카제인 또는 베타 락토글로불린)로부터의 프로모터 및 인핸서와 작동가능하게 연결된 폴리펩티드를

위한 암호화 서열을 포함한다.

- [0220] 시험관내 제조는 다량의 원하는 폴리펩티드를 제공하기 위해 규모를 확장할 수 있도록 한다. 조직배양 조건하에 포유동물 대규모 세포 배양을 위한 기술이 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 에어리프트 반응기에서 또는 연속 교반식 반응기에서 균질한 현탁 배양, 또는, 예를 들면, 아가로스 마이크로비이드 또는 세라믹 카트리지를 상의 중공 섬유, 마이크로캡슐에서 고정화되거나 갇힌 세포 배양을 포함한다. 필요에 따라 그리고/또는 경우에 따라, 폴리펩티드 용액은, 예를 들면, 합성 힌지 영역 폴리펩티드의 우선적인 생합성 후 또는 본원에 기술된 HIC 크로마토그래피 단계 전에 또는 후속으로 통상적인 크로마토그래피 방법에 의해, 예를 들면, 겔 투과, 이온-교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로즈 상에서 크로마토그래피 또는 (면역-) 친화성 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있다. 친화성 태그 서열 (예를 들면 His(6) 태그)은 임의로 하류 정제를 용이하게 하기 위한 폴리펩티드 서열 내에 부착시키거나 포함시킬 수 있다.
- [0221] 당해 분야의 숙련가는 본 발명과 관련하여 사용하기 위한 보다 작은 펩티드를 용이하게 합성할 수 있다. 합성 펩티드를 제조하는 표준 방법이 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 펩티드는 메리필드(Merrifield)의 고체상 펩티드 합성 (SPPS) 방법 (J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1964), 이는 본원에 참조로 포함됨)을 사용하거나, 당해 분야에 잘 공지된 표준 용액 방법 (참조, 예를 들면, Bodanzsky, M., Principles of Peptide Synthesis 2nd revised ed. (Springer-Verlag, 1988 및 1993), 이는 본원에 참조로 포함됨)을 사용하여 합성할 수 있다. 이와 달리, 당해 분야에 잘 공지된 동시 다중 펩티드 합성(simultaneous multiple peptide synthesis) (SMPS) 기술이 사용될 수 있다. 메리필드 방법에 의해 제조되는 펩티드는 더 어플라이드 바이오시스템즈 431 A-01 펩티드 합성기(the Applied Biosystems 431 A-01 Peptide Synthesizer) (Mountain View, Calif.)와 같은 자동화 펩티드 합성기를 사용하거나, 본원에 참조로 포함된 문헌 (Houghten, Proc. Nat. Acad. Sci., USA 82:5131 (1985))에 기술된 수동 펩티드 합성 기술을 사용하여 합성할 수 있다.
- [0222] 펩티드는 아미노산 또는 아미노산 동족체를 사용하여, 합성할 수 있으며, 이의 활성 그룹은 필요에 따라, 예를 들면, 3급 부틸디카르보네이트 (t-BOC) 그룹 또는 플루오레닐메톡시 카르보닐(FMOC) 그룹을 사용하여 보호한다. 아미노산 및 아미노산 동족체는 상용 구입 (Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtec)하거나, 당해 분야에 공지된 방법들을 사용하여 합성할 수 있다. 고체상 방법을 사용하여 합성한 펩티드는 이들 모두 시판중인, 4-메틸벤즈히드릴아민 (MBHA), 4-(옥시메틸)-페닐아세트아미도메틸 및 4-(히드록시메틸)펜옥시메틸-코폴리(스티렌-1% 디비닐벤젠) (Wang 수지)을 포함하는 수지에, 또는 본원에 참조로 포함된 문헌 (De Grado and Kaiser, J. Org. Chem. 47:3258 (1982))에 기술된 바와 같이 합성할 수 있는 p-니트로벤조페논 옥심 중합체 (옥심 수지)에 부착시킬 수 있다.
- [0223] VII. 결합 분자의 정제
- [0224] 일단 발현되면, 본 발명의 폴리펩티드는, 예를 들면, 황산암모늄 침전법, 친화성 칼럼 크로마토그래피, HPLC 정제 및 겔 전기영동 등을 포함한 당해 분야의 표준 방법 (참조 일반적으로 스코프스(Scopes), 단백질 정제 (Springer-Verlag, N.Y., (1982))에 따라 정제할 수 있다. 새로이 합성된 펩티드는 또한 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC)와 같은 방법 또는 펩티드의 크기 또는 전하를 기반으로 하는 다른 분리 방법을 사용하여 정제할 수 있다. 더욱이, 정제된 펩티드는 이들 및 아미노산 분석과 질량분석법과 같은 다른 잘 공지된 방법들을 사용하여 특성분석할 수 있다.
- [0225] 실질적으로 정제된 단백질은 적어도 약 90 내지 95% 상동성이 있는 것이 약제학적 용도를 위해 바람직하고, 98 내지 99% 또는 그 이상의 상동성이 가장 바람직하다.
- [0226] VIII. 투여 방법
- [0227] 본 발명의 폴리펩티드의 제조 및 대상자에 투여 방법이 잘 공지되어 있거나, 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 결정된다.
- [0228] 대상자에 투여하기 위한 조성물은 폴리펩티드 분자뿐만 아니라, (유전자 치료 적용을 위해) 본 발명의 결합 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함한다.
- [0229] 도입 방법은 이로써 제한되는 것은 아니지만, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비내, 경막외 및 경구 경로를 포함한다. 접합체는 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들면, 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는

점막피부 라이닝 (예: 구강 점막, 직장 및 위장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여할 수 있고, 다른 약물학적 활성 제제와 함께 투여할 수 있다. 투여는 전신 또는 국부일 수 있다.

- [0230] 특정 상황에서, 뇌실내 및 척수강 주사를 포함한, 임의의 적합한 경로에 의해 중추신경계로 직접 본 발명의 약제학적 조성물을 도입시키는 것이 바람직할 수 있고; 뇌실내 주사는, 예를 들면, 리저버 (예: 옴마야 리저버 (Ommaya reservoir))에 부착된 뇌실내 카테터에 의해 용이할 수 있다.
- [0231] 폐 또는 비내 투여가 또한, 예를 들면, 흡입기 또는 분무기 및 에어로졸화 제제와의 제형의 사용에 의해 사용될 수 있다.
- [0232] 다른 구현예에서, 접합체는 제어방출 시스템 (controlled release system)으로 전달될 수 있다. 한 구현예에서, 펌프가 사용될 수 있다 (참조: Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgety 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). 또 다른 구현예에서, 제어방출 시스템이 치료학적 표적, 즉 뇌에 근접하게 위치될 수 있음으로써, 단지 전신 용량의 분획만을 요구할 수 있다 (참조, 예: Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).
- [0233] 다른 제어방출 시스템이 랑거 (Langer)의 검토에서 논의된다 (Science 249:1527-1533 (1990)).
- [0234] 대상자는 바람직하게는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 소, 돼지, 말, 닭, 고양이, 개 등과 같은 동물을 포함한다. 동물이며, 바람직하게는 포유동물이고, 가장 바람직하게는 인간이다.
- [0235] 대개, 주사용으로 적합한 약제학적 조성물은 완충제 (예: 아세테이트, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 계면활성제 (예: 폴리소르베이트), 임의로 안정화제 (예: 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 그러나, 본원의 교시와 양립되는 다른 방법들에서, 폴리펩티드는 유해 세포집단의 부위로 직접 전달됨으로써, 질환이 있는 조직을 치료학적 제제에 노출시키는 것을 증가시킬 수 있다.
- [0236] 비경구 투여용 제제는 멸균 수성 또는 비-수성 용액, 현탁액 및 에멀전을 포함한다. 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성유 (예: 올리브유) 및 주입가능한 유기 에스테르 (예: 에틸 올레이트)이다. 수성 담체는 생리식염수 및 완충 매질을 포함한, 물, 알콜성/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 본 발명에서, 약제학적으로 허용되는 담체는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 0.01 내지 0.1M 및 바람직하게는 0.05M 포스페이트 완충액 또는 0.8% 생리식염수를 포함한다. 다른 통상적인 비경구 비히클은 인산나트륨 용액, 링거 포도당(텍스트로스), 포도당(텍스트로스) 및 염화나트륨, 젯산 링거수액 또는 불휘발성유를 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양소 보충제, 전해질 보충제, 예를 들면, 링거 포도당 등을 기반으로 하는 것들을 포함한다. 예를 들면, 향미생물제, 향산화제, 킬레이트화제 및 불활성 기체 등과 같은 보존제 및 다른 부가제가 또한 존재할 수 있다.
- [0237] 보다 특히, 주사용으로 적합한 약제학적 조성물은 멸균 수용액 (수용성인 경우에) 또는 분산액 및 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제제용 멸균 분말을 포함한다. 상기 경우에, 조성물은 멸균되어야 하고, 용이한 시린지어빌리티(syringability)가 존재하는 정도로 유체이어야 한다. 그것은 제조 및 저장 조건하에 안정해야 하고, 바람직하게는 미생물 (예: 세균 및 진균)의 오염 작용에 대해 보존될 것이다. 담체는, 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산액 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들면, 레시틴과 같은 코팅물의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지할 수 있다.
- [0238] 미생물 작용의 방지는 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티메로살 등에 의해 성취할 수 있다. 많은 경우에, 조성물에 등장성 제제, 예를 들면, 당, 폴리알콜 (예: 만니톨, 소르비톨), 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연하는 제제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 일으킬 수 있다.
- [0239] 임의의 경우에, 멸균 주사용 용액은 필요에 따라, 본원에 열거한 성분들 중 하나 또는 혼합물과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 활성 화합물 (예를 들면, 폴리펩티드 자체 또는 다른 활성 제제와 함께)을 혼입시킨 다음, 여과 멸균시켜 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산액 매질 및 상기 열거한 것들로부터 필요한 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클로 활성 화합물을 혼입시켜 제조한다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결-건조이며, 이는 이미 멸균-여과된 그의

용액으로부터 활성 성분 + 임의로 원하는 부가적인 성분의 분말이 수득된다. 주사용 제제는 당해 분야에 공지된 방법들에 따라 무균 상태하에 처리하여, 용기 (예: 앰플, 백, 병, 시린지 또는 바이알)로 충전시키고, 밀봉한다. 또한, 제제는 바람직하게는 관련 조성물이 자가면역 또는 종양 질환으로 고생하거나 가능성이 보이는 대상자의 치료에 유용함을 제시한 포장 동물물 또는 라벨을 가지게 될 키트의 형태로 포장하여 시판될 수 있다.

[0240] 본 발명의 조성물의 유효량은 병태 치료를 위해, 투여 방법, 표적 부위, 환자가 인간 또는 동물이든지 간에, 환자의 생리학적 상태, 다른 투여 약물 및 치료가 예방적 또는 치료학적이든지 간에를 포함한, 많은 상이한 요인에 따라 변한다. 대개, 환자는 인간이지만, 형질전환 포유동물물을 포함한 비-인간 포유동물이 또한 치료될 수 있다.

[0241] 치료 용량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위하여 당해 분야의 숙련가에게 공지된 통상의 방법들을 사용하여 적정화할 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 환자에 이미 투여되어 왔지만, 통상의 링커 펩티드 대신에 본 발명의 링커 펩티드를 포함하도록 개질된 것이다. 상기 경우에, 투여될 폴리펩티드의 용량은 이미 안전하고 효과적인 것으로 확인된 것, 즉 치유 표준과 일치할 것이다.

[0242] 본 발명의 폴리펩티드는 다중 경우로 투여될 수 있다. 단일 용량 사이의 간격은 매주, 매월 또는 매년일 수 있다. 간격은 또한 환자에서 폴리펩티드의 혈액 수준, 폴리펩티드 표적 또는 항원을 측정함으로써 제시된 바와 같이 불규칙할 수 있다. 일부 방법들에서, 용량은 특별한 생체내 농도를 성취하도록 조절된다. 이와 달리, 폴리펩티드는 서방출 제형(sustained release formulation)으로서 투여될 수 있으며, 이 경우에 덜 빈번한 투여가 요구된다. 용량 및 빈도는 환자에서 폴리펩티드의 반감기에 따라 변한다.

[0243] 투여 용량 및 빈도는 치료가 예방적인지 치료학적인지 여부에 따라 변할 것이다. 예방적 적용시, 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 각테일을 함유하는 조성물은 환자의 내성을 개선하기 위하여 이미 질환 상태가 아닌 환자에 투여된다. 이러한 양은 "예방학적 유효량"으로 정의된다. 비교적 적은 용량이 오랜 시간에 걸쳐 비교적 빈번하지 않은 간격으로 투여될 수 있다. 일부 환자들은 그들의 삶의 나머지 동안 계속 치료를 받는다.

[0244] 치료학적 적용시, 질환의 진행이 감소되거나 종결될 때 까지, 및 바람직하게는 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 완화를 나타낼 때 까지 종종 요구되는 비교적 짧은 간격으로 비교적 고용량이 투여될 수 있다.

[0245] 본 발명의 분자는 (예를 들면, 병용 치료학적 섭생을 제공하기 위한) 제제 또는 제제들과 함께 또는 병용하여 사용될 수 있음을 또한 이해하게 될 것이다. 본 발명의 분자가 조합될 수 있는 예시적 제제는 치료할 특별한 장애에 대해 통상의 표준 치유를 나타내는 제제를 포함한다. 상기 제제들은 본래 화학적 또는 생물학적일 수 있다. 용어 "생물학적(biologic)" 또는 "생물학적 제제"는 치료제로서 사용하고자 하는 생물체로부터 제조된 약제학적 활성 제제 및/또는 그들의 제품을 의미한다.

[0246] 본 발명의 폴리펩티드는 임의로 치료가 필요한 (예: 예방적 또는 치료학적) 장애 또는 병태의 치료에 효과적인 다른 제제와 병용 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 보조 치료법과 함께 또는 이와 병용하여 본 발명의 폴리펩티드의 투여는 치료법 및 기술된 폴리펩티드의 순차적, 동시, 동일 기간에, 병류, 수반 또는 동시발생 투여 또는 적용을 의미한다. 당해 분야의 숙련가들은 병용 치료학적 섭생의 다양한 성분들의 투여 또는 적용이 전반적인 치료 효과를 개선하기 위하여 시기에 맞춰질 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 화학요법 또는 생물학적 제제는 본 결합 분자와 함께 표준의 잘 공지된 치료 과정으로 투여될 수 있었다. 숙련가 (예: 의사)는 선택된 보조 치료법 및 본 명세서의 교시를 기반으로 하는 적합하지 못한 실험없이 효과적인 병용 치료학적 섭생을 용이하게 구별할 수 있을 것이다.

[0247] 한 구현예에서, 폴리펩티드는 핵산 분자로서 투여에 의해 환자에서 생성될 수 있다. 핵산 분자는 벡터, 플라스미드, 리포솜, DNA 주사, 전기천공법, 유전자 건, 정맥내 주사 또는 간동맥 주입을 통함을 포함한, 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 투여할 수 있다. 유전자 치료법 구현예에 사용하기 위한 벡터가 당해 분야에 공지되어 있다.

[0248] 본 발명의 폴리펩티드와 병용하여 사용되는 제제의 양은 대상에 의해 변할 수 있거나, 당해 분야에 공지된 것에 따라 투여될 수 있다. 예를 들면, 문헌 (Bruce A Chabner 등, Antineoplastic Agents, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 1233-1287 ((Joel G. Hardman et al., eds., 9th ed. 1996)을 참조하라. 다른 구현예에서, 표준 치유와 일치하는 상기 제제의 양이 투여된다.

[0249] 이미 논의된 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드는 포유동물 장애의 생체내 치료를 위해 약제학적 유효량으로 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 분자는 투여를 용이하게 하고, 활성 제제의 안정성을 촉진하기 위

하여 제형화될 수 있음을 이해하게 될 것이다. 바람직하게는, 본 발명에 따르는 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 비-독성, 멸균 담체, 예를 들면, 생리식염수, 비-독성 완충제 및 보존제 등을 포함한다. 본 출원의 목적을 위해, 치료학적 제제와 접합되거나 접합되지 않은 본 발명의 폴리펩티드 약제학적 유효량은 항원에 대한 효과적인 결합을 성취하고, 이점을 성취하기 위하여, 예를 들면, 질환 또는 장애의 증상을 완화하거나, 물질 또는 세포를 검출하는데 충분한 양을 의미하도록 유지해야 할 것이다. 중앙 세포의 경우에, 폴리펩티드는 바람직하게는 종양성 또는 면역반응성 세포 상에 선택된 면역반응성 항원과 상호작용할 수 있고, 이들 세포사를 증가시키기 위해 제공될 것이다. 물론, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적 유효량의 폴리펩티드를 가능하게 하는 단일 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다.

[0250] 본 기술의 범위를 유지함에 있어서, 본 발명의 분자는 치료학적 또는 예방학적 효과를 제공하기에 충분한 양으로 상기 언급한 치료 방법에 따라 인간 또는 다른 동물에 투여될 수 있다.

[0251] 투여 방법 및 투여 형태는 물론 제시된 치료 적용에 바람직하고 유용한 화합물의 치료학적 양에 영향을 줄 것이다. 치료학적 유효량은 질환 개시의 중증도를 방지, 지연 또는 감소시키는데 필요한 양, 또는 진행중인 질환의 중증도를 정지 또는 감소시키는데 필요한 양이다. 이 양은 수용자의 체중 및 건강, 형질전환시킬 세포의 형태, 본 조성물의 투여 형태 및 치료할 의학적 장애의 형태와 같은 요인들을 근거로 변할 것임을 당해 분야의 숙련가는 용이하게 알 수 있을 것이다.

[0252] 본 발명은 또한 본 발명의 약제학적 조성물의 하나 이상의 성분들로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩 또는 키트를 제공한다. 임의로, 상기 용기(들)은 약제 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관이 고지한 형태의 공고와 관련이 있을 수 있고, 이 공고는 인간 투여를 위해 제조, 사용 또는 판매 기관에 의한 승인을 반영한다.

[0253] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 추가로 설명되며, 이는 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 본 출원을 통해 인용된 모든 참조문헌, 특허 및 공개된 특허출원의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0254] **실시예**

[0255] FC5 분자의 발현, 정제 및 특성분석: FC5는 이. 콜라이(E. coli)에서 발현시켰고, 주변세포질 공간으로부터 가용성 단백질을 방출시키기 위해 삼투 충격(osmotic shock)을 사용하여 정제시켰다. 그 다음에, 가용성 His 태그된 FC5는 프락토젤 SE 상에서 양이온 교환에 이어서, 수퍼텍스 200 상에서 겔 여과에 의해 니켈 칼럼 상에서 용해물로부터 포획했다. 카멜리드 Vhh는 SDS PAGE로 특성분석했다 (도 2a-c). FC5-Fc, Fc-FC5 및 FC5-scram-Fc는 앞서 기술한 방법에 따라 DG44 CHO 세포주에서 발현시켰다. 원하는 hFc 함유 단백질은 pH를 7.0으로 조절하고, 미리 평형화시킨 5ml HiTrap rProteinA FF column (GE healthcare) 상에서 단백질을 포획함으로써 CHO 세포 발효 매질 (1L)로부터 정제했다. 모든 정제된 단백질은 보편화된 내독소 의존성 BBB 개방이 일어나지 않음을 보장하기 위하여 주입 전에 내독소의 수준에 대해 특성분석했다. 결과는 표 I에 제시되어 있다. 신경활성 펩티드, 달라르긴, 갈라닌 또는 NPY는 석신이미디알-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC) 이관능성 화학적 링커를 사용하여 문헌 [Uto 등 1991 (Uto, I., Ishimatsu, T., Hirayama, H., Ueda, S., Tsuruta, J., and Kambara, T.(1991) Journal of immunological methods 138(1), 87-94)]에 기술된 방법을 사용하여 원하는 분자 (FC5, FC5-Fc)에 연결시켰다. 연결된 각각의 펩티드는 이것이 SMCC 이관능성 가교결합 화학을 사용하여 단백질의 리신 측쇄에 대해 유리 시스템을 통한 펩티드의 C-말단 가교결합을 허용하는 C-말단 상의 시스테아미드 동족체에 의해 합성했다. 가교결합에 이어서, 각각의 표지된 분자는 S-200 예비 겔 투과로 정제하여 가교결합 반응 동안 형성된 임의의 응집물을 제거했다. 각각의 FC5 도메인 또는 FC5-Fc 도메인에 연결된 펩티드 달라르긴, NPY 또는 갈라닌의 평균 수는 질량분석법으로 측정했다. 표 I은 FC5, FC5-Fc 또는 Fc-FC5 도메인당 연결된 펩티드의 평균 수를 나타낸다.

[0256] FC5 함유 분자의 순환 약동학: 각각의 FC5 함유 항체에 대한 BBB 내피의 노출을 이해하기 위하여, 분자의 약동학을 래트에서 측정했다. 동물은 인간 Fc 도메인에 N-말단으로 (FC5-Fc) 또는 C-말단으로 (Fc-FC5) 융합된 FC5 Vhh를 사용하여 3 mpk로 복강내 투여했다. 혈장에서 FC5-Fc 또는 Fc-FC5의 농도는 ELISA에 의해 여러 시점에서 측정했다. 결과는 각 작제물의 베타-상 반감기를 측정하기 위하여 분석했다 (표 II). 결과는 Fc가 재순환을 부여하고 더 큰 질량은 신장 여과를 방지하는 것으로 잘 알려진 바와 같이 FC5-Fc 및 Fc-FC5의 반감기가 FC5 Vhh 단독의 경우보다 인간 Fc에 융합되는 경우에 의미있게 더 길어짐을 입증하였다 (Holt, L. J.,



Herring, C., Jespers, L. P., and Tomlinson, I. M. (2003) Trends in biotechnology 21(11), 484-490).

- [0257] FC5 함유 분자의 시험관내 수송속도: 각각의 FC5 함유 단백질에 대한 BBB 유속에 대해 생체내 모델에 시험관내 BBB 내피세포 층을 사용했다. 시험관내 모델은 소분자와의 기밀성에 대해 적합한 단층 검정 시스템에 고정화 어른 래트 뇌내피세포 (SV-ARBE)의 단층을 이용한다 ( Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R. D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J. E., Raub, T. J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberg, J. O., and Osterberg, T. (2005) Toxicol In Vitro 19(3), 299-334). 시험관내 유속 측정 방법은 문헌 (Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G. K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A., and Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, ed. 2010, 383-401)에 기술된 것과 거의 동일하다. 유입 속도는 SV-ARBE 세포층에 대한 FC5, FC5-Fc 및 Fc-FC5에 대해 측정했고, 결과는 도 3에 제시되어 있다.
- [0258] TMEM30A에 대한 FC5 분자의 결합 친화성: 각 분자의 결합 친화성은 새로 단리된 래트 BBB 내피세포, SV40 형질전환된 래트 BBB 내피세포(Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G. K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A., and Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, ed. 2010, 383-401)를 사용하고, 앞서 확인된 표적 TMEM30A에 의해 일시적으로 형질감염시킨 Hek293 세포에 대해 별도의 형광 유세포분석법으로 평가했다. 각 세포주에 대한 결합 곡선이 도 4a-c에 제시되어 있으며, 계산된 친화성 값이 표 III에 있다. 결과는 원발성 래트 BBB 내피세포에 대한 FC5Fc의 결합이 11 nM의 친화성을 갖는 것으로 나타난 반면에, SV40 형질전환된 세포주에 대한 결합은 75 nM의 EC50 값으로, 약 7배 더 약한 결합을 생성한다. 반면에 래트 TMEM30A에 의해 일시적으로 형질감염시킨 Hek293 세포주에 대한 결합은 1700 nM 근처의 친화성을 생성하고, 원발성 BBB 내피세포에 대한 결합보다 거의 170배 더 약하다. 이들 데이터는 FC5-Fc가 유세포분석기로 측정할 경우에 FC5 Vhh 단독에 대한 결합 친화성에 있어서 실질적인 증가를 가짐을 나타내는 것으로, FC5-Fc가 TMEM30A를 발현하는 세포에 대해 이좌 (bidentate) 결합활성으로 결합됨을 제시하는 것이다.
- [0259] 동물 모델에서 효능 평가: FC5 Vhh 도메인 이합체가 RMT를 통해 BBB에 대한 분자 플레이로드를 전달하는 수송체로서 기능하는 분자의 능력에 어떤 영향을 갖는지를 평가하기 위하여, 이들 분자의 활성을 동물 모델에서 평가했다. 수많은 요인이 수송 효율에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려지고 있는데, 예를 들면, 항-트랜스페린 수용체 항체의 친화성을 심지어 몇 배 감소시키면 BBB 이전을 효과적으로 수행하는 분자의 능력에 포지티브 영향을 주는 것으로 보고되어 왔다 (Yu, Y. J., Zhang, Y., Kenrick, M., Hoyte, K., Luk, W., Lu, Y., Atwal, J., Elliott, J. M., Prabhu, S., Watts, R. J., and Dennis, M. S. Science translational medicine 3(84), 84ra44). 이 개념에 따르면, FC5 Vhh의 Fc 이합체에 대한 중요한 친화성 개선은 효과적인 BBB 수송 분자로서 기능하는 FC5 Vhh의 능력에 네가티브한 영향을 주는 것으로 예상되었다. 따라서, 신경활성 펩티드가 연결된 분자 (각 분자는 상이한 FC5 밸런시(valency)를 가짐)의 효능은 생체내 모델에서 평가했다.
- [0260] 하그리브즈 모델은 발에 프로인트 보조제(Freud's adjuvant)의 주사에 의해 유도된 열적 고통에 대해 증가된 감수성을 측정했다. 열적 고통은 뇌의 수도관 주위 부분에서 발현되는 mu 수용체에 대한 6개 아미노산 펩티드 달라르긴의 결합시 억제될 수 있다. 정맥내 주사한 달라르긴은 BBB를 통과할 수 없고, 통증 억제를 가져오지 못하지만, ICV 주사로 달라르긴이 mu 수용체로 확산되어 mu 수용체를 차단함으로써, 통증을 차단할 수 있다. 따라서, 정맥내 주사된 달라르긴은 BBB를 통한 수송 및 통증 억제를 허용하기 위해 수용체 매개된 수송체에 연결되어야 한다. BBB를 통한 FC5 함유 분자에 의해 매개되는 달라르긴의 수송을 평가하기 위하여, 하그리브즈 동물 모델이 달라르긴에 연결된 다양한 분자 형태의 FC5 Vhh의 효능을 비교하기 위하여 사용되었다. FC5-달라르긴에 대한 네가티브 대조군 분자는 EG2-달라르긴이고, FC5-Fc-달라르긴에 대해서는 Fc-FC5-달라르긴이었다.
- [0261] 포지티브 및 네가티브 시험 조항의 비교성을 보장하기 위하여, FC5-Da1 및 EG2-Da1는 각 Vhh에 연결된 달라르긴 펩티드의 비가 견줄만 함을 보여주기 위하여 질량분석법으로 특성분석하였다 (표 I).
- [0262] 정맥내(IV) 주사 전에, 각 분자는 먼저 연결된 모든 분자가 기능적으로 활성이고 통증 억제를 유도할 수 있음을 보장하기 위하여 포지티브 대조군으로서 뇌실내(ICV) 주사에 의해 시험했다. 네가티브 대조군 및 포지티브 시험 분자는 모두 분자가 뇌척수액으로 직접 주사되어 확산될 수 있으며 수도관 주위 mu 통증 수용체를 차단

하는 것과 같이 ICV 주사시 통증을 억제하리라 예상되었다. ICV 주사에 의해 평가한 모든 경우에, 상기 FC5-Da1, EG2-Da1, FC5-Fc-Da1, Fc-FC5-Da1 또는 달라르킨은 전달된 달라르킨의 양을 기반으로 하여 유사한 효능을 제공했다. 이어서, 각각의 달라르킨 표지 분자 및 상응하는 달라르킨 표지 대조군 단백질은 IV 투여시 효능에 대해 평가했다. 먼저, FC5-Da1 대 대조군 (EG2-Da1의 효능을 비교했다. 결과는 모르핀 단독 사용에 의해 관찰될 수 있는 억제 수준과 유사한 완전 통증 억제가 성취되었음을 보여준다 (도 5a & b). 초기 통증 억제를 관찰하기 전에 용량당 7.5 mg/kg (mpk)인 FC5-Da1의 세 용량이 필요함을 주시하는 것이 흥미롭다. 또한, 대조군은 심지어 동물에 7.5 mg/kg (mpk)으로 유사하게 3회 투여한 후에도 통증의 억제가 나타나지 않았다. 이들 데이터는 FC5가 수용체 매개 수송체로서 기능하여, BBB를 통해 달라르킨이 뇌실질로 수송되고, 달라르킨이 mu 통증 수용체에 결합되어 차단할 수 있음을 입증하고 확인한 반면에, 대조군 EG2-Da1은 통증 억제를 나타내지 않았다. 이들 데이터는 표 IV에 요약되어 있다.

[0263] 이합체화 FC5 형태인, FC5-Fc 및 Fc-FC5는 BBB 내피세포 상의 TMEM30A에 대해 매우 상이한 결합 친화성을 입증했다 (표 III). 개선된 친화성이 하그리브즈 통증 모델에서 개선된 효능과 상관관계가 있는 지를 결정하기 위하여, FC5-Fc-dal 및 Fc-FC5-dal을 모두 통증 억제에 대해 평가했다. IV 주사에 이어서, Fc-FC5-dal은 효능을 나타내지 않은 반면에 (도 6a-d), FC5-Fc-dal (도 7a & 7c)은 통증 억제에서 상당히 효능이 있었다. 또한, 네가티브 대조군 Fc-Dal은 생체내 효능을 나타내지 않았다 (도 7b & 7d). FC5-Fc는 심지어 초기에 0.5 mpk인 단일 용량에서도 처음 시간 내에 통증 감소시 효능을 나타냈으며, 처음 0.5시간 후 평균 50% MPE를 가졌다. FC5-dal과 FC5-Fc-dal의 효능 비교 결과는 21 mpk인 FC5-dal의 단일 용량이 0.5 mpk인 FC5-Fc-Dal과 동일한 수준의 통증 억제를 제공함을 나타냈다. 주사된 달라르킨의 몰 비를 기반으로 하여, FC5Fc-Dal은 하그리브즈 모델에서 통증을 억제하는 능력에 있어서 FC5-Dal보다 약 80배 더 큰 효능을 나타낸다. 2.5 mpk인 FC5-Fc-Dal의 제2 용량은 한 동물에서 최대 가능한 통증 억제를 제공하는데 충분했다. 하그리브즈 통증 모델에서 관찰된 FC5-Fc-Dal, Fc-FC5-Dal 및 FC5-Dal의 개선된 생물학적 활성은 표 II에 요약된 바와 같이 FC5-Fc의 높은 친화성 및 높은 효능과 상관관계가 있다.

[0264] 또한, 통증 억제에 대한 유사한 효능은 다른 신경활성 펩티드를 사용하여 성취할 수 있다. 예를 들면, 상기 기술된 것과 동일한 화학을 갖는, FC5 또는 FC5-Fc에 연결된 29개 아미노산 3.2 kD 펩티드인 갈라닌은 하그리브즈 모델에서 만성 통증을 억제했다. 대조적으로, Fc 단독에 연결된 갈라닌은 효과적인 통증 완화를 제공할 수 없었다. ICV 포지티브 대조군 및 IV 주사 모두에 대한 결과가 표 VI에 요약되어 있다. 네가티브 대조군 및 시험 분자 모두에서 그의 동족 수용체 GalR1 및 GalR2를 결합하여 통증을 억제하는 연결된 갈라닌의 활성을 입증하기 위하여, 모든 분자를 시험했고, ICV 주사 후에 통증 억제를 나타냈다 (표 VI). IV를 주사하는 경우에, FC5 함유 분자, FC5 또는 FC5-Fc에 연결된 갈라닌 만이 통증을 생체내 억제할 수 있었다. 하그리브즈 동물 모델에서 통증을 감소시키는데 필요한 FC5-Fc에 대한 FC5에 연결된 갈라닌의 용량에 있어서 유의한 차이가 존재했다. 6 mpk의 단일 용량인 갈라닌-FC5 (표 VI)는 8% MPE를 일으킨 반면에, FC5-Fc-Gal의 단일 용량은 45% MPE를 유발했다.

[0265] 펜틸렌테트라졸 (PTZ)의 복강내 투여는 래트에서 발작을 유도하고, 간질성 발작의 모델로서 사용되었다 (Chen, J.W.; Naylor, D.E.; Wasterlain, C.G. *Advances in the pathophysiology of status epilepticus. Acta Neurol. Scand. Suppl.*, 2007, 186, 7-15.; Werner, F.M.; Covenas, R. *Neuropeptides involved in schizophrenia, Curr. Top. Neurochem.*, 2005, 4, 35-49.; Werner, F.M.; Covenas, R. In: *Focus on Neuropeptide Research*, Covenas, Mangas and Narvaez, Eds.; Transworld Research Network: Trivandrum, 2007; pp. 299-339; Werner, F.M.; Covenas, R. *Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in major depression. Int. J. Neurosci.*, 2010, 120, 455-70). 신경활성 펩티드 (예; 갈라닌 및 뉴로펩티드 Y)는 PTZ 유도 발작으로부터 보호를 부여하는 것으로 공지되어 있다 (Mazarati 1998a; Mazarati, A M., Hohmann, J. G., Bacon, A, Liu, H., Sankar, R., Steiner, R. A, Wynick, D., et al. *Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2000, 20(16), 6276-81.). Mazarati et al. (Mazarati A, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. *J Neurosci* 1998, 18:10070-10077.). 이들 연구는 래트 해마로부터 갈라닌의 결실이 자급자족상태 간질지속증의 발병과 관련됨을 나타냈다. 또한, 뇌의 해마 영역으로 갈라닌의 주사는 발작을 억제할 수 있다 (Mazarati A, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. *J Neurosci* 1998, 18:10070-10077.; Mazarati AM, Halaszi E, Telegdy G Anticonvulsive effects of galanin administered into the

central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. *Brain Res* 1992, 589:164-166.).

[0266] 그러나, 정맥내 제공된 신경활성 펩티드는 BBB를 통과할 수 없고, 그들의 작은 크기로 인하여 짧은 반감기를 갖는다 (Jain, Kamal and Batra. *Trends Biotechnol.* Vol 25. ed.: 2007:307-16, Batra, Jain, Wittel, Chauhan and Colcher. *Curr Opin Biotechnol.* Vol 13. ed.: 2002:603-8). PTZ 모델에서 갈라닌의 효능은 단일 도메인 항체 FC5 및 FC5-Fc에 모두 연결된 갈라닌을 시험함으로써 평가했다. 두 작제물이 BBB 수송을 개선하는 것으로 예상됨에도 불구하고, FC5-Fc 작제물은 본원에서 그의 추정 표적 TMEM30A에 대한 열망하는 결합으로 인해 실제 친화성이 증가되고, 증가된 크기 및 Fc 의존성 재순환으로 인하여 훨씬 더 긴 반감기를 갖는 것으로 제시되었다.

[0267] PTZ 유도 발작 모델에서, 관심있는 제제는 IV로 또는 직접 해마 주사에 의해 주입시킨다. 해마 주사는 제제를 작용 부위로 직접 전달하여 갈라닌이 그의 동족 수용체에 결합되어 발작 개시를 차단할 수 있도록 한다. 또한, 각 분자의 직접 해마 주사는 각 분자, Fc, FC5 또는 FC5-Fc에 연결된 갈라닌이 발작 억제 활성을 유지함을 나타내기 위한 포지티브 대조군으로서 사용된다. 투여되는 각 분자의 용량은 몰당량 갈라닌 용량에 가깝게 제공하기 위해 변화되었다. 포지티브 대조군 연구를 위해, 수컷 위스타르 래트 (4-6주)에 다음 중 하나의 해마내 주사를 투여했다: 5  $\mu$ l의 최종 용적으로 발프로산, Gal-Cya 또는 FC5-Gal에 이어서, 15분 후 발작을 유도하기 위하여 50 mpk PTZ의 IP 주사.

[0268] BBB를 통과하는 FC5, FC5-Fc 또는 Fc에 연결된 갈라닌의 효과를 평가하기 위하여, 이들 분자는 각각 도 7a 및 7b에 상세히 제시한 바와 같이 전신 주사했다. 전신 연구를 위해, 래트에 Gal-Cya 또는 FC5-Gal의 1, 2 또는 3회 정맥내 주사 (꼬리 정맥을 통해) 또는 단일 용량의 FC5-Fc-Gal 또는 Fc-Gal를 투여했다. 각 경우에, 이어서 50 mpk 용량으로 IP PTZ 주사를 복강내 투여했고, 래트의 움직임을 30분 동안 기록했다.

[0269] 기록된 모든 움직임을 검토했고, 발작 개시 시간 및 발작 지속시간은 선입견이 없는 관찰자가 세 개의 독특한 거동 변화 각각에 대해 측정한다: 처음 근간대성 경련 (First myoclonic jerk; FMJ; 이는 귀, 머리 및 어깨 쉴룩거림을 특징으로 함), 처음 간대성 발작 (First clonic seizure; FCJ; 이는 최소 발작, 두근 및 앞다리의 간헐성 경련, 전신의 비자발적 움직임 및 정위반사에 의한 점핑 움직임을 특징으로 함) 및 처음 강직간대성 확장 (Tonic generalized extension; TGE; 이는 정위 능력의 손실, 앞- 및 뒷다리의 굽힘 또는 뻗기 및 전신의 간헐성 경련을 특징으로 함).

[0270] 표 VIIa는 각 분자의 해마내 주사에 대한 결과를 나타낸다. 50mpk PTZ의 IP 주사는 최소로 심각한 FMJ로부터 가장 심각한 발작 형태인 강직 간대성으로의 신속한 진행과 함께 발작, 근간대성 경련, 간대성 경련 및 강직 간대성의 신속한 시작을 일으켰다. PTZ 유도 발작 개시를 부분적으로 억제하는 것으로 공지된 소분자인 발프로산(Pollack G.M., Shen D.D. *J Pharmacol Methods.* (1985) Apr;13(2):135-46.)은 세 가지 모든 발작 형태을 의미있게 지연시켰지만, 발작 개시를 완전히 방지하진 못했고, 근간대성 및 간대성 발작의 개시시 약 100초의 지연이 관찰되었다. 단독으로 또는 FC5에 연결된 갈라닌의 해마내 주사는 근간대성 발작을 상당히 지연시켰고, 보다 심각한 간헐적 경련 및 강직 간대성 발작을 완전히 방지했다.

[0271] 각 분자의 정맥내 투여에 의해 수득된 결과가 표 VIIb에 제시되어 있다. PTZ는 각 발작 형태의 신속한 개시를 유도하고, 11.2 mpk IV 투여인 발프로산은 근간대성 및 간대성 발작의 개시를 억제한다. 신경활성 펩티드의 짧고 긴 반감기 버전인, 정맥내 갈라닌 및 갈라닌-Fc는 각각 발작 개시의 지연이 없거나 매우 사소했다. PTZ 투여 1시간 전에 6 mpk로 투여된 FC5-갈라닌은 근간대성 발작의 상당한 지연 및 간대성 및 강직 간대성 발작의 완전한 억제를 일으켰다. PTZ 투여 2시간 전에 단일 용량의 FC5-Fc-갈라닌도 또한 근간대성 발작의 상당한 지연 및 간대성 및 강직 간대성 발작의 완전한 억제를 일으켰다.

[0272] 몇몇 결론이 이들 결과로부터 유추될 수 있다. FC5, Fc 또는 FC5-Fc에 연결된 갈라닌은 하그리브즈 모델에서 ICV로 투여한 경우에 제시된 바와 같은 동등한 활성을 유지하며 (표 IV & V), 또한 표 VIIa는 FC5-갈라닌이 PTZ 발작 모델에서 래트의 해마로 주사한 경우 갈라닌 단독에 대한 몰 기준으로 동등한 활성을 나타냈다. 대조적으로, 갈라닌 단독 또는 hFc 분자에 부착된 수명이 긴 분자로서는 뇌혈관 장벽을 효과적으로 통과하여, PTZ 유도 발작을 억제하지 못한다. FC5-갈라닌으로서 또는 FC5-Fc-갈라닌으로서, FC5에 부착되는 경우에만, 갈라닌은 BBB를 가로질러, PTZ 유도 발작을 효과적으로 지연하거나 억제할 수 있다. FC5-Fc에 연결된 갈라닌이 몰 용량 비교를 기반으로 하는 발작의 감소시 FC5 단독에 연결된 갈라닌보다 훨씬 더 효과적이고; 특히 적어도 16배 더 효능이 있다. 또한, FC5-Fc 갈라닌은 FC5-갈라닌과 비교하는 경우에 처음 근간대성 발작의 개시에 대해 제때 더 많은 지연을 나타냈다. 이들 결과는 그의 표적에 대한 FC5-Fc의 개선된 반감기 및 실제적인

친화성 증가가 갈라닌의 BBB 통과 전달을 개선하고, FC5-갈라닌보다 PTZ 발작 모델에서 보다 효과적인 발작 감소를 일으킴을 나타낸다.

[0273] 표 I. 발현되고 정제된 분자의 특성분석.

분자 플라스미드	FC5 <sup>(1)</sup> (EAG2333)	FC5-Fc <sup>(2)</sup> (EAG2345)	Fc-FC5 <sup>(2)</sup> (EAG2304)	Fc
계산된 Mwt (달톤)	15,375	78,725	78,924	51,896
내독소 (EU/mg)	<1	<1	<1	<1
LS Mwt (달톤)	16,860	77,530	78,950	57,800
분석 SEC 에서 피크의 순도% 면적	99.7	98.9	95.0	99.7
평균 연결된 달라르긴 펩티드 <sup>(3)</sup>	1.5	1.5	1.5	1.0

[0274]

[0275] (1) myc 태그 EQKLISEEDL, C-말단 (1202 mwt), C-말단 His 태그 5H를 함유한다

[0276] (2) Fc 도메인은 인간 IgG1 및 agly이다 (모든 Fc 도메인은 Fc N-글리코실화를 제거하기 위하여 hIgG 서열에 T299A 점돌연변이를 함유한다)

[0277] (3) FC5-Fc 도메인에 공유적으로 결합된 달라르긴의 평균수를 측정하기 위하여, MS로 평가했음

[0278] 표 II. hFc에 융합된 FC5 도메인의 약동학적 반감기 측정.

검정 포맷	FC5-Fc		Fc-FC5		hIgG1	
	형광	ELISA	형광	형광	ELISA	
베타-상 반감기 (h)	39.4	35.7	38.6	43.5	48	

[0279]

[0280] 반감기는 래트 혈청으로부터의 인간 Fc 또는 AL680 표지된 분자를 사용하여 ELISA 검출에 의해 측정했고, 형광은 혈청으로부터 측정했다. 분자 간에 어떠한 차이도 관찰되지 않았고, 여기서 반감기는 ELISA에 대해 형광으로 측정했다. 분자는 3 mpk로 복강내 주사했다.

[0281] 표 III. BBB 내피세포에 대한 효능과 친화성의 상관관계를 나타내는, 하그리브즈 모델에서 FC5-Da1, FC5-Fc-Da1 및 Fc-FC5-Da1의 결합 친화성 및 상대 효능의 요약.

친화성 (nM)

분자	FC5	FC5-Fc	Fc-FC5
원발성 래트 BBB EC	>2000	11	1700
SV-ARBEC		75	ND
래트 대동맥 내피세포		1700	
하그리브즈 모델에서 FC5-Dal 과 비교되는 효능 배수	1	80	<0.1

[0282]

[0283] 표 IV. 단독으로 또는 FC5에 연결된 달라르긴에 의한 하그리브즈 모델에서의 만성 통증 억제 요약.

분자	ICV		IV	
	용량 (ug)	% MPE	용량 (mg/kg)	% MPE
PBS	5	0 ± 0.8	800 (µL)	0 ± 0.6
달라르긴	2	35 ± 1	0.34 x 3 inj	0.3 ± 0.3
FC5	69.75	0 ± 2	7 x 3 inj	1.9 ± 0.3
EG2	69.75	0 ± 2	7 x 3 inj	0 ± 1.3
A20.1			7.84 x 3 inj	2.2 ± 0.3
FC5-달라르긴	74.4	47 ± 2	7 x 3 inj	41 ± 0.5
EG2-달라르긴	74.4	31 ± 1	7 x 3 inj	2.0 ± 0
A20.1-달라르긴			2.49 x 3 inj	3.1 ± 0
FC5 + 달라르긴			(0.65 ug + 7 mg/Kg) x 3 inj	0 ± 1.6

[0284]

[0285] 만성 통증 억제제는 최대 가능 효과 % (%MPE)로서 나타낸다. 그 값은 측정 시간 프레임에 대한 대측성 제어 발에 대해 통증 억제된 동물에 대한 곡선 아래 면적을 기반으로 한다. ICV 또는 IV로 주사한 분자의 효능이 하그리브즈 모델에서 최대 가능 효과 % (%MPE)로서 제시되어 있다. A20.1 및 EG2는 FC5에 관련되지 않은 단일 도메인 항체로, BBB 내피세포에 대한 걸보기 친화성이 없다. 정맥내 (IV) 투여 수치를 위한 용량 (mpk)은 주사 수로 이어지는 주사에 따라 제시되고 있다.

[0286] 표 V. Fc에 연결된 달라르긴 또는 FC5-Fc에 연결된 달라르긴에 의한 하그리브즈 모델에서 만성 통증 억제의 요약.

분자	ICV		IV	
	용량 (ug)	% MPE	용량 (mg/kg)	% MPE
FC5-Fc-Dal	11.5	43 ± 3	6	46 ± 2
Fc Dal	9.3	55 ± 2	6	5 ± 2
FC5-Fc + FC5-Fc-Dal			2.5 + 6	32 ± 7

[0287]

[0288] 두번째 실험으로, 연결되지 않은 FC5-Fc의 IV 용량을 제시된 농도로 FC5-Fc-Dal의 부가 전에 IV 주사했다.

[0289] 표 VI. Fc, FC5-Fc 또는 FC5로 연결된 갈라닌에 의한 하그리브즈 모델에서 만성 통증 억제.

분자	ICV		IV	
	용량 (ug)	% MPE	(mg/kg)	% MPE
갈라닌	2	54 ± 1	1	0 ± 1
Fc-Gal	11.2	49 ± 1	6	2 ± 1
FC5-Gal	10.87	49 ± 2	6	8 ± 1
FC5-Fc-Gal	11.4	49 ± 2	6	45 ± 2

[0290]

[0291] FC5-Gal에 대한 다중 용량의 경우에, 용량은 1시간 간격을 두었다. 세번 째 실험으로, 연결되지 않은 FC5-Fc의 IV 용량을 제시된 농도로 FC5-Fc-Da1의 부가 전에 IV 주사했다.

[0292] 표 VII. : 래트 PTZ 모델에서 해마 주사 (a) 또는 IV 주사 (b)를 사용하여 발작 개시까지의 시간 비교.

[0293] a)해마 주사.

분자	용량 (ug)	발작 개시까지의 시간 (초)		
		근간대성 (초)	간대성	강직 간대성
PTZ 단독	50 mg/kg	0 ± 2	0 ± 6	0 ± 0.5
발프로산	11.2	100 ± 6	100 ± 9	2 ± 1
갈라닌	1.82	104 ± 0	방지됨	방지됨
FC5-갈라닌	11.9	82 ± 4	방지됨	방지됨

[0294]

[0295] b) 정맥내 주사.

분자	용량 (mg/kg)	발작 개시까지의 시간 (초)		
		근간대성 (초)	간대성	강직 간대성
PTZ 단독	50 mg/kg	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 0.5
발프로산	11.2	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 0
갈라닌	1 x 2 inj	0.5 ± 5	0 ± 2	2 ± 4
Fc-Gal	6	2 ± 1	18 ± 2	17 ± 2
FC5-갈라닌	6 x 3 inj	47 ± 3	방지됨	방지됨
FC5-Fc-갈라닌	6	101 ± 28	방지됨	방지됨

[0296]

[0297] PTZ에 의한 래트의 IP 투여에 이어서, 각 형태의 발작에 대한 개시까지의 시간이 하기에 제시되었고; FMJ, FCJ 및 TGE을 시험했다. 발작 형태는 상기 보다 상세히 기술되고 있다. (a) IP 투여된 PTZ는 각각의 발작 형태까지 제어된 시간을 설정한다. PTZ의 IP 주사 전에 발프로산, 갈라닌 또는 FC5-갈라닌의 해마 주사는 이들 각각의 분자가 각 발작 형태까지의 시간에 대해 가질 수 있는 최대 효과를 설정한다. (b) 발프로산, 포지티브 대조군, 갈라닌 (1 x 3회 주사 투여, 1시간 간격의 각각의 투여는 PTZ 투여 45분 전에 완결했음) 또는 FC5-갈라닌 (1 x 3회 투여, 1시간 간격의 각각의 투여는 PTZ 투여 45분 전에 완결했음), FC5-Fc-Gal 또는 Fc-Gal(PTZ의 IP 주사 2시간 전에 모두 투여됨)의 IV 투여로 이들 각각의 분자가 IV 투여시 가질 수 있는 효과를 측정한다. Fc-Gal은 분자가 FC5 F(ab) 단편을 결여시켜 네가티브 대조군으로서 사용되지만, FC5-Fc에 대한 생체내 PK에서 유사하다.

[0298] 서열1: FC5-agly (T299A)hFc의 서열. (pEAG2345)

[0299] DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKI THYTMGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTEFYSNSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTADYYCAAGSTS TATPLRVDYWGKGTQVTVSSAEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL

DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0300] 서열2: agly (T299A) hFc-FC5의 서열. (pEAG2403)

[0301] EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHTYTMGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVKGRFTI SRDNAKNTVYVYLMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVYDYGKGTQVTVSS

[0302] 서열3: 스크램블된 FC5-agly (T299A)hFc (pYL605)의 서열.

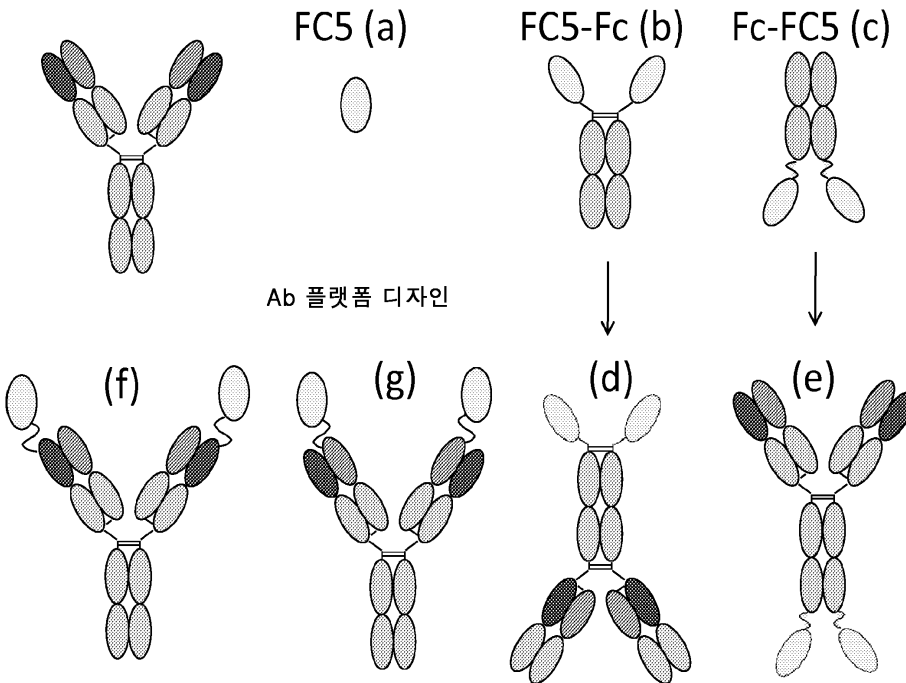
[0303] EPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHTYTMGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYNSVKGRFTI SRDNAKNTVYVYLMNSLKPEDTADYYCAADAGSTGSYGSFDYWGKGTQVTVSS

[0304] 등가물

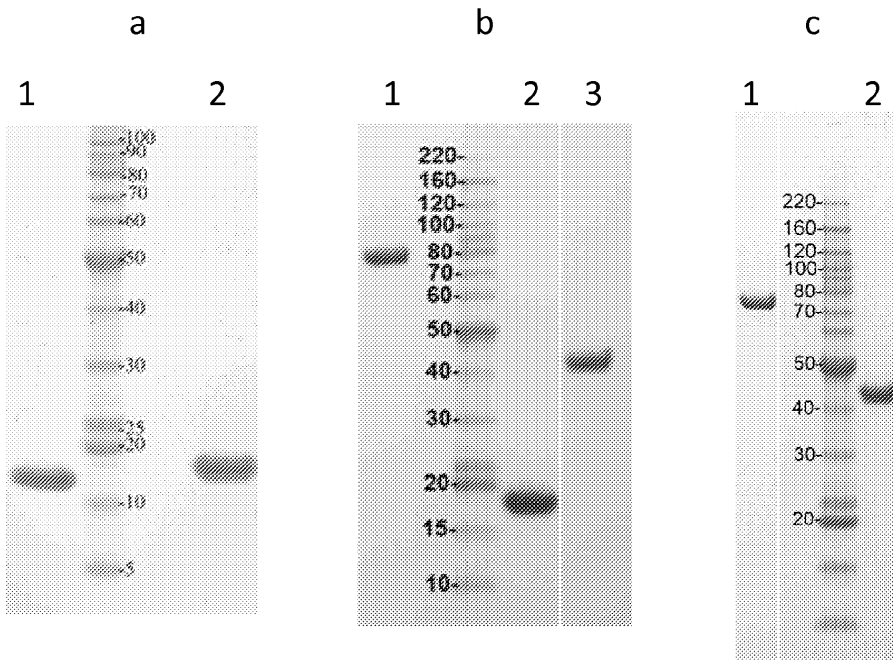
[0305] 당해 분야의 숙련가는 더 이상 통상적이지 않은 실험을 사용하여 본원에 기술된 본 발명의 특정 구현 예에 대한 많은 등가물을 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 상기 등가물은 하기 특허청구범위에 포함시키고자 한다.

**도면**

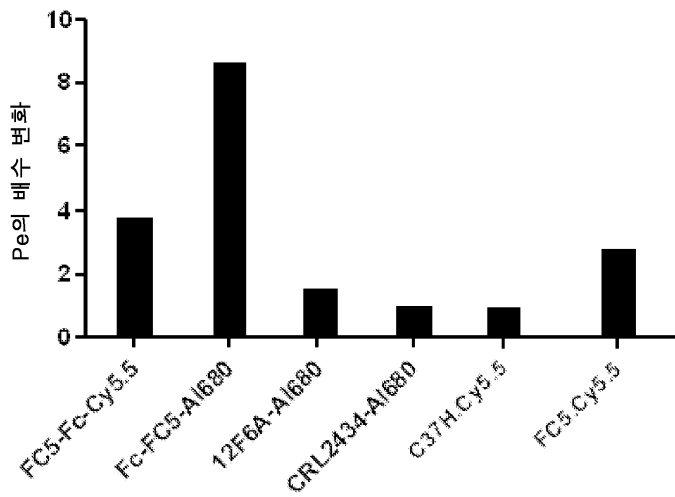
**도면1**



도면2

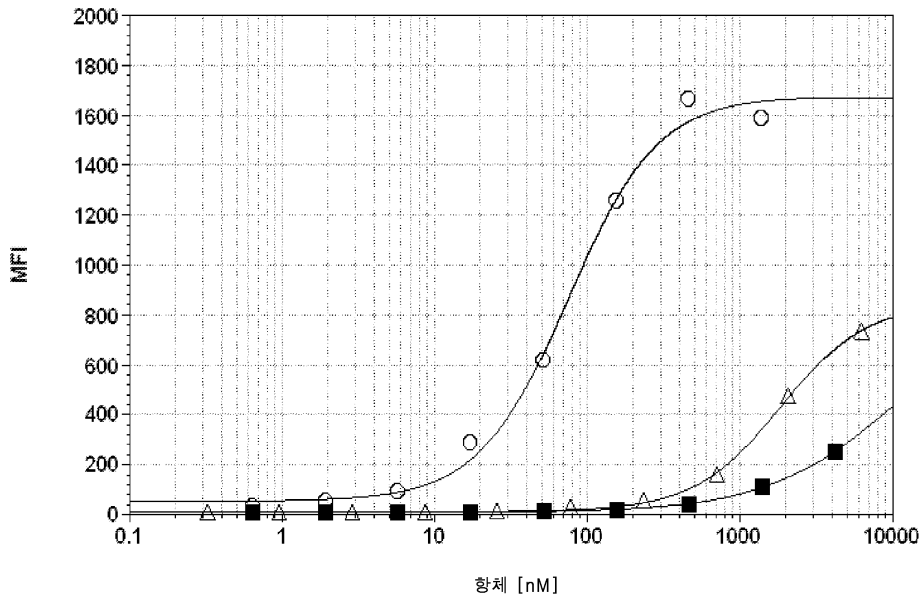


도면3

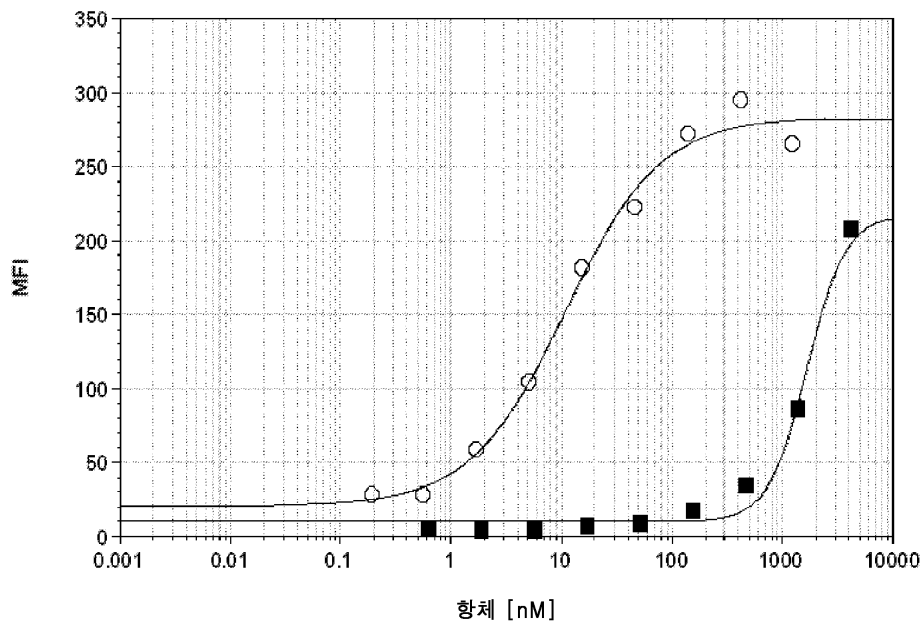




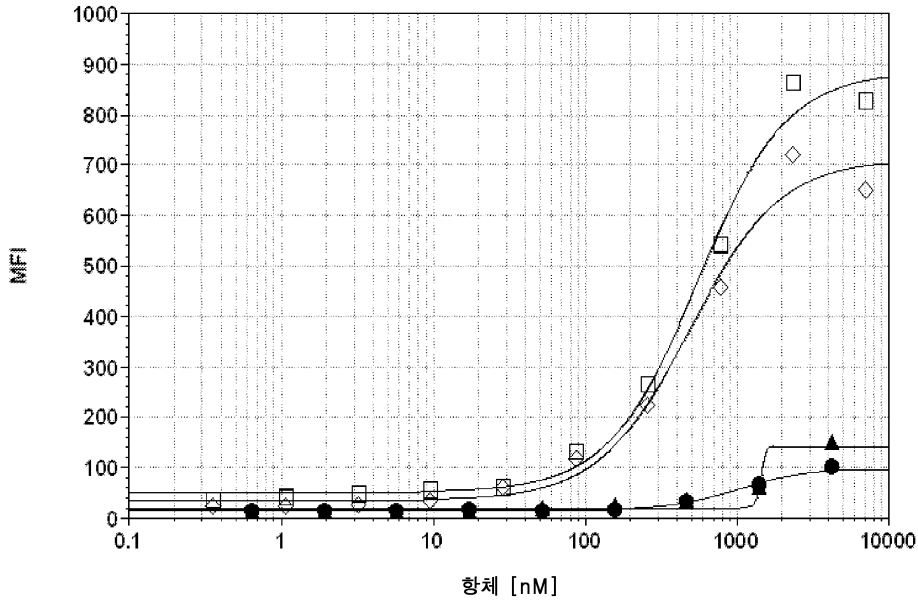
도면4a



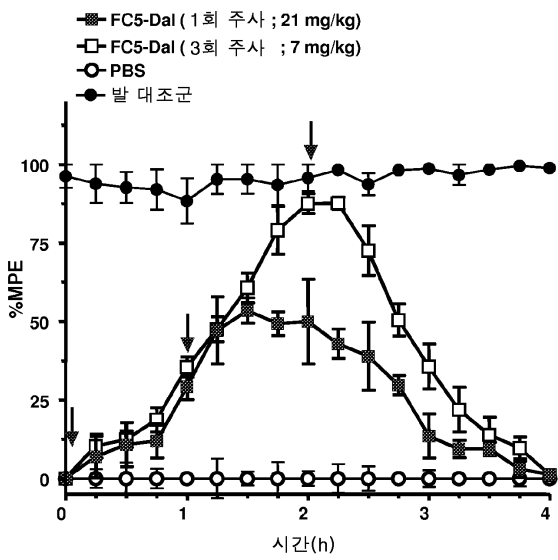
도면4b



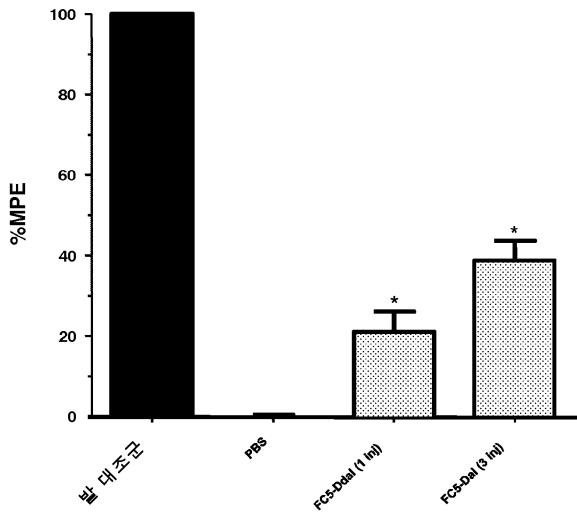
도면4c



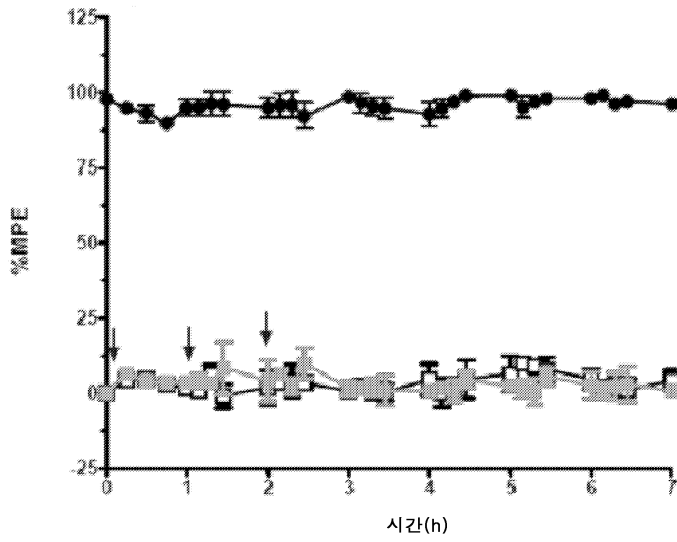
도면5a



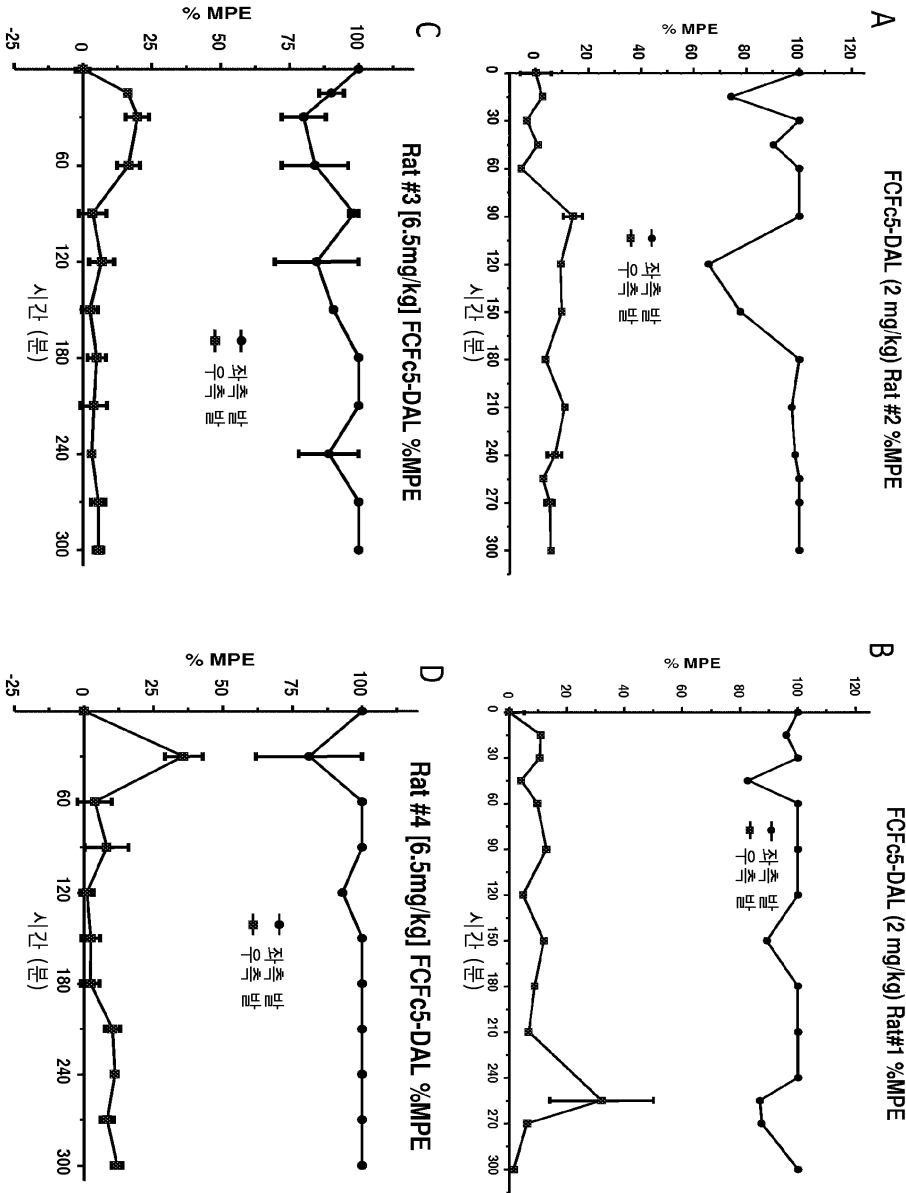
도면5b



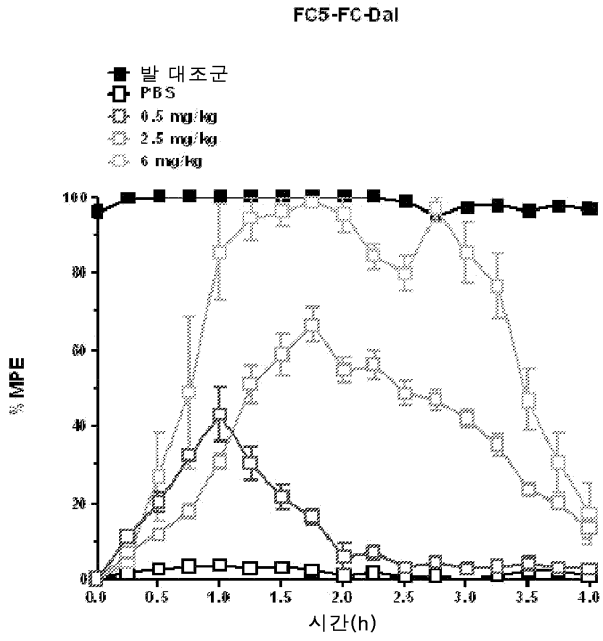
도면5c



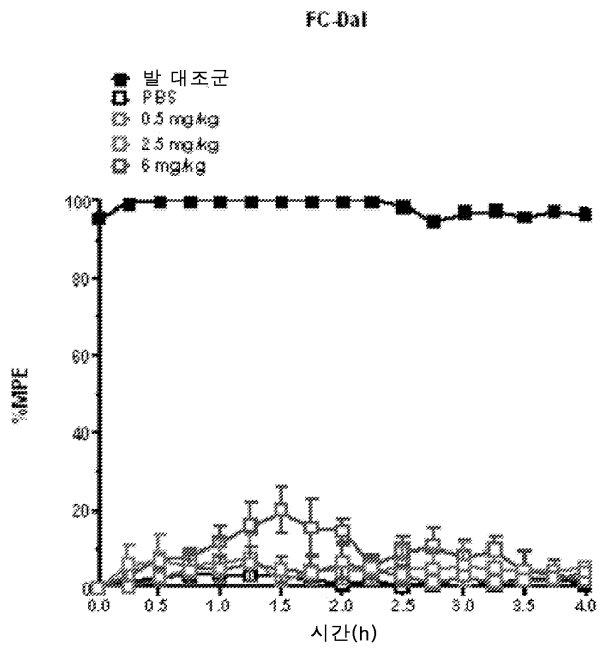
도면6



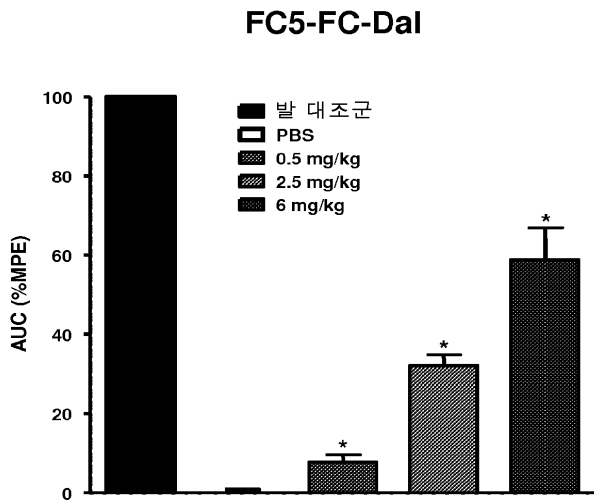
도면7a



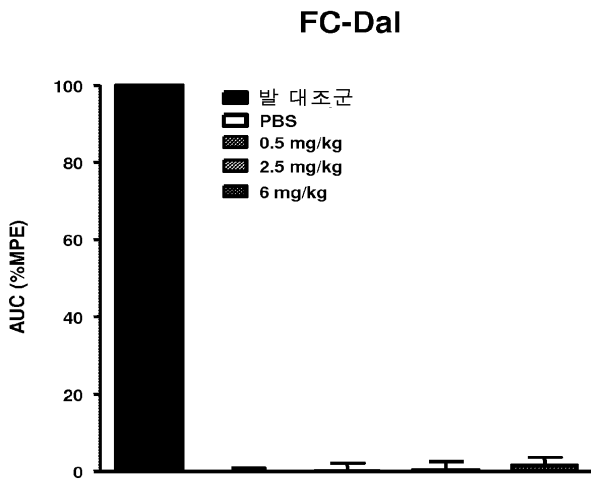
도면7b



도면7c



도면7d



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> BIOGEN IDEC MA INC.  
 FARRINGTON, Graham K.  
 SISK, William

<120> ENHANCEMENT OF TRANSPORT OF THERAPEUTIC MOLECULES ACROSS THE  
 BLOOD BRAIN BARRIER

<130> BGG-952PC

<140> PCT/US2013/021041

<141> 2013-01-10

<150> US 61/585,039

<151> 2012-01-10

<160> 10  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 355  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic construct: FC5-agly (T299A)hFc. (pEAG2345)

<400> 1  
 Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Thr His Tyr  
                   20                    25                    30  
 Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
                   35                    40                    45  
 Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val  
                   50                    55                    60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg Val Asp Tyr Trp  
                   100                    105                    110  
 Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys  
                   115                    120                    125  
  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
                   130                    135                    140  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 145                    150                    155                    160  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                   165                    170                    175  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

180 185 190

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Ala Tyr

195 200 205

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

210 215 220

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

225 230 235 240

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

245 250 255

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

260 265 270

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

275 280 285

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

290 295 300

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

305 310 315 320

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

325 330 335

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

340 345 350

Pro Gly Lys

355

<210> 2

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid: agly (T299A) hFc-FC5. (pEAG2403)

<400> 2

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10 15



Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 20 25 30  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 35 40 45  
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 50 55 60  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 65 70 75 80  
  
 Tyr Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 85 90 95  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 100 105 110  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 115 120 125  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr  
 130 135 140  
  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 145 150 155 160  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 165 170 175  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 180 185 190  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 195 200 205  
  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 210 215 220  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Gln Leu  
 225 230 235 240  
 Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255  
 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Thr His Tyr Thr Met Gly Trp  
 260 265 270

Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ser Arg Ile Thr  
 275 280 285

Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe  
 290 295 300

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn  
 305 310 315 320

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ser  
 325 330 335

Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg Val Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr  
 340 345 350

Gln Val Thr Val Ser Ser  
 355

<210> 3

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid: scrambled FC5-agly (T299A)hFc (pYL605)

<400> 3

Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Ala Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala



Gln Val Thr Val Ser Ser

355

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 4

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro

1                    5                    10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 5

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln

1                    5

<210> 6

<211> 8

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 6

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys

1                    5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 7

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys

1                    5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 8

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln

1 5

<210> 9

<211> 300

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence of TMEM30A

<400> 9

Met Ala Met Asn Tyr Asn Ala Lys Asp Glu Val Asp Gly Gly Pro Pro

1 5 10 15

Cys Ala Pro Gly Gly Thr Ala Lys Thr Arg Arg Pro Asp Asn Thr Ala

20 25 30

Phe Lys Gln Gln Arg Leu Pro Ala Trp Gln Pro Ile Leu Thr Ala Gly

35 40 45

Thr Val Leu Pro Ile Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Phe Ile Pro Ile

50 55 60

Gly Ile Gly Ile Phe Val Thr Ser Asn Asn Ile Arg Glu Ile Glu Ile

65 70 75 80

Asp Tyr Thr Gly Thr Glu Pro Ser Ser Pro Cys Asn Lys Cys Leu Ser

85 90 95

Pro Asp Val Thr Pro Cys Phe Cys Thr Ile Asn Phe Thr Leu Glu Lys

100 105 110

Ser Phe Glu Gly Asn Val Phe Met Tyr Tyr Gly Leu Ser Asn Phe Tyr

115 120 125

Gln Asn His Arg Arg Tyr Val Lys Ser Arg Asp Asp Ser Gln Leu Asn

130 135 140

Gly Asp Ser Ser Ala Leu Leu Asn Pro Ser Lys Glu Cys Glu Pro Tyr

145                    150                    155                    160  
 Arg Arg Asn Glu Asp Lys Pro Ile Ala Pro Cys Gly Ala Ile Ala Asn  
                          165                    170                    175  
  
 Ser Met Phe Asn Tyr Met Leu Asp Ser Asp Pro Asp Asn Asn Gly Phe  
                          180                    185                    190  
 Ile Asn Glu Asp Phe Ile Val Trp Met Arg Thr Ala Ala Leu Pro Thr  
                          195                    200                    205  
 Phe Arg Lys Leu Tyr Arg Leu Ile Glu Arg Lys Ser Asp Leu His Pro  
                          210                    215                    220  
 Thr Leu Pro Ala Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Val Thr Tyr Asn Tyr Pro  
 225                    230                    235                    240

Val His Tyr Phe Asp Gly Arg Lys Arg Met Ile Leu Ser Thr Ile Ser  
                          245                    250                    255  
 Trp Met Gly Gly Lys Asn Pro Phe Leu Gly Ile Ala Tyr Ile Ala Val  
                          260                    265                    270  
 Gly Ser Ile Ser Phe Leu Leu Gly Val Val Leu Leu Val Ile Asn His  
                          275                    280                    285  
 Lys Tyr Arg Asn Ser Ser Asn Thr Ala Asp Ile Thr  
                          290                    295                    300

<210> 10

<211

> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence of FC5

<400> 10

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

Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg Val Asp Tyr Trp

100

105

110

Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

120