



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월08일  
(11) 등록번호 10-2187751  
(24) 등록일자 2020년12월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 27/02 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)  
C07K 16/24 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/18 (2013.01)  
A61P 27/02 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7000139
- (22) 출원일자(국제) 2017년06월02일  
심사청구일자 2019년01월03일
- (85) 번역문제출일자 2019년01월03일
- (65) 공개번호 10-2019-0015481
- (43) 공개일자 2019년02월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2017/063506
- (87) 국제공개번호 WO 2017/211731  
국제공개일자 2017년12월14일
- (30) 우선권주장  
16173166.6 2016년06월06일  
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌  
JP2013542722 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
에프. 호프만-라 로슈 아게  
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
- (72) 발명자  
헬스만 페터 미하엘  
독일 82392 하바흐 임 존넨탈 20  
코페츠키 에르하르트  
독일 82377 펜츠베르크 카스트네르호프스트라쎄 21
- (74) 대리인  
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 20 항

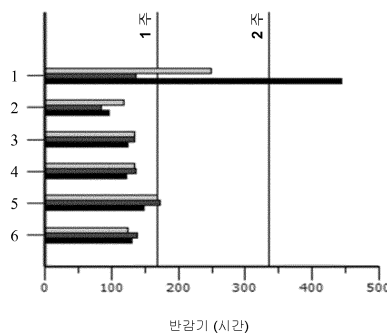
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 **눈 잔류가 증가된 안과학용 융합 단백질**

(57) 요약

눈 질환과 관련된 표적에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위 및 눈에서의 잔류에 영향을 미치는 표적에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위의 조합인 다중특이적 결합제는 단일특이적 결합제에 비해 개선된 유리체내 잔류를 제공한다. 제2 결합 부위는 유리액의 세포외 매트릭스(ECM)/망막에서 발견되는 화합물/분자에 특이적으로 결합한다. 이러한 세포외 매트릭스의 화합물은 약물의 충분한 적재량/투여량이 결합되도록 하는 양으로 존재해야 한다. 이러한 목적을 위해, 콜라겐, 특히 콜라겐 II가 유리액의 ECM에 적합한 화합물임이 밝혀졌다. 따라서, 치료적 안구 표적에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위 및 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위를 포함하는 다중특이적 결합제가 본원에 보고된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C07K 16/22** (2013.01)

**C07K 16/245** (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*C07K 2317/31* (2013.01)

*C07K 2317/33* (2013.01)

*C07K 2317/55* (2013.01)

*C07K 2317/622* (2013.01)

*C07K 2317/90* (2013.01)

*C07K 2317/92* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- a) 서열번호 9 및 서열번호 10, 또는
- b) 서열번호 15 및 서열번호 16

의 카바트에 따라 결정된 CDR을 포함하는 항-인간 콜라겐 II 항체; 및  
약학적으로 허용되는 부형제  
를 포함하는, 안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 약학 제형.

#### 청구항 2

- a) 서열번호 9 및 서열번호 10, 또는
- b) 서열번호 15 및 서열번호 16

의 카바트에 따라 결정된 CDR을 포함하는, 안혈관 질환의 치료용 약제로서 사용하기 위한 항-인간 콜라겐 II 항체.

#### 청구항 3

- a) 서열번호 9 및 서열번호 10, 또는
- b) 서열번호 15 및 서열번호 16

의 카바트에 따라 결정된 CDR을 포함하는, 안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 항-인간 콜라겐 II 항체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

항체가

- a) 서열번호 9 및 서열번호 10, 또는
- b) 서열번호 15 및 서열번호 16

의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인  
을 포함하는, 약학 제형.

#### 청구항 5

제2항 또는 제3항에 있어서,

항체가

- a) 서열번호 9 및 서열번호 10, 또는
- b) 서열번호 15 및 서열번호 16

의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인  
을 포함하는, 항-인간 콜라겐 II 항체.

#### 청구항 6

제4항에 있어서,

항체가 scFv인, 약학 제형.

**청구항 7**

제5항에 있어서,

항체가 scFv인, 항-인간 콜라겐 II 항체.

**청구항 8**

- 제1 항원에 특이적으로 결합하는 Fab, 및

- 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv

를 포함하는 융합 단백질로서,

상기 Fab가 펩티드 결합에 의해 이의 C-말단 중 하나에서 펩티드 연결기의 N-말단에 접합되고, 상기 scFv가 펩티드 결합에 의해 이의 N-말단에서 펩티드 연결기의 C-말단에 접합되고,

상기 제1 항원이 ANG2, VEGF, PDGF-B 및 IL-1베타로 이루어진 군으로부터 선택되며,

상기 scFv가 a) 서열번호 9 및 서열번호 10, 또는 b) 서열번호 15 및 서열번호 16의 카바트에 따라 결정된 CDR을 포함하는,

융합 단백질.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

제2 항원에 특이적으로 결합하는, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv인 제3 결합 부위를 추가적으로 포함하는 융합 단백질로서,

제1 및 제3 결합 부위가 F(ab')<sub>2</sub>, 다이아바디, BITE, tandAb 및 DART로 이루어진 군으로부터 선택되고, 제1 및 제3 결합 부위가 펩티드 결합에 의해 이들의 C-말단에서 펩티드 연결기의 N-말단에 접합되고, scFv가 펩티드 결합에 의해 이의 N-말단에서 펩티드 연결기의 C-말단에 접합되는, 융합 단백질.

**청구항 10**

제9항에 있어서,

제1 항원, 제2 항원 또는 둘 모두가 치료적 안구 표적인, 융합 단백질.

**청구항 11**

제9항에 있어서,

제1 항원, 제2 항원 또는 둘 모두가 서로 독립적으로 ANG2, VEGF, PDGF-B 및 IL-1베타로 이루어진 군으로부터 선택되는, 융합 단백질.

**청구항 12**

제9항에 있어서,

제1 항원, 제2 항원 또는 둘 모두가 ANG2, VEGF, PDGF-B 및 IL-1베타로 이루어진 군으로부터 선택된 상이한 항원인, 융합 단백질.

**청구항 13**

제9항에 있어서,

콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv가

a) 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는

경쇄 가변 도메인, 또는

b) 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 도메인

을 포함하는, 융합 단백질.

**청구항 14**

제8항에 있어서,

콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv가 서열번호 11, 서열번호 14 또는 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어지는, 융합 단백질.

**청구항 15**

제14항에 있어서,

콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv가 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어지는, 융합 단백질.

**청구항 16**

제9항에 있어서,

제1 결합 부위 및 제3 결합 부위가 Fab인, 융합 단백질.

**청구항 17**

제8항 내지 제16항 중 어느 한 항의 융합 단백질 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 약학 제형.

**청구항 18**

제8항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

약제로서 사용하기 위한 융합 단백질.

**청구항 19**

제18항에 있어서,

용도가 안혈관 질환의 치료를 위한 것인, 융합 단백질.

**청구항 20**

제8항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 융합 단백질.

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 안과 질환 및 이의 치료의 분야에 속한다. 안과 질환의 치료에 적합한 안구내/유리체내 적용례를 위한 용합 단백질, 즉, 다작용성 결합체가 본원에 보고된다. 이의 다작용성 때문에, 용합 단백질은 눈 잔류 표적 및 치료적 표적에 결합할 수 있다.

**배경 기술**

[0002] 눈으로부터 치료적 분자의 클리어런스(clearance)를 야기하는 인자 중 하나는 확산이다. 치료적 분자의 확산적 특성은 궁극적으로 Fc-수용체 결합과 조합된 이의 크기에 의해 주로 결정된다. 눈으로부터 클리어런스 후에, 치료적 분자는 체순환에서 발견될 수 있다.

[0003] 문헌[Kleinberg, T.T. et al., Surv. Ophthalmol. 56 (2011) 300-323]은 유리액 대체물(vitreous substitute)의 보고서를 제공하였다. 영구적 유리액 대체물은 콜라겐, 히알루론산, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스 및 천연 하이드로겔 중합체에 의해 시도되어 왔다. 그러나, 어느 것도 임상적으로 실행가능한 것으로 입증되지 않았다.

[0004] 문헌[Favara, D.M. and Harris, A.L., EMBO Mol. Med. 6 (2014) 577-579]은 검출가능한 전신 부작용 없이 혈관 신생을 국소 억제하는 비-전신 작용 혈관신생 억제제로서 VEGF 점착성-트랩을 개시하였다. VEGF 점착성-트랩은 VEGF 수용체 1 도메인 2, VEGF 수용체 2 도메인 3, CH3 도메인 및 heparin-결합 도메인(엑손 6, 7 및 8의 부분)을 포함하는 폴리펩티드의 이량체이다.

[0005] 문헌[Ponsioen, T. L., et al., Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 49 (2008) 4089-4095]은 인간 유리체망막 계면에 서 콜라겐의 분포를 개시하였다. 망막절제 샘플은 모든 시험된 콜라겐 유형에서 mRNA를 발현하였다.

[0006] WO 2008/135734는 항체 또는 단편이 약학적 활성 잔기에 접합된, 산화된 콜라겐 II에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물을 개시한다.

[0007] 문헌[Uysal, H., et al., Mol. Immunol. 45 (2008) 2196-2204]은 병원성 콜라겐 유형 II-특이적 단클론 항체 CIIC1 Fab의 결정 구조를 개시하였다.

[0008] 문헌[Nandakumar, K-S., et al., Eur. J. Immunol. 33 (2003) 2269-2277]은 단일 단클론 IgG 항-콜라겐 유형 II 항체에 의한 관절염의 유도 및 억제성 FcγRIIb가 결핍된 마우스에서 관절염의 증대를 개시하였다.

[0009] 문헌[Xu, Y., et al., Mol. Immunol. 41 (2004) 411-419]은 유형 II 콜라겐의 정확히 동일한 에피토프에 대한 2개의 단클론 항체가 파지 디스플레이에 의해 비-교차-반응성 파지 클론을 선택함을 개시하였다.

[0010] WO 2012/047583은 인간 콜라겐 II에 결합하는 항체를 개시한다.

**발명의 내용**

**발명의 요약**

[0011] 본 발명은 항-인간 콜라겐 II 항체에 관한 것이다.

[0012] a) 서열번호 9 및 서열번호 10,

[0013] b) 서열번호 12 및 서열번호 13, 또는

[0014] c) 서열번호 15 및 서열번호 16

[0015] 의/에서와 같은 카바트(Kabat)에 따라 결정된 6개의 CDR을 포함하는 항-인간 콜라겐 II 항체가 본원에 개시된다.

[0016] 하나의 실시양태에서, 항체는

- [0018] a) 서열번호 9 및 서열번호 10,
- [0019] b) 서열번호 12 및 서열번호 13, 또는
- [0020] c) 서열번호 15 및 서열번호 16
- [0021] 의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0022] 하나의 실시양태에서, 항체는 scFv이다.
- [0023] a) 서열번호 9 및 서열번호 10,
- [0024] b) 서열번호 12 및 서열번호 13, 또는
- [0025] c) 서열번호 15 및 서열번호 16
- [0026] 의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체로서 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0027] 본원에 개시된 항체 및 임의적으로 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 제형이 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0028] 하나의 실시양태에서, 약학 제형은 안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 것이다.
- [0029] 약제로서 사용하기 위한 본원에 개시된 항체가 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0030] 하나의 실시양태에서, 용도는 안혈관 질환의 치료를 위한 것이다.
- [0031] 약제의 제조에서 본원에 개시된 항체의 용도가 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0032] 하나의 실시양태에서, 용도는 안혈관 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 것이다.
- [0033] 안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 본원에 개시된 항체가 용도가 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0034] 본원에 개시된 항체를 안혈관 질환의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 안혈관 질환을 앓는 환자의 치료 방법이 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0035] 본 발명은 2개 이상의 결합 부위(이중 하나는 콜라겐 II에 특이적으로 결합함)를 갖는 융합 단백질을 보고한다.
- [0036] 안질환에 관련된 표적에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위 및 눈에서의 잔류에 영향을 미치는 표적(눈 잔류 표적)에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위를 조합함으로써, 다중특이적 결합체가 눈 잔류 표적에 대한 결합 특이성을 갖지 않는 분자와 비교하여 개선된 유리체내 잔류를 제공할 수 있음이 밝혀졌다. 제2 결합 부위는 유리액의 세포외 매트릭스(ECM) 또는 망막에서 발견되는 화합물 또는 분자에 특이적으로 결합한다. 이러한 세포외 매트릭스의 화합물은 다중특이적 결합체의 충분한 적재량 및 그에 따른 투여량을 가능하게 하는 양으로 존재해야 한다. 이러한 목적을 위해, 콜라겐, 특히 콜라겐 II가 유리액의 ECM에 적합한 화합물임이 밝혀졌다.
- [0037] 이러한 다중특이적 결합체는 (재조합) 융합 단백질로서 재조합하여 생산될 수 있다.
- [0038] 따라서, - 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위, 및
- [0039] - 유리액의 세포외 매트릭스에 존재하는 화합물에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위
- [0040] 를 포함하는 융합 단백질이 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0041] 하나의 실시양태에서, 유리액의 세포외 매트릭스에 존재하는 화합물은 콜라겐이다. 하나의 실시양태에서, 콜라겐은 콜라겐 II이다.
- [0042] 하나의 실시양태에서, 제1 항원은 안혈관 질환과 관련된다.
- [0043] 또한, - 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위, 및
- [0044] - 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위
- [0045] 를 포함하는 융합 단백질이 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0046] 하나의 실시양태에서, 융합 단백질은 하기를 포함한다:

- [0047] - 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위,
- [0048] - 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위, 및
- [0049] - 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제3 결합 부위.
- [0050] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 콜라겐 II는 인간 콜라겐 II이다. 하나의 실시양태에서, 인간 콜라겐 II는 서열번호 17, 18 또는 19의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0051] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 각각의 결합 부위는 항체 결합 부위, 항체 단편, 안티칼린, DARPIN, 수용체 리간드 또는 이의 결합 단편, 수용체 또는 이의 결합 단편, 및 테트라넥틴 도메인으로 이루어진 군으로부터 서로 독립적으로 선택된다.
- [0052] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 각각의 결합 부위는 서로 독립적으로 항체 결합 부위 또는 항체 단편이다. 하나의 실시양태에서, 각각의 결합 부위는 항체 중쇄 가변 도메인 및 항체 경쇄 가변 도메인의 쌍이다.
- [0053] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 제1 결합 부위는 제1 폴리펩티드에 포함되고, 제2 결합 부위는 제2 폴리펩티드에 포함되되, 제1 폴리펩티드는 직접, 펩티드 연결기를 통해 또는 다이설파이드 결합을 통해 제2 폴리펩티드에 접합되거나 융합된다.
- [0054] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 제1 결합 부위는 제1 폴리펩티드에 포함되고, 제2 결합 부위는 제2 폴리펩티드에 포함되고, 제3 결합 부위는 제3 폴리펩티드에 포함되되, 제1 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드는 항체 또는 항체 단편을 형성하고, 상기 항체 또는 항체 단편은 직접, 펩티드 연결기를 통해 또는 다이설파이드 결합을 통해 제2 폴리펩티드에 접합된다.
- [0055] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드는 scFv, dsscFv, Fab, dsFab, 교차Fab, 모노바디 및 VHH로 이루어진 군으로부터 서로 독립적으로 선택된다(여기서, sc=단일 쇠, ds=다이설파이드-안정화된). 하나의 실시양태에서, 폴리펩티드 중 하나는 Fab 또는 dsFab이고, 나머지 폴리펩티드는 scFv 또는 dsscFv이고, 폴리펩티드는 펩티드 연결기를 통해 접합된다. 하나의 실시양태에서, 폴리펩티드 중 2개가 Fab 또는 dsFab이고, 나머지 폴리펩티드가 scFv 또는 dsscFv이고, 폴리펩티드는 펩티드 연결기를 통해 접합된다.
- [0056] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 융합 단백질은
- [0057] - 제1 결합 부위로서, 제1 항원에 특이적으로 결합하는 Fab,
- [0058] - 제2 결합 부위로서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv, 및
- [0059] - 펩티드 연결기
- [0060] 를 포함하되, 상기 Fab는 펩티드 결합에 의해 이의 C-말단 중 하나에서 펩티드 연결기의 N-말단에 접합되고, 상기 scFv는 펩티드 결합에 의해 이의 N-말단에서 펩티드 연결기의 C-말단에 접합된다.
- [0061] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 융합 단백질은
- [0062] - 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위,
- [0063] - 제2 결합 부위로서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv,
- [0064] - 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제3 결합 부위, 및
- [0065] - 펩티드 연결기
- [0066] 를 포함하되, 조합된 제1 및 제3 결합 부위는 펩티드 결합에 의해 이들의 C-말단에서 펩티드 연결기의 N-말단에 접합되고, scFv는 펩티드 결합에 의해 이의 N-말단에서 펩티드 연결기의 C-말단에 접합된다.
- [0067] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 조합된 제1 및 제3 결합 부위는 적어도 F(ab')<sub>2</sub>, 다이아바디(diabody), BITE, tandAb 또는 DART이거나/이에 속한다.
- [0068] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 제1 항원 및/또는 제2 항원은 치료적 안구 표적(therapeutic ocular target)이고/안혈관 질환에 관련된다.



- [0069] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 제1 항원 및/또는 제2 항원은 ANG2, VEGF, PDGF-B 및 IL-1베타로 이루어진 군으로부터 서로 독립적으로 선택된다.
- [0070] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 제1 항원 및/또는 제2 항원은 ANG2, VEGF, PDGF-B 및 IL-1베타로 이루어진 군으로부터 선택된 상이한 항원이다.
- [0071] 하나의 실시양태에서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv는 하기를 포함한다:
- [0072] a) 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 10의 경쇄 가변 도메인,
- [0073] b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 13의 경쇄 가변 도메인, 또는
- [0074] c) 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 16의 경쇄 가변 도메인.
- [0075] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv는 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 13의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0076] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv는 서열번호 11, 서열번호 14 또는 서열번호 17의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0077] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv는 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0078] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 제1 결합 부위 및 제3 결합 부위는 Fab이다.
- [0079] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 융합 단백질은
- [0080] - ANG2, VEGF, PDGF-B 또는 IL-1베타에 특이적으로 결합하는 Fab,
- [0081] - 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 13의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv, 및
- [0082] - 펩티드 연결기
- [0083] 를 포함하되, 상기 Fab는 펩티드 결합에 의해 이의 C-말단 중 하나에서 펩티드 연결기의 N-말단에 접합되고, 상기 scFv는 펩티드 결합에 의해 이의 N-말단에서 펩티드 연결기의 C-말단에 접합된다.
- [0084] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 융합 단백질은 75 kDa 미만의 분자량을 갖는다.
- [0085] 본원에 개시된 모든 양상의 하나의 실시양태에서, 융합 단백질은 항체 Fc-영역이 없다.
- [0086] 본원에 개시된 융합 단백질 및 임의적으로 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 제형이 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0087] 하나의 실시양태에서, 약학 제형은 안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 것이다.
- [0088] 약제로서 사용하기 위한 본원에 개시된 융합 단백질이 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0089] 하나의 실시양태에서, 용도는 안혈관 질환의 치료를 위한 것이다.
- [0090] 약제의 제조에서 본원에 개시된 융합 단백질의 용도가 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0091] 하나의 실시양태에서, 용도는 안혈관 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 것이다.
- [0092] 안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 본원에 개시된 융합 단백질이 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0093] 본원에 개시된 융합 단백질을 안혈관 질환의 치료가 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 안혈관 질환을 앓는 환자의 치료 방법이 양상으로서 본원에 개시된다.
- [0094] **발명의 상세한 설명**
- [0095] 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄의 뉴클레오티드 서열에 관한 일반적인 정보는 문헌[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 제공된다.
- [0096] 본원에 사용된 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의 모든 불변 영역 및 도메인의 아미노산 위치는 문헌[Kabat, et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 기재된 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링되고, 본원에서 카바트에 따른 넘버링"으로 지칭된다. 구체적으로, 문헌[Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]의 카바트 넘버링 시스템(647 내지 660면 참조)은 카파 및 람다 이소타입의 경쇄 불변 도메인 CL에 대해 사용되고, 카바트 EU 인덱스 넘버링 시스템(661 내지 723면 참조)은 불변 중쇄 도메인(CH1, 힌지, CH2 및 CH3)에 대해 사용된다(이는 본원에서 이러한 경우 "카바트 EU 인덱스에 따른 넘버링"으로 지칭함으로써 추가로 명확해진다).

- [0097] 본 발명을 수행하기 위해 유용한 방법 및 기술은 예를 들어 문헌[Ausubel, F.M. (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I to III (1997)]; [Glover, N.D., and Hames, B.D., ed., DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (1985)]; [Oxford University Press; Freshney, R.I. (ed.), Animal Cell Culture - a practical approach, IRL Press Limited (1986)]; [Watson, J.D., et al., Recombinant DNA, Second Edition, CHSL Press (1992)]; [Winnacker, E.L., From Genes to Clones; N.Y., VCH Publishers (1987)]; [Celis, J., ed., Cell Biology, Second Edition, Academic Press (1998)]; [Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, second edition, Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1987)]에 기재되어 있다.
- [0098] 재조합 DNA 기술의 사용은 핵산 유도체의 생산을 가능하게 한다. 이러한 유도체는 예를 들어 개별적 또는 여러 뉴클레오타이드 위치에서 치환, 변경, 교환, 결실 또는 삽입에 의해 변형될 수 있다. 변형 또는 유도체화는 예를 들어 부위-지향적 돌연변이 유발에 의해 수행될 수 있다. 이러한 변형은 당업자에 의해 용이하게 수행될 수 있다(예를 들어 문헌[Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A laboratory manual (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA]; [Hames, B.D., and Higgins, S.G., Nucleic acid hybridization - a practical approach (1985) IRL Press, Oxford, England] 참조).
- [0099] I. 정의
- [0100] 본원에 사용된 용어 "포함함"은 용어 "~로 이루어짐"을 포함하는 것으로 명시적으로 언급된다. 따라서, 용어 "포함함"을 함유하는 모든 양상 및 실시양태는 또한 용어 "~로 이루어짐"을 사용하여 개시된다.
- [0101] 용어 "약"은 그 후에 따르는 수치적 값의 +/- 20% 범위를 나타낸다. 하나의 실시양태에서, 용어 약은 그 후에 따르는 수치적 값의 +/- 10% 범위를 나타낸다. 하나의 실시양태에서, 용어 약은 그 후에 따르는 수치적 값 +/- 5% 범위를 나타낸다.
- [0102] 본원에서 용어 "(온전한) 항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고 다양한 항체 구조(비제한적으로 단클론 항체를 포함함)를 포괄한다.
- [0103] 용어 "(온전한) 항체"는 다양한 구조를 갖는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 온전한 IgG 항체는 다이설파이드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. N-말단부터 C-말단까지, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로서도 지칭되는 가변 영역(VH)에 이어서 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단부터 C-말단까지, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로서도 지칭되는 가변 영역(VL)에 이어서 불변 경쇄(CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 근거하여 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ )로서 지칭되는 두 유형 중 하나로 배정될 수 있다.
- [0104] 용어 "항체 단편"은 온전한 항체가 결합한 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 나타낸다. 항체 단편의 예는 비제한적으로 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; 다이아바디; 선형 항체; 단일 쇠 항체 분자(예를 들어 scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0105] 용어 "항체 결합 부위"는 항원 결합에 책임이 있는 항체의 아미노산 잔기를 나타낸다. 일반적으로 이는 항체 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 쌍이다. 항체의 항원-결합 부위는 "초가변 영역" 또는 "HVR"의 아미노산 잔기를 포함한다. "골격" 또는 "FR" 영역은 본원에 정의된 초가변 영역 이외의 가변 도메인 영역이다. 따라서, 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인은 영역 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4(면역글로불린 골격)의 N-말단에서 C-까지를 포함한다. 특히, 중쇄의 CDR3 영역은 항원 결합에 가장 기여하고 항체를 한정하는 영역이다.
- [0106] 용어 "(항원에 대한) 결합"은 생체의 분석에서, 하나의 실시양태에서, 항체가 표면에 결합하는 결합 분석에서,

항원에 대한 항체의 결합을 나타내고, 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정된다. 결합은 약  $10^{-7}$  M 이하의 결합 친화성( $K_D$ ), 일부 실시양태에서  $10^{-13}$  내지  $10^{-8}$  M의 결합 친화성( $K_D$ )을 의미한다.

- [0107] 결합은 비아코어(BIAcore) 분석(지이 헬스케어 바이오센서 에이비(GE Healthcare Biosensor AB, 스웨덴 옘살라 소재))에 의해 조사될 수 있다. 결합의 친화성은 용어  $k_a$ (항체/항원 복합체로부터 항체의 결합에 대한 속도 상수),  $k_d$ (해리 상수) 및  $K_D(k_d/k_a)$ 에 의해 정의된다.
- [0108] 용어 "결합 부위"는 표적에 대한 결합 특이성을 나타내는 단백질성 독립체를 나타낸다.
- [0109] 항체의 "클래스"는 이의 중쇄에 의해 보유된 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체의 5종의 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스(동종형), 예를 들어 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> 및 IgA<sub>2</sub>로 더 나누어질 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스들에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로서 지칭된다.
- [0110] "골격" 또는 "FR"은 추가변 영역(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인으로 구성된다: FR1, FR2, FR3 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- [0111] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고, 외래 핵산이 도입되어 있는 세포(이러한 세포의 자손을 포함함)를 지칭한다. 숙주 세포는 일차 형질전환된 세포, 및 계대배양의 수와 관계없이 이로부터 유래된 자손을 포함하는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함한다. 자손은 핵산 함량 면에서 모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있으나 돌연변이를 함유할 수 있다. 최초로 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선별된 기능 또는 생물학적 활성과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 여기에 포함된다.
- [0112] "인간화된 항체"는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화된 항체는 하나 이상, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 이때 모든 또는 실질적으로 모든 HVR(예를 들어 CDR)은 비-인간 항체의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것에 상응한다. 인간화된 항체는 임의적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화된 형태"는 인간화를 겪은 항체를 지칭한다.
- [0113] 본원에서 사용된 용어 "추가변 영역" 또는 "HVR"은 서열 면에서 추가변성(상보성 결정 영역 또는 CDR)을 갖고 구조적으로 정의된 루프(추가변 루프)를 형성하고/하거나 항원 접촉 잔기(항원 접촉부)를 함유하는 항체 가변 도메인의 영역 각각을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR을 포함한다: VH에서 3개(H1, H2 및 H3), 및 VL에서 3개(L1, L2 및 L3). 본원에 나타낸 HVR은 하기를 포함한다:
- [0114] (a) 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3)에서 발생하는 추가변 루프(문헌[Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917]);
- [0115] (b) 아미노산 잔기 24-34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3), 31-35b(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3)에서 발생하는 CDR(문헌[Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.]);
- [0116] (c) 아미노산 잔기 27c-36(L1), 46-55(L2), 89-96(L3), 30-35b(H1), 47-58(H2) 및 93-101(H3)에서 발생하는 항원 접촉부(문헌[MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)]); 및
- [0117] (d) HVR 아미노산 잔기 46-56(L2), 47-56(L2), 48-56(L2), 49-56(L2), 26-35(H1), 26-35b(H1), 49-65(H2), 93-102(H3) 및 94-102(H3)를 포함하는 (a), (b) 및/또는 (c)의 조합.
- [0118] 하나의 실시양태에서, HVR 잔기는 CDR 잔기인 것으로 본원 다른 곳에서 확인되는 잔기를 포함한다.
- [0119] 달리 지시되지 않는 한, 가변 도메인의 HVR 잔기 및 다른 잔기(예를 들어 FR 잔기)는 카바트 EU 인덱스 넘버링 시스템(상기 카바트 등의 문헌)에 따라 본원에서 넘버링된다.
- [0120] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산된 항체, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-암호화 서열을 사용하는 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는

항체이다. 인간 항체의 이 정의는 비-인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체를 특히 배제한다. 특정 실시양태에서, 인간 항체는 비-인간 유전자 이식된 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 인간 항체는 하이브리도마 세포주로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 인간 항체는 (과지) 디스플레이 라이브러리로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 인간 항체는 인간 B-세포로부터 유래된다.

[0121] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 비제한적으로 사육 동물(예를 들어 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대, 원숭이), 토끼 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0122] "단리된" 항체는 이의 천연 환경의 성분으로부터 분리되어 있는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 예를 들어 전기영동(예를 들어 SDS-PAGE, 등전점 포커싱(IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피(예를 들어 크기 배제 크로마토그래피 또는 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정될 때 95% 또는 99% 초과 순도로 정제된다. 항체 순도의 평가 방법의 검토를 위해서는 예를 들어 문헌[Flatman, S. et al., J. Chrom. B 848 (2007) 79-87]을 참조한다.

[0123] "단리된" 핵산은 이의 천연 환경의 성분으로부터 분리되어 있는 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 통상적으로 핵산 분자를 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 상기 핵산 분자는 염색체 외부에 존재하거나 이의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.

[0124] 본원에서 사용된 용어 "단클론 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭한다, 즉, 예를 들어, 천연 돌연변이를 함유하거나 단클론 항체 제제의 제조 동안 발생하는 가능한 변이체 항체(이러한 변이체는 일반적으로 미미한 양으로 존재함)를 제외하고 상기 집단을 구성하는 개별 항체는 동일하고/하거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 유도된 상이한 항체를 포함하는 다중 클론 항체 제제와 대조적으로, 단클론 항체 제제의 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 유도된다. 따라서, 수식어 "단클론"은 항체의 특성을 항체들의 실질적으로 균질한 집단으로부터 수득되는 것으로서 표시하고, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 제조를 요구하는 것으로서 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단클론 항체는 비제한적으로 하이브리도마 방법, B-세포 방법, 재조합 DNA 방법, 과지-디스플레이 방법, 및 인간 면역글로불린 좌위의 전부 또는 일부를 함유하는 형질전환 동물을 사용하는 방법을 포함하는 다양한 기법들에 의해 생산될 수 있다.

[0125] 용어 "안혈관 질환"은 비제한적으로 안구내 신생혈관 증후군, 예컨대 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 황반 부종, 미숙아 망막증, 신생혈관성 녹내장, 망막 정맥 폐색, 중심성 망막 정맥 폐색, 황반 변성, 연령-관련된 황반 변성, 색소성 망막염, 망막 혈관종 증식, 황반 모세혈관 확장증, 허혈성 망막병증, 홍채 신혈관 형성, 안구내 신혈관 형성, 각막 신혈관 형성, 망막 신혈관 형성, 맥락막 신혈관 형성 및 망막 변성을 포함한다(예를 들어 문헌 [Garner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., and Klintworth, G.K., (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York (1994), pp. 1625-1710] 참조).

[0126] 용어 "약학 제형"은 그 내부에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이게 하는 형태로 존재하고 이 제형이 투여되는 대상체에게 허용되지 않는 독성을 나타내는 추가적 성분을 함유하지 않는 제형을 지칭한다.

[0127] "약학적으로 허용되는 담체"는 대상체에게 독성을 나타내지 않는, 약학 제형 중의 활성 성분 이외의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용되는 담체는 비제한적으로 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함한다.

[0128] 본원에 사용된 용어 "펩티드 연결기"는 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 나타내고, 이는 하나의 실시양태에서 합성 기원의 것이다. "펩티드 연결기"는 아미노산 잔기의 선형 쇄를 나타낸다. 이러한 아미노산 잔기의 선형 쇄는 1 내지 30개의 잔기의 길이를 갖는다.

[0129] 하나의 실시양태에서, 펩티드 연결기는 글리신, 글루타민 및/또는 세린 잔기가 풍부하다. 하나의 실시양태에서, 이들 잔기는 예를 들어 5개 이하의 아미노산의 반복적인 소단위, 예컨대 GS(서열번호 21), GGS(서열번호 22), GGG(서열번호 23) 및 GGGGS(서열번호 24)로 배열된다. 반복적인 소단위는 1 내지 5회 반복될 수 있다. 다중결합 단위의 아미노- 및/또는 카복시-말단 단부에서, 6개의 추가적인 자연적으로 발생하는 임의적인 아미노산이 첨가될 수 있다.

[0130] 펩티드 연결기는 하나의 실시양태에서 30개 이하의 아미노산 잔기의 길이, 하나의 실시양태에서 5 내지 20개의 아미노산 잔기의 길이를 갖는 아미노산 서열을 갖는 펩티드이다. 하나의 실시양태에서, 펩티드 연결기는  $(GxS)_n$ 이다(이때, G = 글리신, S = 세린,  $(x = 3, n = 2, 3, 4$  또는  $5)$  또는  $(x = 4, n = 2, 3$  또는  $4)$ ), 하나의 실시양태에서  $x = 3, n = 2$ , 하나의 실시양태에서  $x = 4, n = 2$ 임). 그럼에도 불구하고, 이러한 펩티드 연

결기는 이의 말단의 하나 또는 둘 다에 추가적 글리신 및/또는 세린 잔기를 포함할 수 있다.

- [0131] 다른 합성 펩티드 연결기는 10 내지 20회 반복되는 단일 아미노산으로 구성되고, 아미노- 및/또는 카복시-말단 단부에서 6개 이하의 자연적으로 발생하는 임의적 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0132] 합성 GS-풍부 펩티드 연결기 이외에, 또한 자연적으로 발생하는 펩티드 연결기, 예컨대 IgG 힌지, 인간 P-당단 백질의 연결기, 인간 복제 단백질 A의 C-말단 연결기, 부갑성선 호르몬-관련된 단백질의 연결기가 사용될 수 있다.
- [0133] 모든 펩티드 연결기는 핵산 분자에 의해 암호화될 수 있고, 따라서 재조합적으로 발현될 수 있다. 연결기는 자체로 펩티드이기 때문에, 연결기에 의해 연결된 폴리펩티드는 2개의 아미노산 사이에 형성된 펩티드 결합을 통해 연결기에 연결된다.
- [0134] 용어 "재조합" 또는 "재조합적으로 생산되는"은 재조합 방법에 의해 제조되거나 발현되거나 생산되거나 단리되는 폴리펩티드를 나타낸다. 이는 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 유전자 이식된되거나 폴리펩티드 발현된, 숙주 세포, 예컨대 NSO 또는 CHO 세포로부터 또는 동물(예를 들어 마우스)로부터 단리된 폴리펩티드를 포함한다.
- [0135] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료"(및 이의 문법적 어미변화, 예컨대, "치료하다" 또는 "치료하는")는 치료되는 개체의 자연적 경과를 변경하기 위한 시도에서의 임상 중재를 지칭하고, 예방을 위해 또는 임상 병리의 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 비제한적으로 질환의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적이거나 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이의 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 경감, 및 관해 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 보고된 항체 또는 Fc-영역 융합 폴리펩티드는 질환의 발달을 지연시키거나 질환의 진행을 늦추기 위해 사용된다.
- [0136] 본원 내에 사용된 용어 "원자가"는 (항체) 분자에서 명시된 수의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 이와 같이, 용어 "이가", "사가" 및 "육가"는 (항체) 분자에서 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 본원에 기재된 이종특이적 항체는 하나의 바람직한 실시양태에서 "이가"이다.
- [0137] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항원에 대한 항체의 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 이때 각각의 도메인은 4개의 골격 영역(FR) 및 3개의 초가변 영역(HVR)을 포함한다(예를 들어 문헌[Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), page 91] 참조). 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 나아가, 특정 항원에 결합하는 항체는 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 각각 상보적인 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리될 수 있다(예를 들어 문헌[Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887]; 및 [Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628]) 참조).
- [0138] 본원에서 사용된 용어 "벡터"는 그 자신에 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이 용어는 자가 복제 핵산 구조물로서의 벡터뿐만 아니라 그 자신이 도입되어 있는 숙주 세포의 게놈 내로 삽입된 벡터도 포함한다. 특정 벡터는 이들에 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로서 지칭된다.
- [0139] 용어 "치료적 안구 표적"은 안혈관 질환에 관련된 분자를 나타낸다.
- [0140] 용어 "다이아바디"는 작은 펩티드 연결기에 의해 연결된 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)으로 이루어진 단일 쇠 Fv(scFv) 단편의 비-공유결합 이량체를 나타낸다. scFv에서 공통의 연결기는 14 내지 15개의 아미노산 잔기를 갖고 가변 도메인의 N-말단과 C-말단 사이에 존재한다. 그러나, 3 내지 12개의 아미노산 잔기 길이의 연결기를 사용하는 것은 다이아바디의 형성을 야기할 것이다.
- [0141] 용어 "탠덤(tandem) scFv(taFv)"는 2개의 scFv 분자가 짧은 연결기를 통해 접합된 분자를 나타낸다.
- [0142] 용어 "미니항체" 또는 "미니바디(minibody)"는 2개의 변형된 이량체화 도메인을 통해 2개의 scFv 분자의 화합에 의해 생산된 이가(또는 이종특이적) (scFv)<sub>2</sub>를 나타낸다.
- [0143] 용어 "tandAb"는 각각의 항원에 대해 2개의 결합 부위로 이루어진 사가 이종특이적 항체 포맷을 나타낸다. 이는 연결기에 의해 연결된 가변 면역글로불린-도메인으로만 이루어진다.
- [0144] 용어 "BiTE"는 이종특이적 T-세포 인계이저(BiTE)를 나타낸다. 숙주의 면역계, 보다 구체적으로 T-세포의 세포

독성 활성이 암 세포로 향하게 하는 인공 이중특이적 단클론 항체의 클래스가 존재한다. BiTE는 약 55 kDa의 단일 펩티드 쇄에 대해 상이한 항체의 2개의 단일 쇄 가변 단편(scFv), 또는 4개의 상이한 유전자의 아미노산 서열으로 이루어진 융합 단백질이다. scFv 중 하나는 CD3 수용체를 통해 T-세포에 결합하고, 나머지는 종양 특이적 분자를 통해 종양 세포에 결합한다.

[0145] 용어 "DART"는 자신의 VH가 또 다른 하나로 교환된 2개의 조각된 Fv 단편으로 이루어진 분자이다. 상세히, Fv1은 항체 A의 VH 및 항체 B의 VL을 포함하는 반면에, Fv2는 Ab-B의 VH 및 Ab-A의 VL을 포함한다. 이러한 Fv 도메인의 내부-교환은 짧은 연결성 펩티드에 의해 구조적 제약으로부터 변이체 단편을 해방시킨다.

[0146] "콜라겐"은 동물 체내 다양한 결합 조직에서 세포의 공간의 주요 구조적 단백질이다. 결합 조직의 주요 성분으로서, 이는 포유동물에서 전신 단백질 함량의 25 내지 35%를 이루는 가장 풍부한 단백질이다. 미네랄화의 정도에 따라, 콜라겐 조직은 단단하거나(뼈), 유연하거나(힘줄), 단단함 내지 유연함의 변화도를 가질 수 있다(연골). 연장된 피브릴의 형태의 콜라겐은 대부분 섬유상 조직, 예컨대 힘줄, 인대 및 피부에서 발견된다. 또한, 이는 각막, 연골, 뼈, 혈관, 소화관, 추간관 및 치아의 상아질에서 풍부하다. 근조직에서, 이는 근내막의 주요 성분으로서 사용된다. 콜라겐은 근조직의 1 내지 2%를 구성하고, 강한 힘줄 근육의 중량의 6%를 차지한다. 섬유아세포는 콜라겐을 생산하는 가장 통상적인 세포이다.

[0147] "유형 II 콜라겐"은 관절 연골 및 유리질 연골의 토대이다. 이는 연골의 모든 단백질의 50%를 구성하고 관절 연골의 콜라겐의 85 내지 90%를 구성한다. 유형 II 콜라겐은 피브릴을 형성한다. 이러한 콜라겐의 피브릴 네트워크는 프로테오글리칸 군집을 포획하는 것을 허용할 뿐만 아니라 조직에 인장 강도를 제공한다. 유형 II 콜라겐은 연골 및 눈의 유리액에서 발견된다.

[0148] II. 유리액/유리체

[0149] 눈의 대부분의 공간을 채우는 매트릭스를 유리액/유리체로 나타낸다.

[0150] 인간 유리액은 투명한 수용액이고, 이는 수정체와 망막 사이에 위치한 눈의 후방 구획을 채운다. 이는 안구 부피의 약 80%를 차지하고, 99%의 물을 포함하나, 콜라겐 피브릴의 네트워크 및 히알루론산의 큰 분자 때문에, 생성될 때 겔-유사 구조를 갖는다. 이의 부피는 약 4 내지 5 ml이다(문헌[Beauthier, J.P., (2008) In: De Boeck Universite [Ed]. Traite de medecine legale. Bruxelles: 715-725]). 유리액은 무기 염, 당 및 아스코르브산을 포함하는 여러 저분자량 용질을 함유한다. 인간 유리액에서 단백질의 총 농도는 약 1200 µg/ml이고, 이중 콜라겐은 180 µg/ml를 차지한다(예를 들어 문헌[Aretz, S., et al., Prot. Sci. 11 (2013) 22]; [Theocharis, A.D., et al., Biochim. 84 (2002) 1237-1243] 참조). 대부분 알부민으로 구성된(60 내지 70%) 0.5 mg/mL의 건강한 유리액의 평균 단백질 농도가 문헌[Angi, M., et al., Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation, Volume 2012, Article ID 148039]에 보고되어 있다. 또한, 유리액의 성분이 글로불린, 응고 단백질, 보체 인자 및 저분자량 단백질임이 보고되어 있다(문헌[Ulrich, J.N., et al., Clin. Exp. Ophthalmol. 36 (2008) 431-436]). 모양체는 수성 유체의 후방 구역 내로의 확산, 한외여과 및 능동 수송에 의한 일정한 유체 교환을 제공한다(문헌[Bishop, P.N., Eye, 16 (2002) 454-460]). 단백질은 국소적 분비(예를 들어 당단백질), 혈액으로부터 여과(예를 들어 알부민) 또는 주위 조직으로부터 확산에 의해 유리액에 축적될 수 있다(문헌[Wu, C.W., Am. J. Ophthalmol., 137 (2004) 655-661]). 유리액과 내부 망막 사이에 밀접한 접촉 때문에, 망막의 생리학적 상태 및 병리학적 상태는 프로테움 및 유리액의 생화학적 특성 둘 다에 영향을 미친다.

[0151] III. 눈 잔류가 증가된 안과학용 다작용성 결합제

[0152] 눈 질환과 관련된 표적에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위 및 눈에서 잔류에 영향을 미치는 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합 부위의 조합인 다중특이적 결합제는 단일특이적 결합제에 비해 개선된 유리체내 잔류를 제공할 수 있음이 밝혀졌다. 제2 결합 부위는 유리액의 세포외 매트릭스(ECM)/망막에서 발견되는 화합물/분자에 특이적으로 결합한다. 이러한 세포외 매트릭스의 화합물은 약물의 충분한 적재량/투여량이 결합되도록 하는 양으로 존재해야 한다. 이러한 목적을 위해, 콜라겐, 특히 콜라겐 II가 유리액의 ECM에 적합한 화합물임이 밝혀졌다.

[0153] 긴 유리체내 반감기에 의해 덜 빈번한 주사가 필요하고, 체순환에서 짧은 반감기에 의해 낮은 전신 노출이 영향 받을 수 있고, 상기 둘의 조합에 의해 증가된 효율 및 감소된 부작용이 예상된다.

[0154] 긴 유리체내 반감기는 하기에 의해 달성될 수 있다:

- [0155] - 고분자량(IgG, 예를 들어 PEG를 보다 작은 포맷, 예컨대 다이아바디, Fab 등에 첨가함),
- [0156] - 잔류 표적에 대한 높은 친화성 및 결합활성(보다 낮은 효율적인 약물 농도는 보다 덜 빈번한 투여를 야기한다),
- [0157] - 37°C에서 높은 열안정성,
- [0158] - 유리액 및 혈액 망막 장벽(BRB)을 가로지르는 분자의 확산의 감소,
- [0159] - 최적의 전하 또는 pI.
- [0160] 신속한 전신 클리어런스가 하기에 의해 달성될 수 있다:
- [0161] - 감소된 FcRn 결합을 위해 Fc-영역 조작,
- [0162] - (보다) 낮은 분자량(Fab, 다이아바디, DARPIN),
- [0163] - 보다 적은 투여된 투여량(투여량은 또한 친화성에 좌우된다).
- [0164] 본 발명의 목적은 눈에 적용을 위해 오래 지속되는 약물을 제공하는 것이다. 이는 필요한 적용 횟수를 감소시키고 마찬가지로 단일 투여 사이의 시간을 감소시킨다. 이는 한편으로는 각각의 적용에서 투여되는 투여량을 증가시킴으로써 달성될 수 있고, 다른 한편으로는 적용후 눈에서 약물의 반감기 및 내구성을 증가시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0165] 본 발명은 일반적으로 하기를 포함하는 다중특이적 결합제(즉, 재조합 융합 단백질)에 관한 것이다:
- [0166] - 치료적 안구 표적에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위, 및
- [0167] - 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위.
- [0168] 하나의 실시양태에서, 각각의 결합 부위는 서로 독립적으로 항체 결합 부위, 안티칼린, DARPIN, 수용체 리간드 또는 이의 결합 단편, 수용체 또는 이의 결합 단편, 및 테트라넥틴 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0169] 하나의 실시양태에서, 각각의 결합 부위는 항체 결합 부위이다. 하나의 실시양태에서, 각각의 결합 부위는 항체 중쇄 가변 도메인 및 항체 경쇄 가변 도메인의 (관련이 있는) 쌍이다.
- [0170] 하나의 실시양태에서, 제1 결합 부위는 제1 도메인에 포함되고, 제2 결합 부위는 제2 도메인에 포함되고, 제1 도메인은 직접 또는 펩티드 연결기를 통해 제2 도메인에 접합된다. 하나의 실시양태에서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 서로 독립적으로 scFv, dsscFv, Fab, dsFab, 교차Fab, 모노바디, 및 VHH로 이루어진 군으로부터 선택된다(여기서, sc=단일 쇠, ds=다이설파이드-안정화된). 하나의 실시양태에서, 도메인 중 하나는 Fab 또는 dsFab이고, 나머지 도메인은 scFv 또는 dsscFv이고, 상기 도메인은 펩티드 연결기를 통해 접합된다.
- [0171] 하나의 실시양태에서, 다중특이적 결합제는 탠덤-Fv, 다이아바디, 단일 쇠 다이아바디, 다이설파이드-안정화된 다이아바디, DART, scFv2, Fab-scFv 및 미니바디로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0172] - 치료적 안구 표적에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위를 포함하는 Fab 또는 scFv,
- [0173] - 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv, 및
- [0174] - 펩티드 연결기
- [0175] 포함하는 다중특이적 결합제(즉, 재조합 융합 단백질)가 본원에 개시되며,
- [0176] 상기 제1 결합 부위를 포함하는 Fab 또는 scFv는 펩티드 결합에 의해 이의 C-말단 중 하나에서 펩티드 연결기의 N-말단에 접합되고, 상기 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv는 펩티드 결합에 의해 이의 N-말단에서 펩티드 연결기의 C-말단에 접합된다.
- [0177] 하나의 실시양태에서, 치료적 안구 표적은 ANG2, VEGF, PDGF-B 및 IL-1베타로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0178] 하나의 실시양태에서, 다중특이적 결합제는,
- [0179] - ANG2, VEGF, PDGF-B 또는 IL-1베타에 특이적으로 결합하는 Fab,
- [0180] - 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv, 및

- [0181] - 펩티드 연결기
- [0182] 를 포함하는 이중특이적 결합제이되,
- [0183] 상기 Fab는 펩티드 결합에 의해 이의 C-말단 중 하나에서 펩티드 연결기의 N-말단에 접합되고, 상기 scFv는 펩티드 결합에 의해 이의 N-말단에서 펩티드 연결기의 C-말단에 접합된다.
- [0184] 하나의 실시양태에서, 다중특이적 결합제는
- [0185] - ANG2, VEGF, PDGF-B 또는 IL-1베타에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위,
- [0186] - ANG2, VEGF, PDGF-B 또는 IL-1베타에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위,
- [0187] - 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv, 및
- [0188] - 펩티드 연결기
- [0189] 를 포함하는 삼중특이적 결합제이되,
- [0190] 조합된 제1 및 제2 결합 부위는 이들의 C-말단에서 펩티드 연결기의 N-말단에 접합되고, scFv는 펩티드 결합에 의해 이의 N-말단에서 펩티드 연결기의 C-말단에 접합된다.
- [0191] 하나의 실시양태에서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv는 하기를 포함한다:
- [0192] a) 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 10의 경쇄 가변 도메인,
- [0193] b) 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 13의 경쇄 가변 도메인, 또는
- [0194] c) 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 16의 경쇄 가변 도메인.
- [0195] 하나의 실시양태에서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv는 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 13의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0196] 하나의 실시양태에서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv는 서열번호 11, 서열번호 14 또는 서열번호 17의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0197] 하나의 실시양태에서, 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv는 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는다.
- [0198] 하나의 실시양태에서, 다중특이적 결합제는
- [0199] - ANG2, VEGF, PDGF-B 또는 IL-1베타에 특이적으로 결합하는 Fab,
- [0200] - 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 및 서열번호 13의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 콜라겐 II에 특이적으로 결합하는 scFv, 및
- [0201] - 펩티드 연결기
- [0202] 를 포함하는 이중특이적 결합제이되,
- [0203] 상기 Fab는 펩티드 결합에 의해 이의 C-말단 중 하나에서 펩티드 연결기의 N-말단에 접합되고, 상기 scFv는 펩티드 결합에 의해 이의 N-말단에서 펩티드 연결기의 C-말단에 접합된다.
- [0204] 약물의 유리체내 반감기 및 내구성은 다양한 방법, 예컨대 특히 약물의 수력학적 반경의 증가(이에 의해 눈으로부터의 확산을 느리게 한다), 표적에 대한 약물의 높은 친화성(이에 의해 약물-표적 복합체의 해리를 감소시킨다), 눈에서 높은 (열적) 열화 안정성 및 높은 주사가능한 투여량에 의해 증가될 수 있다.
- [0205] 내구성에 영향을 미치는 것으로 생각되는 주요 인자는 투여량(적용되는 투여량의 증가는 내구성을 긍정적으로 증가시킨다), 반감기(반감기의 증가는 내구성을 긍정적으로 증가시킨다) 및 표적에 대한 친화성( $K_b$ 로 표현됨)(친화성의 증가는 내구성을 긍정적으로 증가시킨다)이다.
- [0206] 유리체내 적용 후에, 많은 양의 약물은 눈에서 약물의 잔류를 위해 선택된 유리액의 ECM의 화합물에 의해 결합되어야 한다. 상기 화합물에 대한 결합 동력학은 망막/맥락막 내로의 약물의 충분한 잔여 확산을 허용하여 최소 유효 투여량을 유지해야 한다(목적: 유리체내 적용 후에 최소 유효 투여량보다 높은 약물 농도를 가능한 한 길게 유지함).



- [0207] "확산비"(눈에서 약물의 잔류를 위해 선택된 ECM의 화합물에 대한  $k_{on}/k_{off}$  및 유리액에서 데포의 용량에 의존적임)는 체순환 내로의 배설률보다 약간 높거나 같아야 한다.
- [0208] 눈에서 약물의 잔류를 위해 선택된 ECM의 화합물의 "용량"(= 데포 크기)은 충분히 높아야 한다. 상기 용량은 눈에서 약물의 잔류를 위해 선택된 ECM의 화합물의 양/접근성, 이의 결합 부위의 수 및 이의 턴오버(turnover)에 의존적이다.
- [0209] 결합제-ECM 화합물-상호작용은 확산 상수를 감소시켜 눈으로부터의 접합물의 클리어런스를 감소시켜야 한다. 유리액에서의 감소된 확산비는 증가된/개선된 눈 잔류를 위한 요건이다. 복합 용액에서 형광 표지된 단백질의 확산 상수는 형광 상관 분광법(FCS; 즉, 형광을 사용하는 DLS)에 의해 결정될 수 있다.
- [0210] 농도, 확산 계수 및 MW와 같은 파라미터는 측정으로부터 직접 결정될 수 있다. 확산성 시험은 유리액의 조성을 "나타내는" 인공 시험 용액(약물의 잔류를 위해 선택된 ECM의 화합물을 포함함)에서 또는 미니돼지의 유리액에서 직접 수행될 수 있다.
- [0211] 형광 상관 분광법(FCS)은 초점이 맞춰진 레이저 빔에 의해 조사된 개방형 미세 부피 요소에서 형광 표지된 분자의 확률적인 움직임을 분석한다. FCS는 용액에서 분자 상호작용의 연구를 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 하나의 결합 파트너는 형광단으로 표지되고 지정된 상호작용제와 함께 항온처리된다. 결합시에, 표지된 복합물의 MW 및 확산적 이동성은 변경되고, 이는 FCS에 의해 정량화될 수 있다. 일정한 농도의 결합 파트너에 대한 표지된 리간드의 적정은 상호작용의 친화성을 결정한다. 시간 분해 측정은 상응하는 속도 상수를 초래한다. 따라서, 복합 크기 FCS에서 충분한 이동은 해리 상수 및 속도 상수의 결정을 위해 사용될 수 있다.
- [0212] 브라운 운동(Brownian motion)은 빛나는 검출량을 통해 형광 표지된 분자의 확산을 추진한다. 부피 요소를 통과하는 동안 방출된 광자는 자외선-감응성 애벌란시(avalanche) 광 검출기(APD) 상에 기록된다. 변동은, 기록된 광자 수를 자기 상관(auto-correlation)으로 지칭되는 수학적 방법으로 처리하고 추론된 자기상관 함수를 적절한 생물물리 모델에 맞추므로써 분석된다.
- $$J = -D * dc/dx$$
- [0213]  $dc/dt = D * (d^2c)/(dx^2)$
- [0214] 상기 식에서,
- [0215] J: 확산 플럭스
- [0216] D: 확산 상수
- [0217] c: 농도
- [0218] x: 거리
- [0219] t: 시간
- [0220] 눈에서 약물의 잔류를 위해 선택될 수 있는 ECM의 화합물은 유리액/유리체에서 발견되는 잠재적으로 불용성인 단백질, 예컨대 콜라겐(유형 II, IX, V/XI, IV 등), 히알루론산(콜라겐과 함께 구조물을 형성함), 콘드로이틴 설페이트 및 헤파린 설페이트이다.
- [0221] 본 발명은, 치료적 효과를 행사하기 위해 표적에 특이적으로 결합하는 제1 결합 부위, 및 눈에서 (적어도) 이중 특이적 결합제의 잔류를 위해 선택된 ECM의 화합물에 특이적으로 결합하는 제2 결합 부위를 포함하는 (적어도) 이중 특이적 결합제에 관한 것이다.
- [0222] 본 발명에 따른 예시적 결합제는 눈에서 약물의 잔류를 위해 선택된 ECM의 화합물에 대해 지향된 제2 결합 특이성과 조합된 항-다이곡시제닌 결합제이다.
- [0223] 다양한 구축물을 생체외 및 생체내 시험하였다:
- [0224] 참조물로서:
- [0225] - 항-다이곡시제닌 항체 Fab(하기에 FAB로 나타냄),
- [0226] - 20 kDa의 PEG 잔기에 접합된 항-다이곡시제닌 항체 Fab(하기에 FAB-PEG로 나타냄),

[0227] 이중특이적 결합제/융합 단백질로서:

[0228] - 헤파린-결합 도메인에 접합된 항-다이콕시제닌 항체 Fab(잔기 111-165를 포함하는 인간 VEGF 단편; 하기에 FAB-HBD로 나타냄),

[0229] - 3개의 상이한 항-콜라겐 II 항체 scFv와 접합된 항-다이콕시제닌 항체 Fab(하기에 FAB-COLL-I(서열번호 9(VH), 10(VL) 및 11(scFv)), FAB-COLL-II(서열번호 12(VH), 13(VL) 및 14(scFv)), FAB-COLL-III(서열번호 15(VH), 16(VL) 및 17(scFv))로 나타내고, 이들은 결합 동력학이 상이하다).

[0230] 미니돼지 연구에서, 상이한 구축물의 농도는 각각의 구축물의 500 nM 용액의 유리체내 주사(d0) 168, 336 및 672시간에 유리액, 망막 및 맥락막에서 결정되었다.

[0231] 유리액에서, 하기 시간-의존적 농도가 결정되었다:

	168시간 (pmol/g)	336시간 (pmol/g)	672시간 (pmol/g)
FAB	82.5	53.6	6.7
FAB-PEG	128.6	93.3	32.5
FAB-HBD	45.2	10.3	2.1
FAB-COLL-I	165.6	59.2	10.4
FAB-COLL-II	171.0	58.5	19.6
FAB-COLL-III	149.3	62.0	11.1

[0232]

[0233] 망막에서, 하기 시간-의존적 농도가 결정되었다:

	168시간 (pmol/g)	336시간 (pmol/g)	672시간 (pmol/g)
FAB	85.9	17.6	5.6
FAB-PEG	50.3	43.6	5.4
FAB-HBD	72.5	12.6	1.1
FAB-COLL-I	78.2	52.6	6.7
FAB-COLL-II	101.3	67.7	13.6
FAB-COLL-III	68.2	41.6	6.6

[0234]

[0235] 맥락막에서, 하기 시간-의존적 농도가 결정되었다:

	168시간 (pmol/g)	336시간 (pmol/g)	672시간 (pmol/g)
FAB	29.6	21.4	2.0
FAB-PEG	54.8	34.4	23.9
FAB-HBD	60.2	13.1	1.6
FAB-COLL-I	64.2	51.7	5.4
FAB-COLL-II	68.2	41.6	6.6
FAB-COLL-III	129.5	37.8	7.2

[0236]

[0237] 상이한 콜라겐 scFv는 하기 생체의 특징을 갖는다:

[0238] 눈에서의 상이한 구획(조직)에서 상이한 구축물의 반감기를 도 1에 나타냈다.

[0239] 상이한 구축물에 대한 눈의 상이한 구획(조직)의 노출을 도 2에 나타냈다.

[0240] 구축물의 특징적 파라미터를 미니돼지에서 생체내, 및 비아코어를 사용하여 생체의 결정하고, 뿐만 아니라 인공 확산 시험 용액에서 결정하였다. 데이터를 하기 표에 나타냈다.

	K <sub>D</sub> (nM) 돼지 / 인간 콜라겐 II	확산비 FCS (PBS 단독과 비교한, 등물 농도의 ECM 화합물을 포함하는 PBS에서의 증가)	확산비 FCS (PBS과 비교한 유리액에서의 증가)
FAB	n.a.	100 %	100 %
FAB-PEG	n.a.	+ 65-100 %	+ 70-100 %
FAB-HBD (40 nM)	n.a.	+ 25 %	+ 35 %
FAB-COLL-I (2 nM)	56 / 30	+ 180 %	+ 35-130 %
FAB-COLL-II (8 nM)	50 / 15	+ 260 %	+ 140-310 %
FAB-COLL-III (8 nM)	342 / 180	+ 40 %	+ 30-85 %

[0241]

	농도 (nM)	확산 시간 유리액 (μs)	확산 시간 PBS (μs)
FAB	8	270	267
FAB-COLL-I	2	632	477
FAB-COLL-II	8	1113	347
FAB-COLL-III	8	497	390

[0242]

[0243]

FAB-COLL-II의 경우, 3.2배의 증가된 확산 시간(즉, 감소된 확산)이 VF에서 발견되었고, 2.7배의 증가된 확산 시간이 콜라겐으로 보충된 PBS(동일한 FAB-COLL-II 농도)에서 발견되었다.

[0244]

	t <sub>1/2</sub> 유리액 (시간)	C0 추정값 (nM)
FAB	135	196
FAB-PEG	249	205
FAB-HBD (40 nM)	118	121
FAB-COLL-I (8 nM)	125	421
FAB-COLL-II (2 nM)	169	341
FAB-COLL-III (8 nM)	134	355

[0245]

본원에 개시된 다중특이적 결합제/융합 단백질은,

[0246]

- 긴 유리체내 반감기 및 짧은 전신 반감기를 지원하여 갖지 않은 투여를 가능하게 하고 전신 독성 효과를 최소화/배제시키고,

[0247]

- 유리체 잔류를 가져 눈으로부터 보다 느린 방출, 낮은 전신 C<sub>max</sub> 및 보다 적은 전신 독성을 야기하고,

[0248]

- 선택된 ECM 화합물에 대한 친화성을 증가시켜 보다 낮은 효율적인 약물 농도를 야기하고, 이는 보다 덜 빈번한 투여를 야기할 수 있고,

[0249]

- 특정 유리체 잔류 잔기를 가져 긴 유리체내 반감기를 야기하고,

[0250]

- 유리체 잔류 잔기와 조합된 저분자량 포맷을 가져 유리체 및 혈액 망막 장벽을 가로지르는 신속한 확산을 보완하고,

[0251]

- 눈 장치에서 사용하기 위해 최대로 실현가능한 저분자량 포맷이고,

[0252]

- 제3 특이성의 부가에 의해, 훨씬 더 높은 효능을 야기할 수 있고,

[0253]

- Fc-영역을 포함할 때, FcRn에 결합하지 않는 '사일런트(silent)' Fc 부분 때문에, 짧아진 전신 반감기를 갖는 높은 MW 포맷이다.

[0254]

하나의 양상에서, 본 발명은 인간 콜라겐 II에 결합하는 단리된 항체를 제공한다.

[0255]

특정 실시양태에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 8 nM 농도에서 미니돼지의 유리액에서 750 μs 초과, 하나의 실시양태에서 1000 μs 초과 확산 시간을 갖는다.

[0256]

특정 실시양태에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 또한 돼지 콜라겐 II에 특이적으로 결합한다.

[0257]

특정 실시양태에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 8 nM의 농도에서 400 nM 미만의 돼지 콜라겐 II에 대한 결합에 대한 K<sub>D</sub> 값을 갖는다. 하나의 실시양태에서, K<sub>D</sub>는 100 nM 미만이다.

[0258]

특정 실시양태에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 200 nM 미만의 인간 콜라겐 II에 대한 K<sub>D</sub> 값을 갖는다. 하나의 실시양태에서, K<sub>D</sub>는 50 nM 미만이다.

[0259]

특정 실시양태에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 150시간 초과인 미니돼지 유리액에서의 반감기를 갖는다.

[0260]

특정 실시양태에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 200 nM 초과인 미니돼지에서 추정된 C0을 갖는다. 하나의 실시양태에서, C0은 300 nM 초과이다.

[0261]

하나의 양상에서, 본 발명은 서열번호 9의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VH HVR을 포함하는 항체를 제공한다.

[0262]

하나의 양상에서, 본 발명은 서열번호 12의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VH HVR을

포함하는 항체를 제공한다.

- [0263] 하나의 양상에서, 본 발명은 서열번호 15의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VH HVR을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0264] 하나의 양상에서, 본 발명은 서열번호 10의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VL HVR을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0265] 하나의 양상에서, 본 발명은 서열번호 13의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VL HVR을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0266] 하나의 양상에서, 본 발명은 서열번호 16의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VL HVR을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0267] 또 다른 양상에서, 본 발명의 항체는 (a) 서열번호 9의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) 서열번호 10의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0268] 또 다른 양상에서, 본 발명의 항체는 (a) 서열번호 12의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) 서열번호 13의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0269] 또 다른 양상에서, 본 발명의 항체는 (a) 서열번호 15의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VH HVR 서열을 포함하는 VH 도메인; 및 (b) 서열번호 16의 카바트에 따라 결정된 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두의 VL HVR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.
- [0270] 상기 실시양태 중 어느 하나에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 인간화된다. 하나의 실시양태에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 상기 실시양태 중 어느 하나에서와 같이 HVR을 포함하고, 수용자 인간 골격, 예를 들어 인간 면역 글로불린 골격 또는 인간 컨센서스 골격을 추가로 포함한다.
- [0271] 또 다른 양상에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 서열번호 9의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 기준 서열에 비해 치환(예를 들어 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하나, 항-인간 콜라겐 II 항체는 인간 콜라겐 II에 결합하는 능력을 보유하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열번호 9에서 치환되고/되거나 삽입되고/되거나 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실이 HVR 외부 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 항-인간 콜라겐 II 항체는 서열번호 9의 VH 서열(상기 서열의 번역-후 변형을 포함함)을 포함한다.
- [0272] 또 다른 양상에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 서열번호 12의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 기준 서열에 비해 치환(예를 들어 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하나, 항-인간 콜라겐 II 항체는 인간 콜라겐 II에 결합하는 능력을 보유하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열번호 12에서 치환되고/되거나 삽입되고/되거나 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실이 HVR 외부 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 항-인간 콜라겐 II 항체는 서열번호 12의 VH 서열(상기 서열의 번역-후 변형을 포함함)을 포함한다.
- [0273] 또 다른 양상에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 서열번호 15의 아미노산 서열에 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 기준 서열에 비해 치환(예를 들어 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하나, 항-인간 콜라겐 II 항체는 인간 콜라겐 II에 결합하는 능력을 보유하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열번호 15에서 치환되고/되거나 삽입되고/되거나 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실이 HVR 외부 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 항-인간 콜라겐 II 항체는 서열번호 15의 VH 서열(상기 서열의 번역-후 변형을 포함함)을 포함한다.
- [0274] 또 다른 양상에서, 항-인간 콜라겐 II 항체가 제공되되, 상기 항체는 서열번호 10의 아미노산 서열에 대해 적어

도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열에 비해 치환(예를 들어 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하나, 항-인간 콜라겐 II 항체는 인간 콜라겐 II에 결합하는 능력을 보유하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열번호 10에서 치환되고/되거나 삽입되고/되거나 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실이 HVR 외부 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 항-인간 콜라겐 II 항체는 서열번호 10의 VL 서열(상기 서열의 번역-후 변형을 포함함)을 포함한다.

[0275] 또 다른 양상에서, 항-인간 콜라겐 II 항체가 제공되되, 상기 항체는 서열번호 13의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열에 비해 치환(예를 들어 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하나, 항-인간 콜라겐 II 항체는 인간 콜라겐 II에 결합하는 능력을 보유하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열번호 13에서 치환되고/되거나 삽입되고/되거나 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실이 HVR 외부 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 항-인간 콜라겐 II 항체는 서열번호 13의 VL 서열(상기 서열의 번역-후 변형을 포함함)을 포함한다.

[0276] 또 다른 양상에서, 항-인간 콜라겐 II 항체가 제공되되, 상기 항체는 서열번호 16의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 기준 서열에 비해 치환(예를 들어 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하나, 항-인간 콜라겐 II 항체는 인간 콜라겐 II에 결합하는 능력을 보유하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열번호 16에서 치환되고/되거나 삽입되고/되거나 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실이 HVR 외부 영역에서(즉, FR에서) 발생한다. 임의적으로, 항-인간 콜라겐 II 항체는 서열번호 16의 VL 서열(상기 서열의 번역-후 변형을 포함함)을 포함한다.

[0277] 또 다른 양상에서, 항-인간 콜라겐 II 항체가 제공되되, 상기 항체는 상기에 제공된 실시양태 중 어느 하나에서와 같은 VH 및 상기에 제공된 실시양태 중 어느 하나에서와 같은 VL을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 항체는 각각 서열번호 9 및 서열번호 10의 VH 및 VL 서열(이들 서열의 번역-후 변형을 포함함)을 포함한다.

[0278] 또 다른 양상에서, 항-인간 콜라겐 II 항체가 제공되되, 상기 항체는 상기에 제공된 실시양태 중 어느 하나에서와 같은 VH 및 상기에 제공된 실시양태 중 어느 하나에서와 같은 VL을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 항체는 각각 서열번호 12 및 서열번호 13의 VH 및 VL 서열(이들 서열의 번역-후 변형을 포함함)을 포함한다.

[0279] 또 다른 양상에서, 항-인간 콜라겐 II 항체가 제공되되, 상기 항체는 상기에 제공된 실시양태 중 어느 하나에서와 같은 VH 및 상기에 제공된 실시양태 중 어느 하나에서와 같은 VL을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 항체는 각각 서열번호 15 및 서열번호 16의 VH 및 VL 서열(이들 서열의 번역-후 변형을 포함함)을 포함한다.

[0280] 추가적 양상에서, 본 발명은 본원에 제공된 항-인간 콜라겐 II 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다.

[0281] 본 발명의 추가적 양상에서, 상기 실시양태 중 어느 하나에 따른 항-인간 콜라겐 II 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체를 포함하는 단클론 항체이다. 하나의 실시양태에서, 항-인간 콜라겐 II 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fv, Fab, Fab', scFv, 다이아바디 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이다.

[0282] 본 발명의 추가적 양상에서, 상기 실시양태 중 어느 하나에 따른 항-인간 콜라겐 II 항체는 단클론 항체 scFv 단편 또는 Fab이다. 하나의 실시양태에서, scFv 단편은 서열번호 11의 아미노산 서열을 갖는다. 하나의 실시양태에서, scFv 단편은 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는다. 하나의 실시양태에서, scFv 단편은 서열번호 17의 아미노산 서열을 갖는다.

[0283] IV. 생산

[0284] 본원에 개시된 다중특이적 결합제/융합 단백질은 재조합 방법에 의해 생산된다. 따라서, 본원에 보고된 하나의 양상은 본원에 보고된 다중특이적 결합제를 암호화하는 핵산이고, 추가적 양상은 본원에 보고된 다중특이적 결합제를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포이다. 재조합 생산 방법은 최신 기술에서 널리 공지되어 있고 원핵세포 및 진핵세포에서 단백질을 발현하는 단계, 후속적으로 상기 다중특이적 결합제를 단리하는 단계 및 통상적으

로 약학적으로 허용되는 순도까지 정제하는 단계를 포함한다. 숙주 세포에서 상기 언급된 다중특이적 결합제를 발현하기 위해, 각각의쇄를 암호화하는 핵산을 표준 방법으로 발현 벡터 내로 삽입한다. 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포, 예컨대, CHO 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, PER.C6 세포, 효모 또는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포에서 발현을 수행하고, 상기 다중특이적 결합제를 세포(용해 후 배양 상청액 또는 세포)로부터 회수한다. 일반적인 항체의 재조합 생산 방법은 최신 기술에서 주지되어 있고, 예를 들어 문헌[Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202], [Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282], [Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-160], 및 [Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880]에 기재되어 있다.

[0285] 항체는 예를 들어 US 4,816,567에 기재된 바와 같이 재조합 방법 및 제형화를 사용하여 생산될 수 있다.

[0286] 하나의 실시양태에서, 본원에 기재된 다중특이적 결합제를 암호화하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 다중특이적 결합제의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 다중특이적 결합제의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화한다. 추가적 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터(예를 들어 발현 벡터)가 제공된다. 추가적 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 하나의 이러한 실시양태에서, 숙주 세포는 하기를 포함한다(예를 들어 하기에 의해 형질전환된다): (1) 다중특이적 결합제의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 다중특이적 결합제의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 다중특이적 결합제의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제1 벡터, 및 다중특이적 결합제의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 임파상 세포(예를 들어 YO, NSO, Sp20 세포)이다. 하나의 실시양태에서, 본원에 보고된 다중특이적 결합제의 생산 방법이 제공되며, 상기 방법은 다중특이적 결합제의 발현에 적합한 조건 하에 상기에 제공된 바와 같은 다중특이적 결합제를 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 임의적으로 상기 숙주 세포(또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 다중특이적 결합제를 회수하는 단계를 포함한다.

[0287] 따라서, 본원에 보고된 하나의 양상은 하기 단계를 포함하는 본원에 보고된 다중특이적 결합제의 생산 방법이다:

[0288] a) 다중특이적 결합제를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계;

[0289] b) 상기 다중특이적 결합제의 합성을 허용하는 조건 하에 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0290] c) 상기 배양물로부터 다중특이적 결합제를 회수하는 단계.

[0291] 하나의 실시양태에서, c)의 회수 단계는 (예를 들어, 카파 또는 람다 경쇄가 이종특이적 항체에 함유되는 지에 따라 카파 또는 람다 불변 경쇄에 대해 특이적인) 경쇄 불변 도메인 특이적 포획 시약의 사용을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 이러한 경쇄 특이적 포획 시약은 결합-및-용출 모드로 사용된다. 이러한 경쇄 불변 도메인 특이적 포획 시약의 예는 예를 들어 대규모에서 높은 유속 및 낮은 배압을 허용하는 매우 단단한 아가로스 베이스 매트릭스에 기초한 카파셀렉트(KappaSelect, 상표) 및 람다에프에이비셀렉트(LambdaFabSelect, 상표)(지이 헬스케어/BAC로부터 입수가능함)이다. 이들 물질은 각각 카파 또는 람다 경쇄의 불변 영역에 결합하는 리간드를 함유한다(즉, 경쇄의 불변 영역이 결여된 단편은 결합하지 않을 것이다). 따라서, 이들 둘 다는 경쇄의 불변 영역을 함유하는 다른 표적 분자, 예를 들어 IgG, IgA 및 IgM에 결합할 수 있다. 리간드는 표적 분자와의 결합에 용이하게 사용될 수 있도록 긴 친수성 스페이서 아암(arm)을 통해 매트릭스에 부착된다. 이들은 인간 Ig 카파 또는 람다에 대해 스크리닝되는 단일쇄 항체 단편에 기초한다.

[0292] 다중특이적 결합제는 통상적인 면역글로불린 정제 절차, 예컨대, 친화성 크로마토그래피(단백질 A-세파로스, 또는 카파셀렉트(상표), 람다에프에이비셀렉트(상표)), 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동 또는 투석에 의해 배양 배지로부터 적절하게 분리된다.

[0293] 단클론 항체를 암호화하는 DNA 및 RNA는 통상적인 절차를 사용하여 용이하게 단리되고 서열결정된다. B-세포 또는 하이브리도마 세포는 이러한 DNA 및 RNA의 공급원으로서 작용할 수 있다. 단리된 후에, DNA는 발현 벡터 내로 삽입될 수 있고, 이어서 이는 면역글로불린 단백질을 달리 생성하지 않는 숙주 세포, 예컨대 HEK293 세포, CHO 세포 또는 골수종 세포 내로 형질감염되어 숙주 세포에서 재조합 단클론 항체의 합성물을 수득한다.

[0294] 세포 성분 또는 다른 오염물질, 예를 들어 다른 세포 핵산 또는 단백질을 제거하기 위해 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 당분야에서 잘 공지되어 있는 기타 기법을 포함하는 표준 기법으로 다중특이적 결합제의 정제를 수행한다(예를 들어 문헌[Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols

in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)] 참조). 상이한 방법들, 예컨대, 친화성 크로마토그래피(예를 들어 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피), 이온 교환 크로마토그래피(예를 들어 양이온 교환(카복시메틸 수지), 음이온 교환(아미노에틸 수지) 및 혼합된 모드 교환), 티오친화성 흡착(예를 들어  $\beta$ -머캅토에탄올 또는 다른 SH 리간드를 사용함), 소수성 상호작용 또는 방향족 흡착 크로마토그래피(예를 들어 페닐-세파로스, 아자-아레노친화성 수지 또는 m-아미노페닐보론산을 사용함), 금속 킬레이트 친화성 크로마토그래피(예를 들어 Ni(II) 및 Cu(II) 친화성 물질을 사용함), 크기 배제 크로마토그래피, 및 전기영동 방법(예컨대, 겔 전기영동, 모세관 전기영동)이 잘 확립되어 있고 단백질 정제를 위해 널리 사용된다(문헌[Vijayalakshmi, M., A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102]).

- [0295] 다중특이적 결합제-암호화 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵세포 또는 진핵세포를 포함한다. 예를 들어, 다중특이적 결합제는 특히 글리코실화가 필요하지 않을 때 박테리아에서 생산될 수 있다. 박테리아에서의 폴리펩티드의 발현에 대해 예를 들어 US 5,648,237, US 5,789,199 및 US 5,840,523을 참조한다(에스케리키아 콜라이에서 항체 단편의 발현을 기재하는 문헌[Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254]을 또한 참조한다). 발현 후에, 다중특이적 결합제는 박테리아 세포 페이스트로부터 가용성 분획으로 분리되고 추가로 정제될 수 있다.
- [0296] 원핵생물뿐만 아니라, 진핵미생물, 예컨대 사상균류 또는 효모가 다중특이적 결합제-암호화 벡터에 대해 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이고, 글리코실화 경로가 "인간화"되어 부분적으로 또는 완전한 인간 글리코실화 패턴을 갖는 다중특이적 결합제의 생산을 야기하는 균류 및 효모 균주를 포함한다. 문헌[Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414]; 및 [Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215]를 참조한다.
- [0297] 글리코실화된 다중특이적 결합제의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체(무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 많은 배칼로바이러스 균주는 특히 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0298] 또한, 식물 세포 배양물을 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978 및 US 6,417,429를 참조한다(유전자 이식된 식물에서 항체를 생산하는 PLANTIBODIES(상표) 기법을 기재함).
- [0299] 척추동물 세포를 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서 성장하도록 적합화된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7); 인간 배아 신장 세포주(예를 들어 문헌[Graham, F.L., et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74]에 기재된 HEK293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(예를 들어 문헌[Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252]에 기재된 TM4 세포); 원숭이 신장 세포(CV1); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 경부암 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2); 마우스 유방 종양(MMT 060562); 예를 들어 문헌[Mather, J.P., et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68]에 기재된 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(DHFR<sup>-</sup> CHO 세포를 포함함(문헌[Urlaub, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220])); 및 골수종 세포주, 예컨대 YO, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌[Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268]을 참조한다.
- [0300] V. 약학 제형
- [0301] 본원에 개시된 다중특이적 결합제/융합 단백질은 가치있는 효능/안전성 프로필을 가질 수 있고, 각각의 치료가 필요한 환자에게 이점을 제공할 수 있다.
- [0302] 하나의 양상에서, 약제로서 사용하기 위한 본원에 보고된 다중특이적 결합제가 제공된다.
- [0303] 추가적 양상에서, 본 발명은 약제의 제조 또는 생산에서 다중특이적 결합제의 용도를 제공한다. 임의의 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.
- [0304] 추가적 양상에서, 본 발명은 예를 들어 본원에 요약된 치료 방법 중 하나에서 사용하기 위해 본원에 제공된 다

중특이적 결합제 중 어느 하나를 포함하는 약학 제형을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 약학 제형은 본원에 제공된 다중특이적 결합제 중 어느 하나 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 약학 제형은 본원에 제공된 다중특이적 결합제 중 어느 하나 및 하나 이상의 추가적 치료제를 포함한다.

- [0305] 본원에 보고된 하나의 양상은 본원에 보고된 다중특이적 결합제를 포함하는 약학 제형이다.
- [0306] 본원에 기재된 다중특이적 결합제의 약학 제형은, 목적하는 정도의 순도를 갖는 이러한 다중특이적 결합제를 하나 이상의 임의적 약학적으로 허용되는 담체(문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)])와 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 혼합함으로써 제조된다. 약학적으로 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 비제한적으로 하기를 포함한다: 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기 산; 산화방지제, 예컨대 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제(예컨대 옥타데실 다이메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리(비닐피롤리돈); 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 다이사카라이드 및 기타 탄수화물(글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함함); 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체(예를 들어 Zn-단백질 착체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG). 본원의 예시적인 약학적으로 허용되는 담체는 침입형 약물 분산제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rhuPH20(HYLENEX(등록상표)), 백스터 인터네셔널 인코포레이티드(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rhuPH20을 포함하는 특정 예시적인 sHASEGP 및 이의 사용 방법은 US 2005/0260186 및 US 2006/0104968에 기재되어 있다. 하나의 양상에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가적 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다.
- [0307] 예시적 동결건조된 항체 제형이 US 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제형은 US 6,171,586 및 WO 2006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제형은 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.
- [0308] 또한, 본원의 제형은 치료할 특정 적응증에 필요한 하나 초과와 활성 성분, 바람직하게 서로 악영향을 주지 않는 상보적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적을 위해 효과적인 양으로 조합으로 적합하게 존재한다.
- [0309] 생체내 투여를 위해 사용할 제형은 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 멤브레인을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.
- [0310] 본원에 보고된 또 다른 양상은 약학 제형의 제조를 위한 본원에 보고된 다중특이적 결합제의 용도이다. 본원에 보고된 추가적 양상은 본원에 보고된 다중특이적 결합제를 포함하는 약학 제형의 제조 방법이다. 또 다른 양상에서, 제형, 예를 들어 약학적 담체와 함께 제형화된 본원에 보고된 다중특이적 결합제를 함유하는 약학 제형이 제공된다.
- [0311] 안구내 적용 또는 국소 적용을 포함하나 이들로 한정되지 않는 많은 가능한 전달 방식이 사용될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 적용은 안구내 적용이고, 이는 비제한적으로 결막하 주사, 전방내 주사, 측두 윤부를 통한 전방 내로의 주사, 간질내 주사, 각막내 주사, 망막하 주사, 안구방수 주사, 테논낭하 주사 또는 지속된 전달 장치, 유리체내 주사(예를 들어 전방, 중간 또는 후방 유리체 주사)를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 적용은 국소 적용이고, 이는 비제한적으로 각막으로 투여되는 점안액을 포함한다.
- [0312] 하나의 실시양태에서, 본원에 보고된 다중특이적 결합제 또는 약학 제형은 유리체내 적용, 예를 들어 유리체내 주사를 통해 투여된다. 이는 당분야에 공지되어 있는 표준 절차에 따라 수행될 수 있다(예를 들어 문헌[Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-3276], [Russelakis-Carneiro et al., Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206], 및 [Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-185] 참조).
- [0313] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 약학 제형으로 존재하는 다중특이적 결합제의 1회 이상의 투여량, 상기 약학 제형의 유리체내 주사에 적합한 장치, 및 이러한 주사를 수행하기 위한 대상체 및 프로토콜을 상세히 기술하는 설명서를 함유하는 치료 키트가 제공된다. 이들 실시양태에서, 상기 제형은 전형적으로 유리체내 주사를 통해 치료가 필요한 대상체에게 투여된다. 이는 당분야에서 공지되어 있는 표준 절차에 따라 수행될 수 있다(예를 들어 문헌[Ritter et al., J. Clin. Invest. 116 (2006) 3266-3276], [Russelakis-Carneiro et al.,



Neuropathol. Appl. Neurobiol. 25 (1999) 196-206], 및 [Wray et al., Arch. Neurol. 33 (1976) 183-185] 참조).

- [0314] 또한, 제형은 보조제, 예컨대, 보존제, 습윤화제, 유화제 및 분산제도 함유할 수 있다. 미생물이 존재의 방지는 상기 멸균 절차, 및 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등의 포함에 의해 보장될 수 있다. 등장제, 예컨대, 당, 염화 나트륨 등을 제형 내에 포함시키는 것도 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 약학 형태의 연장된 흡수가 흡수를 지연시키는 물질, 예컨대, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 포함에 의해 달성될 수 있다.
- [0315] 선택된 투여 경로와 관계없이, 적합한 수화된 형태 및/또는 본원에 보고된 약학 조성물에서 사용될 수 있는 본원에 보고된 다중특이적 결합제는 당업자에게 공지되어 있는 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용되는 투여량 형태로 제형화된다.
- [0316] 본원에 보고된 약학 제형의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성을 나타내지 않으면서 특정 환자에 대한 목적하는 치료적 반응, 제형 및 투여 모드를 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 변경될 수 있다. 선택된 투여량 수준은, 사용되는 특정 제형의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료의 지속기간, 사용되는 특정 제형과 조합으로 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받을 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 과거 병력, 및 의학 분야에서 주지되어 있는 다른 인자를 포함하는 다양한 약동학적 인자들에 의해 좌우될 것이다.
- [0317] 제형은 제형이 주사기에 의해 전달될 수 있도록 하는 정도로 멸균성 및 유동성을 가져야 한다. 담체는 물 이외에 바람직하게는 등장성 완충된 식염수 용액이다.
- [0318] 적절한 유동성은 예를 들어 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우, 등장제, 예를 들어 당, 다 가알코올, 예컨대, 만니톨 또는 소르비톨, 및 염화 나트륨을 제형에 포함시키는 것이 바람직하다.
- [0319] 제형은 결막하 투여를 위한 활성 물질을 포함하는 안과 데포 제형을 포함할 수 있다. 안과 데포 제형은 본질적으로 순수한 활성 물질, 예를 들어 본원에 보고된 다중특이적 결합제의 미세입자를 포함한다. 본원에 보고된 다중특이적 결합제의 미세입자는 약학적으로 허용되는 생체적합성 중합체 또는 지질 캡슐화제 내에 내장될 수 있다. 상기 데포 제형은 연장된 기간에 걸쳐 모든 활성 물질들을 실질적으로 전부 방출시키도록 개조될 수 있다. 존재하는 경우 중합체 또는 지질 매트릭스는 모든 또는 실질적으로 모든 활성 물질의 방출 후 투여 부위로부터 수송되기 위해 충분히 분해되도록 개조될 수 있다. 상기 데포 제형은 약학적으로 허용되는 중합체 및 용해되거나 분산된 활성 물질을 포함하는 액체 제형일 수 있다. 주사시, 상기 중합체는 예를 들어 겔화 또는 침전에 의해 주사 부위에서 데포를 형성한다.
- [0320] 본원에 보고된 또 다른 양상은 안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 본원에 보고된 다중특이적 결합제이다.
- [0321] 본원에 보고된 또 다른 양상은 안혈관 질환의 치료에서 사용하기 위한 본원에 보고된 약학 제형이다.
- [0322] 본원에 보고된 또 다른 양상은 안혈관 질환의 치료용 약제의 제조를 위한 본원에 보고된 다중특이적 결합제의 용도이다.
- [0323] 본원에 보고된 또 다른 양상은, 안혈관 질환의 치료가 필요한 환자에게 본원에 보고된 다중특이적 결합제를 투여하는 단계를 포함하는, 안혈관 질환을 앓는 환자의 치료 방법이다.
- [0324] VI. 치료 방법
- [0325] 본원에 개시된 다중특이적 결합제/융합 단백질 중 어느 하나가 치료 방법에 사용될 수 있다.
- [0326] 특정 실시양태에서, 치료 방법에서 사용하기 위한 다중특이적 결합제가 제공된다. 하나의 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 개체에게 예를 들어 하기에 기재되는 하나 이상의 추가적 화합물의 유효량을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 실시양태 중 어느 하나에 따라 "개체"는 하나의 바람직한 실시양태에서 인간이다.
- [0327] 특정 실시양태에서, 치료 방법에서 사용하기 위한 다중특이적 결합제가 제공된다. 하나의 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 방법은 개체에게 예를 들어 하기에 기재되는 하나 이상의 추가적 화합물의 유효량을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 실시양태 중 어느 하나에 따라 "개체"는 하나의 바람직한 실시양태에서 인간이다.

[0328] 본원에 보고된 다중특이적 결합제는 적절한 의료 행위와 일치하는 방식으로 제형화되고, 투약되고 투여될 수 있다. 본원에 있어서 고려 인자는 치료할 특정 장애, 치료받을 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정 및 개업의에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 다중특이적 결합제는, 꼭 그럴 필요는 없지만, 해당 장애를 예방하거나 치료하는 데 현재 사용되고 있는 하나 이상의 제제와 함께 임의적으로 제형화된다. 이러한 다른 제제의 유효량은 제형에 존재하는 다중특이적 결합제의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기에 논의된 다른 인자에 좌우된다. 이는 일반적으로 본원에 기재된 바와 같이 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나, 경험적으로/임상적으로 적절하게 결정되는 임의의 투여량 및 임의의 경로로 사용된다.

[0329] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 본원에 보고된 다중특이적 결합제의 적절한 투여량(단독으로 또는 하나 이상의 다른 추가적 치료제와 조합으로 사용시)은 치료할 질병의 유형, 다중특이적 결합제의 유형, 질병의 심각도 및 추이, 다중특이적 결합제를 예방적 목적으로 투여하거나 치료적 목적으로 투여하는지 여부, 이전 요법, 환자의 병력 및 다중특이적 결합제에 대한 반응, 및 담당의의 재량에 좌우될 것이다. 다중특이적 결합제는 적합하게 환자에게 1회의 치료로 또는 일련의 치료에 걸쳐 투여된다. 며칠 또는 그 이상에 걸친 반복된 투여를 위해, 상태에 따라, 치료는 일반적으로 목적하는 질병 증상의 진압이 발상할 때까지 지속될 수 있다. 이러한 투여량은 간헐적으로, 예를 들어 1주마다 또는 3주마다(예를 들어 환자가 약 2 내지 약 20회의 투여량의 항체, 또는 예를 들어 6회 투여량의 항체를 제공받도록) 투여될 수 있다. 초기의보다 높은 적재 투여량, 뒤이어 하나 이상의 보다 낮은 투여량이 투여될 수 있다. 이러한 요법의 진행은 종래의 기법 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0330] VII. 제조 물품

[0331] 본원에 보고된 또 다른 양상에서, 상기에 기재된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 용기, 및 상기 용기 상의 또는 상기 용기와 결합된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 제형을 함유하고, 이는 질환의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 단독으로 또는 또 다른 제형과 조합으로 존재하고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 스타퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 제형의 하나 이상의 활성 제제는 본원에 보고된 다중특이적 결합제이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은, 제형을 선택된 질환의 치료를 위해 사용함을 나타낸다.

[0332] 또한, 제조 물품은 (a) 내부에 제형을 함유하는 제1 용기(이때, 제형은 본원에 보고된 다중특이적 결합제를 포함함); 및 (b) 내부에 제형을 함유하는 제2 용기(이때, 제형은 추가적 치료제를 포함함)를 포함할 수 있다. 본원에 보고된 본 실시양태에서 제조 물품은 제형을 특정 질환을 위해 사용할 수 있음을 나타내는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 제조 물품은 약학적으로 허용되는 완충제, 예컨대 주사용 위한 정균수(BWFI) 또는 포스페이트-완충된 염수를 포함하는 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 또는 주사를 포함하는, 상업적 관점 또는 사용자 관점으로부터 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0333] VIII. 변형

[0334] 추가적 양상에서, 상기 실시양태 중 어느 하나에 따른 다중특이적 결합제는 하기 섹션 1 내지 5에 기재된 임의의 특징을 단독으로 또는 조합으로 포함할 수 있다:

[0335] 1. 항체 친화성

[0336] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중특이적 결합제는 이의 임의의 표적에 대해 100 nM 이하(예를 들어  $10^{-7}$  M 이하, 예를 들어  $10^{-7}$  내지  $10^{-13}$  M)의 평형 해리 상수( $K_D$ )를 갖는다.

[0337] 하나의 실시양태에서, 비아코어(등록상표) 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용하여  $K_D$ 를 측정한다. 예를 들어, 약 10 반응 유닛(RU)에서 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어(등록상표)-2000 또는 비아코어(등록상표)-3000(지이 헬스케어 인코포레이티드(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재))을 사용한 분석을 수행한다. 하나의 실시양태에서, 카복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩(CM5, 지이 헬스케어 인코포레이티드)을 공급자의 설명서에 따라 N-에틸-N'-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)로 활성화시킨다. 약 10 반응 유닛(RU)의 커플링된 단백질을 달성하기 위해 5  $\mu$ l/분의 유속으로 주입하기 전에 항원을 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.8)으로 5  $\mu$ g/ml(약 0.2  $\mu$ M)까지 희석한다. 항원의 주입

후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미반응한 기를 차단한다. 동력학적 측정을 위해, 0.05% 폴리소르베이트 20(트윈(TWEEN)-20(상표)) 계면활성제를 갖는 PBS(PBST) 중의 Fab의 2배 연속 희석물(0.78 내지 500 nM)을 25°C에서 약 25  $\mu$ l/분의 유속으로 주입한다. 결합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅함으로써 단순 1-대-1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델(비아코어(등록상표) 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 결합 속도( $k_{on}$ ) 및 해리 속도( $k_{off}$ )를 계산한다. 평형 해리 상수( $K_D$ )를 비  $k_{off}/k_{on}$ 으로서 계산한다(예를 들어 문헌[Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881] 참조). 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 측정된 결합 속도가  $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 을 초과하는 경우, 분광계, 예컨대, 정지-유동 장착된 분광광도계(아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반된 큐비트를 갖춘 8000-시리즈 SLM-AMINCO(상표) 분광광도계(써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정된 증가하는 농도의 항원의 존재하에 25°C에서 PBS(pH 7.2) 중의 20 nM 항-항원 항체(Fab 형태)의 형광 방사 강도의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 소광 기법을 사용함으로써 결합 속도를 측정할 수 있다.

- [0338] 2. 키메라 결합 부위 및 인간화된 결합 부위
- [0339] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 다중특이적 결합체는 키메라 항체 또는 인간화된 항체의 항체 결합 부위를 포함한다.
- [0340] 특정 키메라 항체는 예를 들어 US 4,816,567 및 문헌[Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855]에 기재되어 있다. 하나의 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역(예를 들어 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가적 예에서, 키메라 항체는 클래스 또는 서브클래스가 모 항체의 것으로부터 변형되어 있는 "클래스 전환된" 항체이다. 키메라 항체는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0341] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화된 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화성을 유지하면서 인간에 대한 면역원성을 감소시키도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화된 항체는 HVR, 예를 들어 CDR(또는 이의 부분)이 비-인간 항체로부터 유래되고 FR(또는 이의 부분)이 인간 항체 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 또한, 인간화된 항체는 임의적으로 인간 불변 영역의 적어도 부분을 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화된 항체의 일부 FR 잔기는 예를 들어 항체 특이성 또는 친화성을 회복시키거나 개선하기 위해 비-인간 항체(예를 들어 HVR 잔기의 기원이 되는 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.
- [0342] 인간화된 항체 및 이의 제조 방법은 예를 들어 문헌[Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633]에서 검토되어 있고, 예를 들어 하기 문헌에 추가로 기재되어 있다: 문헌[Riechmann, I., et al., Nature 332 (1988) 323-329]; 문헌[Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033]; US 5,821,337; US 7,527,791; US 6,982,321; US 7,087,409; 문헌[Kashmiri, S.V., et al., Methods 36 (2005) 25-34](특이성 결정 영역(SDR) 이식이 기재됨); 문헌[Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498]("재표면화"가 기재됨); 문헌[Dall'Acqua, W.F., et al., Methods 36 (2005) 43-60]("FR 셔플링"이 기재됨); 문헌[Osborn, J., et al., Methods 36 (2005) 61-68]; 및 문헌[Klimka, A., et al., Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260](FR 셔플링에 대한 "유도된 선택" 방법이 기재됨).
- [0343] 인간화를 위해 사용될 수 있는 인간 골격 영역은 비제한적으로 "베스트-피트(best-fit)" 방법을 사용함으로써 선택된 골격 영역(예를 들어 문헌[Sims, M.J., et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 골격 영역(예를 들어 문헌[Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289] 및 [Presta, L.G., et al., J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632] 참조); 인간 성숙 (체세포 돌연변이된) 골격 영역 또는 인간 생식세포주 골격 영역(예를 들어 문헌[Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633] 참조); 및 스크리닝 FR 라이브러리로부터 유래된 골격 영역(예를 들어 문헌[Baca, M. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684] 및 문헌[Rosok, M.J. et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618]) 참조)을 포함한다.
- [0344] 3. 인간 항체 결합 부위
- [0345] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중특이적 결합체는 인간 항체의 항체 결합 부위를 포함한다.
- [0346] 인간 항체는 당분야에 공지된 다양한 기법을 사용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌[van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374] 및 [Lonberg, N., Curr. Opin. Immunol. 20 (2008) 450-459]에 기재되어 있다.

- [0347] 인간 항체는 항원 시험에 대한 반응으로 온전한 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 온전한 항체를 생산하도록 변형된 유전자 이식된 동물에게 면역원을 투여함으로써 생산될 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 인간 면역글로불린 유전자자리의 전부 또는 일부를 함유하고, 이는 내인성 면역글로불린 유전자자리로 대체되거나, 염색체의 존재하거나 동물의 염색체 내로 무작위로 통합된다. 이러한 유전자 이식된 마우스에서, 내인성 면역글로불린 유전자자리는 일반적으로 불활성화된다. 유전자 이식된 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법에 대한 검토를 위해, 문헌[Lonberg, N., Nat. Biotech. 23 (2005) 1117-1125]을 참조한다. 또한, 예를 들어 US 6,075,181 및 US 6,150,584(XENOMOUSE(상표) 기법을 기재함); US 5,770,429(HuMab(등록상표) 기법을 기재함); US 7,041,870(K-M MOUSE(등록상표) 기법을 기재함); 및 US 2007/0061900(VelociMouse(등록상표) 기법을 기재함)을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생산된 온전한 항체의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합함으로써 추가로 변형될 수 있다.
- [0348] 또한, 인간 항체는 하이브리도마-기반 방법에 의해 생산될 수 있다. 인간 단클론 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종 세포주가 기재되었다(예를 들어 문헌[Kozbor, D., J. Immunol. 133 (1984) 3001-3005]; [Brodeur, B.R., et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63]; 및 [Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95] 참조). 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기법을 통해 생산된 인간 항체는 문헌[Li, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562]에 기재되어 있다. 추가적 방법은 예를 들어 US 7,189,826(하이브리도마 세포주로부터 단클론 인간 IgM 항체의 생산을 기재함) 및 문헌[Ni, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268](인간-인간 하이브리도마를 기재함)에 기재된 것을 포함한다. 또한, 인간 하이브리도마 기법(트라이오마(Trioma) 기법)이 문헌[Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Histology and Histopathology 20 (2005) 927-937] 및 [Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191]에 기재되어 있다.
- [0349] 또한, 인간 항체를, 인간-유래된 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리함으로써 생산할 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 목적하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하는 기법은 하기에 기재된다.
- [0350] 4. 라이브러리-유래된 항체 결합 부위
- [0351] 본원에 보고된 다중특이적 결합체는, 목적하는 활성을 갖는 항체에 대한 조합 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리된 항체의 항체 결합 부위를 포함할 수 있다.
- [0352] 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생산하고 목적하는 결합 특징을 갖는 항체에 대한 상기 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 당분야에 공지되어 있다. 이러한 방법이 예를 들어 문헌[Hoogenboom, H.R. et al., Methods in Molecular Biology 178 (2001) 1-37]에 검토되어 있고, 예를 들어 문헌[McCafferty, J. et al., Nature 348 (1990) 552-554]; [Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628]; [Marks, J.D. et al., J. Mol. Biol. 222 (1992) 581-597]; [Marks, J.D. and Bradbury, A., Methods in Molecular Biology 248 (2003) 161-175]; [Sidhu, S.S. et al., J. Mol. Biol. 338 (2004) 299-310]; [Lee, C.V. et al., J. Mol. Biol. 340 (2004) 1073-1093]; [Fellouse, F.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 12467-12472]; 및 [Lee, C.V. et al., J. Immunol. Methods 284 (2004) 119-132]에 추가로 기재되어 있다.
- [0353] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 폴리머라제 쉘 반응(PCR)에 의해 개별적으로 클로닝되고 파지 라이브러리에 무작위로 재조합된 후에, 이는 항원-결합 파지에 대해 스크리닝되고, 이는 문헌 [Winter, G., et al., Ann. Rev. Immunol. 12 (1994) 433-455]에 기재되어 있다. 파지는 전형적으로 단일 쉘 Fv(scFv) 단편 또는 Fab 단편으로서 항체 단편을 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 고친화성 항체를 면역원에 제공한다. 대안적으로, 나이브(naive) 레퍼토리는, (예를 들어 인간으로부터) 클로닝되어 문헌[Griffiths, A.D., et al., EMBO J. 12 (1993) 725-734]에 기재된 바와 같이 임의의 면역화 없이 항체의 단일 공급원을 광범위한 비-자가 및 자가 항원에게 제공한다. 최종적으로, 나이브 라이브러리는 또한 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V-유전자 분절을 클로닝하고, 매우 가변적인 CDR3 영역을 암호화하고 생체의 재배열을 달성하는 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써 합성적으로 생산될 수 있고, 이는 문헌[Hoogenboom, H.R. and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388]에 기재되어 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허는 예를 들어 하기를 포함한다: US 5,750,373, US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936 및 US 2009/0002360.

[0354] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주된다.

[0355] 5. 다중특이적 결합제 변이체

[0356] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 다중특이적 결합제의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 다중특이적 결합제의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 성질을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 다중특이적 결합제의 아미노산 서열 변이체는 적절한 변형을, 다중특이적 결합제를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 내로 도입하거나 펩티드를 합성함으로써 제조될 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 다중특이적 결합제의 아미노산 서열로부터의 잔기의 결실, 이러한 서열 내로의 잔기의 삽입 및/또는 이러한 서열 내의 잔기의 치환을 포함한다. 최종 구축물이 목적하는 특성, 예를 들어 항원 결합을 보유하는 한, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합으로 최종 구축물에 도달할 수 있다.

[0357] a) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0358] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 다중특이적 결합제 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이 유발을 위한 관심있는 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"이라는 표제하에 하기 표에 제시되어 있다. 보다 더 실질적인 변형은 "예시적인 치환"이라는 표제하에 하기 표에 제공되어 있고 아미노산 측쇄 클래스와 관련하여 하기에 추가로 기재되어 있다. 아미노산 치환은 관심있는 다중특이적 결합제 내로 도입될 수 있고, 생성물은 원하는 활성, 예를 들어 보유된/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

**표 1**

[0359]

원래 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0360] 아미노산은 공통 측쇄 성질에 따라 분류될 수 있다:

[0361] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0362] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0363] (3) 산성: Asp, Glu;

[0364] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

- [0365] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;
- [0366] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0367] 비-보존적 치환은 이 클래스 중 하나의 구성원을 또 다른 클래스의 구성원으로 교체하는 것을 수반할 것이다.
- [0368] 치환 변이체의 하나의 유형은 모 다중특이적 결합체(예를 들어 인간화된 항체 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기의 치환을 포함한다. 일반적으로, 추가적 연구를 위해 선택된 생성된 변이체는 모 항체 다중특이적 결합체에 비해 일부 생물학적 성질의 변형(예를 들어 개선)(예를 들어 증가된 친화성, 감소된 면역원성)을 가질 것이고/이거나, 모 항체의 실질적으로 보유된 특정 생물학적 성질을 가질 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 과지 디스플레이-기초 친화성 성숙 기법, 예컨대 본원에 기재된 기법을 사용함으로써 편리하게 생산될 수 있는 친화성 다중특이적 결합체이다. 요약하건대, 하나 이상의 HVR 잔기가 성숙되고, 변이체 다중특이적 결합체가 과지 상에서 디스플레이되고 특정 생물학적 활성(예를 들어 결합 친화성)에 대해 스크리닝된다.
- [0369] 변경(예를 들어 치환)은 예를 들어 다중특이적 결합체 친화성을 개선하기 위해 HVR에서 만들어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟(hotspot)", 즉 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이되는 코돈에 의해 암호화된 잔기(예를 들어 문헌[Chowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196] 참조), 및/또는 항원과 접촉하는 잔기에서 만들어질 수 있고, 이때 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화성에 대해 시험된다. 이차 라이브러리를 구축하고 이 라이브러리로부터 재선택함에 의한 친화성 성숙은 예를 들어 문헌[Hoogenboom, H.R. et al. in Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37]에 기재되어 있다. 친화성 성숙의 일부 실시양태에서, 다양성은 다양한 방법(예를 들어 오류 유발 PCR, 쇠 서플링 또는 올리고뉴클레오티드-지향된 돌연변이 유발) 중 임의의 방법에 의해 성숙을 위해 선택된 가변 유전자 내로 도입된다. 그 다음, 이차 라이브러리가 생산된다. 그 다음, 상기 라이브러리를 스크리닝하여 목적하는 친화성을 갖는 임의의 다중특이적 결합체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 HVR-지향된 방법을 포함하고, 이때 여러 HVR 잔기(예를 들어 한번에 4개 내지 6개의 잔기)가 무작위화된다. 예를 들어, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발 또는 모델링을 사용하여 항원 결합에 관여하는 HVR 잔기를 구체적으로 확인할 수 있다. CDR-H3 및 CDR-L3이 특히 자주 표적화된다.
- [0370] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 HVR 내에서 치환, 삽입 또는 결실이 일어날 수 있되, 이러한 변경은 항원에 결합하는 다중특이적 결합체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않아야 한다. 예를 들어, 결합 친화성을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어 본원에서 제공된 보존적 치환)이 HVR에서 만들어질 수 있다. 이러한 변경은 예를 들어 HVR 내의 항원 접촉 잔기의 외부에 존재할 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 1개, 2개 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.
- [0371] 돌연변이 유발을 위해 표적화될 수 있는 다중특이적 결합체의 잔기 또는 영역을 확인하는 유용한 방법은 문헌[Cunningham, B.C. and Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085]에 기재된 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"로서 지칭된다. 이 방법에서, 다중특이적 결합체와 항원의 상호작용이 영향을 받는지를 확인하기 위해 잔기 또는 표적 잔기의 군(예를 들어 대전된 잔기, 예컨대, arg, asp, his, lys 및 glu)을 확인하고 중성 또는 음으로 대전된 아미노산(예를 들어 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 교체한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치에서 추가적 치환을 도입할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 다중특이적 결합체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-다중특이적 결합체 복합체의 결정 구조를 사용할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기를 치환 후보로서 표적화할 수 있거나 제거할 수 있다. 변이체가 원하는 성질을 함유하는지를 확인하기 위해 변이체를 스크리닝할 수 있다.
- [0372] 아미노산 서열 삽입은 1개 잔기의 길이 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드 길이를 갖는 아미노-말단 및/또는 카복시-말단 융합뿐만 아니라, 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입도 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 다중특이적 결합체를 포함한다. 다중특이적 결합체 분자의 다른 삽입 변이체는 다중특이적 결합체의 N-말단 또는 C-말단에서 효소(예를 들어 ADEPT) 또는 폴리펩티드와 융합된 융합체를 포함한다.
- [0373] 하기 실시예, 서열 및 도면은 본 발명의 이해를 보조하기 위해 제공되고, 이의 진정한 범위는 첨부된 특허청구 범위에 제시된다. 본 발명의 취지를 벗어나지 않는 범위 내에서 제시된 절차의 변형이 있을 수 있음이 이해된다.

**도면의 간단한 설명**

[0374] 도 1은 눈의 상이한 구획에서 상이한 구축물의 반감기를 보여준다: 1: FAB-PEG, 2: FAB-HBD, 3: FAB, 4: FAB-COLL-I, 5: FAB-COLL-II, 6: FAB-COLL-III; 상부 막대: 유리액, 가운데 막대: 망막, 하부 막대: 맥락막.

도 2는 상이한 구축물에 대한 눈의 상이한 구획(조직)의 노출을 보여준다: 1: FAB-COLL-I, 2: FAB-COLL-II, 3: FAB-COLL-III, 4: FAB, 5: FAB-HBD, 6: FAB-PEG; 좌측 막대: 유리액, 가운데 막대: 망막, 우측 막대: 맥락막.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0375] **재료 및 방법**

[0376] 재조합 DNA 기법

[0377] 문헌[Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, (1989)]에 기재된 바와 같이 표준 방법을 사용하여 DNA를 조작하였다. 분자생물학 시약을 제조자의 설명서에 따라 사용하였다.

[0378] 유전자 합성

[0379] 원하는 유전자 분절을, 진아트(Geneart, 독일 레겐스부르크 소재)에서 주어진 요건에 따라 주문하였다.

[0380] DNA 서열 결정

[0381] 메디게노믹스 게엠베하(MediGenomix GmbH, 독일 마르틴스리드 소재) 및 세퀴서브 게엠베하(SequiServe GmbH, 독일 바터스테인 소재)에서 수행된 이중 가닥 서열결정으로 DNA 서열을 결정하였다.

[0382] DNA 및 단백질 서열 분석 및 서열 데이터 관리

[0383] GCG(제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group, 미국 위스콘신주 매디슨 소재))의 소프트웨어 팩키지 버전 10.2 및 인포맥스(Informax)의 벡터 NTI 어드밴스 스위트(Advance suite) 버전 8.0을 서열 생성, 맵핑, 분석, 해독 및 예증을 위해 사용하였다.

[0384] 발현 벡터

[0385] 기재된 항체의 발현을 위해, CMV-인트론 A 프로모터를 갖거나 갖지 않는 cDNA 구성 또는 CMV 프로모터를 갖는 계놈 구성에 기초한 (예를 들어 HEK293-F 세포에서의) 일시적 발현용 발현 플라스미드를 사용하였다.

[0386] 항체 유전자의 전사 유닛은 하기 요소들로 구성되었다:

[0387] - 5' 말단에서 독특한 제한 부위,

[0388] - 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 즉시 초기 인핸서 및 프로모터,

[0389] - cDNA 구성의 경우 인트론 A 서열,

[0390] - 인간 면역글로불린 유전자의 5'-비번역 영역,

[0391] - 면역글로불린 중쇄 신호 서열을 암호화하는 핵산,

[0392] - 면역글로불린 엑손-인트론 구성을 cDNA 또는 계놈 조직화로서 갖는 인간 항체 쇠(야생형 또는 도메인 교환을 가짐)를 암호화하는 핵산,

[0393] - 폴리아데닐화 신호 서열을 갖는 3'-비번역 영역, 및

[0394] - 3' 말단에서의 독특한 제한 부위.

[0395] 항체 발현 카세트 이외에 플라스미드는 하기를 함유하였다:

[0396] - 에스케리키아 콜라이에서 상기 플라스미드의 복제를 가능하게 하는 복제기점,

[0397] - 에스케리키아 콜라이에서 앰피실린 내성을 부여하는 β-락타마제 유전자, 및

[0398] - 진핵세포에서 선별 마커로서 머스 머스쿨러스(*Mus musculus*)로부터의 다이하이드로폴레이트 리덕타제 유전자.

[0399] 항체 쇠를 암호화하는 핵산을 PCR 및/또는 유전자 합성에 의해 생산하고, 예를 들어 각각의 벡터 내의 독특한 제한 부위를 사용하여 일치하는 핵산 분절에 따른 연결에 의해 공지된 재조합 방법 및 기법으로 조립하였다. 서브클로닝된 핵산 서열을 DNA 서열 결정으로 검증하였다. 일시적 형질감염을 위해 보다 많은 양의 플라스미드

를 형질전환된 에스케리키아 콜라이 배양물로부터의 플라스미드 생산에 의해 생산하였다(뉴클레오본드 에이엑스(Nucleobond AX), 마슈레이-나겔(Macherey-Nagel)).

- [0400] 세포 배양 기법
- [0401] 표준 세포 배양 기법을 문헌[Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc]에 기재된 바와 같이 사용하였다.
- [0402] 하기에 기재된 바와 같이 현탁액에서 성장하는 HEK293-F 세포에서 각각의 발현 플라스미드를 일시적으로 공형질 감염(co-transfection)시켜 이중특이적 항체를 발현하였다.
- [0403] **실시예 1: 발현 및 정제**
- [0404] HEK293-F 시스템에서의 일시적 형질감염
- [0405] HEK293-F 시스템(인비트로젠(Invitrogen))을 제조자의 설명서에 따라 사용하여 각각의 플라스미드를 사용한 일시적 형질감염으로 융합 구축물을 생산하였다. 요약하건대, 진탕 플라스크 또는 교반된 발효기 내의 무혈청 프리스타일(FreeStyle, 상표) 293 발현 배지(인비트로젠)에서 현탁액에서 성장하는 HEK293-F 세포(인비트로젠)를 각각의 발현 플라스미드 및 293펙틴(293fectin, 상표) 또는 펙틴(인비트로젠)의 혼합물로 형질감염시켰다. 2 l 진탕 플라스크(코닝(Corning))에 대해, HEK293-F 세포를 600 ml 중의  $1 \times 10^6$  세포/ml의 밀도로 시딩하고 120 rpm 및 8% CO<sub>2</sub>에서 항온처리하였다. 다음 날, 세포를 약  $1.5 \times 10^6$  세포/ml의 세포 밀도에서 하기 A와 B의 혼합물 약 42 ml로 형질감염시켰다: A) 등몰비로 각각 중쇄 또는 변경된 중쇄 및 상응하는 경쇄를 암호화하는 600 µg의 총 플라스미드 DNA(1 µg/ml)를 갖는 20 ml Opti-MEM(인비트로젠), 및 B) 20 ml Opti-MEM + 1.2 ml 293펙틴 또는 펙틴(2 µl/ml). 글루코스 소비에 따라 글루코스 용액을 발효 과정 동안 첨가하였다. 분비된 항체를 함유하는 상청액을 5 내지 10일 후에 채취하고, 항체를 상청액으로부터 직접적으로 정제하거나, 상청액을 동결하고 저장하였다.
- [0406] 정제
- [0407] 폴리펩티드-함유 배양 상청액을 여과하고 2개의 크로마토그래피 단계에 의해 정제하였다. 항체를, PBS(1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)(pH 7.4)와 평형된 하이트랩(HiTrap) 카파셀렉트(지이 헬쓰케어)를 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 포착하였다. 미결합된 단백질을 평형 완충제에 의해 세척함으로써 제거하고, 융합 폴리펩티드를 100 mM 시트레이트 완충제(pH 2.9)에 의해 회수하고, 용리 직후에 1 M 트리스-염기(pH 9.0)에 의해 pH 6.0으로 중화시켰다. 하이로드(HiLoad) 26/60 슈퍼덱스(Superdex) 75(상표)(지이 헬쓰케어) 상에서의 크기 배제 크로마토그래피를 제2 정제 단계로서 사용하였다. 크기 배제 크로마토그래피를 20 mM 히스티딘 완충제(0.14 M NaCl, pH 6.0)에서 수행하였다. 폴리펩티드 함유 용액을 바이오맥스(Biomax)-SK 멤브레인을 갖춘 울트라 프리-CL 원심분리기 유닛(밀리포어(Millipore, 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재))에 의해 농축하고 -80°C에서 저장하였다.
- [0408] 폴리펩티드의 단백질 농도를, 아미노산 서열을 기반으로 계산한 몰 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서의 광학 밀도를 측정함으로써 결정하였다.
- [0409] 폴리펩티드 분자의 순도 및 온전성을 단백질 발현 칩 및 HT 단백질 발현 시약 키트를 갖춘 랩칩(LabChip) GX II(퍼킨엘머(PerkinElmer))를 사용하여 CE-SDS에 의해 분석하였다.
- [0410] 응집체 함량을 러닝 완충제로서 200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM KCl(pH 7.0)을 사용하는 바이오수트(Biosuite) 고해상도 SEC, 250 Å, 5 µm 분석적 크기 배제 컬럼(워터스 게엠베하(Waters GmbH))를 사용하는 고성능 SEC에 의해 결정하였다.
- [0411] 환원된 폴리펩티드의 아미노산 주쇄의 온전성을 뉴라미니다제, O-글리카나제 및 펩티드-N-글리코시다제 F(로슈어플라이드 사이언스(Roche Applied Science))에 의한 효소적 처리에 의해 N-글리칸의 제거 후에 나노 전자분무 QTOF 질량분무법에 의해 검증하였다.
- [0412] **실시예 2: 인간 및 돼지 콜라겐 II에 대한 결합**
- [0413] 인간 콜라겐 유형 II(밀리포어 CC052) 및 돼지 콜라겐 유형 II(유에스바이올로지컬(USBiological) C7510-31)에



대한 항-콜라겐 항체의 결합 동력학을 비아코어 T200 기기(지이 헬스케어)를 사용하는 표면 플라즈몬 공명에 의해 조사하였다. 모든 실험을 25°C에서 러닝 및 희석 완충제로서 HBS-P(10 mM His, 140 mM NaCl, 0.05% 트윈 20 pH 7.4)를 사용하여 수행하였다. 콜라겐 유형 II를 표준 아민 커플링 화학을 사용하여 시리즈 S CM5 센서 칩(지이 헬스케어) 상에 고정시켰다. 항-콜라겐 항체를 180초 동안 1.23 내지 900 nM의 농도로(1:3 희석 시리즈) 표면(결합 상) 상에 주사하였다. 해리 상을 600초 동안 러닝 완충제로 세척함으로써 모니터링하였다. 표면을 60초 동안 0.85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 주사함으로써 재생성하였다. 벌크 굴절률 차이를 모크(mock) 표면으로부터 수득한 반응을 감함으로써 보정하였다. 블랭크 주사를 감하였다(이중 표준화). 유도된 곡선을 비아이벨류에이션(BIAevaluation) 소프트웨어를 사용하여 1:1 랭뮤어 결합 모델에 정합시켰다.

**[0414] 실시예 3: 미니돼지 약동학 연구**

[0415] 암컷 미니돼지(각각 7 내지 8 kg)를 IVT 주사에 의해 1.25 nmol의 각각의 약물을 투여하였다. 각각의 분자에 대한 눈에서의 목적되는 초기 농도는 500 nM이었다. 적용 후에 종결 시점 168, 336 및 672시간에서 유리액, 망막 및 맥락막 샘플을 수집하였다.

**[0416] 실시예 4: 약동학 파라미터 결정**

[0417] 미니돼지 혈청, 안방수, 유리액 및 안구 조직(망막, 맥락막, 공막, 홍채, 수정체, 모양체)을 ELECSYS 기기(로슈 디아그노스틱스 게엠베하(Roche Diagnostics GmbH))를 사용하여 ECLIA 방법으로 분석하였다.

[0418] 요약하건대, 시험 샘플(교정, 품질 제어 또는 연구 샘플), 제1 검출 항체 mAb<H-Fab(카파)>M-1.7.10-IgG-Bi, 제2 검출 항체 mAb<H-Fab(CH1)>M-1.19.31-IgG-Ru, 및 SA-비드를 검출 용기에 단계별로 첨가하고, 각각의 단계에서 9분 동안 항온처리하였다. 최종적으로, SA-비드-결합된 복합체를, 반복적으로 SA-비드의 수를 세어 세포를 측정함으로써 검출하였다. SA-비드의 수는 시험 샘플의 피분석물 농도에 비례한다.

[0419] Bi=비오틴, Ru=루테튬 라벨, SA=스트렙타비딘

[0420] 분석 전에, 유리액 및 안구 조직 샘플을 마가나 라이저 호모제니세이터(Magana Lyser Homogenisator, 로슈 디아그노스틱스 게엠베하)를 사용하여 프로제아제 억제제를 함유하는 조직 추출 완충제(10 mM 트리스, 137 mM NaCl, 1% 트리톤, 10% 글리세린)에 기계적으로 용해시켰다.

[0421] 3개의 콜라겐 결합제 접합물 FAB-COLL-I, -II, 및 -III에 대한 분석 측정 범위는 4.92 내지 3000 ng/mL였다(분석 농도).

[0422] 혈청 샘플을 유효한 결과를 수득하기 위해 1:10 내지 1:20로 희석하였다. 표준 곡선, 품질 제어 및 샘플 희석을 미니돼지 혈청을 함유하는 분석 완충제에서 수행하여 10% 매트릭스 농도를 야기하였다. 49.2 ng/mL 미만의 실험 혈청 샘플을 "BLQ"로 주석을 달았다.

[0423] 안방수, 유리액 및 안구 조직 샘플을, 희석되지 않거나 1:50 이하로 희석된 상태로 측정하여 유효한 결과를 수득하였다. 표준 곡선, 품질 제어 및 샘플 희석을 매트릭스를 미함유하는 분석 완충제에서 수행하였다. 4.92 ng/mL 미만의 실험 안방수, 유리액 및 안구 조직 샘플을 "BLQ"로 주석을 달았다.

**[0424] 실시예 5: 확산 파라미터 결정**

[0425] 시험 용액(미니돼지의 유리액)을 -80°C에서 저장하였다.

[0426] Dig-3-cme-eda-Cy5를 DMF에 용해시키고 30% DMF/희석 완충제에서 1 mM Dig-Cy5로 조정하였다. 작업 스톱을 PBS/0.2%BSA/1.5% DMF 중의 50 μM Dig-Cy5의 용액으로서 제조하였다. PBS를 LONZA(#17-516F)(pH 7.3 내지 pH 7.5)에서 구매하고 0.2% BSA로 보충하였다(분획 V). 측정을 384-웰 유리 바닥 분석 플레이트(MMI, #60200)에서 수행하였다.

[0427] 하나의 샘플을 얼음 위에서 해동하였다. 유체는 매우 점성질이었고 투명하였다. 샘플을 잘린 1000 μL 팁에 의해 주의하여 10회 피펫질하였다. 이는 부드럽게 발포하였다. 100 μl의 분액(잘린 200 μl 팁을 사용함)을 드라이아이스 상에서 냉동하고 -80°C에서 저장하였다.

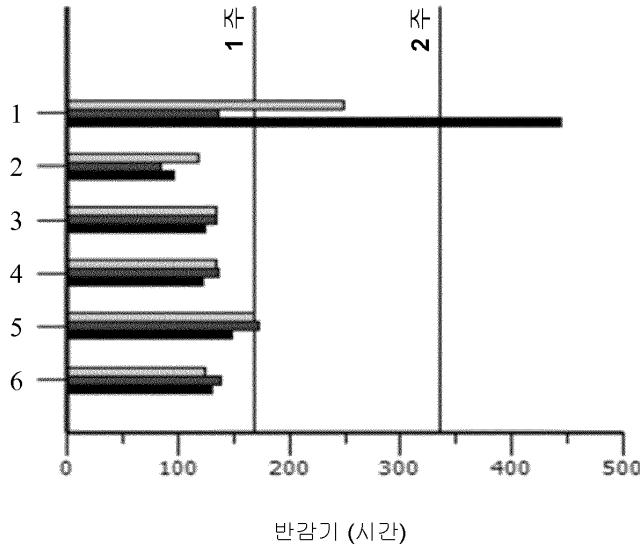
[0428] 다른 샘플을 해동하고 비슷하게 액화시켰다. 벌크 양의 모든 세계의 샘플을 모으고, 분액하고 -80°C에서 샘플 명칭 "ul(a11)"과 함께 저장하였다. 일부 원래 분액을 기준 샘플로 저장하였다.

[0429] FCS 측정을 C-아포크로맷(Apochromat) 40x N.A. 1.2 수침 렌즈(칼 자이즈(Carl Zeiss), 제나(Jena), 독일)를 갖춘 액시오버트(Axiovert) 100M에 연결된 ConfoCor2 FCS 유닛에 의해 수행하였다. 이러한 기기에서, Cy5를

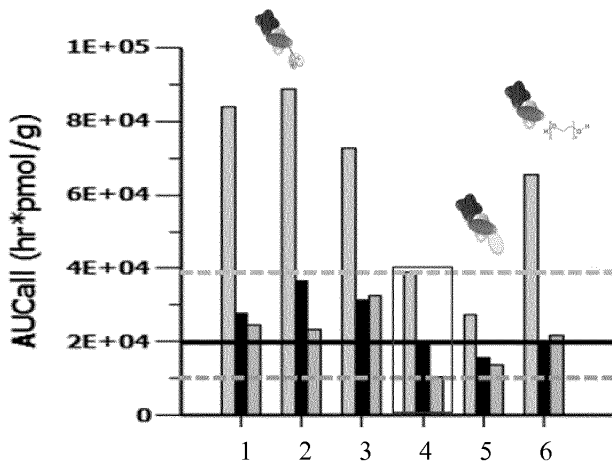
633 헬륨-네온 레이저에 의해 여기시켰다. Cy5에 의해 방출된 적색 형광을 LP 650 롱 패스 필터에 의해 검출하였다. 측정을 전형적으로 10초씩 10회의 취득 세팅에 의해 수행하였다. 형광 변동을 적절한 정합 형식주의에 의해 자기상관시켰다. 데이터 분석으로 균질 용액에서 형광 자분의 휘도, 거동 및 확산 시간을 결정하였다.

**도면**

**도면1**



**도면2**



**서열 목록**

SEQUENCE LISTING

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Fusion proteins for ophthalmology with increased eye retention

<130> P33669-WO (ASK)

<140> PCT/EP2017/063506

<141> 2017-06-02  
 <150> EP16173166.6  
 <151> 2016-06-06  
 <160> 24  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> anti-digoxigenin Fab HC  
 <400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
                   20                    25                    30

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

Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                    55                    60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95

Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
                   100                    105                    110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
                   115                    120                    125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
                   130                    135                    140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 145                    150                    155                    160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His



130                      135                      140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145                      150                      155                      160  
  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
                                  165                      170                      175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
                                  180                      185                      190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
                                  195                      200                      205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                                  210  
 <210> 3  
 <211> 293  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> anti-digoxigenin Fab + HBD HC  
 <400> 3  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
                                  20                      25                      30  
 Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                                  35                      40                      45  
 Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
  
                                  50                      55                      60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                  85                      90                      95  
 Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
                                  100                      105                      110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 115 120 125  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
 130 135 140  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 165 170 175  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 180 185 190  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 195 200 205  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 210 215 220  
 Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Arg  
 225 230 235 240  
 Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe  
 245 250 255  
 Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser  
 260 265 270  
 Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys  
 275 280 285  
 Asp Lys Pro Arg Arg  
 290  
 <210> 4  
 <211> 488  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> anti-digoxigenin Fab + anti-collagen II scFV I HC  
 <400>  
 4  
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
                           20                    25                    30  
 Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                           35                    40                    45  
 Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                           50                    55                    60  
  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65                                    70                                    75                                    80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
     85                                    90                                    95  
 Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
     100                                    105                                    110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
     115                                    120                                    125  
  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
     130                                    135                                    140  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 145                                    150                                    155                                    160  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
     165                                    170                                    175  
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
     180                                    185                                    190  
  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
     195                                    200                                    205  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
     210                                    215                                    220  
 Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile  
 225                                    230                                    235                                    240  
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg  
     245                                    250                                    255

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asp Phe Leu Ala  
 260 265 270

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly  
 275 280 285

Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 290 295 300

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp  
 305 310 315 320

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Ser Ala Pro Leu Thr Phe  
 325 330 335

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 340 345 350

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln  
 355 360 365

Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys  
 370 375 380

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser  
 385 390 395 400

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile  
 405 410 415

Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg  
 420 425 430

Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu  
 435 440 445

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp  
 450 455 460

Pro Asn Gly Asn Ile Val Leu Ser Glu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 465 470 475 480

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 485

<210> 5

<211> 484



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-digoxigenin Fab + anti-collagen II scFV II HC

<400> 5

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

1                    5                    10                    15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

                  20                    25                    30  
Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

                  50                    55                    60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65                    70                    75                    80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

                  85                    90                    95  
Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met

                  100                    105                    110  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

                  115                    120                    125  
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

                  130                    135                    140  
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

                  145                    150                    155                    160  
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

                  165                    170                    175  
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser

                  180                    185                    190  
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

                  195                    200                    205  
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu



Ile Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 465                      470                      475                      480  
 Thr Val Ser Ser

<210> 6

<211> 482

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-digoxigenin Fab + anti-collagen II scFV III HC

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

                    20                      25                      30  
 Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                     35                      40                      45

Ser Ser Ile Asn Ile Gly Ala Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                     50                      55                      60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

                    85                      90                      95  
 Ala Arg Pro Gly Ser Pro Tyr Glu Tyr Asp Lys Ala Tyr Tyr Ser Met  
                     100                      105                      110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
                     115                      120                      125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser  
                     130                      135                      140  
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu

145                      150                      155                      160  
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
                     165                      170                      175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 180 185 190  
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 195 200 205  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu  
 210 215 220  
 Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile  
 225 230 235 240  
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg  
 245 250 255  
 Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asp Trp Leu Ala  
 260 265 270  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp  
 275 280 285  
 Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 290 295 300  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp  
 305 310 315 320  
 Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Gly Trp Pro Ile Thr Phe  
 325 330 335  
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 340 345 350  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln  
 355 360 365  
 Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys  
 370 375 380  
 Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser  
 385 390 395 400  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile  
 405 410 415  
 Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg



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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-collagen II scFV I VL

<400> 10

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

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







Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-collagen II scFV II VL

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Trp

                  20                    25                    30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

                  35                    40                    45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

                  50                    55                    60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65                    70                    75                    80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Thr Ala Pro Ile

                  85                    90                    95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

                  100                    105

<210> 14

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-collagen II scFV II scFv

<400> 14

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Trp

                  20                    25                    30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asp Thr Ala Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln

115 120 125

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

130 135 140

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

145 150 155 160

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

165 170 175

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

180 185 190

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met

195 200 205

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

210 215 220

Arg Asn Ile Val Gly Asp Tyr Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 15

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-collagen II scFV III VH

<400> 15

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

1                    5                    10                    15

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly

                  50                    55                    60

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

65                    70                    75                    80

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

                  85                    90                    95

His Leu Tyr Tyr Met Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

                  100                    105                    110

Val Ser Ser

                  115

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-collagen II scFV III VL

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1                    5                    10                    15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ala Asp Trp

                  20                    25                    30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

                  35                    40                    45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

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

<210> 17

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-collagen II scFV III scFv

<400> 17

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 115 120 125  
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser  
 130 135 140  
 Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

145                    150                    155                    160  
 Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
                          165                    170                    175

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

Thr Val Ser Ser

<210> 18  
 <211> 1418  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18

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

Gln Met Ala Gly Gly Phe Asp Glu Lys Ala Gly Gly Ala Gln Leu Gly  
 115 120 125  
 Val Met Gln Gly Pro Met Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly  
 130 135 140  
 Pro Ala Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln Gly Asn Pro Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Pro Gly Glu Pro Gly Val Ser Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro  
 165 170 175  
 Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly Asp Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly  
 180 185 190  
 Lys Ala Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Phe  
 195 200 205  
 Pro Gly Thr Pro Gly Leu Pro Gly Val Lys Gly His Arg Gly Tyr Pro  
 210 215 220  
 Gly Leu Asp Gly Ala Lys Gly Glu Ala Gly Ala Pro Gly Val Lys Gly  
 225 230 235 240  
 Glu Ser Gly Ser Pro Gly Glu Asn Gly Ser Pro Gly Pro Met Gly Pro  
 245 250 255  
 Arg Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg Thr Gly Pro Ala Gly Ala Ala  
 260 265 270  
 Gly Ala Arg Gly Asn Asp Gly Gln Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly  
 275 280 285  
 Pro Val Gly Pro Ala Gly Gly Pro Gly Phe Pro Gly Ala Pro Gly Ala  
 290 295 300  
 Lys Gly Glu Ala Gly Pro Thr Gly Ala Arg Gly Pro Glu Gly Ala Gln  
 305 310 315 320  
 Gly Pro Arg Gly Glu Pro Gly Thr Pro Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly  
 325 330 335  
 Ala Ser Gly Asn Pro Gly Thr Asp Gly Ile Pro Gly Ala Lys Gly Ser  
 340 345 350  
 Ala Gly Ala Pro Gly Ile Ala Gly Ala Pro Gly Phe Pro Gly Pro Arg







850                      855                      860  
 Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Glu Pro Gly Leu Gln Gly Pro  
 865                      870                      875                      880  
 Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser  
  
                          885                      890                      895  
 Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Arg Gly  
                          900                      905                      910  
 Ile Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu  
                          915                      920                      925  
 Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly Ala Pro Gly Ala Ser  
                          930                      935                      940  
 Gly Asp Arg Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Pro Gly Leu Thr Gly  
  
 945                      950                      955                      960  
 Pro Ala Gly Glu Pro Gly Arg Glu Gly Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro  
                          965                      970                      975  
 Pro Gly Arg Asp Gly Ala Ala Gly Val Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr  
                          980                      985                      990  
 Gly Ala Val Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly  
                          995                      1000                      1005  
 Pro Ala Gly Pro Thr Gly Lys Gln Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly  
  
 1010                      1015                      1020  
 Ala Gln Gly Pro Met Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly  
                          1025                      1030                      1035  
 Ile Gln Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly  
                          1040                      1045                      1050  
 Glu Pro Gly Glu Arg Gly Leu Lys Gly His Arg Gly Phe Thr Gly  
                          1055                      1060                      1065  
 Leu Gln Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asp Gln Gly  
  
 1070                      1075                      1080  
 Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly  
                          1085                      1090                      1095

Pro Val Gly Pro Ser Gly Lys Asp Gly Ala Asn Gly Ile Pro Gly  
 1100 1105 1110

Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Ser Gly Glu Thr Gly  
 1115 1120 1125

Pro Ala Gly Pro Pro Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 1130 1135 1140

Pro Pro Gly Pro Gly Ile Asp Met Ser Ala Phe Ala Gly Leu Gly  
 1145 1150 1155

Pro Arg Glu Lys Gly Pro Asp Pro Leu Gln Tyr Met Arg Ala Asp  
 1160 1165 1170

Gln Ala Ala Gly Gly Leu Arg Gln His Asp Ala Glu Val Asp Ala  
 1175 1180 1185

Thr Leu Lys Ser Leu Asn Asn Gln Ile Glu Ser Ile Arg Ser Pro  
 1190 1195 1200

Glu Gly Ser Arg Lys Asn Pro Ala Arg Thr Cys Arg Asp Leu Lys  
 1205 1210 1215

Leu Cys His Pro Glu Trp Lys Ser Gly Asp Tyr Trp Ile Asp Pro  
 1220 1225 1230

Asn Gln Gly Cys Thr Leu Asp Ala Met Lys Val Phe Cys Asn Met  
 1235 1240 1245

Glu Thr Gly Glu Thr Cys Val Tyr Pro Asn Pro Ala Asn Val Pro  
 1250 1255 1260

Lys Lys Asn Trp Trp Ser Ser Lys Ser Lys Glu Lys Lys His Ile  
 1265 1270 1275

Trp Phe Gly Glu Thr Ile Asn Gly Gly Phe His Phe Ser Tyr Gly  
 1280 1285 1290

Asp Asp Asn Leu Ala Pro Asn Thr Ala Asn Val Gln Met Thr Phe  
 1295 1300 1305

Leu Arg Leu Leu Ser Thr Glu Gly Ser Gln Asn Ile Thr Tyr His  
 1310 1315 1320

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

1325                      1330                      1335  
 Lys Lys Ala Leu Leu Ile Gln Gly Ser Asn Asp Val Glu Ile Arg

1340                      1345                      1350  
 Ala Glu Gly Asn Ser Arg Phe Thr Tyr Thr Ala Leu Lys Asp Gly

1355                      1360                      1365  
 Cys Thr Lys His Thr Gly Lys Trp Gly Lys Thr Val Ile Glu Tyr

1370                      1375                      1380  
 Arg Ser Gln Lys Thr Ser Arg Leu Pro Ile Ile Asp Ile Ala Pro

1385                      1390                      1395  
 Met Asp Ile Gly Gly Pro Glu Gln Glu Phe Gly Val Asp Ile Gly

1400                      1405                      1410  
 Pro Val Cys Phe Leu

1415  
 <210> 19

<211> 1487  
 <212> PRT

<213> Homo sapiens  
 <400> 19

Met Ile Arg Leu Gly Ala Pro Gln Thr Leu Val Leu Leu Thr Leu Leu

1                      5                      10                      15  
 Val Ala Ala Val Leu Arg Cys Gln Gly Gln Asp Val Gln Glu Ala Gly

20                      25                      30  
 Ser Cys Val Gln Asp Gly Gln Arg Tyr Asn Asp Lys Asp Val Trp Lys

35                      40                      45  
 Pro Glu Pro Cys Arg Ile Cys Val Cys Asp Thr Gly Thr Val Leu Cys

50                      55                      60  
 Asp Asp Ile Ile Cys Glu Asp Val Lys Asp Cys Leu Ser Pro Glu Ile

65                      70                      75                      80  
 Pro Phe Gly Glu Cys Cys Pro Ile Cys Pro Thr Asp Leu Ala Thr Ala

85                      90                      95  
 Ser Gly Gln Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ile

100                      105                      110

Lys Asp Ile Val Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ala  
 115 120 125  
 Gly Glu Gln Gly Pro Arg Gly Asp Arg Gly Asp Lys Gly Glu Lys Gly  
 130 135 140  
 Ala Pro Gly Pro Arg Gly Arg Asp Gly Glu Pro Gly Thr Pro Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Gly  
 165 170 175  
 Gly Asn Phe Ala Ala Gln Met Ala Gly Gly Phe Asp Glu Lys Ala Gly  
 180 185 190  
 Gly Ala Gln Leu Gly Val Met Gln Gly Pro Met Gly Pro Met Gly Pro  
 195 200 205  
 Arg Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Phe Gln  
 210 215 220  
 Gly Asn Pro Gly Glu Pro Gly Glu Pro Gly Val Ser Gly Pro Met Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Lys Pro Gly Asp Asp Gly Glu  
 245 250 255  
 Ala Gly Lys Pro Gly Lys Ala Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln  
 260 265 270  
 Gly Ala Arg Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Leu Pro Gly Val Lys Gly  
 275 280 285  
 His Arg Gly Tyr Pro Gly Leu Asp Gly Ala Lys Gly Glu Ala Gly Ala  
 290 295 300  
 Pro Gly Val Lys Gly Glu Ser Gly Ser Pro Gly Glu Asn Gly Ser Pro  
 305 310 315 320  
 Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly Arg Thr Gly  
 325 330 335  
 Pro Ala Gly Ala Ala Gly Ala Arg Gly Asn Asp Gly Gln Pro Gly Pro  
 340 345 350  
 Ala Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Gly Pro Gly Phe Pro





850                      855                      860  
 Pro Gln Gly Pro Ser Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro Thr Gly Val  
 865                      870                      875                      880  
 Thr Gly Pro Lys Gly Ala Arg Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Ala Thr  
                          885                      890                      895  
 Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly Ser Asn Gly  
  
                          900                      905                      910  
 Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Lys Asp Gly Pro  
                          915                      920                      925  
 Lys Gly Ala Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala Gly Glu Pro  
                          930                      935                      940  
 Gly Leu Gln Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly  
 945                      950                      955                      960  
 Asp Asp Gly Pro Ser Gly Ala Glu Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Leu  
  
                          965                      970                      975  
 Ala Gly Gln Arg Gly Ile Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg Gly Glu Arg  
                          980                      985                      990  
 Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly Lys Gln Gly  
                          995                      1000                      1005  
 Ala Pro Gly Ala Ser Gly Asp Arg Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly  
                          1010                      1015                      1020  
 Pro Pro Gly Leu Thr Gly Pro Ala Gly Glu Pro Gly Arg Glu Gly  
  
                          1025                      1030                      1035  
 Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro Pro Gly Arg Asp Gly Ala Ala Gly  
                          1040                      1045                      1050  
 Val Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Ala Val Gly Ala Pro Gly  
                          1055                      1060                      1065  
 Ala Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly  
                          1070                      1075                      1080  
 Lys Gln Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Met Gly  
  
                          1085                      1090                      1095

Pro Ser Gly Pro Ala Gly Ala Arg Gly Ile Gln Gly Pro Gln Gly  
 1100 1105 1110

Pro Arg Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly Glu Pro Gly Glu Arg Gly  
 1115 1120 1125

Leu Lys Gly His Arg Gly Phe Thr Gly Leu Gln Gly Leu Pro Gly  
 1130 1135 1140

Pro Pro Gly Pro Ser Gly Asp Gln Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly  
 1145 1150 1155

Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Ser Gly  
 1160 1165 1170

Lys Asp Gly Ala Asn Gly Ile Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly  
 1175 1180 1185

Pro Arg Gly Arg Ser Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly  
 1190 1195 1200

Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Gly Ile  
 1205 1210 1215

Asp Met Ser Ala Phe Ala Gly Leu Gly Pro Arg Glu Lys Gly Pro  
 1220 1225 1230

Asp Pro Leu Gln Tyr Met Arg Ala Asp Gln Ala Ala Gly Gly Leu  
 1235 1240 1245

Arg Gln His Asp Ala Glu Val Asp Ala Thr Leu Lys Ser Leu Asn  
 1250 1255 1260

Asn Gln Ile Glu Ser Ile Arg Ser Pro Glu Gly Ser Arg Lys Asn  
 1265 1270 1275

Pro Ala Arg Thr Cys Arg Asp Leu Lys Leu Cys His Pro Glu Trp  
 1280 1285 1290

Lys Ser Gly Asp Tyr Trp Ile Asp Pro Asn Gln Gly Cys Thr Leu  
 1295 1300 1305

Asp Ala Met Lys Val Phe Cys Asn Met Glu Thr Gly Glu Thr Cys  
 1310 1315 1320

Val Tyr Pro Asn Pro Ala Asn Val Pro Lys Lys Asn Trp Trp Ser



1325                      1330                      1335  
 Ser Lys Ser Lys Glu Lys Lys His Ile Trp Phe Gly Glu Thr Ile  
 1340                      1345                      1350  
 Asn Gly Gly Phe His Phe Ser Tyr Gly Asp Asp Asn Leu Ala Pro  
 1355                      1360                      1365  
 Asn Thr Ala Asn Val Gln Met Thr Phe Leu Arg Leu Leu Ser Thr  
 1370                      1375                      1380  
 Glu Gly Ser Gln Asn Ile Thr Tyr His Cys Lys Asn Ser Ile Ala

1385                      1390                      1395  
 Tyr Leu Asp Glu Ala Ala Gly Asn Leu Lys Lys Ala Leu Leu Ile  
 1400                      1405                      1410  
 Gln Gly Ser Asn Asp Val Glu Ile Arg Ala Glu Gly Asn Ser Arg  
 1415                      1420                      1425  
 Phe Thr Tyr Thr Ala Leu Lys Asp Gly Cys Thr Lys His Thr Gly  
 1430                      1435                      1440  
 Lys Trp Gly Lys Thr Val Ile Glu Tyr Arg Ser Gln Lys Thr Ser

1445                      1450                      1455  
 Arg Leu Pro Ile Ile Asp Ile Ala Pro Met Asp Ile Gly Gly Pro  
 1460                      1465                      1470  
 Glu Gln Glu Phe Gly Val Asp Ile Gly Pro Val Cys Phe Leu  
 1475                      1480                      1485

<210> 20

<211> 268

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Ser Ala Phe Ala Gly Leu Gly Pro Arg Glu Lys Gly Pro Asp Pro

1                      5                      10                      15

Leu Gln Tyr Met Arg Ala Asp Gln Ala Ala Gly Gly Leu Arg Gln His

20                      25                      30

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

35                      40                      45

Ser Ile Arg Ser Pro Glu Gly Ser Arg Lys Asn Pro Ala Arg Thr Cys  
 50 55 60

Arg Asp Leu Lys Leu Cys His Pro Glu Trp Lys Ser Gly Asp Tyr Trp  
 65 70 75 80

Ile Asp Pro Asn Gln Gly Cys Thr Leu Asp Ala Met Lys Val Phe Cys  
 85 90 95

Asn Met Glu Thr Gly Glu Thr Cys Val Tyr Pro Asn Pro Ala Asn Val  
 100 105 110

Pro Lys Lys Asn Trp Trp Ser Ser Lys Ser Lys Glu Lys Lys His Ile  
 115 120 125

Trp Phe Gly Glu Thr Ile Asn Gly Gly Phe His Phe Ser Tyr Gly Asp  
 130 135 140

Asp Asn Leu Ala Pro Asn Thr Ala Asn Val Gln Met Thr Phe Leu Arg  
 145 150 155 160

Leu Leu Ser Thr Glu Gly Ser Gln Asn Ile Thr Tyr His Cys Lys Asn  
 165 170 175

Ser Ile Ala Tyr Leu Asp Glu Ala Ala Gly Asn Leu Lys Lys Ala Leu  
 180 185 190

Leu Ile Gln Gly Ser Asn Asp Val Glu Ile Arg Ala Glu Gly Asn Ser  
 195 200 205

Arg Phe Thr Tyr Thr Ala Leu Lys Asp Gly Cys Thr Lys His Thr Gly  
 210 215 220

Lys Trp Gly Lys Thr Val Ile Glu Tyr Arg Ser Gln Lys Thr Ser Arg  
 225 230 235 240

Leu Pro Ile Ile Asp Ile Ala Pro Met Asp Ile Gly Gly Pro Glu Gln  
 245 250 255

Glu Phe Gly Val Asp Ile Gly Pro Val Cys Phe Leu  
 260 265

<210> 21

<211

> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker monomer

<400> 21

Gly Ser

1

<210> 22

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker monomer

<400> 22

Gly Gly Ser

1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker monomer

<400> 23

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker monomer

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5