



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월22일
(11) 등록번호 10-1961495
(24) 등록일자 2019년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7018914
(22) 출원일자(국제) 2010년12월23일
심사청구일자 2015년12월18일
(85) 번역문제출일자 2012년07월18일
(65) 공개번호 10-2012-0096093
(43) 공개일자 2012년08월29일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2010/001737
(87) 국제공개번호 WO 2011/075786
국제공개일자 2011년06월30일
(30) 우선권주장
61/289,497 2009년12월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Molecular Biology. Vol. 377, No.
2, pp. 478-488 (2008)
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
아비웹 피티와이 리미티드
오스트레일리아, 빅토리아 3052, 파크빌, 343 로
열 퍼레이드
(72) 발명자
허드슨, 피터, 존
호주, 빅토리아 3130, 블랙번, 36 픽시아 스트리트
탐바키스, 데브라
호주, 빅토리아 3124, 캄버웰, 1/15 헤이즐 스트리트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
허용록

전체 청구항 수 : 총 41 항

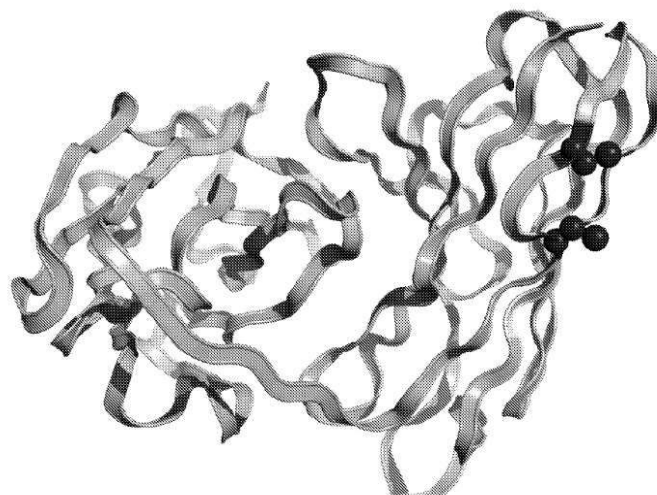
심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 면역-컨쥬게이트 및 그 제조방법 2

(57) 요약

본 발명은 프레임워크 영역(FR) 2내에서 위치 결정된 적어도 2개의 시스테인 잔기 및/또는 프레임워크 영역(FR 3)에서 위치결정된 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하는 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 분리된 단백질을 제공하되, FR2 및/또는 FR3 내 적어도 2개의 시스테인 잔기가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 프레임워크 내 이황화 결합은 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있다. 바람직하게 단백질은 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H) 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하되, 가변 영역 중 적어도 하나는 2개의 시스테인 잔기를 포함한다. 본 발명은 또한 본 단백질 및 다른 화합물의 컨쥬게이트를 제공한다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

위트크로프트, 마이클, 폴

호주, 빅토리아 3006, 싸우스뱅크, 2/68 웰스 스트리트

투라티, 파비오

호주, 빅토리아 3008, 도클랜드, 100 하버 에스플래네이드, 유닛 1411

(56) 선행기술조사문헌

W02003050531 A1

KR1020070054682 A

W02008052187 A2

W02009099728 A1

Nature Biotechnology. Vol. 26, No. 8, pp. 925-932 (2008)

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H) 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 분리된 단백질로서, 가변 영역 중 적어도 하나는:

(i) FR2 내 시스테인 잔기 중 적어도 2개가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 프레임워크 영역 내 이황화 결합은 FR2 내 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있는, 프레임워크 영역(FR) 2 내에 위치된 적어도 2개의 시스테인 잔기; 또는

(ii) FR3 내 시스테인 잔기 중 적어도 2개가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 프레임워크 영역 내 이황화 결합은 FR3 내 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있는, FR3 내에 위치된 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하며, 가변 영역이 중쇄 가변 영역(V_H)인 경우, V_H 의 FR2 내 적어도 2개의 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 39 내지 45에 위치되고, V_H 의 FR3 내 적어도 2개의 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 70 내지 79에 위치되며,

가변 영역이 경쇄 가변 영역(V_L)인 경우, V_L 의 FR2 내 적어도 2개의 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 38 내지 44에 위치되고, V_L 의 FR3 내 적어도 2개의 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 65 내지 72에 위치되는 것을 특징으로 하는, 분리된 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 이황화 결합은 비환원성 조건 하에 존재하는 것인 분리된 단백질.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제2항에 있어서, 중쇄 가변 영역(V_H) 내의 상기 시스테인 잔기는

(i) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR2의 위치 39 및 43;

(ii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR2의 위치 39 및 45;

(iii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR3의 위치 70 및 79; 또는

(iv) 상기 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR3의 위치 72 및 75에 위치된 것인 분리된 단백질.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제2항에 있어서, 경쇄 가변 영역(V_L) 내의 상기 시스테인 잔기는:

(i) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR2의 위치 38 및 42;

(ii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR2의 위치 38 및 44; 또는

(iii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR3의 위치 65 및 72에 위치된 것인, 분리된 단백질.

청구항 15

제2항에 있어서, 인간 내피 성장 인자(Her)2, 종양 결합 글리코단백질 TAG72, MUC1 또는 전립선 특이적 막 항원 (prostate specific membrane antigen : PSMA)과 특이적으로 결합하는 것인, 분리된 단백질.

청구항 16

제2항에 있어서, 상기 단백질은 서열 번호: 59, 61, 63 또는 65 중 하나 이상에서 설명한 V_H 및 V_L 서열과 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 V_L 를 포함하며, FR2 또는 FR3 내 위치된 2개 이상의 시스테인 잔기를 포함 하도록 변형되는 것인, 분리된 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서, 서열 번호: 101, 103, 107, 109, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147 또는 149 중 하나 이상에서 설명되는 서열과 적어도 80% 동일하며, 선택적으로 N-말단의 세린 잔기를 포함하는 서열을 포함하는 것인, 분리된 단백질.

청구항 18

적어도 하나의 V_L 이 적어도 하나의 V_H 와 결합하여 항원 결합 자리를 형성하는 제2항에 따른 적어도 하나의 단백 질을 포함하는 Fv를 포함하는, 분리된 단백질.

청구항 19

제18항에 있어서, 항원 결합 자리를 형성하는 V_L 및 V_H 는 단일 폴리펩티드 쇠에 있는 것인, 분리된 단백질.

청구항 20

제19항에 있어서,

(i) 단일 쇠 Fv 단편(single chain Fv fragment : scFv);

(ii) 다이머 scFv(다이-scFv); 또는

(iii) Fc 또는 중쇄 불변 도메인(constant domain: C_H2 또는 C_H3에 연결된 (i) 또는 (ii) 중 적어도 하나인 것인, 분리된 단백질.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 항원 결합 자리를 형성하는 V_L 및 V_H는 상이한 폴리펩티드 쇄에 존재하는 것인, 분리된 단백질.

청구항 22

제21항에 있어서,

(i) 다이아바디(diabody);

(ii) 트라이아바디(triabody); 또는

(iii) 테트라바디(tetrabody)인 것인 분리된 단백질.

청구항 23

제21항에 있어서, 면역글로불린인 것인, 분리된 단백질.

청구항 24

제2항에 있어서, 상기 시스테인 잔기는 이황화 결합에 의해 연결되는 것인 분리된 단백질.

청구항 25

제2항에 있어서, 적어도 하나의 시스테인 잔기에 컨쥬게이트된 화합물을 포함하되, 상기 화합물의 컨쥬게이션은 항원에 단백질의 결합을 막지 않는 것인, 분리된 단백질.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 화합물은 방사성동위원소, 검출가능한 표지, 치료적 화합물, 콜로이드, 독소, 핵산, 펩티드, 단백질, 피험자에서 단백질의 반감기를 증가시키는 화합물 및 그것의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 분리된 단백질.

청구항 27

제2항에 있어서, 적어도 하나의 N-말단의 트레오닌 또는 세린 잔기를 추가로 포함하는 것인 분리된 단백질.

청구항 28

제27항에 있어서, 트레오닌 또는 세린 잔기에 컨쥬게이트된 화합물을 포함하되, 상기 화합물의 컨쥬게이션은 항원에 단백질의 결합을 막지 않는 것인, 분리된 단백질.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 화합물은 방사성동위원소, 검출가능한 표지, 치료적 화합물, 콜로이드, 독소, 핵산, 펩티드, 단백질, 피험자에서 단백질의 반감기를 증가시키는 화합물 및 그것의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 분리된 단백질.

청구항 30

제28항에 있어서, FR2 또는 FR3 내 시스테인 잔기 중 적어도 하나에 컨쥬게이트된 제1 화합물, 및 트레오닌 또는 세린 잔기에 컨쥬게이트된 제2 화합물을 포함하되, 상기 제2 화합물은 제1 화합물과 상이한 것인, 분리된 단백질.

청구항 31

제25항에 있어서, 상기 화합물은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)인 것인 분리된 단백질.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 PEG는 단분산된 PEG인 것인 분리된 단백질.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 단분산된 PEG는 단분산된 PEG는 48개 이하의 에틸렌 글리콜 단위를 가지는 것인 분리된 단백질.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 단분산된 PEG는 24개 이하의 에틸렌 글리콜 단위를 가지는 것인 분리된 단백질.

청구항 35

제15항의 단백질을 포함하는, 암의 진단 또는 예측용 조성물.

청구항 36

제2항의 단백질을 암호화하는 분리된 핵산.

청구항 37

프로모터에 작동가능하게 연결된 제36항의 핵산을 포함하는 발현 구성체.

청구항 38

제37항의 발현 구성체를 포함하는 분리된 세포.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 포유류 세포 또는 곤충 세포인 것인 분리된 세포.

청구항 40

제37항의 발현 구성체를 분리된 세포 내로 도입하는 단계, 및

제37항의 발현 구성체를 포함하는 분리된 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제37항의 발현 구성체에 의해 인코딩된 단백질의 생성방법.

청구항 41

삭제

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 배양 단계 이후에 단백질을 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 단백질의 생성방법.

청구항 43

(i) 제2항의 단백질을 얻는 단계; 및

(ii) 상기 단백질의 FR2 또는 FR3 내 적어도 2개의 시스테인 잔기 중 적어도 하나에 화합물을 컨쥬게이트시켜 단백질 컨쥬게이트를 생성하는 단계를 포함하는, 단백질 컨쥬게이트의 생성방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 단계 (i)에서 얻은 단백질의 FR2 또는 FR3 내 시스테인 잔기는 이황화 결합에 의해 연결되며, 상기 방법은 시스테인 잔기에 화합물을 컨쥬게이트하기 전 이황화 결합을 환원시키거나 또는 파괴하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 단백질 컨쥬게이트의 생성방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 이황화 결합을 환원시키거나 또는 파괴하는 단계는 단백질 내 유리 티올 기를 만들며, 상기 화합물은 단백질에 화합물의 컨쥬게이션을 허용하는 티올 반응기를 가지는 것인, 단백질 컨쥬게이트의 생성방법.

청구항 46

제43항에 있어서, 상기 단백질은 적어도 하나의 N-말단의 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하며, 상기 방법은 세린 또는 트레오닌 잔기에 화합물을 컨쥬게이트하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 단백질 컨쥬게이트의 생성방법.

청구항 47

제15항의 단백질을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 암은 유방암, 전립선암, 결장직장암, 난소암, 위암, 췌장암, 폐암 및 방광암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 49

제2항의 단백질을 생체의 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 생체의 세포에 화합물을 전달하는 방법.

청구항 50

삭제

청구항 51

- (i) 피험자로부터 생물학적 샘플을 분리하는 단계;
- (ii) 상기 분리된 생물학적 샘플과, 제2항의 단백질을 접촉시켜, 단백질에 검출 가능한 표지를 컨쥬게이트하는 단계; 및
- (iii) 생물학적 샘플 내에서 검출가능한 표지가 컨쥬게이트된 단백질을 찾아내거나 검출하는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플에서 항원의 위치를 찾아내거나 검출하는 방법.

청구항 52

- (i) 피험자로부터의 분리된 생물학적 샘플과, 제15항의 단백질을 접촉시켜 복합체를 형성하는 단계;
- (ii) 생물학적 샘플 내에서 상기 복합체를 검출하는 단계; 및
- (iii) 상기 복합체의 수준을 대조군 샘플의 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 암을 진단 또는 예측하기 위한 정보 제공 방법으로서,

상기 암은 인간 상피 성장 인자 2(human epidermal growth factor (Her) 2), 종양 결합 글리코단백질 TAG72(tumour associated glycoprotein TAG72), MUC1 또는 전립선 특이성 멤브레인 항원(prostate specific membrane antigen (PSMA))을 발현시키는 암인 것을 특징으로 하는, 암을 진단 또는 예측하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 암은 유방암, 전립선암, 결장직장암, 난소암, 위암, 췌장암, 폐암 및 방광암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 암을 진단 또는 예측하기 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련출원과의 상호참조

[0002] 본 출원은 2009년 12월 23일 출원된 미국출원 제61/289497호(발명의 명칭: "Immuno-conjugates and methods for producing them 2")로부터의 우선권을 주장하며, 이 기초출원은 그것의 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 단백질에 화합물의 컨주게이션(conjugation)을 용이하게 하도록 변형된 면역글로불린 가변 영역을 포함하거나 그것에 컨주게이트된 화합물을 가지는 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 면역글로불린, 예를 들어 항체 및 항체 유사 분자(예를 들어 카멜리드(camelid) 면역글로불린 또는 연골어류(cartilaginous fish)로부터의 면역글로불린 신규 항원 수용체(immunoglobulin new antigen receptors : IgNAR)) 또는 그것의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질의 높은 특이적 결합성은 그것들이 피험자 내의 특정 표적에 분자를 전달하기에 특히 적합하게 한다. 예를 들어, 면역글로불린 또는 그것의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질은, 예를 들어 종양 세포와 같은 세포의 성장을 억제하거나 죽이기 위한 세포독성 또는 세포증식억제성 화합물, 예를 들어 약물에 컨주게이트될 수 있다(Lambert, 2005). 이러한 컨주게이트는 면역글로불린 또는 단편이 결합하는 항원을 발현시키는 세포에 세포독성 또는 세포증식억제성 화합물의 표적화된 전달을 용이하게 하는데, 오히려 피험자 전체를 통해서는 비특이적이다. 이러한 컨주게이트는 피험자 내에서 전신으로 보다는 필요한 자리에 대해 화합물의 독성 수준의 전달을 보장함으로써 피험자에 대해 일반적으로 독성인 화합물의 사용을 허용할 수 있다. 더 나아가, 항체 또는 그것의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질과 검출가능한 화합물, 예컨대 형광단(fluorophore) 또는 방사성동위원소의 컨주게이트는, 예를 들어 생체내 이미지 기반 방법을 사용하여 암세포와 같은 질병 세포의 검출을 용이하게 한다.

[0006] 통상적인 의미에서 항체 또는 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질에 대한 화합물의 결합은 일반적으로 그 화합물이 항체 상의 수많은 자리에 부착되는 경우 이종성 혼합물을 유발한다. 예를 들어, 화합물은 항체 또는 그것의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질에 항체 또는 항원 결합 도메인 내의 종종 수많은 리신 잔기를 통해 전형적으로 컨주게이트되어, 이종성 항체-화합물 컨주게이트 혼합물을 생성한다. 사용된 반응 조건에 따라서, 이종성 혼합물은 전형적으로 0 내지 약 8, 또는 그 이상으로 부착된 화합물과 컨주게이트의 분포(distribution)를 함유한다. 추가로, 항체 또는 화합물 대 항체 또는 단백질의 특정 정수비를 가지는 컨주게이트들의 각 서브 그룹 내에서, 화합물이 항체 또는 단백질 상의 다양한 자리에 부착된 잠재적으로 이종성인 혼합물이 있다. 분석적 및 예비적 방법들은 컨주게이트 반응으로부터 비롯된 이종성 혼합물 내에서 다양한 컨주게이트 종(species)을 분리하고 특성화하기에 부적합하다.

[0007] 더 나아가, 항체 또는 그것의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질에 대한 화합물의 비특이적 컨주게이트는, 예를 들어 상기 화합물이 항원 결합에 필요한 영역에 컨주게이트되면 항원에 대한 항체/단백질의 결합을 감소시키거나 완전히 막을 수 있다. 이러한 위험은 그 안에 항원 결합을 위해 중요하지 않은 컨주게이트에 적합한 잔기가 거의 존재하지 않을 수 있는 무결함(intact) 항체에서보다 훨씬 작은 항원 결합 도메인들을 포함하는 단백질 내에서 증가된다. 예로써, 항체의 항원 결합 도메인을 좀 더 많이 포함하는 단백질들은, 화합물이 항원 결합을 감소시키거나 막지 않고 컨주게이트될 수 있는 자리를 거의 가지지 않는다.

[0008] 항체의 Fc 영역 상의 탄수화물(들)은 화합물을 부착하기 위한 천연 자리이다. 일반적으로, 탄수화물은 과요오드 산화에 의해 변형되어 반응성 알데하이드를 만드는데, 이것은 시프 염기(Schiff base) 형성에 의해 반응성 아민 함유 화합물을 부착하는데 사용될 수 있다. 알데하이드가 아민기와 반응할 수 있기 때문에, 반응은 항체 또는 항원 결합 도메인 내의 리신 잔기들이 양성자화(protonated) 또는 비반응화 되도록 하는 낮은 pH에서 수행된다. 하이드라자이드 기는 만들어진 알데하이드에 부착에 가장 잘 컨주게이트되는데, 그것들이 낮은 pH에서 반응성이어서 하이드라존 결합을 형성하기 때문이다. 상기 결합은 하이드라진 결합을 형성하는 시아노보로하이드라이드 나트륨에 의한 환원에 의해 더 안정화될 수 있다(Rodwell et al, 1986). 이러한 접근의 단점은 결합에 필요한 일부 항체 분자들을 손상시키고 응집시킬 수 있는 가혹한 조건을 포함한다. 예를 들어, 일부 항체 가변 영역에 존재하는 메티오닌 잔기는 항원 결합 친화성(avidity)의 손실을 가져올 수 있는 과요오드에 의한 산화에 특히 영향을 받는다. 히스티딘 및/또는 트립토판 잔기는 또한 산화에 영향을 받는다. 나아가, 항체의 항원 결합 도메인을 포함하는 많은 단백질이 반드시 Fc 영역을 포함하는 것은 아니며, 이는 그것들이 상술한 과정을 이용하여 화합물에 컨주게이트될 수 없다는 것을 의미한다.

[0009] 시스테인 티올은 pH 7 근처에서 양성자화되어 덜 친핵성이 되는 대부분의 아민과 달리 중성 pH에서 반응성이다. 유리 티올 기는 상대적으로 반응성이기 때문에, 시스테인 잔기를 갖는 단백질은 종종 이황화 결합된 올리고머로서 그것의 산화된 형태로 존재하거나 내부적으로 브릿지된 이황화 기를 가진다. 세포의 단백질은 일반적으로 유리 티올을 가지지 않는다(Garman, 1997). 시스테인 잔기는 유전공학 기술에 의해 단백질에 도입되어 리간드와 공유적 부착을 형성하거나 새로운 분자 내 이황화 결합을 형성한다. 그러나, 단백질에 삽입되거나 치환된 시스테인 티올 기는 특히 반응 또는 산화에 상대적으로 접근되기 쉬운 경우, 즉, 화합물의 컨쥬게이트에 유용한 자리에 위치되는 경우 잠재적으로 문제가 된다. 이것은 단백질의 농축된 용액에서, 대장균(*Escherichia coli*)의 원형질막, 배양물 상청액, 또는 부분적으로 또는 완전히 정제된 단백질 내에서, 단백질의 표면상의 시스테인 잔기가 짝을 이루고 산화되어 분자 내 이황화물 및 그에 따른 단백질 응집물을 형성할 수 있기 때문이다. 이러한 단백질 응집물은, 예를 들어 원하는 생물학적 활성을 가지는 유용한 형태로 있는 분리된 단백질의 불량한 수율을 유발한다. 나아가, 단백질은 새롭게 가공된 시스테인 및 존재하는 시스테인 잔기 사이에서 산화적으로 분자 내의 이황화 결합을 형성할 수 있어, 상기 단백질의 3차원 구조의 미스폴딩(misfolding) 또는 손실에 의해 비활성 또는 비특이성을 제공할 수 있다. 상술한 문제점 각각은, 서로 결합하여 정확한 폴딩 및 안정성, 결과로서 항원 결합 반응성을 보장하는 수개의 시스테인 잔기를 일반적으로 포함하는 항체 및 그것의 항원 결합 도메인을 포함하는 항체 및 그것의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질 내에서 악화된다.

[0010] 본 기술 분야에서 화합물의 단순한 컨쥬게이트를 허용하도록 변형된 면역글로불린의 항원 결합 도메인을 포함하는 단백질에 대한 요구가 존재한다는 것은 상술한 것으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 바람직한 단백질은 바람직하게 결과적으로 분자 내부의 결합에 의해 연결된 멀티머 응집물의 고려할 만한 수준을 초래하지 않는, 다양한 시스템 내에서 재조합 생성을 용이하게 할 것이다.

발명의 내용

[0011] 본 발명에 이르는 작업에서, 발명자들은 면역글로불린의 가변 영역 내 자리, 예를 들어 항원에 대한 가변 영역의 결합의 막지 않고 화합물의 컨쥬게이트를 허용하는 항체를 확인하기 위하여 노력하였다. 본원에 예시된 바와 같이, 본 발명자들은 컨쥬게이트에 접근 가능하며, 그것에 컨쥬게이트된 화합물이 항원 결합을 방해하거나 막을 가능성이 없는 가변 영역의 항원 결합 자리로부터 충분히 제거된, 가변 영역의 프레임 워크 영역 2(framework region 2 : FR2) 및/또는 프레임 워크 영역 3(framework region 3 : FR3) 내의 다수의 자리를 결정하였다. 이 자리들은 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L) 둘 다에서 보존된다. 이 결정을 기반으로, 본 발명자들은 두 개의 시스테인 잔기들이 FR2 및/또는 FR3에 삽입된 돌연변이된 가변 영역을 포함하는 다양한 단백질을 생성하였다. 이러한 시스테인 잔기들은 그것들이 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면 또한 그것들 사이에 형성될 수 있도록 위치된다. 재조합 생성 및/또는 정제 동안, 시스테인 잔기들은 이황화 결합에 의해 연결됨으로써 동일 단백질 또는 다른 단백질 내에서 그 잔기들과 다른 시스테인 잔기와의 결합이 감소되거나 방지된다. 이것은 연결된 멀티머 및/또는 비정상적으로 폴딩된 가변 영역의 생성 가능성을 감소시키고, 기능성 단백질의 생성 및/또는 분리를 허용한다. 분리 후, 시스테인 잔기들은 환원되거나, 다르게는 파괴되어 단백질에 화합물의 컨쥬게이트를 허용한다. 본 발명자들은 또한 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 벌키(bulky) 화합물 및 방사성 동위원소와 같은 이미징 화합물을 포함하여, 이 단백질들이 수많은 화합물의 컨쥬게이트가 항원에 대한 가변영역의 결합을 막지 않는다는 것을 증명하였다.

[0012] 한 예에서, 본 발명은

[0013] (i) FR2 내 시스테인 잔기 중 적어도 2개가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합이 FR2 내 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있는 프레임워크 영역(FR) 2 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기; 및/또는

[0014] (ii) 영역 내 시스테인 잔기 중 적어도 2개가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합은 영역 내 시스테인 잔기 사이에서 형성될 수 있는 FR3를 포함하는 영역 및 상보적 결정 영역(complementarity determining region : CDR) 2 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하는 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 분리된 단백질을 제공한다.

[0015] 대안의 또는 추가적인 예에서, 본 발명은

[0016] (i) FR2 내 시스테인 잔기 중 적어도 2개가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합은 FR2 내 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있는 프레임워크 영역(FR) 2 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기; 및/또는

[0017] (ii) FR3 내 시스테인 잔기 중 적어도 2개가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합은 FR3 내 시스테인

인 잔기 사이에 형성될 수 있는 FR3 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하는 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 분리된 단백질을 제공한다.

- [0018] 대안의 또는 추가 예에서, 본 발명은 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H) 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 분리된 단백질을 제공하되, 가변 영역 중 적어도 하나는:
- [0019] (i) FR2 내 시스테인 잔기 중 적어도 2개가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합이 FR2 내 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있는 프레임워크 영역(FR) 2 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기; 및/또는
- [0020] (ii) 영역 내 적어도 2개의 시스테인 잔기가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합이 영역 내 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있는 FR3 및 상보적 결정 영역(CDR) 2를 포함하는 영역 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함한다.
- [0021] 대안의 또는 추가 예에서, 본 발명은 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H) 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 분리된 단백질을 제공하되, 가변 영역 중 적어도 하나는:
- [0022] (i) FR2 내 시스테인 잔기 중 적어도 2개가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합이 FR2 내 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있는 프레임워크 영역(FR) 2 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기; 및/또는
- [0023] (ii) FR3 내 적어도 2개의 시스테인 잔기가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합이 FR3 내 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있는 FR3 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함한다.
- [0024] 바람직하게, FR3 내 시스테인 잔기는 FR3 내 보존적 시스테인 잔기에 추가되며, 예를 들어 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 V_L 의 위치 88 또는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 V_H 의 위치 92에서 시스테인 잔기에 추가된다. 바람직하게, 시스테인 잔기는 보존적 시스테인 잔기를 가지는 이황화 결합을 형성하지 않는다.
- [0025] 바람직하게, 단백질은 단일 폴리펩티드 쇄 내 적어도 하나의 V_L 및 적어도 하나의 V_H 를 포함한다.
- [0026] 바람직하게, 시스테인 잔기는 이황화 결합이 비환원성 조건 하에 존재하도록 위치된다.
- [0027] 바람직하게, 시스테인 잔기는 화합물이 이황화 결합에 의해 연결되지 않는다면 적어도 하나의 잔기에 컨쥬게이트되도록 위치된다.
- [0028] 바람직하게, FR2 내 시스테인 잔기는 CDR1와 CDR2 사이에 위치되고, 및/또는 시스테인 잔기 FR3은 CDR2와 CDR3 사이에 위치된다.
- [0029] 한 예에서, 시스테인 잔기는 FR2 및/또는 FR3의 하나 이상의 루프 영역 내에 위치된다.
- [0030] 대안의 또는 추가적인 예에서, 시스테인 잔기는 V_H 내에 있다. 예를 들어, FR2 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 36 내지 49에 위치되고, 및/또는 FR3 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따르는 잔기 66 내지 94에 위치된다. 바람직하게, FR2 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 39 내지 45에 위치되고, 및/또는 FR3 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 68 내지 86에 위치된다.
- [0031] 한 예에서, FR2 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 39 내지 45에 위치되고, 및/또는 FR3 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 68 내지 81에 위치된다. 한 예에서, FR3 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 82C 내지 86에 위치된다. 한 예에서, 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 68 내지 81 사이의 FR3 내에 위치된다.
- [0032] 시스테인 잔기의 예시적인 위치는:
- [0033] (i) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR2의 위치 39 내지 43;
- [0034] (ii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR2의 위치 39 내지 45;
- [0035] (iii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR3의 위치 70 내지 79; 및/또는
- [0036] (iv) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR3의 위치 72 내지 75.
- [0037] 한 예에서, CDR2 및 FR3을 포함하는 영역 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 59 내지 86에 위치된다. 예를 들어 영역 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 59 내지

63 및/또는 65 내지 68 및/또는 82C 내지 86에 위치된다.

- [0038] 대안의 또는 추가적인 예에서, 시스템인 잔기는 V_L 내에 있다. 바람직하게, FR2 내 시스템인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 35 내지 49에 위치되며, 및/또는 FR3 내에 위치한 시스템인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 57 내지 88에 위치된다. 한 예에서, FR2 내 시스템인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 38 내지 44에 위치되며, 및/또는 FR3 내 시스템인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 63 내지 82에 위치된다.
- [0039] 한 예에서, FR3 내의 시스템인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 63 내지 74에 위치된다. 한 예에서, FR3 내의 시스템인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 78 내지 82에 위치된다.
- [0040] 한 예에서, 시스템인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 63 내지 74의 FR3 내에 위치된다.
- [0041] 시스템인 잔기에 대한 예시적인 위치는:
- [0042] (i) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR2의 위치 38 내지 42;
- [0043] (ii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR2의 위치 38 내지 44; 및/또는
- [0044] (iii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 FR3의 위치 65 내지 72.
- [0045] 한 예에서, CDR2 및 FR3을 포함하는 영역 내 시스템인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 54 내지 82에 위치된다. 추가의 또는 대안의 예에서, 영역 내 시스템인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 54 내지 58 및/또는 60 내지 63 및/또는 78 내지 82에 위치된다.
- [0046] 본 발명은 가변 영역 내 또는 그것을 포함하는 단백질 내 추가 잔기들을 변형시키는 것을 분명히 고려한다. 예를 들어, 본 발명은 추가적으로 시스템인 잔기 사이에 위치한 잔기들을 치환하거나 심지어 CDR 내에서 자연적으로 발생하는 시스템인 잔기들을 대체하는 것을 생각한다.
- [0047] 한 예에서, 본 명세서에서 설명된 단백질은 인간 내피 성장 인자 HER2, 종양 결합 글리코단백질 TAG72, MUC1 또는 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen : PSMA)과 특이적으로 결합한다. 다른 단백질들은 다수의 항원, 예를 들어 교차 반응성 때문에 앞서 열거한 항원과 결합하며, 단백질은 복합 특이적이 된다.
- [0048] 한 예에서, 단백질은 서열 번호: 59, 61, 63 또는 65 중 임의의 하나 이상에서 설명한 V_H 및 V_L 서열과 적어도 약 80% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 V_L 를 포함하며, FR2 및/또는 FR3 내 위치한 2개 이상의 시스템인 잔기를 포함하도록 변형된다.
- [0049] 한 예에서, 선택적으로 단백질은 N-말단 세린 잔기를 포함하는 EQ ID NO: 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147 또는 149 중 임의의 하나 이상에서 설명된 서열과 적어도 약 80% 동일한 서열을 포함한다.
- [0050] 본 발명은 또한 적어도 하나의 V_L 이 적어도 하나의 V_H 에 결합하여 항원 결합 자리를 형성하는 본 발명의 적어도 하나의 단백질을 포함하는 Fv를 포함하는 분리된 단백질을 제공한다.
- [0051] 상기 단백질의 일 형태는 단일 폴리펩티드쇄 내에서 항원 결합 자리를 형성하는 V_L 및 V_H 를 포함한다. 예를 들어, 단백질은:
- [0052] (i) 단일쇄 Fv 단편(scFv);
- [0053] (ii) 이합체(dimeric) scFv(다이-scFv); 또는
- [0054] (iii) Fc 또는 중쇄 불변 도메인(constant domain: CH)2 및/또는 CH3에 연결된 적어도 하나의 (i) 및/또는 (ii).
- [0055] 대안으로, 단백질은 상이한 폴리펩티드쇄 내 항원 결합 자리를 형성하는 V_L 및 V_H 를 포함한다. 한 예에서, 단백질 내 각각의 폴리펩티드쇄는 V_L 및 V_H 를 포함한다. 바람직하게, 이러한 단백질은:
- [0056] (i) 다이아바디(diabody);

- [0057] (ii) 트라이아바디(triabody); 또는
- [0058] (iii) 테트라바디(tetrabody).
- [0059] 본 명세서에서, 용어 Avibody 또는 Avibodies는 W098/044001 및/또는 W094/007921에서 설명된 것과 같은 임의의 다이아바디(다이아바디들), 트라이아바디(트라이아바디들) 및 테트라바디(테트라바디들)을 포함하는 Avibody(상표명) 제품의 임의의 형태를 포함한다.
- [0060] 다른 예에서, 본 발명의 단백질은 면역글로불린, 바람직하게는 항체이다. 면역글로불린의 예시적인 형태는 본 명세서에서 설명되고 필요한 변경을 가하여 본 발명의 본 예에 적용되는 것으로 여겨진다.
- [0061] 본 발명의 일부 예에서, 본 발명의 단백질은 이황화 결합에 의해 연결되는 시스테인 잔기들을 포함한다. 대안으로, 본 발명의 단백질은 시스테인 잔기 중 적어도 하나에 컨쥬게이트된 화합물을 포함하되, 본 화합물의 컨쥬게이션은 항원에 대한 단백질의 결합을 방해하지 않는다. 예시적 화합물은 방사성동위원소, 검출가능한 표지, 치료적 화합물, 콜로이드, 독소, 핵산, 펩티드, 단백질, 피험자에서 단백질의 반감기를 증가시키는 화합물 및 그것의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물을 포함한다. 당업자는 하나 이상의 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 단백질, 예를 들어 본 명세서에 설명된 것과 같은 단백질을 함유하는 Fv를 포함하는 항체 또는 그것의 단편을 포함한다는 것을 인식할 것이다.
- [0062] 한 예에서, 본 발명의 단백질은 프레임워크 영역(FR) 1 내에 위치된 적어도 2개의 시스테인 잔기를 추가로 포함하되, 적어도 2개의 시스테인 잔기가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합은 FR1 내 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있다. 본 발명에 적합할 수 있는 FR1 내 시스테인 잔기를 포함하는 단백질을 함유하는 예시적인 가변 영역은 공동 계류중인 국제특허 출원 PCT/AU2010/000847호에서 개시되며, 그것의 전문은 참조로 포함된다.
- [0063] 한 예에서, 시스테인 잔기는 이황화 결합이 비환원성 조건 하에서 존재하도록 위치된다.
- [0064] 한 예에서, FR1 내 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템 및 CDR1에 따라서 넘버링된 잔기 2 사이에 위치된다.
- [0065] 한 예에서, 시스테인 잔기는 FR1의 하나 이상의 루프 영역 내에 위치된다.
- [0066] 대안의 또는 추가적인 예에서, 시스테인 잔기는 V_H 내에 있고, Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 2 내지 30에 위치된다. 바람직하게, 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 7-20 및/또는 잔기 24-30에 위치되고, 더 바람직하게 잔기 7-20에 위치된다. 추가 예에서, 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 6-16에 위치된다. 추가 예에서, 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 7-16에 위치된다.
- [0067] 대안의 또는 추가적인 예에서, 시스테인 잔기는 V_L 내에 있고, Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 2 내지 22에 위치된다. 바람직하게, 시스테인 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 7-20에 위치된다. 추가 예에서, 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 7-19에 위치된다. 추가 예에서, 잔기는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 잔기 7-17에 위치된다.
- [0068] 본 발명의 예시적인 형태에서, 시스테인 잔기는 V_H 및/또는 V_L 내 보존적 시스테인 잔기에 추가된다. 당업자는 보존적 시스테인 잔기는 적어도 대다수의 자연적으로 발생하는 항체 중의 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 V_L 내 잔기 23 및/또는 V_H 내 잔기 22라는 것을 인식할 것이다.
- [0069] 본 발명의 한 바람직한 형태에서, 시스테인 잔기는 보존적 시스테인 잔기에 대해 N-말단에 위치된다. 바람직하게, 시스테인 잔기는 다음 중 하나 이상에 위치된다:
- [0070] (i) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 κV_L 의 잔기 8 및 잔기 11;
- [0071] (ii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 κV_L 의 잔기 14 및 잔기 17;
- [0072] (iii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 λV_L 의 잔기 7 및 잔기 11;
- [0073] (iv) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 λV_L 의 잔기 14 및 잔기 17;
- [0074] (v) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 λV_L 의 잔기 8 및 잔기 12;

- [0075] (vi) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 λ V_H 의 잔기 7 및 잔기 10; 및/또는
- [0076] (vii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 λ V_H 의 잔기 13 및 잔기 16.
- [0077] 본 발명의 다른 바람직한 예에서, 시스템 잔기는 다음 중 하나 이상에 위치된다:
- [0078] (i) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 κ V_L 의 잔기 13 및 잔기 19;
- [0079] (ii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 λ V_L 의 잔기 13 및 잔기 19;
- [0080] (iii) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 V_H 의 잔기 6 및 잔기 9; 및/또는
- [0081] (iv) Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 V_H 의 잔기 12 및 잔기 18.
- [0082] 임의의 예에 따라서 본 명세서에서 설명된 단백질은 1개 이상 및 바람직하게는 10 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2 개 미만의 치환, 바람직하게는 보존적 아미노산 치환 또는 결실 또는 삽입을 포함할 수 있다. 상기 언급된 서열에 대한 예시적 변형은 N-말단 세린의 결실 또는 세린을 다른 아미노산 잔기로 치환(바람직하게는 보존적 아미노산 치환) 및/또는 C-말단의 리신 및/또는 아르기닌의 결실 또는 치환을 포함한다.
- [0083] 본 발명자들은 또한 가변 영역을 포함하는 단백질이 N-말단에서 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함하도록 변형되었다. 이 잔기는 그것에 화합물의 자리 특이적 컨주게이션을 허용한다. N-말단 세린/트레오닌 돌연변이와 상기 논의한 시스템 돌연변이를 조합함으로써, 본 발명자들은 그것들이 적어도 2개의 상이한 화합물을 컨주게이트할 수 있는 단백질을 생성하였다.
- [0084] 따라서, 본 발명의 예는 적어도 하나의 N-말단 트레오닌 또는 세린 잔기를 추가적으로 포함하는 본 발명의 단백질을 제공한다. 세린 또는 트레오닌 잔기는 단백질의 N-말단에 추가될 것이다(즉, 단백질의 서열에 추가된다). 바람직하게, 세린 또는 트레오닌 잔기는 본 단백질의 N-말단에서 자연적으로 발생하는 아미노산 잔기를 대체하며, 즉 치환적 돌연변이의 결과이다. 선택적으로, 트레오닌 또는 세린 잔기는 상기 설명된 화합물과 같은 화합물에 연결되되, 화합물의 컨주게이션은 항원에 단백질의 결합을 막지 않는다.
- [0085] 한 예에서, 본 발명의 단백질은 시스템 잔기 중 적어도 하나에 컨주게이트된 제1 화합물 및 트레오닌 또는 세린 잔기에 컨주게이트된 제2 화합물을 포함하되, 제2 화합물은 제1 화합물과 상이하다.
- [0086] 한 예에서, 임의의 예에 따라서 본 명세서에서 설명된 단백질은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 컨주게이트된다. 한 예에서, PEG는 단분산된(monodispersed) PEG이다. 한 예에서, 단분산된 PEG는 48개 이하의 에틸렌 글리콜 단위, 예컨대 약 24개의 에틸렌 글리콜 단위를 가진다.
- [0087] 본 발명의 단백질의 예는 서열 번호: 59, 61, 63 또는 65 중 임의의 하나에서 설명된 서열과 80% 또는 90% 또는 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함하며, FR2 및/또는 FR3 내에 위치한 2 이상을 포함하도록 변형된다. 변형에 적합한 자리는 본 명세서에서 설명되며 또한 필요한 변경을 가하여 본 발명의 본 예에 적용되는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 단백질은 선택적으로 N-말단의 세린 잔기를 포함하는 서열 번호: 83, 85, 87 또는 89에서 설명된 서열과 적어도 약 80% 또는 90% 또는 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.
- [0088] 한 예에서, 본 단백질 TAG72에 결합하며, 서열 번호: 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117 또는 119에서 설명된 서열과 적어도 약 80% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 V_L 을 포함한다.
- [0089] 다른 예에서, 본 단백질은 Her2에 결합하며 서열 번호: 127, 129, 141, 143, 145, 147 또는 149 중 하나 이상에서 설명된 서열과 적어도 약 80% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 V_L 을 포함한다.
- [0090] 다른 예에서, 본 단백질은 MUC1에 결합하며, 서열 번호: 131, 133, 135, 137 또는 139 중 하나 이상에서 설명된 서열과 적어도 약 80% 동일한 서열을 포함하는 V_H 및 V_L 을 포함한다.
- [0091] 한 예에서, 본 발명의 단백질은 인간, 인간화된, 탈면역화된 또는 키메라이다.
- [0092] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0093] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질을 암호화하는 분리된 핵산을 포함한다. 예시적인 핵산은 서열 번호: 58, 60, 62 또는 64 중 임의의 하나 이상에 설명된 서열과 적어도 약 80% 또는 90% 또는 95% 또는 96% 또는 97% 또는

98% 또는 99% 또는 100% 동일하며, 암호화된 단백질의 FR2 및/또는 FR3 내 적어도 2개의 시스테인 잔기를 암호화하는 코돈을 포함하도록 변경된 서열을 가지는 것을 포함하며, 선택적으로 N-말단의 세린 또는 트레오닌 잔기를 포함한다. 한 예에서, 본 발명의 핵산은 서열 번호: 82, 84, 86 또는 88 중 임의의 하나 이상에서 설명된 서열과 적어도 약 80% 또는 90% 또는 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 당업자는 코돈 용도의 축중(degeneracy)에 기인하여, 다수의 뉴클레오타이드 서열이 본 발명의 단백질을 암호화할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 모든 이러한 뉴클레오타이드 서열은 본 발명에 의해 포함된다. 예를 들어, 코돈 최적화된 핵산이 특이적 세포형 또는 유기체에서 발현을 용이하게 하기 위하여 생성될 수 있다.

[0094] 본 발명의 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결됨으로써 발현 구성체를 생성할 수 있다. 이러한 발현 구성체 또는 핵산은 벡터 내에, 바람직하게는 세포 내의 복제가능한 벡터, 예를 들면 플라스미드 또는 파지미드(phagemid) 또는 코스미드(cosmid) 또는 인공 염색체 내에 바람직하게 포함된다.

[0095] 본 발명은 또한 본 발명의 외인성(exogenous) 핵산 또는 발현 구성체를 포함하는 분리된 세포를 제공하되, 바람직하게는 본 세포는 본 발명의 단백질을 발현시킨다. 예시적인 세포는 이에 제한되는 것은 아니지만, 박테리아 세포, 효모 세포, 포유류 세포 또는 곤충 세포를 포함한다.

[0096] 본 발명에 의해 제공되는 핵산 및/또는 발현 구성체 및/또는 세포는 또한 본 발명의 단백질의 제조방법에 대한 기초를 제공한다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 단백질의 생성방법을 제공하며, 본 방법은 생성되는 암호화된 단백질에 대해 충분한 조건 하에서 본 발명의 발현 구성체를 유지하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본 방법은 상기 암호화된 단백질이 생성되도록 하기에 충분한 조건 하에서 본 발명의 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 한 예에서, 본 방법은 단백질을 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 본 방법은, 예를 들어 결합 활성 또는 친화도를 위해 단백질을 시험하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 방법은 단백질을 약제학적 조성물로 조제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0097] 본 방법은 또한 본 발명의 단백질을 포함하는 컨쥬게이트의 제조방법을 제공하며, 본 방법은:

[0098] (i) FR2 및/또는 FR3 내에 위치된 적어도 두 개의 시스테인 잔기를 포함하는 본 발명의 단백질을 얻는 단계; 및

[0099] (ii) 적어도 하나의 시스테인 잔기에 화합물을 컨쥬게이트함으로써 컨쥬게이트를 생성하는 단계를 포함한다.

[0100] 한 예에서, (i)에서 얻은 단백질 내 시스테인 잔기는 이황화 결합에 의해 연결되고, 본 방법은 시스테인 잔기(들)에 화합물을 연결하기 전 이황화 결합을 환원시키거나 달리 파괴하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게, 이황화 결합을 환원시키거나 달리 파괴하는 단계는 단백질 내 유리 티올 기를 만들고, 화합물은 티올 반응기를 가진다. 화합물과 티올 반응성 기를 반응시킴으로써, 컨쥬게이트가 생성된다.

[0101] 한 예에서, 본 화합물은 말레이미드를 사용하여 단백질에 컨쥬게이트된다. 예를 들어, 본 단백질은 컨쥬게이션이 일어나도록 말레이미드 작용기를 포함하는 화합물과 접촉된다.

[0102] 본 발명의 추가 예에서, 단백질은 적어도 하나의 N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 선택적으로 포함하고, 본 방법은 세린 또는 트레오닌 잔기에 화합물을 컨쥬게이션하는 단계를 포함한다. 바람직하게, 세린 또는 트레오닌에 컨쥬게이트된 본 화합물은 시스테인 잔기(들)에 컨쥬게이션된 화합물과 상이하다.

[0103] 본 발명의 본 발명의 단백질을 포함하는 컨쥬게이트를 제조하기 위한 대안의 방법을 제공하며, 본 방법은:

[0104] (i) N-말단 트레오닌 또는 세린 잔기를 포함하는 본 발명의 단백질을 얻는 단계; 및

[0105] (ii) 단백질의 N-말단에서 적어도 하나의 세린 또는 트레오닌 잔기에 화합물을 컨쥬게이트함으로써 컨쥬게이트를 생성하는 단계를 포함한다.

[0106] 선택적으로, 컨쥬게이트를 제조하기 위한 본 발명의 방법은 컨쥬게이트를 분리하는 단계 및/또는 컨쥬게이트를 약제학적 조성물로 조제하는 단계를 추가적으로 포함한다.

[0107] 본 발명자들이 병든 세포, 조직 또는 기관(예를 들어, 암)에 독성 화합물 또는 방사성동위원소의 전달 및/또는 생체내 이미징 및/또는 단백질의 안정성을 증가시키는 것을 포함하는 다양한 용도에 유용한 시약을 제조한 것은 당업자에게 명백할 것이다.

[0108] 따라서, 본 발명은 또한 약제에서 본 발명의 단백질 또는 조성물의 사용을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 질환을 치료하거나 예방하기 위한 약제의 제조에서 본 발명의 단백질의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 피험자에서 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제공하며, 본 방법은 필요한 피험자에 본 발명의 단백질 또는 조성물

을 투여하는 단계를 포함한다. 예시적인 질환은 본 명세서에서 설명되며, 필요한 변경을 가하여 본 발명의 본 예에 적용되는 것으로 여겨진다. 나아가 본 발명 단백질의 예시적인 컨쥬게이트된 형태는 본 명세서에서 설명되며 필요한 변경을 가하여 본 발명의 본 예에 적용되는 것으로 여겨진다.

- [0109] 본 발명은 추가적으로 세포에 화합물을 전달하기 위한 방법을 제공하며, 본 방법은 화합물 또는 그것을 포함하는 조성물에 컨쥬게이트된 본 발명의 단백질과 세포를 접촉하는 단계를 포함한다. 한 예에서, 세포는 단백질을 포함하는 조성물을 피험자에 투여하는 단계에 의해 접촉된다.
- [0110] 본 발명은 또한 피험자에서 항원의 위치를 찾아내거나 검출하는 것과 같은 이미징 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0111] (i) 단백질이 항원에 결합하기에 충분한 시간 동안 및 조건 하에서 본 발명의 단백질을 피험자에게 투여하되, 단백질은 검출가능한 표지에 컨쥬게이트되는 단계; 및
- [0112] (ii) 생체내 검출가능한 표지의 위치를 찾아내거나 검출하는 단계를 포함한다.
- [0113] 당업자는 상술한 방법이 항원을 발현시키는 종양과 같은 세포, 조직 및 기관 또는 그것의 부분의 위치를 찾아내거나 검출하는데 유용하다는 것을 인식할 것이다. 예시적인 항원은 본 명세서를 통해 설명되고, 필요한 변경을 가하여 본 발명의 본 예에 적용되는 것으로 여겨진다.
- [0114] 본 발명은 또한 피험자 내 질환을 진단하거나 예측하기 위한 방법을 제공하며, 본 방법은 단백질이 항원에 결합하고 복합체를 형성하기에 충분한 시간 동안 및 조건 하에서 피험자로부터의 샘플을 본 발명의 단백질 또는 조성물과 접촉하는 단계 및 복합체를 검출하는 단계를 포함하되, 복합체의 검출은 질환에 대해 진단적 또는 예측적이다. 바람직하게, 단백질은 검출가능한 표지에 컨쥬게이트되고, 표지의 검출은 복합체를 표시한다.
- [0115] 한 예에서, 본 방법은 복합체의 수준을 결정하는 단계를 포함하되, 대조군 샘플과 비교하여 상기 복합체의 증진된 또는 감소된 수준은 질환에 대해 진단적 또는 예측적이다.
- [0116] 본 발명은 추가적으로 본 발명의 다수의 단백질을 포함하는 라이브러리를 제공한다. 한 예에서, 단백질은 입자(예를 들어, 과립 또는 리보솜) 또는 세포 표면 상에서 보여진다. 분명하게도, 본 발명은 또한 본 발명의 복수 개의 단백질을 포함하는 상기 라이브러리를 암호화하는 핵산의 라이브러리를 제공한다.
- [0117] 본 발명은 본 발명의 단백질을 분리하는 방법을 제공하며, 본 방법은 단백질이 항원에 결합하기에(또는 그 결과로 결합하도록) 충분한 시간 동안 및 조건 하에서 본 발명의 라이브러리를 항원과 접촉시키는 단계 및 단백질을 분리하는 단계를 제공한다.
- [0118] 본 발명은 부가적으로 본 발명의 복수 개의 단백질을 포함하는 라이브러리를 제공하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0119] (i) 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 복수 개의 단백질은 암호화하는 핵산을 얻거나 제조하는 단계로서, 가변 영역은 FR2 및/또는 FR3 내에 위치된 적어도 2개의 시스테인 잔기 및, 선택적으로 N-말단의 트레오닌 또는 세린 잔기를 포함하는 단계;
- [0120] (ii) 다음의 작동가능하게 연결된 핵산을 포함하는 발현 구성체의 라이브러리를 제조하는 단계:
- [0121] a) 프로모터;
- [0122] b) (i)에서 얻은 또는 제조된 핵산; 및
- [0123] c) 세포 또는 입자 내에서/상에서 단백질을 함유하는 가변 영역의 표시를 용이하게 하는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산; 및
- [0124] (iii) 그것들이 세포 또는 입자 내에서/상에서 표시되도록 발현 구성체에 의해 암호화되는 단백질을 발현하는 단계를 포함한다.
- [0125] 시스테인 잔기 및/또는 트레오닌 또는 세린 잔기를 위치시키기 위한 적당한 자리는 본 명세서에서 설명되며, 필요한 변경을 가하여 본 발명의 본 예에 적용되는 것으로 여겨진다.
- [0126] 한 예에서, 본 단백질의 CDR 내 아미노산은 무작위 또는 반무작위(semi-random)이거나 인간 항체로부터 유래된다.
- [0127] 한 예에서, 본 방법은 본 단백질을 암호화하는 핵산을 분리하는 단계를 포함한다. 이러한 핵산은 발현 구성체에

도입될 수 있다. 선택적으로, 단백질이 발현될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0128]

도 1a는 Kabat 잔기 8 내지 11에서 V_L 프레임워크 내 아미노산이 시스테인으로 변환된(인실리코(*in silico*)) AVP04-50에 대해 만들어진 분자 모델을 나타내는 다이어그램.

도 1b는 다이어그램 AVP04-50의 V_L 프레임워크 1 Kabat 잔기 8 내지 11(검정색으로 채운 공간)에서 항원 결합 도메인(음영) 및 시스테인 치환체 돌연변이 항체가 공간 중에서 서로 떨어져 있다는 것을 나타내는 다이어그램.

도 2a는 AVP04-50 His-Tag 친화도 크로마토그래피 정제의 280 nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다.

도 2b는 AVP04-50의 양이온 정제의 결과를 나타내는 그래프. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다.

도 2c는 AVP04-50의 크기 배제 크로마토그래피의 결과를 나타내는 그래프. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 관심 부분을 보여준다.

도 2d는 AVP04-50의 정제 후 크기 배제 크로마토그래피의 결과를 나타내는 그래프. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다.

도 2e는 정제 후 AVP04-50의 순도를 나타내는 환원성 SDS-PAGE의 결과를 나타내는 그래프의 사본. MW. 마커. 화살표는 AVP04-07 단백질을 나타낸다.

도 3a는 AVP04-07(점선) 및 항원 소 턴밀샘 뮤신(bovine submaxillary mucin : BSM)(검정색 선)에 복합체화된 AVP04-07의 컬럼 이동 분석 결과를 나타내는 그래프(TAG72를 함유).

도 3b는 AVP04-50(점선) 및 항원 BSM(검정색 선)에 복합체화된 AVP04-50의 컬럼 이동 분석의 결과를 나타내는 그래프(TAG72를 함유).

도 3c는 AVP07-17(점선) 및 항원 HER2(재조합 HER2 엑토도메인)(검정색 선)에 복합체화된 AVP07-17의 컬럼 이동 분석 결과를 나타내는 그래프.

도 3d는 AVP07-63(점선) 및 항원 HER2(재조합 HER2 엑토도메인)에 복합체화된 AVP07-63(검정색 선)의 컬럼 이동 분석 결과를 나타내는 그래프.

도 4는 항원 BSM(TAG72를 함유)와 복합체화된 자리 특이적으로 유포름 표지된 AVP04-50 및 AVP04-50의 컬럼 이동 분석 결과를 나타내는 그래프. Eu-AVP04-50/TAG72 복합체가 14분에 용리하는 경우, 유포름은 각 부분에서 추적되어 피크 이동을 결정한다.

도 5a는 SDS-PAGE를 사용하여 재용해된 폐쇄화된 AVP04-50을 나타내는 사진의 사본. MW. 마커, 1. 네이키드 AVP04-50, 2. AVP04-50-PEG2000-NH₂.

도 5b는 AVP04-50-PEG2000의 겔 여과 용리 결과(검정색 선)를 나타내는 그래프.

도 5c는 AVP04-50-PEG2000(점선) 및 항원 BSM(TAG72를 함유)과 복합체화된 AVP04-50-PEG2000(검정색 선)의 컬럼 이동 분석 결과를 나타내는 그래프.

도 6a는 본 발명의 일부 예에 따르는 프레임워크 영역 FR2 내 시스테인 잔기 위치의 다이어그램. 원으로 표시된 "S"는 대부분의 포유류 항체 가변 (V)-도메인에 존재하는 보존적 시스테인 잔기(들)을 나타내는 한편, 원이 없는 "S"는 FR2 내 본 발명의 시스테인 잔기를 나타낸다.

도 6b는 본 발명의 일부 예에 따라서 FR3로 시스테인 잔기의 일부 변형 및 삽입을 나타내는 다이어그램. 원으로 표시된 "S"는 대부분의 포유류 항체 (V)-도메인에 존재하는 보존적 시스테인 잔기(들)을 나타내는 한편, 원이 없는 "S"는 본 발명의 시스테인 잔기를 나타낸다. 한 예에서, C2에 도식되는 상황은 본 발명에 포함되지 않는다.

도 7은 인실리코 상동성 모델화된, 비돌연변이 AVP04-07 다이어그램(서열 번호: 59에서 설명한 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함)를 나타내는 다이어그램. 돌연변이에서 확인되는 잠재적 이황화물 삽입 잔기는 화살표로 나타낸다.

도 8은 인실리코 상동성 모델화된, 비돌연변이 AVP07-17 다이어그램(서열 번호: 61에서 설명한 서열을 포함하는

폴리펩티드를 포함)를 나타내는 다이어그램. 돌연변이에서 확인되는 잠재적 이황화물 삽입 잔기는 화살표로 나타낸다.

도 9는 인실리코 상동성 모델화된, 비돌연변이 AVP02-60 다이어그램(서열 번호: 63에서 설명한 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함)를 나타내는 다이어그램. 돌연변이에서 확인되는 잠재적 이황화물 삽입 잔기는 화살표로 나타낸다.

도 10a는 a) 프레임워크 영역에 의해 배열된 최소 제곱을 나타낸, 각각의 AVP02-60 다이어그램 모델로부터의 Fv(AVP04-07, 돌연변이 c5를 모델링하는 AVP04-xx 및 돌연변이 c6를 모델링하는 AVP04-xx)를 나타내는 일련의 다이어그램 표현. 모든 FR2 시스테인 돌연변이체 측쇄는 공과 막대(ball and stick)로서 나타낸다. b)는 a에서 모델링된 Avibody에 대한 FR2 영역만을 나타낸다. c)는 비교를 위해 나란히 V_H FR2 영역과 그것의 돌연변이를 나타낸다. d)는 비교를 위해 나란히 V_L FR2 영역 및 그것의 돌연변이를 나타낸다. c) 및 d)는 참고 목적을 위해 또한 Kabat 잔기 수 및 모델링 돌연변이 수(c5, c6)로 라벨을 붙인다.

도 10b는 각각의 AVP04-xx 다이어그램 모델(AVP04-07, 돌연변이 c4를 모델링하는 AVP04-xx, 돌연변이 c8을 모델링하는 AVP04-xx 및 돌연변이 c9를 모델링하는 AVP04-xx)로부터 Fv를 나타내는 일련의 다이어그램 표현, 프레임워크 영역과 공과 막대로 나타낸 시스테인 돌연변이체 측쇄에 의해 배열된 최소 제곱을 나타낸다. b)는 a에서 모델링한 Avibody만에 대한 FR3 영역을 나타낸다. c)는 비교를 위해 나란히 V_H FR3 영역과 그것의 돌연변이를 나타낸다. d)는 비교를 위해 나란히 V_L FR3 영역과 그것의 돌연변이를 나타낸다. c) 및 d)는 또한 참고 목적을 위해 Kabat 잔기 수 및 모델링 돌연변이 수(c4, c8, c9)로 라벨을 붙인다.

도 11은 각 개개의 후보자 시스테인 치환이 V_H - V_L 배향(각 시리즈에서 제1 컬럼)에서 AVP04-xx 다이어그램, -1 잔기 링커(각 시리즈에서 제2 컬럼)를 가지는 V_H - V_L 배향에서 AVP04-xx 트라이아바디, 0-잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향에서 AVP04-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제3 컬럼), 1LMK 다이어그램(각 시리즈에서 제4 컬럼)에서 모델링된 Fv 공간 배향과 V_H - V_L 배향에서 AVP04-xx 다이어그램, 1MOE 다이어그램(각 시리즈에서 제5 컬럼) 상에서 모델링된 Fv 공간 배향을 가지는 V_H - V_L 배향에서 AVP04-xx 다이어그램, 1 잔기 링커(각 시리즈에서 제6 컬럼)를 가지는 V_H - V_L 배향에서 AVP04-xx 트라이아바디 및 2 잔기 링커(각 시리즈에서 제7 컬럼 및 마지막 컬럼)를 가지는 V_H - V_L 배향에서 AVP04-xx 트라이아바디의 모델을 고려하여 플롯팅된 접근가능한 표면 영역(Accessible Surface Areas : ASA) 값의 그래프. c6에 의해 설계된 모델링 돌연변이는 H39-H43 및 L38-L42 이황화물 돌연변이 및 유사하게 c5 H39-H45/L38-L44, c8 H70-H79/L65-L72, c9 H72-H75 및 c4 H82C-H86/L78-L82를 함유한다. 에러바(error bar)는 다이어그램에 대해 $n = 20$ 및 트라이아바디에 대해 $n = 30$ 의 ASA 값으로 표준 편차를 나타낸다.

도 12a는 a) 프레임워크 영역에 의해 배열된 최소제곱을 나타낸 각각의 AVP02-xx 다이어그램 모델(AVP02-60, 모델링 돌연변이 c5를 가지는 AVP02-xx 및 모델링 돌연변이 c6를 가지는 AVP02-xx)로부터의 Fv를 나타내는 일련의 다이어그램 표현. 모든 FR2 시스테인 돌연변이체 측쇄는 공과 막대로서 나타낸다. b)는 A에서 모델링한 Avidodies에 대한 FR2 영역만을 나타낸다. c)는 비교를 위해 나란히 V_H FR2 영역과 그것의 돌연변이를 나타낸다. d)는 비교를 위해 나란히 V_L FR2 영역 및 그것의 돌연변이를 나타낸다. c) 및 d)는 또한 참고 목적을 위해 또한 Kabat 잔기 수 및 모델링 돌연변이 수(c5, c6)로 라벨을 붙인다.

도 12b는 프레임워크 영역 및 공과 막대로서 나타낸 시스테인 돌연변이체 측쇄에 의해 배열된 최소제곱을 나타낸 각각의 AVP02-xx 다이어그램 모델(AVP02-60, 모델링 돌연변이 c4를 가지는 AVP02-xx, 모델링 돌연변이 c8을 가지는 AVP02-xx 및 모델링 돌연변이 c9를 가지는 AVP02-xx)로부터의 Fv를 나타내는 일련의 다이어그램 표현. b)는 단지 A에서 모델링된 Abibodies에 대한 FR3 영역을 나타낸다. c)는 비교를 위해 나란히 V_H FR3 영역 및 그것의 돌연변이를 나타낸다. d)는 비교를 위해 나란히 V_L FR3 영역 및 그것의 돌연변이를 나타낸다. c) 및 d)는 또한 참고 목적을 위해 Kabat 잔기 수 및 모델링 돌연변이 수(c4, c8, c9)로 라벨을 붙인다.

도 13a는 프레임워크 영역에 의해 배열된 최소제곱을 나타낸, 각각의 AVP07-xx 다이어그램 모델(AVP07-17, 모델링 돌연변이 c5를 가지는 AVP07-xx 및 모델링 돌연변이 c6를 가지는 AVP07-xx)로부터의 Fv를 나타내는 일련의 다이어그램 표현. 모든 FR2 시스테인 돌연변이체 측쇄는 공과 막대로서 나타낸다. B)는 단지 A에서 모델링한 Abibodies에 대한 FR2 영역을 나타낸다. C)는 비교를 위해 나란히 V_H FR2 영역과 그것의 돌연변이를 나타낸다.

D)는 비교를 위해 나란히 V_L FR2 영역 및 그것의 돌연변이를 나타낸다. C) 및 D)는 또한 참고 목적을 위해 Kabat 잔기 수 및 모델링 돌연변이 수(c5, c6)로 라벨을 붙인다.

도 13b는 프레임워크 영역 및 공과 막대로서 나타난 시스테인 돌연변이체 측쇄에 의해 배열된 최소제곱을 나타낸 각각의 AVP07-xx 다이아바디 모델(AVP07-17, 모델링 돌연변이 c4를 가지는 AVP07-xx, 모델링 돌연변이 c8을 가지는 AVP07-xx 및 모델링 돌연변이 c9를 가지는 AVP07-xx)로부터의 Fv를 나타내는 일련의 다이어그램 표현. b)는 단지 A에서 모델링된 Abibodies에 대해 FR3 영역을 나타낸다. c)는 비교를 위해 나란히 V_H FR3 영역 및 그것의 돌연변이를 나타낸다. d)는 비교를 위해 나란히 V_L FR3 영역 및 그것의 돌연변이를 나타낸다. c) 및 d)는 또한 참고 목적을 위해 Kabat 잔기 수 및 모델링 돌연변이 수(c4, c8, c9)로 라벨을 붙인다.

도 14는 각 개개의 후보자 시스테인 치환이 V_H - V_L 배향에서 AVP02-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제1 컬럼), -1 잔기 링커(을 가지는 V_H - V_L 배향에서 AVP02-xx 트라이아바디각 시리즈에서 제2 컬럼), 0-잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향에서 AVP02-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제3 컬럼), 1LMK 다이아바디에서 모델링된 Fv 공간 배향을 가지는 V_L - V_H 배향에서 AVP02-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제4 컬럼), 1MOE 다이아바디에서 모델링된 Fv 공간 배향을 가지는 V_L - V_H 배향에서 AVP02-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제5 컬럼), 1 잔기 링커를 가지는 V_L - V_H 배향에서 AVP02-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제6 컬럼) 및 2 잔기 링커를 가지는 V_L - V_H 배향에서 AVP02-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제7 및 마지막 컬럼)의 모델에 대해서 플롯팅된 접근가능한 표면 영역(ASA) 값을 나타내는 그래프 표현. c6에 의해 지정된 모델링 돌연변이는 H39-H43 및 L38-L42 이황화물 돌연변이 및 유사하게 c5 H39-H45/L38-L44, c8 H70-H79/L65-L72, c9 H72-H75 및 c4 H82C-H86/L78-L82를 함유한다. 에러바는 다이아바디에 대해 $n = 20$ 및 트라이아바디에 대해 $n = 30$ 의 ASA 값으로 표준편차를 나타낸다.

도 15는 V_H - V_L 배향에서 AVP07-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제1 컬럼), -1 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향에서 AVP07-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제2 컬럼), 0-잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향에서 AVP07-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제3 컬럼), 1LMK 다이아바디에서 모델링된 Fv 공간 배향을 가지는 V_L - V_H 배향에서 AVP07-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제4 컬럼), 1MOE 다이아바디에서 모델링된 Fv 공간 배향과 함께 V_L - V_H 배향에서 AVP07-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제5 컬럼), 1 잔기 링커를 가지는 V_L - V_H 배향에서 AVP07-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제6 컬럼) 및 2 잔기 링커를 가지는 V_L - V_H 배향에서 AVP07-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제7 컬럼 및 마지막 컬럼)의 모델에 대해 플롯팅한 각 개개의 후보자 시스테인 치환에 대해 접근가능한 표면 영역(ASA) 값을 나타내는 그래프 표현. c6에 의해 지정된 모델링 돌연변이는 H39-H43 및 L38-L42 이황화물 돌연변이 및 유사하게 c5 H39-H45/L38-L44, c8 H70-H79/L65-L72, c9 H72-H75 및 c4 H82C-H86/L78-L82를 함유한다.

에러바는 다이아바디에 대해 $n = 20$ 및 트라이아바디에 대해 $n = 30$ 을 가지는 ASA 값의 표준편차를 나타낸다.

도 16은 Abibody 모델로부터 유래한 천연 및 시스테인 돌연변이된 V 도메인에 대한 평균평방근편차(Root Mean Squared Deviations : RMSD)의 그래프 표현, H 또는 L- V_H V_L D 5, H 또는 L- V_H V_L T -1, H 또는 L- V_H V_L T 0, H 또는 L- V_L V_H D 1mk5, H 또는 L- V_L V_H D moe5, H 또는 L- V_L V_H T 1 및 H 또는 L- V_L V_H T 2는 실시예 9.8에서 설명되는 한정된 구성체 그룹으로부터의 V_H 또는 V_L 도메인이다. 모든 Avibody 모델을 모든 다른 천연(비티올화) Avibody 모델(각 구성체 그룹에서 제1 컬럼)과 비교하였고, 후속하여 모델링 돌연변이 c6(H39-H43/L38-L42, 각 구성체 그룹에서 제2 막대), 모델링 돌연변이 c5(H39-H45/L38-L44, 각 구성체 그룹에서 제3 막대), 모델링 돌연변이 c8(H70-H79/L65-L72, 각 구성체 그룹에서 제4 막대), 모델링 돌연변이 c9(H72-H75, 각 구성체 그룹에서 제5 막대) 및 모델링 돌연변이 c4(H82C-H86/L78-L82, 각 구성체 그룹에서 제6 및 최종 막대)로 산출된 모든 모델과 비교하였다. 에러바는 다이아바디에 대해 $n = 40$ 및 트라이아바디에 대해 $n = 90$ 을 가지는 RMSD 값에 대한 표준편차를 나타낸다.

도 17a는 AVP04-111(서열 번호: 107)의 His-태그 고정된 금속 친화도 크로마토그래피 정제의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 17b는 AVP04-120(서열 번호: 113)의 His-태그 고정된 금속 친화도 크로마토그래피 정제의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 17c는 AVP04-121(서열 번호: 115)의 His-태그 고정된 금속 친화도 크로마토그래피 정제의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 18a는 AVP04-111(서열 번호: 107)의 음이온 크로마토그래피 정제의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 18b는 AVP04-120(서열 번호: 113)의 음이온 크로마토그래피 정제의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 18c는 AVP04-121(서열 번호: 115)의 음이온 크로마토그래피 정제의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 19a는 AVP04-111(서열 번호: 107)의 겔 여과 크로마토그래피 정제의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 19b는 AVP04-120(서열 번호: 113)의 겔 여과 크로마토그래피 정제의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 19c는 AVP04-121(서열 번호: 115)의 겔 여과 크로마토그래피 정제의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 20a는 AVP04-111(서열 번호: 107)의 크기 배제 크로마토그래피 분석의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 20b는 AVP04-120(서열 번호: 113)의 크기 배제 크로마토그래피 분석의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 20c는 AVP04-121(서열 번호: 115)의 크기 배제 크로마토그래피 분석의 280nm 크로마토그래프를 나타내는 그래프 표현. 화살표는 관심의 용리 피크를 나타낸다. 점선은 용리 버퍼의 관심 부분을 보여준다.

도 21a 및 b는 크기 배제 크로마토그래피 후 본 명세서에서 언급된 정제된 Avibodies의 일련의 그래프 표현(표시된 명명법은 본문과 서열목록을 통해 사용된 것에 대응한다).

도 22a 및 b는 본 명세서에서 언급된 Avibodies의 면역활성을 결정하기 위하여 사용된 컬럼 이동 분석의 일련의 그래프 표현(표시된 명명법은 본문과 서열목록을 통해 사용된 것에 대응한다). 각 그래프는 항원의 존재(실선) 또는 부재(점선) 중 하나에서 인큐베이션된 Avibody의 2개의 오버레이된 크기 배제 크로마토그래피 프로파일을 포함한다.

도 23a 및 도 23b는 a) 대조군 Avibody 단백질 및 무결함 IgG 및 b) 유전자 조작 시스테인 치환 돌연변이를 수행하는 Avibody 단백질에 대한 Ellman 분석에 의한 단백질의 티올 반응성의 일련의 그래프 표현. 검정색 수평선은 TCEP의 환원 전 및 후 티올 반응성의 1:1 비를 나타낸다.

도 24는 폐길화된(PEGylated) 샘플(AVP04-111(서열 번호: 107), AVP04-120(서열 번호: 113) 및 AVP04-121(서열 번호: 115))의 전자분무이온화 질량 분석법(electrospray ionization mass spectrometry) 후 MS 스펙트럼의 그래프 표현.

도 25a 및 도 25b는 본 명세서에서 언급된 폐길화된 Avibody 단백질의 면역반응성을 결정하기 위해 사용된 컬럼 이동 분석을 나타내는 일련의 그래프 표현(표시된 명명법은 본문과 서열목록을 통해 사용된 것에 대응한다). 각 그래프는 항원의 존재(실선) 및 부재(점선) 중 하나에서 인큐베이션된 Avibody-PEG 컨쥬게이트의 2개의 오버레이된 크기 배제 크로마토그래피 프로파일을 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열목록에 대한 요지

[0129]

서열 번호: 1 - 인간 항체 중쇄의 FR2의 아미노산 서열;

[0130]

서열 번호: 2 - 인간 항체 중쇄의 FR2의 아미노산 서열;

[0131]

서열 번호: 3 - 인간 항체 중쇄의 FR2의 아미노산 서열;

[0132]

- [0133] 서열 번호: 4 - 인간 항체 중쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0134] 서열 번호: 5 - 인간 항체 중쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0135] 서열 번호: 6 - 인간 항체 중쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0136] 서열 번호: 7 - 인간 항체 중쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0137] 서열 번호: 8 - 인간 항체 중쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0138] 서열 번호: 9 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0139] 서열 번호: 10 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0140] 서열 번호: 11 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0141] 서열 번호: 12 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0142] 서열 번호: 13 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0143] 서열 번호: 14 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0144] 서열 번호: 15 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0145] 서열 번호: 16 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0146] 서열 번호: 17 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0147] 서열 번호: 18 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0148] 서열 번호: 19 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0149] 서열 번호: 20 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0150] 서열 번호: 21 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR2의 아미노산 서열;
- [0151] 서열 번호: 22 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0152] 서열 번호: 23 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0153] 서열 번호: 24 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0154] 서열 번호: 25 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0155] 서열 번호: 26 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0156] 서열 번호: 27 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0157] 서열 번호: 28 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0158] 서열 번호: 29 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0159] 서열 번호: 30 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0160] 서열 번호: 31 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0161] 서열 번호: 32 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0162] 서열 번호: 33 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0163] 서열 번호: 34 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0164] 서열 번호: 35 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0165] 서열 번호: 36 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0166] 서열 번호: 37 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0167] 서열 번호: 38 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0168] 서열 번호: 39 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;

- [0169] 서열 번호: 40 - 인간 항체 중쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0170] 서열 번호: 41 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0171] 서열 번호: 42 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0172] 서열 번호: 43 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0173] 서열 번호: 44 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0174] 서열 번호: 45 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0175] 서열 번호: 46 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0176] 서열 번호: 47 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0177] 서열 번호: 48 - 인간 항체 κ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0178] 서열 번호: 49 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0179] 서열 번호: 50 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0180] 서열 번호: 51 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0181] 서열 번호: 52 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0182] 서열 번호: 53 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0183] 서열 번호: 54 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0184] 서열 번호: 55 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0185] 서열 번호: 56 - 인간 항체 λ 경쇄의 FR3의 아미노산 서열;
- [0186] 서열 번호: 57 - 링커의 아미노산 서열;
- [0187] 서열 번호: 58 - AVP04-07 항-TAG72 다이아바드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- [0188] 서열 번호: 59 - AVP04-07 항-TAG72 다이아바드의 아미노산 서열;
- [0189] 서열 번호: 60 - AVP07-17 항-Her2 다이아바드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- [0190] 서열 번호: 61 - AVP07-17 항-Her2 다이아바드의 아미노산 서열;
- [0191] 서열 번호: 62 - AVP02-60 항-MucI 다이아바드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열;
- [0192] 서열 번호: 63 - AVP02-60 항-MucI 다이아바드의 아미노산 서열;
- [0193] 서열 번호: 64 - CDR3H 시스테인 잔기 Cys104(Kabat 넘버링 H100) 및 Cys109(H100E)를 알라닌으로 치환하는 변형된 AVP07-17 항-HER2 다이아바드를 암호화하며, N-말단의 세린 지정 AVP07-86을 포함하는 뉴클레오티드 서열;
- [0194] 서열 번호: 65 - CDR3H 시스테인 잔기 Cys104(Kabat 넘버링 H100) 및 Cys109(H100E)을 알라닌으로 치환하며 N-말단의 세린 지정 AVP07-86을 포함하는 변형된 AVP07-17 항-HER2 다이아바드의 아미노산 서열;
- [0195] 서열 번호: 66 - AVP04-07에서 N-말단의 Gln 잔기를 Ser 잔기로 치환하는 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0196] 서열 번호: 67 - AVP04-07에서 N-말단의 Gln 잔기를 Ser 잔기로 치환하는 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열;
- [0197] 서열 번호: 68 - AVP04-07의 V_L FR2의 위치 38 및 42에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0198] 서열 번호: 69 - AVP04-07의 V_L FR2의 위치 38 및 42에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0199] 서열 번호: 70 - AVP04-07의 V_L FR2의 위치 38 및 42에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발

프라이머의 뉴클레오티드 서열

- [0200] 서열 번호: 71 - AVP04-07의 V_L FR2의 위치 38 및 42에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0201] 서열 번호: 72 - AVP04-07의 V_L FR3의 위치 78 및 82에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0202] 서열 번호: 73 - AVP04-07의 V_L FR3의 위치 78 및 82에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0203] 서열 번호: 74 - AVP04-07의 V_H FR2의 위치 39 및 43에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0204] 서열 번호: 75 - AVP04-07의 V_H FR2의 위치 39 및 43에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0205] 서열 번호: 76 - AVP04-07의 V_H FR2의 위치 39 및 45에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0206] 서열 번호: 77 - AVP04-07의 V_H FR2의 위치 39 및 45에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0207] 서열 번호: 78 - AVP04-07의 V_H FR3의 위치 82C 및 86에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0208] 서열 번호: 79 - AVP04-07의 V_H FR3의 위치 82C 및 86에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0209] 서열 번호: 80 - AVP04-07의 V_H FR3의 위치 70 및 79에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0210] 서열 번호: 81 - AVP04-07의 V_H FR3의 위치 70 및 79에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0211] 서열 번호: 82 - AVP04-07의 V_H FR3의 위치 72 및 75에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0212] 서열 번호: 83 - AVP04-07의 V_H FR3의 위치 72 및 75에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0213] 서열 번호: 84 - AVP04-07의 V_L FR3의 위치 65 및 72에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0214] 서열 번호: 85 - AVP04-07의 V_L FR3의 위치 65 및 72에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0215] 서열 번호: 86 - scFv 발현을 위한 AVP04-79의 링커 잔기의 변형에 대한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0216] 서열 번호: 87 - scFv 발현을 위한 AVP04-79의 링커 잔기의 변형에 대한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0217] 서열 번호: 88 - scFv 발현을 위한 AVP04-79의 링커 잔기의 변형에 대한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열.
- [0218] 서열 번호: 89 - 트라이아바디 발현을 위한 AVP04-79의 링커 잔기의 변형에 대한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴

클레오티드 서열.

- [0219] 서열 번호: 90 - CDR3H 시스테인 잔기가 AVP07-86 지정된 알라닌으로 치환되는 AVP07-17 항-HER2 다이아바디에 대한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0220] 서열 번호: 91 - CDR3H 시스테인 잔기가 AVP07-86 지정된 알라닌으로 치환되는 AVP07-17 항-HER2 다이아바디에 대한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0221] 서열 번호: 92 - AVP02-60의 V_L FR2에서 위치 38 및 42의 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0222] 서열 번호: 93 - AVP02-60의 V_L FR2의 위치 38 및 42에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0223] 서열 번호: 94 - AVP02-60의 V_L FR2의 위치 39 및 43에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0224] 서열 번호: 95 - AVP02-60의 V_L FR2의 위치 39 및 43에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0225] 서열 번호: 96 - AVP07-86의 V_L FR2의 위치 38 및 42에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0226] 서열 번호: 97 - AVP07-86의 V_L FR2의 위치 38 및 42에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0227] 서열 번호: 98 - AVP07-86의 V_H FR2의 위치 39 및 43에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0228] 서열 번호: 99 - AVP07-86의 V_H FR2의 위치 39 및 43에서 시스테인 잔기 치환을 도입하기 위한 돌연변이 유발 프라이머의 뉴클레오티드 서열
- [0229] 서열 번호: 100 - AVP04-79이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0230] 서열 번호: 101 - AVP04-79이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0231] 서열 번호: 102 - AVP04-80이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 44에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0232] 서열 번호: 103 - AVP04-80이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 44에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0233] 서열 번호: 104 - AVP04-83이 지정된 V_L FR3의 Kabat 위치 78 및 82에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0234] 서열 번호: 105 - AVP04-83이 지정된 V_L FR3의 Kabat 위치 78 및 82에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0235] 서열 번호: 106 - AVP04-111이 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 43에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0236] 서열 번호: 107 - AVP04-111이 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 43에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0237] 서열 번호: 108 - AVP04-112가 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 45에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는

항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열

- [0238] 서열 번호: 109 - AVP04-112가 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 45에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0239] 서열 번호: 110 - AVP04-114가 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 82C 및 86에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0240] 서열 번호: 111 - AVP04-114가 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 82C 및 86에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0241] 서열 번호: 112 - AVP04-120이 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 70 및 79에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열
- [0242] 서열 번호: 113 - AVP04-120이 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 70 및 79에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열.
- [0243] 서열 번호: 114 - AVP04-121이 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 72 및 75에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열.
- [0244] 서열 번호: 115 - AVP04-121이 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 72 및 75에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열.
- [0245] 서열 번호: 116 - AVP04-123이 지정된 V_L FR3의 Kabat 위치 65 및 72에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열.
- [0246] 서열 번호: 117 - AVP04-123이 지정된 V_L FR3의 Kabat 위치 65 및 72에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 다이아바디의 뉴클레오티드 서열.
- [0247] 서열 번호: 118 - AVP04-124가 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 scFv 뉴클레오티드 서열.
- [0248] 서열 번호: 119 - AVP04-124가 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 scFv 뉴클레오티드 서열.
- [0249] 서열 번호: 120 - AVP04-125가 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 트라이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0250] 서열 번호: 121 - AVP04-125가 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-TAG72 트라이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0251] 서열 번호: 122 - AVP02-115가 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0252] 서열 번호: 123 - AVP02-115가 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0253] 서열 번호: 124 - AVP02-116이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 39 및 43에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0254] 서열 번호: 125 - AVP02-116이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 39 및 43에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0255] 서열 번호: 126 - AVP02-117이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0256] 서열 번호: 127 - AVP02-117이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 42에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는

항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.

- [0257] 서열 번호: 128 - AVP02-118이 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 43에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0258] 서열 번호: 129 - AVP02-118이 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 43에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0259] 서열 번호: 130 - AVP02-126이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 44에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0260] 서열 번호: 131 - AVP02-126이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 44에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0261] 서열 번호: 132 - AVP02-127이 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 45에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0262] 서열 번호: 133 - AVP02-127이 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 45에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0263] 서열 번호: 134 - AVP02-128이 지정된 V_L FR3의 Kabat 위치 65 및 72에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0264] 서열 번호: 135 - AVP02-128이 지정된 V_L FR3의 Kabat 위치 65 및 72에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0265] 서열 번호: 136 - AVP02-129가 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 70 및 79에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0266] 서열 번호: 137 - AVP02-129가 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 70 및 79에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0267] 서열 번호: 138 - AVP02-130이 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 72 및 75에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0268] 서열 번호: 139 - AVP02-130이 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 72 및 75에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-MucI 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0269] 서열 번호: 140 - AVP07-131이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 44에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0270] 서열 번호: 141 - AVP07-131이 지정된 V_L FR2의 Kabat 위치 38 및 44에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0271] 서열 번호: 142 - AVP07-132가 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 45에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0272] 서열 번호: 143 - AVP07-132가 지정된 V_H FR2의 Kabat 위치 39 및 45에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0273] 서열 번호: 144 - AVP07-133이 지정된 V_L FR3의 Kabat 위치 65 및 72에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0274] 서열 번호: 145 - AVP07-133이 지정된 V_L FR3의 Kabat 위치 65 및 72에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0275] 서열 번호: 146 - AVP07-134가 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 70 및 79에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는

항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.

- [0276] 서열 번호: 147 - AVP07-134가 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 70 및 79에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0277] 서열 번호: 148 - AVP07-135가 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 72 및 75에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0278] 서열 번호: 149 - AVP07-135가 지정된 V_H FR3의 Kabat 위치 72 및 75에서 시스테인 치환 돌연변이를 포함하는 항-Her2 다이아바디 뉴클레오티드 서열.
- [0279] 서열 번호: 150 - 인간 HER2의 아미노산 서열;
- [0280] 서열 번호: 151 - 인간 PSMA의 아미노산 서열;
- [0281] 서열 번호: 152 - 인간 MUC1의 아이소타이프(isotype)의 아미노산 서열;
- [0282] 서열 번호: 153 - 몇몇 형태의 암에서 발현된 인간 MUC1의 아이소타이프의 아미노산 서열;
- [0283] 서열 번호: 154 - AVP04-50이 지정된 항-HER2 다이아바디의 뉴클레오티드 서열;
- [0284] 서열 번호: 155 - AVP04-50이 지정된 항-HER2 다이아바디의 아미노산 서열;
- [0285] 서열 번호: 156 - AVP07-17이 지정된 항-HER2 다이아바디의 뉴클레오티드 서열; 및
- [0286] 서열 번호: 157 - AVP07-17이 지정된 항-HER2 다이아바디의 아미노산 서열.

[0287] **일반**

- [0288] 본 명세서를 통하여, 특별히 다르게 언급되거나 본 내용이 다르게 요구하지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성물, 단계들의 그룹 또는 물질의 조성물들의 그룹에 대한 참조는 하나 및 복수(즉, 하나 이상)의 그러한 단계들, 물질의 조성물들, 단계들의 그룹 또는 물질의 조성물들의 그룹을 포함하는 것으로 여겨진다.
- [0289] 당업자들은 본 명세서에서 설명된 발명이 특별히 설명된 것 이외의 변화 및 변형에 적용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 본 발명은 그러한 모든 변화 및 변형들을 포함하는 것으로 이해된다. 본 발명은 또한 기재 또는 참조된 모든 단계들, 구성들, 조성물들 및 화합물들을 개별적으로 또는 집합적으로, 및 임의의 및 모든 조합들 또는 임의의 둘 이상의 상기 단계들 또는 구성들을 포함한다.
- [0290] 본 발명은 단지 예시의 목적으로 의도된 본원에 설명된 특정 구체예에 의해 제한되지 않는다. 기능적으로 동등한 생성물, 조성물 및 방법들은 분명히 본 명세서에서 설명되는 바와 같은 본 발명의 범주 내에 있다.
- [0291] 본 명세서의 임의의 구체예는 달리 구체적으로 언급되지 않는다면 필요한 변경을 가하여 임의의 다른 구체예에 적용되는 것으로 여겨진다.
- [0292] 달리 구체적으로 정의되지 않는다면, 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 기술분야에서(예로서, 세포 배양, 분자 유전학, 면역학, 면역조직화학, 단백질 화학, 생화학 및 상동 모델링에서) 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지는 것으로 여겨질 것이다.
- [0293] 달리 기재되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 재조합 단백질, 세포 배양 및 면역학적 기술은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있는 표준 방법이다. 그러한 기술들은 문헌[J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지의 모든 업데이트를 포함), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 및 J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons](현재까지 모든 업데이트를 포함)와 같은 공급 문헌을 통해 기재 및 설명된다.
- [0294] 본 명세서에서 가변 영역 및 그것의 부분, 면역글로불린, 항체 및 그것의 단편의 설명 및 정의는, 예를 들면 문헌[Kabat (1987 및/또는 1991), Bork et al (1994) 및/또는 Chothia and Lesk (1987 and 1989) 또는 AI-

Lazikani et al (1997)]에서의 논의에 의해 더욱 명확하게 될 수 있다.

[0295] 용어 "및/또는", 예를 들어, "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y" 중 하나를 의미하는 것으로 이해될 것이며, 양자의 의미 또는 어느 한 쪽의 의미를 위한 분명한 뒷받침을 제공하는 것으로 여겨진다.

[0296] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 구체적 위치 번호(예를 들어 Kabat 넘버링 시스템에 따라서)를 기반으로 한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드 잔기의 위치를 정의하는 내용 중 용어 "사이"는 두 개의 열거된 잔기들과 2개의 열거된 잔기들 사이에 위치한 임의의 잔기들을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 용어 "잔기 38과 42 사이"는 잔기 38, 39, 40, 41 및 42를 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0297] 본 명세서를 통하여 "포함하다" 또는 변형, 예컨대 "포함하다" 또는 "포함하는"은, 언급된 구성, 성분 또는 단계, 또는 구성들, 성분들 또는 단계들의 그룹의 포함, 그러나 어떤 다른 구성, 성분 또는 단계, 또는 구성들, 성분들 또는 단계들의 그룹에 대한 배제는 아닌 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0298] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "으로부터 유래된"은 특정 완전체 특정 공급원으로부터 얻어질 수 있지만 그 공급원으로부터 필수적으로 직접 유래하는 것으로 이해될 것이다.

[0299] 선택된 정의들

[0300] 본 명세서에서 사용된 것과 같은 용어 "면역글로불린"은 항체 또는 항체관련 단백질을 의미하는 것으로 여겨질 것이다. 당업자는 항체가 일반적으로 복수 개의 폴리펩티드 쇄로 이루어진 가변 영역, 예를 들면 경쇄 가변 영역(V_L) 및 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 단백질로 인식된다는 것을 알 것이다. 항체는 또한 일반적으로 고정 영역 또는 고정 단편 또는 결정화 가능한 단편(fragment crystallisable : Fc)으로 배열될 수 있는 불변 도메인들을 포함한다. 항체들은 하나 또는 수 개의 근접하게 연결된 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일반적으로, 항체들은 그들의 기본 단위로서 4개의 쇄 구조를 포함한다. 전장 항체들은 공유적으로 연결된 2개의 중쇄(~50-70 kD) 및 2개의 경쇄(각각 ~23 kD)를 포함한다. 경쇄는 일반적으로 가변 영역 및 불변 도메인을 포함하며, 포유류에서는 κ 경쇄 또는 λ 경쇄 중 하나이다. 중쇄는 일반적으로 가변 영역 및 부가적인 불변 도메인(들)에 힌지 영역(hinge region)에 의해 연결된 하나 또는 두 개의 불변 도메인(들)을 포함한다. 포유류의 중쇄들은 다음의 α , δ , ϵ , γ , 또는 μ 형 중 하나이다. 각 경쇄는 또한 중쇄 중 하나에 공유적으로 연결된다. 예로서, 2개의 중쇄 및 중쇄 및 경쇄들은 쇄 간 이황화 결합 및 비공유적 상호작용에 의해 서로 보유된다. 쇄 간 이황화 결합의 수는 항체의 다른 형태 중에서 다를 수 있다. 각 쇄는 N-말단 가변 영역(각각이 ~110 아미노산 길이인 V_H 또는 V_L) 및 C-말단에서 하나 이상의 불변 도메인들을 가진다. 경쇄의 불변 도메인(길이가 ~110 아미노산인 C_L)은 중쇄의 제1 불변 도메인(길이가 ~330-440 아미노산인 C_H)과 정렬되거나 이황화 결합된다. 경쇄 가변 영역은 중쇄의 가변 영역과 정렬된다. 항체 중쇄는 2이상의 부가적인 C_H 도메인(예컨대, C_{H2} , C_{H3} 등)을 포함할 수 있고, C_{H1} 과 C_m 불변 도메인 사이에서 확인될 수 있는 힌지 영역을 포함할 수 있다. 항체들은 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 분류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스일 수 있다. 바람직하게, 항체는 무린(마우스 또는 래트) 항체 또는 영장류(바람직하게 인간) 항체이다. 용어 "항체"는 또한 인간화된 항체들, 영장류화된 항체들, 인간 항체들 및 키메라 항체들을 포함한다. 항체에 연관된 단백질 및 그에 따라 용어 "면역글로불린"에 의해 포함되는 것은 도메인 항체들, 카멜리드 항체들 및 연골어류(즉, 면역글로불린 신규 항원 수용체(immunoglobulin new antigen receptors : IgNAR))로부터의 항체들을 포함한다. 일반적으로 카멜리드 항체 및 IgNAR은 V_H 를 포함하지만, V_L 는 결여되어 있으며, 종종 중쇄 면역글로불린으로서 참조된다. 본 명세서에 사용된 것과 같은 용어 "면역글로불린"은 T 세포 수용체들 및 예를 들면 가변 영역을 포함하는 항원 결합 자리를 통해 항원에 결합될 수 없는 단백질을 포함하는 다른 면역글로불린 유사 도메인은 포함하지 않는다. 나아가, 상기 용어 "면역글로불린"은 FR2 및/또는 FR3을 포함하지 않는 면역글로불린 도메인을 포함하는 단백질을 포함하지 않는데, 본 발명은 그러한 단백질로는 수행될 수 없기 때문이다.

[0301] 본 명세서에서 사용되는 "가변 영역"은 CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3, 및 FRs의 아미노산 서열을 포함하는 본 명세서에 정의되는 항체 또는 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄의 부분을 말한다. IgNAR의 경우, 용어 "가변 영역"은 CDR2의 존재를 필요로 하지 않는다. V_H 는 중쇄의 가변 영역을 말한다. V_L 는 경쇄의 가변 영역을 말한다. 본 발명에서 사용된 방법에 따라서, CDR 및 FR로 부여된 아미노산 위치는 Kabat(1987 및 1991)에 따라서 정의된다. 당업자들은 또한 본 발명의 실행에서 다른 넘버링 시스템, 예를 들어 문헌[Chothia and Lesk(1987 및/또는 1989 및/또는 Al-Lazikani et al 1997)]의 과가변성(hypervariable) 루프 넘버링 시스템을 용이하게 사용할 수 있을

것이다.

[0302] 본 명세서에서 사용되는 용어 "중쇄 가변 영역" 또는 " V_H "는 하나 이상의 항원들에 결합가능한, 바람직하게는 하나 이상의 항원들에 특이적으로 결합 가능하고 적어도 FR2 및/또는 FR3을 포함하는 단백질을 의미하는 것으로 여겨진다. 중쇄로부터 예시적인 FR2 및/또는 FR3의 서열이 본 명세서에 제공된다(예를 들어, 서열 번호1 내지 8 또는 22 내지 40을 참조한다). 바람직하게, 중쇄는 3개 또는 4개의 FR(예를 들어, FR1, FR2, FR3 및 선택적으로 FR4)를 3개의 CDR과 함께 포함한다. 바람직하게 중쇄는 Kabat 넘버링 시스템에 따라 넘버링된 다음과 같은 잔기들 1-30(FR1), 31-25(CDR1), 36-49(FR2), 50-65(CDR2), 66-94(FR3), 95-102(CDR3) 및 103-113(FR4)로 위치되는 FR 및 CDR을 포함한다. 한 예에서, 중쇄는 상기 중쇄 및 복수 개의(바람직하게 3 또는 4) 불변 도메인 또는 불변 단편(constant fragment : Fc)에 연결된 면역글로불린으로부터 유래된다.

[0303] 본 명세서에 사용된 용어 "경쇄 가변 영역" 또는 " V_L "은 하나 이상의 항원에 결합할 수 있는, 바람직하게 하나 이상의 항원들에 특이적으로 결합가능하고, 적어도 FR2 및/또는 FR3을 포함하는 하나 이상의 항원에 결합가능한 단백질을 의미하는 것으로 여겨질 것이다. 경쇄로부터의 예시적인 FR2 및/또는 FR3의 서열은 본 명세서에서 제공된다(예를 들어, 서열 번호 9 내지 21 또는 41 내지 56을 참조). 바람직하게, 경쇄는 3개 또는 4개의 FR(예를 들어, FR2, FR3 및 선택적으로 FR4)를 3개의 CD와 함께 포함한다. 바람직하게, 경쇄는 Kabat 넘버링 시스템에 따라서 넘버링된 다음의 잔기들 1-23(FR1), 24-34(CDR1), 35-49(FR2), 50-56(CDR2), 57-88(FR3), 89-97(CDR3) 및 98-107(FR4)로서 위치되는 FR 및 CDR을 포함한다. 한 예로서, 경쇄는 하나의 불변 도메인에 연결된 및/또는 불변 단편(Fc)에 연결되지 않은 상기 경쇄를 포함하는 면역글로불린으로부터 유래된다.

[0304] 본 발명의 일부 예에서, 용어 "프레임워크 영역"은 CDR 잔기 이외의 가변 영역 잔기를 의미하는 것으로 이해될 것이다. 자연적으로 발생된 면역글로불린(예를 들어, 항체)의 각 가변영역은 전형적으로 FR1, FR2, FR3 및 FR4로서 확인되는 4개의 FR을 가진다. CDR이 Kabat에 따라 정의된다면, 예시적인 경쇄 FR(LCFR) 잔기들은 잔기 1-23(LCFR1), 35-49(LCFR2), 57-88(LCFR3), 및 98-107(LCFR4)에 위치된다. λ LCFR1는 κ LCFR1에 포함되는 잔기 10을 포함하지 않음에 주목한다. 예시적인 중쇄 FR(HCFR) 잔기들은 약 잔기 1-30(HCFR1), 36-49(HCFR2), 66-94(HCFR3), 및 103-113(HCFR4)에 위치된다.

[0305] 본 발명의 모든 면역글로불린 가변 영역에 대하여, "골격 영역 2"(FR2)는 CDR1과 CDR2 사이의 잔기로서 정의된다. 이 잔기들은 적어도 2가지의 명명법 1) Kabat(1987 및/또는 2001) 및 2) Chothia and Lesk(1987, 1989 및 Al-Lazikani et al 1997)에 의해 넘버링되었다. Chothia 및 Lesk 넘버링 시스템은 잘 정립된 Kabat 시스템을 기초로하며, 3차원 구조에서 그것들의 실제 위치를 더 잘 맞추기 위하여 면역글로불린 가변영역 내 경쇄 CDR1 및 중쇄 CDR1 서열 길이 가변성의 넘버링을 수정하도록 시도하였다. Chothia 및 Lesk에 의해 채택된 CDR-특이적 넘버링은 이후 1989에 변경되었지만 1997년에 복귀되었다. CDR 루프 내에서 발견되는 잔기들을 다룰 때 이 넘버링 시스템들 사에 미묘한 차이점이 있다. Kabat 넘버링 시스템에 따라서, FR2는 V_H 에서 36 내지 49 잔기 및 V_L 에서 35 내지 49 잔기 사이에 위치된다.

[0306] 본 발명의 모든 면역글로불린 가변 영역에 대해, "프레임워크 영역 3"(FR3)은 CDR2와 CDR3 사이의 잔기로서 정의된다. FR2와 함께 이 잔기들은 1) Kabat(1987 및/또는 2001) 및 2) Chothia 및 Lesk(1987, 1989 및 Al-Lazikani et al 1997)인 적어도 2가지의 명명법에 의해 넘버링되었다. Kabat 넘버링 시스템에 따라서, FR3은 V_H 중 66 내지 94 및 V_L 중 57 내지 88에 위치된다.

[0307] 본 발명의 모든 면역글로불린 가변 영역에 대해, "프레임워크 영역 1"(FR1)은 천연 N-말단 잔기와 상보적 결정 영역 No. 1(complementarity determining region No. 1 : CDR1)의 출발 사이의 잔기로서 정의된다. FR2 및 FR3과 같이, 이 잔기들은 1) Kabat(1987 및/또는 2001) 및 2) Chothia and Lesk(1987, 1989 및 Al-Lazikani et al 1997)인 적어도 2가지의 명명법에 의해 넘버링되었다. 당업자들은 프레임워크 영역 1 내에서 따라서 CDR1 전에 인식할 것이고, 단일의 고 보존적 시스템 잔기(Cys)가 일반적으로 존재한다. 카파와 람다 가변 경쇄 내에서, 이 보존적 시스템은 Kabat 위치 23에서 불변이고, CDR2와 CDR3사이의 프레임워크 영역 3으로서 정의된 영역 내에서 불변적으로 다른 높은 보존적 시스템 잔기와 함께 Kabat 위치 88에서 이황화 결합을 형성한다. 그러나 본 발명은 FR1의 다른 아미노산에 상대적으로 보존적인 시스템의 위치를 변경시킬 수 있는 1, 2 또는 3개의 아미노산의 삽입제거(indel), 일반적으로 사람이 만든 삽입제거를 고려한다.

[0308] 고 보존적 시스템의 짝지음(pairing)은 가변 중쇄 내에서 미묘하게 다르며, 불변적 Kabat 위치 22(FR1 내) 및 92(FR3 내). 그러나, 이 짝지음은 대부분 모든 면역글로불린 내에서 거의 완전하게 보존되며, 이러한 이황화 결합이 Ig-루프 다양화의 시작에 아마도 이미 존재하였고, 선택적인 압력 하에 유지되었음을 시사한다. 이황화 결

합의 거의 완벽한 보존은 나아가 그것이 Ig-루프의 안정성에 중요하게 기여한다는 것을 시사한다.

[0309] 본 명세서에서 사용된 용어 "상보성 결정 영역"(동일하게 CDR; 즉, CDR1, CDR2, 및 CDR3 또는 과가변 영역)은 그 존재가 항원 결합에 필요한 면역글로불린 가변 영역의 아미노산 잔기들을 말한다. 각 가변 영역은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3로 확인되는 3개의 CDR 영역을 가진다. 각 CDR 영역은 Kabat(1987 및/또는 1991)에서 정의된 바와 같은 "상보성 결정 영역"으로부터의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 영역에서 CDRH1은 잔기 31-35 사이이며, CDRH2는 잔기 50-65 사이이고 CDRH3은 잔기 95-102 사이이다. 경쇄에서 CDR11은 잔기 24-34 사이이고, CDR12는 잔기 50-56 사이이고, CDR13은 잔기 89-97 사이이다. 이 CDR은 또한, 예를 들어 Kabat(1987 및/또는 1991)에서 설명되는 바와 같은 수많은 삽입을 포함할 수 있다.

[0310] 용어 "불변 영역"(동일하게 CR 또는 결정성 단편 또는 Fc)은 적어도 하나의 고정 도메인을 포함하는 면역글로불린의 일부로서 참조되며, 일반적으로(필수적으로는 아니지만) 글리코실화되며, 하나 이상의 F 수용체들 및/또는 상보적 캐스케이드 성분들(예를 들면, 이펙터(effector) 기능들을 부여한다)에 결합한다. 중쇄 불변 영역은 5가지 아이소타이프: α , δ , ϵ , γ 또는 μ 중 어느 것으로부터 선택될 수 있다. 나아가, 다양한 서브클래스의 중쇄(예컨대 중쇄의 IgG 서브클래스)는 상이한 이펙터 기능을 초래하고, 따라서 바람직한 중쇄 고정 영역을 선택하여 원하는 이펙터 기능을 가지는 단백질이 생성될 수 있다. 바람직한 중쇄 불변 영역은 감마 1(IgG1), 감마 2(IgG2) 및 감마 3(IgG3)이다.

[0311] "불변 도메인"은 그것의 서열이 면역글로불린/그것의 항체들 내에서 매우 유사한 면역글로불린 내의 도메인, 예를 들면 IgG 또는 IgM 또는 IgE이다. 면역글로불린의 불변 영역은 일반적으로 복수의 불변 도메인들을 포함하여, 예를 들면 γ , α 및 δ 중쇄의 불변 영역은 3개의 불변 도메인을 포함하며, γ , α 및 δ 중쇄는 2개의 불변 도메인을 포함한다. μ 및 ϵ 중쇄의 불변 영역은 4개의 불변 도메인을 포함하며, Fc 영역은 2개의 불변 도메인을 포함한다.

[0312] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fv"는 다수의 폴리펩티드로 구성되든 또는 단일 폴리펩티드로 구성되든, V_L 및 V_H 가 결합되고 항원 결합 자리를 가지는, 즉 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 복합체를 형성하는, 임의의 단백질을 의미하는 것으로 여겨질 것이다. 항원 결합 자리를 형성하는 V_H 및 V_L 은 단일 폴리펩티드 쇠 또는 상이한 폴리펩티드 쇠에 있을 수 있다. 나아가 본 발명의 Fv(뿐만 아니라 본 발명의 임의의 단백질)은 동일한 항원에 결합되거나 결합되지 않을 수 있는 다수의 항원 결합 자리를 가질 수 있다. 이 용어는 재조합 기술을 이용하여 제조되는 이러한 단편에 대응하는 단백질뿐만 아니라 면역글로불린으로부터 직접 유래된 단편을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 일부 예에서, V_H 는 중쇄 불변 도메인(CH) 1에 연결되지 않으며 및/또는 V_L 은 경쇄 불변 도메인(C_L)에 연결되지 않는다. 폴리펩티드 또는 단백질을 함유하는 예시적인 Fv는 Fab 단편, a Fab' 단편, a F(ab') 단편, scFv, 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디 또는 더 고차의 복합체, 또는 불변 영역에 연결된 임의의 앞서 언급한 것 또는 그것의 도메인, 예를 들어 CH2 또는 CH3 도메인을 포함한다. "Fab 단편"은 면역글로불린의 1가 항원결합 단편으로 이루어지며, 효소 파파인(papain)으로 전체 면역글로불린의 분해에 의해 제조되어 무결합 경쇄 및 중쇄 부분으로 이루어지는 단편을 수득할 수 있거나 또는 재조합 수단을 사용하여 생성될 수 있다. 면역글로불린의 "Fab' 단편"은 펩신으로 전체 면역글로불린을 처리한 다음 환원시켜 얻어서 무결합 경쇄 및 중쇄의 부분으로 이루어진 분자를 수득할 수 있다. 2개의 Fab' 단편은 또한 재조합 수단들에 의해 제조될 수 있다. 면역글로불린의 "F(ab')₂ 단편"은 2개의 이황화 결합에 의해 서로 홀드된 2개의 Fab'단편의 이합체로 이루어지며, 전체 면역글로불린 분자를 후속하는 환원 없이 효소 펩신으로 처리하여 얻는다. "Fab₂" 단편은 예를 들어 류신 지퍼(leucine zipper) 또는 C_H3 도메인을 이용하여 연결된 2개의 Fab 단편들을 포함하는 재조합 단편이다. "단일 쇠 Fv" 또는 "scFv"는 경쇄의 가변 영역과 중쇄의 가변 영역이 적당한, 가요성 폴리펩티드 링커에 의해 공유적으로 연결되는 면역글로불린의 가변 영역 단편(Fv)을 함유하는 재조합 분자이다. 본 용어의 범주 내에 속하는 단백질을 함유하는 예시적인 Fv의 상세한 논의는 본 명세서에서 이하에 제공한다.

[0313] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원 결합 자리"는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질에 의해 형성된 구조를 의미하는 것으로 여겨진다. 항원 결합 자리는 일련의 연속적 아미노산, 또는 심지어 단일 폴리펩티드 쇠 내의 아미노산일 필요는 없다. 예를 들어 2개의 다른 폴리펩티드 쇠로부터 제조된 Fv에서 항원 결합 자리는 항원과 상호작용하고, 그러나 일반적으로 항상 각 가변 영역에서 하나 이상의 CDR 내에 있는 것은 아닌 V_L 및 V_H 의 일련의 영역으로 구성된다.

[0314] "Kabat 넘버링 시스템"은 Kabat(1987 및/또는 1991)에서 설명된 바와 같은 면역글로불린의 가변 영역에서 FR 및

CDR의 위치를 결정하는 넘버링 시스템을 의미한다.

- [0315] 용어 "단백질"은 단일 폴리펩티드 쇠, 즉 펩티드 결합에 의해 연결된 일련의 연속적인 아미노산 또는 서로 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된 일련의 폴리펩티드 쇠(즉, 폴리펩티드 복합체)를 포함하는 것으로 여겨질 수 있다. 예를 들어, 일련의 폴리펩티드 쇠는 적당한 화학적 또는 이황화 결합을 이용하여 공유적으로 연결될 수 있다. 비공유적 결합의 예는, 수소 결합, 이온 결합, 반데르발스 힘, 및 소수성 상호작용을 포함한다. 본 발명에 의해 고려되는 비공유적 결합은, 예를 들어 다이아바디 또는 트라이아바디 또는 테트라바디의 일부 형태인 V_H 과 V_L 사이의 상호작용이다.
- [0316] 용어 "폴리펩티드 쇠"는 앞서 언급한 단락으로부터 펩티드 결합에 의해 연결된 일련의 연속적 아미노산을 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0317] 당업자는 "이황화 결합"이 티올 기의 커플링에 의해 형성된 공유 결합이라는 것을 인식할 것이다. 결합은 또한 SS-결합 또는 이황화 브릿지로 불린다. 단백질에서, 이황화 결합은 일반적으로 2개의 시스테인 잔기의 티올 기 사이에서 생겨서 시스틴을 제조한다.
- [0318] 당업자는 또한 용어 "비환원 조건"이 단백질 내에서 설프하이드릴(-SH) 기의 산화에 충분한, 예를 들어 이황화 결합 형성에 허용적인 조건을 포함한다는 것을 인식할 것이다.
- [0319] 본 명세서에서 사용된 용어 "항원"은 면역글로불린 반응(예를 들어, 항체 반응)이 일어날 수 있는 것에 대항하는 임의의 조성의 물질을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 예시적인 항원은 단백질, 펩티드, 폴리펩티드, 탄수화물, 포스페이트 기, 형광체-펩티드 또는 폴리펩티드, 글리코실화된 펩티드 또는 펩티드 등을 포함한다.
- [0320] 본 명세서에서 사용되는 용어 "특이적으로 결합하는"은 본 발명의 단백질이 그것이 대안의 항체 또는 세포에 대해서보다, 더 빈번하게, 더 빠르게 특정 항원 또는 항원들 또는 그것을 발현시키는 세포와 더 큰 지속성으로 및/또는 더 큰 친화도로 반응하거나 결합하는 것을 의미하는 것으로 여겨질 것이다. 예를 들어, 특이적으로 항원에 결합하는 단백질은 더 큰 친화도, 친화력으로, 더 용이하게 및/또는 그것이 다른 항원에 결합하는 것보다 더 큰 지속성으로 항원과 결합한다. 그것은 또한 이러한 정의를 해석함에 의해, 예를 들어 제1 항원에 특이적으로 결합하는 단백질은 제2 항원과 특이적으로 결합할 수도 있고 결합하지 않을 수도 있다는 것으로 이해된다. 따라서, "특이적 결합"은 반드시 다른 항원에 대한 배타적 결합 또는 비검출적 결합을 요구하는 것은 아니며, 이는 용어 "선택적 결합"을 의미한다. 일반적으로, 필수적이지는 않지만, 결합에 대한 언급은 특이적 결합을 의미하며, 각각의 용어는 다른 용어에 대한 분명한 뒷받침을 제공하는 것으로 이해될 것이다.
- [0321] 항원에 본 발명의 단백질의 결합의 내용에서 용어 "방지하는", "방지하다" 또는 "방지"는 항원에 대한 결합의 완전한 폐지 또는 완전한 억제를 의미하는 것으로 여겨질 것이다.
- [0322] **단백질을 함유하는 가변 영역**
- [0323] 본 발명은 하나 이상의 항원들에 특이적으로 또는 선택적으로 결합하고 임의의 구체예에 따라서 본 명세서에 설명된 바와 같이 변형된 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 임의의 단백질을 고려한다. 바람직한 단백질은 적어도 하나의 V_H 및 적어도 하나의 V_L 을 포함한다. 예시적인 면역글로불린 가변 영역은 항체 및 그것의 변형된 형태(예를 들어 인간화된 항체) 및 중쇄 항체, 예컨대 카멜리드 면역글로불린 및 IgNAR로부터의 가변 영역이다.
- [0324] **면역글로불린 가변 영역**
- [0325] **항체 가변 영역**
- [0326] 본 명세서의 설명을 기반으로 당업자에게 명백한 것과 같이, 본 발명의 단백질은 본 명세서에서 설명하는 FR2 및/또는 FR3 내 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 항체로부터 하나 이상의 가변 영역을 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 항체 분자들을 제공한다. 이러한 항체는 우선 관심의 항원에 대한 항체를 생성하고 그 항체를 변형시키거나(예를 들어 재조합 수단을 사용하여) 또는 이전에 생성한 항체를 변형하여 생성될 수 있다.
- [0327] 항체의 생성방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어 하이브리도마 기술과 같은 단클론성 항체를 생성하는 방법은 Kohler 및 Milstein, (1975)에 의한다. 하이브리도마 방법에서, 마우스, 햄스터 또는 다른 적합한 숙주 동물은 전형적으로 면역원 또는 항원 또는 그것을 발현시키는 세포에 의해 면역화되어 면역원 또는 항원과 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유발한다. 면역화된 동물로부터의 림프구 또는 비장 세포는 다음으로 적당한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 불멸화된(immortalized) 셀라인과 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한다(Goding, 1986). 결과된 하이브리도마 세포는 융합되지 않은, 불멸화된 세포의

성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게 함유하는 적당한 배양물 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어 모세포가 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포라이보실 트랜스퍼라제(hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase : HGPRT 또는 HPRT)가 없다면, 하이브리도마 에 대한 배양물 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린, 및 티미딘("HAT 배지")를 포함하는데, 이 물질들은 HGPRT-결핍 세포들의 성장을 막을 것이다. 항체를 생성하는 다른 방법은 또한, 예를 들어 Largaespada (1990) 또는 Weissinger et al. (1991)에서 일반적으로 설명되는 ABL-MYC 기술을 사용하여 본 발명에 의해 고려된다.

[0328] 대안으로, 항체 또는 그것을 암호화하는 서열은 관心の 항체를 발현시키는 이전에 생성한 세포, 예를 들어 하이브리도마 또는 트랜스펙토마(transfectoma)로부터 만들어진다. 이러한 하이브리도마 및/또는 트랜스펙토마의 다양한 공급원은 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 ATCC(American Type Culture Collection) 및/또는 ECACC(European Collection of Cell Cultures)를 포함한다. 항체로부터의 가변 영역을 암호화하는 서열을 분리하고 및/또는 변형하기 위한 방법은 당업자에게 명백하거나 및/또는 본 명세서에서 설명될 것이다.

[0329] 항체 생성 및/또는 그것을 암호화하는 서열의 분리 후, 항체는 임의의 구체예에 따라 본 명세서에 설명되는 자리에서 본 명세서에 설명되는 FR2 및/또는 FR3 내 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된다. 일반적으로 이것은 항체를 암호화하는 핵산을 분리하고, 그것의 서열을 변형하여 영역을 암호화하고 변형된 항체를 발현시키는 본 명세서에 설명된 FR2 및/또는 FR3의 필수 자리에서 시스테인 잔기(즉, TGT 또는 TGC)를 암호화하는 코돈을 포함하는 것을 수반한다.

[0330] 예시적인 인간 항체 중쇄 FR2 서열은 WVRQAPGKGLEWVS(서열 번호: 1); WVRQAPGKGLEWVG(서열 번호: 2); WVRQAPGQLEWMG(서열 번호: 3); WVRQAPGKGLEWMG(서열 번호: 4); WIRQPPGKGLEWIG(서열 번호: 5); WIRQPPGKALEWLIG(서열 번호: 6); WVRQMPGKGLEWMG(서열 번호: 7); 및 WIRQSPSRGLEWLIG(서열 번호: 8)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0331] 예시적인 인간 항체 κ 경쇄 FR2 서열은 WYQQKPGKAPKLLIY(서열 번호: 9); WYQQKPGQAPRLLIY(서열 번호: 10); WYQQKPGQPPKLLIY(서열 번호: 11); WYLQKPGSQPLLIY(서열 번호: 12); WYQQKPCQAPRLLIY(서열 번호: 13); WFQQKPGKAPKSLIY(서열 번호: 14); WYQQKPAKAPKLFYIY(서열 번호: 15); 및 WYLQKPGQPPQLLIY(서열 번호: 16)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0332] 예시적인 인간 항체 λ 경쇄 FR2 서열은 WYQQLPGTAPKLLIY(서열 번호: 17); WYQQHPGKAPKLMYIY(서열 번호: 18); WYQQKPGQAPVLVIY(서열 번호: 19); WYQQKPGQSPVLVIY(서열 번호: 20); 및 WHQQPEKGPRLMYIY(서열 번호: 21)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0333] 예시적인 인간 항체 중쇄 FR3 서열은

[0334] RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(서열 번호: 22);

[0335] RFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKR(서열 번호: 23);

[0336] RFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR(서열 번호: 24);

[0337] RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR(서열 번호: 25);

[0338] RLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAR(서열 번호: 26);

[0339] RFVFSLDTSVSTAYLQMSSLKAEDTAVYYCAR(서열 번호: 27);

[0340] RVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR(서열 번호: 28);

[0341] RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR(서열 번호: 29);

[0342] RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD(서열 번호: 30);

[0343] RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR(서열 번호: 31);

[0344] RVTMTNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR(서열 번호: 32);

[0345] RFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKK(서열 번호: 33);

[0346] RFTISRDNKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKD(서열 번호: 34);

[0347] RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(서열 번호: 35);

- [0348] RLTIKSDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARI(서열 번호: 36);
- [0349] RFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR(서열 번호: 37);
- [0350] RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR(서열 번호: 38);
- [0351] HVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR(서열 번호: 39); 및
- [0352] RVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR(서열 번호: 40)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0353] 예시적인 인간 항체 κ 경쇄 FR3 서열은
- [0354] GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC(서열 번호: 41);
- [0355] GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDATYYC(서열 번호: 42);
- [0356] GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYC(서열 번호: 43);
- [0357] GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC(서열 번호: 44);
- [0358] GIPARFSGSGSGTDFLTISLQPEDFVAVYYC(서열 번호: 45);
- [0359] GIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFVAVYYC(서열 번호: 46);
- [0360] GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDEVAVYYC(서열 번호: 47); 및
- [0361] GVPDRFSGSGSGTDFLTISRVEAEDVGVYYC(서열 번호: 48)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0362] 예시적인 인간 항체 λ 경쇄 FR3 서열은
- [0363] GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQSEDFATYYC(서열 번호: 49);
- [0364] GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC(서열 번호: 50);
- [0365] GIPARFSGSGPGTDFLTISLQPEDFVAVYYC(서열 번호: 51);
- [0366] GVPSRFSGSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYC(서열 번호: 52);
- [0367] GIPARFSGSGSGTDFLTISLQPEDFVAVYYC(서열 번호: 53);
- [0368] GVPSRFSGSGSGTDFLTISLEAEDAATYYC(서열 번호: 54);
- [0369] GIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFC(서열 번호: 55); 및
- [0370] GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYC(서열 번호: 56)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0371] 앞서 언급한 서열들은 단지 본 발명을 수행하는데 사용될 수 있는 서열의 예시이고, 이러한 서열의 완전한 열거는 아니다. 이러한 예들은 본 발명을 설명하는 목적을 위해 제한되며, 본 발명의 제한하는 것은 아니다. 알려진 방법 및/또는 예를 들어 Kabat(1987 및/또는 2001)에 개시된 것을 기반으로 부가적인 FR2 및/또는 FR3의 서열을 결정하는 것은 당업자의 능력 내이다.
- [0372] FR2 및/또는 FR3 영역의 앞서 언급한 예는 임의의 실시예 또는 구체예로 본 명세서에서 설명되는 위치에서 2이상의 시스테인 잔기를 포함하도록 용이하게 변형된다.
- [0373] 당업자는 당업계에 알려진 지식 및/또는 본 명세서에서 설명되는 서열을 기반으로 FR2 및/또는 FR3를 암호화하는 핵산 서열을 용이하게 결정할 것이다.
- [0374] *키메라, 탈면역화, 인간화 및 인간 항체*
- [0375] 본 발명의 단백질은 인간화된 항체들 또는 인간 항체들 또는 그것들로부터 유래된 가변 영역이거나 또는 그것들로부터 유래될 수 있다. 용어 "인간화된 항체"는 일반적으로 제조할 기술을 이용하여 제조되는 비인간 종으로부터의 항체로부터 유래된 항원 결합 자리 및 인간 항체의 구조 및/또는 서열을 기반으로 한 분자의 남아있는 항체 구조를 포함하는, 키메라 분자를 말하는 것으로 이해될 것이다. 항원 결합 자리는 바람직하게 인간 항체의 가변 영역 및 인간 항체로부터 남아있는 영역 들 내 적절한 FS 상에 접합된 비인간 항체로부터의 CDR을 포함한다. 항원 결합 자리는 야생형일 수 있고 또는 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크 잔기는 대응하는 비인간 잔기에 의해 치환된다. 인간화된 항체는 또한 수령자

항체 내에서도 또는 유입된 CDR 또는 프레임워크 서열 내에서도 발견되지 않는 잔기들을 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 실질적으로 적어도 하나 및 전형적으로 두 개의 가변 영역을 모두 포함할 것인데, 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비인간 면역글로불린의 그것들에 대응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역들은 인간 면역글로불린 공통서열의 그것들이다. 비인간 항체들을 인간화하기 위한 방법은 당업계에 알려져 있다. 인간화는 미국 제5225539호, 미국 제6054297호 또는 미국 제5585089호의 방법에 따라서 수행될 수 있다. 항체를 인간화하기 위한 다른 방법은 배제되지 않는다. 당업자는 완전한 항체가 아닌 본 발명의 단백질이 인간화될 수 있다는 것, 예를 들어 가변 도메인이 인간화될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0376] 항체 분자들 및 결합 단백질들과 연관되어 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 인간에서, 예를 들어 인간 생식계열 또는 체세포로부터 유래되거나 또는 그것으로부터 발결되는 서열에 대응하는 가변 및 선택적으로 불변 항체 영역을 말한다. "인간" 항체들은 인간서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기, 예를 들어 무작위 또는 시험관내에서 자리 지정 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이(특히 작은 수의 항체 잔기들, 예를 들어 1, 2, 3, 4 또는 5의 항체 잔기, 바람직하게 예를 들면 항체의 하나 이상의 CDR을 구성하는 1, 2, 3, 4 또는 5의 잔기 내에서 보존적 치환 또는 돌연변이를 수반하는 돌연변이)를 포함할 수 있다. 이 "인간 항체"는 실질적으로 인간에 의해 제조될 필요는 없고, 오히려 그것들은 제조할 수단을 사용하여 제조되거나 및/또는 인간 항체 불변 및/또는 가변 영역을 암호화하는 핵산을 포함하는 유전자이식 동물(예를 들어 마우스)로부터 분리될 수 있다. 인간 항체 또는 그것의 단편들은 파지 디스플레이 라이브러리(예를 들어 미국 제6300064호; 미국 제5885793호; 미국 제6204023호; 미국 제6291158호; 또는 미국 제6248516호에서 설명됨)에 기재된 바와 같이 본 기술분야에 알려진 다양한 기술을 사용하거나, 또는 인간 면역글로불린 유전자를 발현시키는 유전자이식 동물을 사용하여(예를 들어, W02002/066630; Lonberg et al. (1994) 또는 Jakobovits et al. (2007)에서 설명됨) 제조될 수 있다.

[0377] 한 예에서, 본 발명의 단백질은 키메라 항체 또는 그것의 부분, 예를 들어 Fab 단편이다. 용어 "키메라 항체"는 그 안에 중 및/또는 경쇄의 부분이 특정 종(예를 들면, 뮤린, 예컨대 마우스)으로부터 유래된 항체들에서의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성이거나 또는 특정 항체 분류 또는 서브클래스에 속하는 한편, 그것들이 원하는 생물학적 활성을 나타낸다면 쇄(들)의 나머지가 다른 종으로부터 유래된 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성이거나 또는 이러한 항체의 단편뿐만 아니라 다른 항체의 분류 또는 서브클래스에 속하는 항체를 말한다(미국 제4,816,567호). 전형적으로 키메라 항체들은 우세하게 인간 도메인을 가지는 항체를 생성하기 위하여 설치류 또는 토끼 가변 영역 및 인간 불변 영역을 이용한다. 예를 들어, 키메라 항체는 인간 불변 도메인 및/또는 인간 불변 영역에 융합된 본 발명의 임의의 구체예에 따라서 변형된 마우스 항체로부터의 가변 영역을 포함한다. 이러한 키메라 항체의 생성은 당업계에 알려져 있고, 표준 수단에 의해 달성될 수 있다(예를 들어, 미국 제5,807,715호; 미국 제4,816,567호 및 미국 제4,816,397호).

[0378] 본 발명은 또한 탈면역화된 단백질을 고려한다. 탈면역화된 단백질은 하나 이상의 에피토프를 가지는데, 예를 들어 B 세포 에피토프 또는 T 세포 에피토프가 제거되어(즉, 돌연변이되어) 피험자가 단백질에 대한 면역 반응을 상승시킬 가능성을 감소시킨다. 탈면역화된 단백질을 생성하는 방법은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 W000/34317, W02004/108158 및 W02004/064724에서 설명된다. 예를 들어, 본 방법은 인실리코 분석을 수행하여 단백질 내에서의 에피토프를 예측하는 단계 및 예측한 에피토프 내 하나 이상의 잔기를 돌연변이시켜서 그것의 면역원성을 감소시키는 단계를 포함한다. 단백질은 그 다음에, 예를 들어 인실리코 또는 시험관내 또는 생체내로 분석되어 그것이 항원에 결합하는 능력을 보유한다는 것을 보장한다. CDR 내에서 생기는 바람직한 에피토프는 돌연변이가 항원 결합을 감소시킬 가능성이 없지않다면, 돌연변이화되지 않는다. 항원을 예측하기 위한 방법은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 문헌[Saha (2004)]에서 설명된다. AVP04-07에서 예시적인 에피토프는 서열 번호: 59의 다음의 위치 35-41; 68-77; 84-90; 109-119; 122-128; 160-169; 및 185-194 of 서열 번호: 59에서 생긴다. 돌연변이되어 면역원성을 잠재적으로 감소시킬 수 있는 잔기는 K38, T71, A72, K74, T87, T112, V113, S114, S115, G116, T125, Q163, Q164, P166, F188, T189, G190 또는 S191를 포함한다.

[0379] 중쇄 면역글로불린

[0380] 중쇄 면역글로불린은 그것들이 중쇄를 포함하지만 경쇄를 포함하지 않는 한, 면역글로불린(예를 들면, 항체)의 많은 다른 형태들과 구조적으로 다르다. 따라서, 이러한 면역글로불린은 또한 "중쇄 유일 항체들"로 언급된다. 중쇄 면역글로불린은 예로서 카멜리드 및 연골여루(또한 IgNAR)에서 발견된다.

[0381] 자연적으로 발생하는 중쇄 면역글로불린에 존재하는 가변영역은 그것들을 통상적인 4-쇄 항체들("V_H 도메인"으로서 언급됨)에 존재하는 중쇄 가변 영역 및 통상적인 4-쇄 항체들("V_L 도메인"으로서 언급됨)에 존재하는 경쇄

가변영역과 구분하기 위하여, 카멜리드 Ig 및 IgNAR 내 V-NAR로서 일반적으로 언급된다.

- [0382] 중쇄 면역글로불린은 적절한 항원에 높은 친화도 및 높은 특이성으로 결합되는 경쇄의 존재를 필요로 하지 않는다. 이 특징은 중쇄 면역글로불린과 V_H 와 V_L 도메인을 둘 다 포함하는 일부 통상적인 4-쇄 항체를 구별한다. 이것은 단편과 결합하는 단일 도메인이 발견되기 쉽고, 일반적으로 안정하고 가용성인 중쇄 면역글로불린으로부터 유래될 수 있다는 것을 의미한다. 중쇄 면역글로불린 및 그것으로부터 유래된 그것의 가변 영역 도메인은 또한 효소와 같은 항원 내 및 전염성 질병의 원인이 되는 바이러스 및 시약의 단백질 표면 상에서 발견되는 공동의 침투 및결합을 용이하게 하는 긴 표면 루프(특히 CDR3)를 포함할 수 있다.
- [0383] 카멜리드로부터의 중쇄 면역글로불린 및 그것의 가변영역 및 그것의 생성 및/또는 분리 및/또는 사용 방법의 일반적인 설명은 특히 다음의 참고문헌 [W094/04678, W097/49805 및 WO 97/49805; Riechmann and Muyldermans(1999) 및 Nguyen et al. (2001)]에서 발견된다.
- [0384] 연골어류로부터의 중쇄 면역글로불린 및 그것의 가변영역 및 그것의 생성 및/또는 분리 및/또는 사용 방법의 일반적인 설명은 특히 문헌[W02005/118629; Shao et al. (2007); 및/또는 Dooley and Flajnik (2006)]에서 발견된다.
- [0385] 단백질을 함유하는 가변영역
- [0386] *다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디*
- [0387] 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 예시적인 바람직한 단백질은 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디 및 W098/044001 및 W094/007921에서 설명되는 것과 같은 더 고차의 단백질 복합체이다. 본 명세서에서 용어 "Avibody" 또는 "Avibodies"는 W098/044001 및/또는 W094/007921에서 설명되는 것과 같은 임의의 다이아바디(다이아바디들), 트라이아바디(트라이아바디들) 및 테트라바디(테트라바디들)를 포함하는 Avibody(상표명) 제품의 임의의 형태를 포함한다.
- [0388] 본 명세서에서 사용되는 용어 "다이아바디"는 2개의 연결된 폴리펩티드 쇄를 포함하는 단백질로서, 각각의 폴리펩티드 쇄는 구조 V_L -X- V_H 또는 V_H -X- V_L 을 포함하되, V_L 은 면역글로불린 경쇄 가변 영역이고, V_H 는 중쇄 가변 영역이고, X는 단일 폴리펩티드 쇄 내의 V_H 및 V_L 가 연결되는 것(또는 Fv를 형성하는 것)을 허용하기에 불충분한 잔기를 포함하는 링커이거나 또는 없고, 폴리펩티드 쇄의 V_H 가 다른 폴리펩티드 쇄의 V_L 과 결합하여 항원 결합 자리를 형성하는, 즉 하나 이상의 항원들이 특이적으로 결합 가능한 Fv 분자를 형성하는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. V_L 및 V_H 는 각 폴리펩티드 쇄 내에서 동일할 수 있고, V_L 및 V_H 는 각 폴리펩티드 쇄 내에서 상이하여 2-특이성 다이아바디를 형성할 수 있다(즉, 상이한 특이성을 가지는 2개의 Fv를 포함한다).
- [0389] 본 명세서에서 사용되는 용어 "트라이아바디"는 3개의 연결된 폴리펩티드 쇄를 포함하는 단백질로서, 각각의 폴리펩티드 쇄는 구조 V_L -X- V_H 또는 V_H -X- V_L 을 포함하되, V_L 은 면역글로불린 경쇄 가변 영역이고, V_H 는 중쇄 가변 영역이고, X는 단일 폴리펩티드 쇄 내의 V_H 및 V_L 가 연결되는 것(또는 Fv를 형성하는 것)을 허용하기에 불충분한 잔기들을 포함하는 링커이거나 또는 없고, 폴리펩티드 쇄의 V_L 이 다른 폴리펩티드 쇄의 V_L 과 연결되어서 삼합체의 단백질(트라이아바디)를 형성하는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, 제1 폴리펩티드 쇄의 V_H 는 제2 폴리펩티드 쇄의 V_L 과 연결되고, 제2 폴리펩티드 쇄의 V_H 는 제3 폴리펩티드 쇄의 V_L 과 연결되며, 제3 폴리펩티드 쇄의 V_H 는 제1 폴리펩티드 쇄의 V_L 과 연결된다. V_H 및 V_L 는 연결되어 항원 결합 자리, 즉 하나 이상의 항원들에 특이적으로 결합 가능한 Fv 분자를 형성한다. V_L 및 V_H 는 각 폴리펩티드 쇄에서 동일할 수 있고(즉, 모노특이적 트라이아바디를 생성) 또는 2개의 V_L 및 2개의 V_H 는 동일할 수 있고, 제3 폴리펩티드에서 3번째는 각각 상이하여 2특이성 단백질을 만들거나 V_L 및 V_H 는 각 폴리펩티드 쇄 내에서 상이하여 3가 단백질을 형성할 수 있다.
- [0390] 본 명세서에서 사용되는 용어 "테트라바디"는 4개의 연결된 폴리펩티드 쇄를 포함하며, 각 폴리펩티드 쇄는 구조 V_L -X- V_H 또는 V_H -X- V_L 를 포함하되, V_L 은 면역글로불린 경쇄 가변영역이고, V_H 는 면역글로불린 중쇄 가변영역이고, X는 단일 폴리펩티드 쇄 내에서 V_L 및 V_H 가 연결되는 것을 허용하기에 불충분한 잔기를 포함하는 링커이거나 또는 없고, 하나의 폴리펩티드 쇄의 V_H 는 다른 폴리펩티드 쇄의 V_L 과 결합되어 사합체 단백질(테트라바디)를 형

성한다. V_L 및 V_H 는 연결되어 항원 결합 자리, 즉 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 Fv를 형성한다. 예를 들어, 제1 폴리펩티드 쇠의 V_H 는 제2 폴리펩티드 쇠의 V_L 과 연결되고, 제2 폴리펩티드 쇠의 V_H 는 제3 폴리펩티드 쇠의 V_L 과 연결되며, 제3 폴리펩티드 쇠의 V_H 는 제4 폴리펩티드 쇠의 V_L 과 연결되고, 제4 폴리펩티드 쇠의 V_H 는 제1 폴리펩티드 쇠의 V_L 과 연결된다. V_L 및 V_H 는 각 폴리펩티드 쇠에서 동일할 수 있고(즉, 모노 특이적 테트라바디를 생성) 또는 2개의 V_L 및 2개의 V_H 는 한 형태이며 나머지 2개의 폴리펩티드에서 상이한 형태로 있어서 2특이성 테트라바디를 만들거나 또는 V_L 및 V_H 는 각 폴리펩티드 쇠 내에서 상이하여 4특이성 테트라바디를 형성할 수 있다.

[0391] 당업자는 다이아바디, 트라이아바디 및/또는 테트라바디 및 그것의 제조방법을 알 것이다. 일반적으로, 이 단백질은 V_H 및 V_L 이 직접적으로 또는 V_H 및 V_L 이 결합되는 것을 허용하기에 불충분한 길이의 링커를 사용하여 연결되는 폴리펩티드 쇠를 포함한다. V_H 및 V_L 는 임의의 순서, 즉 V_L - V_H 또는 V_H - V_L 로 위치될 수 있다. V_H 및 V_L 는 예를 들어 하나 이상의 관심의 가변 영역(들)을 포함하는 면역글로불린(항체 또는 키메라 항체 또는 인간화된 항체 또는 인간 항체)을 발현하는 세포로부터 V_H 및 V_L 폴리펩티드 쇠들을 발현하는 재조합 라이브러리(예를 들어 scFv 라이브러리, 예를 들어 유럽 제0239400호 또는 미국 제4946778호에서 설명됨)로부터 이러한 폴리펩티드 쇠들을 암호화하는 핵산을 분리함으로써 용이하게 얻어진다. V_H 및/또는 V_L 은 다음에 임의의 구체예에 따라서 본 명세서에서 설명되는 필수 시스템 잔기를 포함하도록 용이하게 변형될 수 있다.

[0392] V_H 및 V_L 을 포함하는 단백질은 연결되어 (만약 존재한다면) 링커의 길이 및/또는 V_H 및 V_L 도메인의 순서에 따라서 다이아바디, 트라이아바디 및/또는 테트라바디를 형성한다. 바람직하게, 링커는 12개 또는 더 적은 아미노산을 포함한다. 예를 들어, 다음의 N에서 C 순서 V_H -X- V_L 로 배열된 구조를 가지는 폴리펩티드 쇠의 경우, X는 링커이며, 3-12개의 잔기를 가지는 링커는 일반적으로 다이아바디의 형성을 초래하고, 1 또는 2개의 잔기를 가지는 링커 또는 링커가 없는 경우는 일반적으로 트라이아바디의 형성을 초래한다. N에서 C 순서 V_L -X- V_H 로 배열된 구조를 가지는 폴리펩티드 쇠의 경우, X는 링커이며, 3-12개의 잔기를 가지는 링커는 일반적으로 다이아바디의 형성을 초래하고, 1 또는 2개의 잔기를 가지는 링커는 일반적으로 다이아바디, 트라이아바디 및 테트라바디의 형성을 초래하며, 링커가 없는 폴리펩티드는 일반적으로 트라이아바디 또는 테트라바디를 형성한다.

[0393] 융합 단백질에서 사용을 위한 링커는 당업계에 알려져 있다. 링커 서열 조성은 융합 단백질의 폴딩 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 융합된 단백질과 관련되지 않은 링커를 통한 단백질의 간접적 융합에 의해, 두 단백질 사이의 입체 방해가 회피되며 링커에 대한 자유도가 달성된다.

[0394] 단백질의 가요성 및 결과적으로 그것의 기능적 활성을 제한할 수 있는 α -나선 또는 β -가닥 구조를 채택하는 높은 성향을 가지는 링커 서열을 가지는 것은 종종 선호되지 않는다. 오히려, 더 바람직한 링커는 확장된 입체 형태를 채택하는 선호도를 가지는 서열이다. 실제로, 대부분의 현재 설계된 링커 서열은 링커가 루프 구조를 채택하도록 강제하는 글리신 잔기의 높은 함량을 가진다. 글리신이 설계된 링커에서 일반적으로 사용되는데, β -탄소가 없을 때 다른 아미노산에 대해 에너지적으로 금지된 폴리펩티드 백본이 이면각(dihedral angle)에 접근하는 것을 허용하기 때문이다.

[0395] 한 구체예에서, 링커는 글리신이 풍부한 링커이다. 바람직하게, 링커는 추가적으로 알라닌 및/또는 세린을 포함하는 글리신 링커이다. 이러한 링커는 가요성을 제공하며, 친수성을 향상시키고, 상대적으로 프로테아제 저항성이다, 이것에 관해서는 예를 들어 문헌[Kortt et al., 2001]를 참조한다.

[0396] 글리신에 의해 주어진 입체형태적 가요성은 단백질의 C 말단과 링커의 N 말단 사이의 접합에서 중요할 수 있다. 따라서, 단백질의 C 말단에 인접한 영역 내 글리신을 포함하는 링커가 바람직하다. 이에 대해서, 이것이 링커의 제1 아미노산 잔기가 글리신일 필요가 있다는 요구를 부여하는 것은 아니다.

[0397] 프롤린 잔기는 링커에 포함되어 링커에 의한 상당한 제2 구조적 요소의 형성을 방지할 수 있다. 예를 들어, 링커는 n이 약 1 내지 약 5인 서열 Gly_n -Pro- Gly_n 을 포함한다.

[0398] 바람직한 링커는 G; GG; GGG; GGGG; GGGGS(서열 번호: 57); S; SG; SGG; 및 SGGG로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0399] 다이아바디 및 더 고차의 멀티머는 또한, 예를 들어 WO2006/113665에서 설명된, 예를 들어 단백질들 사이의 이

항화 결합에 의해 공유적으로 연결된 단백질을 포함할 수 있다.

- [0400] 다중특이성 다이아바디 및 더 고차의 멀티머는 짧은 링커에 의해 다른 면역글로불린의 V_L 도메인에 연결된 하나의 면역글로불린으로부터의 V_H 도메인을 포함하는 2개의 단일쇄 융합 생성물의 비공유적 결합을 통해 생성될 수 있으며, 그것에 의해 2개의 F_v 를 형성하는데, 각각은 상이한 면역글로불린이다, 이것에 관해서, 예를 들어 문헌[Hudson and Kortt (1999)]를 참조한다. 유사하게, 다중특이성 트라이아바디는 다음과 같은 3개의 단쇄 융합 단백질의 비공유적 결합에 의해 생성될 수 있다:
- [0401] (i) 제2 면역글로불린의 V_L 도메인에 짧은 링커에 의해 연결된 제1 면역글로불린으로부터의 V_H 도메인을 포함하는 제1 단백질;
- [0402] (ii) 제3 면역글로불린의 V_L 도메인에 짧은 링커에 의해 연결된 제2 면역글로불린으로부터의 V_H 도메인을 포함하는 제2 단백질; 및
- [0403] (iii) 제1 면역글로불린의 V_L 도메인에 짧은 링커에 의해 연결된 제3 면역글로불린으로부터의 V_H 도메인을 포함하는 제3 단백질.
- [0404] 당업자는 2특이성 테트라바디, 3특이성 테트라바디 및 4특이성 테트라바디를 생성하기 위해 앞서 언급한 적합한 변형을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0405] 본 발명은 임의의 항원 또는 그것의 조합에 대한 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디 또는 더 고차의 멀티머를 고려하며, 특정 항원에 결합되는 것으로 제한되도록 해석되어서는 안 된다. 예시적인 항원이 예시의 목적을 위하여 제한 없이 본 명세서에 설명된다.
- [0406] 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디를 설명하는 예시적인 간행물은 문헌[W094/07921; W098/44001; Holliger et al (1993); Kortt et al (1997); Hudson and Kortt (1999); Le Gall et al (1999); Todorovska et al., (2001); Hollinger and Hudson (2005); 및 그것에 인용되는 참고문헌]을 포함한다. 예시적인 다이아바디, 트라이아바디 및/또는 테트라바디는 서열 번호: 59의 아미노산 1-115 또는 서열 번호: 61의 아미노산 1-129 또는 서열 번호: 63의 아미노산 1-129 서열 번호: 65의 아미노산 1-129를 포함하며, 본 명세서에서 설명되는 FR2 및/또는 FR3의 2이상의 시스테인 잔기를 포함하도록, 선택적으로 N-말단의 트레오닌/세린 잔기를 가지도록 변형된다.
- [0407] 예시적인 항체, 트라이아바디 및/또는 테트라바디는 서열 번호: 59의 아미노산 121-239 또는 서열 번호: 61의 아미노산 135-262 또는 서열 번호: 63의 아미노산 126-237 서열 번호: 65의 아미노산 135-262를 포함하며, FR2 및/또는 FR3의 2이상의 시스테인 잔기를 포함하도록, 선택적으로 N-말단의 트레오닌/세린 잔기를 가지도록 변형된다. 예를 들어, V_L 은 다음에서 설명하는 서열을 포함한다:
- [0408] (i) 서열 번호: 101의 아미노산 121-239;
- [0409] (ii) 서열 번호: 103의 아미노산 121-239;
- [0410] (iii) 서열 번호: 105의 아미노산 121-239;
- [0411] (iv) 서열 번호: 117의 아미노산 121-239;
- [0412] (v) 서열 번호: 119의 아미노산 136-254;
- [0413] (vi) 서열 번호: 121의 아미노산 115-233;
- [0414] (vii) 서열 번호: 123의 아미노산 126-237;
- [0415] (viii) 서열 번호: 127의 아미노산 135-262;
- [0416] (ix) 서열 번호: 131의 아미노산 126-237;
- [0417] (x) 서열 번호: 135의 아미노산 126-237;
- [0418] (xi) 서열 번호: 141의 아미노산 135-262; 및/또는
- [0419] (xii) 서열 번호: 145의 아미노산 135-262.
- [0420] 예시적인 항체, 트라이아바디 및/또는 테트라바디는 서열 번호: 59의 아미노산 1-115 또는 서열 번호: 61의 아미노산 1-129 또는 서열 번호: 63의 아미노산 1-120 서열 번호: 65의 아미노산 1-129를 포함하며, FR2 및/또는

FR3의 2이상의 시스테인 잔기를 포함하도록, 선택적으로 N-말단의 트레오닌/세린 잔기를 가지도록 변형된다. 예를 들어, V_L 은 다음에서 설명하는 서열을 포함한다:

- [0421] (i) 서열 번호: 107의 아미노산 1-115;
- [0422] (ii) 서열 번호: 109의 아미노산 1-115;
- [0423] (iii) 서열 번호: 111의 아미노산 1-115;
- [0424] (iv) 서열 번호: 113의 아미노산 1-115;
- [0425] (v) 서열 번호: 115의 아미노산 1-115;
- [0426] (vi) 서열 번호: 125의 아미노산 1-120;
- [0427] (vii) 서열 번호: 129의 아미노산 1-129;
- [0428] (viii) 서열 번호: 133의 아미노산 1-120;
- [0429] (ix) 서열 번호: 137의 아미노산 1-120;
- [0430] (x) 서열 번호: 139의 아미노산 1-120;
- [0431] (xi) 서열 번호: 143의 아미노산 1-129;
- [0432] (xii) 서열 번호: 147의 아미노산 1-129; 및/또는
- [0433] (xiii) 서열 번호: 149의 아미노산 1-129.
- [0434] 앞서 언급한 단락에서 설명한 V_H 및 V_L 은 임의의 순서로 배열될 수 있고, 본 명세서에 설명되는 적당한 링커에 의해 연결될 수 있다. 다이아바디에 대해, 링커는 서열 GGGGS(서열 번호: 57)를 바람직하게 포함한다. 트라이아바디 또는 테트라바디에 대해, 바람직하게는 링커가 없거나 단일 글리신 잔기이다.
- [0435] 한 구체예에서, 다이아바디는 TAG72에 결합하고, 서열 번호: 59에서 설명하는 서열을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩티드쇄를 포함하는데(및 바람직하게 2개의 폴리펩티드쇄를 각각 포함한다), 이는 FR2 및/또는 FR3에서 2이상의 시스테인 잔기를 포함하도록, 선택적으로 N-말단의 트레오닌/세린 잔기를 가지도록 변형된다. 예를 들어, 다이아바디는 서열 번호: 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117 또는 119에서 설명되는 서열을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩티드쇄를 포함한다(및 바람직하게 2개의 폴리펩티드쇄를 각각 포함한다).
- [0436] 한 예에서, 트라이아바디는 TAG72에 결합하며, 서열 번호: 121에서 설명하는 서열을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩티드쇄를 포함한다(및 바람직하게 2개 또는 3개의 폴리펩티드쇄를 각각 포함한다).
- [0437] 다른 실시예에서, 다이아바디는 Her2에 결합하며, 서열 번호: 61 또는 64에서 설명하는 서열을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩티드쇄를 포함하는데(및 바람직하게 2개의 폴리펩티드쇄를 각각 포함한다), 이는 FR2 및/또는 FR3에서 2이상의 시스테인 잔기, 및 선택적으로 N-말단의 트레오닌/세린 잔기를 포함하도록 변형된다. 예를 들어, 다이아바디는 서열 번호: 127, 129, 141, 143, 145, 147 또는 149 중 하나 이상에서 설명되는 서열을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩티드쇄를 포함한다(및 바람직하게 2개의 폴리펩티드쇄를 각각 포함한다).
- [0438] 다른 예에서, 다이아바디는 MUC1에 결합하고, 서열 번호: 63에서 설명하는 서열을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩티드쇄를 포함하는데(및 바람직하게 2개의 폴리펩티드쇄를 각각 포함한다), 이는 FR1 및/또는 FR2에서 2이상의 시스테인 잔기, 및 선택적으로 N-말단의 트레오닌/세린 잔기를 포함하도록 변형된다. 예를 들어, 다이아바디는 서열 번호: 131, 133, 135, 137, 또는 139 중 하나 이상에서 설명되는 서열을 포함하는 적어도 하나의 폴리펩티드를 포함한다(바람직하게 2개의 폴리펩티드쇄를 각각 포함한다).
- [0439] 단쇄 Fv(scFv) 단편
- [0440] 당업자는 scFv가 단일 폴리펩티드쇄 내의 V_H 및 V_L 영역을 포함한다는 것을 알 것이다. 바람직하게, 폴리펩티드쇄는 V_H 과 V_L 사이의 폴리펩티드 링커를 더 포함하는데, 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성하도록 한다(즉, 단일 폴리펩티드쇄의 V_H 및 V_L 이 서로 연결되어 Fv를 형성함). 이것은 상이한 폴리펩티드쇄로부터의 가변 영역이 서로 연결되거나 결합되는 다이아바디 또는 더 고차의 멀티머와 구별된다. 예를 들어, 링커는 scFv에 대해

더 선호되는 링커 중 하나가 되는 (Gly₄Ser)₃을 가지는 과량의 12개의 아미노산 잔기를 포함한다.

- [0441] 예시적인 scFv는 다이아바디, 트라이아바디 및 테트라바디에 관하여 상기 설명한 V_H 및 V_L을 포함한다. 한 예에서, scfv는 TAG72에 결합한다. 한 예에서, scFv는 서열 번호: 119에서 설명하는 서열을 포함한다.
- [0442] 본 발명은 또한 이황화물 안정화된 Fv(또는 diFv 또는 dsFv)을 고려하는데, 이때 단일 시스테인 잔기는 V_H의 FR 및 V_L의 FR에 도입되며, 시스테인 잔기는 이황화 결합에 의해 연결되어 안정한 Fv를 얻는다(예를 들어 문헌 [Brinkmann et al., 1993]를 참조한다).
- [0443] 대안으로 또는 추가로, 본 발명은 다이머 scFv, 즉 비공유적 또는 공유적 결합에 의해 연결된 2개의 scFv 분자를 포함하는 단백질을 제공한다. 이러한 다이머 scFv의 예는, 예를 들어 류신 지퍼 도메인(예를 들어 Fos 또는 Jun로부터 유래)에 의해 연결된 2개의 scFv를 포함하여, 류신 지퍼 도메인이 연결되어 다이머 화합물을 형성한다(예를 들어, 문헌[Kostelny 1992 or Kruif and Logtenberg, 1996]를 참조한다). 대안으로, 2개의 scFv는, 예를 들어 미국 20060263367에서 설명되는 바와 같이 scFv가 둘 다 형성되어 항원에 결합하도록 허용하는 충분한 길이의 펩티드 링커에 의해 연결된다. 추가적인 예에서, 각 scFv는 예를 들어 링커 영역 내 또는 말단에서 시스테인 잔기를 포함하도록 변형되고, scFv는, 예를 들어 문헌[Albrecht et al., (2004)]에서 설명되는 이황화 결합에 의해 연결된다.
- [0444] scFv의 변형된 형태, 예를 들어 미국 제623322호에 설명되는, 예를 들어 글리코실화를 허용하도록 변형된 링커를 포함하는 scFv가 또한 본 발명에 의해 고려된다.
- [0445] 당업자는 scFv 또는 본 발명의 개시를 기반으로 한 본 발명에 따르는 적당한 변형된 V_H 및/또는 V_L을 포함하는 scFv 또는 그것의 변형된 형태를 용이하게 생성할 수 있다. V_H 및/또는 V_L의 예시적인 서열은 본 명세서에서 설명되며 필요한 변경을 가하여 본 발명의 이 구체예에 적용되는 것으로 여겨진다.
- [0446] scFv의 검토를 위하여, 문헌[Pluckthun (1994)]을 참조한다. scFv의 추가적인 설명은 예를 들어 미국 제 5260203호에서 찾을 수 있다.
- [0447] 미니바디(Minibodies)
- [0448] 당업자는 미니바디가 면역글로불린의 C_H2 및/또는 C_H3 도메인에 융합된 면역글로불린의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다는 것을 인식할 것이다. 선택적으로, 미니바디는 V_H와 V_L 사이의 힌지 영역을 포함하며, 때때로 이러한 입체구조는 문헌[Flex Minibody (Hu et al., 1996)]로서 언급된다. 미니바디는 C_H1 또는 C_L을 포함하지 않는다. 바람직하게, V_H 및 V_L 도메인은 힌지 영역 및 면역글로불린의 C_H3 도메인에 융합된다. 각각의 영역은 동일한 면역글로불린으로부터 유래될 수 있다. 대안으로, V_H 및 V_L 도메인은 하나의 면역글로불린 및 힌지로부터 유래될 수 있고, C_H2/C_H3는 다른 것으로부터 유래될 수 있고, 또는 힌지 및 C_H2/C_H3는 또한 상이한 면역글로불린으로부터 유래될 수 있다. 본 발명은 또한 하나의 면역글로불린으로부터 V_H 및 V_L 및 다른 면역글로불린으로부터 V_H 및 V_L을 포함하는 다중특이성 미니바디를 고려한다. 상기 미니바디의 적어도 하나의 가변 영역은 본 명세서에 설명되는 FR2 및/또는 FR3 내 시스테인 잔기를 포함한다.
- [0449] 당업자는 본 명세서에서 제공되는 교시와 함께 당업계에 알려진 방법을 사용하여 본 발명의 미니바디를 용이하게 생성할 것이다.
- [0450] 앞서 언급한 것을 기반으로, 당업자는 미니바디가 단일 단백질 쇄에서 암호화된 전체 면역글로불린의 작은 형태로 항원 결합 영역, 이중 결합 분자 내로 조립을 허용하는 C_H3 도메인(또는 C_H2 도메인) 및 이황화 결합에 의한 다이머화를 수용하는 면역글로불린 힌지를 보유한다는 것을 인식할 것이다.
- [0451] 예시적인 미니바디 및 그것의 생성방법은, 예를 들어 W094/09817에서 설명된다.
- [0452] 단백질을 함유하는 다른 가변 영역
- [0453] 미국 제5,731,168호는 Fv 쌍 사이의 접점(interface)이 유전자 조작으로 재조합 세포 배양물로부터 회수된 헤테로다이머의 백분율을 최대로 하여, 2특이성 단백질을 생성할 수 있는 분자를 설명한다. 바람직한 인터페이스는 적어도 C_H3 도메인의 부분을 포함한다. 이 방법으로, 제1 단백질의 접점으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측

쇄들은 더 큰 측쇄(예를 들면 티로신 도는 트립토판)으로 대체될 수 있다. 큰 측쇄(들)에 대한 동일 또는 유사한 크기의 보상적 "공동(cavity)"은 작은 것들(예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)에 의해 큰 아미노산 측쇄들을 대체함으로써 제2 단백질의 접점 상에 생성된다.

[0454] 가변 영역을 포함하는 2특이성 단백질은 교차연결된 또는 "헤테로컨주게이트" 단백질을 포함한다. 예를 들어, 헤테로컨주게이트 내 단백질 중 하나는 아비딘과, 나머지는 비오틴과 커플링될 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어 면역 시스템 세포들을 원치 않는 세포들에 대해 표적화하도록 제안되었다(미국 제4,676,980호). 가변 영역을 포함하는 헤테로컨주게이트 단백질은 임의의 편리한 교차 결합 방법을 사용하여 만들어질 수 있다. 적합한 교차결합제는 당업계에 알려져 있고, 다수의 교차결합 기술과 함께 미국 제4,676,980호에서 개시된다.

[0455] 가변 영역을 포함하는 2특이성 단백질은 또한 화학적 결합을 사용하여 제조될 수 있다. Brennan (1985)은 무결합 항체들이 단백질분해적으로 절단되어 $F(ab')_2$ 단편을 만드는 방법을 설명한다. 이 단편들은 다이티올 복합화제, 아르세나이트 나트륨의 존재하에 환원되어 근접한 다이티올을 안정화하고 분자간 이황화물 형성을 방지한다. 만들어진 Fab' 단편은 다음으로 티오나이트로벤조에이트(thionitrobenzoate : TNB) 유도체로 변환된다. Fab' -TNB 유도체 중 하나는 다음으로 Fab' -티올에 의해 Fab' -티올로 재변환되고, 다른 Fab' -TNB의 등몰량과 혼합되어 2특이성 단백질을 형성한다.

[0456] 진행은 화학적으로 커플링되어 가변 영역을 포함하는 2특이성 단백질들을 형성할 수 있는 대장균(*E. coli*)로부터의 Fab' -SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. Shalaby (1992)는 완전히 인간화된 2특이성 $F(ab')_2$ 분자의 생성을 설명한다. 각각의 Fab' 단편은 *E. coli*로부터 개별적으로 분리되고 시험관 내에서 관련된 화학적 커플링을 받아서 가변 영역을 포함하는 2특이성 단백질을 형성한다. 이렇게 형성된 2특이성 단백질은 적절한 항원 및 정상 인간 T 세포를 발현시키는 세포에 결합될 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 분해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0457] 단백질을 함유하는 부가적인 가변 영역은, 예를 들어 도메인 항체(domain antibodies : dAbs) 및 그것의 융합(예를 들어, 미국 제6248516에서 설명됨), 단일쇄 Fab (예를 들어, Hust et al., 2007) 또는 Fab_3 (예를 들어, EP19930302894에서 설명됨)을 포함한다.

[0458] 불변 도메인 융합

[0459] 본 발명은 가변 여역 및 불변 영역(예를 들어, Fc) 또는 그것의 도메인, 예를 들어 C_{H2} 및/또는 C_{H3} 도메인을 포함하는 단백질을 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 미니바디(상기 설명함) 또는 $scFv$ - Fc 융합 또는 다이아바디- Fc 융합 또는 트리아바디- Fc 융합 또는 테트라바디- Fc 융합 또는 $scFc$ - C_{H2} 융합 또는 다이아바디- C_{H2} 융합 또는 트리아바디- C_{H2} 융합 또는 테트라바디- C_{H2} 융합 또는 $scFv$ - C_{H3} 융합 또는 다이아바디- C_{H3} 융합 또는 트리아바디- C_{H3} 융합 또는 테트라바디- C_{H3} 융합을 제공한다. 이 단백질 중 어떤 것은 가변영역과 불변 영역 또는 불변 도메인 사이에 링커, 바람직하게는 면역글로불린 힌지 영역을 포함할 수 있다.

[0460] 본 명세서에서 사용되는 용어 "힌지 영역"은 C_{H1} 도메인을 C_{H2} 도메인에 접합하는 중쇄 분자의 부분을 포함한다. 이 힌지 영역은 약 25개의 잔기를 포함하며, 가요성이고, 따라서 2개의 N-말단 항원 결합 영역이 독립적으로 이동하도록 한다. 힌지 영역은 3개의 개별 도메인, 즉 상부, 중간 및 하부 힌지 도메인으로 분류될 수 있다(Roux et al., 1998).

[0461] 본 명세서에서 사용되는 용어 " C_{H2} 도메인"은, 예를 들어 Kabat EU 넘버링 시스템에 따라 대략 위치 231-340에서 연장하는 중쇄 면역글로불린 분자의 일부를 포함한다. 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물쇄는 일반적으로 무결합 천연 IgG 분자의 2개의 $CH2$ 도메인 사이에 끼워진다. 한 구체예에서, 본 발명의 단백질은 IgG1 분자(예를 들어, 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 C_{H2} 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 단백질은 IgG4 분자(예를 들어, 인간 IgG4 분자)로부터 유래된 $CH2$ 도메인을 포함한다.

[0462] 본 명세서에서 사용되는 용어 " C_{H3} 도메인"은 C_{H2} 도메인의 N-말단으로부터, 예를 들어 대략 위치 341-446b(Kabat EU 넘버링 시스템)으로부터 대략 110개의 잔기가 연장하는 중쇄 면역글로불린 분자의 일부를 포함한다. C_{H3} 도메인은 면역글로불린의 C-말단 부분을 전형적으로 형성한다. 그러나 일부 면역글로불린에서, 추가적인 도메인은 C_{H3} 도메인으로부터 연장되어 분자의 C-말단 부분을 형성한다(예를 들어, IgM의 μ 쇄 및 IgE의 e쇄).

내 C_{H4} 도메인). 한 구체예에서, 본 발명의 단백질은 IgG1 분자(예를 들어, 인간 IgG1 분자)로부터 유래된 C_{H3} 도메인을 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 단백질은 IgG4 분자(예를 들어, 인간 IgG4 분자)로부터 유래된 C_{H3} 도메인을 포함한다.

[0463] 본 발명의 단백질을 생성하는데 유용한 불변 도메인 서열은 다수의 상이한 공급원으로부터 얻어질 수 있다. 바람직한 구체예에서, 단백질의 불변 영역 도메인 또는 그것의 일부는 인간 면역글로불린으로부터 유래된다. 그러나, 불변 영역 도메인 또는 그것의 일부가 예를 들어 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그) 또는 비인간 영장류(예를 들어 침팬지, 마카쿠(macaque))를 포함하는 다른 포유류 종의 면역글로불린으로부터 유래될 수 있다는 것이 이해된다. 게다가 불변 영역 도메인 또는 그것의 일부는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE을 포함하는 임의의 면역글로불린 분류, 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4을 포함하는 임의의 면역글로불린 아이소타입으로부터 유래될 수 있다. 바람직한 예에서, 인간 아이소타입 IgG1이 사용된다.

[0464] 다양한 불변 영역 유전자 서열(예를 들어, 인간 불변 영역 유전자 서열)은 공공연하게 접근가능한 기탁물의 형태로 이용가능하고 또는 그것의 서열은 공공연하게 이용가능한 데이터베이스로부터 이용가능하다. 불변 영역 도메인은 특정 이펙터 기능을 가지고(또는 특정 이펙터 기능을 결여한) 또는 면역원성을 감소시키는 특정 변형을 가진 것으로 선택될 수 있다.

[0465] 본 명세서에서 사용된 용어 "이펙터 기능"은 단백질 및/또는 면역 시스템의 세포에 결합하고 다양한 생물학적 효과를 매개하는 Fc 영역 또는 그것의 일부(예를 들어, C_{H2} 도메인)의 기능적 능력을 말한다. 이펙터 기능은 항원 의존적 또는 항원 독립적일 수 있다. "항원 의존적 이펙터 기능"은 보통 대응하는 항원에 대한 면역글로불린의 결합에 따라 보통으로 유도되는 이펙터 기능을 말한다. 전형적인 항원 의존적 이펙터 기능은 보체 단백질(예를 들어 C1q)에 결합하는 능력을 포함한다. 예를 들어, Fc 영역에 상보적인 C1 성분의 결합은 세포 병원체의 옵소닌화(opsonisation) 및 용해를 유발하는 고전적인 상보적 시스템, 즉 보체 의존적 세포독성(complement-dependent cytotoxicity : CDC)으로 언급되는 과정을 활성화시킬 수 있다. 보체의 활성화는 또한 염증반응을 자극하고, 또한 자가면역 과민성에 수반될 수 있다. 다른 항원 의존적 이펙터 작용은 그것의 Fc 영역을 통해 세포 상의 특정 Fc 수용체("FcR")에 대해 면역글로불린의 결합에 의해 매개된다. IgG(감마 수용체, 또는 $Ig\lambda R$), IgE(엡실론 수용체, 또는 $Ig\epsilon R$), IgA(알파 수용체, 또는 $Ig\alpha R$) 및 IgM(뮤 수용체, 또는 $Ig\mu R$)를 포함하는 면역글로불린의 상이한 분류에 특이적인 다수의 Fc 수용체가 있다. 세포 표면 상에 Fc 수용체에 대한 면역글로불린의 결합은 면역 복합체의 엔도시토시스(endocytosis), 면역글로불린 코팅된 입자 또는 미세기관들의 섭취 및 파괴(또한 항체 의존적 식균작용 또는 ADCP(antibody-dependent phagocytosis)로 불림), 면역 복합체의 클리어런스(clearance), 킬러 세포에 의한 항체 코팅된 표적 세포들의 용해(항체 의존적 세포 매개의 세포 독성, 또는 ADCC로 불림), 염증 매개체들의 방출, 면역 시스템 세포 활성의 조절, 면역글로불린 생성물의 태반 전달 및 제어 등을 포함하는, 다수의 중요하고 다양한 생물학적 반응을 촉발한다.

[0466] 본 명세서에서 사용된 용어 "항원 독립적 이펙터 기능"은 그것의 대응하는 항원에 결합되는지 여부와 관계없이 면역글로불린에 의해 유발될 수 있는 이펙터 기능을 말한다. 전형적인 항원 독립적 이펙터 기능은 세포 수송, 면역글로불린의 순환 반감기 및 클리어런스를, 및 정체의 축진을 포함한다. 구조적으로 독특한 Fc 수용체, "신생아 Fc 수용체" 또는 "FcRn"은 또한 구조 수용체로 알려져 있으며, 반감기 및 세포 수송을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 미생물 세포(예를 들어, 스태필로코커스(*Staphylococcal*) 단백질 A 또는 G)로부터 정제된 다른 Fc 수용체는 높은 친화도로 Fc 영역에 결합할 수 있고, Fc-함유 단백질의 정체를 용이하게 하는데 사용될 수 있다.

[0467] 불변 영역 도메인은, 예를 들면 관심의 도메인을 증폭시키기 위해 선택되는 중합효소 연쇄반응 및 프라이머를 사용하여 클로닝될 수 있다. 면역글로불린 서열의 클로닝은, 예를 들어 미국 제5,658,570호에서 설명된다.

[0468] 본 발명의 단백질은 다른 유형 중 임의의 수의 불변 영역 도메인을 포함할 수 있다.

[0469] 단백질의 불변 영역을 구성하는 불변 영역 도메인 또는 그것의 일부는 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 IgG1 분자로부터 유래된 C_{H2} 도메인 또는 그것의 일부 및 IgG3 분자로부터 유래된 C_{H3} 도메인 또는 그것의 일부를 포함할 수 있다.

[0470] 본 발명의 다른 예에서, 본 발명의 단백질은 FcRn 결합을 부여하기에 충분한 적어도 하나의 Fc 영역을 포함한다. 예를 들어, FcRn과 결합하는 Fc 영역의 일부는 Kabat 넘버링에 따라서 IgG1의 아미노산 약 282-438로부터 포함된다.

[0471] 한 예에서, 본 발명의 단백질은 변경된 합성 불변 영역을 포함하되, 그 안의 더 많은 불변 영역 도메인은 부분

적으로 또는 완전히 결실된다("도메인 결실 불변 영역"). 본 발명은 또한 변형된 Fc 여역 또는 버경된 부분, 예를 들어 개선된 또는 환위거느된 이펙터 기능을 포함한다. 다수의 이러한 변형된 Fc 영역은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 미국 제7217797호; 미국 제7217798호; 또는 W02005/047327 미국 20090041770(증가된 반감기를 가짐) 또는 미국 2005037000(증가된 ADCC)에서 설명된다.

[0472] **단백질에 대한 돌연변이**

[0473] 본 발명은 본 발명의 단백질의 돌연변이체 형태의 사용을 고려한다. 예를 들어, 이러한 돌연변이체 폴리펩티드는 본 명세서에서 설명하는 서열과 비교하여 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 일부 예에서, 폴리펩티드는 10이하, 예를 들어 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2개의 보존적 아미노산 치환을 포함한다. "보존적 아미노산 치환"은 유사한 측쇄 및/또는 수치료성(hydropathicity) 및/또는 친수성을 가지는 아미노산으로 대체되는 것이다.

[0474] 바람직한 예에서, 돌연변이체 단백질은 자연적으로 발생하는 단백질과 비교할 때 유일한, 또는 많아야 1 또는 2 또는 3 또는 4개의 보존적 아미노산 변화를 가진다. 보존적 아미노산 변화의 상술은 이하에 제공된다. 당업자는 재조합 세포에서 발현될 때 이러한 부수적 변화들이 폴리펩티드의 활성을 변경시키지 않도록 합리적으로 예측될 수 있다는 것을 인식한다.

[0475] 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기의 패밀리들은, 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐 알라닌, 트립토판, 히스티딘)을 포함하여 당업계에 정의되어 있다.

[0476] 본 발명은 또한 본 명세서에 설명된 서열과 비교하여 하나 이상의 삽입 또는 결실을 고려한다. 일부 예에서, 폴리펩티드는 10이하, 예를 들어, 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2개의 삽입 및/또는 결실을 포함한다.

[0477] **시스테인 잔기의 위치 결정**

[0478] 본 발명은 임의의 구체예 또는 예로 본 명세서에 설명된 것과 같은 FR2 및/또는 FR3의 시스테인 잔기의 위치 결정을 고려한다. 본 발명에 의해 고려되는 예시적인 시스테인 잔기는 도 6a 및 도 6b에 도시된다.

[0479] 한 예에서, 본 발명은 프레임워크 영역(FR) 1 내 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하는 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 분리된 단백질을 제공하되, 시스테인 잔기는 잔기들 중 적어도 하나가 화합물에 컨쥬게이트되고, 적어도 하나의 시스테인 잔기가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합이 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있도록 위치된다.

[0480] 다른 예에서, 본 발명은 프레임워크 영역(FR) 1 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하는 분리된 단백질을 제공하되, 시스테인 잔기는 잔기들 중 적어도 하나가 화합물에 컨쥬게이트될 수 있고, 적어도 2개의 시스테인 잔기가 화합물에 컨쥬게이트되지 않는다면, 이황화 결합이 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있도록 위치된다.

[0481] 대안적인 또는 추가적인 예에서, 본 발명은 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 분리된 단백질을 제공하되, 가변 영역 중 적어도 하나는 프레임 워크 영역(FR) 1 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하며, 시스테인 잔기는 화합물에 컨쥬게이트될 수 있는 적어도 하나의 잔기가 화합물에 컨쥬게이트되며, 적어도 하나의 시스테인 잔기가 다른 화합물에 컨쥬게이트된다면, 이황화 결합이 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있도록 위치된다.

[0482] 대안의 또는 추가적인 예에서, 본 발명은 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H) 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 분리된 단백질을 제공하되, 적어도 하나의 가변영역은 프레임 워크 영역(FR) 1 내에 위치한 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하며, 시스테인 잔기는 화합물에 컨쥬게이트될 수 있는 적어도 하나의 잔기가 화합물에 컨쥬게이트되며, 적어도 2개의 시스테인 잔기가 다른 화합물에 컨쥬게이트된다면, 이황화 결합이 시스테인 잔기 사이에 형성될 수 있도록 위치된다.

[0483] 본 발명의 각각의 상기 예에서, 적어도 2 또는 적어도 2개의 시스테인 잔기는 그것들이 화합물이 컨쥬게이트될 수 있도록 위치되는 것이 바람직하다.

[0484] 본 발명의 한 예에서, 시스테인 잔기는 FR2 및/또는 FR3의 루프 영역 내에 위치된다. 본 명세서에서 사용되는

용어 "루프 영역"은 FR2 또는 FR3의 2개 영역 및/또는 2개의 아미노산에 가요성을 제공하여 서로 연결되거나 결합하는, 예를 들어 베타 시트 내 2개의 아미노산에 충분한 가요성을 제공하여 서로 연결되거나 결합하는 FR2 또는 FR3 내의 아미노산 서열을 의미하는 것으로 여겨질 것이다. FR2 및/또는 FR3의 루프 영역은 CDR1 또는 CDR3의 부분이 아니다.

[0485] 다른 예에서, FR2 및/또는 FR3의 시스테인 잔기는 잔기들 사이에서 이황화 결합을 형성하도록 위치된다.

[0486] "이황화 결합을 형성하도록 위치되는"은 단백질이 폴딩될 때, 그것들이 이황화 결합에 충분히 가까워서 잔기 사이에 형성되도록 2개의 시스테인 잔기가 단백질 내에 위치된 것을 의미한다. 예를 들어, 2개의 시스테인 잔기 내 2개의 탄소 원자 사이의 거리는 서로 약 6-7Å 또는 서로 약 2-9Å, 예컨대 서로 6-7Å 또는 서로 3.5-6.8Å, 예를 들어 서로 약 4Å 내에 있을 수 있다. 단백질 내 잔기의 근접성을 예측하고 및/또는 이황화 결합 형성의 가능성을 예측하는 방법은 당업자에게 명백하며 및/또는 본 명세서에서 설명될 것이다.

[0487] 따라서, 한 예에서, 본 발명의 단백질은 FR2 및/또는 FR3 내에 위치된 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하되, 시스테인 잔기는 서로 약 2-9Å, 바람직하게 서로 약 6-7Å 내에 있다.

[0488] 다른 예에서, 시스테인 잔기는 그것의 측쇄가 용매에 노출되는 단백질의 잔기에 위치된다. 용매 노출 또는 용매 접근가능 표면적을 결정하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 쉬레이크-러플리(Shrake-Rupley) 알고리즘 또는 LCPO 방법을 포함한다.

[0489] 따라서 다른 예에서, 본 발명의 단백질은 FR2 및/또는 FR3 내에 위치된 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함하되, 시스테인 잔기는 그것의 측쇄(바람직하게 그것의 티올 기)가 용매에 노출되도록 위치된다.

[0490] "용매에 노출"은 시스테인 잔기의 측쇄가 그것들이 단백질이 존재하거나 현탁된 용매와 접촉할 수 있도록 폴딩될 때 단백질의 표면 상에 있는 것을 의미한다. 바람직하게, 적어도 하나(또는 하나 또는 둘 다)의 측쇄는 용매에 충분히 노출되어 화합물이 그것에 컨จู게이트된다.

[0491] 바람직하게, 본 발명의 단백질은 다음 중 하나 이상, 바람직하게는 2이상의, 바람직하게는 모두에 위치된 적어도 2개의 시스테인 잔기를 포함한다:

[0492] (i) 그것들의 측쇄가 서로를 향해 기울어져 있도록 위치;

[0493] (ii) 그것들의 측쇄원자가 용매에 노출되도록 위치; 및/또는

[0494] (iii) 그것의 Cα 탄소 원자가 서로 약 6-7Å에 있도록 위치.

[0495] 본 발명의 단백질(본 발명의 임의의 하나 이상의 예에 따라서 본 명세서에서 설명됨)은 따라서 FR2 및/또는 FR3 내에서 이황화 결합을 형성할 수 있고 대안으로 화합물의 화학양론적 컨จู게이션을 위해 환원될 수 있는 FR2 및/또는 FR3 내에 위치된 적어도 2개의 시스테인 잔기를 제공한다. 이 본 발명의 생성물은 프레임워크 영역(FR1 및/또는 FR2 및/또는 FR3) 내에서 이황화 결합을 형성할 수 있는 적어도 2개의 시스테인 잔기를 제공하지 않는 다른 시스테인 컨จู게이션 전략에 비해 이점을 가진다. 이러한 선행의 및 비효과적인 전략은 단일 시스테인 잔기(Kim et al., 2008), C-말단 시스테인 잔기(Sirk et al., 2008) 및 무결함 항체 내 단일 시스테인 잔기(Junutula et al., 2008)를 포함하며, 이것들 모두는 빈약한 발현 수율, 가변적 컨จู게이션 및 더 큰 스케일의 공정을 위한 복잡함을 포함한다. 더 나아가, 꽤 간 이황화 결합의 부분적 환원에 의해 시스테인 잔기 상에 컨จู게이션된 항체들은 가변적 화학양론(항체 당 0 내지 8약물) 및 잠재적으로 100개 중 초과 수율을 가진다(Junutula et al., 2008).

[0496] 폴딩된 단백질 내에서 루프 및/또는 잔기의 위치를 예측하는 방법은 당업자에게 명백할 것이며 인실리코 방법을 포함한다. 예를 들어, 단백질의 구조적 특징은 미국국립보건원(National Institutes of Health)에서 미국 메릴랜드주 20894 베데스다 록빌 파이크 8600에 소재한 미국 국가생물공학센터(National Center for Biotechnology Information: NCBI)의 웹사이트에서 이용가능한 적합한 소프트웨어, 예를 들어 X-레이 결정학 및/또는 NMR 분광학을 사용하여 결정되는 3차원 생체분자 구조를 포함하여 NCBI 분자 모델링 데이터베이스(Molecules Modeling Database : MMDB)를 통해 결정된다.

[0497] NCBI 보존 도메인 데이터베이스(conserved domain database : CDD)는 알려진 Smart and Pham 컬렉션으로부터 도메인을 포함하여, 3D-구조 뷰어(3D-structure viewer : Cn3D)와 연결한다. NCBI 보존적 도메인 아키텍처 검색 툴(Conserved Domain Architecture Retrieval Tool : CDART)은 그것의 도메인 아키텍처에 의해 이웃하는 단백질에 대해 사전 계산된 도메인 배치를 사용한다.

- [0498] 단백질 또는 펩티드 2차 구조를 예측하는 추가적인 방법은 당업계에 알려져 있고 및/또는 예를 들어 문헌 [Moult, 1996; Chou et al., 1974; Chou et al., 1974; Chou et al., 1978; Chou et al., 1978; 또는 Chou et al., 1979]에서 설명된다.
- [0499] 추가적으로, 컴퓨터 프로그램은 현재 단백질 또는 펩티드의 2차 구조를 예측하는 것을 보조하기 위해 이용가능하다. 2차 구조의 하나의 이러한 방법은 상동성 모델링을 기반으로 한다. 예를 들어, 30% 초과 또는 유사하게 40% 초과인 서열 동일성을 가지는 2개의 단백질은 종종 유사한 구조적 위상(topology)을 기반으로 한다. 예를 들어, 단백질 구조적 데이터베이스(protein structural database : PDB)의 최근 성장은, 단백질의 구조 내 잠재적인 폴딩 수를 포함하여 2차 구조의 향상된 예측성을 제공하였다(Holm et al., 1999). 예를 들어, 단백질 구조의 결정 방법은, 예를 들어 미국 20020150906에서 설명되거나 또는 컴퓨터 프로그램 또는 알고리즘, 예컨대 MODELLER(Sali and Blundell, 1993)를 사용한다. 이 기술들은 특징화된 구조를 가지는 단백질 서열로 단백질 서열을 배열하는 것에 의존한다. 이러한 배열 알고리즘은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 NCBI의 BLAST와 같은 소프트웨어 패키지를 통해 접근된다. 구조적 정보, 즉 문제 단백질의 3차원 구조는 다음으로 미리 특징화된 단백질 또는 펩티드에 배열된 서열 또는 하위 서열에 대응하는 구조적 정보를 기반으로 예측된다. 이러한 방법에서 번역글로불린의 본 명세서에서 설명하는 FR2 및/또는 FR3에 대응하는 단백질의 3차원 구조의 라이브러리를 만들 수 있다.
- [0500] 2차 구조를 예측하는 추가적인 방법은, 예를 들어 "스레딩(threading)"(Jones, 1996), "프로파일 분석"(Bowie et al., 1991; Gribskov et al., 1990; Gribskov et al., 1989), 및 "진화적 결합"을 포함한다. 단백질 서열의 통상적인 스레딩은 단백질의 3D 구조 스캐폴드를 예측하기 위해 사용된다. 전형적으로, 스레딩은 서열을 포함하는 스코어링 기능뿐만 아니라 2차 구조 및 용매 노출과 같은 국소 변수를 사용하여 단백질이 잠재적인 구조적 주형에 그것의 서열을 스레딩(또는 비교)하여 폴딩을 할당하는 과정이다(Rost et al. 1997; Xu and Xu 2000; 및 Panchenko et al. 2000). 예를 들어 스레딩 과정은 아미노산 서열의 2차 구조 및 문제 서열의 각 잔기에 대한 용매 접근성의 예측으로부터 시작한다. 예측된 구조의 결과적인 1차(1D) 프로파일이 알려진 3D 구조 라이브러리의 일원으로 스레딩된다. 각 서열 구조 쌍은 문제의 서열에 대해 예측되는 3D 구조를 구성한다. 본 발명의 경우 스레딩은 2차 구조가 해결된 다수의 번역 글로불린의 Fv 및 Fab 단편 때문에 상대적으로 단순하게 만들어진다.
- [0501] 2개 이상의 시스테인 잔기들을 포함하는 단백질의 경우에, 짝수의 시스테인 잔기들이 포함되는 것이 바람직하며, 예를 들어 4 또는 6 또는 8 또는 10개의 시스테인 잔기가 포함된다. 예를 들어, 시스테인 잔기들이 짝지어지며, 즉 두 개 잔기들의 조합은 이황화 결합이 그것들 사이에 형성되도록 배열된다.
- [0502] 바람직하게, 본 발명의 단백질은 비환원성 조건하에서 FR2 및/또는 FR3 내 유리 티올을 포함하지 않고 및/또는 비환원성 조건 하에서 다른 시스테인 잔기에 또는 화합물에 연결되지 않는 시스테인 잔기를 포함하지 않는다.
- [0503] 본 발명의 예에서, 시스테인 잔기는 그것들이 화합물에 컨주게이트되지 않을 때 프레임워크 내 이황화 결합이 그것들 사이에 형성될 수 있도록 위치된다. 용어 "프레임워크 내 이황화 결합"은 이황화 결합이 단일 프레임워크 영역 내에서 형성되는 것을 의미하는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 2개의 시스테인 잔기가 FR2 내에 위치되면, 왜 내 이황화 결합이 FR2 내에 형성된다.
- [0504] **단백질 생성**
- [0505] **돌연변이 유발**
- [0506] 가변 영역을 포함하는 단백질을 암호화하는 DNA는 당업계의 표준 방법을 사용하여 분리된다. 예를 들어, 프라이머는 관심의 영역 옆에 있는 가변 영역 내 보존된 영역에 어닐(anneal)하도록 설계되고, 그 프라이머들은 다음으로, 예를 들어 PCR에 의해 증폭 핵산을 증폭시키기 위해 사용된다. 적당한 방법 및/또는 프라이머는 당업계에 알려져 있고 및/또는 예를 들어 Borrebaeck (ed), 1995 및/또는 Froyen et al., 1995에서 설명된다. 이러한 증폭 방법을 위한 주형 DNA의 적당한 공급원은, 예를 들어 본 명세서에 설명된 하이브리도마, 트랜스펙토마 및/또는 가변 영역을 포함하는 단백질을 발현시키는 세포로부터 유래된다.
- [0507] 분리 후, DNA는 당업계에 알려진 임의의 다양한 방법에 의해 요구되는 위치에서 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된다. 이러한 방법은 제한되는 것은 아니지만, 자리 지정(또는 올리고뉴클레오타이드 매개된) 돌연변이, PCR 돌연변이 유발, 및 단백질을 암호화하는 미리 제조된 DNA의 카세트 돌연변이 유발을 포함한다. 재조합 단백질의 변이체는 또한 제한 단편 조작에 의해 또는 합성 올리고뉴클레오타이드에 의한 오버랩 확장 PCR에 의해 구성될 수 있다. 돌연변이 유발 프라이머는 시스테인 코돈 대체물(들)을 암호화하며, 예를 들어 코돈 암호화 시스테인(즉 TGT 또는 TGC)을 암호화하는 코돈을 구성하는 잔기를 포함한다. 표준 돌연변이 기술이 이러한 돌연변이체 DNA를

암호화하는 DNA를 만들기 위해 사용될 수 있다. 일반적인 안내는 문헌[Sambrook et al 1989; 및/또는 Ausubel et al 1993]에서 찾을 수 있다.

[0508] 자리 지정 돌연변이 유발은 치환 변이체, 즉 돌연변이체 단백질을 제조하는 한 방법이다. 이 기술은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Carter et al 1985; Ho et al 1989; 및 Kunkel 1987]를 참조). 간략하게, DNA의 자리 지정 돌연변이 유발을 수행하는 것에서, 출발 DNA는 우선 이러한 출발 DNA의 단일 가닥에 원하는 돌연변이(즉, 코돈을 암호화하는 하나 이상의 시스테인의 삽입)를 암호화하는 올리고뉴클레오티드를 혼성화하여 변경된다. 혼성화 후, DNA 폴리머라제가 사용되어 프라이머로서 혼성화된 올리고뉴클레오티드를 사용하고, 주형으로서 출발 DNA의 단일 가닥을 사용하여 완전한 제2 가닥을 합성한다. 따라서 원하는 돌연변이를 암호화하는 올리고뉴클레오티드는 결과된 이중 가닥 DNA에 포함된다. 자리 지정 돌연변이 유발은 발현 플라스미드 내에서 돌연변이되는 단백질을 발현하는 유전자 내에서 수행될 수 있고, 결과된 플라스미드는 원하는 시스테인 대체 돌연변이의 도입을 확인하기 위해 서열화될 수 있다. 자리 지정 프로토콜 및 포맷들은 상업적으로 이용가능한 키트, 예를 들어 QuikChange(등록상표) Multi Site-Directed Mutagenesis Kit(캘리포니아주 라호이아에 소재된 Stratagene)를 포함한다.

[0509] PCR 돌연변이 유발은 또한 출발 단백질의 아미노산 서열 변이체를 만들기 위해 적합하다. 이에 관하여 문헌[Higuchi, 1990; Ito et al 1991; Bernhard et al 1994; 및 Vallette et al 1989]을 참조한다. 간략하게, 소량의 주형 DNA가 PCR에서 출발 물질로서 사용될 때, 주형 DNA 내 대응하는 영역으로부터 서열과 약간 상이한 프라이머는 그 프라이머가 주형과 다른 경우의 위치에서만 주형 서열과 상이한, 상대적으로 많은 양의 특이적 DNA 단편을 만들기 위해 사용될 수 있다.

[0510] 변이체, 카세트 돌연변이 유발의 다른 제조방법은 문헌[Wells et al, 1985]에 의해 설명되는 기술을 기반으로 한다. 출발 물질은 돌연변이되는 출발 단백질 DNA를 포함하는 플라스미드(또는 다른 벡터)이다. 돌연변이되는 출발 DNA의 코돈(들)이 확인된다. 확인된 돌연변이 자리(들)의 각 자리 상에는 독특한 제한 엔도뉴클레아제 자리가 있어야 한다. 이러한 제한 자리가 존재하지 않는다면, 그것들은 상기 설명한 올리고뉴클레오티드 매개 돌연변이 유발 방법을 사용하여 만들어져서 그것들을 출발 DNA의 적절한 위치에 도입할 수 있다. 플라스미드 DNA는 그것을 선형화하는 자리에서 절단된다. 제한 자리 사이의 DNA 서열을 암호화하지만 원하는 돌연변이(들)를 함유하는 이중 가닥의 올리고뉴클레오티드는 표준 과정을 사용하여 합성되며, 올리고뉴클레오티드 중 2개의 가닥은 개별적으로 합성된 다음 표준 기술을 사용하여 함께 혼성화된다. 이런 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 카세트로서 언급된다. 이 카세트는 선형화된 플라스미드의 말단과 양립하는 5' 및 3' 말단을 가지도록 설계되어, 그것들은 플라스미드에 직접적으로 결합될 수 있다. 이 플라스미드는 현재 돌연변이된 DNA 서열을 함유한다. 암호화된 시스테인 대체물을 함유하는 돌연변이체 DNA는 DNA 시퀀싱에 의해 확인될 수 있다.

[0511] 또한 PCR 기반 돌연변이 유발에 의해 주형으로서 이중 가닥 플라스미드 DNA를 사용하여 올리고뉴클레오티드 관련 돌연변이 유발에 의해 단일 돌연변이가 만들어진다(문헌[Sambrook and Russel, 2001; Zoller et al 1983; Zoller and Smith, 1982]).

[0512] 재조합 발현

[0513] 재조합 단백질의 경우, 그것을 암호화하는 핵산은 발현 벡터에 바람직하게 위치되는데, 이것은 다음에 달리 번역글로불린 단백질을 생성하지 않는 숙주 세포, 바람직하게 이항화 브릿지 또는 결합을 만들 수 있는 세포, 예컨대 *E. coli* 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 포유류 세포, 예컨대 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 골수종 세포에 트랜스펙션되어 재조합 숙주 세포에서 단백질의 합성을 얻는다. 번역글로불린을 암호화하는 DNA의 박테리아 내 재조합 발현의 검토 논문은 문헌[Skerra et al, (1993) 및 Pluckthun, (1992)]을 포함한다. 이러한 결과를 달성하기 위한 분자 클로닝 기술은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 문헌[Ausubel 또는 Sambrook]에서 설명된다. 매우 다양한 클로닝 및 시험관내 증폭 방법들이 재조합 핵산의 구성에 적합하다. 재조합 번역글로불린의 생성방법은 또한 당업계에 알려져 있다. 이에 관해서 미국 제4,816,567호; 미국 제5225539호, 미국 제6054297호, 미국 제7566771호 또는 미국 제5585089호를 참조한다.

[0514] 분리 후, 본 발명의 단백질을 암호화하는 핵산은 세포 유리 시스템에서 또는 세포 내에서 추가적인 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위하여 발현 구성체 또는 복제가능한 벡터 내에 바람직하게 삽입될 수 있다. 바람직하게 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0515] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프로모터"는 그것의 가장 넓은 맥락으로 취해지며, 예를 들어 발달 및/또는 외부 자극에 반응하여 핵산의 발현을 변경시키는 부가적인 조절 요소(예를 들어 상류의 활성화 서열, 전사 인자 결합

자리, 인핸서 및 사일렌서(silencer))과 함께 또는 이것들 없이, TATA 박스 또는 개시 요소를 포함하는, 정확한 전사 개시에 필요한 계층 유전자의 전사 조절 서열을 포함한다. 본 문맥에서, 용어 "프로모터"는 또한 그것이 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 부여하고, 활성화하거나 향상시키는 제조합, 합성 또는 융합 핵산을 설명하기 위해 사용된다. 바람직한 프로모터는 추가로 상기 핵산의 발현을 향상시키고 및/또는 공간적 발현 및/또는 일시적 발현을 변경시키기 위하여 하나 이상의 특이적 조절 요소의 추가적인 복제물을 함유할 수 있다.

[0516] 본 명세서에서 사용되는 용어 "작동가능하게 연결된"은 핵산의 발현이 프로모터에 의해 제어되는 핵산에 대한 프로모터의 위치결정을 의미한다.

[0517] 세포 유리 발현 시스템이 또한 본 발명에 의해 고려된다. 예를 들어, 본 발명의 단백질을 암호화하는 핵산은 적당한 프로모터, 예를 들어 T7 프로모터에 작동가능하게 연결되며, 결과된 발현 구성체는 전사 및 번역에 충분한 조건에 노출된다. 시험관내 발현 또는 세포 유리 발현에 대한 전형적인 발현 벡터는 설명되었고, 제한되는 것은 아니지만, TNT T7 및 TNT T3 시스템(Promega), pEXP1-DEST 및 pEXP2-DEST 벡터(Invitrogen)를 포함한다.

[0518] 세포 내 발현을 위해 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로, 제한되는 것은 아니지만, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 신호 서열, 본 발명의 단백질을 암호화하는 서열(예를 들어 본 명세서에서 제공된 정보로부터 유래됨), 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열. 당업자는 단백질의 발현을 위한 적당한 서열을 인식할 것이다. 예를 들어, 예시적인 신호 서열은 원핵생물 분비 신호(예를 들어, pelB, 알칼린 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열안정성 엔테로톡신 II), 효소 분비 신호(예를 들어, 인버타제 리더(invertase leader), α 인자 리더, 또는 산 포스파타제 리더) 또는 포유류 분비 신호(예를 들어, 단순포진 gD 신호)를 포함한다.

[0519] 예시적인 프로모터는 원핵생물 중에서 활성인 것(예를 들어, phoA 프로모터, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼린 포스파타제, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 및 tac 프로모터와 같은 혼성 프로모터)를 포함한다. 이 프로모터는 그램 음성 또는 그램 양성 유기체와 같은 진정세균, 예를 들어 에스케리키아(*Escherichia*)와 같은 장내세균, 예를 들어, 대장균, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어, 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 및 쉬겔라(*Shigella*)뿐만 아니라, 바실리(*Bacilli*) 예컨대 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 바실러스 리케니포미스(*B. licheniformis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대 슈도모나스 에루기노사(*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)을 포함하는 원핵생물 내에서 발현에 유용하다. 바람직하게, 숙주는 *E. coli*이다. *E. coli* B, *E. coli* X 1776(ATCC 31,537), 및 *E. coli* W3110(ATCC 27,325), DH5 α 또는 DH10B와 같은 다른 균주가 적합하지만, 한 바람직한 *E. coli* 클로닝 숙주는 *E. coli* 294(ATCC 31,446)이다.

[0520] 포유류 세포에서 활성인 예시적인 프로모터는 거대세포바이러스 즉시 초기 프로모터(cytomegalovirus immediate early promoter : CMV-IE), 인간 연장 인자 1- α 프로모터(EF1), 소핵 RNA 프로모터(U1a 및 U1b), α -미오신 중쇄 프로모터, 유인원 바이러스 40 프로모터(SV40), 라우스 육종 바이러스 프로모터(RSV), 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, β -액틴 프로모터; CMV 인핸서/ β -액틴 프로모터를 포함하는 융합 조절 요소 또는 번역 글로블린 프로모터 또는 그것의 활성 단편을 포함한다. 유용한 포유류 숙주 셀라인의 예는 SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인(현탁액 배양물 중에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포; 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 또는 중국 햄스터 난소 세포(CHO)를 포함한다.

[0521] 예를 들어 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 사카로마이세스 폼베(*S. pombe*)를 포함하는 균으로부터 선택되는 효모와 같은 효모 세포에서 발현에 적당한 전형적인 프로모터는, 이에 제한되는 것은 아니지만, ADH1 프로모터, GAL1 프로모터, GAL4 프로모터, CUP1 프로모터, PHO5 프로모터, nmt 프로모터, RPR1 프로모터, 또는 TEF1 프로모터를 포함한다.

[0522] 곤충 세포에서 발현에 적당한 프로모터는, 이에 제한되는 것은 아니지만, OPEI2 프로모터, *Bombyx mori*로부터 분리된 곤충 액틴 프로모터, 초파리(*Drosophila sp.*) dsh 프로모터(Marsh et al 2000) 및 유도성 메탈로티오네인 프로모터를 포함한다. 제조합 단백질의 발현을 위한 바람직한 곤충 세포는 BT1-TN-5B1-4 세포, 및 스포돔테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포(예를 들어, sf19 세포, sf21 세포)를 포함하는 균으로부터 선택된 곤충 세포를 포함한다. 핵산 단편의 발현을 위한 적당한 곤충은, 이에 제한되는 것은 아니지만 초파리를 포함한다. 스포돔테라 프루기페르다의 사용이 또한 고려된다.

[0523] 분리된 핵산 분자 또는 그것을 포함하는 유전자 구성체를 발현을 위한 세포에 도입하는 수단은 당업자에게 알려

져 있다. 주어진 세포에 대해 사용되는 기술은 알려진 성공적 기술에 의존한다. 세포에 재조합 DNA를 도입하는 수단은 미세주입, DEAE-텍스트란에 의해 매개되는 트랜스펙션, 리포펙타민(미국 메틸랜드주에 소재한 Gibco) 및 /또는 셀펙틴(미국 메틸랜드주에 소재한 Gibco)을 사용하는 것과 같은 리포솜에 의해 매개되는 트랜스펙션, PEG-매개된 DNA 흡수, 전기천공법 및 특히 DNA-코팅된 텅스텐 또는 금 입자(미국 위스콘신주에 소재한 Agracetus Inc.)를 이용하는 것에 의하는 것과 같은 미세입자 폭발법(microparticle bombardment)을 포함한다.

[0524] 본 발명의 단백질을 생성하는데 사용된 숙주 세포는 사용되는 세포 유형에 의존하여 다양한 배지 중에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예컨대 Ham's F10(Sigma), 최소 필수 배지((Minimal Essential Medium : MEM), (Sigma)), RPMI-1640(Sigma), 및 돌베코 변형 이글 배지((Dulbecco's Modified Eagle's Medium : DMEM), Sigma)가 포유동물 세포를 배양하는데 적당하다. 본 명세서에서 논의되는 다른 세포 유형을 배양하기 위한 배지는 당업계에 알려져 있다.

[0525] 단백질의 분리

[0526] 본 발명의 단백질은 바람직하게 분리된다. "분리된"은 단백질이 실질적으로 정제되거나 그것의 자연적으로 발생하는 환경으로부터, 예를 들어 이중기원의 환경에 있는 것으로부터 제거되는 것을 의미한다. "실질적으로 정제되는"은 단백질에 오염 물질이 실질적으로 없는, 예를 들어 오염물질이 적어도 약 70% 또는 75% 또는 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 96% 또는 97% 또는 98% 또는 99% 없는 것을 의미한다.

[0527] 본 발명의 단백질의 정제 방법은 당업계에 알려져 있고 및/또는 본 명세서에서 설명된다.

[0528] 재조합 기법을 사용할 때, 본 발명의 단백질은 세포 내부에서, 플라스미드 주변 공간에서 생성될 수 있고 또는 배지로 직접적으로 분비될 수 있다. 단백질이 세포 내부적으로 생성된다면, 제1 단계로서, 특정 파편, 즉 숙주 세포 또는 용해된 단편은, 예를 들어 원심분리 또는 초미세여과에 의해 제거된다. 문헌[Carter et al. (1992)]는 *E. coli*의 플라스미드 주변 공간으로 분비된 항체들을 분리하는 방법을 설명한다. 간략하게, 세포 페이스트가 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오라이드(PMSF)의 존재하에서 약 30분에 걸쳐 녹는다. 세포 파편은 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 단백질이 배지로 분비되면, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액은 일반적으로 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 초미세여과 유닛을 사용하여 우선 농축된다. PMSF와 같은 프로테아제 억제제가 임의의 앞서 언급한 단계 중에 포함될 수 있으며, 항생물질이 우연한 오염물질의 성장을 방지하도록 포함될 수 있다.

[0529] 세포로부터 제조된 단백질은, 예를 들어 하이드록실 아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화도 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화 리간드로서 단백질 A의 적합성은 중 및 단백질 내에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인(만약 존재한다면)의 아이소타입에 의존한다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄(Lindmark et al. 1983)를 기반으로 하는 면역글로불린을 정제하기 위해 사용될 수 있다. 단백질 G는 모든 마우스 아이소타입에 대해 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 추천된다(Guss et al. 1986). 다르게는 본 발명의 단백질 내 가변 영역이 결합하거나 상승된 항원 또는 에피토프의 결정소를 사용하여 친화도 정제가 수행될 수 있다. 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게 아가로스에 부착되지만, 다른 매트릭스가 이용가능하다. 제어된 포어 글래스 또는 폴리(스티렌다이비닐)벤젠과 같이 기계적으로 안정한 매트릭스는 아가로스로 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 공정 시간을 허용한다. 단백질 정제의 다른 기술, 예컨대 이온 교환 컬럼 상 분류, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 헤파린 SEPHAROSE(상표명) 크로마토그래피 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 암모늄 설페이트 침전이 또한 회수되는 단백질에 따라서 이용가능하다.

[0530] 당업자는 또한 본 발명의 단백질이 정제 또는 검출을 용이하게 하도록 태그, 예를 들어 폴리-히스티딘 태그, 예를 들어 헥사-히스티딘 태그 또는 인플루엔자 바이러스 혈구응집소(HA) 태그, 또는 유인원 바이러스 5(V5) 태그 또는 FLAG 태그, 또는 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST) 태그를 포함하도록 변형될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 바람직하게, 태그는 헥사-his 태그이다. 결과된 단백질은 다음으로, 친화도 정제와 같이 당업계에 알려진 방법을 사용하여 정제된다. 예를 들어, hexa-his 태그를 포함하는 단백질은 고체 또는 반고체 지지체 상에 고정된 헥사-his 태그와 특이적으로 결합하는 니켈-나이트릴로트라이아세산(Ni-NTA)과 단백질을 포함하는 샘플을 접촉시키는 단계, 샘플을 세척하여 비결합 단백질을 제거하는 단계, 및 후속하여 결합 단백질을 용리하는 단계에 의해 정제된다. 대안으로, 또는 추가적으로 태그와 결합하는 리간드 또는 항체는 친화도 정제 방법으로 사용된다.

- [0531] 임의의 예비적인 정제 단계(들) 후, 본 발명의 단백질과 오염물질을 포함하는 혼합물은 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피를 받을 수 있다.
- [0532] 단백질 합성
- [0533] 본 발명의 단백질은 표준화된 기술을 사용하여, 예를 들어 BOC 또는 FMOC 화학을 사용하여 그것이 결정되는 아미노산 서열로부터 용이하게 합성된다. 합성 펩티드는 고체 상, 액체 상 또는 펩티드 응축 또는 그것의 임의의 조합을 사용하여 제조되며, 천연 및/또는 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 펩티드 합성을 위해 사용되는 아미노산은 문헌[Merrifield, 1963]의 본래의 고체 상 공정의 탈보호, 중화, 커플링 및 세척 프로토콜에 의한 표준 Boc(N α -아미노 보호된 N α -t-부틸옥시카르보닐) 아미노산 수지, 또는 문헌[Carpino and Han, 1972]에 의해 설명되는 염기 불안정 N α -아미노 보호된 9-플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc) 아미노산일 수 있다. Fmoc와 Boc N α -아미노 보호된 아미노산을 둘 다, 예를 들어 Fluka, Bachem, Advanced Chemtech, Sigma, Cambridge Research Biochemical, Bachem, 또는 Peninsula Labs과 같은 다양한 상업적 공급원으로부터 얻을 수 있다.
- [0534] 컨쥬게이트
- [0535] 본 발명은 또한 임의의 구체예에 따라서 본 명세서에 설명된 단백질의 컨쥬게이트를 제공한다. 단백질이 컨쥬게이트 될 수 있는 화합물의 예는 방사성 동위원소, 검출가능한 표지, 치료적 화합물, 콜로이드, 독소, 핵산, 펩티드, 단백질, 피험자 내에서 반감기를 증가시키는 화합물 및 이것의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물이다. 예시적인 치료제는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 항혈관형성제, 신혈관형성 억제제 및/또는 다른 혈관신생 억제제, 증식방지제, 세포자멸사유발제, 화학치료제 또는 치료적 핵산을 포함한다.
- [0536] 독소는 세포에 해로운(예를 들어 사멸시키는) 임의의 약제를 포함한다. 당업계에 알려진 약물의 이러한 분류 설명 및 그것의 작용 메커니즘에 대해, 문헌[Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990]을 참조한다. 면역글로불린 면역독소 컨쥬게이트의 제조에 적절한 추가적인 기술은, 예를 들어 문헌[Vitetta (1993) 및 미국 제5,194,594호]에서 제공된다. 예시적인 독소는 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄(슈도모나스 에루기노사로부터 유래), 리신(ricin) A쇄, 아브린 A쇄, 모텍신 A쇄, 알파-사신(sarcin), 유동나무(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, 및PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신(curcin), 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 에노마이신 및 트라이코테센(tricothecenes)을 포함한다. 이에 관하여 예를 들어, WO 93/21232를 참조한다.
- [0537] 본 발명의 면역컨쥬게이트를 형성하기에 적당한 화학치료제는 아우리스타틴 및 메이탄신, 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 이메틴, 미토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 다이하이드록시 안트라신 다이온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데-하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신, 항대사물질(예컨대 메토폭세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 테카르바진, 하이드록시우레아, 아스파라기나제, 젬시타빈, 클라드리빈), 알킬화제(예컨대 메클로레타민, 티오에파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU), 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파미드, 부설판, 다이브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진(DTIC), 프로카르바진, 미토마이신 C, 시스플라틴 및 다른 백금 유도체, 예컨대 카르보플라틴), 항생물질(예컨대 닥티노마이신(앞서 언급한 악티노마이신), 블레오마이신, 다우노루비신(앞서 언급한 다우노마이신), 독소루비신, 이다루비신, 미트라마이신, 미토마이신, 미톡산트론, 플리카마이신, 안트라마이신(AMC))를 포함한다.
- [0538] 적당한 혈관형성 억제제(항혈관형성제)는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 유로키나제 억제제, 매트릭스 메탈로프로테아제 억제제(예컨대 마리마스타트(marimastat), 네오바스타트(neovastat), BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 및 유사한 약제), 내피 세포 이동 및 증식 억제제(예컨대 TNP-470, 스쿠알라민, 2-메톡시에스트라다이올, 콤레타스타틴, 엔도스타틴, 엔지오스타틴, 페니실라민, SCH66336(뉴저지주 매디슨시에 소재한 Schering-Plough Corp), R115777(뉴저지주 타이타스빌시에 소재한 Janssen Pharmaceutica, Inc) 및 유사한 약제), 혈관생성 성장 인자의 길항제(예컨대 ZD6474, SU6668, 혈관생성제에 대한 항체 및/또는 그것의 수용체(예컨대 VEGF, bFGF, 및 엔지오포이에틴-1), 탈리도마이드, 탈리도마이드 유사체(예컨대 CC 5013), Sugen 5416, SU5402, 항혈관형성제 라이보자임(예컨대 엔지오자임), 인터페론 α (예컨대 인틸페론 α 2a), 수라민 및 유사한 약제), VEGF-R 키나제 억제제 및 다른 항혈관형성 티로신 키나제 억제제(예컨대 SU011248), 내피-특이적 인테그린/생존 신호의 억제제(예컨대 비탁신 및 유사한 약제), 구리 길항제/킬레이터(예컨대 테트라티오몰리브

데이트, 캅토프릴 및 유사한 약제), 카르복시아미도-트라이아졸(CAI), ABT-627, CM101, 인터류킨-12(IL-12), IM862, PNU145156E뿐만 아니라 혈관형성을 억제하는 뉴클레오타이드 분자(예컨대, 안티센스-VEGF-cDNA, 앤지오스타틴에 대한 cDNA 코딩, p53에 대한 cDNA 코딩, 및 결합 VEGF 수용체-2에 대한 cDNA 코딩) 및 유사한 약제를 포함한다. 혈관형성, 신혈관형성 억제제 및/또는 다른 혈관신생의 억제제는 항혈관생성 헤파린 유도제 및 관련 분자(예를 들어, 헤파리나제 III), 테모졸로마이드, NK4, 대식세포 이동 억제 인자(macrophage migration inhibitory factor : MIF), 사이클로옥시게나제 2 억제제, 하이포시아-유도성 인자 1의 억제제, 항혈관형성 대두 이소플라본, 울티프라즈, 푸마질린 및 그것의 유사체, 소마토스타틴 유사체, 펜토산 폴리설페이트, 테코갈란 나트륨, 달테파린, 톨스타틴, 트롬보스폰딘, NM-3, 콤브레스타틴, 칸스타틴, 아바스타틴, 다른 적절한 표적에 대한 항체(예컨대 항-알파-v/베타-3 인테그린 및 항-키니노스타틴 mAbs) 및 유사한 약제이다.

[0539] 한 예에서, 임의의 구체예에 따라서 본 명세서에서 설명되는 단백질은, 예를 들어 본 명세서에서 설명되는 면역글로불린 또는 그것으로부터 유래된 단백질과 같은 본 발명의 다른 단백질 또는 면역글로불린 가변 영역을 포함하는 단백질을 포함하는, 다른 단백질에 컨쥬게이트되거나 연결된다. 다른 단백질들은 배제되지 않는다. 추가적인 단백질은 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 특히 혈청 알부민에 결합하는 면역조절제 또는 반감기 연장 단백질 또는 펩티드 또는 다른 단백질을 포함한다.

[0540] 예시적인 면역조절자는 사이토카인 및 케모카인을 포함한다. 용어 "사이토카인"은 세포 내부의 매개체들로서 다른 세포 상에서 활동하는 하나의 세포 집단에 의해 방출된 단백질 또는 펩티드에 대한 유전적 용어이다. 사이토카인의 예는, 림포카인, 모노카인, 성장 인자 및 전통적 폴리펩티드 호르몬을 포함한다. 사이토카인 중에서, 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 파라티로이드 호르몬, 티록신, 인슐린, 프로인슐린, 릴렉신, 프로릴렉신, 글리코단백질 호르몬, 예컨대 여포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체 형성 호르몬, 간 성장 인자; 프로스타글란딘, 섬유아세포 성장 인자, 프롤락틴, 태반 유선 자극제, OB 단백질, 종양 괴사 인자- α 및 - β ; 뮐러관 억제 물질(mullerian-inhibiting substance), 성선자극호르몬-결합 펩티드, 인히빈, 악티빈, 혈관내피성장인자, 인테그린, 트롬보포이에틴(TPO), 신경성장인자, 예컨대 NGF-B, 혈소판 성장 인자, 형질전환 성장인자(TGF), 예컨대 TGF- α 및 TGF- β , 인슐린 유사 성장 인자-I 또는 -II, 에리트로포이에틴(EPO), 골유도 인자(osteoinductive factor), 인터페론, 예컨대 인터페론- α , - β , 또는 - γ ; 군집 자극 인자(CSF) 예컨대, 대식세포-CSF(M-CSF), 과립구-대식세포-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF), 인터류킨(IL) 예컨대 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21 및 LIF이다.

[0541] 케모카인은 일반적으로 케모카인 발현 자리에 면역 이펙터 세포를 조달하는 화학유인물질로서 작용한다. 케모카인은, 이에 제한되는 것은 아니지만, RANTES, MCAF, MIP1-알파 또는 MIP1-베타를 포함한다. 당업자는 특정 사이토카인이 또한 화학유인물질 효과를 가지는 것을 알고, 또한 용어 케모카인 하에서 분류될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0542] 예시적인 혈청 알부민 결합 펩티드 또는 단백질은 미국 20060228364호 또는 미국 20080260757호에서 설명된다.

[0543] 다양한 방사성 핵종이 방사성컨쥬게이트된 단백질의 생성을 위해 이용가능하다. 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니지만, 낮은 에너지의 방사성 핵(예를 들어 진단 목적에 적합한), 예컨대 ^{13}C , ^{15}N , ^2H , ^{125}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In 등을 포함한다. 바람직하게, 방사성 핵종은 투여와 이미징 자리에 배치 사이의 경과된 시간 후 활성 및 검출을 허용하기에 적당한 반감기를 가지는 감마, 광전자 또는 양전자 방출 방사성 핵종이다. 본 발명은 또한 높은 에너지 방사성활성 핵(예를 들어, 치료적 목적을 위해), 예컨대 ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re 및 ^{188}Re 를 포함한다. 이 동위원소는 전형적으로 짧은 경로 길이를 가지는 높은 에너지 α - 또는 β -입자를 생성한다. 이러한 방사성핵종은 바로 근접한 세포, 예를 들어 컨쥬게이트가 부착되거나 도입된 신생 세포를 사멸시킨다. 그것들은 비편재(nonlocalized) 세포에 효과가 거의 없거나 전혀 없고, 본질적으로 비면역원성이다. 대안으로, 고에너지 동위원소는 달리 안정한 동위원소의 열적 자극, 예로서 붕소 중성자 포획 치료법(Guan et al., 1998)에 의해 만들어질 수 있다.

[0544] 다른 구체예에서, 단백질은 세포 사전 표적화에서 이용을 위하여 "수용체"(예컨대 스트렙타비딘)에 컨쥬게이트되며, 컨쥬게이트는 환자에 투여된 다음 세정제를 사용하여 순환으로부터 비결합 컨쥬게이트의 제거 다음에 치료제에 컨쥬게이트된 "리간드"(예를 들어, 아비딘)가 투여된다.

[0545] 본 발명의 단백질은 당업계에 알려져 있고 용이하게 이용가능한 추가적인 비단백질성 모이어티를 함유하도록 변

형될 수 있다. 바람직하게, 본 단백질의 유도체화에 적당한 모이어티는 수용성 폴리머이다. 수용성 폴리머의 비제한적 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리비닐 알코올(PVA), 공중합체s of 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-다이옥솔란, 폴리-1,3,6-트라이옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동중합체 또는 무작위 공중합체 중 하나), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜(PPG) 동중합체, 프로일프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올(예를 들어, 글리세롤; POG), 폴리비닐 알코올, 및 그것의 혼합물을 포함한다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 그것의 물에서의 안정성에 기인하여 제조시 이점을 가질 수 있다.

[0546] 폴리머 분자는 전형적으로 예를 들어 약 2 내지 약 1000, 또는 약 2 내지 약 300개의 반복 단위를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0547] 예를 들어 수용성 폴리머는, 제한되는 것은 아니지만, PEG, 폴리(에틸렌 옥사이드)(PEO), 폴리옥시에틸렌(POE), 폴리비닐 알코올, 하이드록시에틸 셀룰로스, 또는 텍스트란은 보통 단백질에 컨쥬게이트되어 단백질의 안정성 또는 크기 등을 증가시킨다.

[0548] PEG, PEO 또는 POE는 에틸렌 옥사이드의 올리고머 또는 폴리머를 말한다. PEG의 경우, 이 올리고머 또는 폴리머는, 예를 들어 에폭사이드 고리 상의 수산화 이온의 친핵성 공격에 의해 개시된 에틸렌 옥사이드의 음이온성 고리 열림 중합화에 의해 생성된다. 단백질 변형을 위한 PEG의 더 유용한 형태 중 하나는 모노메톡시 PEG(mPEG)이다.

[0549] 바람직한 PEG는 단분산성 또는 다분산성, 바람직하게는 단분산성이다. 당업자는 PEG가 다분산성 또는 단분산성일 수 있다는 것을 인식할 것이다. 다분산성 PEG는 상이한 분자량을 가지는 PEG의 혼합물을 포함한다. 다분산성 PEG의 경우에, 특정 분자량에 대한 언급은 혼합물 내 PEG의 수평균 분자량을 말하는 것으로 이해될 것이다. 크기 분포는 그것의 중량 평균 분자량(MW) 및 그것의 수평균분자량(Mn)에 의해 통계적으로 특징지어지며, 그것의 비는 다분산지수(Mw/Mn)로 불린다. 특정 양태에서 MW 및 Mn은 질량분석기에 의해 측정된다. 대부분의 PEG-단백질 컨쥬게이트, 특히 1 KD 초과로 PEG에 컨쥬게이트된 것은 모 PEG 분자의 다분산 특성에 기인하여 분자량의 범위를 나타낸다. 예를 들어, mPEG2K(Sunbright ME-020HS, NOF)의 경우, 실제 분자량은 1.036의 다분산지수로 1.5 ~ 3.0 KD의 범위에 걸쳐 분포된다.

[0550] 앞서 언급한 것을 기반으로, 당업자는 단분산성 PEG가 실질적으로 동일한 분자량을 포함하는 PEG의 혼합물을 포함한다는 것을 인식할 것이다. 단분산성 PEG는, 예를 들어 노르웨이의 Polypure AS로부터 상업적으로 이용가능하다.

[0551] PEG의 평균 또는 바람직한 분자량은 약 500 Da 내지 약 200 kDa의 범위에 있을 것이다. 예를 들어, PEG의 분자량은 약 1 내지 약 100 kDa, 약 1.5 내지 약 50 kDa, 약 1.5 내지 약 10 kDa, 약 1.5 kDa 내지 약 5 kDa, 약 1.5 kDa 내지 약 4 kDa, 약 1.5 내지 약 2 kDa이다.

[0552] 바람직하게, PEG는 단분산성이고 약 500 Da의 분자량을 가진다. 바람직하게, PEG는 약 1.5 kDa의 분자량을 가진다. 바람직하게, PEG는 약 2 kDa의 분자량을 가진다.

[0553] 바람직하게, PEG는 말레이미드기와 같은 반응기를 포함한다. 바람직하게, PEG는 PEG24-말레이미드이다.

[0554] 생리적으로 허용가능한 폴리머 분자는 특정 구조로 제한되지 않지만, 다양한 양태에서, 선형(예를 들어 알콕시 PEG 또는 2작용성 PEG), 분지된 또는 복수의 암(arm)(예를 들어, 포크형 PEG 또는 폴리올 코어에 부착된 PEG), 수지상 또는 분해가능한 결합이다. 게다가, 폴리머 분자의 내부 구조는 임의의 수의 다른 형태로 구조화되고, 동중합체, 교차 공중합체, 무작위 공중합체, 블록 공중합체, 교차 삼합체, 무작위 삼합체 및 차단 삼합체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0555] 단백질에 부착되는 폴리머의 수는 다를 수 있으며, 하나 이상의 폴리머가 부착된다면, 그것들은 동일 또는 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화를 위해 사용된 폴리머의 수 및/또는 유형은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 개선되는 단백질의 특정 특성 또는 기능, 단백질 유도체가 정의된 조건 등 하에서 치료에 사용될 것인지 여부 등을 포함하는 고려사항을 기반으로 결정될 수 있다. 바람직하게, 폴리머는 PEG이다.

[0556] 당업자는 단백질에 대한 컨쥬게이션 전에 폴리머(예를 들어, PEG)가 하나 또는 양 말단에서 작용기를 가지는 유도체를 제조하는 것에 의해 활성화될 필요가 있다는 것을 인식할 것이다.

[0557] 본 발명의 단백질에 컨쥬게이션을 위해 바람직한 특정 화합물은 표 1에서 설명된다.

표 1

그룹	내용
방사성 동위원소 (직접 또는 간접적)	<ul style="list-style-type: none"> ^{123}I, ^{125}I, ^{130}I, ^{131}I, ^{135}I, ^{47}Sc, ^{72}As, ^{72}Sc, ^{90}Y, ^{88}Y, ^{97}Ru, ^{100}Pd, ^{101}Rh, ^{101}Rh, ^{119}Sb, ^{128}Ba, ^{197}Hg, ^{211}At, ^{212}Bi, ^{153}Sm, ^{169}Eu, ^{212}Pb, ^{109}Pd, ^{111}In, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{67}Cu, ^{75}Br, ^{76}Br, ^{77}Br, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, ^{188}Re, ^{203}Pb, ^{64}Cu, ^{105}Rh, ^{198}Au, ^{199}Ag 또는 ^{177}Lu
반감기 연장자	<ul style="list-style-type: none"> 폴리에틸렌 글리콜 글리세롤 글루코스
형광 프로브	<ul style="list-style-type: none"> 피코에리쓰린(Phycocerythrin(PE)) 알로피코시아닌(Allophycocyanin(APC)) Alexa Fluor 488 Cy5.5

[0558]

생물제제	<ul style="list-style-type: none"> 레닐라 루시페라제(Renilla luciferase), GFP와 같은 형광 단백질들 면역 조절자들 독소들 면역 글로불린들 알부민과 같은 반감기 연장자들
화학요법제	<ul style="list-style-type: none"> 탁솔(Taxol) 5-FU 독소루비신(Doxorubicin) 이다루비신(Idarubicin)

[0559]

[0560] 본 발명의 한 예에서, 스페이스 모이어티는 그것이 컨쥬게이트되는 화합물과 단백질 사이에 포함된다. 본 발명의 스페이스 모이어티는 벽개성(cleavable) 또는 비벽개성이다. 예를 들어, 벽개성 스페이스 모이어티는 산화환원-벽개성 스페이스 모이어티이며, 스페이스 모이어티는 고농도의 유리 설프하이드릴 기를 가지는 분자가 있는 세포질 및 다른 영역과 같은 더 낮은 산화환원 전위를 가지는 환경에서 벽개성이다. 산화환원 전위에서의 변화에 기인하여 벽개성인 스페이스 모이어티의 예는 이황화물을 함유하는 것을 포함한다. 세포질의 더 낮은 산화환원 전위가 스페이스 모이어티의 벽개성을 용이하게 하는 경우, 벽개성 자극(cleaving stimulus)은 컨쥬게이트된 단백질의 세포내 흡수 시 제공된다.

[0561] 다른 예에서, pH의 감소는 스페이스의 벽개성을 야기하며, 그것에 의해 표적 세포로 화합물을 방출시킨다. pH의 감소는 엔도솜 트래피킹, 종양 성장, 염증 및 심근허혈과 같은 많은 생리적 및 병리학적 과정과 관련된다. pH는 엔도솜에서 생리적 7.4 내지 5-6 또는 리소솜에서 4-5로 감소한다. 암 세포의 리소솜 또는 엔도솜을 표적화하기 위해 사용될 수 있는 산 민감성 스페이스 모이어티의 예는, 아세탈, 케탈, 오르소에스터, 하이드라존, 트라이틸, 시스-아코니틸, 또는 티오카바모일에서 발견되는 것과 같은 산으로 벽개성인 결합을 가지는 것들을 포함한다(예를 들어 미국 특허 제4,569,789호, 제4,631,190호, 제5,306,809호, 및 제5,665,358호를 참조한다). 다른 예시적인 산 민감성 스페이스 모이어티는 다이펩티드 서열 Phe-Lys 및 Val-Lys을 포함한다.

[0562] 벽개성 스페이스 모이어티는 특정 표적 세포, 예를 들어 리소솜 또는 종양 결합 효소에 결합된 생물학적으로 공급된 벽개성 작용물질에 민감할 수 있다. 효소적으로 벽개성인 연결 모이어티의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 펩티드 및 에스터를 포함한다. 예시적인 효소 벽개성 연결 모이어티는 카텝신 B 또는 플라스민과 같은 종양-결합 프로테아제에 민감한 것을 포함한다. 카텝신 B 벽개성 자리는 다이펩티드 서열 발린-시트룰린, 페닐알라닌-리신 및/또는 발린-알라닌을 포함한다.

[0563] 컨쥬게이션 방법

[0564] 시스테인(티올)에 대한 컨쥬게이션

[0565] 화합물을 시스테인에 컨쥬게이션하기 위한 다양한 방법이 당업계에 알려져 있으며, 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 컨쥬게이션을 위한 시약은 전형적으로 (i) 표지된 단백질을 형성하는 시스테인의 시스테인 티올과 직접적으로, (ii) 링커-표지 중간체를 형성하는 링커 시약과, 또는 (iii) 표지된 단백질을 형성하는 링커 단백질과 반응 작용성을 함유한다. 링커의 경우에, 몇몇 경로, 사용하는 유기 화학 반응, 조건 및 시약은 당업자에게 알려져 있으며, (1) 본 발명 단백질의 시스테인 기를 링커 시약과 반응시켜 공유 결합을 통해 단백질-링커 중간체를 형성한 다음 활성화된 화합물과 반응; 및 (2) 화합물의 친핵성 기를 링커 시약과 반응시켜 공유 결합을 통해 화합물 링커 중간체를 형성한 후 본 발명 단백질의 시스테인 기와 반응하는 것을 포함한다. 2작용성 링커가 본 발명에서 유용하다는 것은 앞서 언급한 것으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어 2작용성 링커는 시스테인 잔기(들)에 공유결합을 위한 티올 변형기 및 화합물에 공유적 또는 비공유적 결합을 위한 적어도 하나의 부착 모이어티(예를 들어, 제2 티올 변형 모이어티)를 포함한다.

[0566] 다양한 단백질 및 화합물(및 링커)가 본 발명의 컨쥬게이트를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 시스테인 티올 기는 친핵성이며, 다음을 포함하는 링커 시약 또는 화합물-링커 중간체 또는 약물 상에서 친전자적 기와 공유 결합을 형성하도록 반응할 수 있다: (i) 활성 에스터, 예컨대 NHS 에스터, HOBt 에스터, 할로포르메이트 및 산 할로젠화물; (ii) 알킬 및 벤질 할로젠화물, 예컨대 할로아세트아마이드; (iii) 알데하이드, 케톤, 카복실, 및 말레이미드 기; 및 (iv) 설파이드 교환을 통해 피리딘 다이설파이드를 포함하는 다이설파이드. 화합물 또는 링커 상의 친핵성 기는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 공유 결합을 형성하도록 반응할 수 있는 아민, 티올, 하이드록실, 하이드라지드, 옥심, 하이드라진, 티오세미카바존, 하이드라진, 카복실레이트, 및 아릴하이드라지드 기를 포함한다.

[0567] 다른 작용기가 또한 사용될 수 있지만, 바람직한 표지 시약은, 말레이미드, 할로아세틸, 요오도아세트아미드 숙시닐이미드 에스터, 이소티오시아네이트, 설포닐 클로라이드, 2,6-다이클로로트라이아지닐, 펜타플루오로페닐 에스터, 및 포스포르아미다이트를 포함한다.

[0568] 메이탄신(maytansine)은, May-SSCH₃로 변환될 수 있는데, 이는 유리 티올, 즉 May-SH로 환원될 수 있고, 본 발명의 단백질과 반응되어(Chari et al, 1992) 다이설파이드 링커를 가지는 메이탄시노이드-면역컨쥬게이트를 만들 수 있다. 이황화 결합을 가지는 메이탄시노이드 컨쥬게이트가 보고되었다(WO 04/016801; 미국 제6884874호; 및 WO 03/068144). 이황화물 링커 SPP는 링커 시약 N-숙신이미드 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트로 구성될 수 있다.

[0569] 다른 예시적인 반응성 작용기는 화합물, 예를 들어 비오틴 또는 형광 염료 또는 독소 또는 단백질의 카복실 기 치환체의 N-하이드록시숙신이미드 에스터(NHS)이다. 화합물의 NHS 에스터는 사전형성되고, 분리되고, 정제되고 및/또는 특징화될 수 있고, 또는 인시츄로 형성되어 단백질의 친핵성 기와 반응된다. 전형적으로, 화합물의 카복실 형태는 카보다이이미드 시약, 예를 들어 카보다이이미드 시약, 예를 들어, 다이사이클로헥실카보다이이미드, 다이아아소프로필카보다이이미드, 또는 우로늄 시약, 예를 들어, TSTU(O-(N-숙신이미드)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트, HBTU(O-벤조트라이아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트), 또는 HATU (O-(7-아자벤조트라이아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트), 활성화제, 예컨대 1-하이드록시 벤조트라이아졸(HOBt), 및 N-하이드록시숙신이미드의 일부 조합과 반응에 의해 활성화되어 화합물의 NHS 에스터를 제공한다. 일부 경우에, 본 화합물 및 단백질은 화합물의 인시츄 활성화 및 단백질과 반응에 의해 커플링되어 한 단계로 컨쥬게이트를 형성할 수 있다. 다른 활성화 및 커플링 시약은 TBTU(2-(1H-벤조트라이아조-1-일)-1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트), TFFH(N,N',N',N'-테트라메틸우로늄 2-플루오로-헥사플루오로포스페이트), PyBOP(벤조트라이아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리딘-포스포늄 헥사플루오로포스페이트, EEDQ(2-에톡시-1-에톡시카보닐-1,2-다이하이드로-퀴놀린), DCC(다이사이클로헥실카보다이이미드); DIPCDI(다이아아소프로필카보다이이미드), MSNT(1-(메시틸렌-2-설포닐)-3-나이트로-1H-1,2,4-트라이아졸, 및 아릴 설포닐 할로젠화물, 예를 들어, 트라이아아소프로필벤젠설포닐 클로라이드를 포함한다.

[0570] 추가적인 컨쥬게이션 방법은, 예를 들어 시스테인의 티올기와 반응하여 화합물과 반응성인 티오에스터를 생성하기 위한 말레이미드, 요오도아세트아미드 또는 할로아세틸/알킬 할로젠화물, 아지리딘, 아크릴로일 유도체의 사용을 포함한다(예를 들어, 문헌[Schelte et al., 2000(말레이미드의 사용); Reddy et al., 1988 (말레이미드 유도체의 사용); Ramseier and Chang, 1994(요오도아세트아미드의 사용); Eisen et al., 1953(2,4-다이나이트로벤젠설포닉산의 사용); Grossman et al., 1981 (아지리딘의 사용); 또는 Yem et al., 1992(아크릴로일 유도체의 사용)]. 활성화된 피리딘다이설파이드와 유리 티올의 다이설파이드 교환은 또한 컨쥬게이트를 생성하는데 유

용한다(문헌[King et al., 1978 및 그것에 인용된 참고문헌], 예를 들어, 5-티오-2-나이트로벤조(TNB)산의 사용). 바람직하게 말레이미드가 사용된다.

[0571] 방사성 표지된 컨쥬게이트의 사용에 대해, 본 발명의 단백질은 직접적으로 표지될 수 있고(예컨대 요오드화를 통해) 또는 킬레이트제의 사용을 통해 간접적으로 표지될 수도 있다. 본 명세서에서 사용되는 어구 "간접적 표지" 및 "간접적 표지 접근"은 둘 다 킬레이트제가 단백질에 공유적으로 부착되고 적어도 하나의 방사성핵종이 킬레이트제와 결합된다는 것을 의미한다. 이러한 킬레이트제는 전형적으로 2기능성 킬레이트제로서 언급되는데, 그것들이 단백질과 방사성동위원소 둘 다에 결합하기 때문이다. 예시적인 킬레이트제는 1-아이소티오사이클로마토벤질-3-메틸다이오텔렌 트리아아민펜타아세트산("MX-DTPA") 및 사이클로헥실 다이에틸렌트리아아민 펜타아세트산("CHX-DTPA") 유도체, 또는 DOTA를 포함한다. DOTA-말레이미드(4-말레이미도부티르아미도벤질-DOTA)과 같은 링커 시약은 아미노벤질-DOTA와 아이소프로필클로로포르메이트((Aldrich)로 활성화된 A-말레이미도부티르산(Fluka)의 반응에 의해, 문헌[Axworthy et al, (2000)]의 방법에 따라서 제조될 수 있다. DOTA-말레이미드 시약은 본 발명 단백질의 유리 시스템인 아미노산과 반응하며, 그것에 대한 금속 복합체 리간드를 제공한다(Lewis et al, 1998). 킬레이트 링커 표지 시약, 예컨대 DOTA-NHS(1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노(N-하이드록시숙신이미드 에스터)가 상업적으로 이용가능하다(텍사스주 달라스에 소재한 Macrocylics).

[0572] 결합 전, 본 발명의 단백질은 DTT(Cleland's 시약, 다이티오프레일) 또는 TCEP(트리스(2-카복시에틸)포스핀 하이드로클로라이드; 문헌[Getz et al, 1999]; 메틸렌주 비버리에 소재한 Soltec Ventures)와 같은 환원제로 처리에 의해 링커 시약과 컨쥬게이션을 위해 반응성으로 되는 것이 바람직하다. 이황화 결합은 실온에서 묽은 (200nM) 수성 황산구리(CuSO_4)와 결합에 필요하지 않은 시스템인 잔기 사이에서 회복될 수 있다. 다른 산화제, 즉 당업계에 알려진 산화제 및 산화 조건들이 사용될 수 있다. 주변 대기 산화가 또한 효과적이다. 이 온화하고, 부분적인 재산화 단계는 높은 정확도로 사슬 간 이황화물을 효율적으로 형성한다.

[0573] 트레오닌/세린에 대한 컨쥬게이션

[0574] 트레오닌 또는 세린 잔기에 화합물을 컨쥬게이션하는 방법이 또한 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Zhang and Tam (1996)은 과요오드산 염에 의해 선택적으로 및 빠르게 알데하이드 형태로 변환될 수 있는 카보닐 전구체가 세린 또는 트레오닌의 1,2-아미노알코올로부터 유도되는 방법을 설명하였다. 본 발명의 단백질에 부착되는 화합물 내 시스템의 1,2-아미노티올과 알데하이드의 반응은 안정한 티아졸리딘 생성물을 형성한다. 이 방법은 N-말단의 세린 또는 트레오닌 잔기에서 단백질 표지에 특히 유용하다.

[0575] 본 발명의 한 예에서, 스페이서 모이어티는 그것이 컨쥬게이트된 화합물과 단백질 사이에 포함된다. 본 발명의 스페이서 모이어티는 벽개성 또는 비벽개성이다. 예를 들어 벽개성 스페이서 모이어티는 산화환원-벽개성 스페이서 모이어티이며, 스페이서 모이어티는 고농도의 유리 설프하이드릴 기를 가지는 분자가 있는 세포질 및 다른 영역과 같은 더 낮은 산화환원 전위를 가지는 환경에서 벽개성이다. 산화환원 전위에서의 변화에 기인하여 벽개성인 스페이서 모이어티의 예는 이황화물을 함유하는 것을 포함한다. 벽개성 자극은 세포질의 더 낮은 산화환원 전위가 스페이서 모이어티의 벽개성을 용이하게 하는 경우 컨쥬게이트된 단백질의 세포 내 흡수 시 제공될 수 있다.

[0576] 다른 예에서, pH의 감소는 스페이서의 벽개성을 야기하며, 그것에 의해 표적 세포로 화합물을 방출시킨다. pH의 감소는 엔도솜 트래피킹, 종양 성장, 염증 및 심근허혈과 같은 많은 생리적 및 병리학적 과정과 관련된다. pH는 엔도솜에서 생리적 7.4 내지 5-6 또는 리소솜에서 4-5로 감소한다. 암 세포의 리소솜 또는 엔도솜을 표적화하기 위해 사용될 수 있는 산 민감성 스페이서 모이어티의 예는, 아세탈, 케탈, 오르소에스터, 하이드라존, 트라이틸, 시스-아코니틸, 또는 티오카바모일에서 발견되는 것과 같은 산으로 벽개성인 결합을 가지는 것들을 포함한다(예를 들어 미국 특허 제4,569,789호, 제4,631,190호, 제5,306,809호, 및 제5,665,358호를 참조한다). 다른 예시적인 산 민감성 스페이서 모이어티는 다이펩티드 서열 Phe-Lys 및 Val-Lys을 포함한다.

[0577] 벽개성 스페이서 모이어티는 특정 표적 세포, 예를 들어 리소솜 또는 종양 결합 효소에 결합된 생물학적으로 공급된 벽개성 작용물질에 민감할 수 있다. 효소적으로 벽개성인 연결 모이어티의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 펩티드 및 에스터를 포함한다. 예시적인 효소 벽개성 연결 모이어티는 카텝신 B 또는 플라스민과 같은 종양-결합 프로테아제에 민감한 것을 포함한다. 카텝신 B 벽개성 자리는 다이펩티드 서열 발린-시트룰린 및 페닐알라닌-리신을 포함한다.

[0578] 폐길화 방법

- [0579] 화합물을 컨쥬게이트하기 위한, 예를 들어 PEG를 단백질에 컨쥬게이트하기 위한 다양한 방법이 알려져 있다. 본 발명의 스페이스 모이어티는 벽개성 또는 비벽개성일 수 있다. 예를 들어 벽개성 스페이스 모이어티는 산화환원-벽개성 스페이스 모이어티이며, 스페이스 모이어티는 고농도의 유리 설프하이드릴 기를 가지는 분자가 있는 세포질 및 다른 영역과 같은 더 낮은 산화환원 전위를 가지는 환경에서 벽개성이다. 산화환원 전위에서의 변화에 기인하여 벽개성인 스페이스 모이어티의 예는 이황화물을 함유하는 것을 포함한다. 벽개성 자극은 세포질의 더 낮은 산화환원 전위가 스페이스 모이어티의 벽개성을 용이하게 하는 경우 컨쥬게이트된 단백질의 세포 내 흡수 시 제공될 수 있다. PEG의 경우, 분자는 아민 또는 이미다졸, 카복실기, 하이드록실기 또는 설프하이드릴 기에 결합을 용이하게 하도록 활성화될 수 있다.
- [0580] 다른 예에서, pH의 감소는 스페이스의 벽개성을 야기하며, 그것에 의해 표적 세포로 화합물을 방출시킨다. pH의 감소는 엔도솜 트래피킹, 종양 성장, 염증 및 심근허혈과 같은 많은 생리적 및 병리학적 과정과 관련된다. pH는 엔도솜에서 생리적 7.4 내지 5-6 또는 리소솜에서 4-5로 감소한다. 암 세포의 리소솜 또는 엔도솜을 표적화하기 위해 사용될 수 있는 산 민감성 스페이스 모이어티의 예는, 아세탈, 케탈, 오르소에스터, 하이드라존, 트라이틸, 시스-아코니틸, 또는 티오카바모일에서 발견되는 것과 같은 산으로 벽개성인 결합을 가지는 것들을 포함한다(예를 들어 미국 특허 제4,569,789호, 제4,631,190호, 제5,306,809호, 및 제5,665,358호를 참조한다). 다른 예시적인 산 민감성 스페이스 모이어티는 다이펩티드 서열 Phe-Lys 및 Val-Lys을 포함한다.
- [0581] 벽개성 스페이스 모이어티는 특정 표적 세포, 예를 들어 리소솜 또는 종양 결합 효소에 결합된 생물학적으로 공급된 벽개성 작용물질에 민감할 수 있다. 효소적으로 벽개성인 연결 모이어티의 예는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 펩티드 및 에스터를 포함한다. 예시적인 효소 벽개성 연결 모이어티는 카텝신 B 또는 플라스민과 같은 종양-결합 프로테아제에 민감한 것을 포함한다. 카텝신 B 벽개성 자리는 다이펩티드 서열 발린-시트룰린 및 페닐 알라닌-리신을 포함한다.
- [0582] 예를 들어, Abuchowski et al (1977)는 PEG 다이클로로트라이아진 유도체를 생성하기 위해 시아누르 클로라이드를 사용하여 PEG를 활성화하였다. 이 유도체는 리신, 세린, 티로신, 시스테인 및 히스티딘과 같은 다수의 기능성 친핵성 작용기와 반응할 수 있다. 이 프로토콜의 변형된 형태는 PEG-클로로트라이아진을 만드는데, 이것은 더 낮은 반응성을 가지면 리신 또는 시스테인 잔기와 더 선택적으로 컨쥬게이션한다(Mutsushima et al., 1980).
- [0583] 단백질과 컨쥬게이트를 위하여 사용되는 PEG의 2가지 널리 사용된 형태는 숙신이미딜 카보네이트 PEG(SC-PEG; Zalipsky et al., 1992) 및 벤조트라이아졸 카보네이트 PEG(BTC-PEG; 미국 제5,560,234호)이다. 이 화합물들은 둘 다 리신 잔기와 우선적으로 반응하여 카바메이트 결합을 형성하지만, 그러나 또한 히스티딘 및 티로신과 반응하는 것으로 알려져 있다. SC-PEG는 BTC-PEG보다 가수분해에 약간 더 저항성이다.
- [0584] 단백질에 컨쥬게이트 하기에 유용한 다른 PEG는 PEG-프로피온알데하이드이다(미국 제5,252,714호). 산성 조건 (약 pH 5) 하에 있는 이 화학의 이점은 N-말단의 α -아민에 크게 선택적이고, 따라서 비특이적 컨쥬게이션을 가지는 잠재적 문제를 회피하는 것이다. PEG-프로피온알데하이드의 아세탈 유도체, 즉 PEG-아세트알데하이드는 그것이 PEG-프로피온알데하이드보다 더 긴 저장을 제공한다면 추가적인 이점을 제공한다(미국 제5,990,237호).
- [0585] PEG 카복실산의 활성화 에스터는 아마도 단백질 컨쥬게이션에 대해 가장 흔히 사용되는 아실화제 중 하나이다. 활성화 에스터는 생리적 조건 근처의 1차 아민과 반응하여 안정한 아마이드를 형성한다. 숙신이미딜 활성화 에스터로 PEG-카복실산의 활성화는 PEG-카복실산을 N-하이드록시숙신이미드(NHS 또는 HOSu) 및 카보다이이미드와 반응시킴으로써 수행된다. PEG의 예시적인 카복실산 유도체는 카복시메틸화된 PEG(CM-PEG; Zalipsky et al., 1990), 부타논산 유도체 및 프로피온산 유도체를 포함한다(미국 제5,672,662호). 메틸렌 단위의 부가에 의해 활성화 에스터와 PEG 백본 사이의 거리를 변화시키는 것은 물과 아민에 대한 반응성에 극적으로 영향을 미칠 수 있다(예를 들어, 환원성 가수분해에 의함). 대안으로 또는 추가로, 가수분해는 카복실산에 α -분지 모이어티를 도입하여 환원될 수 있다.
- [0586] 단백질 내 유리 시스테인 잔기의 폐길화는 자리 특이적 컨쥬게이션에 유용하다(예를 들어 본 명세서에 설명된 시스테인 잔기를 포함하도록 변형된 단백질을 사용). 시스테인 컨쥬게이션에 대한 예시적인 PEG 유도체는 PEG-말레이미드, PEG-비닐설폰, PEG-요오도아세트아미드 및 PEG-오르소퍼리딜 다이설프라이드를 포함한다. 시스테인 잔기에 PEG를 컨쥬게이트하는 예시적인 방법은 문헌[Goodson and Katre (1990)] 및/또는 상지에서 설명된다. PEG-비닐설폰을 사용하여 컨쥬게이션하는 예시적인 방법은, 예를 들어 문헌[Li et al. (2006)]에서 설명된다.
- [0587] 미국 제5985263호는 1차 아민보다 더 낮은 pKa를 가지는 히스티딘의 2차 아민 기에 PEG를 컨쥬게이트하는 방법을 설명한다. 이 접근의 이점은 아실-히스티딘 결합이 안정하지 않다는 것인데, 이것은 단백질이 서서히 방출되

는 것을 의미한다(즉, 컨쥬게이트는 서방출 조제물 또는 프로드러그로 작용한다).

- [0588] 폐길화를 위한 다른 접근은 N-말단의 세린 또는 트레오닌의 이점을 취하는 것인데, 이것은 상기 논의한 과요오드산염으로 변환될 수 있다. 이 접근을 사용하여 PEG는 생활성 단백질에 컨쥬게이트되었다(예를 들어, Gaertner and Offord, 1996).
- [0589] PEG는 또한 탄수화물 기에 컨쥬게이트될 수 있다.
- [0590] 본 발명은 또한 가역적 폐길화 전략의 사용을 포함한다.
- [0591] **용도**
- [0592] 본 발명의 단백질은 연구, 진단적 및 치료적 용도를 포함하는 다양한 용도에서 유용하다. 단백질이 결합되는 항원에 따라서, 세포에 화합물을 전달하는데 및/또는 이미징하는데 및/또는 시험관내 분석에 유용할 수 있다. 한 예에서, 단백질은 세포독성제를 세포에 이미징하고 전달하는데 유용하며, 즉 그것은 검출가능한 표지 및 세포독성제 또는 그 일부가 세포독성제에 컨쥬게이트되고 그 일부가 검출가능한 표지에 컨쥬게이트되는 단백질의 혼합물을 포함하는 조성물에 컨쥬게이트된다.
- [0593] 본 명세서에서 설명되는 단백질은 (a) (예를 들어 리간드, 억제제의 수용체에 결합, (b) 수용체 신호 기능 및/또는 (c) 자극 기능을 억제하는 억제제로서 작용할 수 있다. 수용체 기능의 억제제로서 작용하는 단백질은 직접적으로 또는 간접적으로(예를 들어 구조적 변화를 유발함으로써) 리간드 결합을 차단할 수 있다.
- [0594] **항원**
- [0595] 본 발명은 임의의 항원(들)에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 2개의 시스템인 잔기들을 FR2 및/또는 FR3에서 적어도 2개의 시스템 잔를 포함하는 적어도 하나의 가변영역을 포함하는 단백질을 고려하며, 즉, 본 발명의 예는 특정 항원을 요구하는 것에 반하는 총괄적인 것이다.
- [0596] 본 발명의 예는, 예를 들어 암 또는 암성/형질전환된 세포에 의해 발현되거나 관련되 및/또는 자가면역 질병에 관련된 및/또는 염증성 질병 또는 질환과 관련된 및/또는 신경퇴행성 질병과 관련된 및/또는 면역 결핍 장애와 관련된 항원에 특이적으로 결합하는 단백질을 고려한다.
- [0597] 본 발명의 단백질이 생성되는 것에 대한 예시적인 항원은 BMPR1B(뼈형성단백질 수용체 IB형(bone morphogenetic protein receptor-type IB), Dijke. et al 1994, WO2004063362); E16(LAT1, SLC7A5, Gaugitsch et al 1992; WO2004048938); STEAP1(전립선의 6개 막관통 상피(six transmembrane epithelial antigen of prostate), Hubert, et al, 1999); WO2004065577); CA125(MUC16, WO2004045553); MPF(MSLN, SMR, 거핵세포 강화 인자, 메소텔린, Yamaguchi et al, 1994, WO2003101283); Napi3b(NAPI-3B, NPTIIB, SLC34A2, 용질 담체 패밀리 34; Feild et al, 1999; WO2004022778); Sema 5b(FLJ10372, KIAA1445, SEMA5B, SEMAG, 세마포린 5b, 세마 도메인, 7개 트롬보스폰딘 반복체(1형 및 Hike형), 막관통 도메인(TM) 및 짧은 세포질 도메인, (semaphorin) 5B, Nagase et al, 2000; WO2004000997); PSCA (Ross et al, 2002; 미국 2003129192호); ETBR(엔도텔린 B형 수용체, Nakamuta., et al, 34-39, 1991; WO2004045516); MSG783 (RNF124, WO2003104275); STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-I, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, 전립선암 관련 유전자 1, 전립선암 관련 단백질 1, 전립선의 6개 막관통 상피 항원 2, 6개 막관통 전립선 단백질, WO2003087306); TrpM4(BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 일시적 수용체 퍼텐셜 양이온 채널, 서브패밀리 M, 멤버 4, Xu et al, 2001, 미국 2003143557호); CRIPTO(CR, CR4, CRGF, CRIPTO, TDGF1, 기형암종 유래 성장 인자, Ciccodicola, et al, 1989; US2003224411); CD21(CR2(보체 수용체 T) 또는 C3DR(C3d/엡스타인 바르 바이러스 수용체) Fujisaku et al, 1989; WO2004045520); CD79b(CD79B, CD79 β , IgB(면역글로불린 결합 베타), B29, Muller, 1992; WO2004016225); FcRH2(DFGP4, IRTA4, SPAP1A(포스파타제 양코르 단백질 Ia를 함유하는 SH2 도메인), SPAP1B, SPAP1C, Xu, et al, 2001; WO2004016225); HER2(ErbB2, Coussens et al, 1985; WO2004048938); NCA(CEACAM6, Barnett et al, 1988; WO2004063709); MDP(DPEP1, WO2003016475); IL20R α (IL20Ra, ZCYTOR7, Clark, et al, 2003; EP1394274); Brevican(BCAN, BEHAB, Gary et al, 2000; 미국 2003186372호); EphB2R(DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, Chan and Watt, 1991; WO2003042661); ASLG659(B7h, US20040101899); PSCA(전립선 줄기 세포 항원 전구체, Reiter et al, 1735-1740, 1998; WO2004022709); GEDA(지방종 HMGIC 융합 파트너 유사 단백질 WO2003054152); BAFF-R(B 세포-활성화 인자 수용체, BLyS 수용체 3, BR3, Thompson, et al, 2001; WO2004058309); CD22(B-세포 수용체 CD22-B 아이소타이프, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, Wilson et al, 1991; WO2003072036); CD79a(CD79A, CD79 α , 면역글로불린 결합 알파, Ig 베타와 공유적으로 상호작용하고 표면 상에서 Ig M 분자와 복합체를 형성하며, B-세포 분화에 수반되는 신호를 변환하는 B 세포 특이적 단

백질(CD79B); W02003088808); CXCR5(버킷림프종 수용체 1, CXCL13 케모카인에 의해 활성화되고, 림프구 이동 및 체액 방어에서 작용하며, HIV-2 감염 및 아마도 AIDS, 림프종, 골수종, 및 백혈병의 발생에 중요한 역할을 하는 G 단백질-결합된 수용체 W02004040000); HLA-DOB(CD4+ T 림프구에 펩티드를 결합하고 그것들이 존재하는 MHC 클래스 II 분자의 베타 서브유닛(Ia 항원); Tonnelle et al, 1985; W09958658); P2X5(푸린수용체 (Purinergic receptor) P2X 리간드 개폐형 이온 채널 5, 세포막 ATP에 의해 개폐되는 이온 채널은 시냅스 전달 및 신경조직 발생에 수반될 수 있고, 결합은 특발성 배뇨근 불안정의 병태생리에 기여할 수 있다; Lee et al, 1998; W02004047749); CD72(B-세포 분화 항원 CD72, Lyb-2; W02004042346); LY64(림프구 항원 64(RP 105), 류신 풍부 반복체의 I형 막 단백질(LRR) 패밀리는 B-세포 활성화 및 아포토시스를 조절하며, 기능의 상실은 전신 홍반성 루푸스 환자에서 증가된 질병 활성과 관련된다; 미국 2002193567호); FcRH1(Fc 수용체 유사 단백질 1, C2형 Ig 유사 및 ITAM 도메인을 함유하는 면역글로불린 Fc 도메인에 대한 추정상의 수용체는 B-림프구 분화에서 중요한 역할을 할 수 있다 W02003077836); IRTA2(면역글로불린 수퍼패밀리 수용체 전좌 관련 2, B 세포 발생에서 가능한 역할을 가지는 추정상의 면역수용체 및 림프종 발생; 전좌에 의한 유전자의 자유화는 일부 B 세포 악성 종양에서 생긴다; Nakayama et al, 2000; W02003077836); TENB2(TMEFF2, 토모레굴린, TPEF, HPP1, TR, 성장 인자 및 폴리스타틴의 EGF/헤레굴린 패밀리와 관련된 추정상의 막관통 프로테오글리칸; W02004074320); CD20(W094/11026); VEGF-A(Presta et al., 1997); p53; EGFR; 프로게스테론 수용체; 카텡신 D; Bcl-2; E 카드헤린; CEA; 루이스 X; Ki67; PCNA; CD3; CD4; CD5; CD7; CD11c; CD11d; c-Myc; 타우; PrPSC; 또는 Aβ.

[0598] 바람직하게, 본 발명의 단백질은 HER2(예를 들어, 서열 번호: 150에서 설명되는 서열을 포함), MUC1(예를 들어, 서열 번호: 152 또는 153에서 설명되는 서열을 포함), TAG72(고분자량 뮤신 유사 단백질, 예를 들어 문헌 [Johnson et al., 1986]에서 설명됨) 또는 PSMA(예를 들어, 서열 번호: 151에서 설명되는 서열을 포함)에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, 본 발명의 단백질은 Her2에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, 본 발명의 단백질은 MUC1에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, 본 발명의 단백질은 TAG72에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, 본 발명의 단백질은 PSMA에 특이적으로 결합한다.

[0599] 본 발명의 단백질이 유래된 다른 예시적인 항체는 당업자에게 명백할 것이고, 예를 들어 리툽시맵(C2B8; W094/11026); 또는 베바시주맵(인간화된 A.4.6.1; Presta et al., 1997))를 포함한다.

[0600] 예시적인 2특이성 단백질은 관심 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 이러한 단백질은 다른 단백질의 결합 자리와 한 항원 결합자리를 조합할 수 있다. 대안으로, 관심 영역의 항-항원은 T-세포 수용체 분자(예를 들어, CD3), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체(FcγR), 예컨대 FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) 및/또는 FcγRIII(CD16)과 같은 백혈구 상의 촉발 분자에 결합하는 영역과 조합되어 관심 항원을 발현시키는 세포에 세포 방어 메커니즘을 집중시키고 편재화할 수 있다. 2특이성 단백질은 또한 관심 항원을 발현시키는 세포에 세포독성제를 편재화시키기 위해 사용될 수 있다. 이 단백질은 관심 항원과 결합하는 영역 및 세포독성제와 결합하는 영역(예를 들어, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A쇄, 메토타렉세이트 또는 방사성 동위원소 핵탄)을 소유한다. W0 96/16673는 2특이성 항-ErbB2/항-FcγRIII 항체를 설명하며 미국특허 제5,837,234호는 2특이성 항-ErbB2/항-FcγR 항체를 개시한다. 2특이성 항-ErbB2/Fcα 항체는 W098/02463에서 나타난다. 미국 제 5,821,337호는 2특이성 항-ErbB2/항-CD3 항체를 교시한다.

[0601] 약제학적 조성물 및 치료 방법

[0602] 본 발명의 단백질(동일하게 활성 성분)은 예방적 또는 치료적 처치를 위한 비경구, 국소, 경구 또는 국부 투여, 에어로졸 투여 또는 경피 투여에 유용하다. 약제학적 조성물은 투여 방법에 따라서 다양한 단위 제형으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여에 적합한 단위 제형은 분말, 정제, 알약, 캡슐 및 로젠지 또는 비경구 투여를 포함한다. 경구로 투여될 때, 본 발명의 약제학적 조성물은 소화로부터 보호되어야 한다는 것이 인식된다. 이는 전형적으로 그것에 산성 및 효소적 가수분해에 저항성을 부여하는 조성물로 단백질을 복합체화하거나 또는 리포솜과 같은 적당한 저항성 담체 내에 화합물을 포장함으로써 달성된다. 소화로부터 단백질을 보호하는 수단은 당업계에 알려져 있다.

[0603] 전형적으로, 치료적 유효량의 단백질은 피험자에게 투여를 위한 조성물로 조제될 것이다. 어구 "치료적 유효량"은 피험자에 치료 또는 다른 치료적 효과를 촉진하고, 유발하고 및/또는 향상시키는데 충분한 양을 말한다. 명백한 바와 같이, 이 조제물에서 본 발명의 단백질 농도는 광범위하게 다양할 수 있고, 선택된 특정 투여 방식 및 환자의 필요에 따라서 유체 부피, 점도, 체중 등을 우선 기준으로 선택될 것이다. 질병의 유형 및 중증도에 의존하여, 예를 들어 하나 이상의 분비 투여에 의하든, 또는 연속적 주입에 의하든 치료적 유효량은 약 1 μg/kg 내지 15 mg/kg(예를 들어, 0.1-20 mg/kg)의 분자일 수 있다. 전형적인 1일 투약량은 약 1 μg/kg 내지 100 mg/kg

또는 그 이상의 범위일 수 있다. 환자에 투여되는 단백질의 예시적인 투약량은 환자 체중의 약 0.1 내지 약 10 mg/kg 범위에 있다. 질환에 따라서 수 일 또는 그 이상에 걸쳐 반복된 투여에 대해, 질병 증세의 원하는 억제가 나타날 때까지 처리가 유지된다. 예시적인 용량 섭생은 약 4mg/kg의 초기 투여량 다음에 매주 약 2 mg/kg의 단백질의 지속적 투여이다. 다른 투약 섭생이 유용할 수 있다. 이러한 치료의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0604] 대안으로, 본 발명의 단백질은 피험자에 투여 전 치료적 유효량으로 희석되는 농축된 용량으로 조제된다.

[0605] 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여에 특히 유용하며, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피하, 경피, 또는 연동성 투여 및 종양 또는 질병 자리에 직접 침투(공동 내(intracavity) 투여)를 포함하는 다른 이러한 경로를 통한 주입을 위해 조제된다. 투여를 위한 조성물은 통상적으로 약제학적으로 허용가능한 담체, 바람직하게는 수성 담체 중에 용해된 본 발명 단백질의 용액을 포함할 것이다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 완충 식염수 등이 사용될 수 있다. 다른 예시적인 담체는, 물, 식염수, 링커 용액, 텍스트로스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함한다. 혼합된 오일 및 에틸 올레이트와 같은 비수성 담체가 또한 사용될 수 있다. 또한 리포솜이 담체로서 사용될 수 있다. 비히클은 등장성 및 화학적 안정성을 향상시키는 부수적 양의 첨가제, 예를 들어 완충제 및 보존제를 함유할 수 있다. 조성물은 pH 조절 및 완충제, 독성 조절제 등, 예를 들어 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 락트산나트륨 등을 포함한다.

[0606] 약제학적 조성물을 제조하기 위한 기술은 일반적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. Mack Publishing Company, 1980]에서 예시되는 바와 같이 당업계에 알려져 있다.

[0607] WO2002/080967은 또한 본 발명의 단백질 투여에 적당한, 예를 들어 천식의 치료를 위한 단백질을 포함하는 조성물 및 에어로졸화된 조성물을 투여하는 방법을 설명한다.

[0608] 본 발명의 화합물의 적당한 투약량은 특정 단백질, 진단되고/치료되고/예방되는 질환 및/또는 치료되는 피험자에 의존하여 다를 것이다. 적당한 투약량을 결정하는 것은, 예를 들어 최적 또는 유용한 복용량을 결정하기 위해 최적화된 투약량 미만으로 시작하여 점진적으로 투약량을 변경하는 것에 의해 당업자의 능력 내에 있다. 대안으로 치료/예방을 위한 적합한 투약량을 결정하기 위하여 세포 배양 분석 또는 동물 연구로부터의 데이터가 사용되며, 적당한 용량은 독성이 거의 없거나 없는 활성 화합물의 EC50을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투약량은 사용된 제형 및 이용된 투여 경로에 의존하여 이 범위 내에서 다를 것이다. 치료적/예방적 유효량은 처음에 세포 배양물 분석으로부터 가정될 수 있다. 용량은 세포 배양물에서 결정된 바와 같은 IC50(즉, 증상의 절반의 최대 억제를 이루는 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 이루는 동물 모델에서 조제될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 더 정확히 결정하는데 사용될 수 있다. 혈장 내 수준은, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0609] 본 발명의 단백질은 약제학적 조합 조제물, 또는 조합치료로서 용량 섭생에서 제2 화합물과 조합될 수 있다. 약제학적 조합 조제물 또는 용량 섭생의 제2 화합물은 바람직하게 조합 단백질에 대해 상보적 활성을 가지며, 그것들은 서로 해로운 영향을 미치지 않는다.

[0610] 제2 화합물은 화학치료제, 세포독성제, 사이토카인, 성장억제제, 항호르몬제 및/또는 심장보호제일 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합되어 적당하게 존재한다. 본 발명의 단백질을 함유하는 약제학적 조성물은 또한 치료적 유효량의 화학치료제, 예컨대 튜블린 형성 억제제, 토포아이스머라제 억제제, DNA 결합제를 가진다. 약제학적 "서방성" 캡슐 또는 조성물이 또한 사용될 수 있다. 서방성 조제물은 일반적으로 연장된 기간에 걸쳐 일정한 약물 수준을 제공하도록 설계되며, 본 발명의 화합물을 전달하기 위하여 사용될 수 있다.

[0611] 본 발명은 또한 피험자의 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 본 방법은 필요한 피험자에서 본 발명의 단백질의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0612] 본 명세서에서 사용되는 용어 "예방하는", "예방하다" 또는 "예방"은 특정 질병 또는 질환의 적어도 한 증상을 감소시키거나 제거하기에 충분한 본 명세서에서 설명하는 단백질의 양을 투여하는 것을 포함한다.

[0613] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료하는", "치료하다" 또는 "치료"는 특정 질병 또는 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키거나 제거하기에 충분한 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

[0614] 본 명세서에서 사용되는 용어 "피험자"는 인간을 포함하는 임의의 동물, 바람직하게는 포유류를 의미하는 것으로 여겨진다. 예시적인 피험자는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 인간, 영장류, 가축(예를 들어, 양, 소, 말,

당나귀, 돼지), 반려 동물(예를 들어, 개, 고양이), 실험실 시험 동물(예를 들어, 마우스, 토끼, 래트, 기니아 피크, 햄스터), 포획된 야생 동물(예를 들어, 여우, 사슴)을 포함한다. 바람직하게 포유류는 인간 또는 영장류이다. 더 바람직하게 포유류는 인간이다.

[0615] 본 명세서에서 사용되는 "질환"은 정상적 기능의 파괴 또는 방해이고, 임의의 특정 질환에 제한되는 것은 아니며, 질병 또는 장애를 포함할 것이다. 예를 들어, 질환은 암 또는 면역병리학적 장애이다.

[0616] 예시적인 암은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 암종, 림프종, 세포종, 육종, 및 백혈병 또는 임파 악성 종양을 포함한다. 이러한 암의 더 구체적인 예는 암(예를 들어, 편평상피세포암(예를 들어, 상피의 편평 상피세포암), 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 비선암 및 폐의 편평 상피 암종을 포함하는 폐암, 복막암, 간 세포암, 위장관암을 포함하는 위암, 췌장암, 신경교아세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘선암종, 신장 또는 신장부 암, 전립선암, 외음부 암, 갑상선 암, 간암, 항문 암, 음경암 및 두경부암을 포함한다. 바람직하게, 암은 유방암 또는 난소암 또는 전립선암이다.

[0617] 본 발명의 한 예에서, 암은 Her2를 발현시킨다. 예시적인 암은, 유방암, 난소암, 위암 또는 자궁암을 포함하며, 바람직하게 유방암이다. 이러한 암은 Her2에 결합하는 본 발명의 단백질로 치료될 수 있다.

[0618] 본 발명의 다른 예에서, 암은 PSMA를 발현시킨다. 예시적인 암은 전립선암이다. 이러한 암은, 예를 들어 PSMA에 결합하는 본 발명의 단백질로 치료될 수 있다.

[0619] 본 발명의 추가 예에서, 암은 Tag72를 발현시킨다. 예시적인 암은, 결장직장암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁내막암, 유방암 비소세포 폐암 및 전립선 암을 포함한다. 이러한 암은 예로서 Tag72에 결합하는 본 발명의 단백질로 치료될 수 있다.

[0620] 본 발명의 추가 예에서, 암은 MUC1, 바람직하게 암과 관련된 MUC1의 글리코형태를 발현시킨다. 예시적인 암은 결장직장암, 위암, 췌장암, 유방암, 폐암 및 방광암과 같은 암종을 포함한다. 이러한 암은, 예를 들어 MUC1에 결합하는 본 발명의 단백질로 치료될 수 있다.

[0621] 면역병리학은 면역학적 원인을 가지는 질병의 연구이고, 면역학적 질병은 항원에 대한 면역글로불린의 반응에 의해 야기되는 임의의 질환이다. 따라서, "면역병리학적 장애"는 항원과 피험자의 면역계의 반응으로부터 생기는 장애로서 정의될 수 있다. 면역병리학적 장애는 자가면역 질병 및 과민성 반응(예를 들어, I형: 과민증, 발진, 식품 알레르기, 천식; II형: 자가면역 용혈성 빈혈, 수혈 반응; III형: 혈청병, 괴사 혈관염, 사구체신염, 류마티스성 관절염, 루푸스, IV형: 접촉성 피부염, 이식 거부)를 포함한다. 자가면역 질병은 류마티스성 장애(예컨대 류마티스성 관절염, 쇼그렌 증후군, 피부경화증, SLE 및 루푸스 신염과 같은 루푸스, 다중근염/피부근염, 한랭 글로불린혈증, 항포스포리피드 항체 증후군, 및 건선 관절염, 골관절염, 자가면역성 위장 및 간 장애(예로서, 염증성 장 질환)(예를 들어, 궤양성 대장염 및 크론병), 자가면역 위염 및 악성 빈혈, 자가면역성 간염, 초기 담즙 간경변, 초기 경화성 수담관염, 및 셀리악병, 혈관염(예를 들어, ANCA-관련 혈관염, 베게너 육아종증, 및 다중 동맥염), 자가면역성 신경 장애(예를 들어, 다발성경화증, 안구간대경련 근간대경련 증후군, 증중 근무력증, 시속신경수염, 및 자가면역성 다중신경장애), 신장 장애(예를 들어, 사구체신염, 굿파스튜어 증후군, 버거씨병), 자가면역 피부 장애(예를 들어, 건선, 두드러기, 발진, 심상성 수포창, 수포성 유천포창, 및 피부 홍반 루푸스), 혈액학적 장애(예를 들어, 혈소판 감소 자반병, 혈전증의 혈소판 감소 자반병), 수혈 후 자반병, 및 자가면역성 용혈성 빈혈), 아테롬성 동맥 경화증, 포도막염, 자가면역성 청각 질환(예를 들어, 귀 내부 질환, 및 청각 손실), 베체트병, 레이노 증후군, 장기 이식, 및 자가면역성 내분비 장애(예를 들어 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM)과 같은 당뇨병 관련 자가면역 질병, 에디슨병 및 자가면역성 갑상성 장애(예를 들어 그레이브스병 및 갑상선염)). 더 바람직한 이러한 질병은, 예를 들어 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염, ANCA-관련 혈관염, 루푸스, 다발성경화증, 쇼그렌 증후군, 그레이브스병, IDDM, 악성 빈혈, 갑상선염, 및 사구체 신염을 포함한다.

[0622] 다른 구체예에서, 장애는 염증성 질병이다. 염증은 자극 및 손상에 대한 신체 조직의 방어적 반응이며, 급성 또는 만성일 수 있다. 따라서, 염증 장애는 호중구, 단핵 백혈구, 비만 세포, 호염기성 세포, 호산구, 사이토카인 방출, 히스티딘 방출, 산화제 분출, 식균 작용, 다른 과립 효소 및 주화성의 방출이 일어나는 대식 세포들이 관련되는 질병을 포함한다. 과민성 반응(상기 면역 병리학적 장애 하에서 정의됨)은 또한 염증 질병 염증성 질병(급성 또는 만성)으로 간주될 수 있는데, 그것들이 종종 호중구, 비만세포, 호염기성 세포 등과 같은 바이러스 백혈구의 보체 활성화 및 유인/침투에 관련되기 때문이다.

- [0623] 본 발명의 조성물은 투약 제형과 양립가능한 방법으로 및 치료적/예방적 유효량으로 투여될 것이다. 조제물은 다양한 방식, 예를 들어 섭취 또는 주사 EH는 흡입에 의한 여러가지 방법들로 용이하게 투여될 것이다.
- [0624] 다른 치료적 섭생이 본 발명의 단백질의 투여와 조합될 수 있다. 조합 치료는 동시 또는 연속적 섭생으로서 투여될 수 있다. 연속적으로 투여될 때, 결합은 둘 이상의 투여로 투여될 수 있다. 조합된 투여는 별개의 조제물 또는 단일 약제학적 조제물, 및 및 바람직하게 두 개의(또는 모든) 활성 약제가 동시에 그것들의 생물학적 활성을 발휘하는 시간 기간의 순서의 연속적 투여를 사용하는 공동 투여를 포함한다.
- [0625] 치료적 사용에 앞서, 본 발명의 단백질은, 예를 들어 하기 설명하는 바와 같이 시험관내 및/또는 생체내에서 바람직하게 시험된다.
- [0626] 시험관내 시험
- [0627] 한 예에서, 본 발명의 단백질은 화합물에 컨쥬게이트되더라도 항원에 결합된다. 단백질은 항원 및 적어도 그것이 유래된 단백질에 결합할 수 있다. 대안으로, 단백질 또는 그것을 포함하는 컨쥬게이트는 그것이 유래된 단백질 또는 시스테인 잔기들이 결여된 및/또는 화합물에 컨쥬게이트되지 않은 단백질 형태의 친화도 또는 친화성의 적어도 약 10% 또는 20% 또는 30% 또는 40% 또는 50% 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90%를 가지는 항원에 결합한다.
- [0628] 단백질의 결합 친화도를 결정하는 예시적인 방법은 항원을 표적 항원에 비변형 단백질 또는 비컨쥬게이트된 단백질의 결합을 차단하는 단백질의 능력을 보여주는 단순 면역분석, 예를 들어 경쟁적 결합 분석을 포함한다. 경쟁적 결합은 시험 하에서 단백질이 통상적인 항원에 대한 기준 단백질의 특이적 결합을 억제하는 분석에서 결정된다. 다양한 유형의 경쟁적 결합 분석, 예를 들어 고체상 직접 또는 간접 방사성 면역분석(RIA), 고체상 직접 또는 간접 효소 면역 분석(EIA), 샌드위치 경쟁 분석(문헌[Stahli et al., 1983; Kim, et al., 1989]을 참조); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(문헌[Kirkland et al., 1986]을 참조); 고체상 직접 표지된 분석, 고체상 직접 표지된 샌드위치 분석(문헌[Harlow and Lane, 1988]을 참조); ¹²⁵I 표지를 사용하는 고체상 직접 표지 RIA(문헌[Morel et al., 1988]); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA(문헌[Cheung et al., 1990]); 또는 직접 표지된 RIA(문헌[Moldenhauer et al., 1990]을 참조). 예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, 1988]을 참조. 전형적으로, 이러한 분석은 고체 표면에 결합된 정제된 항원, 또는 비표지된 시험 단백질 및 표지된 기준 단백질 중 하나를 함유하는 세포들의 사용과 관련된다. 경쟁적 억제는 시험 단백질의 존재 하에서 고체 표면 또는 세포들에 결합된 표지의 양을 결정함으로써 측정된다.
- [0629] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질의 활성을 시험하는 방법을 포함한다. 시험관 내에서 본 발명의 단백질 활성을 평가하기 위해 다양한 분석이 이용가능하다. 예를 들어, 본 발명의 단백질은 상기 세포에 결합되고 및/또는 상기 세포에 의해 내면화될 수 있는지 여부를 결정하기 위하여 세포 또는 그것의 집단에 투여된다. 이러한 분석은 본 발명의 단백질을 검출가능한 표지로 표지화 함으로써(즉, 컨쥬게이트 생성) 용이하게 되지만, 이것은 본 발명의 단백질이 또한 표지된 단백질로 검출될 수 있기 때문에 필수적이지 않다. 이러한 분석은 세포에 화합물을 전달하는(즉, 탑재하는) 본 발명의 단백질 능력 및/또는 이미징에서 그것의 유용성을 평가하는데 유용하다. 바람직하게 상기 세포는 본 발명의 단백질에 결합하는 항원을 발현시키고, 더욱 바람직하게는 검출되거나 처리되는 것이 바람직한 세포 형태의 셀라인 또는 주요 세포 배양물이다.
- [0630] 일반적으로, 예를 들어 세포 독성 분자에 컨쥬게이트된 본 발명의 세포독성 또는 세포활동 억제 활성은, 본 발명의 단백질이 결합하는 본 발명의 단백질과 결합하는 항원을 발현시키는 세포들을 본 발명의 단백질에 노출시키고; 단백질이 생물학적 효과를 발휘하기 위한 적당한 기간 동안, 예를 들어 약 6시간 내지 약 5일 동안 세포를 배양시키고; 및 세포 생존력, 세포 독성 및/또는 세포 사멸을 측정하는 것에 의해 측정된다. 생존력(증식), 세포 독성 및 세포 소멸 측정에 유용한 세포 기반 시험관내 분석은 당업계에 알려져 있다. 발광 세포 생존력 분석은 상업적으로 이용가능한(위스콘신주 매디슨에 소재한 Promega Corp.), 딱정벌레 루시페라제의 재조합 발현에 기반한 균질한 분석 방법(미국 특허 제5583024호; 제5674713호 및 제5700670호)이다. 이 세포 증식 분석은 대사적으로 활성인 세포의 인디케이터인 세포 내 존재하는 ATP의 정량화에 기반한 배양물에서 생존 세포의 수를 결정한다(문헌[Crouch et al 1993; 미국 특허 제6602677호]를 참조). 대안으로, 세포 생존력은 본 발명 단백질의 존재 하에서 배양된 세포에 부가된 비 형광성 레자주린을 사용하여 분석된다. 살아있는 세포는 레자주린을, 예를 들어 현미경 또는 형광 플레이트 판독기를 사용하여 용이하게 검출가능한 붉은 형광성 레조루핀으로 환원시킨다. 세포 생존력의 분석을 위한 키트는, 예를 들어 미국 오리건주 유진에 소재한 Molecular Probes로부터 이용가능하다. 세포 생존력에 대한 다른 분석은 그것이 합성 될 때에 ³H-티미딘 또는 ¹⁴C-티미딘의 DNA에 혼입

을 결정하는 것을 포함하는 것으로, 세포 분리와 관련된 DNA 합성에 대한 분석이다. 이어서 어떤 결합되지 않은 티미딘의 제거를 위해 세척한 후, 예를 들어 신틸레이션 계측기를 사용하여 표지(예를 들어, 방사성 표지)를 검출한다. 세포 증식을 결정하는 대안의 분석은, 예를 들어 BrdU 포함에 의한 DNA 합성의 측정을 포함한다(ELISA 또는 면역조직화학, Amersham Pharmacia Biotech로부터 이용가능한 키트). 세포 사멸을 검출하는 예시적 분석은 아포토시스의 초기에 APOPTEST(Immunotech로부터 이용가능) 염색 세포를 포함하고, 세포 샘플의 고정을 필요로 하지 않는다. 이 방법은 아포토시스를 겪는 세포의 특징인 세포막 재구성을 검출하기 위하여 부착되는 V 항체를 이용한다. 이 방법으로 염색된 아포토시스 세포는 다음으로 형광 활성 세포 분류(FACS), ELISA에 의하거나 또는 고정된 부착의 V 항체를 이용하는 접착 및 패닝(panning)에 의하여 분류될 수 있다. 대안으로, 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제-매개의 비오틴화된 UTP Nick 말단 표지화(transferase-mediated biotinylated UTP nick end-labeling : TUNEL) 분석이 세포 사멸의 수준을 결정하는데 사용된다. TUNEL 분석은 비오틴화된 뉴클레오티드를 가지는 아포토시스 동안 생성된 표지 3'-OH DNA 말단에 효소 말단의 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제를 사용한다. 다음으로 비오틴화된 뉴클레오티드는 검출 가능한 마커에 컨쥬게이트된 스트렙타비딘을 사용하여 검출된다. TUNEL 염색을 위한 키트는, 예를 들어 뉴욕주 퍼체이스에 소재한 Intergen Company로부터 이용가능하다.

[0631] 본 발명의 단백질의 안정성은 또한 본 발명 단백질을 혈청 및/또는 세포에 노출시키고, 후속적으로 본 발명의 단백질을, 예를 들어 면역 친화도 정제를 사용하여 분리시킴으로써 평가될 수 있다. 본 발명의 회수된 단백질의 감소된 양은 본 발명의 단백질이 혈청에서 또는 세포에 노출되었을 때 분해된다는 것을 나타낸다.

[0632] 다른 예에서, 수용체에 대해 리간드의 결합을 차단하는 본 발명의 단백질의 능력은 표준 방사성 면역분석 또는 형광 면역분석을 사용하여 평가된다.

[0633] 생체 내 시험

[0634] 본 발명의 단백질은 또한 그것의 생체 내 안정성 및/또는 효능에 대해 시험될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 단백질은 피험자에게 투여되며, 단백질의 혈청 수준은, 예를 들어 ELISA를 사용하여 또는 단백질에 컨쥬게이트된 검출가능한 표지를 검출함으로써 시간에 걸쳐 검출된다. 이것은 본 발명의 단백질의 생체 내 안정성의 결정을 허용한다.

[0635] 본 발명의 단백질은 또한 인간 질병의 동물 모델에 투여될 수 있다. 당업자는 본 발명의 단백질이 결합하는 항원에 기반한 적당한 모델을 용이하게 결정할 것이다. 예를 들어, 인간 암의 예시적인 모델은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 유방암의 마우스 모델은 섬유아세포 성장인자 3을 과발현시키는 마우스(Muller et al., 1990); TGF-알파(Matsui et al., 1990); erbB2(Guy, et al., 1992); RET-1(Iwamoto et al., 1990) 또는 SCID 마우스에 인간 유방암 세포의 이식을 포함한다. 난소암의 모델은 마우스에 난소암 세포의 이식(예를 들어, 문헌[Roby et al., 2000]에서 설명되는 바와 같음); 황체형성 호르몬을 만성적으로 분비하는 유전자이식 마우스(Risma et al., 1995); 또는 Wx/Wv 마우스를 포함한다. 전립선 암의 마우스 모델은 또한 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 SV40 초기 유전자들의 강제된 발현으로부터 도출되는 모델들(예로써, SV40 초기 유전자들을 발현시키기 위한 최소의 래트 프로바신(probasin) 프로모터 또는 큰 T 항원을 발현하기 위한 긴 프로바신 프로모터를 사용하는 TRAMP 모델, 집합적으로 명명되는 'LADY' 모델 또는 c-myc 또는 Bcl-2 또는 Fgf8b를 발현시키는 또는 압도적인 네가티브 TGFβ를 발현시키는 마우스를 포함한다(전립선 암의 유전자 이식된 모델의 검토를 위해 문헌[Matusik et al., 2001]을 참조).

[0636] 본 발명의 단백질은 또한 암 이외의 질병의 동물 모델, 예를 들어, 당뇨병을 억제하고, 방지하고, 치료하고 지연시키는 그것들의 능력을 시험하기 위한 NOD 마우스(예를 들어, 문헌[Tang et al. (2004)]에서 설명된 바와 같음) 및/또는 GVHD의 마우스 모델(예를 들어, 문헌[Trenado (2002)]에서 설명된 바와 같음) 및/또는 건선의 마우스 모델(예를 들어, Wang et al. 2008) 및/또는 to a model of rheumatoid arthritis 예를 들어, 마우스의 SKG 변형(Sakaguchi et al.), 래트 II형 콜라겐 관절염 모델, 마우스 II형 콜라겐 관절염 모델 또는 몇몇 종에서 항원 유발 관절염 모델(Bendele, 2001)) 및/또는 다발성 경화증의 모델(예를 들어, 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE; 문헌[Bradl and Linington, 1996])) 및/또는 염증성 기도 질병(예를 들어, OVA 시험감염 또는 바퀴벌레 항원 시험감염(문헌[Chen et al. 2007; Lukacs et al. 2001])) 및/또는 염증성 장질환의 모델(예를 들어, 텍스트란 황산나트륨(DSS)-유발된 대장염 또는 대장염의 Muc2 결핍 마우스 모델(Van der Sluis et al. 2006)에 투여될 수 있다.

[0637] 진단적/예측적 방법

- [0638] 한 예에서, 본 발명은 질환을 진단하거나 예측하는 방법을 제공한다.
- [0639] 본 명세서에서 사용된 용어 "진단" 및 이에 제한되는 것은 아니지만 "진단하다", "진단된" 또는 "진단하는"과 같은 그것의 변형은 재발 질병의 임상적 상태 또는 진단의 임의의 주요한 진단을 포함한다.
- [0640] 본 명세서에서 사용되는 "예측", "예측하는" 및 변형은 회복 또는 재발의 가능성을 포함하는 질병의 가능성 있는 결과 또는 과정을 말한다.
- [0641] 한 예에서, 방법은 샘플 내 항원의 양을 결정하는 단계를 포함한다. 따라서, 본 발명의 단백질은 진단적 또는 연구 목적을 위한 세포 분류(예를 들어, 유세포분석기), 형광 활성화된 세포 분류)와 같은 용도에서 이용성을 가진다. 예를 들어, 샘플은 일정 시간 동안 그것이 항원에 결합하여 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 본 발명의 단백질과 접촉되고, 그 다음에 상기 복합체가 검출되거나 복합체의 수준이 결정된다. 이 목적을 위하여, 단백질은 표지되거나 비표지될 수 있다. 단백질은, 예를 들어 본 명세서에서 설명된 방법을 사용하여 직접적으로 표지될 수 있다. 비표지될 때, 단백질은, 예를 들어 응집 분석으로서 적당한 수단을 사용하여 검출될 수 있다. 또한 비표지 항체 또는 단편이 단백질 또는 다른 적당한 시약(예를 들어, 표지화된 단백질 A)과 반응하는 표지화된 항체(예를 들어, 2차 항체)와 같은 단백질을 검출하는데 사용될 수 있는(즉, 하나 이상의) 적당한 시약과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0642] 바람직하게, 본 발명의 단백질은 면역분석에서 사용된다. 바람직하게, 면역조직화학, 면역형광법(immunofluorescence), 효소 결합 면역흡착 분석(enzyme linked immunosorbent assay : ELISA), 형광 연결된 면역흡착 분석(FLISA), 웨스턴 블롯팅, RIA, 바이오센서 분석 또는 FLISA 포맷은 다양한 샘플로부터 단백질 농도를 결정하는데 특히 유용하다.
- [0643] 한 형태에서, 이러한 분석은, 예컨대 폴리스티렌 또는 폴리카보네이트 마이크로웰(microwell) 또는 딥스틱(dipstick)과 같은 고체 매트릭스, 막 또는 유리 지지체(예를 들어, 유리 슬라이드) 상에 생물학적 샘플을 고정시키는 단계를 수반한다. 관심 항원에 특이적으로 결합하는 본 발명의 단백질은 고정된 샘플과 직접적으로 접촉되어, 상기 샘플에 존재하는 그것의 표적 항원 중 어떤 것과 직접적인 결합을 형성한다. 본 발명의 단백질은 일반적으로, 예를 들어 FLISA의 경우에 형광 표지(예를 들어 FITC 또는 Texas Red) 또는 형광 반도체 나노 결정체(미국특허 제6,306,610호에 설명된 바와 같음) 또는 ELISA의 경우에 효소(예를 들어, 호스 래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase : HRP), 알칼라인 포스파타제(AP) 또는 β -갈락토시다제)와 같은 검출가능한 리포터 분자로 일반적으로 표지되며, 또는 대안으로 본 발명의 단백질과 결합하는 표지된 항체가 사용될 수 있다. 임의의 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위한 세척 후, 표지를 형광 표지의 경우 직접적으로 또는 효소 표지인 경우 과산화수소, TMB, 또는 톨루이딘, 또는 5-브로모-4-클로로-3-인돌-베타-D-갈락토피라노사이드(x-gal)과 같은 기질의 첨가를 통해 검출될 수 있다. 이러한 ELISA 또는 FLISA 기반 시스템은 특히 리된 및/또는 재조합 단백질 또는 그것의 면역원성 단편 또는 그것의 에피토프와 같은 단백질이 결합하는 단백질 표준의 알려진 양에 대한 검출 시스템을 조정함으로써 샘플 내 단백질 양의 정량화에 특히 적합하다.
- [0644] 다른 형태에서, 본 발명의 단백질 및 관심있는 항원에 결합하는 항체들, 예로서 막, 폴리스티렌 또는 폴리카보네이트 마이크로웰, 폴리스티렌 또는 폴리카보네이트 딥스틱 또는 유리 지지체 상에 고정시키는 것을 포함한다. 샘플은 다음으로 상기 본 발명의 단백질, 및 상기 화합물이 결합되거나 포획되는 단백질과 물리적 연결이 이루어진다. 결합된 단백질은 다음으로 다른 단백질 또는 동일 단백질의 상이한 자리에 결합하는 본 발명의 표지된 단백질을 사용하여 검출된다. 대안으로, 제3의 표지된 항체는 제2의(검출하는) 항체에 결합하는데 사용될 수 있다.
- [0645] 이미징 방법
- [0646] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명은 또한 본 발명의 단백질을 사용하는 이미징 방법을 고려한다. 이미징을 위하여, 본 발명의 단백질은 이미징에 의해 검출 가능한 신호를 방출할 수 있는 임의의 분자 또는 작용물질일 수 있는 검출가능한 표지에 컨쥬게이트된다. 예를 들어, 검출가능한 표지는 단백질, 방사성 동위원소, 형광단, 가시광선 방출 형광단, 적외선 방출 형광단, 금속, 강자성 물질, 전자기 방출 물질, 특이한 MR 분광학적 시그니처를 가지는 물질, X-레이 흡수 또는 반사 물질 또는 사운드 변화 물질일 수 있다.
- [0647] 본 발명의 단백질은 이미징 방법에 앞서, 전신적으로 또는 국소적으로 이미징되는 종양, 기관 또는 조직에 투여될 수 있다. 일반적으로, 본 단백질은 종양, 조직 또는 기관의 원하는 광학 이미지를 달성하는데 효과적인 용량으로 투여된다. 이러한 용량은 사용된 특정 단백질, 이미징 방법을 받는 종양, 조직 또는 기관, 사용된 이미징 장치 등에 의존하여 매우 광범위할 수 있다.

- [0648] 본 발명의 일부 구체예에서, 본 발명의 단백질은, 제한되는 것은 아니지만, 종양의 이미징, 기관의 단층촬영 이미징, 기관 기능의 모니터링, 관상 동맥 혈관 촬영법, 형광 내시경 검사법, 레이저 가이드 수술, 광청각 및 음향광 방법 등을 포함하는 다양한 생의학적 용도에서 조직 및 기관들의 생체내 광학적 이미징 작용물질로서 사용된다. 본 발명의 단백질이 이미징을 위해 사용되는 예시적 질병들, 예를 들어 암들이 본 명세서에서 설명되며, 필요한 변경을 가하여 본 발명의 실시예에 적용되는 것으로 여겨질 것이다. 한 예에서, 본 발명의 단백질 컨쥬게이트는 본 발명의 특정 단백질이 피험자에서 농축되는 경우 모니터링에 의해 종양 또는 다른 이상 징후의 존재 검출에 유용하다. 다른 구체예에서, 본 발명의 단백질은 복강경 검사법에 의한 종양의 미세전이 검출을 위한 레이저 보조 가이드된 수술에 유용하다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 단백질은 아테롬성 동맥경화증 플라크 및 혈전의 진단에 유용하다.
- [0649] 이미징 방법의 예는 자기공명이미징(MRI), MR 분광기, 방사선 사진법, CT, 초음파, 평면 감마 카메라 이미징, 단일 광자 방출 단층 촬영(SPECT), 양전자 방사 단층 촬영, 다른 핵의학 기반 이미징, 가시광선을 사용하는 광학적 이미징, 루시피라제를 사용하는 광학적 이미징, 형광단을 사용하는 광학 이미징, 다른 광학 이미징, 근적외선을 사용하는 이미징 또는 적외선을 사용하는 이미징을 포함한다.
- [0650] 본 발명의 방법의 특정 구체예는 피험자에서 외과적 방법 동안 조직을 이미징하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0651] 이미징을 위한 다양한 기술은 당업자에게 알려져 있다. 임의의 이런 기술은 검출 가능한 표지로부터 신호를 측정하는 본 발명의 이미징 방법 내용에 적용될 수 있다. 예로서, 광학적 이미징은 특정 의학 영역에서 광범위하게 허용되는 하나의 이미징 양상이다. 예는 세포 성분의 광학적 표지화 및 플루오레세인 혈관조영법(fluorescein angiography), 형광안저혈관조영술(indocyanine green angiography)과 같은 혈관 조영술을 포함한다. 광학적 이미징제의 예는, 예를 들어 플루오레세인, 플루오레세인 유도체, 인도시아닌 그린, 오레곤 그린(Oregon green), 오레곤 그린 유도체, 로다민 그린, 로다민 그린의 유도체, 에오신, 에리틸로신, 텍사스 레드, 텍사스 레드의 유도체, 말라카이트 그린, 나노골드 실포숙신이미딜 에스터, 캐스케이드 블루, 쿠마린 유도체, 나프탈렌, 피리딜옥사졸 유도체, 캐스케이드 옐로 염료, 덤옥실 염료를 포함한다.
- [0652] 감마 카메라 이미징은 검출가능한 표지로부터 유래된 신호를 측정하기 위하여 이용될 수 있는 이미징 방법으로서 고려된다. 당업자는 감마 카메라 이미징의 적용을 위한 기술에 익숙할 것이다. 한 구체예에서, 신호를 측정하는 것은 ^{111}In 또는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 컨쥬게이트, 특히 ^{111}In -옥트레오타이드 또는 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -소마토스타틴 유사체의 감마 카메라 이미징의 사용을 수반할 수 있다.
- [0653] 컴퓨터 단층촬영(CT)은 본 발명의 내용에서 이미징 양상으로서 고려된다. 다양한 각도로부터 일련의 X-레이를 취한 다음 그것들을 컴퓨터와 조합함으로써, CT는 신체의 어떤 부분의 3차원 이미지를 만들 수 있다. 컴퓨터는 임의의 각도 및 임의의 깊이로부터 2차원 슬라이스를 나타내도록 프로그래밍된다. 슬라이스는 조합되어 3차원적 표현을 구성할 수 있다.
- [0654] CT에서, 관심의 항원에 결합하는 본 발명의 단백질에 컨쥬게이트된 방사성 불투과성의 콘트라스트 촉진제(contrast agent) 정맥내 주입은 초기 CT 스캔이 진단적이지 않을 때 연약 조직 덩어리의 확인 및 묘사를 보조할 수 있다. 유사하게, 콘트라스트 촉진제는 연약 조직 손상의 혈관질을 평가하는 것을 보조한다. 예를 들어, 콘트라스트 촉진제의 사용은 종양과 그 주변의 혈관 구조의 관계 묘사를 보조할 수 있다.
- [0655] CT 콘트라스트 촉진제는, 예를 들어 요오드화된 조영제이다. 이러한 작용물질의 예는 이오탈라메이트, 이오헥솔, 다이아트라이조에이트, 이오파미돌, 에티오돌, 및 이오파노에이트를 포함한다. 가돌리늄제는 또한 CT 콘트라스트 촉진제, 예를 들어 가도펜테이트로서 사용이 보고되었다.
- [0656] 자기 공명 이미징(Magnetic resonance imaging : MRI)은 높은 강도의 자기 및 무선 주파수 신호를 사용하여 이미지를 만드는 이미징 양상이다. MRI에서, 이미징되는 샘플은 강한 정적 자기장 내에 위치되고, 샘플 내 네트 자화(net magnetization)를 생성하는 무선 주파수 방사 펄스로 여기된다. 다음으로 다양한 자기장 구배 및 다른 RF 펄스는 공간적 정보를 기록되는 신호로 암호화하도록 작용한다. 이러한 신호들을 수집하고, 분석함으로써, CT 이미지에서와 같이 보통 2차원 슬라이스로 나타나는 3차원 이미지를 컴퓨팅할 수 있다. 슬라이스는 3차원 표현을 구성하도록 조합될 수 있다.
- [0657] MRI 또는 MR 분광학 이미징에서 사용되는 콘트라스트 촉진제는 다른 이미징 기술에서 사용되는 것과 다르다. MRI 콘트라스트 촉진제의 예는 가돌리늄 킬레이트, 망간 킬레이트, 크롬 킬레이트, 및 철 입자를 포함한다. 예를 들어 본 발명의 단백질은 스칸듐, 티탄, 바나듐, 크롬, 망간, 철, 코발트, 니켈, 구리, 몰리브덴, 루테튬, 세륨, 인듐, 프라세오디뮴, 네오디뮴, 프로메튬, 사마륨, 유로퓸, 가돌리늄, 터비늄, 다이스프로슘, 홀름, 에르

봄, 톨륨 및 이테르븀으로 이루어진 군으로부터 선택된 상자성 금속의 킬레이트를 포함하는 화합물에 컨쥬게이트된다. 본 q말명에 유용한 이미징제의 추가적인 예는 PFOB와 같은 할로카본계 나노입자 또는 다른 플루오르계 MRI 작용물질이다. CT와 MRI는 둘 다 조직 경계와 혈관 구조를 구분하는데 도움이 되는 해부학적 정보를 제공한다.

[0658] 세포 생존력과 같은 세포 수준의 정보에 속하는 정보를 제공하는 이미징 양상은 양전자 방출 단층 촬영(positron emission tomography : PET) 및 단일 광자 방출 계산된 단층촬영(single-photon emission computed tomography : SPECT)을 포함한다. PET에서, 환자는 물질이 신체를 통해 이동함에 따라 모니터링 될 수 있는 양성자들을 방출하는 방사성 물질을 흡수하거나 또는 그것과 함께 주입된다.

[0659] 단일 광자 방출 계산된 단층 촬영 또는 SPECT가 PET와 밀접하게 관련되어 있다. 2가지의 주된 차이점은 양성자를 방출하는 물질 대신 SPECT는 고에너지 광자를 방출하는 방사성 추적자를 사용한다는 것이다. SPECT는 관상동맥 질환을 포함하는 다수의 질병들을 진단하는데 가치가 있으며, 이미 매년 약 2백 5십만 건의 SPECT 심장 연구가 미국에서 수행된다.

[0660] PET에 대해, 본 발명의 단백질은 통상적으로 ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{82}Rb , ^{62}Cu , 및 ^{68}Ga 와 같은 양성자 방출자로 표지된다. SPECT에 대해 본 발명의 단백질은 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{201}Tl , 및 ^{67}Ga , ^{111}In 과 같은 양성자 방출자로 표지된다.

[0661] 동물 및 인간의 비침입성 형광 이미징은 또한 생체내 진단적 정보를 제공하며, 매우 다양한 임상적 전문 분야에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 형광단의 UV 여기에 이어 진보된 장치를 사용하는 복잡한 분광학적 이미징(예를 들어, 문헌[Andersson-Engels et al, 1997]을 참조)에 이르기까지 단순한 관찰을 포함하는 기술들이 수년에 걸쳐 개발되었다. 예를 들어, 형광단 또는 형광 단백질의 생체내 검출을 위해 당업계에 알려진 특정 장치 또는 방법은, 제한되는 것은 아니지만, 생체내 근적외선 형광법(예를 들어, 문헌[Frangioni, 2003]을 참조), Maestro (상표명) 생체내 형광 이미징 시스템(메사추세츠주 우번에 소재한 Cambridge Research & Instrumentation, Inc.), 플라잉 스팟 스캐너(flying-spot scanner)(예를 들어, 문헌[Ramanujam et al, 2001]을 참조) 등을 포함한다.

[0662] 광학 반응을 검출하는 다른 방법 또는 장치는, 제한 없이, 시각적 관찰, CCD 카메라, 비디오 카메라, 사진 필름, 레이저 스캐닝 장치, 형광계, 감광성 반도체 소자, 양자 계측기, 형광의 현미경, 주사형 현미경, 유세포 분석기, 형광 미세 혈소판 판독기, 또는 광전자 증배관을 이용하는 신호 증폭을 포함한다.

[0663] 일부 예에서, 이미징제는, 예를 들어 본 명세서에 설명된 모델을 사용하여 인간에서 사용에 앞서 시험관내 또는 생체내 분석을 사용하여 시험된다.

[0664] 제조 물품

[0665] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질을 함유하는 제조 물품 또는 "키트"를 제공한다. 제조 물품은 선택적으로 용기 및 표지 또는, 예를 들어 임의의 구체예에 따라서 본 명세서에서 설명되는 방법의 발명을 사용하는 설명서를 제공하는 용기 상 또는 용기와 결합되는 패키지를 포함한다. 적당한 용기는, 예를 들어 보틀(bottles), 바이알, 주사기, 블리스터 팩 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 용기는 본 발명의 단백질을 보유하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어 용기는 정맥 용액 백 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통 가능한 스탑퍼(stopper)를 가지는 바이알일 수 있다). 대안으로 또는 추가적으로, 제조 물품은 주사를 위한 세균 발육 억제수(bacteriostatic water for injection : BWFI), 인산 완충 식염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액과 같은 약제학적으로 허용가능한 완충제를 포함하는 제2 (또는 제3) 용액을 추가로 포함할 수 있다. 기타 완충제, 희석제, 필터, 니들 및 주사기를 포함하는 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 기구들이 추가적으로 포함될 수 있다.

[0666] 본 발명은 다음의 비제한적 실시예에서 추가로 설명된다.

[0667] 실시예

[0668] 다음의 예에서, 실시예 1-8은 FR1 내에서 2이상의 시스템인 잔기 및 그것에 화합물의 컨쥬게이션을 포함하는 항체 가변 영역을 포함하는 단백질의 생성을 설명한다. 이 실험은 항원에 단백질 결합을 막지 않고 이항화 결합을 형성할 수 있거나 컨쥬게이션을 위한 위치를 제공할 수 있는 시스템인 잔기의 위치를 예측하기 위한 방법을 만들었다는 것을 증명하기 위한 모델로서 사용된다. 이 방법을 사용하여, 본 발명자는 또한 FR2 및/또는 시스템인 잔기가 도입될 수 있는 FR3 및 CDR2를 포함하는 영역 내 위치를 확인하였다. 실시예 9 내지 15는 FR2 및/또는

FR3 내 시스테인 잔기의 위치 결정 및 그것에 화합물의 컨쥬게이션에 관련된 실험을 설명한다.

[0669] 실시예 1 -재료 및 방법

[0670] 1.1 유전자 조작 시스테인 교체 돌연변이에 대한 위치로서 프레임워크 1의 분자 모델링 및 확인

[0671] 수많은 다이아바디 서열의 V_H/V_L 접점을 모델링하였고 다음의 기준을 충족시키는 잔기를 확인하였다:

- [0672] ● 도메인 및 도메인-도메인 접점의 구조적 통합에 수반되지 않음;
- [0673] ● 다른 아미노산과 소수성 접점에 수반되지 않음;
- [0674] ● CDR 내에 없음;
- [0675] ● 무작위 코일 중에 있을 수 있고, 따라서 그것의 백본은 2차 구조 모티프에 수반되지 않음; 및
- [0676] ● 바람직하게 필요하지 않아도, 표면에서 무작위 코일 잔기에 의해 각 측면이 둘러싸임(예를 들어 CDR 바깥쪽의 구조화되지 않은 루프의 중간).

[0677] 잔기의 이런 서브세트(subset)으로부터, 시스테인으로 2개의 천연 잔기의 대체를 통해 이황화 결합을 만들었다.

[0678] 1.2 서열 넘버링

[0679] 항체 잔기를 Kabat(1987 및/또는 1991)에 따라서 넘버링한다.

[0680] 1.3 DNA를 암호화하는 항체 V_L 및 V_H 도메인의 합성

[0681] TAG72(서열 번호: 58)에 특이적인 마우스 mAb 및 HER2(서열 번호: 60)에 특이적인 인간 mAb의 V 영역을 포함하는 다이아바디를 암호화하는 DNA 구성체를 적절한 제한 자리와 함께 합성하였고 GenScript에 의해 pUC57에 클로닝하였다. V 영역을 V_H -Gly4Ser- V_L 또는 V_L -Gly4Ser- V_H 로서 배열하였다.

[0682] 1.4 일반적 클로닝 과정

[0683] 모든 DNA 조작을 New England Biolabs로부터 구입한 시약에 의한 표준 프로토콜에 따라서 수행하였다. DNA 구성체를 암호화하는 다이아바디를 적절한 제한효소로 pUC57로부터 절단하였고, 1%(w/v) 아가로스 겔에 재용해하고, Qiaquick 겔 추출 키트(Qiagen)를 사용하여 겔로부터 정제하였다. 구성체를 유사하게 제조한 pET22b 발현 벡터에 결합시키고, 결합 혼합물을 *E. coli* XL1-Blue 세포에 전기천공법에 의해 형질전환하였다. 미니프렙(Miniprep) DNA를 Qiagen 미니프렙 스핀 키트를 사용하여 형질전환체로부터 추출하였고, 재조합 클론을 AmpliTaq를 가지는 Dye 터미네이터 사이클 시퀀싱(Terminator Cycle Sequencing) 키트를 사용하여 T7 프로모터 및 터미네이터 프라이머로 시퀀싱하여 확인하였다. V_H -Gly4Ser- V_L 배향 내 항-TAG72 mAb의 V 영역을 함유하는 클론은 AVP04-07(서열 번호: 58)을 지정하였다. V_H -Gly4Ser- V_L 배향 내 항-HER2 mAb의 V 영역을 함유하는 클론은 AVP07-17(서열 번호: 60)을 지정하였다. 이 클로닝 방법은 카복시 말단의 6xHIS 태그 삽입을 허용하였다. 이 태그는 통상적으로 유선 하류 정제 과정에 사용되었고, 활성이 중성이 되는 것으로 알려져 있다.

[0684] 1.5 돌연변이 유발에 의한 시스테인 잔기 및 N-말단의 세린의 도입

[0685] 시스테인 잔기를 아미노산 위치 8 및 12에서 잔기 8 및 11 또는 8 및 12를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 변경함으로써 각각 V_L 도메인의 FR1 영역의 AVP04-07의 아미노산 위치 8 내지 11 및 AVP07-86에 도입하였다. 예시로서, 아미노산 서열 Pro₈Ser₉Ser₁₀Leu₁₁를 AVP04-07의 V_L 영역의 FR1 서열에서 발견하였다. 위치 8의 프롤린 잔기를 서열 CCG에 의해 암호화하고, 위치 11의 류신 잔기를 서열 CTG에 의해 암호화한다. 돌연변이 유발 기술은 시스테인을 암호화하는 이 뉴클레오티드 서열을 TGC로 변경하기 위해 사용된다.

[0686] 유사한 기술을 사용하여 단백질의 천연 N-말단 잔기를 세린 잔기로 대체하였다. 이것은 시스테인 잔기의 도입 전 또는 도입 후에 행해졌다.

[0687] QuikChange(등록상표) 자리 지정 돌연변이 유발 방법(Stratagene)을 사용하여 시스테인 잔기를 도입하고 N-말단을 변경하였다. 이 PCR-기반 방법은 프라이머로서 원하는 돌연변이 및 주형으로서 플라스미드 DNA를 함유하는 2개의 상보적 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 2중 가닥의 돌연변이체 PCR 생성물을 합성한다. 다음으로 DpnI 분해를 사용하여 주형 플라스미드를 제거하여 돌연변이 유발 효율을 증가시킨다. 간략하게, PCR을 15ng의 주형 및 각각 125ng의 돌연변이 유발 전방 및 후방 프라이머를 함유하는 50 μ l 반응 혼합물을 사용하여 제조업자

의 설명서에 따라서 수행한다.

[0688] 예로서, 천연 N-말단 글루타민 잔기를 세린 잔기 AVP04-07(서열 번호: 58)으로 치환하기 위하여 전방 프라이머로서 5'- CC CAG CCG GCC ATG GCG AGC GTG CAG CTG CAG CAG AGC G -3'(서열 번호: 66)를 주형으로서 사용하였고, 후방 프라이머로서 5'- C GCT CTG CTG CAG CTG CAC GCT CGC CAT GGC CGG CTG GG - 3'(서열 번호: 67)(호주 애들레이드에 소재한 Geneworks)를 주형으로서 사용하였다. 결과 구성체를 자리 지정 돌연변이 유발을 사용하여 V_L 쇠의 FR1 영역의 위치 8 및 11에서 시스테인 잔기를 도입하기 위하여 주형으로서 사용하였다. 서열에 다음의 조건을 사용하여 증폭을 수행하였다: 30초 동안 95℃; 30초 동안 95℃, 30초 동안 55℃ 및 13분 동안 68℃로 이루어진 18주기; 7분 동안 68℃의 최종 확장. 주형을 1시간 동안 37℃에서 DpnI로 분해하였다. 형질전환체를 스트라젠(Stratagene), 즉 상기 확인한 바와 같이 추출한 미니프랩 DNA 및 확인한 DNA 서열에 의해 공급한 프로토콜을 사용하여 얻었다. 유사한 돌연변이 유발 접근을 본 명세서에서 예시한 모든 다이아바디를 만들기 위해 이용하였다.

[0689] V_L FR1의 시스테인 치환 돌연변이 및 유전자 조작된 N-말단의 세린 잔기를 포함하는 항-TAG72 다이아바디는 AVP04-50을 지정하였다. V_L FR1의 시스테인 치환 돌연변이 및 유전자 조작된 N-말단의 세린 잔기를 포함하는 항-HER2 다이아바디는 AVP07-63을 지정하였다.

[0690] 1.6 대규모 박테리아 배양물을 사용하는 다이아바디의 발현

[0691] DNA를 암호화하는 다이아바디를 표준 프로토콜을 사용하여 화학적 경쟁자 *E. coli* BL21 세포로 형질전환하였다. 단일 형질전환체를 1% D-글루코스 및 100μg/ml 암피실린을 함유하는 500ml 2xYT에 도입하였고, 밤새 37℃에서 인큐베이션하고, 220 rpm으로 진탕하였다. 18L의 동일한 배지를 0.1의 최종 OD₆₀₀로 밤새 배양물과 함께 시딩하였고 OD₆₀₀가 약 0.6 내지 0.8이 될 때까지 30℃에서 인큐베이션하였다. 배양물을 12℃로 옮기고 유도 온도로 도달될 때까지 진탕을 계속하였다. 단백질을 0.2mM IPTG의 첨가로 유발하였고, 배양물을 12℃에서 15시간 동안 인큐베이션하였다. 박테리아 펠렛을 10,000g에서 원심분리하여 제조하였고, 수확하였고, 칭량하고 -20℃에서 밤새 저장하였다.

[0692] 1.7 *E. coli*에서 발현된 다이아바디의 정제

[0693] (대략 150-300g의) 박테리아 펠렛을 용해하였고, 단백질을 추출하고 후속하여 정제하였다. 박테리아 펠렛의 모든 그램에 대해 5ml의 His-태그 친화도 크로마토그래피 추출 완충제(20mM 포스페이트, 500mM NaCl, 20mM 이미다졸, 0.025% 라이소자임(w/v), 1mM PMSF, 250U/μl 벤조나제, pH 7.4)을 용해 프로토콜 내에서 사용하였다. 박테리아 펠렛을 기계적 균질화에 의해 용해 완충제 중에서 재현탁한 다음 초음파 처리하였다(얼음 상에서 6 x 30 초 펄스). 박테리아 용해물을 이후에 37℃에서 원심분리(10,000g, 30분) 및 여과(0.45μm 필터 막) 전 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0694] 다음으로 AKTA Purifier 10(GE LifeSciences)를 사용하여 His-태그 친화도 크로마토그래피 정제를 사용하여 여과한 박테리아 용해물로부터 다이아바디를 정제하였다. 2 내지 4개의 5ml HisTrap(상표명)(GE LifeSciences) 미정제 FF 컬럼을 정제를 위해 연속해서 사용하였다. 용해물을 외부 P960 펌프를 통해 니켈 컬럼을 통과시켰다. HisTrap(상표명) 컬럼을 10컬럼 부피의 His-Tag 친화도 크로마토그래피 추출 완충제(20mM 포스페이트, 500mM NaCl, 20mM 이미다졸)로 세척하였다. 정제한 단백질을 50% His-Tag 친화도 크로마토그래피 용리 완충제(500mM 포스페이트, 500mM NaCl, 20mM 이미다졸) 및 50% His-Tag 친화도 크로마토그래피 추출 완충제(260mM 이미다졸 최종 농도)로 용리하였다. 용리된 단백질을 함유하는 분획(AKTA Unicorn 프로그램 상에서 280mM 흡광도에 의해 결정됨)을 수집하였고, 모으고, 단백질 농도를 결정하였고, 적절한 이온 교환 완충제에서 투석하였다.

[0695] 단백질의 pI보다 높은 완충제 1.0-1.5 pH 단위(양이온 교환) 또는 단백질의 pI보다 낮은 1.0-1.5 단위(음이온 교환)에서 단백질을 투석하였다. 전형적으로, 7.0-8.0의 pI를 가지는 다이아바디는 MES 완충제(50mM MES, 양이온 교환에 대해 pH 6.0)에서 투석하였고, 8.0-9.0의 pI를 가지는 것을 포스페이트 완충제(50mM 포스페이트, 양이온 교환에 대해 pH 7.0)에서 투석하였고, 5.0-6.5의 pI를 가지는 것을 Tris 완충제에서 투석하였다(20mM, 음이온 교환에 대해 pH 7.5). 대부분의 다이아바디 pI는 앞서 언급한 범위 내에 속한다. 다이아바디를 4시간 만큼 별도로 3가지의 동일한 완충제 교환과 함께 200x 부피의 완충제로 투석하였다. 4℃에서 10K 컷오프 투석 튜브를 사용하여 투석을 수행하였다.

[0696] 투석 후, 단백질 샘플을 10분 동안 3220 x g에서 원심분리하여 이온 교환 전 변성된 불용성 물질을 펠렛화하였다. AKTA 정제기 10을 사용하고, 2 x 5ml HiTrapTM SP HP 컬럼 실행을 연속해서 사용하고, P960 외부 펌프를

통해 정제된 투석 물질이 컬럼을 통과하도록 하여 이온 교환을 수행하였다. 이 단계 후, 컬럼을 10컬럼 부피의 이온교환 완충제로 세척한 다음 컬럼으로부터 단백질의 용리 동안 선형 완충제 구배(염 구배)를 시작하였다. 이 과정에서, 1M 최종 농도로 NaCl의 첨가와 함께 동일한 완충제를 완충제로 선형 구배에 걸쳐 이온 교환 완충제를 대체하였다. 용리 구배를 600mM NaCl의 최종 농도로 300ml 이상에서 수행하였다.

[0697] 용리한 다이아바디에 대응하는 분획(Unicorn의 280nm 흡광도에 의해 결정)을 모으고, 정량화하였다. 이온 교환 컬럼으로부터 용리한 주된 단백질 종은 전형적으로 다이아바디의 이합체 형태이다. 이온 교환 후, 용리한 단백질 물질을 투석 막에 두었고(10K 컷오프) 폴리에틸렌 글리콜 생성물(Aquacide II, Calbiochem)에 대해 막을 노출시킴으로써 4℃에서 대략 3mg/ml로 농축하였다. 농축한 단백질을 후속하여 인산 완충 식염수(PBS) 중에서 한 번 투석한 후(최소 4시간 동안 4℃에서 200x 부피) 크기 배제 크로마토그래피(겔 투과)하였다. 크기 배제 크로마토그래피를 AKTA Purifier 10 상의 PBS 내 Pharmacia Amersham(GE LifeSciences) Superdex(등록상표) 75 26/60 프랩-등급(prepare-grade) 컬럼을 사용하여 수행하였다. 280nm 내 단일 피크에 대응하는 용리한 다이아바디를 정량화하였고, 대략 3mg/ml로 추가로 농축하였고, 앞서 약술한 바와 같이 PBS 중에서 투석한 후, -20℃에서 저장하였다. 다이아바디를 통상적으로 SDS-PAGE(10% Bis-트리스)(미국 캘리포니아에 소재한 Invitrogen)에 의해 모니터링하였다. 단백질(0.5-50μg)을 150V에서 90분 동안 100mM의 존재 또는 부재하에 전기영동하였고 Coomassie Brilliant Blue R-250 염색에 의해 시각화하였다.

[0698] 1.8 다이아바디 면역반응성을 결정하기 위한 분석.

[0699] 가용성 항원에 대한 결합 활성을 컬럼 이동에 의해 확립하였다. AVP04-07 및 AVP04-50 다이아바디에 대한 가용성 항원은 소 텍밀샘 뮤신(BSM)(Sigma)으로부터 가용성 형태로 이용가능한 TAG72이었다. AVP07-17 및 AVP07-63 다이아바디에 대해, 가용성 항원은 제조항 HER2 엑토도메인이다. 컬럼 이동 분석에서, 다이아바디에 대해 적어도 2배 물 과량의 가용성 항원을 1시간 동안 주변 온도에서 PBS 완충제 중에서 인큐베이션하였다. 결합 활성을 유리 다이아바디 피크에 대해 결과된 다이아바디/항원 복합체 피크를 비교함으로써 결정하였다. 다이아바디 또는 다이아바디/항원 복합체의 용리 프로파일을 280nm에서 흡광도를 통해 또는 다이아바디가 유포품 표지된 경우 분획을 Victor 다표지 프로그램 위저드의 유포품 모드를 사용하여 Victor 시간 분해 형광계에서 측정하였다.

[0700] 1.9 무작위 표면 리신에 대한 유포품 표지

[0701] 대략 3mg/ml에서 다이아바디를 해리 향상 시간 분해 형광측정 분석에 대한 유리 아미노기에 대해 유포품(DELFI Eu-N1 ITC Chelate, Perkin Elmer)으로 표지하였다. 다이아바디를 20nmol 유포품 대 1nmol 단백질의 비로 유포품 시약으로 표지하였다. 이것은 100mM 탄산수소나트륨 완충제 pH 9.0-9.3의 존재하에서 40nmol 유포품 시약에 48.5μl의 최종 부피로 100μg의 단백질을 첨가함으로써 달성된다. 반응을 작은 자기 교반기를 함유하는 Reacti 바이알(Pierce)에서 수행하였다. 반응을 어둠 속에서 밤새 4℃에서 수행하였다. Tris-완충 식염수(TBS, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8)를 인큐베이션 후 반응에 첨가하여(200 μL) 풍부한 유리 아미노기를 도입함으로써 과량의 유포품 시약을 킬칭하였다. 유포품 반응을 Superdex(등록상표) 200 10/300 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)을 사용하여 겔 여과에 의해 정제하였고 정제한 다이아바디에 대응하는 0.5ml 분획을 수집하였다. 분획의 Eu를 LumiTrac 600 96 웰 플레이트 상에서 DELFIA 증강 용액 중에서 1:100 희석을 만들어서 측정하였다. 분호기를 Victor 다표지 프로그램 위저드의 유포품 모드를 사용하여 Victor 시간 분해 형광계에서 측정하였다. 형광 프로파일을 겔 여과 280nm 크로마토그램 및 다이아바디 용리 프로파일에 대응하는 분획(280nm 흡광도에 의해 결정함)에 대해 플롯팅하였고, 형광의 피크를 수집하고 모았다. 단백질을 정량화하였고, 표지한 단백질 내 Eu³⁺ 농도를 제조업자의 설명서에 따라서 키트와 함께 제공된 유포품 표준을 사용하여 계산하였고, 그것에 의해 반응시킨 Eu-N1 ITC 킬레이트의 몰 흡광도는 280nm에서 8000이다(1 μmol/L의 반응 킬레이트는 280nm에서 0.008의 흡광도를 제공한다). 저장 전 Tris-HCl 중의 7.5% BSA(고 순도, DELFIA 유포품 표지 키트로 공급)를 0.1%(w/v)의 최종 농도로 유포품 표지된 다이아바디에 첨가하였다.

[0702] 1.10 티올화된 다이아바디의 환원

[0703] 티올화된 다이아바디(다이아바디를 확인하기 위하여 본 명세서에서 사용된 용어는 FR1 내 시스테인 치환 돌연변이를 포함한다)를 3.8mM의 TCEP(Tris(2-카복시에틸) 포스핀 하이드로클로라이드)(일리노이주 록퍼드시에 소재한 Pierce, Rockford)와 함께 실온에서 25분 동안 PBS 중에서 인큐베이션하였다. 반응 후, TCEP를 100mM 인산염 완충제 + 1mM EDTA로 사전 평형화한 PD10 탈염 컬럼으로 제거하였고, 0.5ml 분획을 수집하였고, 피크 단백질 분획을 모았다.

[0704] 1.11 티올-특이적 유포품 표지

- [0705] 킨주게이션에 대한 유리 티올 이용가능성을 결정하기 위하여, 티올화된 다이아바디를 환원시켰고 1-(p-요오도아세트아미도벤질) 다이에틸렌트라이아민-N1-N1,N2,N3,N3-펜타아세트산(DTPA)(핀란드 투르쿠에 소재한 PerkinElmer)의 Eu^{3+} 킬레이트로 표지하였다. 요오도아세트아미도 기는 안정한 공유 티오에스터 결합을 형성하는 다이아바디 상의 유리 설프하이드릴 기와 반응한다. 제조업자의 설명서에 따라서 표지를 수행하였다. 간략하게, 단백질을 50-100mM 탄산수소나트륨 완충제 + 4mM EDTA, pH 8.5 중에서 3mg/ml로 농축하였다. Eu-DTPA를 환원된 AVP04-50에 대해 30배(Eu-DTPA: 단백질) 과량의 물로 첨가하였다. 반응을 3-16시간 후 4℃에서 완료하였다. 미 반응 Eu-DTPA를 Superdex(등록상표) 200 10/300 겔러 상의 겔 여과에 의해 단백질로부터 분리시켰고, Tris-완충 식염수로, pH 7.4로 사전 평형화하였다. 각각의 결과된 분획을 증강 용액(핀란드 투르쿠에 소재한 PerkinElmer) 중에서 희석하였고, PerkinElmer 시간 분해 형광계를 사용하여 유로퓸 계측을 위해 분석하였다. 피크 단백질 분획과 부합하는 피크 유로퓸 계측을 모으고 0.1%의 매우 순수한 BSA로 안정화시키고, 4℃에서 저장하였고, 빛으로부터 보호하였다. 포함한 Eu-DTPA의 농도를 키트와 함께 공급한 100nM Eu 표준에 대한 샘플의 Eu 수를 계산함으로써 결정하였다.
- [0706] 1.12 유리 설프하이드릴의 정량화
- [0707] 환원시킨 티올화된 다이아바디를 Microcon 원심분리 농축기(메사추세츠주에 소재한 Millipore)를 사용하여 적어도 2mg/ml로 농축하였다. 반응성 티올을 시험하기 위하여, 25 μl 의 환원 단백질을 250 μl 의 100mM 인산염 완충제 + 1mM EDTA, pH 8.0 및 5 μl 의 4mg/ml 엘만 시약(DTNB)(일리노이주 록퍼드시에 소재한 Pierce, Rockford)과 혼합하였다. 15분 동안 주변 온도에서 반응을 진행시켰다. 유리 설프하이드릴 농도를 몰 흡광도에 의해 정량화하였고, 412nm로 이 완충제 시스템에서 TNB의 몰 흡광 계수의 추정치는 14,150 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 이다. 다이아바디 당 설프하이드릴 기의 평가치를 설프하이드릴의 몰 농도를 다이아바디의 몰 농도로 나눔으로써 얻었다.
- [0708] 1.13 다이아바디의 티올 자리 특이적 폐길화
- [0709] 헤테로이작용성, 단분산된 말레이미드-PEG2000-NH를 미국 JenKem Technology로부터 구입하였다(다분산도 Q-값 < 1.04). 사용 전 소량의 PEG를 물에서 복원하였고, 100 mM 인산염 완충제 + 1mM EDTA pH 7.0 중에서 20배 물 과량으로 환원시킨 티올화된 다이아바디에 첨가하였다. 3-16시간 동안 4℃에서 일정한 교반과 함께 반응을 진행시켰다. 인큐베이션 후, 완전한 샘플을 Superdex(등록상표) 200 10/300 겔럼에 대해 적용하였다.
- [0710] **실시예 2 - 유전자 조작 시스테인 치환 돌연변이에 적합한 위치로서 프레임워크 1의 분자 모델링 및 확인**
- [0711] 가변 쇠의 인실리코 분자 모델링은 실시예 1에서 약속한 기준을 충족시키는 프레임워크 1(FR1)의 잔기를 지속적으로 나타내었다. AVP04-07(서열 번호: 59)을 함유하는 뮤린 카파 가변 경쇄의 내용에서, 8 내지 11의 V_L 잔기를 시스테인 치환 돌연변이에 가장 구조적으로 적당하게 표시하였다(도 1a). 더 나아가, 인실리코 분자 모델링은 또한 V_L 프레임워크에 도입한 시스테인 치환 돌연변이가 다이아바디의 알려진 항원 결합 자리로부터 3차원적 공간으로 떨어져 있다는 것을 나타낸다(도 1b)
- [0712] HER2-특이적 AVP07-17 다이아바디(서열 번호: 61)를 함유하는 인간 람다 가변쇄에서 인실리코에 잔기 8 내지 12의 시스테인 치환 돌연변이가 포함될 때 분자 모델링으로부터 유사한 결과를 관찰하였다.
- [0713] **실시예 3- 티올화된 다이아바디 유전적 구성체의 발생**
- [0714] AVP04-07(서열 번호: 58) 및 AVP07-17(서열 번호: 60)의 내용에서 정의된 시스테인 치환 돌연변이를 도입하기 전, 천연 N-말단 잔기를 암호화하는 코돈을 세린 잔기를 암호화하는 코돈으로 각 경우에 치환하였고, 새로운 유전적 구성체를 형성하였다. 이 새로운 유전적 구성체로부터, 시스테인 치환 돌연변이를 AVP04-07에 도입하였고, 서열 번호: 154에서 설명한 유전적 구성체를 형성하였다. AVP07-17의 경우, 시스테인 치환 돌연변이를 삽입하기 전 추가 변형을 만들어서(서열 번호: 64) 서열 번호: 156에서 설명한 서열을 포함하는 구성체를 형성하였다. 하류의 처리, 예를 들어 발현 및/또는 정제 및/또는 분석을 위해 BL21 발현 박테리아 균주로 서브클로닝하기 전 실시예 1에서 약속한 바와 같이 모든 구성체의 유전적 서열을 입증하였다.
- [0715] **실시예 4 - 다이아바디의 정제**
- [0716] 모든 다이아바디를 실시예 1에서 약속한 핵심 기술에 따라서 정제하였다. TAG72-특이적 AVP04-50(서열 번호: 155) 다이아바디에 의해 예시한 전형적인 정제 전략을 본 명세서에서 보고한다.
- [0717] 박테리아 펠렛으로부터 AVP04-50의 제1 단계 정제로 His-태그 친화도 크로마토그래피를 사용하였다. 처리된 물

질을 연속적으로 설정된 다수의 5ml HisTrap™ 미정제 FF 컬럼으로부터 용리하였고, 결과된 280nm 크로마토그래피 용리 프로파일을 도 2a에 나타낸다. 280nm에서 가장 높은 흡광도를 함유하는 260mM에서 용리한 분획(도 2a의 화살표)을 모았고, 양이온 교환 전 50mM MES, pH 6.0(200x 부피의 3 완충제 변화)에서 투석하였다. 양이온 교환을 2 x HiTrap™ SP HP 컬럼에서 앞서 약술한 바와 같이 연속해서 수행하였다. 1 mS/cm 내지 대략 80 mS/cm로의 전도도의 범위에 있는 선형 염 구배 하에서, AVP04-50 다이아바디는 통상적으로 대략 30 mS/cm로 용리하였다. 도 2b는 AVP04-50의 주된 다이머 아이소타이프(화살표)가 다른 원치않는 AVP04-50 아이소타이프 또는 단백질로부터 용이하게 분리될 수 있도록 280nm에서 전형적인 양이온 교환 용리 프로파일 추적 흡광도를 나타낸다. 관심의 주된 아이소타이프을 함유하는 용리 분획(도 2b에서 화살표로 정의됨)을 하류의 정제를 위해 모았다.

[0718] 양이온 교환 후, AVP04-50 다이머를 농축하였고 Superdex(등록상표) 75 26/60 프랩-등급 컬럼을 통과시켰다. 실시예 1에서 약술한 용리 설정 하에서, AVP04-50 다이아바디는 주입 후 대략 53.5분에 용리되었다(도 2c). 용리한 AVP04-50 다이머에 대응하는 도 2c에서 약술한 차이 내에서 분획을 모았고 1.5-3 mg/ml로 농축하였다. 정제된 생성물의 최종 순도를 Superdex(등록상표) 200 10/300 컬럼 및 SDS-PAGE 전기영동 상의 겔 여과에 의해 평가하였다. 채택한 정제 섭생은 겔 여과에서 단일의 깨끗한 용리 피크를 초래하는 생성물 순도(도 2d) 및 SDS-PAGE 전기영동에서 단일의 한정된 중(도 2e)로 통상적으로 되돌아왔다. 정제 및 결과물 순도 프로파일은 AVP04-07, AVP04-50, AVP07-17 및 AVP07-63을 포함하는 임의의 시험한 다이아바디에서 상당히 다르지 않다. 더 나아가, 임의의 다이아바디(AVP04-07 및 AVP07-17)와 유전자 조작된 N-말단의 세린 잔기 및 시스테인 치환 돌연변이(AVP04-50 및 AVP07-63)를 함유하는 그것의 각각의 다이아바디 사이에서 수득을 위한 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

[0719] 실시예 5 - 다이아바디의 시험관내 면역반응성 평가

[0720] 정제된 다이아바디(AVP04-07, AVP04-50, AVP07-17 및 AVP07-63)의 면역반응성을 실시예 1에서 약술한 핵심 방법에 따라서 컬럼 이동 분석에 의해 시험관내에서 시험하였다. AVP04-07 및 AVP04-50이 겔 여과 전 그것의 항원 BSM(TAG72를 함유)과 사전 복합체화하였을 때, 다이아바디 단독과 비교하여 상당한 용리 시간의 단축이 관찰되었다(도 3a, 도 3b). 유사하게, AVP07-17 및 AVP07-63은 또한 겔 여과에서 용리 시간을 상당히 단축시킴으로써 증명된 것과 같은 항원과 함께 복합체 형성을 나타내었다(도 3c, 도 3d). 다이아바디가 무관한 항원과 함께 인큐베이션될 때 또는 관련없는 항원이 다이아바디와 함께 인큐베이션될 때 복합체 형성은 관찰되지 않았다. 이 결과는 시스테인 치환 돌연변이가 그것의 항원에 다이아바디의 결합을 없애지 않는다는 것을 제안한다.

[0721] 실시예 6 - 시스테인 치환 돌연변이를 가지는 다이아바디 내 유리 설프하이드릴의 정량화

[0722] VL 프레임워크에서 시스테인 치환 돌연변이가 선택적 환원에 이용가능한지 여부를 결정하기 위하여, 티올화된 다이아바디(AVP04-50)를 엘만 시약을 사용하여 정량화한 TCEP 및 환원성 티올과 함께 환원시켰다. VL 프레임워크 1(예를 들어, AVP04-07)에서 시스테인 치환 돌연변이를 함유하지 않는 무결합 IgG 및 다이아바디를 표준 대조군으로서 사용하였다. 실시예 1에서 약술한 반응 조건 하에서, 천연 및 무결합 IgG는 환원을 위해 이용가능한 8개의 반응성 티올을 가지며, AVP04-07와 같은 다이아바디는 유리 반응성 티올을 가지지 않는다. 이 조건 하에서, 가변 경쇄에서 변하지 않는 카바트 위치 23 및 88과 가변 중쇄의 카바트 위치 22 및 92 사이의 이황화 결합을 형성하는 보존적 시스테인은 반응성이 없고 컨주게이션을 위해 이용가능하지 않다.

[0723] 유리 설프하이드릴 정량화는 시스테인 치환 돌연변이를 함유하지 않는 무결합 IgG 및 다이아바디 대조군의 각각 8 및 0에서 정확한 시스테인 번호는 반응성이라는 것을 나타내었다(표 2). AVP04-50에서, 2개의 동일한 모노머 쇄로 이루어진 다이아바디는 각각 VL 프레임워크 1에서 2개의 시스테인 치환 돌연변이를 가지며, 평균 4개의 시스테인이 TCEP에 의한 환원에 자유롭게 접근가능하고, 적어도 4개의 유리 및 반응성 티올을 형성한다(표 2). 데이터는 대표적인 3개의 개별 실험을 나타낸다.

표 2

[0724]

물 흡광도에 의한 AVP04-50 상의 반응성 티올의 정량화					
다이아바디	단백질 [mg/ml]	단백질 [mol/L]	OD412nm (cm)	[S-H] mol/L	[S-H]/[단백질]
IgG	1.9	1.32E-05	0.16+/-0.01	1.3E-04	8
AVP04-50	2.5	4.5E-05	0.28+/-0.01	2.2E-04	4

대조군 다이아바디	3.24	5.9E-05	0.03+/-0.01	2.4E-04	0
--------------	------	---------	-------------	---------	---

[0725] **실시예 7 - 반응성 티올에 컨쥬게이션 후 다이아바디의 시험관내 면역반응성 평가**

[0726] VL 프레임워크 1에서 시스템인 치환 돌연변이에 대해 작은 페이로드를 부착하는 것이 다이아바디의 결합 활성을 없애지 않는다는 것을 증명하는 것은 중요하다. 이것의 마지막에, 다이아바디는 환원 조건을 받은 다음, 실시예 1에서 약술한 바와 같이 티올-특이적 유로폼 표지를 사용하였다. 컬럼 이동에 의한 컨쥬게이션 후 면역반응성을 평가하였다.

[0727] AVP04-50의 VL 프레임워크 1의 시스템인 치환 돌연변이를 유로폼이 부착된 DTPA 킬레이트로 표지한 후 실시예 1에서 약술한 바와 같이 면역반응성을 분석하였다. 유로폼-AVP04-50은(TAG72을 함유하는) 그것의 항원 BSM과 함께 복합체를 형성할 수 있는 것으로 나타났고, Superdex(등록상표) 200 10/300 컬럼 상의 겔 여과 크로마토그래피에서 단백질 용리 시간의 단축을 증명하였다. 용리 시간은 대략 27분으로부터(Eu-AVP04-50)(도 4) 대략 14분(Eu-AVP04-50-TAG72 복합체)(도 4)로 단축되었다.

[0728] 이 결과는 작은 페이로드가 결합 활성 및 그것의 항원에 대한 특이성을 없애지 않고 시스템인 치환 돌연변이를 통해 다이아바디에 컨쥬게이트될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0729] **실시예 8 - 반응성 티올에 PEG에 PEG의 컨쥬게이션 후 다이아바디의 시험관내 면역활성 평가**

[0730] 시스템인 치환 돌연변이를 함유하는 다이아바디가 발견되고, 정제될 수 있다는 것을 나타내었고, 그것의 천연 상태에서 면역반응성이 되는 것을 나타내었고 또는 시스템인 치환 돌연변이가 선택적으로 환원되고 작은 페이로드에 컨쥬게이트되었을 때, PEG와 같은 생체내 반감기 연장자들이 면역반응성을 없애지 않고 반응성 시스템인 치환 돌연변이에 특이적으로 컨쥬게이트될 수 있다는 것을 나타내는 것은 중요하다. 이것의 마지막에, 헤테로이 작용성, 일분산된 PEG는 상기 약술하고 실시예 1에서와 같은 시스템인 치환 돌연변이를 통해 AVP04-50(서열 번호: 155)에 특이적으로 컨쥬게이트된 자리이다. 폐결화된 단백질(AVP04-50-PEG2000)을 비 환원성 SDS-PAGE에서 분해하였고(도 5a), 10 kDa의 분자량에서 평균 이동을 AVP04-50 모노머 쉐마다 관찰하였다. 분자량의 이런 이동을 또한 Superdex(등록상표) 200 10/300 컬럼 상의 겔 여과 크로마토그래피에서 단백질 용리 시간의 변화에 의해 확인하였다. 실시예 1에서 약술한 겔 여과 조건 하에서, 그것의 천연 상태에서 AVP04-50을 대략 30분에 이 컬럼으로부터 용리하였다. PEG가 AVP04-50에 자리 특이적으로 컨쥬게이트될 때, 주된 아이소타이프의 용리 시간은 대략 24분으로 상당히 단축되었고(도 5b), 명백한 분자량의 증가를 나타내며 따라서 다이아바디는 성공적으로 폐결화되었다.

[0731] AVP04-50-PEG2000이 여전히 항원에 결합할 수 있다는 것을 확인하기 위하여, 컬럼 이동 결합 분석을 실시예 1에서 약술한 바와 같이 수행하였다. 표준 조건 하에서, AVP04-50-PEG2000은 대략 24분에 Superdex(등록상표) 200 10/300로부터 용리되었다(도 5c 점선). AVP04-50-PEG2000은 그것의 항원 BSM(TAG72를 함유)과 복합체화되며, 280nm에서 흡광도를 추적함으로써 15분으로 용리시간의 단축이 관찰되었고, AVP04-50-PEG2000/TAG72 복합체 형성을 명백하게 나타내었다(도 5c).

[0732] 이것과 함께, 이 데이터는 항원에 결합을 없애지 않고 시스템인 치환 돌연변이에 대해 AVP04-50을 자리 특이적으로 결합할 수 있다는 것을 제안한다. 이 데이터는 또한 항원에 결합을 없애지 않고 티올화된 다이아바디에 큰 화합물을 컨쥬게이트할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0733] **실시예 9 - 분자 모델링**

[0734] **9.1 Avibody에 대한 분자 모델의 생성**

[0735] Avibody는 다양한 항체 도메인을 포함하는 재조합 단백질이다. Avibody는 그것들을 V_H-내지-V_L 또는 V_L-또는-V_H 배향 중 하나에서 짧은 링커 영역에 의해 배치된 단일 폴리펩티드 쉐에 융합함으로써 단클론성 항체의 가변 도메인을 이용한다. 링커 길이에 의존하여, 이 Avibody는 각각 1, 2, 3 또는 4개의 작용 결합 자리를 함유하는 안정하고, 생물학적으로 활성인 모노바디(scFv), 다이아바디, 트라이아바디 또는 테트라바디를 형성하도록 설계된다.

[0736] BLAST 및/또는 FASTA 검색 둘 다를 사용하여 RCSB PDB 데이터 뱅크(www.pdb.org)를 검색하기 위해 모델링된 Avibody의 V_H 및 V_L 도메인 서열을 사용하였다. 가장 높은 서열 동일성, 분해능 및 완성도를 가지는 구조 히트를

모델링한 Avibody의 Fv 도메인에 대한 주형으로서 사용하기 위해 선택하였다. pdb 파일 내 비대칭 단위가 하나 이상의 주형 모델을 함유한다면, 모든 주형은 동일하게 사용되고 처리된다.

- [0737] Avibody 다이아바디 및 트라이아바디에 대해 4가 주형을 사용하여 공간 내 주형 Fv의 배열을 설정하였고, 이 Avibody를 모델링하였다. 다이아바디에 대해 1LMK(Perisic et. al., 1994) 또는 1MOE(Carmichael et. al., 2003)을 다양하게 사용하였고, 트라이아바디 1NQB(Pei et. al., 1997)에 대해 모델링을 위한 4차원 공간에서 주형을 배열하기 위해 사용하였다.
- [0738] 4차 배열을 위해, Fv 도메인(Gelfand et. al., 1998a)에 대해 Israel Gelfand에 의해 생성된 코어 배위물의 복제물은 "코어" 호모-다이머 또는 호모-트라이머를 형성하기 위한 4차 주형으로 배열된 최소 체적이다. 이 정보들을 다양한 Avibody의 모델링에 필요한 연결성을 반영하기 위해 편집하였다.
- [0739] 모든 경우에, "코어" 4차 모델은 최종 모델링 실행에서 Fv 도메인 모델링을 위해 사용하지 않았고, 연결 잔기를 루프로서 "처음부터" 모델링하였다.
- [0740] 소프트웨어에 임베딩된 MODELLER 알고리즘(Sali and Blundell, 1993)을 사용하는 Discovery Studio(DS) 소프트웨어(미국 캘리포니아주에 소재한 v2.5, Accelrys)을 사용하여 Avibody의 분자 모델을 만들었고, 소프트웨어에 함유된 스코어링 기능을 사용하여 평가하였다. 전체 및 생리적 에너지에 대해 MODELLER 생성된 확률 밀도 함수(Probability Density Function : PDF) 및 개별 최적화된 단백질 에너지(Discrete Optimized Protein Energy : DOPE) 스코어의 존재를 기반으로 최상의 모델을 선택하였다(Shen et. al., 2006). 선택한 모델을 추가 분석을 위해 pdb 파일로 작성하였다. 결과된 모델의 이미지를 또한 DS를 사용하여 만들었다.
- [0741] 각각의 선택 모델의 추가 분석은 그래픽스 워크스테이션(graphics workstation) 및 돌연변이된 잔기의 용매 접근가능 표면적(accessible surface area : ASA)의 계산의 시작적 조사를 포함한다.
- [0742] ASA를 컨주게이션에 이용가능하게 되는 모델링된 이황화물 돌연변이체의 능력의 평가로서 본 명세서에 사용하였다. 각각의 구성체에 대해, 10개의 모델을 만들었고, 각각의 모델링된 V 도메인에서 각 돌연변이된 잔기에 대해 평균 ASA를 결정한 다음, 표준 편차를 계산하였다. 이 분석에서, 큰 표준 편차는 특정 잔기의 표면 노출이 모델링된 이황화물의 가변성을 나타내는 모델에 의존하여 다르며, 따라서 잠재적으로 환원 및/또는 컨주게이션에 덜 접근가능하다는 것을 나타낸다.
- [0743] 각 선택 모델의 추가 분석이 또한 포함되며, 각 구성체의 각 V 도메인에 대해, 비돌연변이 및 돌연변이된, 상기 설명한 최상의 천연 모델의 V 도메인 내 Kabat 지정 프레임워크 잔기와 모델링한 모든 다른 V 도메인의 V 도메인 내 Kabat 지정 프레임워크 잔기 사이의 평균 RMSD(Yasara)를 계산하였다. 또한 각 구성체에 대해 표준 편차를 계산하였고, 본 명세서는 첫째로 천연 V 도메인 프레임워크 영역 사이; 두번째로 천연 V 도메인 프레임워크 영역과 돌연변이된 V 도메인 프레임워크 영역 사이의 구조적 가변성을 나타낸다. 이 분석은 돌연변이체 RMSD 값을 특정 구성체에 대한 비돌연변이 RMSD 값과 비교할 때 티올 돌연변이의 구조적 영향의 표시를 제공한다.
- [0744] 9.2 AVP04-07 다이아바디에 대해 VH 내지 VL 연결된 분자 모델의 생성
- [0745] AVP04-07 Avibody(서열 번호: 59)는 이론적 pI/Mw: 8.0 / 51 kDa, VLκ 경쇄 및 서브그룹 I VH 쇄를 가지는 재조합 다이아바디이다. AVP04-07은 중앙 결합 항원 TAG72를 인식한다. 이 항체의 변형된 형태는 본 명세서에서 AVP04-xx로서 언급되는데, 이 때 "xx"는 다른 형태의 Avibody를 지정하는 번호이다.
- [0746] 이 Avibody는 2개의 작용성 결합 자리를 함유하는 안정하고, 생물학적으로 활성인 다이아바디를 형성하기 위해 서열 내에서 그것들을 융합하는 무린 단클론성 항체 CC49의 가변 영역을 이용한다. CC49의 가변 도메인은 예외적인 시험관내 및 생체내 특성을 가지는 고발현 및 매우 안정한 재조합 분자를 이루기 위하여 아미노산 서열 내에서 변형된다(Roberge, et al, 2006).
- [0747] AVP04-07의 VH 및 VL 도메인 서열을 가지는 PDB의 검색은 PDB에서 하나의 항체, 1ZA6(Larson et al., 2005)를 강조하였는데, 이는 틸이 없는 배열에서 VH와 VL 도메인 둘 다에서 AVP04-07과 82% 동일성 매치를 가진다.
- [0748] 1ZA6 주형은 항 종양 CH2-도메인-결실 인간화된 항체의 구조를 암호화한다. 이 재조합 인간화되니 항체는 또한 TAG72 항원을 인식한다.
- [0749] 1ZA6 pdb 파일 내 Fv 구조를 AVP04-07 다이아바디의 Fv 도메인을 모델링하기 위하여 사용하였다. 상기 설명한 1LMK를 주형의 4차원 공간적 배열을 위해 사용하여 상기 설명한 방법으로 AVP04-07 다이아바디를 형성하였다. AVP04-07 다이아바디의 선택된 가장 높은 스코어링 모델을 티올 돌연변이를 위해 표적화된 위치로(섹션 9.6) 도

7에서 나타내며, 이 Avibody 다이머의 "비돌연변이된" 입체배치를 나타낸다.

[0750] 9.3 AVP07-17 다이아바디에 대한 V_H 내지 V_L 연결 분자 모델의 생성

[0751] AVP07-17 Avibody(서열 번호: 61)는 이론적 6.4 / 55 kDa, 예외적으로 긴 CDRH3 루프 V_L 경쇄 및 서브그룹 I V_H 쇄를 가지는 재조합 다이아바디이다. AVP07-17은 중앙 결합 항원 HER2를 인식한다. 이 Avibody의 변형된 형태를 본 명세서에서 AVP07-xx로서 언급하며, 이때 "xx"는 Avibody의 상이한 형태를 지정하는 수이다.

[0752] AVP04-07과 비교하여 표준 FASTA 및 BLAST 검색 사용할 때 AVP07-17은 RCSB pdb에서 이용가능한 구조와 낮은 동일성을 가진다. AVP04-07에 대해 얻은 결과와 비교할 때 V_L 및 V_H 의 Fv 쌍은 AVP07-17과 높은 동일성을 나타내지 않았다.

[0753] PDB의 대안적인 검색 방법은 전체 Fv 도메인에 대한 주형 선택을 개선시키기 위하여 시험하였다. MATRAS 서버(Kawabata 2003, Kawabata, et. al. 2000)는 주형 선택을 보조하기 위하여 배열된 영역의 그래프 표현과 함께 BLAST 프로그램을 사용하여 현재의 PDB에 대한 표준 서열 상동성 검색을 사용한다. 이 방법은 2개의 양호한 주형을 나타내었고, 둘 다 V_L 및 V_H 도메인에서 64% 초과 서열 동일성을 가진다.

[0754] 선택한 Fv 주형은 a) 링커 잔기 및 CDRH3를 제외하고 AVP07-17과 80.6% 동일성을 가지는 2B1H(Stanfield et. al., 2006) 및 b) 링커 잔기 및 CDRH3를 제외하고 AVP07-17과 73.5% 동일성을 가지는 3G04(Sanders et. al., 2007)의 pdb 파일에 함유되었다.

[0755] 상기 설명한 1LMK 다이아바디를 주형 Fvs의 4차원 공간적 배치를 위해 사용하여 상기 설명한 방법으로 AVP07-17("비돌연변이") 다이아바디를 형성하였다. 상동성 구조가 주형으로서 사용에서 발견되지 않았기 때문에 AVP07-17의 긴 CDRH3 루프 길이는 또한 모델링에 문제가 있다. 이것을 주형 제약이 없는 루프로서 모델링하였고(필수적으로 처음에), 모델링 후 구조적 방해에 대해 평가하였다. 본 명세서에서 나타낸 모든 경우에, CDR3 루프를 낮은 신뢰도 수준으로 모델링하고, 그것들이 전반적인 구조 또는 Avibody의 프레임워크 영역에 영향을 미치지 않는 것으로 고려되기 때문에 일부 분석에 포함시키지 않는다.

[0756] AVP07-17 다이아바디의 선택한 가장 높은 스코어링 모델은 티올 돌연변이(섹션 9.6)에 대해 표적화된 위치로 도 8에서 나타내며, 이 Avibody 다이머에 대해 "비돌연변이된" 입체배치를 나타낸다.

[0757] 9.4 AVP02-60 다이아바디에 대한 분자 모델의 생성

[0758] AVP02-60 Avibody(서열 번호: 63)는 이론적 pI/Mw: 8.47 / 50.1 kDa, V_L 쇄 카파 및 서브그룹 III V_H 쇄를 가지는 재조합 다이아바디이다. 그것은 MUC1 유전자, CD227(Gendler et. al., 1990)에 의해 암호화되는 유방암 결합 뮤신을 인식하는 1차 마우스 단클론성 C595 항체를 기반으로 한다. 그것은 뮤신의 단백질 코어 내 에피토프 RPAP, 즉 서열 내에서 약 40회 반복된 모티프를 인식한다. 이 Avibody의 변형된 형태를 본 명세서에서 AVP02-xx로서 언급하며, 이때 "xx"는 Avibody의 상이한 형태를 지정하는 수이다.

[0759] V_L 및 V_H 에 의한 BLAST 및 FASTA 검색은 V_L 및 V_H 도메인을 둘 다 함유한 높은 동일성 스코어를 가지는 몇몇 주형을 나타낸다. 그러나 하나의 주형만이 CDRH3를 모델링 하기 위해 서열 내에서 충분한 동일성 및 길이를 가지는 V_H 를 가진다. 선택된 주형은 a) 1MHP V_H 및 V_L (86.9% 동일성, 89.6% 상동성; Karpusas, et. al., 2003), b) 2B2X VH 및 VL (85.7% 동일성, 88.3% 상동성; Clark, et. al., 2006) 및 c) 2ADG VH :(86.8% 동일성, 96.5% 상동성; Zhou et. al., 2005)이며, 이것은 CDRH3에 대해 틸이 없는 배치를 가지는 주형만을 가지며, 이 Fv의 V_L 도메인은 모델링에 사용되지 않았다.

[0760] 전반적으로 주형 및 AVP02-60은 88.4% 동일성 및 91.1% 상동성을 가진다. 상기 설명한 1LMK 다이아바디를 주형 Fv의 4차원 공간적 배치를 위해 사용하여 상기 설명한 방법에서 AVP02-60("비돌연변이") 다이아바디를 형성한다.

[0761] AVP02-60 다이아바디의 선택된 가장 높은 스코어링 모델을 티올 돌연변이(섹션 9.6)를 위해 표적화된 위치를 가지는 도 9에서 나타내었고, 이 Avibody 다이머의 "비돌연변이된" 입체배치를 나타낸다.

[0762] 9.5 유전자 조작 치환 시스테인 돌연변이 및 그것의 분자 모델링을 위한 프레임워크 2 및 3 이황화물 삽입 위치의 확인

[0763] 항체의 V_L 및 V_H 도메인은 전형적인 위상(topology) 및 연결성을 가지는 2개의 시트에서 7-10개의 β 가닥을 고

전적으로 함유하는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 첫 번째 구성원이다. 이 도메인은 도메인 축 내에서 β -시트의 대칭을 나타내는 V-형 면역글로불린의 두 번째 구성원이다(Halaby, et. al., 1999). 항체 V-형 또는 V-세트 도메인은 SCOP(<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.c.b.b.html>, Murzin, et. al., 1995), InterPro(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR013106>, Hunter et. al., 2009) 및 Pfam(<http://pfam.sbc.su.se/family/PF07686>, Bateman, et. al., 2004)과 같은 온라인 데이터베이스 내 $V_H(1-4)$ 형), $V_L\kappa$ 및 $V_L\lambda$ 도메인으로 분할된다.

- [0764] $V_H(1-4)$ 형), $V_L\kappa$ 과 $V_L\lambda$ 도메인 사이에 잘 정의된 구조적 유사성이 존재한다. 이 알려지고 허용된 구조적 유사성에 기인하여, 임의의 V_L 도메인에서 확인되는 프레임워크 내 시스테인 치환 돌연변이의 대다수가 또한 임의의 다른 V_H 도메인 내 동일한 구조적 위치로 변형될 수 있어야한다는 것을 가정하는 것은 타당하다. 이 가정은 V_L 에서 동일한 위치에 대해 높은 신뢰도로 구조적으로 매칭될 수 없는 FR3 V_H 에서 하나의 주목할 만한 예외와 함께 이하에서 참인 것으로 나타난다(이하의 모델링 돌연변이 c9를 참조).
- [0765] 유전자 조작된 시스테인 치환에 대한 바람직한 잔기를 AVP04-07 다이아바디의 V_L 도메인의 시각적 조사에 의해 선택하였다. 바람직한 잔기가 그것들이 서로에 대해 일반적으로 곁어진 측쇄를 가지는 것을 포함하는 특정 구조적 필요를 충족시키는지 여부를 확인하였고, 측쇄 원자는 일반적으로 용매에 노출되며, 대략 6-7Å의 C α 탄소 원자의 거리를 가진다. 이러한 기준을 충족시키는 유전자 조작된 시스테인 치환을 제어된 환원 상태에서 선택적으로 파괴될 수 있는 프레임워크 내 이황화 브릿지를 형성하기 위하여 돌연변이를 위한 양호한 후보자로 고려하였고, 페이로드를 컨주게이트하기 위하여 사용하였다. 인실리코에서 이 위치를 다음에 동일한 Fv의 V_H 도메인에 최소 제공법에 의해 전달하였고, 이 도메인을 임의의 추가적인 퍼텐셜 자리에 대해 조사하였다.
- [0766] AVP04-07 V_L 및 V_H 도메인에서 모든 확인한 자리는 다음으로 최소 제공법 배치 및 그것의 모델링에 의해 AVP02-xx 및 AVP07-xx 구성원에 전달될 수 있다.
- [0767] 면역글로불린 V 도메인의 구조에서 프레임워크 2(FR2)는 유전자 조작 시스테인 치환에 대한 후보자이다. FR2는 V_L 잔기 35 내지 49 포함 및 V_H 잔기 36 내지 49 포함으로서 Kabat에 의해 정의된다. 그것은 CDR1로부터 루프/턴(turn)으로 연장하고, 다시 CDR2로 연장하는 면역글로불린 β -시트의 C 및 C' 가닥을 포함한다. C 가닥은 CDC'FG 시트의 부분이며, C'와 F 가닥 둘 다와 상호작용한다. C' 가닥은 시트의 가장자리에 있고, Kabat CDR3 및 FR4의 C-말단 부분이 묻힌 반대 도메인과 상호작용을 통해 Fv의 V_H 과 V_L 도메인 사이의 상호작용과 부분적으로 관련된다.
- [0768] 2개의 위치를 V_L 도메인 내 유전자 조작 시스테인 치환을 위한 후보자로서 확인하였다. 이 위치는 Kabat 잔기 L38-L44(모델링 돌연변이 c5로서 표지) 및 L38-L42(모델링 돌연변이 c6로서 표지)이었다.
- [0769] 항체 V_H 과 V_L 도메인 사이의 구조적 유사성이 알려지고 허용되었기 때문에, V_L 의 유전자 조작 시스테인 치환을 위한 후보자는 V_H 도메인에서 동일한 구조적 위치로 동일하게 맵핑될 수 있었다. V_H 에서 모델링 돌연변이 c5 및 모델링 돌연변이 c6의 구조적 상동성은 Kabat 잔기 H39-H45(모델링 돌연변이 c5) 및 H39-H43(모델링 돌연변이 c6)이었다.
- [0770] 면역글로불린 V의 구조에서 프레임워크 3(FR3)은 또한 유전자 조작 시스테인 치환에 대한 양호한 후보자이다. FR3은 V_L 잔기 57 내지 88 포함 및 V_H 잔기 66 내지 94 포함으로서 Kabat에 의해 정의된다. 그것은 C", D, E 및 F 가닥 및 그것의 연결 루프/턴을 포함한다. FR3 내에서, V_L 의 Kabat 위치 63-74 및 V_H 의 Kabat 위치 68-81의 영역을 유전자 조작 시스테인 치환에 대한 양호한 영역으로서 확인하였다. 각 영역 내 2개의 위치를 유전자 조작 시스테인 치환을 위한 양호한 후보자로서 확인하였다. 이 후보자는 V_H Kabat 잔기 H70-L79(모델링 돌연변이 c8로서 표지) 및 H72-H75(모델링 돌연변이 c9로서 표지)이었다. 상기 약속한 바와 같이, 항체의 V_H 와 V_L 사이의 구조적 유사성에 기인하여 FR3 영역 내 모델링 돌연변이 c8은 잔기 L65-L72에서 V_L 도메인의 동일한 구조적 위치로 용이하게 맵핑될 수 있다. 대조적으로, 모델링 돌연변이 c9(즉, Kabat 잔기 V_H H72-H75)에 대한 구조적 상동성은 V_L 도메인에서 존재하지 않는데, 이 루프가 V_H 도메인 내에서 크게 보존적이지 않더라도, V_L 도메인 루프는 더 짧은 2개의 잔기이며 따라서 모델링 돌연변이 c9는 V_L 도메인에 이황화물의 도입을 위한 불량한 표적

이기 때문이다.

- [0771] 유전자 조작 시스템인 치환을 위한 후보자를 평가하는 것에서, 관심의 특정 자리는 FR3 Kabat 잔기 H82C-H86/L78-L82(labeled as 모델링 돌연변이 c4로서 표지됨)이었다. 이 잔기는 상대적으로 낮은 용매 노출을 제외하고, 모두 유전자 조작 시스템인 치환을 위한 구조적 필요를 충족시킨다. 모델링한 돌연변이된 잔기는 심지어 더 낮은 접근가능한 표면적일 때 조차도 나타난다. 모델링 돌연변이 c4(Kabat L78-L82, AVP04-83, 서열 번호: 105 및 Kabat H82C-H86, AVP04-114, 서열 번호: 111)을 함유하는 돌연변이체를 설계하고, 발현시키고, 시험하였고, 유전자 조작 시스템인 치환의 도입이 안정성 및/또는 면역반응성을 없애지 않았지만, 후속의 제어된 이황화 결합 환원 및 페이로드 컨쥬게이션은 높은 접근가능한 표면적에 의존한다는 것을 증명하기 위하여 사용하였다.
- [0772] 유전자 조작된 시스템인 치환을 함유하는 모든 Avibody를 본 명세서에서 "Thiolated" Avibody로서 언급한다.
- [0773] 9.6 AVP04-xx Avibody 다이아바디에서 유전자 조작 시스템인 치환 돌연변이 및 분자 모델링에 대해 확인한 프레임워크 2 및 프레임워크 3 시스템인 삽입 위치
- [0774] 비돌연변이된 AVP04-07 모델은 프레임워크 내에서 이황화 결합을 형성할 수 있는 상기 설명한 프레임워크 2(FR2) 및 프레임워크 3(FR3) 유전자 조작된 시스템인 치환을 맵핑하기 위한 출발 지점이었다. 확인한 위치는 천연 AVP04-07 다이아바디 모델 상에서 도 7로 나타난다.
- [0775] 프레임워크 2 유전자 조작된 시스템인 치환을 위한 예시적인 위치를 다음과 같이 확인하였다:
- [0776] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 101)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6로서 언급되는 AVP04-79 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 100).
- [0777] ● Kabat 잔기 L38 및 L44(서열 번호: 103)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP04-80 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 102).
- [0778] ● Kabat 잔기 H39 및 H43(서열 번호: 107)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6로서 언급되는 AVP04-111 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 106).
- [0779] ● Kabat 잔기 H39 및 H45(서열 번호: 109)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP04-112 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 108).
- [0780] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 119)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6로서 언급되는 AVP04-124 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 118).
- [0781] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 121)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6로서 언급되는 AVP04-125 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 120).
- [0782] 프레임워크 3 유전자 조작된 시스템인 치환을 위한 예시적인 위치를 다음과 같이 확인하였다:
- [0783] ● Kabat 잔기 H70 및 H79(서열 번호: 113)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c8로서 언급되는 AVP04-120 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 112).
- [0784] ● Kabat 잔기 L65 및 L72(서열 번호: 117)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c8로서 언급되는 AVP04-123 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 116).
- [0785] ● Kabat 잔기 H72 및 H75(서열 번호: 115)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c9로서 언급되는 AVP04-121 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 114).
- [0786] 상기 약술한 바와 같이, 유전자 조작된 시스템인 치환에 대한 H72-H75 후보자(모델링 돌연변이 c9)는 D와 E 가닥 사이의 루프/턴에서 생긴다. 이 루프가 V_H 도메인 내에서 매우 보존적이지만, V_L 도메인 루프는 2개의 더 짧은 잔기이며, 따라서 V_L 도메인 내 동일한 구조적 위치는 유전자 조작된 시스템인 치환에 대한 불량한 표적을 나타낸다. 이것은 단지, V_L 도메인 내 유전자 조작된 시스템인 치환의 맵핑이 V_H 도메인 내 동일한 구조적 위치로 용이하게 맵핑될 수 있다는 본 명세서의 언급에 대한 예외로 확인되었다.
- [0787] 상기 돌연변이체의 모델링을 상기 원하는 돌연변이를 반영한 이황화 결합의 서열 입력 및 지정을 제외하고 동일한 입력 변수를 사용하는 AVP04-07 모델(실시예 9.2)에 대해 약술한 방법을 사용하여 반복하였다. 모델 평가를 또한 AVP04-07 모델에서와 같이 수행하였다. 각각의 후보자 유전자 조작 시스템인 치환은 각 모델링 실행에 포

함된 하나의 V_L 시스템 쌍 돌연변이체 및 그것의 유사한 V_H 시스템 쌍 돌연변이체로 모델링을 받도록 하였다. AVP04-07 FR2/FR3 구조 상 시스템 치환 모델링의 결과는 도 10a-b에서 나타낸다. 도 10a-b는 시스템 치환 사이의 프레임워크 내 이황화 결합이 인실리코로 규정될 때조차, 유전자 조작된 FR2/FR3 시스템 돌연변이의 근처에서 구조적 변화가 거의 없다는 것을 나타낸다.

- [0788] 제어된 환원 및 후속하는 페이로드에 대한 컨주게이션을 위해 이용가능한 돌연변이 가능한 잔기 쌍을 한정할 목적으로, 후보자 시스템 치환 쌍은 "표면이 노출"되어야 하고 따라서 용매에 노출되는 것으로 가정하였다. 후보자 시스템 치환을 위한 용매 접근가능 표면적(ASA) 값을 상기 산출한 모델로부터 계산하였다(도 11). 도 11에서 각 개개의 후보자 시스템 치환에 대한 ASA 값을 V_H-V_L 배향의 AVP04-xx(-xx는 문제의 클론 번호를 나타낸다) 다이아바디(각 시리즈에서 제1 컬럼), a-1 잔기 링커를 가지는 V_H-V_L 배향에서 AVP04-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제2 컬럼), 0-잔기 링커를 가지는 V_H-V_L 배향에서 AVP04-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제3 컬럼), 1LMK 다이아바디 상에서 모델링된 Fv 공간 배향을 가지는 V_L-V_H 배향 내 AVP04-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제4 컬럼), 1MOE 다이아바디에서 모델링된 Fv 공간 배향을 가지는 V_L-V_H 배향 내 AVP04-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제5 컬럼), 1 잔기 링커를 가지는 V_L-V_H 배향의 AVP04-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제6 컬럼) 및 2 잔기 링커를 가지는 V_L-V_H 배향에서 AVP04-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제7 및 마지막 컬럼)의 모델에 대해 플롯팅하였다. c6에 의해 지정된 모델링 돌연변이는 H39-H43 및 L38-L42 이황화물 돌연변이 및 유사하게 c5 H39-H45/L38-L44, c8 H70-H79/L65-L72, c9 H72-H75 및 c4 H82C-H86/L78-L82를 함유한다. 예러바는 다이아바디에 대해 $n = 20$ 및 트라이아바디에 대해 $n = 30$ 을 가지는 ASA 값의 표준 편차를 나타낸다.
- [0789] 모든 경우에, 후보자 시스템 치환 쌍에 대한 ASA 값은 크게 보존되고, 아직 구조적으로 묻혀 있는 시스템 쌍 H22-H92 및 L23-L88의 ASA 값보다 상당히 더 크며, 평균 0.025의 ASA 값이 된다. 사실 후보자 시스템 치환 쌍의 ASA 값은 구조적으로 노출된 CDR 잔기의 ASA 값과 더 유사하다.
- [0790] 구조적 위치결정의 바람직함 및 제어된 이황화 결합 환원에 대한 용매의 "표면" 노출 및 페이로드 컨주게이션을 증명하기 위하여, 여분의 FR3 후보자 시스템 치환 삽입을 포함하도록 결정되었다. 이 후보자는 하기와 같다:
- [0791] ● Kabat 잔기 L78 및 L82(서열 번호: 105)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c4로서 언급되는 AVP04-83 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 104).
- [0792] ● Kabat 잔기 H82C 및 H86(서열 번호: 111)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c4로서 언급되는 AVP04-114 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 110).
- [0793] 모델링 돌연변이 c4를 함유하는 돌연변이체는 유전자 조작 시스템 치환에 대해 모든 구조적 필요조건을 충족시키지만, 돌연변이된 잔기는 매우 낮은 접근가능한 표면적을 나타내었다(도 11을 참조한다). 모델링 돌연변이 c4를 함유하는 돌연변이체를 사용하여 유전자 조작된 시스템 치환의 도입이 안정성 및 면역반응성을 없애지 않는다는 것을 증명하였지만, 잔기가 용매에 "표면 노출"되며; 특징은 모델링 돌연변이 c4의 돌연변이체를 결여하는 이후의 제어된 이황화 결합 환원 및 페이로드 컨주게이션은 바람직하다.
- [0794] 9.7 AVP02-xx 및 AVP07-xx Avibody 다이아바디에서 유전자 조작 시스템 치환 돌연변이 및 분자 모델링에 대해 확인한 프레임워크 2 및 3 시스템 삽입 위치.
- [0795] 항체 구성원을 교차시키는 $V_H(1-4\text{형})$, $V_L\kappa$, $V_L\lambda$ 도메인 사이의 구조적 유사성은 알려져 있고 허용된다. 이 구조적 유사성 때문에, AVP04-07의 모델로부터 인실리코로 확인한 시스템 삽입 위치는 이 항체의 프레임워크 영역의 최소 제곱 배열에 의해 AVP02-xx 및 AVP07-xx 시스템 삽입 Avibody 모델로 구조적으로 전달되었다.
- [0796] 모든 경우에 상기 논의한 바와 같이, FR2 및 FR3 유전자 조작 시스템 상비과 양립가능한 것으로 확인된 바람직한 위치는 모두 실시예 9.5에서 약속한 중요한 모델링 제약을 충족시킨다.
- [0797] AVP02-xx 프레임워크 2 또는 프레임워크 3 시스템에 바람직한 위치를 이하와 같이 확인하였다:
- [0798] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 123)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6로서 언급되는 AVP04-115 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 122).
- [0799] ● Kabat 잔기 H39 및 H43(서열 번호: 125)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6로서 언급되는 AVP04-116 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 124).

- [0800] ● Kabat 잔기 L38 및 L44(서열 번호: 131)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP04-126 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 130).
- [0801] ● Kabat 잔기 H39 및 H45(서열 번호: 133)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP04-127 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 132).
- [0802] ● Kabat 잔기 L65 및 L72(서열 번호: 135)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c8로서 언급되는 AVP04-128 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 134).
- [0803] ● Kabat 잔기 H70 및 H79(서열 번호: 137)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c8로서 언급되는 AVP04-129 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 136).
- [0804] ● Kabat 잔기 H72 및 H75(서열 번호: 139)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c9로서 언급되는 AVP04-128 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 138).
- [0805] AVP07-xx 프레임워크 2 또는 프레임워크 3 시스템인 삽입에 대한 바람직한 위치를 다음과 같이 확인하였다:
- [0806] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 127)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6으로서 언급되는 AVP04-117 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 126).
- [0807] ● Kabat 잔기 H39 및 H43(서열 번호: 129)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6으로서 언급되는 AVP04-118 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 128).
- [0808] ● Kabat 잔기 L38 및 L44(서열 번호: 141)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP04-131 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 140).
- [0809] ● Kabat 잔기 H39 및 H45(서열 번호: 143)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP04-132 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 142).
- [0810] ● Kabat 잔기 L65 및 L72(서열 번호: 145)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c8로서 언급되는 AVP04-133 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 144).
- [0811] ● Kabat 잔기 H70 및 H79(서열 번호: 147)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c8로서 언급되는 AVP04-134 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 146).
- [0812] ● Kabat 잔기 H72 및 H75(서열 번호: 149)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c9로서 언급되는 AVP04-134 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 148).
- [0813] AVP02-xx 구조 상에 시스템인 삽입 모델링의 결과를 도12a-b에서 나타내고 AVP07-xx 구조 상에 시스템인 삽입 모델링의 결과를 도 13a-b에서 나타낸다.
- [0814] AVP04에 대해 약술한 시스템 위치를 유전자 조작한 후보자에 대해 완료한 것과 같이, AVP02-xx 및 AVP07-xx에서 후보자 시스템 치환에 대한 용매 접근 표면적(ASA) 값을 상기 산출한 모델로부터 계산하였다. 도 14는 AVP02-xx 모델에 대해 계산한 ASA 값을 약술하며, 도 15는 AVP07-xx 모델에 대해 계산한 ASA 값을 약술한다. 도 14와 도 15 둘 다에서, 각 개개의 후보자 시스템 치환에 대한 ASA 값을 V_H-V_L 배향의 AVP02-xx 또는 AVP07-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제1 컬럼), a-1 잔기 링커를 가지는 V_H-V_L 배향에서 AVP02-xx 또는 AVP07-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제2 컬럼), 0-잔기 링커를 가지는 V_H-V_L 배향에서 AVP02-xx 또는 AVP07-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제3 컬럼), 1LMK 다이아바디 상에서 모델링된 Fv 공간 배향을 가지는 V_L-V_H 배향 내 AVP02-xx 또는 AVP07-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제4 컬럼), 1MOE 다이아바디에서 모델링된 Fv 공간 배향을 가지는 V_L-V_H 배향 내 AVP02-xx 또는 AVP07-xx 다이아바디(각 시리즈에서 제5 컬럼), 1 잔기 링커를 가지는 V_L-V_H 배향의 AVP02-xx 또는 AVP07-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제6 컬럼) 및 2 잔기 링커를 가지는 V_L-V_H 배향에서 AVP02-xx 또는 AVP07-xx 트라이아바디(각 시리즈에서 제7 및 마지막 컬럼)의 모델에 대해 플롯팅하였다. c6에 의해 지정된 모델 돌연변이는 H39-H43 및 L38-L42 이황화물 돌연변이 및 유사하게 c5 H39-H45/L38-L44, c8 H70-H79/L65-L72, c9 H72-H75 및 c4 H82C-H86/L78-L82를 함유한다. 에러바는 다이아바디에 대해 $n = 20$ 및 트라이아바디에 대해 $n = 30$ 을 가지는 ASA 값의 표준 편차를 나타낸다. AVP04 모델에서와 같이, 예외는 다시 AVP02-xx와 AVP07-xx 둘 다에서 낮은 ASA 값을 나타낸 모델링 돌연변이 c4(H82C-H86/L78-L82)이었다.

- [0815] 시스템인 위치를 유전자 조작한 후보자의 ASA 값의 유사성은 AVP02-xx, AVP04-xx 및 AVP07-xx의 교차 모델의 위치를 결정하였고, 도 11, 도 14 및 도15에서 보고한 바와 같이 상이한 서열 및 특이성의 항체의 V_H I-IV형, V_L K 및 V_L λ 의 프레임워크 영역에서 알려지고 허용된 구조적 유사성을 지지한다. 이 허용된 구조적 유사성은 차례로 시스템인 위치가 유전자 조작된 각 후보자가 그것이 존재하는 V 도메인 형태와 상관없이 유사한 ASS를 나타낼 가능성이 있다는 것을 제안한다. 이것은 추가로 시스템인 위치가 유전자 조작된 후보자가 상이한 서열 및 특이성의 항체에서 동일한 구조적 위치로 용이하게 전달될 수 있다는 것을 제안한다. 이 알려지고 허용된 유사성 때문에, 본 명세서에서 본 발명자들은 시험관내 유전자 조작된 시스템인 위치가 선택적으로 환원되고 페이로드와 컨주게이트될 수 있는 노출된 용매로 이황화 브릿지를 형성한다는 것을 일반적으로 증명하는 모델로서 티올화된 Avibody의 서브세트를 사용한다.
- [0816] 9.8 구조적 섭동(perturbation) 상의 유전자 조작 시스템인 치환 돌연변이의 효과.
- [0817] AVP02-xx, AVP04-xx 및 AVP07-xx Fv 상에 시스템인 돌연변이가 유전자 조작된 후보자의 모델링은 서로에 대해 일반적으로 곱해진 측세를 가지는 것을 포함하는 구조적 필요조건의 한정된 설정을 고려하며, 측세 원자는 일반적으로 용매에 노출되며, 대략 6-7Å의 C α 탄소 원자의 거리를 가진다. 이 모델을 산출하고 평가하는 것으로부터 예상치 못한 발견은 시스템인 돌연변이로 유전자 조작된 후보자가 표면이 노출된 이황화 브릿지로서 인실리코 모델에 삽입될 때, 야생형(비티올화된) Avibody 구조가 검출되는 것에 대해 구조적 섭동이 거의 없거나 없다는 것이다.
- [0818] 도 16은 Avibody 구성체 모델로부터 천연 및 시스템인 돌연변이된 V 도메인에 대해 루트 평균 제곱 편차(Root Mean Squared Deviations : RMSD)를 나타낸다. RMSD 값을 유전자 조작된 시스템인 이황화물 돌연변이의 인실리코 삽입에 의해 야기된 V 도메인의 섭동을 측정하기 위해 사용하였다. RMSD를 각 구성체 군에 대해 천연 구조를 모델링한 최상의 스코어링에 대하여 V 도메인의 돌연변이된 모델링의 배열에 의해 얻었다. 도 16은 이하와 같이 표지한 14개의 구성체 군을 나타낸다:
- [0819] ● H-VHVD 5: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_H 유전자 조작된 시스템인 치환 쌍을 함유하는 5 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 다이아바디로부터의 V_H 도메인.
- [0820] ● H-VHVT-1: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_H 유전자 조작된 시스템인 치환 쌍을 함유하는 a-1 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 다이아바디로부터의 V_H 도메인.
- [0821] ● H-VHVT-0: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_H 유전자 조작된 시스템인 치환 쌍을 함유하는 0 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 트라이아바디로부터의 V_H 도메인.
- [0822] ● H-VLVHD 1mk5: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_H 유전자 조작된 시스템인 치환 쌍을 함유하는 1LMK 다이아바디 상에 모델링된 Fv 배향 모델과 5 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 다이아바디로부터의 V_H 도메인.
- [0823] ● H-VLVHD moe5: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_H 유전자 조작된 시스템인 치환 쌍을 함유하는 1MOE 다이아바디 상에 모델링된 Fv 배향 모델과 5 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 다이아바디로부터의 V_H 도메인.
- [0824] ● H-VLVHT 1: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_H 유전자 조작된 시스템인 치환 쌍을 함유하는 1 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 트라이아바디로부터의 V_H 도메인.
- [0825] ● H-VLVHT 2: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_H 유전자 조작된 시스템인 치환 쌍을 함유하는 2 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 트라이아바디로부터의 V_H 도메인.
- [0826] ● L-VHVD 5: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_L 유전자 조작된 시스템인 치환 쌍을 함유하는 5 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 다이아바디로부터의 V_L 도메인.
- [0827] ● L-VHVD -1: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_L 유전자 조작된 시스템인 치환 쌍을 함유하는

-1 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 트라이아바디로부터의 V_L 도메인.

- [0828] ● L-VHVL 0: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_L 유전자 조작된 시스테인 치환 쌍을 함유하는 0 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 트라이아바디로부터의 V_L 도메인.
- [0829] ● L-VHVL 1mk5: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_L 유전자 조작된 시스테인 치환 쌍을 함유하는 1LMK 다이아바디 상에 모델링된 Fv 배향 모델과 5 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 다이아바디로부터의 V_L 도메인.
- [0830] ● L-VHVL moe5: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_L 유전자 조작된 시스테인 치환 쌍을 함유하는 1MOE 다이아바디 상에 모델링된 Fv 배향 모델과 5 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 다이아바디로부터의 V_L 도메인.
- [0831] ● L-VLVHT 1: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_L 유전자 조작된 시스테인 치환 쌍을 함유하는 1 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 트라이아바디로부터의 V_L 도메인.
- [0832] ● L-VLVHT 2: 인실리코에서 이황화 결합을 형성하도록 규정된 V_L 유전자 조작된 시스테인 치환 쌍을 함유하는 2 잔기 링커를 가지는 V_H - V_L 배향 내 트라이아바디로부터의 V_L 도메인.
- [0833] 배향의 모든 가능한 Fv 접동, Fv 번호 및 공간적 배향을 다루기 위하여 상기 구성체 군을 모델링하였다. 각 구성체 군에 대해, 최상의 천연(비 티올화된) Avibody 모델을 모든 다른 천연(비 티올화된) Avibody 모델(각 구성체 군에서 제1 컬럼)과 비교하였고, 이후에 모델링 돌연변이 c6(H39-H43/L38-L42, 각 구성체 군에서 제2 바), 모델링 돌연변이 c5(H39-H45/L38-L44, 각 구성체 군에서 제3 바), 모델링 돌연변이 c8(H70-H79/L65-L72, 각 구성체 군에서 제4 바), 모델링 돌연변이 c9(H72-H75, 각 구성체 군에서 제5 바) 및 모델링 돌연변이 c4(H82C-H86/L78-L82, 각 구성체 군에서 제6 및 최종 바)로 산출된 모든 모델과 비교하였다. 에러 바는 다이아바디에 대해 $n = 40$ 및 트라이아바디에 대해 $n = 90$ 을 가지는 RMSD 값에 대한 표준 편차를 나타낸다.
- [0834] 모든 경우에, 천연(비티올화) 모델(각 구성체 군에서 제1 컬럼)과 임의의 티올화된 Avibody 포맷(각 구성체 군에서 컬럼 2-6) 사이의 적절한 구조적 변화는 거의 관찰되지 않았다. 모델링한 모든 항체 서열과 교차하는 모든 구성체 접동에 대해 예상치 못한 낮은 RMSD 값은 임의의 V_H I-IV형, V_L K 및 V_L L에 대한 FR2 및 FR3이 A) 표면 노출된 이황화물의 형성을 위해 유전자 조작된 시스테인 돌연변이의 삽입에 의해 일반적으로 접동되지 않고, B) 이 영역 내 유전자 조작된 시스테인 돌연변이는 상이한 서열, 종 및 특이성의 항체에서 동일한 구조적 위치에 용이하게 전달될 수 있다는 것을 제한한다.
- [0835] 모델링한 모든 항체 서열과 교차하는 모든 구성체 접동에 대해 일반적으로 낮은 RMSD 값 때문에, 본 명세서에서 본 발명자들은 시험관내 유전자 조작된 시스테인 위치가 선택적으로 환원되고 페이로드와 컨주게이트될 수 있는 용매 노출된 이황화 브릿지를 형성한다는 것을 일반적으로 증명하는 모델로서 모든 티올화된 항체의 서브세트를 사용한다.
- [0836] **실시예 10. 항체 구성체의 합성**
- [0837] 10.1 유전자 조작된 프레임워크 내 이황화물 삽입 없이 "비돌연변이된" Avibody의 합성.
- [0838] TAG72에 특이적인 마우스 mAb(서열 번호: 58), HER2에 특이적인 인간 mAb(서열 번호: 60) 및 MUC1에 특이적인 뮤린 mAb(서열 번호: 62)의 V_H 및 V_L 영역을 암호화하는 DNA 구성체를 적절한 제한 자리와 함께 합성하였고 GenScript(미국 뉴저지주에 소재한 Piscataway)에 의해 pUC57에 클로닝하였다. Avibody가 V 영역, 즉 V_H -링커- V_L 및 V_L -링커- V_H (Carmichael et al., 2003)에서 분리되었지만, 본 명세서에서 설명한 모든 구성체를 V_H -링커- V_L 로서 배열하였다.
- [0839] 모든 DNA 조작을 New England Biolabs(미국 매사추세츠주에 소재한 Ipswich)으로부터 구입한 시약으로 표준 프로토콜에 따라서 수행하였다. DNA 구성체를 암호화하는 다이아바디를 적절한 제한 효소에 의해 pUC57로부터 절단하였고, 1%(w/v) 아가로스 겔에서 분해하였고, Qiaquick 겔 추출 키트(Qiagen)를 사용하여 겔로부터 정제하였다. 구성체를 유사하게 제조한 pET22b 발현 벡터에 결합시켰고, 결합 혼합물을 전기천공법에 의해 *E. coli* XL1-Blue 세포로 형질전환시켰다. 미니프렙 DNA를 Qiagen 미니프렙 스핀 키트를 사용하여 형질전환체로부터 추출하

였고, 재조합 클론을 AmpliTaq를 가지는 염료 종결자 사이클 시퀀싱(Dye Terminator Cycle Sequencing)을 사용하는 종결자 프라이머에 의해 확인하였다. V_H -Gly₄Ser- V_L 배향 내 항-TAG72 mAb의 V 영역을 함유하는 클론은 AVP04-07(서열 번호: 58)를 지정하였다. V_H -Gly₄Ser- V_L 배향 내 항-HER2 mAb의 V 영역을 함유하는 클론은 AVP07-17(서열 번호: 60)을 지정하였다. V_H -Gly₄Ser- V_L 배향 내 항-MUC1 mAb의 V 영역을 함유하는 클론은 AVP02-60(서열 번호: 62)을 지정하였다. 이 3개의 클론은 모든 다른 Avibody 돌연변이체 및 티올화된 Avibody가 유래된 염기 모 서열을 형성하였다.

[0840] 이 클로닝 방법은 표적 단백질의 주변 세포질 발현에 대한 아미노 말단 pelB 리더 서열 및 카복시-말단의 (His)₆ 태그 또는 카복시-말단의 Myc+(His)₆ 태그 중 하나의 삽입을 허용하였다.

[0841] 10.2 Avibody 구성체의 서열 변형

[0842] 당업자에게 알려진 표준 분자 생물학 기술을 설명한 DNA 서열에 대한 모든 변형을 위하여 사용하였다. Avibody가 과변이 CDR 영역, 즉 모델링 데이터에 의해 제안된 바와 같이 노출된 표면이 될 가능성이 있는 위치에서 '천연' 시스테인 잔기를 함유하는 경우, 이 잔기들은 다르게는 상기 설명한 바와 같이 본질적으로 자리 지정 돌연변이 유발에 의해 비티올-함유 아미노산으로 돌연변이된다. 예로서, AVP07-xx 구성원; AVP07-17에 대한 모 클론은 2개의 이러한 시스테인 잔기; Cys104(Kabat 넘버링 H100) 및 Cys109(H100E)을 V_H CDR3 영역 내에서 함유하였다. 이 잔기들은 AVP07-86(서열 번호: 64)을 형성하는 돌연변이 유발 프라이머 서열 번호: 90 및 서열 번호: 91을 사용하는 표준 Quikchange(등록상표) 자리 지정 돌연변이를 사용하여 알라닌으로 치환되었다. 모든 AVP07-xx 티올화된 Avibody는 V_H CDR3의 이런 추가 변형을 함유하며, 프레임워크 2 내 또는 프레임워크 3 내 유전자 조작된 시스테인 치환 전략과 양립할 수 있는 AVP07-xx 구성원을 제공한다.

[0843] 티올화된 Avibody는 또한 scFv 또는 트라이아바디의 티올화된 형태를 만들기 위하여 변형된 링커 길이를 가지도록 만들었다. 링커 조성물 및 길이의 변형이 Avibody 멀티머의 형성에 영향을 미칠 수 있다는 것은 항체 분야에서 공개된 문헌으로부터 잘 알려져 있다(Kortt et al. 1997). 정확한 서열을 위해 잔여 잔기를 암호화하고 DNA 결과물 클론을 시퀀싱하는 돌연변이 유발 프라이머를 사용하여 5개 잔기, 전형적으로 GGGGS(서열 번호: 57) 내지 15개, GGGSGGGSGGGGS 또는 20개, GGGSGGGSGGGSGGGGS로부터 모 다이아바디의 링커 길이를 변형시킴으로써 scFv 형성의 촉진을 유전자 조작하였다. 예를 들어 AVP04-124 Avibody(서열 번호: 118)을 암호화하는 핵산은 scFv를 암호화한다.

[0844] 유사하게, 트라이아바디 형성은 링커 잔기의 제거에 의해, 일부 경우에 선행하는 가변 도메인의 최대 2개 잔기의 제거에 의해 조장되었다. 예를 들어, AVP04-125 Avibody(서열 번호: 120)을 암호화하는 핵산은 링커 영역 대신 잔기 'VTVS-DIVM'을 가지는 트라이아바디를 암호화한다. 상기 원하는 서열을 암호화하는 돌연변이 유발 프라이머를 사용하는 결절 돌연변이 유발에 의해 모 AVP04-07로부터 이 클론을 유전자 조작하였다.

[0845] 2.3 자리 지정 돌연변이 유발에 의해 프레임워크 2 내 또는 프레임워크 3 내 유전자 조작된 시스테인 및 N-말단의 세린 치환의 도입.

[0846] 산출한 데이터 모델링을 기반으로, 프레임워크 2 내 또는 프레임워크 3 내 유전자 조작된 시스테인 삽입 돌연변이를 AVP04-xx, AVP07-xx 및 AVP02-xx 구성원의 Avibody 서열에 도입하여 다음의 티올화된 Avibody를 형성하였다:

[0847] AVP04-xx 구성원 주형 서열(TAG72-특이적):

[0848] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 101)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6로서 언급되는 AVP04-79 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 100).

[0849] ● Kabat 잔기 L38 및 L44(서열 번호: 103)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP04-80 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 102).

[0850] ● Kabat 잔기 L78 및 L82(서열 번호: 105)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c4로서 언급되는 AVP04-83 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 104).

[0851] ● Kabat 잔기 H39 및 H43(서열 번호: 107)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6로서 언급되는 AVP04-83 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 106).

[0852] ● Kabat 잔기 H39 및 H45(서열 번호: 109)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌

연변이 번호 c6로서 언급되는 AVP04-112 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 108).

- [0853] ● Kabat 잔기 H82C 및 H86(서열 번호: 111)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c4로서 언급되는 AVP04-114 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 110).
- [0854] ● Kabat 잔기 H70 및 H79(서열 번호: 113)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c8로서 언급되는 AVP04-112 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 112).
- [0855] ● Kabat 잔기 H72 및 H75(서열 번호: 115)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c9로서 언급되는 AVP04-121 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 114).
- [0856] ● Kabat 잔기 L65 및 L72(서열 번호: 117)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c8로서 언급되는 AVP04-123 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 116).
- [0857] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 119)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6으로서 언급되는 AVP04-124 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 118).
- [0858] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 121)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6으로서 언급되는 AVP04-125 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 120).
- [0859] AVP02-xx 구성원 주형 서열(MUC1-특이적):
- [0860] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 123)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6으로서 언급되는 AVP02-115 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 122).
- [0861] ● Kabat 잔기 H39 및 H43(서열 번호: 125)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6으로서 언급되는 AVP02-116 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 124).
- [0862] ● Kabat 잔기 L38 및 L44(서열 번호: 131)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP02-126 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 130).
- [0863] ● Kabat 잔기 H39 및 H45(서열 번호: 133)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP02-127 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 132).
- [0864] AVP07-xx 구성원 주형 서열(HER2-특이적):
- [0865] ● Kabat 잔기 L38 및 L42(서열 번호: 127)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6으로서 언급되는 AVP07-117 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 126).
- [0866] ● Kabat 잔기 H39 및 H43(서열 번호: 129)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c6으로서 언급되는 AVP07-118 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 128).
- [0867] ● Kabat 잔기 H38 및 H44(서열 번호: 141)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP07-131 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 140).
- [0868] ● Kabat 잔기 H39 및 H45(서열 번호: 143)에서 돌연변이된 Avibody를 형성하며, 또한 본 명세서에서 모델링 돌연변이 번호 c5로서 언급되는 AVP07-132 다이아바디 핵산 서열(서열 번호: 142).
- [0869] 바람직한 프레임워크 2 또는 프레임워크 3 유전자 조작된 시스템인 삽입 돌연변이가 a) VL과 VH 도메인 간 및 그것의 상이한 서브형으로 기능적으로 변환할 수 있고, b) 단일(scFv) 또는 다수의 (다이아바디/트라이아바디) Fv 도메인을 함유하는 단백질과 양립가능하다는 것을 증명하기 위하여 이 티올화된 Avibody를 본 명세서에서 예시하였다(인실리코 또는 시험관내).
- [0870] 모든 경우에, 설명서에 따라 QuikChange(등록상표) 자리 지정 돌연변이 유발 방법(Stratagene)을 사용하여 관심의 특이적 아미노산에 대해 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 변경함으로써 시스템 잔기를 도입하였다. 설명서에서와 같이 AVP04-07 Avibody를 사용하여, Kabat 위치 L38 및 L42(FR2 VL 영역)에서 글루타민 잔기를 둘 다 뉴클레오티드 서열 CAG에 의해 암호화한다. 이 뉴클레오티드 서열 코돈을 둘 다 시스템을 암호화하는 TGC로 변경하기 위하여 서열 번호: 68 및 서열 번호: 69에서 설명한 DNA 프라이머에 대해 QuikChange(등록상표) 자리 지정 돌연변이 기술을 사용하였다. 이 변형은 티올화된 Avibody AVP04-79(서열 번호: 100)의 핵산 서열을 형성하였다.
- [0871] QuikChange(등록상표) 자리 지정 돌연변이 PCR 기반 방법은 프라이머로서 원하는 돌연변이 및 주형으로서 플라

스미드 DNA를 함유하는 2개의 상보적 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 이중가닥 돌연변이체 PCR 생성물을 합성한다. 상기 예를 사용하여, AVP04-07에서 V_L 채 FR2 영역의 Kabat 위치 L38 및 L42에서 시스테인 잔기를 도입하기 위하여, 다음의 서열 5'- CAG AAA AAC TAT CTG GCG TGG TAT CAG TGC AAA CCG GGT TGC AGC CCG AAA CTG CTG ATT TAT TGG - 3'(서열 번호: 68)를 전방 프라이머로서 사용하였고, 5'- CCA ATA AAT CAG CAG TTT CGG GCT GCA ACC CGG TTT GCA CTG ATA CCA CGC CAG ATA GTT TTT CTG - 3'(서열 번호: 69)를 후방 프라이머로서 사용하였다. 서열 내에서 다음의 조건을 사용하여 증폭을 수행하였다: 30초 동안 95℃; 30초 동안 95℃, 30초 동안 55℃ 및 13분 동안 68℃로 이루어진 18 사이클; 7분 동안 68℃의 최종 연장. 주형을 1시간 동안 68℃에서 DpnI에 의해 분해하였다. 제조업자의 설명서에 따라서 형질전환체를 얻었고 상기 설명한 바와 같이 DNA 시퀀싱에 의해 확인하였다.

[0872] 서열 번호: 70-85, 92-99에서 약술한 뉴클레오타이드 프라이머에 대해서 동일한 기술을 사용하여 프레임워크 2 내 또는 프레임워크 3 내 시스테인 잔기를 함유하는 티올화된 Avibody의 모든 다른 예를 만들었다.

[0873] 단백질의 천연 N-말단 잔기를 세린 잔기로 대체하기 위해 유사한 돌연변이가 유발 접근을 이용하였다. N-말단의 세린 치환을 프레임워크 내 이황화물 돌연변이의 도입 전 또는 후에 수행하였다.

[0874] 실시예 11. 박테리아 발현을 허용하는 "비돌연변이된" 및 티올화된 Avibody의 발현 및 정제

[0875] 개개의 Avibody 구성체의 DNA를 제조업자의 표준 프로토콜을 사용하여 화학적으로 만족할 만한 *E. coli* BL21 세포로 형질전환하였다. *E. coli* BL21 발현 균주는 모든 예시한 Avibody에 대한 주된 발현 균주로서 작용하였다. 발현은 기대한 추출 조건에 의존하여 2개의 상호 호환 가능한 접근; 박테리아 진탕 플라스크 발현 또는 박테리아 유가배양(Fed batch fermentation)에 의한다. 방법으로부터 Avibody 단백질 상의 품질 평가는 2개의 방법이 상호호환가능하고, 단백질 품질 및 특성이 비교할 만하다는 것을 나타내었다.

[0876] 11.1 박테리아 진탕-플라스크 발현

[0877] 단일 형질전환체 콜로니를 1% D-글루코스 및 100μg/ml 암피실린을 함유하는 500ml 2xYT에 인큐베이션하였고, 37℃에서 밤새 인큐베이션하였고, 220rpm에서 진탕하였다. 9L의 동일한 배지를 최종 0.1의 OD600으로 밤새 배양물과 함께 씨딩하였고, OD600이 약 0.6-0.8이 될 때까지 30℃에서 인큐베이션하였다. 배양물을 12℃로 옮겼고, 유도 온도에 도달할 때까지 진탕을 계속하였다. 0.2mM IPTG의 첨가로 단백질 발현을 유발하였고, 배양물을 12℃에서 15시간 동안 인큐베이션하였다. 박테리아 펠렛을 10,000 x g 원심분리에 의해 제조하였고, 수확하고, 칭량하고 -20℃에서 저장하였다.

[0878] 이 발현 시스템으로부터의 발현 단백질을 함유하는 박테리아 펠렛은 평균이 대략 6 g/L 배양물 배지가 된다.

[0879] 11.2 박테리아 유가배양

[0880] 종자 배양물을 500ml 복합체 배지를 함유하는 2L 배플 삼각 플라스크(baffled Erlenmeyer flask) 중에서 성장시켰고, 16시간 동안 200 rpm에서 진탕하면서 37℃에서 인큐베이션하였으며; 복합체 배지는(L 당): 트립톤, 16 g; 효모 추출물, 5 g; NaCl, 5 g; 암피실린, 200mg을 함유하였다. 단백질 발현을 위해 한정 배지를 사용하였고(L 당): KH₂PO₄, 10.64 g; (NH₄)₂HPO₄, 4.0 g; 및 시트르산 일수화물, 1.7 g; 글루코스 25 g; MgSO₄·7H₂O, 1.25 g; PTM4 미량의 염, 5ml; 암피실린, 200mg; 티아민-HCl, 4.4mg을 함유하였다. PTM4 미량의 염은(L 당): CuSO₄·5H₂O, 2.0 g; NaI, 0.08 g; MnSO₄·H₂O, 3.0 g; NaMoO₄·2H₂O, 0.2 g; H₃BO₃, 0.02 g; CoCl₂·6H₂O, 0.5 g; ZnCl₂, 7.0 g; FeSO₄·7H₂O, 22.0 g; CaSO₄·2H₂O, 0.5 g; H₂SO₄, 1ml를 함유하였다. PTM4 미량의 염, 티아민 하이드로클로라이드 및 필터 멸균한 암피실린을 제외하고 모든 배지 및 첨가물을 121℃에서 30분 동안 오토클레이브에 의해 멸균하였다.

[0881] 단백질 발현을 1.6 L의 한정된 배지를 함유하는 2L 유리 Biostat B 바이오리액터(Bioreactor)(독일 Sartorius Stedim Biotech)에서 완료하였다. 용해한 산소 농도를 500 내지 1,200 rpm의 교반 속도 및 0.3 내지 1.5 L min⁻¹의 에어레이션 속도를 자동적으로 변화시켜서 20%에서 유지하였다. 공기 흐름의 산소 보충을 필요하다면 수동으로 증가시켰다. 배양물의 pH를 10%(v/v) H₃PO₄ 또는 10%(v/v) NH₃ 용액의 자동적 첨가를 통해 7.0에서 제어하였고, 폼(foam)을 소포체의 자동적 첨가에 의해 제어하였다[10%(v/v) 폴리프로필렌 2025]]. 달리 특정되지 않는다면, 용기 온도를 37℃로 유지하였다. 바이오리액터를 종자 배양물을 접종하여 0.25의 출발 광학 밀도(600nm에서 측정)를 달성하였다.

- [0882] 배지에 첨가된 글루코스의 완전한 이용 후, 글루코스 600 g; 및 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.4 g를 함유하는 영양 용액(공급)(L 당)을 40ml h^{-1} 의 유속으로 바이오리액터에 펌핑하였다. 공급의 개시 2시간 후, 용기 온도를 2.5시간 기간에 걸쳐 서서히 20°C 로 감소시켰고, 이 후에 단백질 발현은 0.2 mM IPTG의 첨가에 의해 유발되고 공급 속도가 6ml h^{-1} 로 감소되었다. 배양물을 유도 12시간 후 수확하였고, 전형적으로 광학 밀도(600nm 에서 측정)는 110에 도달하였고, 대략 330g의 축축한 세포 페이스트를 각 2L 배양물로부터 회수하였다.
- [0883] 11.3 *E. coli*에서 발현된 Avibody의 정제
- [0884] 보충한 발현 접근과 관계없이, 모든 Avibody 항체 단백질을 이하에 요약하는 바와 같이 근본적으로 정제하였다
- [0885] 발현 배양물로부터 수확한 박테리아 펠렛(발현 방법에 의존하여 대략 50-400g)을 용해하였고, 단백질을 추출하였고, 후속하여 표준 크로마토그래피 기술에 의해 정제하였다. 박테리아 펠렛의 모든 그래프에 대해 5mL의 His-Tag 친화도 크로마토그래피 용해 완충제(20mM 인산염, 500mM NaCl, 20mM 이미다졸, 0.25mg/mL 라이소자임, 1mM PMSF, 50ug/mL DNaseI, pH 7.4)를 사용하여 세포 펠렛을 재현탁시킨 후 초음파 처리(얼음에서 6 x 30 초 펄스) 또는 Emulsiflex-C5 세포 교란기(disruptor)(캐나다에 소재한 AVESTIN Inc.)을 통해 3가지 경로를 통해 기계적 균질화에 의해 용해하였다. 후속하여 박테리아 용해물을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후 원심분리(16,000 x g, 30분) 및 여과(0.45 μm 필터 막)하였다.
- [0886] AKTA Purifier 10(GE LifeSciences)을 사용하는 His-Tag 친화도 크로마토그래피 정제를 다음을 사용하여 박테리아 용해물로부터 다이아바디를 정제하였다. 1 내지 4개의 5mL HisTrap(상표명)(GE LifeSciences) 미정제 FF 컬럼을 정제의 스케일에 의존하여 정제를 위해 연속하여 사용하였다. 용해물을 외부 P960 펌프를 통해 HisTrap(상표명) 컬럼을 통과시켰다. HisTrap(상표명) 컬럼을 His-Tag 친화도 크로마토그래피 추출 완충제(20mM 인산나트륨, 500mM NaCl, 20mM 이미다졸, pH 7.4)의 10컬럼 부피로 세척하였다. 정제한 단백질을 50% His-Tag 친화도 크로마토그래피 용리 완충제(20mM 인산나트륨, 500mM NaCl, 500mM 이미다졸, pH 7.4) 및 50% His-Tag 친화도 크로마토그래피 용리 완충제(최종 260mM 이미다졸의 농도) 중에서 용리하였다. 용리한 단백질을 함유하는 분획(AKTA Unicorn 소프트웨어에서 280nm 흡광도에 의해 결정)을 수집하였고, 모았고, 단백질 농도를 결정하였고, 적절한 이온 교환 완충제에서 투석하였다. TAG72-특이적 AVP04-111(서열 번호: 107), AVP04-120(서열 번호: 113) 및 AVP04-121(서열 번호: 115)을 사용하는 전형적인 His-Tag 친화도 크로마토그래피 용리 프로파일은 도 17a-c에서 나타난다. 본 명세서에서 설명한 모든 Avibody는 유사한 용리 프로파일을 나타내었다.
- [0887] 특히 정제된 Avibody를 후속하여 단백질의 계산된 pI보다 더 낮은 완충제 1.0-1.5 pH 단위(양이온 교환에 대해) 또는 단백질의 pI보다 더 높은 1.0-1.5 pH 단위(음이온 교환에 대해)에서 투석하였다. 전형적으로 7.0-8.0의 pI를 가지는 Avibody를 MES 완충제(50mM MES, 양이온 교환에 대해 pH 6.0) 중에서 투석하였고, 8.0-9.0의 pI를 가지는 그것을 인산염 완충제(50mM 인산염, 양이온 교환에 대해 pH 7.0) 중에서 투석하였고 5.0-6.5의 pI를 가지는 그것을 Tris 완충제(20mM Tris-HCl, 양이온 교환에 대해 pH 8)로 투석하였다. 모든 Avibody pI 값은 이 범위 내에 속한다. Avibody를 2시간 만큼 별도로 3가지의 완충제 교환과 함께 200x 부피 이상의 완충제로 투석하였다. 4°C 에서 스펙트레이퍼(Spectrapor) 6-8000 Da MW 컷오프 투석 튜브를 사용하여 투석을 수행하였다.
- [0888] 투석 후, 단백질 샘플을 10분 동안 3220 x g에서 원심분리하여 이온 교환 전 변성된 불용성 물질을 펠렛화하였다. AKTA 정제기 10을 사용하고, 2 x 5mL HiTrapTM SP HP 컬럼 실행을 연속해서 사용하고, P960 외부 펌프를 통해 정제된 투석 물질이 컬럼을 통과하도록 하여 이온 교환을 수행하였다. 이 단계 후, 컬럼을 10컬럼 부피의 이온교환 완충제로 세척한 다음 컬럼으로부터 단백질의 용리 동안 선형 완충제 구배(염 구배)를 시작하였다. 이 과정에서, 1M 최종 농도로 NaCl의 첨가와 함께 동일한 완충제를 완충제로 선형 구배에 걸쳐 이온 교환 완충제를 대체하였다. 용리 구배를 600mM NaCl의 최종 농도로 300mL 이상에서 수행하였다.
- [0889] 용리한 다이아바디에 대응하는 분획(Unicorn의 280nm 흡광도에 의해 결정)을 모았고, 정량화하였다. TAG72-특이적 AVP04-111(서열 번호: 107), AVP04-120(서열 번호: 113) 및 AVP04-121(서열 번호: 115)을 사용하는 전형적인 이온 교환 용리 프로파일은 도 18a-c에 존재한다. 모든 다이아바디는 대략 37 mS/cm 또는 32% B의 염 농도로 용리되는데, 이때 주요 다이머 아이소타이프(화살표에 의해 지칭됨)은 다른 전하 및 크기 변형으로부터 용이하게 분리될 수 있었다. 다이아바디 클론은 다른 구성원으로부터의 것에서 조차, 염 구배의 유사한 지점에서 통상적으로 용리하였다. 일부 경우에, 1xPBS 완충제(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , pH 7.4.)에서 교정된 Superdex 200 10/300 컬럼(GE LifeSciences)을 사용하는 분석적 크기 배제를 수행하여서 모으기 전 원하는 중 또는 특정 분획 조성물의 피크 동일성을 확인하였다. 관심의 주된 아이소타이프를 함유하

는 용리 분획을 하류의 정제를 위해 모았다.

[0890] 이온 교환 후, 겔 여과 전 용리한 단백질 물질을 4℃에서 대략 3mg/ml로 농축하였다. AKTA Purifier 10 상에서 PBS 중의 Pharmacia Amersham(GE LifeSciences) Superdex(등록상표) 75 26/60 프랩-등급 컬럼을 사용하여 겔 여과를 수행하였다. 예로서 TAG72-특이적 AVP04-111(서열 번호: 107), AVP04-120(서열 번호: 113) 및 AVP04-121(서열 번호: 115) 다이아바디를 사용하여, 주입 후 대략 150ml에서 단백질을 용리하였다(도 19a-c). AVP04 구성원과 다른 것 내에서 다이아바디 변이체는 대략 54 kDa의 분자량을 가지는 예상한 임의의 구형 단백질로서 유사한 용리 부피에서 통상적으로 용리되었다. 다이머에 대응하는 분획(도 19a-c에서 화살표로 표시)을 모았고 3200 x g, 4℃에서 10K MWC(미국 Millipore)를 가지는 Amicon Ultrafree 스핀 농축기를 사용하여 0.5-3 mg/ml에서 농축하였다.

[0891] 정제한 생성물의 최종 정제를 Superdex(등록상표) 200 10/300 컬럼 및 SDS-PAGE 전기영동 상의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 통상적으로 평가하였다. 예를 들어, TAG72-특이적 AVP04-111(서열 번호: 107), AVP04-120(서열 번호: 113) 및 AVP04-121(서열 번호: 115)을 사용하는 정제 방법은 크기 배제 크로마토그래피 상에서 단일의 선명한 용리 피크를 초래하는 순도를 가지는 단백질로 되돌렸다(도 20a-c).

[0892] 정제 전략 및 결과물 순도 프로파일은 시험한 임의의 Avibody 간에 유의하게 다르지 않았다. 도 21a-b는 본 명세서에서 설명하고, 도면에서 표시하는 Avibody의 최종 크기 배제 크로마토그래피 프로파일을 강조한다. 예상한 바와 같이, 상이한 Avibody 구성원 내에서와 구성원 사이의 작은 변화 정도와 별개로, Avibody의 용리 시간은 예상한 분자 크기; scFvs(AVP04-124, 서열 번호: 119) 보다 더 늦게 용리된 다이아바디보다 더 빨리 용리된 트라이아바디(AVP04-125, 서열 번호: 121)에 잘 대응한다.

[0893] 본 명세서에서 설명한 모든 Avibody를 기능적으로 발현시키고, 실질적인 균질성으로 정제할 수 있었다. 프레임워크 2 내 또는 프레임워크 3 내 시스템인 치환 돌연변이의 존재는 Avibody를 기능적으로 발현시키고, 정제하는 능력에 어떤 효과도 가지지 않았고, 티올화된 Avibody의 프레임워크 2 내 또는 프레임워크 3 내 유전자 조작된 시스템의 위치를 제안하는 모델링 데이터를 부분적으로 확인하는 것(도 16을 참조)은 Avibody 탈안정화를 유발하는 해로운 구조 형태적 변화를 야기하지 않았다.

[0894] 실시예 12 - 다이아바디의 시험관내 면역반응 평가

[0895] 가용성 항원에 대한 결합 활성을 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 컬럼 이동 분석에 의해 측정하였다. AVP04-xx Avibody에 대한 항원은 소 텍밀샘 뮤신(BSM)(Sigma)으로부터 가용성 형태로 이용가능한 TAG72이었다. AVP07-xx Avibody에 대해, 가용성 항원은 재조합 HER2 엑토도메인이다. AVP02-xx Avibody에 대해, 가용성 항원은 재조합 전장 MUC1이다. Avibody 또는 항원과 관계없이, 컬럼 이동 분석을 근본적으로 이하에 설명하는 바와 같이 수행하였다.

[0896] 다이아바디에 대해 적어도 2배 몰 과량의 가용성 항원을 1시간 동안 주변 온도에서 PBS 완충제 중에서 인큐베이션하였다. 결합 활성을 유리 다이아바디 피크에 대해 결과된 다이아바디/항원 복합체 피크를 비교함으로써 결정하였다. 포지티브 결합 결과는 유리 Avibody에 대응하는 피크의 고갈 및/또는 인큐베이션 후 Avibody-항원 복합체에 대응하는 피크의 증가된 크기로서 간주하였다. Avibody 또는 Avibody-항원 복합체의 용리 프로파일을 280 nm에서 흡광도를 통해 모니터링하였다. 본 명세서에서 본 발명자들은 BSM 항원을 사용하여 AVP04-xx 티올화된 Avibody에 대한 컬럼 이동 면역반응성 분석을 보고한다.

[0897] 모든 경우에, Avibody 단독은 scFvs(AVP04-124, 서열 번호: 119)보다 더 늦게 용리된 다이아바디보다 빨리 용리하는 트라이아바디(AVP04-125, 서열 번호: 121)와 함께 28-33분에 용리되었다. 모든 경우에, Avibody-항원 복합체는 10-25분에 용리되었다. Avibody가 무관한 항원과 함께 인큐베이션되었을 때 복합체 형성이 관찰되지 않았고, 특정 결합 상호작용이 일어났다는 것을 나타낸다.

[0898] 본 명세서에서 설명한 모든 Avibody의 면역반응성을 상기 설명한 프로토콜을 사용하여 평가하였고, 결과를 도 22a-b에서 도시하였다. 모든 경우에, Avibody-항원 복합체의 형성은 겔 여과에서 용리 시간의 상당한 단축을 증명하였고 및/또는 비결합 Avibody의 감소된 양이 관찰되었고; Avibody가 면역반응성이라는 것을 나타낸다. 다이아바디, 트라이아바디 및 scFv 포맷으로, V_H 또는 V_L 도메인에서 상호호환가능한 유전자 조작된 시스템 치환을 가지는 티올화된 Avibody에 대해 면역반응성을 관찰하였다.

[0899] 티올화된 Avibody에서 프레임워크 2 또는 프레임워크 3 시스템 치환 돌연변이의 존재 또는 부재는 결합을 없애지 않았고, 프레임워크 2 또는 프레임워크 3 시스템 치환 돌연변이 자리는 Avibody의 결합 특성에 영향을

거의 없거나 전혀 없는 위치에서 유전자 조작된다.

[0900] **실시예 13 - 제어된 환원 후 티올화된 Avibody에서 유리 설프하이드릴의 검출**

[0901] 티올화된 Avibody를 통상적으로 발현하고 실질적인 균질성으로 정제할 수 있었고, 기능적으로 활성이 되는 것으로 나타났다. 프레임워크 시스테인 치환이 페이로드 컨주게이션과 양립할 수 있는 유리 설프하이드릴을 방출하기 위해 선택적으로 파괴될 수 있는 이황화 결합을 형성한다는 것을 증명하기 위하여 간단한 비색분석을 고안하였다.

[0902] 티올화된 Avibody를 PBS 중에서 25분 동안 실온에서 3.8mM 까지의 TCEP(Tris(2-카복시에틸) 포스핀 하이드로클로라이드)(미국 일리노이주 록퍼드시에 소재한 Pierce, Rockford)과 함께 인큐베이션하였다. 환원 후, TCEP를 100mM 인산염 완충제 + 1mM EDTA pH 6.5로 사전 평형화한 PD10 탈염 컬럼으로 제거하였고, 0.5mL 분획을 수집하였다. 피크 단백질 분획을 280nm에서 UV 분광기에 의해 확인하였고 모았다.

[0903] 반응성 티올을 시험하기 위하여, 50-75 μ g의 환원된 단백질을 5 μ l의 4mg/mL 엘만 시약 (5,5'-다이티오-비스(2-나이트로벤조산); DTNB)(일리노이주 록퍼드시에 소재한 Pierce)와 함께 100mM 인산나트륨 완충제 1mM EDTA, pH 8.0 중에서 희석하였다. 15분 동안 주변 온도에서 반응을 진행시켰다. 이용가능한 티올을 DTNB와 반응시키고, 이황화 결합을 절단하여 중성 또는 알칼리 완충제 중에서 NTB2-2음이온(dianion)(황색)으로 이온화하는 2-나이트로-5-티오벤조에이트(NTB-)를 제공하였다. 결과된 황색 착색을 분광기에 의해 정량화하여, 412nm에서 이 완충제 시스템에서 NTB2-2음이온의 몰흡광계수를 추정하였고, $14,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이었다. 반응성 및 이용가능한 설프하이드릴 기를 TCEP로 제어된 환원 전 및 후 DTNB와 반응성의 양을 비교하여 결정하였다. 티올 반응성을 환원 후 대 환원 전 티올 반응 비로서 플롯팅하여, 표시한 1 단위 값은 환원과 비환원 샘플 간 DTNB에 대한 반응성에서 차이가 없음을 나타내었고, 따라서 표면 노출된 이황화 브릿지는 반응에서 파괴되지 않고, 이후에 유리 설프하이드릴 기를 만든다는 것을 나타내었다. 1 단위 초과 티올 반응성 비는 TCEP로 제어된 환원이 DTNB 기질과 반응할 수 있는 표면 노출된 유리 설프하이드릴 기의 수를 증가시킨다는 것을 나타내었다. 티올 반응비의 증가는 환원 시 이용가능하게 만들어지는 더 유리된 설프하이드릴 기 및/또는 분석 과정 동안 DTNB와 반응하는 그것의 더 높은 이용가능성을 나타내었다.

[0904] 상기 검출 방법이 프레임워크 시스테인 치환이 유리 설프하이드릴을 형성하는 것을 선택적으로 파괴할 수 있는 이황화 결합을 형성한다는 것을 나타낼 만큼 충분히 민감하다는 것을 증명하기 위하여, 전체 IgG(4개의 이황화 결합에서 8개 표면 노출 시스테인을 함유) 및 AVP07-17(서열 번호: 61; VH 과변이 CDR3 영역 내 표면 노출된 이황화 결합을 형성하는 2개의 천연 시스테인 잔기를 함유)을 양성 대조군으로서 사용하였다(도 23a). 이 양성 대조군 둘 다에서, 티올 반응성 비는 8이상의 단위로 높았다. 이 결과는 이들 이황화-노출된 단백질이 TCEP로 처리에 민감하다는 것을 나타내었다. 환원제는 유리 티올을 초래하고 그것의 유리 설프하이드릴 기가 DTNB와 반응하도록 존재하는 표면 노출된 이황화 결합(들)을 환원시켰다. 반대로, 임의의 표면 노출 티올이 없는 비티올화된("야생형")AVP04-07 Avibody(서열 번호: 59)는 이 분석에서 음성 대조군으로서 사용되었고, TCEP로 처리 시 변화가 거의 없음을 나타내는 바로 1이상 단위의 티올 반응성 비로 되돌렸다. TCEP로 제어된 환원 후(도 23a) 412nm에서 무시할 만한 흡광도의 증가, 즉 환원 후 DTNB에 대한 반응성의 기여는 단백질의 코어 구조 내에 묻히고 표면에 노출되지 않은 것으로 알려진 불변 Kabat 위치 L23 및 L88과 불변 Kabat 위치 H22 및 H92 사이의 보존된 구조적 이황화 결합이 본 명세서에 이용된 조건 하의 환원에 이용가능하지 않다는 것을 나타낸다.

[0905] AVP04-07 음성 대조군, 즉 AVP04-83과 유사한, 모델링 돌연변이 c4를 함유하는 구성체(Kabat 잔기 L78 및 L82에 삽입된 시스테인, 서열 번호: 105)을 또한 음성 대조군으로서 사용하였다. 유전자 조작 시스테인 치환에 대한 모든 구조적 필요조건을 충족시키는 AVP04-83을 형성하기 위하여 유전자 조작된 시스테인이 삽입되지만(실시예 9.5 및 도 10b를 참조), 유전자 조작된 시스테인을 매우 낮은 용매 접근가능 표면적(도 11을 참조)을 가지도록 모델링함으로써 나타내었고, 따라서 환원에 이용가능하지 않은 것으로 예상되며, DTNB와 반응하는 티올을 형성하지 않았다. TCEP로 환원 전 및 환원 후 412nm에서 흡광도에 상당한 차이가 없다는 것을 관찰하였고, 게다가 AVP04-83의 유전자 조작된 시스테인이 모델링에 의해 표시되는 구조의 중심 내에 묻혀있다는 것을 나타낸다. 이것은 비록 시스테인 돌연변이가 안정성 또는 면역반응성을 없애지 않고 보존된 프레임워크 잔기 내에 삽입되지만, 이황화 브릿지 환원 및 이후의 페이로드 컨주게이션과 양립 가능성이 구조적 평가/표면 위치결정에 의해 바람직하게 결정된다는 것을 증명한다. 이 결과는 분자 모델링이 시험관 내 기능성의 양호한 예측자라는 것을 더 증명하였다.

[0906] 시험관내 평가의 모델링 및 개시가 FR2 또는 FR3 유전자 조작된 시스테인 치환이 일반적으로 코어 단백질 구조를 섭동하지 않고, 이 유전자 조작된 시스테인 치환이 다른 서열, 종 및 특이성 내 Fv의 동일한 구조적 위치에

용이하게 전달될 수 있다는 것을 제안하기 때문에, 이황화 브릿지가 프레임워크 내 유전자 조작된 시스테인 쌍 사이에 형성될 수 있으며, 이 이황화 브릿지는 유리 설피하이드릴 기를 방출시키는 선택적 환원을 파괴할 수 있다는 것을 증명하기 위하여 티올화된 Avibody 단백질의 대표적인 서브세트를 시험하였다. 도 17b에서 예시한 대표적인 Avibody는 다음을 포함한다:

- [0907] ● 다이아바디 포맷 Avibody의 V_L FR2(AVP04-79, 서열 번호: 101)에서 모델링 돌연변이 c6, 다이아바디 포맷 Avibody의 V_H (AVP04-111, 서열 번호: 107)에서 모델링 돌연변이 c6, scFv 포맷 Avibody의 V_L FR2(AVP04-124, 서열 번호: 119)의 모델링 돌연변이 c6, 트라이아바디 포맷 Avibody의 V_L FR2(AVP04-125, 서열 번호: 121)에서 모델링 돌연변이 c6, 다른 항체/분류/과/종에서 다이아바디 포맷 Avibody의 V_L FR2(AVP07-117, 서열 번호: 127)에서 모델링 돌연변이 c6를 함유하는 티올화된 Avibody.
- [0908] ● V_L FR3(AVP04-123, 서열 번호: 117)과 V_H CD3(AVP04-120, 서열 번호: 113)에서 모델링 돌연변이 c8을 함유하는 티올화된 Avibody.
- [0909] ● 구조적 상동체가 V_L FR3에 존재하지 않기 때문에 V_H FR3(AVP04-121, 서열 번호: 115)에만 모델링 돌연변이 c9를 함유하는 티올화된 Avibody.
- [0910] 모든 경우에, 티올 반응성 비는 1 단위보다 컸고, 이황화 결합(들)을 파괴한 TCEP로 환원은 천연(비환원) 상태로 존재하며, 유리 설피하이드릴 기를 DTNB와 반응시킨다 것을 나타내었다. 제어된 환원 후 티올 반응성의 변화는 실험의 시간 프레임 내에서 DTNB와 반응에 대한 설피하이드릴 기의 생물학적 이용성의 측정이다.
- [0911] 이 결과는 바람직한 유전자 조작된 시스테인 치환 돌연변이가 선택적으로 환원될 수 있는 표면 노출 이황화 브릿지를 형성하도록 설계될 수 있다는 것을 나타낸다. 유전자 조작된 시스테인 치환 돌연변이는 다른 서열, 종 및 특이성의 Fv에서 V_H 및 V_L 도메인 둘 다의 동일한 구조적 위치에 용이하게 전달될 수 있다.
- [0912] **실시예 14 - 티올화된 Avibody 내 유전자 조작된 이황화물에 페이로드 컨쥬게이션**
- [0913] 제어된 환원에 대한 티올화된 Avibody 내 유전자 조작된 FR2 또는 FR3 이황화 브릿지의 이용가능성은 임의의 다수의 티올-반응성 페이로드가 노출되고 환원된 시스테인에 컨쥬게이트될 수 있다는 것을 나타내었다.
- [0914] 이 능력을 증명하기 위하여, 말레이미드-PEG24-메톡시 페이로드는 근본적으로 본 명세서에서 설명되는 환원된 유전자 조작 FR2 또는 FR3 시스테인에 컨쥬게이션된다.
- [0915] 티올화된 Avibody의 환원 및 환원제의 제거 후, 과량의 말레이미드-PEG24-메톡시(mal-PEG₂₄-OMe)(미국 오하이오주에 소재한 Quanta Biodesign)를 Avibody 당 20당량으로 첨가하였고 4℃에서 밤새 반응시켰다. 폐길화 후, 반응되지 않은 PEG를 대규모 투석에 의해 제거하였고, PEG 부하의 평가를 질량 분석법에 의해 결정하였다.
- [0916] 질량 분광학 분석에 대해, MassPREP 온라인 탈염 카트리지(MassPREP on-line desalting cartridge)(미국 Waters Corporation)가 있는 Agilent esiTOF 질량 분석기를 사용하여 폐길화된 Avibody의 질량 스펙트럼을 보고하였다. 시스템을 1분 동안 5% CH₃CN으로, 그 다음에 9분에 걸쳐 5-95% 아세트로나이트릴로부터 용리 구배로 평형화하였다. 폐길화된 Avibody는 전형적으로 7분에 용리하였다. MassHunter 소프트웨어를 사용하여 생성된 적절한 m/z 전하 피크의 데콘볼루션(deconvolution)에 의한 샘플의 평균 질량을 결정하였다. 데이터를 표 3에서 보고하고, 질량 스펙트럼의 데콘볼루션 후 얻은 평균 모노머-쇄 Avibody 질량을 요약한다. PEG24의 화학식량을 1239.44 g/mol로서 보고하며, 따라서 적어도 2478.88 질량 단위의 증가는 유전자 조작된 시스테인에 완전한 컨쥬게이션을 나타낸다.
- [0917] 모든 Avibody는 TCEP로 제어된 환원이 페이로드에 대해 티올-매개된 컨쥬게이션에 사용된다는 것을 나타내었고, 이 경우에 말레이미드-PEG₂₄-메톡시이다. 표 3에서 나타내는 바와 같이, 다음의 Avibody는 적어도 하나의 페이로드가 TCEP로 유리 설피하이드릴에 대한 환원 후 유전자 조작된 프레임워크 시스테인에 특이적으로 컨쥬게이트된 자리가 되도록 하였다:
- [0918] ● 다이아바디 포맷 Avibody의 V_L FR2(AVP04-79, 서열 번호: 101)에서 모델링 돌연변이 c6, 다이아바디 포맷 Avibody의 V_H (AVP04-111, 서열 번호: 107)에서 모델링 돌연변이 c6, scFv 포맷 Avibody의 V_L FR2(AVP04-124, 서열 번호: 119)의 모델링 돌연변이 c6, 및 다른 항체/분류/과/종에서 다이아바디 포맷 Avibody의 V_L FR2(AVP07-

117, 서열 번호: 127)에서 모델링 돌연변이 c6를 함유하는 티올화된 Avibody.

[0919] ● V_L FR3(AVP04-123, 서열 번호: 117)과 V_H CD3(AVP04-120, 서열 번호: 113)에서 모델링 돌연변이 c8을 함유하는 티올화된 Avibody.

[0920] ● 구조적 상동체가 V_L FR3에 존재하지 않기 때문에 V_H FR3(AVP04-121, 서열 번호: 115)에만 모델링 돌연변이 c9를 함유하는 티올화된 Avibody.

표 3

[0921] 질량 분석기에 의해 결정된 티올화된 Avibody 상의 PEG 부하

구성체	평균 질량 (kDa)	폐기된 질량 (kDa)	질량 증가 (kDa)	부하된 PEG
FR2 클론				
AVP04-79	26775.86	28018.53	1242.67	1
AVP04-111	26776.02	29256.97	2480.95	2
AVP04-124	27722.12	28963.33	1241.21	1
AVP07-117	28506.04	30986.40	2480.36	2
FR3 클론				
AVP04-123	26844.40	29325.37	2480.97	2
AVP04-120	26768.49	29249.40	2480.91	2
AVP04-121	26830.81	29311.34	2480.53	2
AVP04-83 -ve	26832.10	관찰되지 않음	0	0

[0922] 앞서 약술한 바와 같이, 모델링 돌연변이 c4를 함유하는 구성체(Kabat 잔기 L78 및 L82에 삽입된 시스테인, 서열 번호: 105)인 AVP04-83을 음성 대조군으로서 사용하였다. 이 구성체에서, 유전자 조작된 시스테인을 삽입하여 유전자 조작 시스테인 치환을 위한 모든 구조적 필요조건을 충족시키는 AVP04-83을 형성하였지만(실시예 9.5 및 도 10b를 참고한다), 유전자 조작된 시스테인은 매우 낮은 용매 접근가능 표면적을 가지며, TCEP(도 23a를 참고한다)로 제어된 환원 후 DTNB과 반응에 이용가능하지 않도록 모델링에 의해 나타내었고(도 11을 참고한다), 이후에 페이로드는 Avibody에 컨쥬게이트될 수 없다(표 3을 참고한다). 이것은 시스테인 돌연변이가 안정성 또는 면역반응성, 이황화 브릿지 환원과 양립가능성을 없애지 않고 보존된 프레임워크 잔기에 삽입될 수 있으며, 이후의 페이로드 컨쥬게이션은 한정된 구조적/표면 위치결정을 바람직하게 수반한다는 것을 증명하였다. 이 결과는 분자 모델링이 시험관내 기능성의 양호한 예측자라는 것을 추가로 증명한다.

[0923] TAG72-특이적 AVP04-111(서열 번호: 107), AVP04-120(서열 번호: 113) 및 AVP04-121(서열 번호: 115)에 대한 전형적인 질량 스펙트럼의 예를 도 24에서 나타내며, 이는 적어도 하나의 페이로드가 유리 설프하이드릴을 TCEP로 환원 후 유전자 조작된 프레임워크 내 시스테인에 특이적으로 컨쥬게이트될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0924] 이 결과는 제어된, 자리 특이적 방식으로 유리 설프하이드릴을 TCEP로 환원 시킨 후 티올화된 Avibody, 특이적으로 유전자 조작된 프레임워크 시스테인에 페이로드를 컨쥬게이트하는 능력을 증명한다. 이 결과는 동일한 FR2 또는 FR3 유전자 조작된 시스테인 삽입 돌연변이가 a) V_L 및 V_H 도메인 및 그것의 상이한 서브형 사이에서 기능적으로 이동가능하며, b) 상이한 형태로 Fv 도메인을 함유하는 단백질(예를 들어, Avibody)과 양립가능하고, 페이로드 컨쥬게이션은 용매에 매우 특이적인 잔기 "표면 노출"에 의존한다는 것을 추가로 증명하며; 특징은 모델링 단계에서 결정되고 시험관내에서 예시된다.

[0925] 실시예 15 - 페이로드 컨쥬게이트 티올화된 Avibody의 시험관내 면역반응성 평가

[0926] 티올화된 Avibody를 발현시키고, 정제할 수 있었고, 그것의 천연(비컨쥬게이트된) 상태에서 면역반응성이 되는 것을 나타내었다. 상기 보고한 데이터는 유전자 조작된 시스테인에 화학양론적으로 한정된 컨쥬게이션이 생겼음을 나타낸다.

[0927] 면역반응성이 FR2 또는 FR3 치환 돌연변이에 자리 특이적 컨쥬게이션 후 없어지지 않는다는 것을 나타내기 위하여, 모델링 돌연변이 c6, c8 및 c9에 의해 처리된 유전자 조작된 시스테인 돌연변이를 하함유하는 Avibody의 AVP04-xx 서브셋을 실시예 12에서 약술한 크기 배제 크로마토그래피를 사용한 컬럼 이동 분석에 의해 면역반응성에 대해 시험하였다.

[0928] 모든 경우에, 겔 여과에서 용리 시간의 상당한 단축에 의해 증명된 Avibody-항원 복합체 형성(실시예 12에서 설명함)을 관찰하였다(도 25a-b). 모든 경우에 Avibody 단독은 28-33분에 용리되었고, Avibody-항원 복합체는 10-25분에 용리되었다. 예상한 바와 같이, Avibody가 무관한 항원과 함께 인큐베이션될 때 복합체 형성은 관찰되지 않았다.

[0929] 이 결과는 티올화된 Avibody가 TCEP를 가지는 유리 셀프하이드릴에 대한 환원 후 유전자 조작된 프레임워크 내 시스테인에 특이적으로 컨쥬게이트되는 자리가 되는 적어도 하나의 페이로드를 허용하며, 자리 특이적 컨쥬게이션 사건이 결함을 없애지 않도록 제어한다는 것을 나타낸다.

[0930] **참고문헌**

- Abuchowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 252: 3582-3586, 1977;
- Al-Lazikani *et al.*, *J Mol Biol* 273, 927-948, 1997;
- Albrecht *et al.*, *Bioconjug Chem.* 15:16-26, 2004;
- Andersson-Engels *et al*, *Phys. Med. Biol.* 42:815-824, 1997;
- F.M. Ausubel *et al.* (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, 1988, (including all updates until present);
- Axworthy *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4): 1802-1807, 2000;
- Barnett *et al*, *Genomics* 3: 59-66, 1988;
- Bateman *et al* *Genomics* 3, 59-66, 1988., *Nucleic Acids Res.* 32: D138-41, 2004;
- Bendele *J Musculoskel Neuron Interact*; 1(4):377-385, 2001;
- Bernhard *et al* *Bioconjugate Chem.* 5:126-132, 1994;
- Bork *et al.*, *J Mol. Biol.* 242, 309-320, 1994;
- Borrebaeck (ed), *Antibody Engineering*, Oxford University Press, 1995 (ISBN0195091507);

[0931]

- Bowie *et al.*, *Science*, 253:164-70, 1991;
- Bradl and Linington *Brain Pathol.*, 6:303-311, 1996
- Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81-83, 1985;
- Brinkmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7538-7542, 1993;
- Brown T.A. (Editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press, 1991;
- Carmichael *et al.*, *J. Mol. Biol.* 326: 341- 351, 2003;
- Carpino and Han, *J. Org. Chem.*, 37:3403-3409, 1972;
- Carter *et al* *Nucleic Acids Res.* 13:4431- 4443, 1985;
- Carter *et al.* *Bio/Technology* 10: 163-167, 1992;
- Chan *et al.*, *Oncogene*, 6: 1057-1061, 1991;
- Chari *et al* *Cancer Research* 52:127-131, 1992;
- Chen *et al.* *Nature*, 446:203-207, 2007;
- Cheung *et al.*, *Virology* 176:546, 1990;
- Chothia and Lesk *J. Mol Biol.* 196:901 -917, 1987;
- Chothia *et al.* *Nature* 342, 877-883, 1989;
- Chou *et al.*, *Biochemistry* 13:222-45, 1974;
- Chou *et al.*, *Biochemistry* 13:211-22, 1974;
- Chou *et al.*, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48, 1978;
- Chou *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276, 1978;
- Chou *et al.*, *Biophys. J.* 26:367-84, 1979;
- Ciccodicola *et al*, *EMBO J* 8: 1987-1991, 1989;
- Clark, *et al* *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003;
- Clark *et al.*, *Protein Sci.* 15: 949-960, 2006;
- Coligan *et al.* (Editors), *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, including all updates until present.
- Coussens *et al* *Science* 230(4730): 1132-1139, 1985;
- Crouch *et al.*, *J Immunol Methods*, 160: 81-88, 1993;
- Dijke *et al.*, *J Biol Chem*, 269: 16985-16988
- Dooley *et al.*, *Dev Comp Immunol*, 30:43-56
- Eisen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 4583-4585, 1953;
- Feild *et al* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578-582, 1999;
- Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7:626-634, 2003;
- Froyen *et al.*, *Mol. Immunol.*, 37: 515-521, 1995;
- Fujisaku *et al.*, *J Biol Chem* 264: 2118-2125, 1989;
- Gaertner and Offord, *Bioconj. Chem.* 264 (4):2118-2125, 1989., 7: 38-44, 1996

[0932]

- Garman, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, 1997;
- Gary *et al*, *Gene* 256: 139-147, 2000;
- Gaugitsch *et al* *J. Biol. Chem.* 267 (16):1 1267-1273, 1992;
- Gelfand *et al.* *Protein Eng.* 11: 1015-1025, 1998a;
- Gelfand *et al.*, *Journal of computational biology* 5: 467-477, 1998b;
- Gendler *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 15286-15293, 1990;
- Getz *et al* *Anal. Biochem.* 273:73-80, 1999;
- D.M. Glover and B.D. Hames (Editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press, 1995 and 1996;
- Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103;
- Goodman *et al.*, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990
- Goodson and Katre, *Biotechnology*, 8: 227-231, 1990;
- Gribskov *et al.*, *Methods Enzymol.* 183:146-59, 1990;
- Gribskov *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4355-58, 1989;
- Grossman *et al.*, *Biochemistry*, 21: 6122-6128, 1981;
- Guan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13206-10, 1998;
- Guss *et al.* *EMBO J.* 5: 1567-1575, 1986;
- Guy *et al.*, *Mol Cell Biol.* 12(3):954-61, 1992;
- Halaby *et al.*, *Protein Engineering* 12: 563-571, 1999;
- Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988;
- Higuchi, in *PCR Protocols*, pp.177-183, Academic Press, 1990;
- Ito *et al* *Gene* 102:67-70, 1991;
- Ho *et al* *Gene (Amst.)* 77:51-59, 1989;
- Holliger *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993;
- Hollinger and Hudson *Nature Biotechnology*, 23: 1126-1136, 2005;
- Holm *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47, 1999;
- Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 56: 3055-3061, 1996;
- Hubert, *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 14523-14528, 1999;
- Hudson and Kortt *J. Immunol. Methods*, 231: 177-189, 1999;
- Hunter *et al.*, *Nucleic Acids Research* 37: D211-D215, 2009;
- Hust *et al.*, *BMC Biotechnology* 7:14, 2007;
- Iwamoto *et al.*, *Oncogene.* 5(4):535-42, 1990;

[0933]

- Johnson *et al*, *Cancer Res*, 46: 850-857, 1986;
- Jakobovits *et al*, *Nature Biotechnology* 25, 1134 – 1143, 2007;
- Jones, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:210-216, 1996;
- Johnson and Wu, *Nucleic acids research* 28: 214-218, 2000;
- Junutula *et al.*, *Nature Biotechnology* 26: 925-932, 2008;
- Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991;
- Karpusas *et al.*, *J Mol Biol.* 327:1031-1041, 2003;
- Kawabata *et al.*, *Proteins* 41: 108-122, 2000
- Kawabata, *Nucleic Acids Res.* 31: 3367-3369, 2003;
- Kim. *et al.*, *Mol Cancer Ther.* 7: 2486-2497, 2008;
- Kim, *et al.*, *Infect. Immun.* 57:944, 1989;
- King *et al.*, *Biochemistry*, 17: 1499-1506, 1978;
- Kirkland *et al*, *J Immunol*, 137: 3614-3619, 1986;
- Kohler and Milstein *Nature*, 256:495-497, 1975;
- Kortt *et al* *Protein Eng.* 10: 423-433, 1997;
- Kortt *et al.*, *Biomol. Eng.*, 18: 95-108, 2001;
- Kostelny *et al*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553, 1992;
- Kruif and Logtenberg *J. Biol. Chem.*, 271: 7630-7634, 1996;
- Kunkel *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1987;
- Lambert *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549, 2005;
- Largaespada *et al*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 166, 91-96, 1990;
- Larson *et al.*, *J Mol Biol.*, 348:1177-1190, 2005;
- Le Gall *et al* *FEBS Lett*, 453: 164-168, 1999;
- Lee *et al* *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199, 1998;
- Lewis *et al* *Bioconj. Chem.* 9:72-86, 1998;
- Li *et al.*, *Bioconjug Chem* 17: 68-76, 2006;
- Lindmark *et al.* *J Immunol Meth.* 62: 1 -13, 1983;
- Lonberg, N. "Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies." *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101, 1994;
- Lukacs *et al.* *J. Exp. Med.*, 194: 551-555, 2001;
- Marsh *et al* *Hum. Mol. Genet.* 9, 13-25, 2000;
- Matsui *et al.*, *Cell*.61(6):1147-55, 1990;
- Matusik *et al.*, Transgenic mouse models of prostate cancer. In: Transgenics in Endocrinology, ed. by MM Matzuk, CW Brown, and TR Kumar. The Humana Press Inc (Totowa, NJ) Chapter 19, pp 401-425, 2001

[0934]

- Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963;
- Moldenhauer *et al*, *Scand J Immunol*, 32: 77-82, 1990;
- Morel *et al*, *Curr Stud Hematol Blood Transfus*, 55: 53-63, 1988;
- Moulton, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27, 1996;
- Muller *et al Eur. J. Immunol.* 22 (6): 1621-1625, 1992;
- Muller *et al EMBO J.*9(3):907-13, 1990;
- Murzin *et al J. Mol. Biol.* 247: 536-540, 1995;
- Mutsushima *et al.*, *Chem. Lett.*, 773-776, 1980;
- Nakamura, *et al Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991;
- Nakayama *et al Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124- 127, 2000;
- Nagase *et al DNA Res.* 7 (2): 143-150, 2000;
- Nguyen *et al.*, *Adv Immunol*, 79:261-296
- Panchenko *et al. J. Mol. Biol.* 296: 1319-1331, 2000;
- Pei *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 9637-9642, 1997;
- Perbal *et al.* A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons, 1984;
- Perisic *et al.*, *Structure.* 2:1217-1226, 1994;
- Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188, 1992;
- Presta *et al.*, *Cancer Res.*, 57: 4593-4599, 1997
- Ramseier and Chang *Analyt. Biochem.*, 221: 231-233, 1994;
- Ramanujam *et al*, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 48:1034-1041, 2001;
- Roberge, *et al.*, *Protein Eng Des Sel* 19: 141-145, 2006;
- Ross *et al.*, *Cancer Res*, 62: 2546-2553, 2002;
- Reddy *et al.*, *Synthesis Stuttgart*: 999-1002, 1988;
- Reiter *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1735-1740, 1998;
- Riechmann *et al. J Immunol Methods*, 231:25-38, 1999;
- Risma *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*;92(5):1322-6, 1995;
- Roby *et al.*, *Carcinogenesis.* 21(4):585-91, 2000;
- Rodwell *et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2632-2636, 1986;
- Rost *et al.* 270: 471-480, 1997;
- Roux *et al. J. Immunol.* 161:4083, 1998;
- Saha *et al.*, BcePred:Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. In Nicosia, Cutello, Bentley and Timis (Eds.) ICARIS 2004, LNCS 3239, 197-204, Springer,2004;
- Sakaguchi *et al. Nature*, 426: 454-460;

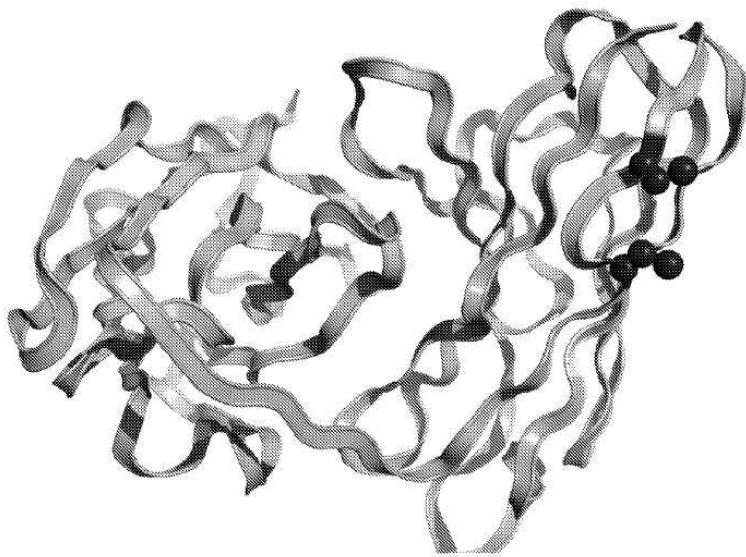
[0935]

- Sali and Blundell, *J. Mol. Biol.* 234, 779-815, 1993;
- Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989;
- Sanders *et al.*, *Thyroid* 17: 395-410, 2007;
- Schelte *et al.*, *Bioconj. Chem.* 11: 118-123, 2000;
- Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225, 1992;
- Shao *et al.*, *Mol Immunol*, 44: 656-665
- Shen *et al.*, *Protein Sci.* 15: 2507- 2524, 2006;
- Sirk *et al.*, *Bioconjug Chem.* 19: 2527-2534, 2008;
- Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262, 1993;
- Stahli *et al.*, *Methods Enzymol.* 92: 242-253, 1983;
- Stanfield *et al.*, *J Virol.* 80:6093-6105, 2006;
- Tang *et al.* *J. Exp. Med.*, 199: 1455-1465, 2004;
- Thompson *et al.*, *Science*, 293: 2108-2111, 2001;
- Todorovska *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 248: 47-66, 2001;
- Tonnelle *et al.*, *EMBO J.* 4: 2839-2847, 1985;
- Trenado *et al.* *J. Clin. Invest.*, 112: 1688-1696, 2002;
- Vallette *et al.* *Nuc. Acids Res.* 17:723-733, 1989;
- Van der Sluis *et al.* *Gastroenterology* 131: 117-129, 2006;
- Vitetta *et al.*, *Immunol Today*, 14: 252-259, 1993;
- Wang *et al.* *J Clin Invest.* 118(7): 2629-2639, 2008;
- Weissinger *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88, 8735-8739, 1991;
- Wells *et al.* *Gene* 34:315-323, 1985;
- Wilson *et al.*, *J Exp Med*, 173: 137-146, 1991;
- Xu and Xu *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 40: 343-354, 2000;
- Xu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10692-10697, 2001;
- Yamaguchi *et al.* *Biol. Chem.* 269 (2), 805-808, 1994;
- Yem *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 3122-3128, 1992;
- Zalipsky *et al.*, *J. Bioact. Compat. Polym.*, 5: 227-231, 1990
- Zalipsky *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15: 100-114, 1992;
- Zhang and Tam, *Anal. Biochem.* 233: 87-93, 1996;
- Zoller *et al.* *Methods Enzymol.* 100:468-500, 1983;
- Zoller and Smith, *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500, 1982; and
- Zhou *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 14575-14580, 2005.

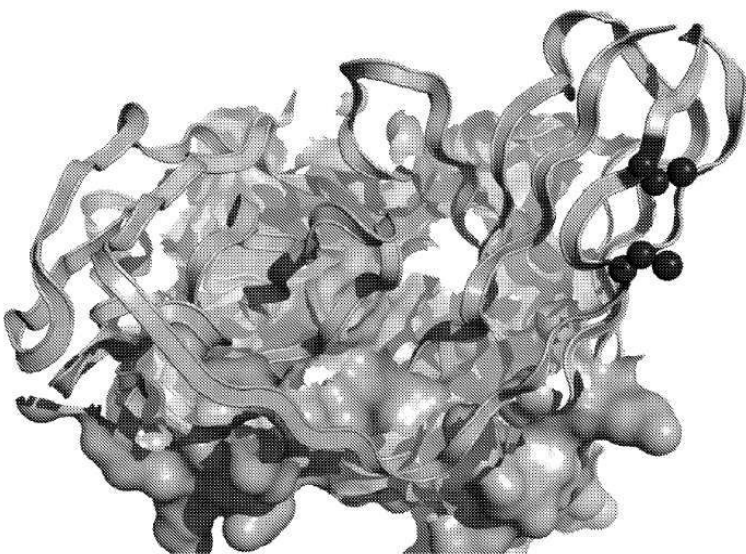
[0936]

도면

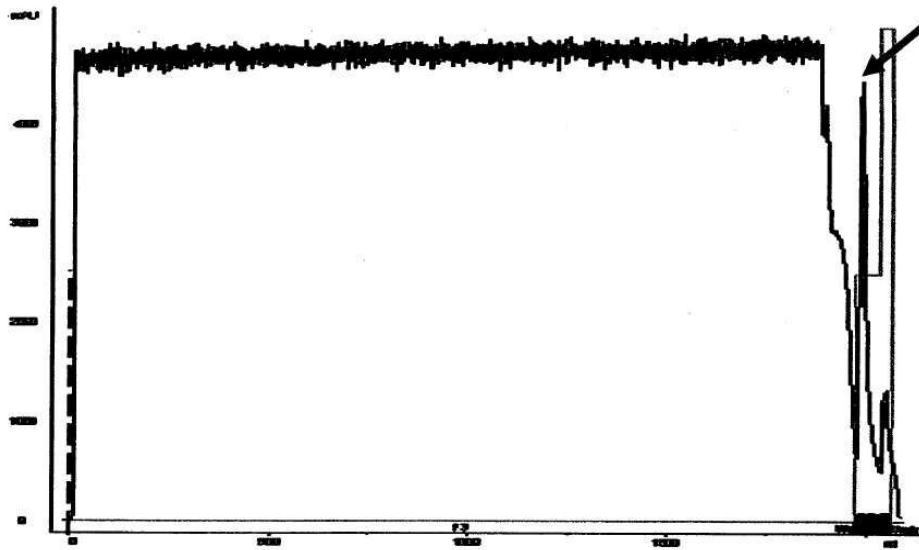
도면1a



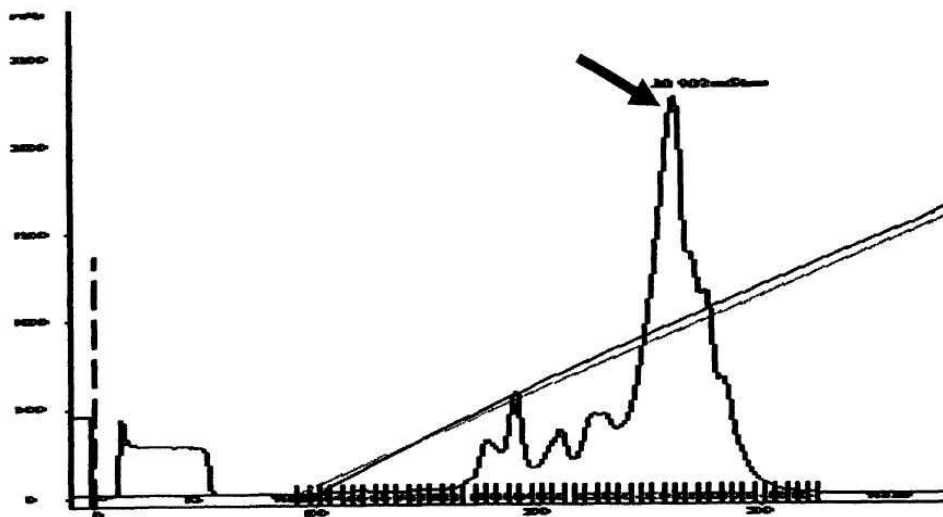
도면1b



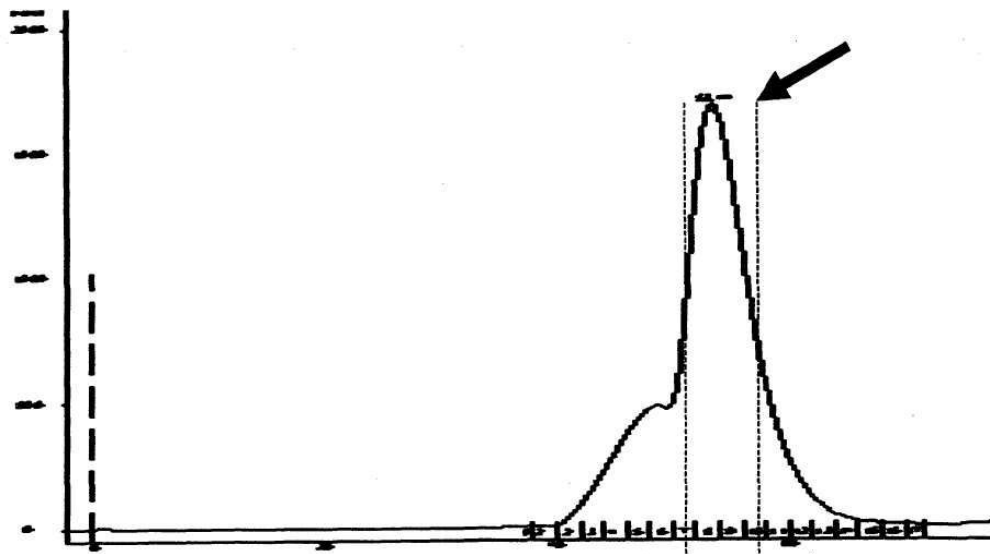
도면2a



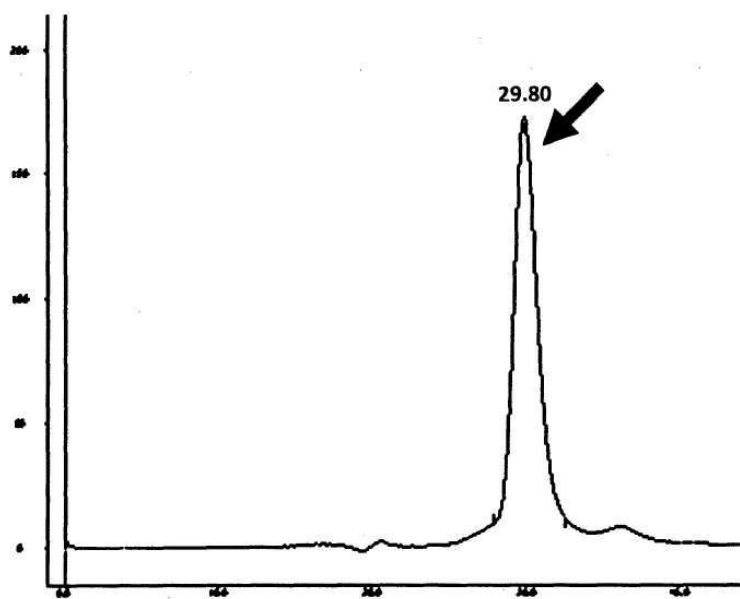
도면2b



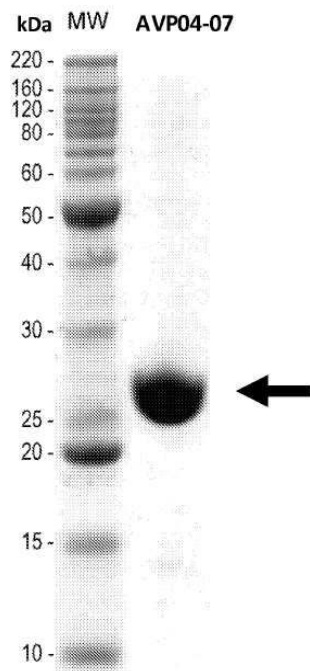
도면2c



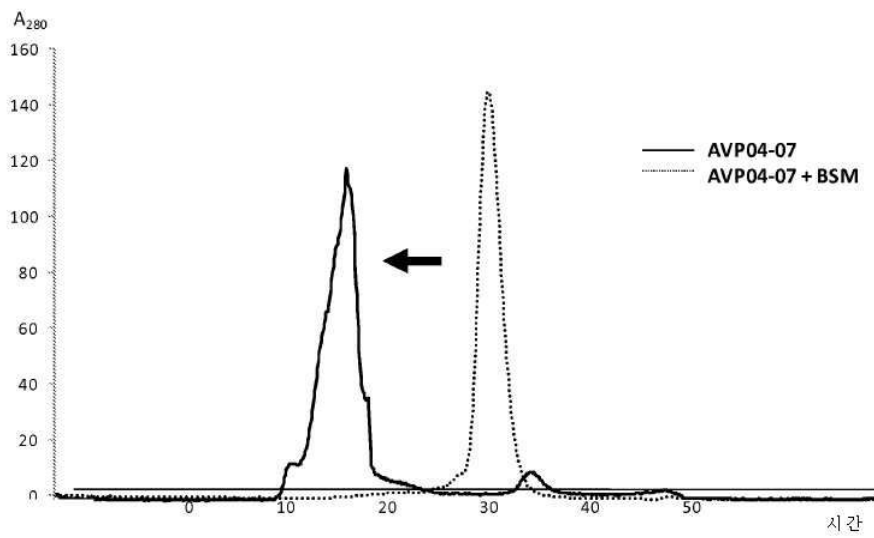
도면2d



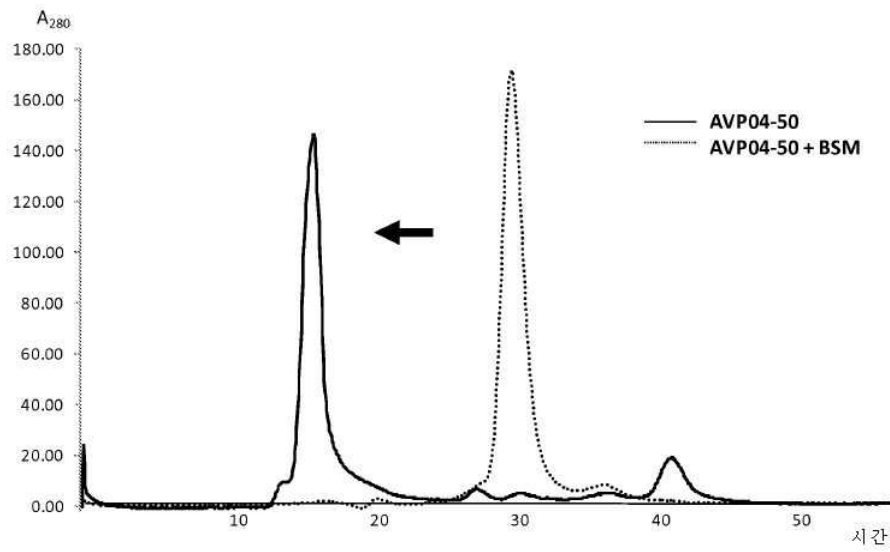
도면2e



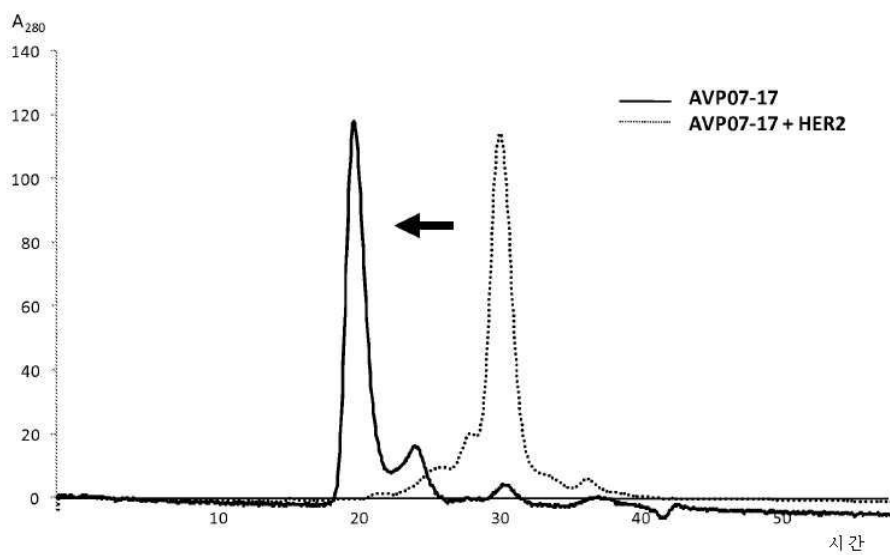
도면3a



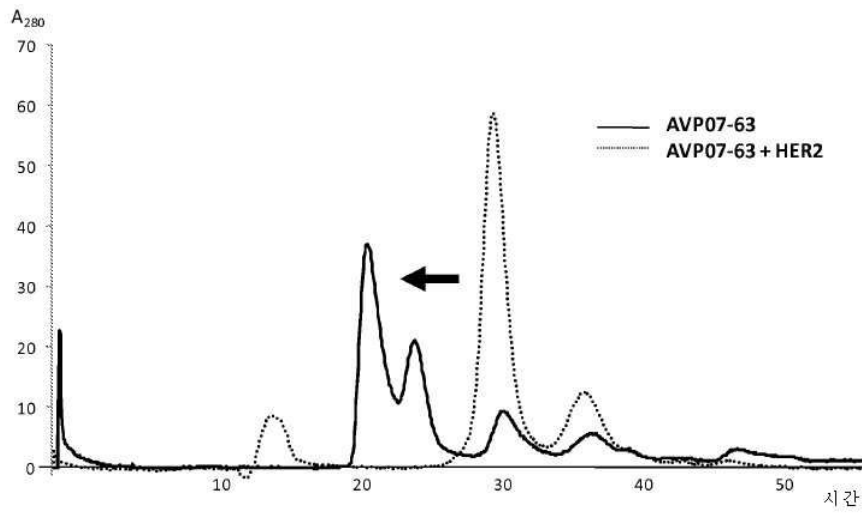
도면3b



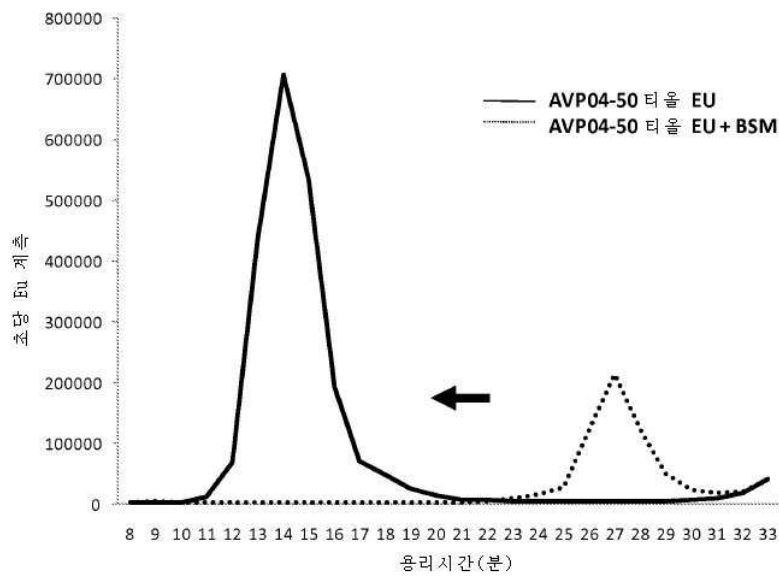
도면3c



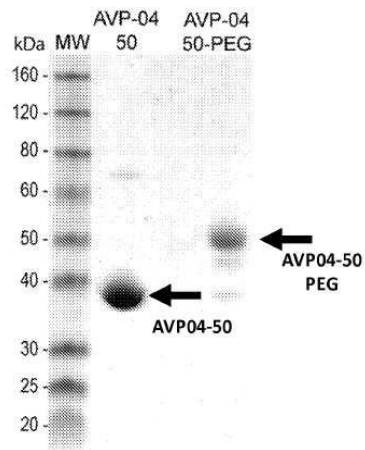
도면3d



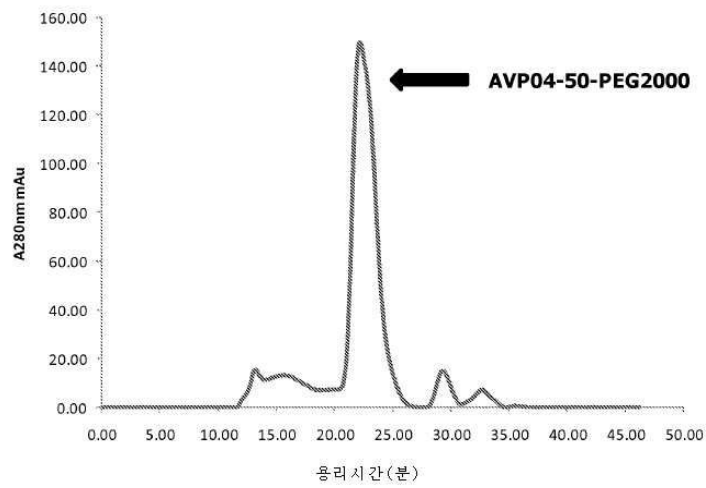
도면4



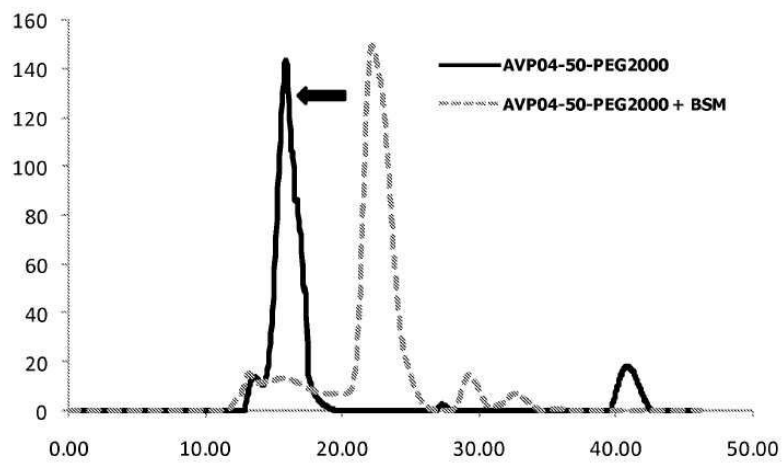
도면5a



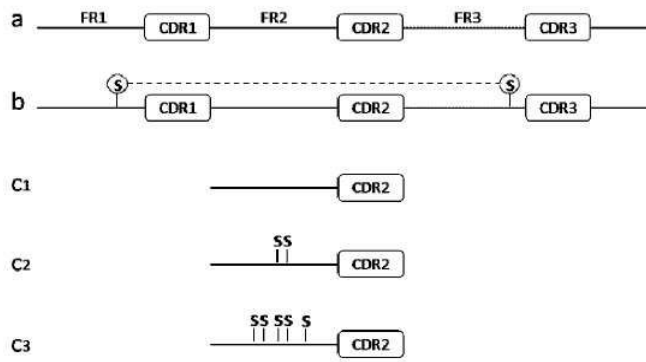
도면5b



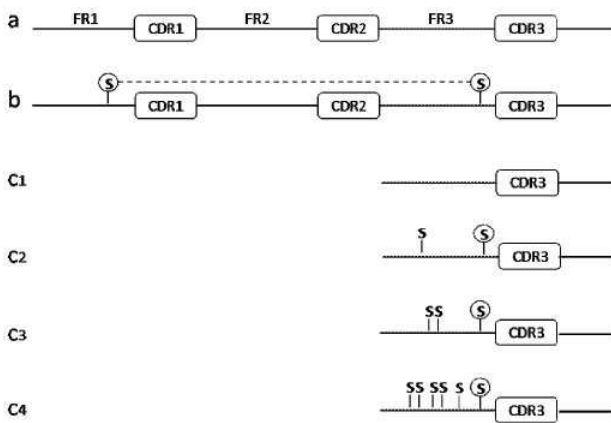
도면5c



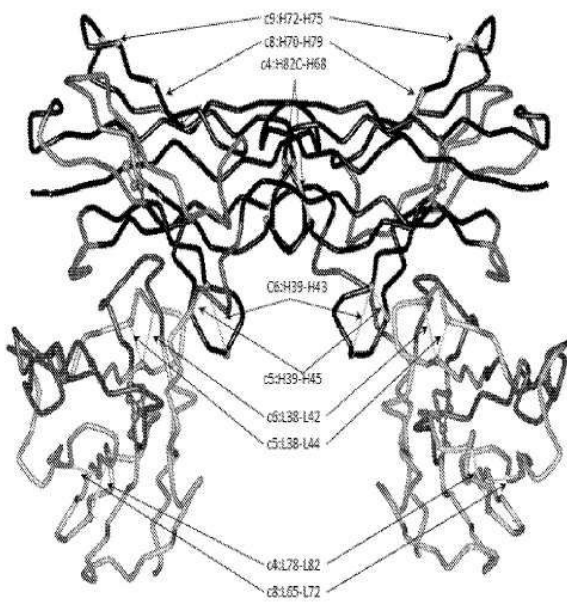
도면6a



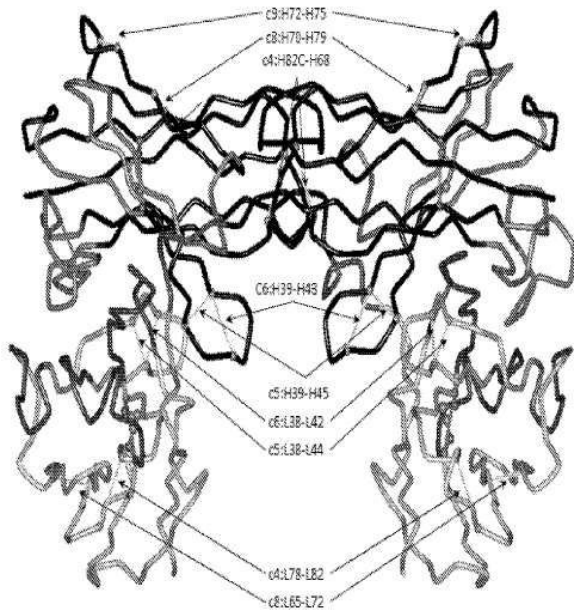
도면6b



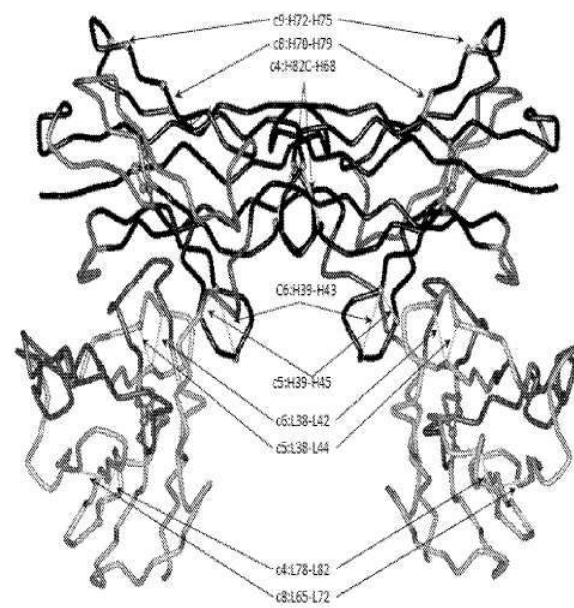
도면7



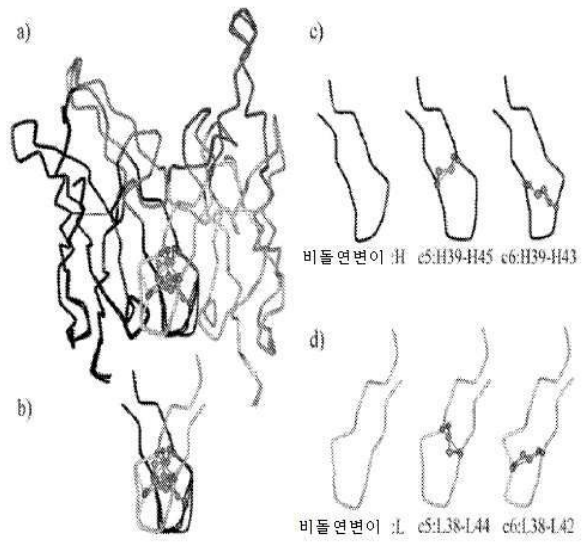
도면8



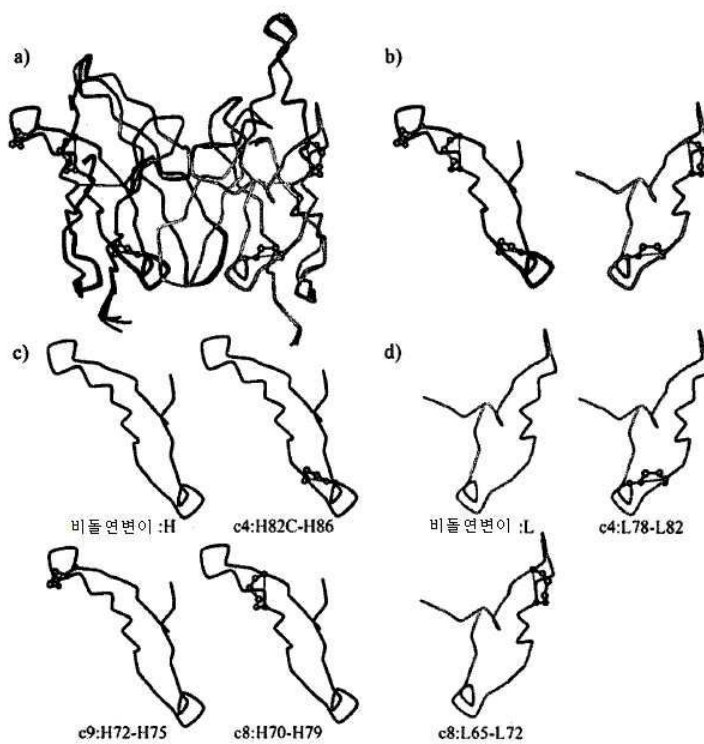
도면9



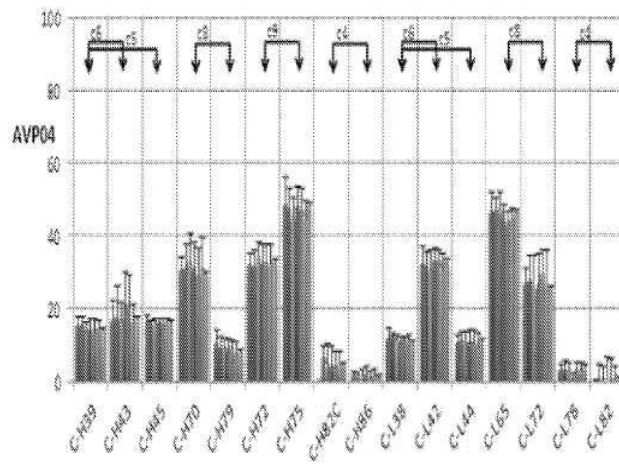
도면10a



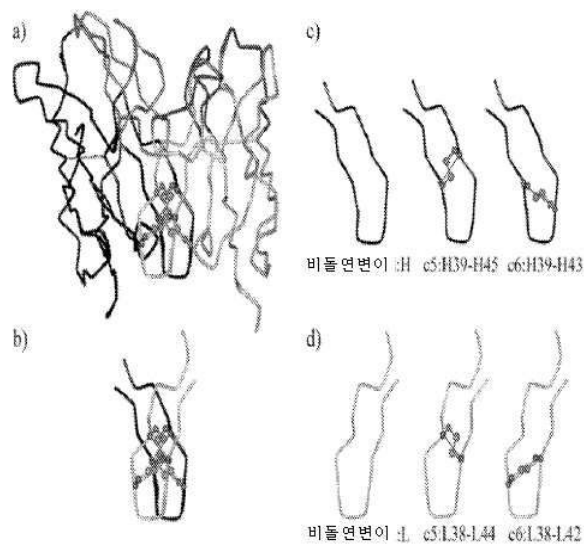
도면10b



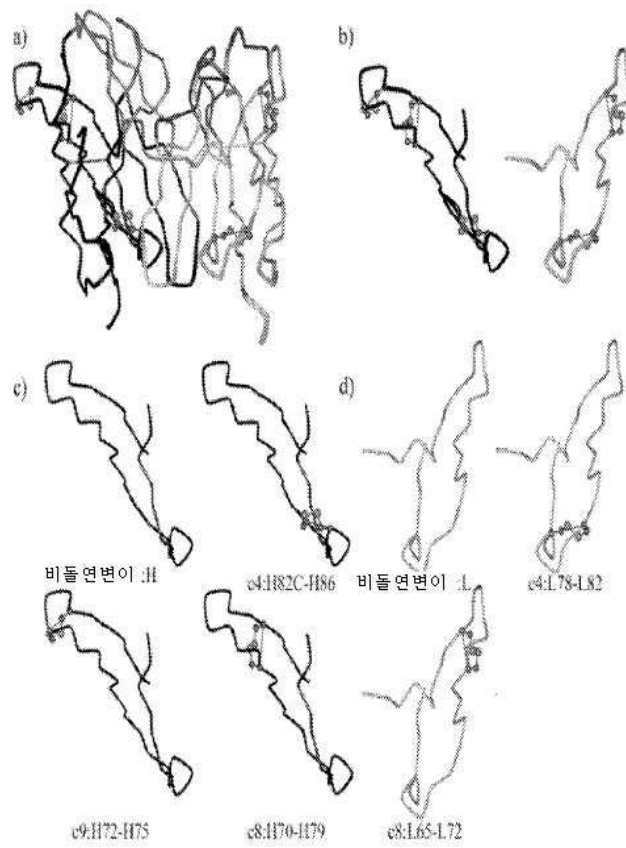
도면11



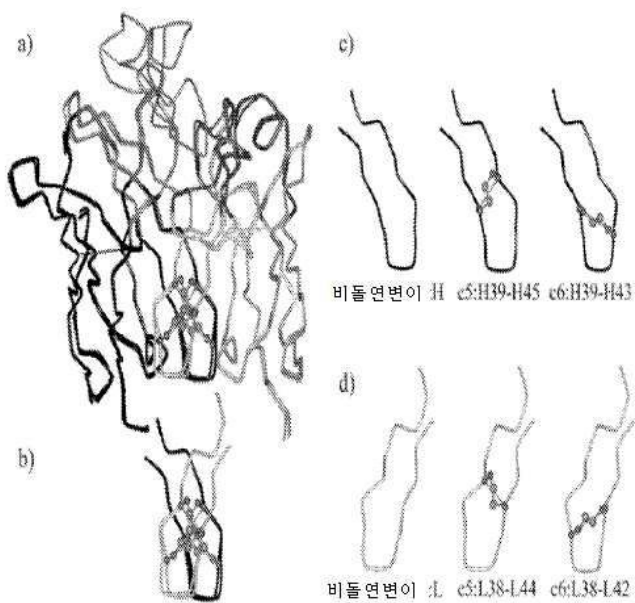
도면12a



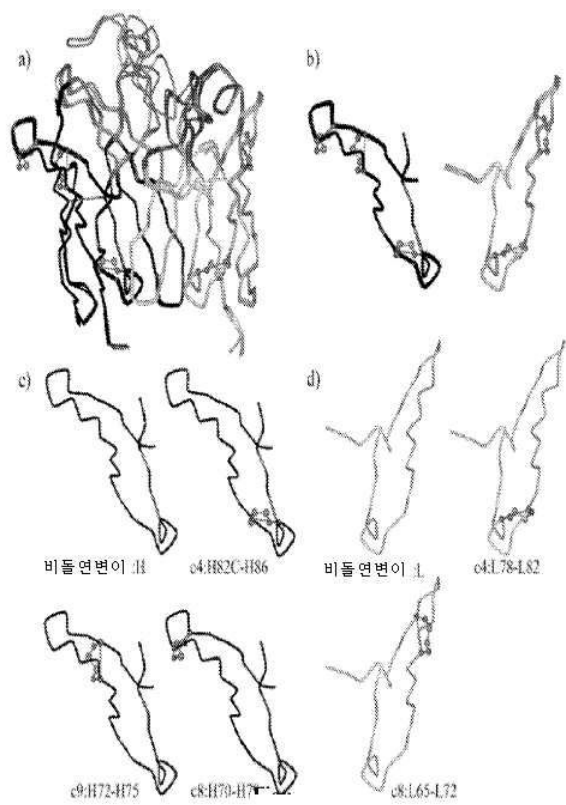
도면12b



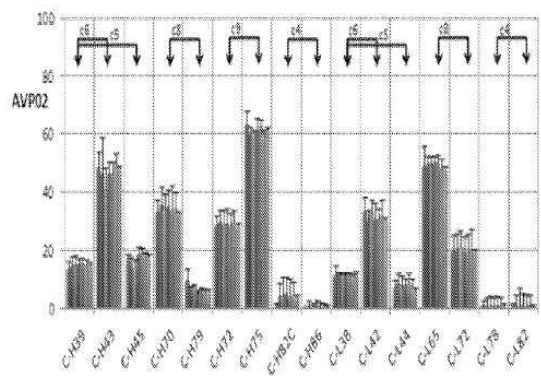
도면13a



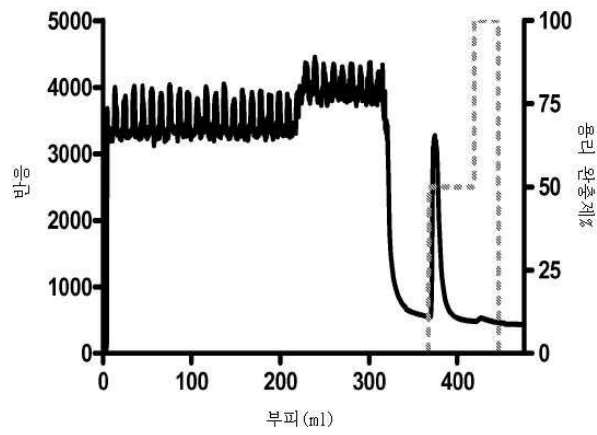
도면13b



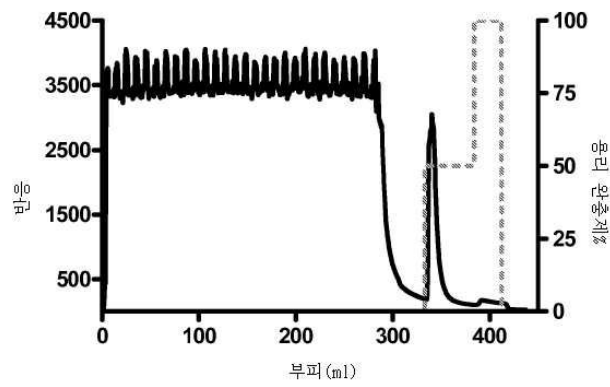
도면14



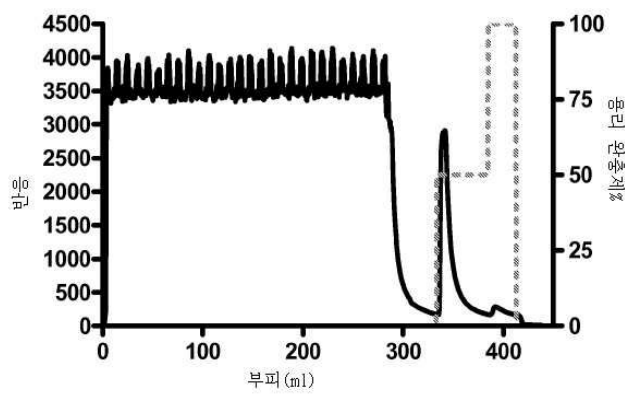
도면17a



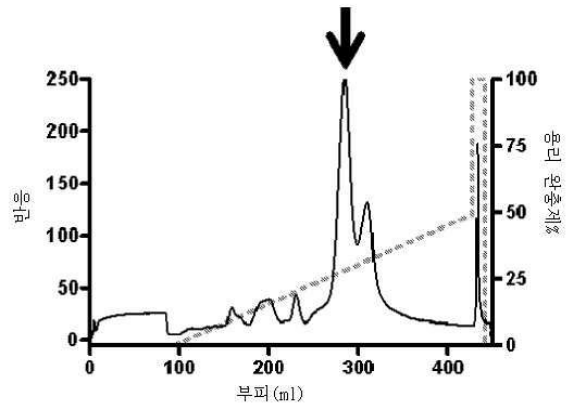
도면17b



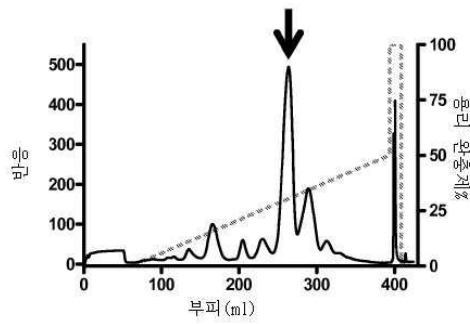
도면17c



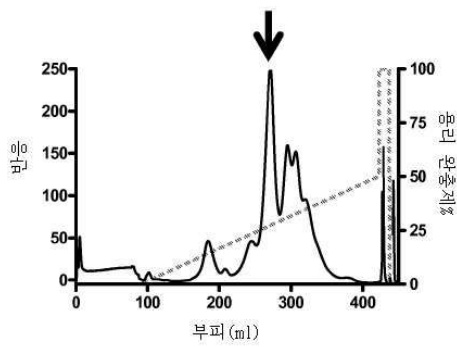
도면18a



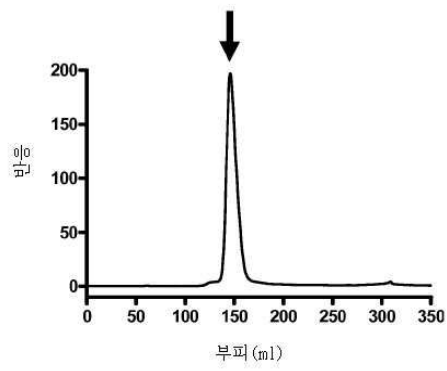
도면18b



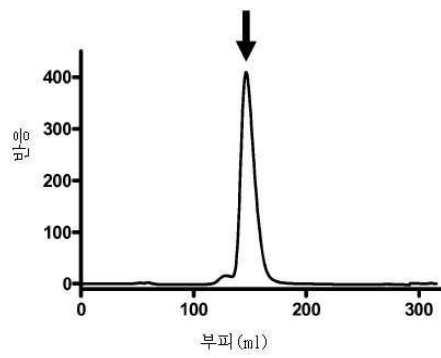
도면18c



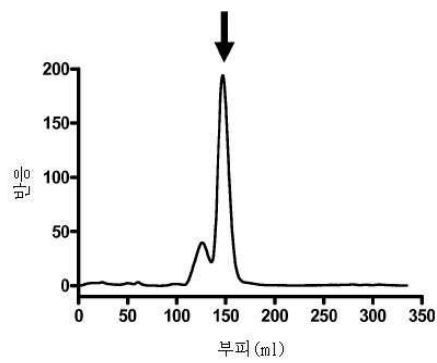
도면19a



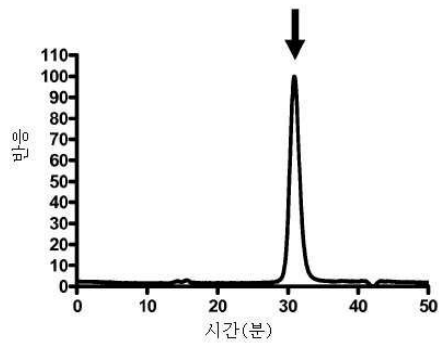
도면19b



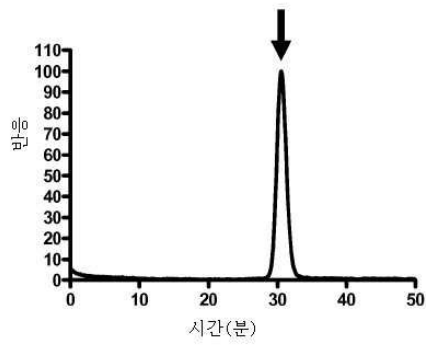
도면19c



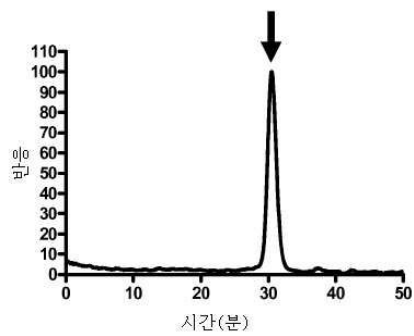
도면20a



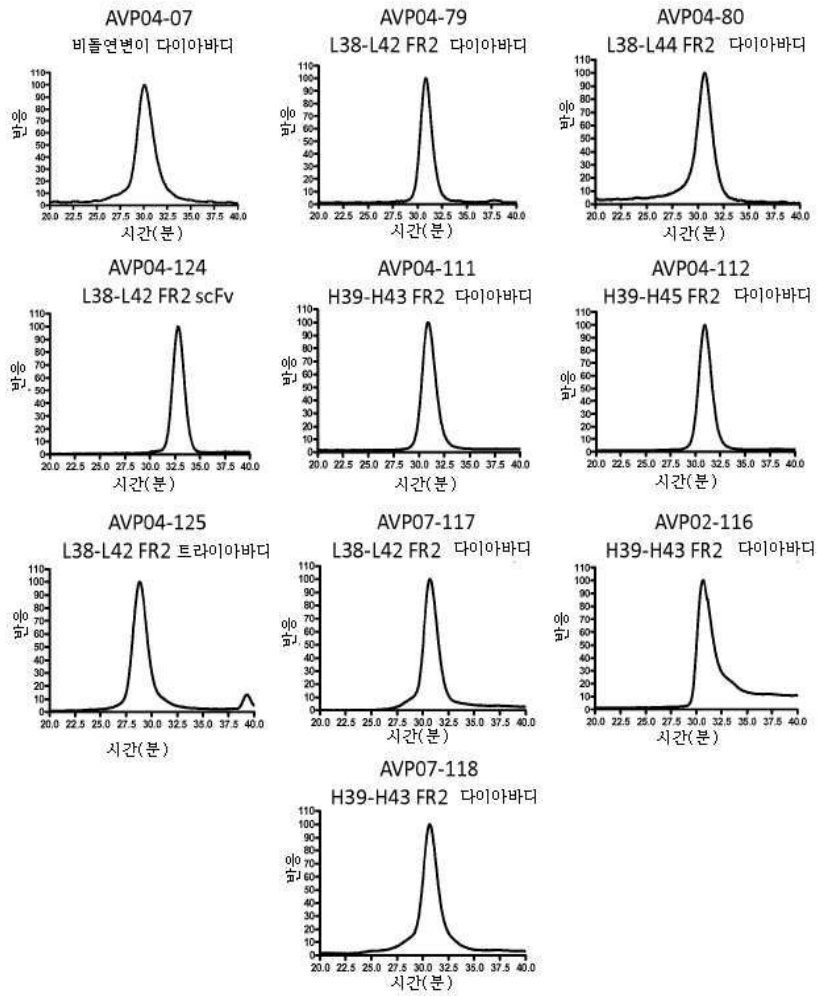
도면20b



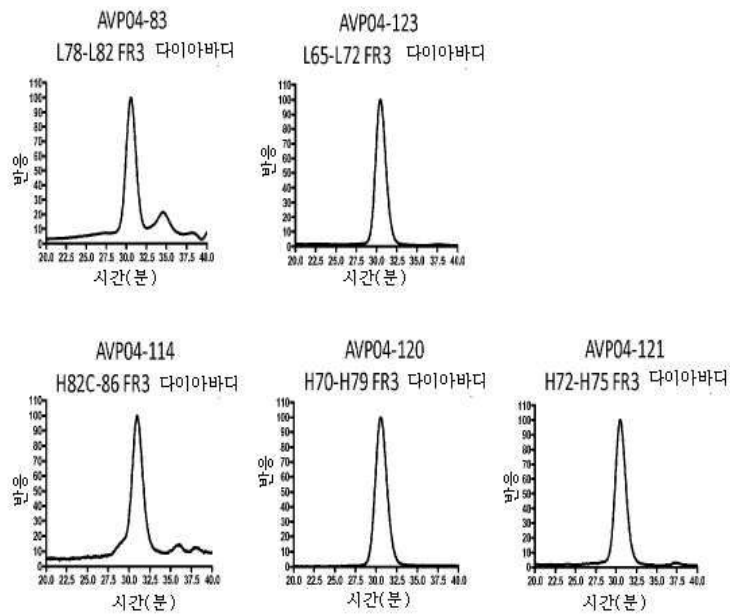
도면20c



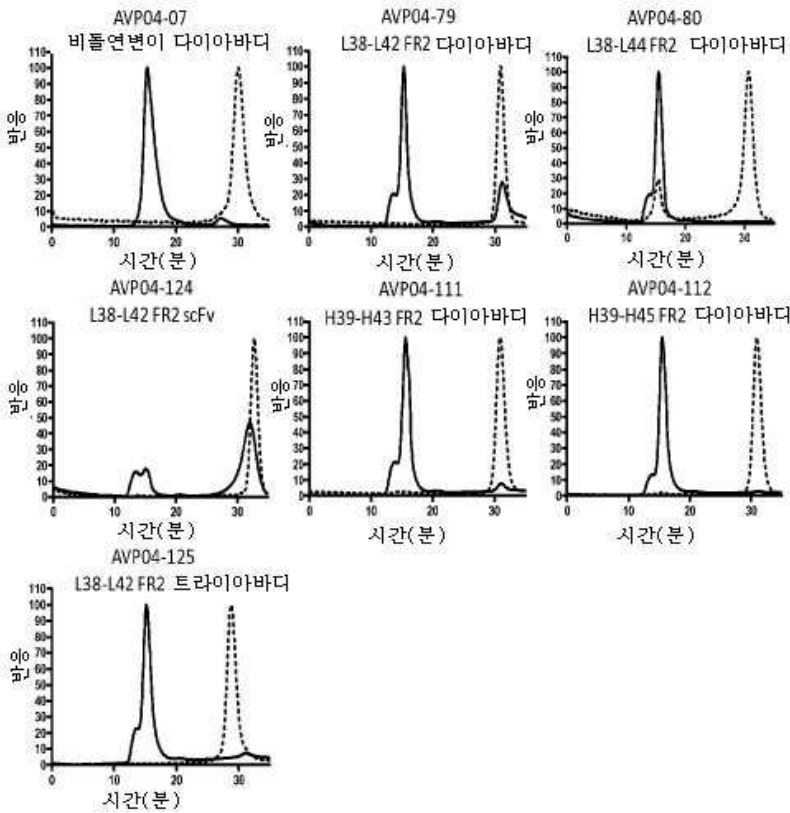
도면21a



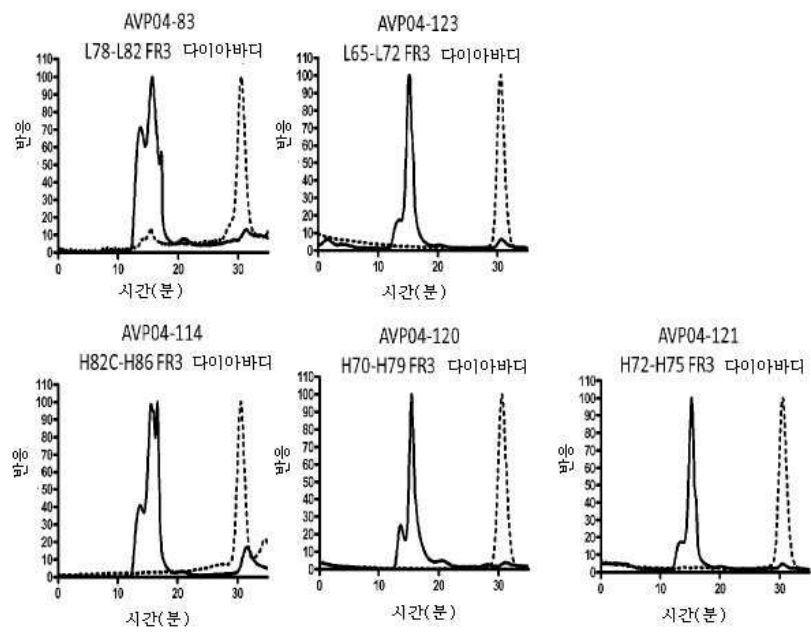
도면21b



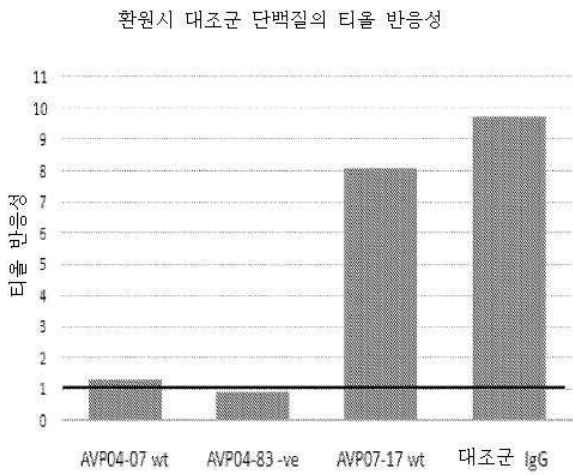
도면22a



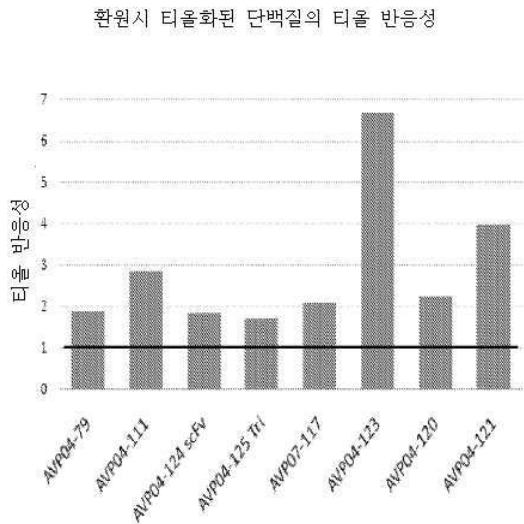
도면22b



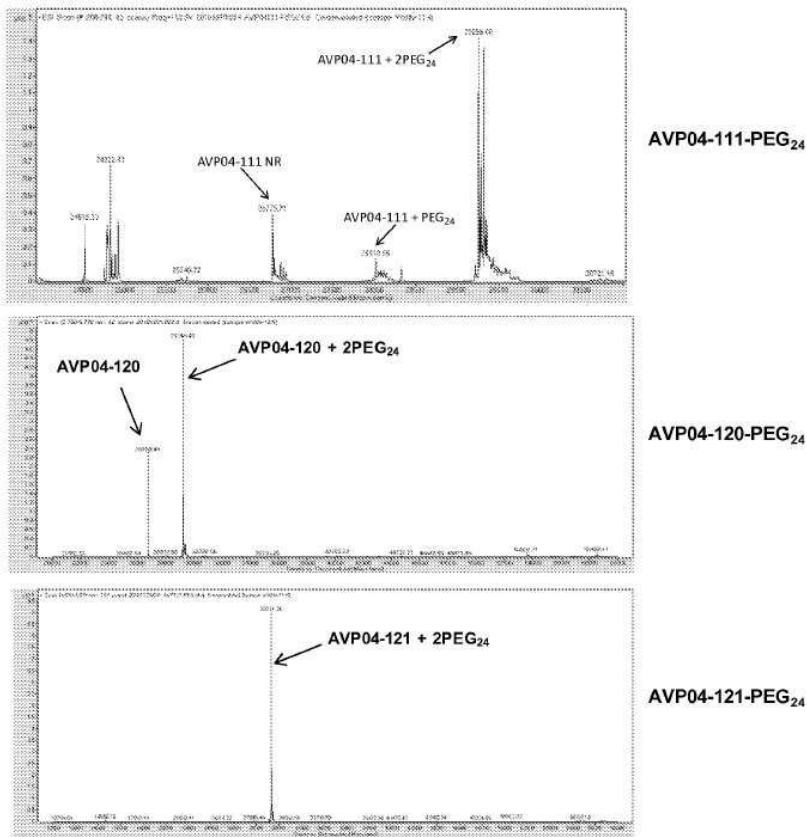
도면23a



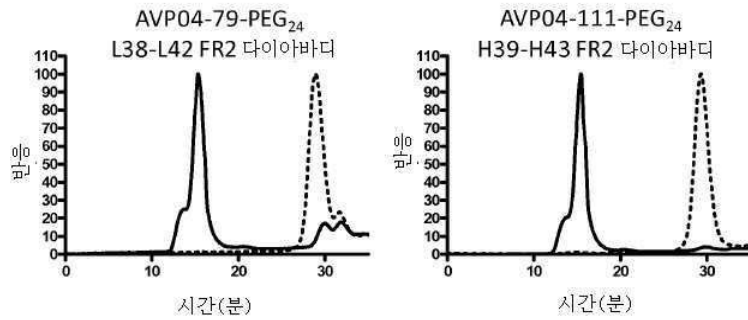
도면23b



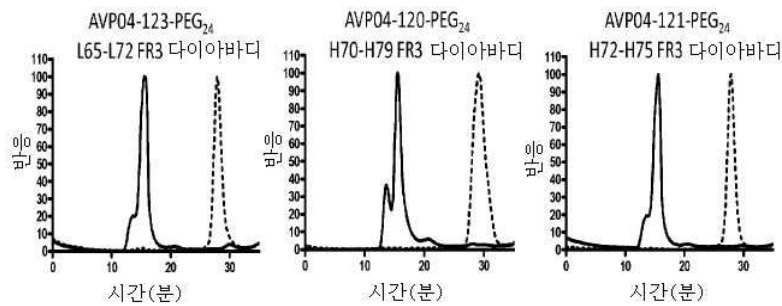
도면24



도면25a



도면25b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Avipep Pty Ltd

<120> IMMUNO-CONJUGATES AND METHODS FOR PRODUCING THEM 2

<130> 509431

<150> US61/289497

<151> 2009-12-23

<160> 157

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody heavy chain

<400> 1

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

1 5 10

<210> 2

<

211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody heavy chain

<400> 2

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

1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody heavy chain

<400> 3

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

1 5 10

<

210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody heavy chain

<400> 4

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

1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody heavy chain

<400> 5

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody heavy chain

<400> 6

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

1 5 10

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody heavy chain

<400> 7

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

1 5 10

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody heavy chain

<400> 8

Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly

1 5 10

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody kappa light chain

<400> 9

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

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody kappa light chain

<400> 10

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

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody kappa light chain

<400> 11

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

1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody kappa light chain

<400> 12

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody kappa light chain

<400> 13

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

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody kappa light chain

<400> 14

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody kappa light chain

<400> 15

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody kappa light chain

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody lambda light chain

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody lambda light chain

<400> 18

Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody lambda light chain

<400> 19

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

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody lambda light chain

<400> 20

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR2 of a human antibody lambda light chain

<400> 21

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

1 5 10 15

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 23

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu His Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 25

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 26

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 27

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 28

Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 30

<211> 33

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 30

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

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25 30

Asp

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 33

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu His Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 34

<211> 33

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 34

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys

20 25 30

Asp

<210> 35

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 35

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 36

<211> 33

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 36

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

Ile

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 37

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 38

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 38

Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 39

His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 40

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody heavy chain

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody kappa light chain

<400> 41

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody kappa light chain

<400> 42

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 43

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody kappa light chain

<400> 43

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody kappa light chain

<400> 44

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody kappa light chain

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 46

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody kappa light chain

<400> 46

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 47

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody kappa light chain

<400> 47

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 48

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody kappa light chain

<400> 48

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody lambda light chain

<400> 49

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody lambda light chain

<400> 50

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody lambda light chain

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody lambda light chain

<400> 52

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody lambda light chain

<400> 53

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

1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody lambda light chain

<400> 54

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 55

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody lambda light chain

<400> 55

Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys
 20 25 30

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> amino acid sequence of FR3 of a human antibody lambda light chain

<400> 56

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

20 25 30

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of a linker

<400> 57

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 58

<211> 711

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding AVP04-07 anti TAG72 diabody

<400> 58

caggtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt 60

agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaacagaat 120

ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat 180

aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgaccctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat 240

ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg 300

aatatggcgt attgggggtca gggcacctcg gtcaccgtga gcagcgggtgg cggcggcagc 360

gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc 420

ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg 480

tggtatcagc agaaaccggg tcagagcccg aaactgctga tttattgggc gagcacccgt 540

gaaagcggcg tgccggatcg ttttaccggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc 600

attagcagcg tggaaaccca agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat 660

ccgctgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc g 711

<210> 59

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of AVP04-07 anti-TAG72 diabody

<400> 59

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

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

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

 145 150 155 160
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 165 170 175
 Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 180 185 190
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Thr Glu Asp
 195 200 205
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe

 210 215 220
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
 225 230 235 240
 His His His His His

245

<210> 60

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding AVP07-17 anti-Her2 diabody

<400> 60

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120

cccgggaaag gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac 180

agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac 240

ttgcaatgga gcagtctgaa gccctcggac agcgccgtgt atttttgtgc gagacatgac 300

gtgggatatt gcagtagtgc caactgcgca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc 360

cagggcaccc tggtcaccgt ttctcaggt ggaggcgggt cacagtctgt gttgacgcag 420

ccgccctcag tgctcgcggc ccaggacag aaggtcacca tctcctgctc tggaagcagc 480

tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagcagc tcccaggaa agtccccaaa 540

ctcctcatct atggtcacac caatcggecc gcagggttcc ctgaccgatt ctctggctcc 600

aagtctggca cctcagcctc cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggctgat 660

tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtggttggg tgttcggcgg agggaccaag 720

ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 780

gccgcacatc accatcatca ccat 804

<210> 61

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of AVP07-17 anti-Her2 diabody

<400> 61

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45
 Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Asn Cys Ala Lys Trp
 100 105 110
 Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
 130 135 140
 Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
 145 150 155 160
 Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
 165 170 175
 Thr Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly His Thr Asn Arg Pro Ala Gly
 180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu
 195 200 205
 Ala Ile Ser Gly Phe Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala
 210 215 220
 Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 245 250 255

Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
 260 265

<210> 62
 <211> 729

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding AVP02-60 anti-MucI diabody

<400> 62

gaagtgcagc	tggttgaaag	cggatggcggga	gtggtgcagc	caggatggaag	cctgcgtctg	60
agctgcgcag	caagcgggtt	tacctttagc	agctatggca	tgagctgggt	gcgtcaggcg	120
ccggataaag	gcctggaact	ggtggcgacc	attaacagca	acggtggaag	cacctattat	180
ccggatagcg	tgaaggcg	ttttaccatt	agccgtgata	acagcaaaaa	caccctgtat	240

ctgcagatga acagcctgcg taccgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgtgatcgt	300
gatggctatg atgaaggctt tgattattgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc	360
ggtgggggcg gaagccagat tcagctgacc cagagcccg a gcagcctgag cgcaagcgtg	420
ggtgatcgtg tgaccattac ctgcagcgcg agcagcagcg tgagctatat gcattggtat	480
cagcagaaac cgggcaaagc gccgaaacgt tggatttatg ataccagcaa actggcgagc	540
ggcgtgccga gccgttttag cggcagcggc agcggcaccg attatacctt taccattagc	600
agcctgcagc cggaagatat tgcgacctat tattgccagc agtggagcag caaccgccg	660

acctttggcc agggcaccaa actgcagatt aaacgtgcgg ccgcactcga gcaccaccac 720
caccaccac 729

<210> 63

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of AVP02-60 anti-MucI diabody

<400> 63

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
 115 120 125
 Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 130 135 140
 Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
 145 150 155 160

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

Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His
 225 230 235 240
 His His His

<210> 64

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding a modified AVP07-17 anti-HER2
 diabody replacing CDR3H Cysteine residues Cys104 (Kabat numbering
 H100) and Cys109 (H100E) with Alanines and comprising a
 N-terminal serine designated AVP07-86

<400> 64

agcgtgcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tcttgaagg gtcttgata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120

ccccggaaag gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac 180

agcccgctct tccaaggcca ggtcaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac 240

ttgcaatgga gcagtcgaa gccctcggac agcgccgtgt atttttgtgc gagacatgac 300

gtgggatatg cgagtagttc caacggcgca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc 360

cagggcaccc tggtcaccgt ttcctcaggt ggaggcgggt cacagtctgt gttgacgcag 420

ccgcctcag tgtctgcggc cccaggacag aaggtcacca tctcctgctc tggaagcagc 480

tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagcagc tcccaggaa agtccccaaa 540

ctctcatct atggtcacac caatcgccc gcagggtcc ctgaccgatt ctctgctcc 600

aagtctggca cctcagctc cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggtgat 660

tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtgggttggg tgttcggcgg agggaccaag 720

ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 780

gccgcacatc accatcatca ccat 804

<210> 65

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of modified AVP07-17 anti-HER2 diabody
replacing CDR3H Cysteine residues Cys104 (Kabat numbering H100)
and Cys109 (H100E) with Alanines and comprising a N-terminal
serine designated AVP07-86

<400> 65

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Asn Ala Ala Lys Trp
100 105 110
Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
130 135 140
Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
145 150 155 160

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

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
245 250 255

Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
260 265

<210> 66

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for substituting the

N-terminal Gln residue with a Ser residue in AVP04-07

<400> 66

cccagccggc catggcgagc gtgcagctgc agcagagcg 39

<210> 67

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for substituting the

N-terminal Gln residue with a Ser residue in AVP04-07

<400> 67

cgctctgctg cagctgcacg ctgcacatgg ccggctggg 39

<210> 68

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 38 and 42 in the VL FR2 of

AVP04-07

<400> 68

cagaaaaact atctggcgtg gtatcagtc aaaccgggtt gcagcccgaa actgctgatt 60

tattgg 66

<210> 69

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 38 and 42 in the VL FR2 of

AVP04-07

<400> 69

ccaataaatc agcagtttcg ggctgcaacc cggtttgac tgataccacg ccagatagtt 60

tttctg 66

<210> 70

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 38 and 44 in the VL FR2 of
AVP04-07

<400> 70

cagaaaaact atctggcgtg gtatcagtgc aaaccgggtc agagctgcaa actgctgatt 60

tattgggcga gc 72

<210> 71

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 38 and 44 in the VL FR2 of
AVP04-07

<400> 71

gctcgcccaa taaatcagca gtttcagct ctgaccgggt ttgcactgat accagccag 60

atagtttttc tg 72

<210> 72

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 78 and 82 in the VL FR3 of
AVP04-07

<400> 72

ccgattttac cctgagcatt agcagctgcg aaaccgaatg cctggcgggtg tattattgcc 60

agcag 65

<210> 73

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 78 and 82 in the VL FR3 of
AVP04-07

<400> 73

ctgctggcaa taatacaccg ccaggcattc ggtttcgag ctgctaagc tcagggtaaa 60

atcgg 65

<210> 74

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 39 and 43 in the VH FR2 of
AVP04-07

<400> 74

cgatcatgag attcattggg tgaaatgcaa tccggaatgc ggcctggaat ggattggcta 60

tttttagc 67

<210> 75

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 39 and 43 in the VH FR2 of

AVP04-07

<400> 75

gctaaaatag ccaatccatt ccaggccgca ttccggattg catttcaccc aatgaatgc 60

atgatcg 67

<210> 76

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 39 and 45 in the VH FR2 of
AVP04-07

<400> 76

cgatcatgcg attcattggg tgaaatgcaa tccggaacag ggctgcgaat ggattggcta 60
ttttagcccg 70

<210> 77

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 39 and 45 in the VH FR2 of
AVP04-07

<400> 77

cgggctaata tagccaatcc attcgagcc ctgttcgga ttgcatttca cccaatgaat 60
cgcatgatcg 70

<210> 78

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 82C and 86 in the VH FR3 of
AVP04-07

<400> 78

gcgtatctgc agctgaacag ctgcaccagc gaatgcagcg cgggtgtattt ttgcaccc 58

<210> 79

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 82C and 86 in the VH FR3 of
AVP04-07

<400> 79

gggtgcaaaa atacaccgcg ctgcattcgc tgggtgcagct gttcagctgc agatacgc 58

<210> 80

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 70 and 79 in the VH FR3 of
AVP04-07

<400> 80

ggcaaagcga ccctgtgctgc ggataaaagc agcagcaccg cgtgcctgca gctgaacagc 60

<210> 81

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 70 and 79 in the VH FR3 of
AVP04-07

<400> 81

cgctgctaata gcacagggtta aaatcggtgc cgtaccgct gccgcaaaaa cgatec 56

<210> 82

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine
residue substitutions at positions 72 and 75 in the VH FR3 of
AVP04-07

<400> 82

ggcaaagcga ccctgaccgc gtgcaaaagc tgcagcaccg cgtatctgca gctg 54

<210> 83

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 72 and 75 in the VH FR3 of

AVP04-07

<400> 83

cagctgcaga tacgcgggtgc tgcagctttt gcacgcggtc agggtcgctt tgcc 54

<210> 84

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 65 and 72 in the VL FR3 of

AVP04-07

<400> 84

cgttttaccg gctgcggtag cggcaccgat tttgcctga gcattagc 48

<210> 85

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 65 and 72 in the VL FR3 of

AVP04-07

<400> 85

gctaattgctc aggcaaaaat cgggtgccgct accgcagccg gtaaaacg 48

<210> 86

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for modification of

linker residues of AVP04-79 for scFv expression

<400> 86

ctcggtcacc gtgagcagcg gtggcggcgg cagcgggtggc ggccggcagcg 50

<210> 87

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for modification of
linker residues of AVP04-79 for scFv expression

<400> 87

cgctgccgcc gccaccgctg ccgccccac cgctgctcac ggtgaccgag 50

<210> 88

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for modification of
linker residues of AVP04-79 for triabody expression

<400> 88

ggcacctcgg tcaccgtgag cgatatcgtg atgaccaga gc 42

<210> 89

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for modification of
linker residues of AVP04-79 for triabody expression

<400> 89

gctctgggtc atcacgatat cgctcacggt gaccgagtg cc 42

<210> 90

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for AVP07-17 anti-HER2
diabody replacing CDR3H Cysteine residues with alanines
designated AVP07-86

<400>

> 90

cccagccggc catggcgagc gtgcagctgg tgcagtctg 39

<210> 91

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for AVP07-17 anti-HER2
diabody replacing CDR3H Cysteine residues with alanines
designated AVP07-86

<400> 91

cagactgcac cagctgcacg ctgccatgg ccggctggg 39

<210> 92

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 38 and 42 in the VL FR2 of
AVP02-60

<400> 92

cgtgagctat atgcattggt atcagtcaa accgggctgc gcgccgaaac gttggattta 60

tgatac 66

<210> 93

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 38 and 42 in the VL FR2 of
AVP02-60

<400> 93

glatcataaa tccaacgttt cggcgcgag cccggtttgc actgatacca atgcatatag 60

ctcacg 66

<210> 94

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 39 and 43 in the VH FR2 of
AVP02-60

<400> 94

ctatggcatg agctgggtgc gttgcgcgcc ggattgcggc ctggaactgg tggcg 55

<210> 95

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 39 and 43 in the VH FR2 of
AVP02-60

<400> 95

cgccaccagt tccaggccgc aatccggcgc gcaacgcacc cagctcatgc catag 55

<210> 96

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 38 and 42 in the VL FR2 of
AVP07-86

<400> 96

gggaataatt atgtatcctg gtaccagtgc ctcccaggat gcgtcccaa actcctcatc 60

tatgg 65

<210> 97

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 38 and 42 in the VL FR2 of
AVP07-86

<400> 97

ccatagatga ggagtttggg gacgcatcct gggaggcact ggtaccagga tacataatta 60

ttccc 65

<210> 98

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 39 and 43 in the VH FR2 of
AVP07-86

<400> 98

ggatcgctg ggtgcgctgc atgcccggt gcggcctgga gtacatgggg c 51

<210> 99

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of mutagenic primer for introducing cysteine

residue substitutions at positions 39 and 43 in the VH FR2 of
AVP07-86

<400> 99

gccccatgta ctccaggccg caccgggca tgcagcgac ccaggcgatc c 51

<210> 100

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine

replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42
designated AVP04-79.

<400> 100

agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt 60

agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaacagaat 120

ccggaacagg gcctggaatg gattggctat ttagcccg gcaacgatga ttttaaatat 180

aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgaccctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat 240

ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg 300

aatatggcgt attgggggtca gggcacctcg gtcaccgtga gcagcgggtgg cggcggcagc 360

gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc 420

ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg 480

tggtatcagt gcaaaccggg ttgcagcccg aaactgctga tttattgggc gagcaccgt 540

gaaagcggcg tgccgatcg ttttaccggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc 600
attagcagcg tggaaaccga agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat 660

ccgctgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac 720
caccaccacc accac 735

<210> 101

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42
designated AVP04-79.

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro

115 120 125

Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys

130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala

145 150 155 160
 Trp Tyr Gln Cys Lys Pro Gly Cys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 165 170 175
 Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 180 185 190
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Thr Glu Asp
 195 200 205

Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
 210 215 220
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
 225 230 235 240
 His His His His His
 245

<210> 102

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine
 replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 44 is

designated AVP04-80.

<400> 102

agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt	60
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaacagaat	120
ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat	180
aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgacctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat	240
ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt attttgcac ccgtagcctg	300
aatatggcgt attggggta gggcacctcg gtcaccgtga gcagcggtagg cggcggcagc	360
gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggca aaaagtgacc	420
ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg	480
tggtatcagt gcaaaccggg tcagagctgc aaactgctga tttattgggc gagcaccgt	540
gaaagcggcg tgccgatcg tttaccggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc	600
attagcagcg tggaaccga agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat	660

ccgctgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac 720

caccaccacc accac 735

<210> 103

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 44 is designated AVP04-80.

<400> 103

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro

115 120 125

Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys

130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala

145 150 155 160

Trp Tyr Gln Cys Lys Pro Gly Gln Ser Cys Lys Leu Leu Ile Tyr Trp

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

225 230 235 240
His His His His His
245

<210> 104

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VL FR3 Kabat positions 78 and 82 designated AVP04-83.

<400> 104

agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt 60

agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcatgtgggt gaaacagaat 120

ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat 180

aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgacctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat 240

ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt attttgcac ccgtagcctg 300

aatatggcgt attggggtea gggcacctcg gtcaccgtga gcagcgggtg cggcggcagc 360

gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc 420

ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg 480

tggtatcagc agaaaccggg tcagagcccg aaactgctga tttattgggc gagcacccgt 540

gaaagcggcg tgccgatcg ttttaccggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc 600

attagcagct gcgaaaccga atgcctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat 660

ccgctgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac 720

caccaccacc accac 735

<210> 105

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VL FR3 Kabat positions 78 and 82

designated AVP04-83.

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Ala Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro

115 120 125

Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys

130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala

145 150 155 160

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp

165 170 175

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe

210 215 220

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His

225 230 235 240

His His His His His

245

<210> 106

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine

replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 43
designated AVP04-111.

<400> 106

agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt 60

agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaatgcaat 120

ccggaatcgc gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat 180

aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgaccctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat 240

ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg 300

aatatggcgt attgggggtca gggcacctcg gtcaccgtga gcagcgggtgg cggcggcagc 360

gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc 420

ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg 480

tggtatcagc agaaaccggg tcagagcccg aaactgctga tttattgggc gagcaccctg 540

gaaagcggcg tgccggtatg ttttaccggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc 600

attagcagcg tggaaccga agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat 660

ccgctgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac 720

caccaccac accac 735

<210> 107

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 43 designated AVP04-111.

<400> 107

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Cys Asn Pro Glu Cys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro

115 120 125

Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys

130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala

145 150 155 160

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp

165 170 175

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly

180 185 190

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

195	200	205	
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe			
210	215	220	
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His			
225	230	235	240
His His His His His			
	245		
<210> 108			
<211> 735			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 45 designated AVP04-112.			
<400> 108			
agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt	60		
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaatgcaat	120		
ccggaacagg gctgcgaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat	180		
aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgacctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat	240		
ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg	300		
aatatggcgt attggggta gggcacctcg gtcaccgtga gcagcgggtg cggcggcagc	360		
gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc	420		
ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg	480		
tggtatcagc agaaaccggg tcagagcccg aaactgctga tttattgggc gagcacccgt	540		
gaaagcggcg tgccggatcg ttttaccggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc	600		
attagcagcg tggaaaccga agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat	660		
ccgctgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcagacac	720		
caccaccacc accac	735		
<210> 109			
<211> 245			
<212> PRT			
<213> Artificial			

<220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 45

designated AVP04-112.

<400> 109

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Cys Asn Pro Glu Gln Gly Cys Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro

115 120 125

Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys

130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala

145 150 155 160

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp

165 170 175

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe

210 215 220
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
 225 230 235 240
 His His His His His
 245
 <210> 110
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine
 replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 82C and 86
 designated AVP04-114
 <400> 110
 agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt 60
 agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaacagaat 120
 ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat 180
 aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgaccctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat 240
 ctgcagctga acagctgcac cagcgaatgc agcgcggtgt attttgcac ccgtagcctg 300
 aatatggcgt attgggggtca gggcacctcg gtcaccgtga gcagcgggtgg cggcggcagc 360
 gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc 420
 ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg 480
 tggatcagc agaaaccggg tcagagcccg aaactgctga tttattgggc gagcaccctg 540
 gaaagcggcg tgccggatcg ttttaccggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc 600
 attagcagcg tggaaccga agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat 660
 ccgctgacct ttggtgcggg caccaaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac 720
 caccaccacc accac 735
 <210> 111
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine
 replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 82C and 86

designated AVP04-114.

<400> 111

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Cys Thr Ser Glu Cys Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro

115 120 125

Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys

130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala

145 150 155 160

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp

165 170 175

Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe

210 215 220

Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His

225	230	235	240
His His His His His			
	245		
<210>	112		
<211>	735		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223>	nucleotide sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 70 and 79 designated AVP04-120		
<400>	112		
agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt			60
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaacagaat			120
ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccg gcaacgatga ttttaaatat			180
aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgaccctg tgcgcggata aaagcagcag caccgcgtgc			240
ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg			300
aatatggcgt attggggta gggcacctcg gtcaccgtga gcagcgggtgg cggcggcagc			360
gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc			420
ctgagctgca aaagcagcca gaggctgtg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg			480
tggtatcagc agaaaccggg tcagagcccg aaactgctga tttattgggc gagcacccgt			540
gaaagcggcg tgccggatcg ttttacggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc			600
attagcagcg tggaaccga agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat			660
ccgtgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac			720
caccaccacc accac			735
<210>	113		
<211>	245		
<212>	PRT		
<213>	Artificial		
<220><223>	amino acid sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 70 and 79 designated AVP04-120		
<400>	113		

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

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Cys Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Cys
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
 115 120 125

 Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys
 130 135 140
 Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
 145 150 155 160
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 165 170 175
 Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 180 185 190

 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Thr Glu Asp
 195 200 205
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
 210 215 220
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
 225 230 235 240
 His His His His His
 245

<210> 114

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine

replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 72 and 75
designated AVP04-121

<400> 114

```

agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt      60
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcatgggt gaaacagaat      120
ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat      180
aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgacctg accgcgtgca aaagctgcag caccgcgtat      240
ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg      300
aatatggcgt attggggta gggcacctcg gtcaccgtga gcagcggtgg cggcggcagc      360

gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc      420
ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg      480
tggtatcagc agaaaccggg tcagagcccg aaactgctga tttattgggc gagcacccgt      540
gaaagcggcg tgccgatcg ttttaccggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc      600
attagcagcg tggaaccga agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat      660
ccgctgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac      720
caccaccacc accac                                          735

```

<210> 115

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine

replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 72 and 75
designated AVP04-121

<400> 115

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

1 5 10 15

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

20	25	30
Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe		
50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Cys Lys Ser Cys Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
85	90	95
Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr		
100	105	110
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro		
115	120	125
Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys		
130	135	140
Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala		
145	150	155
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp		
165	170	175
Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly		
180	185	190
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Thr Glu Asp		
195	200	205
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe		
210	215	220
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His		
225	230	235
His His His His His		
245		
<210> 116		
<211> 735		

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VL FR3 Kabat positions 65 and 72 designated AVP04-123.

<400> 116

```

agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt      60
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaacagaat      120

ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat      180
aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgacctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat      240
ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg      300
aatatggcgt attggggica gggcacctcg gtcaccgtga gcagcggagg cggcggcagc      360
gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc      420
ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg      480
tggtatcagc agaaaccggg tcagagcccg aaactgctga tttattgggc gagcacccgt      540

gaaagcggcg tgccgatcg ttttaccggc tgcggtagcg gcaccgattt ttgcctgagc      600
attagcagcg tggaaccga agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat      660
ccgctgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac      720
caccaccacc accac                                     735

```

<210> 117

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VL FR3 Kabat positions 65 and 72 designated AVP04-123.

<400> 117

```

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

```

35 40 45
 Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
 115 120 125

Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys
 130 135 140
 Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
 145 150 155 160
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
 165 170 175
 Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Cys Gly
 180 185 190

Ser Gly Thr Asp Phe Cys Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Thr Glu Asp
 195 200 205
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
 210 215 220
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His
 225 230 235 240
 His His His His His
 245

<210> 118

<211> 765

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 scFv comprising cysteine

replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42
designated AVP04-124

<400> 118

```

agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt      60
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaacagaat      120
ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat      180
aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgaccctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat      240
ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg      300
aatatggcgt attgggggtca gggcacctcg gtcaccgtga gcagcgggtgg cggcggcagc      360

ggtggcggcg gcagcgggtgg cggcggcagc gatatcgtga tgaccagag cccgagcagc      420
ctgccggtga gcgtgggcga aaaagtgacc ctgagctgca aaagcagcca gaccctgctg      480
tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg tggatcagt gcaaaccggg ttgcagcccg      540
aaactgctga tttattgggc gagcacccgt gaaagcggcg tgccggatcg ttttaccggc      600
agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc attagcagcg tggaaccga agatctggcg      660
gtgtattatt gccagcagta ttagctat ccgtgacct ttggtgcggg caccaaactg      720
gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac caccaccacc accac                      765

```

<210> 119

<211> 260

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 scFv comprising cysteine

replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42
designated AVP04-124.

<400> 119

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser
130 135 140

Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser
145 150 155 160

Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp
165 170 175

Tyr Gln Cys Lys Pro Gly Cys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala
180 185 190

Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser
195 200 205

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Glu Thr Glu Asp Leu
210 215 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
225 230 235 240

Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His
245 250 255

His His His His
260

<210> 120

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-TAG72 triabody comprising cysteine replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42 designated AVP04-125.

<400> 120

```
caggtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt      60
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaacagaat      120
ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat      180
aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgaccctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat      240
ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg      300
aatatggcgt attgggggtca gggcacctcg gtcaccgtga gcgatatcgt gatgaccag      360
agcccagca gcctgccggt gagcgtgggc gaaaaagtga ccctgagctg caaaagcagc      420
```

```
cagagcctgc tglatagcgg caatcagaaa aactatctgg cgtggtatca gtgcaaaccg      480
ggttgagcc cgaaactgct gatttattgg gcgagcaccg gtgaaagcgg cgtgccggat      540
cgttttaccg gcagcggtag cggcacccgat ttacctga gcattagcag cgtggaaacc      600
gaagatctgg cggtgtatta ttgccagcag tattatagct atccgctgac ctttgggtgcg      660
ggcaccaaac tgggtctgaa acgtgcggcc gactcgagc accaccacca ccaccac      717
```

<210> 121

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-TAG72 triabody comprising cysteine

replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42
designated AVP04-125

<400> 121

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

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

 Val Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser
 115 120 125
 Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 130 135 140
 Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Cys Lys Pro
 145 150 155 160
 Gly Cys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 165 170 175

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

<210> 122

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
 replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42
 designated AVP02-115

<400> 122

agcgtgcagc tggttgaaag cgggtggcga gtggtgcagc caggtggaag cctgcgtctg 60

agctgcgcag caagcggttt taccttttagc agctatggca tgagctgggt gcgtcaggcg 120
ccggataaag gcctggaact ggtggcgacc attaacagca acggtggaag cacctattat 180
ccggatagcg tgaagggccg ttttaccatt agccgtgata acagcaaaaa caccctgtat 240

ctgcagatga acagcctgcg taccgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgtgatcgt 300
gatggctatg atgaaggctt tgattattgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
ggtgggggcg gaagccagat tcagctgacc cagagcccga gcagcctgag cgcaagcgtg 420
ggtgatcgtg tgaccattac ctgcagcgcg agcagcagcg tgagctatat gcattggtat 480
cagtgc aaac cgggctgcgc gccgaaacgt tggatttatg ataccagcaa actggcgagc 540
ggcgtgccga gccgttttag cggcagcggc agcggcaccg attatacctt taccattagc 600
agcctgcagc cggaagatat tgcgacctat tattgccagc agtggagcag caaccgccc 660

acctttggcc agggcaccaa actgcagatt aaacgtgcgg ccgcactcga gcaccaccac 720
caccaccac 729

<210> 123

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42
designated AVP02-115

<400> 123

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
145 150 155 160
Gln Cys Lys Pro Gly Cys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
165 170 175
Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
180 185 190
Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln
210 215 220
Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His
225 230 235 240
His His His

<210> 124

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 43
designated AVP02-116.

<400> 124

agcgtgcagc tgggtgaaag cgggtggcga gtggtgcagc caggtggaag cctgcgtctg 60
agctgcgcag caagcggttt tacctttagc agctatggca tgagctgggt gcgttgcgcg 120
ccggtattgcg gcctggaact ggtggcgacc attaacagca acggtggaag cacctattat 180

ccggaatagcg tgaaggccg ttttaccatt agccgtgata acagcaaaaa caccctgtat 240
ctgcagatga acagcctgcg taccgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgtgatcgt 300
gatggctatg atgaaggctt tgattattgg ggccaggga ccctggtgac cgtgagcagc 360
ggtaggggagc gaagccagat tcagctgacc cagagccga gcagcctgag cgcaagcgtg 420

ggtagatcgtg tgaccattac ctgcagcgcg agcagcagcg tgagctatat gcattggtat 480
cagcagaaac cgggcaaagc gccgaaacgt tggatttatg ataccagcaa actggcgagc 540
ggcgtgccga gccgttttag cggcagcggc agcggcaccg attatacctt taccattagc 600
agcctgcagc cggaagatat tgcgacctat tattgccagc agtggagcag caaccgcgcg 660
acctttggcc agggcaccaa actgcagatt aaacgtgcgg ccgcactcga gcaccaccac 720
caccaccac 729

<210> 125

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 43
designated AVP02-116.

<400> 125

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Cys Ala Pro Asp Cys Gly Leu Glu Leu Val

35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln
 115 120 125
 Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 130 135 140
 Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
 145 150 155 160
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser

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

225 230 235 240
 His His His

<210> 126

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
 replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42
 designated AVP07-117.

<400> 126

agcgtgcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gtcttgata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac 180
 agccccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac 240
 ttgcaatgga gcagtctgaa gccctcgac agcgccgtgt attttgtgc gagacatgac 300

gtgggatatg cgagtagttc caacgcggca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc 360
cagggcacc caggcaccgt ttcctcaggt ggaggcggtt cacagtctgt gttgacgcag 420
ccgcctcag tgtctgcggc cccaggacag aaggtcacca tctcctgctc tggaagcagc 480
tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagtgcc tcccaggatg cgtcccaaaa 540
ctctcatct atggtcacac caatcggccc gcaggggtcc ctgaccgatt ctctggtccc 600

aagtctggca cctcagcctc cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggtgat 660
tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtgggttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 780
gccgcacatc accatcatca ccat 804

<210> 127

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 42

designated AVP07-117.

<400> 127

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Asn Ala Ala Lys Trp

100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115	120	125	
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val			
130	135	140	
Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser			
145	150	155	160
Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Cys Leu Pro Gly			
165	170	175	
Cys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly His Thr Asn Arg Pro Ala Gly			
180	185	190	
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu			
195	200	205	
Ala Ile Ser Gly Phe Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala			
210	215	220	
Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys			
225	230	235	240
Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu			
245	250	255	
Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His			
260	265		
<210> 128			
<211> 804			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220><223> nucleotide sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine			
replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 43			
designated AVP07-118.			
<400> 128			
agcgtgcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60		
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgctgcatg	120		
cccggtgcg gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac	180		
agcccgctcct tccaaggcca gggtcaccatc tcagtcgaca agtcgcgtcag cactgcctac	240		

ttgcaatgga gcagtcctgaa gccctcggac agcgccgtgt atttttgtgc gagacatgac 300
gtgggatatg cgagtagttc caacgcggca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc 360
cagggcaccg tggtcaccgt ttctcaggt ggaggcggtt cacagtctgt gttgacgcag 420
ccgcctcag tgctcgggc ccaggacag aaggtcacca tctcctgctc tggaagcagc 480
tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagcagc tcccaggaac agtcccaaa 540
ctctcatct atggtcacac caatcggcc gcaggggtcc ctgaccgatt ctctggtcc 600

aagtctggca cctcagcctc cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggctgat 660
tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtggttggg tggtcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 780
gccgcacatc accatcatca ccat 804

<210> 129

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 43

designated AVP07-118.

<400> 129

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Cys Met Pro Gly Cys Gly Leu Glu Tyr Met

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Asn Ala Ala Lys Trp

100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
130 135 140

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
165 170 175

Thr Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly His Thr Asn Arg Pro Ala Gly
180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu
195 200 205

Ala Ile Ser Gly Phe Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
245 250 255

Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
260 265

<210> 130

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 44
designated AVP02-126

<400> 130

agcgtgcagc tggttgaaag cgggtggcgga gtggtgcagc cagggtggaag cctgcgtctg 60
agctgcgcag caagcggttt tacctttagc agctatggca tgagctgggt gcgtcaggcg 120
ccggataaag gcctggaact ggtggcgacc attaacagca acggtggaag cacctattat 180

ccggaatagcg tgaaggccg ttttaccatt agccgtgata acagcaaaaa caccctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg taccgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgtgatcgt 300
 gatggctatg atgaaggctt tgattattgg ggccaggga ccctggtagc cgtgagcagc 360
 ggtgggggcg gaagccagat tcagctgacc cagagcccga gcagcctgag cgcaagcgtg 420
 ggtgatcgtg tgaccattac ctgcagcgcg agcagcagcg tgagctatat gcattggtat 480
 cagtgcaaac cgggcaaagc gtgcaaacgt tggatttatg ataccagaa actggcgagc 540
 ggcgtgccga gccgttttag cggcagcggc agcggcacccg attatacctt taccattagc 600

agcctgcagc cggaagatat tgcgacctat tattgccagc agtggagcag caaccgccg 660
 acctttggcc agggcaccaa actgcagatt aaacgtgcgg ccgcactcga gcaccaccac 720
 caccaccac 729

<210> 131

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
 replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 44
 designated AVP02-126.

<400> 131

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

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

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

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

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

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

85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln

115 120 125

Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val

130 135 140

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr

145 150 155 160

Gln Cys Lys Pro Gly Lys Ala Cys Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser

165 170 175

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

180 185 190

Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala

195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln

210 215 220

Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His

225 230 235 240

His His His

<210> 132

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 45

designated AVP02-127

<400> 132

agcgtgcagc tgggtgaaag cgggtggcgga gtggtgcagc caggtggaag cctgcgtctg	60
agctgcgcag caagcgggtt tacctttagc agctatggca tgagctgggt gcgttgcgcg	120
ccggataaag gctgcgaact ggtggcgacc attaacagca acggtggaag cacctattat	180
ccggatagcg tgaaggccg ttttaccatt agccgtgata acagcaaaaa caccctgtat	240
ctgcagatga acagcctgcg taccgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgtgatcgt	300
gatggctatg atgaaggctt tgattattgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc	360

ggtggggcgc gaagccagat tcagctgacc cagagcccga gcagcctgag cgcaagcgtg 420

ggtgatcgtg tgaccattac ctgcagcgcg agcagcagcg tgagctatat gcattggtat 480

cagcagaaac cgggcaaagc gccgaaacgt tggatttatg ataccagcaa actggcgagc 540

ggcgtgccga gccgttttag cggcagcggc agcggcaccg attatacctt taccattagc 600

agcctgcagc cggaagatat tgcgacctat tattgccagc agtggagcag caaccgccg 660

acctttggcc agggcaccaa actgcagatt aaacgtgcgg ccgcactcga gcaccaccac 720

caccaccac 729

<210> 133

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 45 designated AVP02-127.

<400> 133

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Cys Ala Pro Asp Lys Gly Cys Glu Leu Val

35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln

115 120 125

Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
130 135 140

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
145 150 155 160

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser

165 170 175
Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
180 185 190

Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln
210 215 220

Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His

225 230 235 240
His His His

<210> 134

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VL FR3 Kabat positions 65 and 72
designated AVP02-128

<400> 134

agcgtgcagc tggttgaaag cgggtggcgga gtggtgcagc caggtggaag cctgcgtctg 60
agctgcgcag caagcggttt tacctttagc agctatggca tgagctgggt gcgtcaggcg 120
ccggataaag gcctggaact ggtggcgacc attaacagca acggtggaag cacctattat 180

ccggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt agccgtgata acagcaaaaa caccctgtat 240
ctgcagatga acagcctgcg taccgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgtgatcgt 300
gatggctatg atgaaggctt tgattattgg ggccagggca ccctgggtgac cgtgagcagc 360
ggtgggggcg gaagccagat tcagctgacc cagagcccga gcagcctgag cgcaagcgtg 420
ggtgatcgtg tgaccattac ctgcagcgcg agcagcagcg tgagctatat gcattggtat 480

cagcagaaac cgggcaaagc gccgaaacgt tggatttatg ataccagcaa actggcgagc 540
ggcgtgccga gccgttttag cggctgcggc agcggcaccg attattgctt taccattagc 600

agcctgcagc cggaagatat tgcgacctat tattgccagc agtggagcag caaccgcgcg 660
acctttggcc agggcaccaa actgcagatt aaacgtgcgg ccgcactcga gcaccaccac 720
caccaccac 729

<210> 135

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VL FR3 Kabat positions 65 and 72
designated AVP02-128.

<400> 135

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

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

65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn
Ser	Leu	Arg	Thr
Glu	Asp	Thr	Ala
Val	Tyr	Tyr	Cys
85	90	95	
Ala	Arg	Asp	Arg
Asp	Gly	Tyr	Asp
Glu	Gly	Phe	Asp
Tyr	Trp	Gly	Gln
100	105	110	
Gly	Thr	Leu	Val
Thr	Val	Ser	Ser
Gly	Gly	Gly	Gly
Ser	Gln	Ile	Gln
115	120	125	
Leu	Thr	Gln	Ser
Pro	Ser	Ser	Leu
Ser	Ala	Ser	Val
Gly	Asp	Arg	Val

130

135

140

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr
 145 150 155 160
 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
 165 170 175
 Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Cys Gly Ser Gly
 180 185 190
 Thr Asp Tyr Cys Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala

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

<210> 136

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
 replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 70 and 79

designated AVP02-129.

<400> 136

agcgtgcagc tgggtgaaag cgggtggcggga gtggtgcagc caggtggaag cctgcgtctg 60
 agctgcgcag caagcggttt tacctttagc agctatggca tgaagtgggt gcgtcaggcg 120
 ccggataaag gcctggaact ggtggcgacc attaacagca acggtggaag cacctattat 180
 ccggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tgccgtgata acagcaaaaa caccctgtgc 240
 ctgcagatga acagcctgcg taccgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgtgatcgt 300
 gatggctatg atgaagcctt tgattattgg ggccagggca ccctgggtgac cgtgagcagc 360
 ggtgggggcg gaagccagat tcagctgacc cagagcccga gcagcctgag cgcaagcgtg 420

 ggtgatcgtg tgaccattac ctgcagcgcg agcagcagcg tgagctatat gcattggtat 480
 cagcagaaac cgggcaaagc gccgaaacgt tggatttatg ataccagcaa actggcgagc 540
 ggcggtgccga gccgttttag cggcagcggc agcggcaccg attatacctt taccattagc 600

agcctgcagc cggaagatat tgcgacctat tattgccagc agtggagcag caaccgccc 660
acctttggcc agggcaccaa actgcagatt aaacgtgcgg cgcactcga gcaccaccac 720
caccaccac 729

<210> 137

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 70 and 79
designated AVP02-129

<400> 137

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Arg Asp Gly Tyr Asp Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Gln

115 120 125

Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val

130 135 140

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr

145 150 155 160

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser

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

225 230 235 240
His His His

<210> 138

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 72 and 75
designated AVP02-130

<400> 138

agcgtgcagc tgggtgaaag cgggtggcgga gtggtgcagc cagggtggaag cctgcgtctg 60
agctgcgcag caagcggttt taccttttagc agctatggca tgagctgggt gcgtcaggcg 120
ccggataaag gcctggaact ggtggcgacc attaacagca acggtggaag cacctattat 180

ccggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt agccgttgca acagctgcaa caccctgtat 240
ctgcagatga acagcctgcg taccgaagat accgcggtgt attattgcgc gcgtgatcgt 300
gatggctatg atgaaggctt tgattattgg ggccagggca ccctgggtgac cgtgagcagc 360
ggtgggggagc gaagccagat tcagctgacc cagagcccga gcagcctgag cgcaagcgtg 420
ggtgatcgtg tgaccattac ctgcagcgcg agcagcagcg tgagctatat gcattggtat 480
cagcagaaac cgggcaaagc gccgaaacgt tggatttatg ataccagcaa actggcgagc 540
ggcgtgccga gccgttttag cggcagcggc agcggcaccg attatacctt taccattagc 600

agcctgcagc cggaagatat tgcgacctat tattgccagc agtggagcag caaccgcgcg 660

acctttggcc agggcaccaa actgcagatt aaacgtgcgg cgcactcga gcaccaccac 720
caccaccac 729

<210> 139

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-MucI diabody comprising cysteine replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 72 and 75 designated AVP02-130.

<400> 139

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

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

65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn
Ser	Leu	Arg	Thr
Glu	Asp	Thr	Ala
Val	Tyr	Tyr	Cys
85	90	95	
Ala	Arg	Asp	Arg
Asp	Gly	Tyr	Asp
Glu	Gly	Phe	Asp
Tyr	Trp	Gly	Gln
100	105	110	
Gly	Thr	Leu	Val
Thr	Val	Ser	Ser
Gly	Gly	Gly	Gly
Ser	Gln	Ile	Gln
115	120	125	
Leu	Thr	Gln	Ser
Pro	Ser	Ser	Leu
Ser	Ala	Ser	Val
Gly	Asp	Arg	Val

130	135	140	
Thr	Ile	Thr	Cys
Ser	Ala	Ser	Ser
Ser	Val	Ser	Tyr
Met	His	Trp	Tyr
145	150	155	160
Gln	Gln	Lys	Pro
Gly	Lys	Ala	Pro
Lys	Arg	Trp	Ile
Tyr	Asp	Thr	Ser
165	170	175	

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

180 185 190

Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala

195 200 205

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln

210 215 220

Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg Ala Ala Ala Leu Glu His His His

225 230 235 240

His His His

<210> 140

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 44

designated AVP07-131.

<400> 140

agcgtgcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gtcttgata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120
cccgggaaag gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac 180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac 240
ttgcaatgga gcagtctgaa gccctcggac agcgccgtgt atttttgtgc gagacatgac 300
gtgggatatg cgagtagttc caacgcggca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc 360
cagggcaccc tggtcaccgt ttctcaggt ggaggcgggt cacagtctgt gttgacgcag 420

ccgccctcag tgctgcggc cccaggacag aaggtcacca tctcctgctc tggaagcagc 480
tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagtgcc tcccaggaac agtctgcaaa 540
ctctcatct atggtcacac caatcgcccc gcaggggtcc ctgaccgatt ctctggctcc 600
aagtctggca cctcagcctc cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggctgat 660
tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtggttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 780

gccgcacatc accatcatca ccat

804

<210> 141

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VL FR2 Kabat positions 38 and 44 designated AVP07-131.

<400> 141

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Asn Ala Ala Lys Trp

100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val

130 135 140

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Cys Leu Pro Gly

165 170 175

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

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
245 250 255
Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
260 265

<210> 142

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 45

designated AVP07-132.

<400> 142

agcgtgcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgctgcatg 120
cccggaag gctgcgagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaatac 180
agcccgctct tccaaggcca gggtcaccatc tcagtcgaca agtcgcctcag cactgcctac 240
ttgcaatgga gcagtctgaa gccctcggac agcgccgtgt atttttgtgc gagacatgac 300
gtgggatatg cgagtagttc caacgcggca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc 360
cagggcaccc tggtcaccgt ttctcaggt ggaggcgggt cacagtctgt gttgacgcag 420

ccgcctcag tgctgcggc ccaggacag aaggtcacca tctcctgctc tggaagcagc 480
tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagcagc tccaggaac agtcccaaa 540
ctctcatct atggtcacac caatcgcccc gcagggtcc ctgaccgatt ctctggtcc 600
aagtctggca cctcagcctc cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggctgat 660
tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtggttggg tgttcggcgg agggaccaag 720

ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 780
gccgcacatc accatcatca ccat 804

<210> 143

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VH FR2 Kabat positions 39 and 45
designated AVP07-132.

<400> 143

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Ala Trp Val Arg Cys Met Pro Gly Lys Gly Cys Glu Tyr Met

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Asn Ala Ala Lys Trp

100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val

130 135 140

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly

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

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 245 250 255
 Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
 260 265

<210> 144

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
 replacement mutations in the VL FR3 Kabat positions 65 and 72

designated AVP07-133.

<400> 144

agcgtgcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gtcttgata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggteaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac 240
 ttgcaatgga gcagtctgaa gccctcggac agcgccgtgt atttttgtgc gagacatgac 300
 gtgggatatg cgagtagttc caacgcggca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc 360
 cagggcaccc tggtcaccgt ttctcaggt ggaggcgggt cacagtctgt gttgacgcag 420

 ccgcctcag tgtctgcggc cccaggacag aaggtcacca tctcctgctc tggaagcagc 480
 tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagcagc tcccaggaac agtccccaaa 540
 ctctcatct atggtcacac caatcgcccc gcaggggtcc ctgaccgatt ctctggctgc 600
 aagtctggca cctcagcctg cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggctgat 660

tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtgggttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 780
gccgcacatc accatcatca ccat 804

<210> 145

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VL FR3 Kabat positions 65 and 72
designated AVP07-133.

<400> 145

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Asn Ala Ala Lys Trp

100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val

130 135 140

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

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

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
245 250 255
Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His
260 265

<210> 146

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 70 and 79

designated AVP07-134.

<400> 146

agcgtgcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg	120
cccgggaaag gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac	180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tgcgtcgaca agtccgtcag cactgcctgc	240
ttgcaatgga gcagtctgaa gccctcggac agcgccgtgt attttgtgc gagacatgac	300
gtgggatatg cgagtagttc caacgggca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc	360
cagggcaccc tggtcaccgt ttcctcaggt ggaggcgggt cacagtctgt gttgacgcag	420
ccgcctcag tgtctgcggc cccaggacag aaggtcacca tctcctgctc tggaagcagc	480
tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagcagc tcccaggaac agtccccaaa	540
ctcctcatct atggtcacac caatcgggcc gcaggggtcc ctgaccgatt ctctggctcc	600

aagtctggca cctcagcctc cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggtgat 660
tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtgggttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 780
gccgcacatc accatcatca ccat 804

<210> 147

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 70 and 79
designated AVP07-134

<400> 147

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Cys Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Cys

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Asn Ala Ala Lys Trp

100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val

130 135 140

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser

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

Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Ser	Gly	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
225					230					235					240
Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu
				245					250					255	
Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His				
				260				265							

<210> 148

<211> 804

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> SEQ ID NO: 148 - nucleotide sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine replacement mutations in the VH FR3 Kabat

positions 72 and 75 designated AVP07-135.

<400> 148

agcgtgcagc	tggtgcagtc	tggggcagag	gtgaaaaagc	ccggggagtc	tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	cagctttacc	agctactgga	tgcctgggt	gcgccagatg	120
cccgggaaag	gcctggagta	catggggctc	atctatcctg	gtgactctga	caccaaatac	180
agcccgctct	tccaaggcca	ggtcaccatc	tcagtctgca	agtcctgcag	cactgcctac	240
ttgcaatgga	gcagtctgaa	gccctcggac	agcgccgtgt	atttttgtgc	gagacatgac	300
gtgggatatg	cgagtagttc	caacgcggca	aagtggcctg	aatacttcca	gcattggggc	360

cagggcacc tggtcacct ttctcaggt ggaggcggtt cacagtctgt gttgacgcag 420
ccgcctcag tgtctcggc cccaggacag aaggtcacca tctctgtctc tgggaagcagc 480

tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagcagc tcccaggaac agtccccaaa 540
 ctctcatct atggtcacac caatcgccc gcaggggtcc ctgaccgatt ctctggctcc 600
 aagtctggca cctcagcctc cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggtgat 660
 tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtggttggg tgttcggcgg agggaccaag 720
 ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 780

gccgcacatc accatcatca ccat 804

<210> 149

<211> 268

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> amino acid sequence of an anti-Her2 diabody comprising cysteine
 replacement mutations in the VH FR3 Kabat positions 72 and 75
 designated AVP07-135.

<400> 149

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Asn Ala Ala Lys Trp

100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val

130 135 140

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly

165 170 175

Thr Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly His Thr Asn Arg Pro Ala Gly

180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu

195 200 205

Ala Ile Ser Gly Phe Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala

210 215 220

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys

225 230 235 240

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

245 250 255

Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His

260 265

<210> 150

<211> 1255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu

1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys

20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His

35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr

50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val

65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
275 280 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
290 295 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305 310 315 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys

325	330	335	
Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu			
340	345	350	
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys			
355	360	365	
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp			
370	375	380	
Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe			
385	390	395	400
Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro			
405	410	415	
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg			
420	425	430	
Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu			
435	440	445	
Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly			
450	455	460	
Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val			
465	470	475	480
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr			
485	490	495	
Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His			
500	505	510	
Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys			
515	520	525	
Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys			
530	535	540	
Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys			
545	550	555	560
Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys			
565	570	575	

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp

580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu

595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln

610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys

625 630 635 640

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

645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly

660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg

675 680 685

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

690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu

705 710 715 720

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

725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile

740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu

755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg

770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu

785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg

805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly

820 825 830
 Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala

 835 840 845
 Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 850 855 860
 Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880
 Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895
 Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val

 900 905 910
 Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
 915 920 925
 Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
 930 935 940
 Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
 945 950 955 960
 Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe

 965 970 975
 Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
 980 985 990
 Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu
 995 1000 1005
 Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
 1010 1015 1020
 Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly

 1025 1030 1035
 Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
 1040 1045 1050
 Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
 1055 1060 1065

Glu Ala	Pro Arg Ser Pro Leu	Ala Pro Ser Glu Gly	Ala Gly Ser
1070	1075	1080	
Asp Val	Phe Asp Gly Asp Leu	Gly Met Gly Ala Ala	Lys Gly Leu
1085	1090	1095	
Gln Ser	Leu Pro Thr His Asp	Pro Ser Pro Leu Gln	Arg Tyr Ser
1100	1105	1110	
Glu Asp	Pro Thr Val Pro Leu	Pro Ser Glu Thr Asp	Gly Tyr Val
1115	1120	1125	
Ala Pro	Leu Thr Cys Ser Pro	Gln Pro Glu Tyr Val	Asn Gln Pro
1130	1135	1140	
Asp Val	Arg Pro Gln Pro Pro	Ser Pro Arg Glu Gly	Pro Leu Pro
1145	1150	1155	
Ala Ala	Arg Pro Ala Gly Ala	Thr Leu Glu Arg Ala	Lys Thr Leu
1160	1165	1170	
Ser Pro	Gly Lys Asn Gly Val	Val Lys Asp Val Phe	Ala Phe Gly
1175	1180	1185	
Gly Ala	Val Glu Asn Pro Glu	Tyr Leu Thr Pro Gln	Gly Gly Ala
1190	1195	1200	
Ala Pro	Gln Pro His Pro Pro	Pro Ala Phe Ser Pro	Ala Phe Asp
1205	1210	1215	
Asn Leu	Tyr Tyr Trp Asp Gln	Asp Pro Pro Glu Arg	Gly Ala Pro
1220	1225	1230	
Pro Ser	Thr Phe Lys Gly Thr	Pro Thr Ala Glu Asn	Pro Glu Tyr
1235	1240	1245	
Leu Gly	Leu Asp Val Pro Val		
1250	1255		
<210>	151		
<211>	750		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	151		

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg

1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe

20 25 30

Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu

35 40 45

Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu

50 55 60

Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu His Asn Phe Thr Gln Ile

65 70 75 80

Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile

85 90 95

Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His

100 105 110

Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile

115 120 125

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

130 135 140

Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro

145 150 155 160

Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr

165 170 175

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

180 185 190

Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val

195 200 205

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

210 215 220

Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys

225 230 235 240

Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly

245 250 255
Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr

260 265 270
Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly

275 280 285
Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys

290 295 300
Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg

305 310 315 320
Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn

325 330 335
Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val

340 345 350
Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro

355 360 365
Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly

370 375 380
Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg

385 390 395 400
Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile

405 410 415
Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr

420 425 430
Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala

435 440 445
Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val

450 455 460
Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu

465 470 475 480
Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser

485 490 495

Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile
500 505 510
Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu
515 520 525
Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn
530 535 540
Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu
545 550 555 560
Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val
565 570 575
Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val
580 585 590
Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala
595 600 605
Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr
610 615 620
Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr
625 630 635 640
Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser
645 650 655
Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu
660 665 670
Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg
675 680 685
His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser
690 695 700
Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp
705 710 715 720
Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala
725 730 735
Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala

740	745	750
<210> 152		
<211> 475		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 152		
Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr		
1	5	10 15
Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly		
20	25	30
Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser		
35	40	45
Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His		
50	55	60
Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu		
65	70	75 80
Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln		
85	90	95
Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr		
100	105	110
Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro		
115	120	125
Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr		
130	135	140
Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser		
145	150	155 160
Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His		
165	170	175
Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu		
180	185	190
Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys		

195	200	205
Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr		
210	215	220
Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser		
225	230	235
Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu		
245	250	255
Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu		
260	265	270
Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu		
275	280	285
Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly		
290	295	300
Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val		
305	310	315
Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp		
325	330	335
Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr		
340	345	350
Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe		
355	360	365
Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu		
370	375	380
Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala		
385	390	395
Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile		
405	410	415
Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr		
420	425	430
His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro		
435	440	445

Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr
450 455 460

Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu
465 470 475

<210> 153

<211> 307

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr
1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
50 55 60

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65 70 75 80

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
85 90 95

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
100 105 110

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
115 120 125

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala Gln Gly Val Thr Ser Ala Pro Glu Thr
130 135 140

Arg Pro Pro Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145 150 155 160

Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Ala Ser Thr Ala Pro Pro Val His
165 170 175

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

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

Met Leu Pro

305

<210> 154

<211> 735

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding AVP04-50 diabody

<400> 154

agcgtgcagc tgcagcagag cgatgcggaa ctggtgaaac cgggcgcgag cgtgaaaatt	60
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gatcatgcga ttcattgggt gaaacagaat	120
ccggaacagg gcctggaatg gattggctat tttagcccgg gcaacgatga ttttaaatat	180
aacgaacgtt ttaaaggcaa agcgacctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat	240
ctgcagctga acagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcac ccgtagcctg	300
aatatggcgt attgggggtca gggcacctcg gtcaccgtga gcagcgggtg cggcggcagc	360
gatatcgtga tgaccagag ctgcagcagc tgcccgtga gcgtgggcga aaaagtgacc	420
ctgagctgca aaagcagcca gagcctgctg tatagcggca atcagaaaaa ctatctggcg	480

tggtatcagc agaaaccggg tcagagcccg aaactgctga tttattgggc gagcacccgt 540
gaaagcggcg tgccgcatcg ttttaccggc agcggtagcg gcaccgattt taccctgagc 600
attagcagcg tggaaccga agatctggcg gtgtattatt gccagcagta ttatagctat 660
ccgctgacct ttggtgcggg caccaaactg gtgctgaaac gtgcggccgc actcgagcac 720

caccaccacc accac 735

<210> 155

<211> 245

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of AVP04-50 diabody

<400> 155

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Cys

115 120 125

Ser Ser Cys Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys

130 135 140

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala

145 150 155 160

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp

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

225 230 235 240
His His His His His
245

<210> 156

<211> 804

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding AVP07-63 diabody

<400> 156

agcgtgcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
tcctgtaagg gtcttgata cagctttacc agctactgga tcgcctgggt gcgccagatg	120
cccgggaaag gcctggagta catggggctc atctatcctg gtgactctga caccaaatac	180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagtcgaca agtccgtcag cactgcctac	240
ttgcaatgga gcagtctgaa gccctcggac agcgccgtgt atttttgtgc gagacatgac	300
gtgggatatg cgagtagttc caacgcggca aagtggcctg aatacttcca gcattggggc	360
cagggcaccc tggtcaccgt ttctcaggt ggaggcgggt cacagtctgt gttgacgcag	420
ccgtgcagca gctgcgcggc ccaggacag aaggtcacca tctcctgctc tggaagcagc	480
tccaacattg ggaataatta tgtatcctgg taccagcagc tcccaggaac agtccccaaa	540
ctctcatct atggtcacac caatcgcccc gcaggggtcc ctgaccgatt ctctggctcc	600
aagtctggca cctcagcctc cctggccatc agtgggttcc ggtccgagga tgaggctgat	660
tattactgtg cagcatggga tgacagcctg agtggttggg tgttcggcgg agggaccaag	720
ctgaccgtcc taggtgcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg	780

gccgcacatc accatcatca ccat

804

<210> 157

<211> 268

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acid sequence of AVP07-63 diabody

<400> 157

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Ala Ser Ser Ser Asn Ala Ala Lys Trp

100 105 110

Pro Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Cys Ser Ser

130 135 140

Cys Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser

145 150 155 160

Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly

165 170 175

Thr Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly His Thr Asn Arg Pro Ala Gly

180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu

195	200	205	
Ala Ile Ser Gly Phe Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala			
210	215	220	
Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys			
225	230	235	240
Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu			
245	250	255	
Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His			
260	265		