(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0093251
(43) 공개일자 2023년06월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 51/10* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A01K 67/027 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7012246
(22) 출원일자(국제) 2021년09월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/075009
(87) 국제공개번호 WO 2022/053651
국제공개일자 2022년03월17일
(30) 우선권주장
20195428.6 2020년09월10일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
프리시릭스 엔.브이.
벨기에, 1090 브뤼셀, 버그미스터 에티엔 디문테 를란 3
(72) 발명자
라후테, 토니
벨기에, 비-1090 브뤼셀, 버그미스터 에티엔 디문 테를란 3
데북트, 닉
벨기에, 비-1090 브뤼셀, 버그미스터 에티엔 디문 테를란 3
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

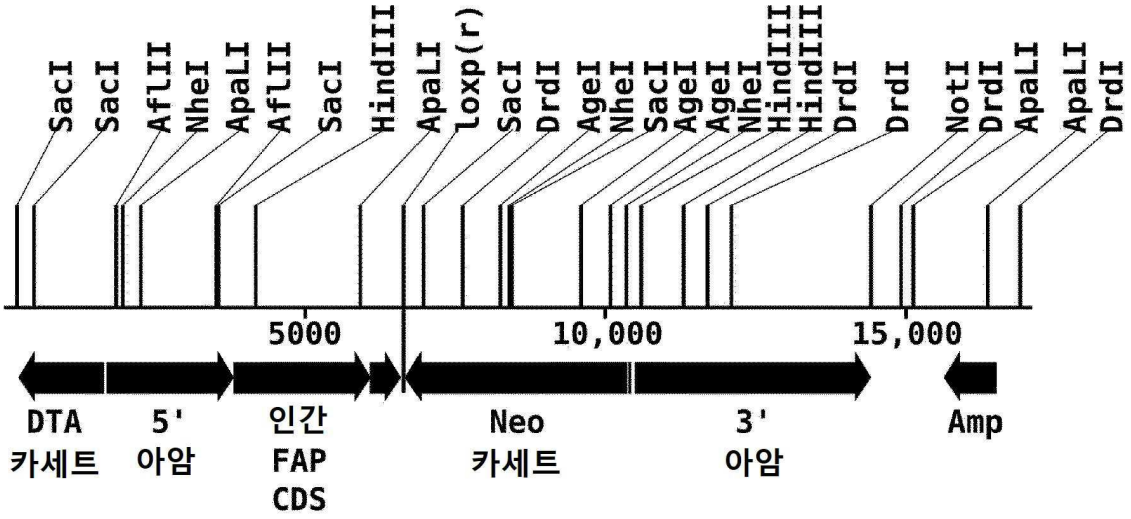
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **FAP에 대한 항체 단편**

(57) 요 약

본 발명은 인간 및/또는 뮤린 FAP의 에피토프에 특이적으로 결합하고 모이어티와 같은 실체에 연결될 수 있는 항체 단편 분야에 관한 것이다. 형성된 항체 단편 및 화합물은 치료 또는 진단 목적으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 51/1045 (2020.05)
A61K 51/1075 (2020.05)
A61K 51/1093 (2020.05)
A61K 51/1096 (2013.01)
C07K 16/40 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2319/21 (2013.01)
C07K 2319/42 (2013.01)
(72) 발명자
듀베터, 매티아스
벨기에, 비-1090 브뤼셀, 버그미스터 에티엔 디문 테를란 3
마사, 샘
벨기에, 비-1090 브뤼셀, 버그미스터 에티엔 디문 테를란 3

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하며, 서열번호 4, 1, 2 또는 3 중 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 가지거나 상기 서열번호의 길이의 50%에 걸쳐 적어도 80% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열로 표시되는 항체 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 4, 1, 2 또는 3 중 임의의 것을 포함하는, 항체 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 길이가 서열번호 4의 정확한 길이 또는 서열번호 4의 정확한 길이보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60개 아미노산만큼 더 긴 범위인, 항체 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 바람직하게는 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 상기 항체의 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되는, 항체 단편.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 바람직하게는 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 상기 항체의 형태적 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함되는, 항체 단편.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합하는, 항체 단편:

1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

5) V158 및/또는 G159, 및/또는

6) R175, 및/또는

7) D457 및/또는 Y458.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 항체(VHH) 또는 이의 단편으로부터 유래된 중쇄 가변 도메인인, 항체 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 FAP(서열번호 26)에 특이적으로 결합하고 뮤린 FAP(서열번호

30)에 특이적으로 결합하는, 항체 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 및/또는 뮤린 FAP의 조절제가 아니고, 바람직하게는 FAP 디펩티딜 펩티다제 활성을 실질적으로 억제하지 않는, 항체 단편.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 바람직하게는 생물층 간섭계를 사용하여 평가된, 10^{-9} 내지 10^{-12} 몰/리터 범위의 K_D 및/또는 10^{-2} 내지 10^{-5} s^{-1} 범위의 k_{off}로 인간 FAP에 특이적으로 결합하는, 항체 단편.

청구항 11

모이어티와 같은 실체에 연결되는, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체 단편을 포함하는 화합물.

청구항 12

제11항에 있어서, 모이어티는 표지, 바람직하게는 방사성 핵종인, 화합물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 방사성 핵종은 α-방출 방사성 핵종 및 β^--방출 방사성 핵종으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 방사성 핵종은 악티늄-225, 아스타틴-211, 비스무트-212, 비스무트-213, 세슘-137, 크로뮴-51, 코발트-60, 구리-67, 디스프로슘-165, 에르븀-169, 페르뮴-255, 금-198, 홀뮴-166, 요오드-125, 요오드-131, 이리듐-192, 철-59, 납-212, 루테튬-177, 몰리브덴-99, 팔라듐-103, 인-32, 칼륨-42, 레늄-186, 레늄-188, 사마륨-153, 라듐-223, 라듐-224, 루테늄-106, 스칸듐-47, 나트륨-24, 스트론튬-89, 테르븀-149, 테르븀-161, 테르븀-149, 토륨-227, 제논-133, 이테르븀-169, 이테르븀-177 및 이트륨-90으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 방사성 핵종은 요오드-131, 이트륨-90, 요오드-125, 루테튬-177, 레늄-186, 레늄-188, 스칸듐-43, 스칸듐-44, 테크네튬-99m, 테르븀-161, 인듐-111, 제논-133, 탈륨-201, 플루오린-18, 갈륨-68, 갈륨-67, 구리-67, 요오드-123, 요오드-124, 지르코늄-89 및 구리-64로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는, 양전자-방출 방사성 동위원소(PET) 또는 γ-방출 방사성 동위원소(SPECT)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 방사성 핵종은 요오드-131인, 화합물.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 단편 및 상기 방사성 핵종은 링커, 바람직하게는 벤조에이트 링커에 의해 분리되고, 더 바람직하게는 상기 링커는 N-석신이미딜-4-구아니디노메틸-3-[I-131]요오도벤조에이트 또는 이의 적합한 유도체를 포함하는, 화합물.

청구항 17

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 다음에 해당하거나 이를 포함하는, 화합물:

- 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 형태적 에피토프가 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 SGMIB를 통해 요오드-131에 연결되는 것인, 항체 단편,

- 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 형태적 에피토프가 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 DOTA 또는 DTPA를 통

해 루테튬-177에 연결되는 것인, 항체 단편,

- 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 형태적 에피토프가 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 DOTA를 통해 악티늄-225에 연결되는 것인, 항체 단편, 또는

- 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 형태적 에피토프가 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 테크네튬-99m에 연결되는 것인, 항체 단편.

청구항 18

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 다음에 해당하거나 이를 포함하는, 화합물:

- 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 4와 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열로 표시되고, SGMIB를 통해 요오드-131에 연결되는 것인, 항체 단편,

- 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 4와 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열로 표시되고, DOTA 또는 DTPA를 통해 루테튬-177에 연결되는 것인, 항체 단편,

- 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 4와 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열로 표시되고, DOTA를 통해 악티늄-225에 연결되는 것인, 항체 단편, 또는

- 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 4와 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열로 표시되고, 테크네튬-99m에 연결되는 것인, 항체 단편.

청구항 19

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체 단편 또는 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화합물, 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 조성물.

청구항 20

약제로서 사용하기 위한 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체 단편, 제11항 내지 제13항, 제15항 또는 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 제19항에 따른 조성물로서, 바람직하게는

상기 약제는 암 세포 및/또는 CAF에서 인간 FAP의 발현과 연관된 암을 치료하기 위한 것인, 항체 단편, 화합물, 또는 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체 단편 또는 제11항, 제12항, 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화합물을 포함하는 진단용 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체 단편, 제11항 내지 제13항, 제15항 또는 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화합물 또는 제19항 또는 제20항에 따른 조성물을 포함하는 병용 요법으로서, 약제는 암 세포 및/또는 CAF에서 인간 FAP의 발현과 연관된 암을 치료하기 위한 것이고, 추가적인 화합물이 사용되는, 병용 요법.

청구항 23

제22항에 있어서, 추가적인 화합물은 항체 또는 항체 단편이거나 혈장 또는 혈액 대체물 또는 양으로 하전된 아미노산과 같은 신장 저류를 최적화할 수 있는 분자인, 병용 요법.

청구항 24

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 항체 단편 또는 제11항, 제12항, 제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 화합물 또는 제21항에 정의된 바와 같은 조성물이 대상체에서 FAP, 바람직하게는 인간 FAP의 발현을 평가하는 데 사용되는 방법.

청구항 25

인간 FAP의 발현을 가능하게 하는 핵산 작제물을 포함하는 비-인간 동물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 섬유아세포 활성화 단백질(Fibroblast Activation Protein; FAP)의 에피토프에 특이적으로 결합하고 모이어티와 같은 실체에 연결될 수 있는 항체 단편 분야에 관한 것이다. 상기 항체 단편의 적용에 따라, 모이어티는 방사성 핵종일 수 있는 표지일 수 있다. 본 발명은 암의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 표지된 항체 단편에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 전 세계적으로 이환률과 사망률의 주요 원인에 있어 큰 비중을 차지한다. 부작용을 최소화하면서 암과 싸우는 개선된 치료법에 대한 지속적인 요구가 있다. FAP는 암-연관 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblast; CAF), 및 또한 암 세포, 예컨대 뼈, 뇌, 유방, 결장직장, 식도, 위, 간, 폐, 난소, 췌장, 부갑상선, 신장 암 세포에서 발현되거나 심지어 과발현되는 것으로 밝혀졌지만(Puré et al 2018, Oncogene Aug;37(32):4343-43573), FAP는 건강한 세포에서 발현되지 않거나 낮은 수준으로 발현된다. 따라서 FAP는 흥미로운 암 표적으로 보인다. 지금까지 FAP를 표적으로 하는 어떠한 항체도 치료용 항체로 승인되지 않았다.

[0003] 이와 같이, 인간 FAP를 표적으로 하는 추가 항체에 대한 당업계의 요구가 있다.

도면의 간단한 설명

[0004] 도 1. 표적화 벡터의 상이한 요소.

도 2. ELISA로 측정한 인간 FAP 재조합 단백질, 뮤린 FAP 재조합 단백질 또는 인간 DPP IV 재조합 단백질에 대한 HA-His_6-태그 VHH B1, B2, B3 및 B4 결합의 신호 대 배경 비율. *결정되지 않음.

도 3. 인간 FAP-발현 GM05389 세포 및 뮤린 FAP-발현 HEK293 세포에 대한 HA-His_6-태그 VHH B1, B2, B3 및 B4의 결합의 Δmfi 값. HEK-뮤린 FAP 세포에서의 VHH B3 및 GM05389 세포에서의 VHH B4에 대한 Δmfi 값은 10보다 작았다.

도 4. HA-His_6-태그 VHH B1, B2 또는 B3, 탈라보스탓 메실레이트(억제제 대조군)와 함께, 또는 FAP-결합 분자 없이(양성 대조군) 사전 인큐베이션된, 인간 FAP 재조합 단백질에 의한 기질 가수분해. 모든 조건에 대해, 평균 상대 형광 단위(n = 2)가 시간에 따라 나타나 있다.

도 5. 24시간에 걸쳐 인간 FAP-발현 GM05389 세포에서 ^{131}I-표지 B1(His_6-태그 및 비태그 형태)의 세포 저류. 데이터는 평균 ± SD(n=3)로 표현되어 있다.

도 6. 24시간에 걸쳐 인간 FAP-발현 GM05389 및 HEK-293 세포에서 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 세포 저류. 데이터는 평균 ± SD(n=3)로 표현되어 있다.

도 7. 24시간에 걸쳐 인간 FAP-발현 GM05389 세포에서 ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1의 세포 저류. 데이터는 평균 ± SD(n=3)로 표현되어 있다.

도 8a 내지 8c: 상이한 방사성표지 비태그 VHH B1로 처리된 마우스의 생존을 설명하는 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선. ^{131}I-표지 비태그 VHH B1은 (A1) 종양 발달을 억제하는 능력 및 (A2) 결과적으로 처리된 마우스의 생존 연장에 의해 밝혀진 바와 같이 확립된 피하 인간 교모세포종 종양(U87 MG)을 가지는 마우스에서 효과적이고; (도 8b) ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1은 (B1) 종양 발달을 억제하는 능력 및 (B2) 결과적으로 처리된 마우스의 생존 연장에 의해 밝혀진 바와 같이 확립된 피하 인간 HEK-293 종양을 가지는 마우스에서 효과적이며; (도 8c) ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1은 (C1) 종양 발달을 억제하는 능력 및 (C2) 결과적으로 처리된 마우스의 생존 연장에

의해 밝혀진 바와 같이 확립된 피하 인간 교모세포종 종양(U87 MG)을 가지는 마우스에서 효과적이다. MS: 평균 생존.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0005] 항체 단편

[0006] 본 발명의 제1 양태에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편이 제공된다. 일 구현예에서, 상기 항체 단편은 서열번호 1, 2, 3, 4 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열로 표시된다.

[0007] 일 구현예에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 제공된 항체 단편은 다음 중 적어도 하나를 충족시킨다:

[0008] a. 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 26 내지 760 내에 포함되고, 바람직하게는 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함됨(또는 이를 포함함),

[0009] b. 여기서 서열번호 26의 적어도 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458은 상기 항체 단편과 상호작용함,

[0010] c. 상기 항체 단편은 서열번호 1, 2, 3, 4 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열로 표시됨.

[0011] 이러한 양태의 일 구현예에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 제공된 항체 단편은 다음 중 적어도 하나를 충족시킨다:

[0012] a. 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 26 내지 760 내에 포함되고, 바람직하게는 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함됨(또는 이를 포함함),

[0013] b. 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합함:

[0014] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0015] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0016] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0017] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0018] 5) V158 및/또는 G159, 및/또는

[0019] 6) R175, 및/또는

[0020] 7) D457 및/또는 Y458,

[0021] c. 상기 항체 단편은 서열번호 1, 2, 3, 4 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열로 표시됨.

[0022] 이러한 양태의 일 구현예에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하고, 서열번호 26의 아미노산 26 내지 760 내에 포함되는 에피토프를 가지는 제공된 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합한다:

[0023] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0024] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0025] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0026] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0027] 5) V158 및/또는 G159, 및

[0028] 6) R175, 및

[0029] 7) D457 및/또는 Y458.

[0030] 이러한 양태의 일 구현예에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하고, 서열번호 26의 아미노산 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되는 에피토프를 가지는(또는 이를 포함하는 에피토프를 가지는) 제공된 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합한다:

[0031] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0032] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0033] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0034] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0035] 5) V158 및/또는 G159, 및

[0036] 6) R175, 및

[0037] 7) D457 및/또는 Y458.

[0038] 출원 전반에 걸쳐, FAP는 FAP알파와 동의어이며, 또한 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP알파)로도 불리는 폴리펩타이드 프롤릴 엔도펩티아제 FAP에 해당한다. 이러한 단백질을 인코딩하는 유전자는 FAP로 불린다.

표 1

인간 및 뮤린 FAP의 아미노산 서열(각각 Uniprot 등록 Q12884 및 P97321로부터 유래됨)

서열번호 26 인간	MKTWVKIVFGVATSAVLALLVMCIVLRPSRVHNSEENTMRALTLKDILNG TFSYKTFFPNWISGQEYLHQSADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNA SNYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRP IQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGIPDW VYEEEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPRTI NIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPVPAMIASSDYYFSWLTW VTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTG WAGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWE AINIFRVTQDSLFYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCHLRKER CQYYTASFSDYAKYYALVCYGPGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKELENAL KNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSV RSVFAVNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVE DQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIAVA PVSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLI HGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGLSGLSTNHL YTHMTHFLKQCFSLSD
서열번호 30 뮤린	MKTWLKTVFGVTTLAALALVVICIVLRPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGT FSYKTYFPNWISEQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNATD YGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLQNGEFVRGYELPRPIQ YLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITYTGRENRIFNGIPDWV YEEEMLATKYALWWSPDGKFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDGQYPRTINI PYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPHHVGPMEVPVPEMIASSDYYFSWLTW VSSERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRTG WAGGFFVSTPAFSQDATSYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKW EAIYIFRVTQDSLFYSSNEFEGYPGRRNIYRISIGNSPPSKKCVTCHLRKE RCQYYTASFSYKAKYYALVCYGPGLPISTLHDGRTDQEIQVLEENKELE NSLRNIQLPKVEIKKLKDGGLTFWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPC SQSVKSVFAVNWITYLASKEGIVIALVDGRGTAFQGDKFLHAVYRKLGVY EVEDQLTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGI AVAPVSSWEYYASIYSERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVD YLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYSDQNHGISSGRS QNHLYTHMTHFLKQCFSLSD

[0039]

[0040] 본 발명의 맥락 내에서, 용어 "항체 단편"은 항체 또는 면역글로불린의 임의의 단편을 지칭한다. 일 구현예에서, 항체 단편은 단일-도메인 항체 단편이다. 일 구현예에서, 항체 단편은 중쇄 항체(VHH) 또는 이의 단편으로부터 유래된 중쇄 가변 도메인이다. 바람직한 구현예에서, 단일-도메인 항체 단편은 VHH 또는 이의 단편이고: 본 명세서에 개시된 바와 같은 중쇄 항체(즉, VHH)로부터 유래된 중쇄 가변 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬로 이루어진다. 본 출원의 맥락 내에서, 표현 "항체 단편"은 "단일-도메인 항체 단편" 또는 "VHH" 또는 "VHH의 단편" 또는 "VHH의 기능적 단편"으로 대체될 수 있다. 바람직하게는 항체 또는 VHH의 단편은 적어도 항체 또는 VHH의 활성을 어느 정도 나타내기 때문에, 항체 또는 VHH의 단편은 기능적 단편이다. "어느 정도"는 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 또는 그 이상을 의미할 수 있다. 항체 단편, VHH 또는 VHH의 단편의 바람직한 활성은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 특이적 결합이다. "인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 특이적 결합"은 본 명세서에서 이후에 정의되어 있다.

[0041] 설명 말단 부분에, "항체", "항체 단편", "효현제", "길항제", "항체 단편의 변이체"의 더 상세한 정의가 제공되어 있다.

[0042] 보다 구체적으로, 본 명세서에 개시된 VHH 또는 이의 단편은 선천적 또는 후천적 면역계로부터, 바람직하게는 선천적 또는 후천적 면역계의 단백질로부터 유래된다. 훨씬 더 구체적으로, 본 명세서에 개시된 VHH는 4개의 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 상보성 결정 영역(CDR), 또는 이의 임의의 적합한 단편(그러면 이는 보통 CDR 중 적어도 하나를 형성하는 아미노산 잔기 중 적어도 일부를 포함할 것임)을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 명세서에 개시된 VHH는, 바람직하게는 미생물 재조합 발현 시스템에서, 고수율로 생산하기 쉽고, 후속적으로 단리 및/또는 정제하기 편리하다.

[0043] 본 명세서에서 이후에 더 상세하게 기재된 특정 구현예에 따르면, 본 발명은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하기에 특히 적합한 항체 단편을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 인간 및 뮤린 FAP에 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 항체 단편은 인간 및/또는 뮤린 FAP의 세포외 도메인의 일부에 결합한다.

[0044] 인간 FAP는 종양형성 기능을 가지는 암-연관 섬유아세포(CAF)에서 특이적으로 발현되고 보다 특이적으로 과발현되기 때문에 표적화하기에 매우 매력적이다(Puré et al 2018, Oncogene Aug;37(32):4343-4357). 또한 인간 FAP는 일부 암 세포(예컨대, 본 명세서에서 이후에 개시된 바와 같은 백혈병, 뼈암, 자궁암, 췌장암, 피부암, 근육암, 뇌암, 유방암, 결장직장암, 식도암, 위암, 간암, 폐암, 난소암, 부갑상선암, 신장암)에서 발현되고 건강한 세포에서는 잘 발현되지 않는다. 따라서 인간 FAP는 종양 항원 또는 암 세포 항원으로 간주될 수 있으므로, 진단 및/또는 치료 표적으로서 사용될 수 있다.

[0045] 그러나 본 발명의 항체 단편의 다른 적용(진단 및 치료)도 또한 본 발명에 포함된다. 이러한 다른 진단 및/또는 치료적 적용은 암과 관련되지 않지만 섬유증, 상처 치유, 심근경색증, 죽상경화증, 관절염, 및 다른 염증성 및 섬유성 질환과 관련될 수 있다. 즉, 본 발명의 항체 단편은 섬유증, 상처 치유, 심근경색증, 죽상경화증, 관절염 및 다른 염증성 및 섬유성 질환을 진단 및/또는 치료하기 위한 진단 및/또는 치료적 적용에 사용될 수 있다. 더 상세한 설명은 본 명세서에서 이후에 제공된다.

[0046] 본 발명의 항체 단편은 항체의 CDR(상보성 결정 영역) 서열을 포함할 수 있고(또는 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이, 이러한 CDR 서열을 기반으로 할 수 있고/있거나 이러한 CDR 서열로부터 유래될 수 있음), 또한 일반적으로 본 명세서에서 'CDR 서열들'(즉, 각각 CDR1 서열, CDR2 서열 및 CDR3 서열)로 지칭될 것이다. 일 구현예에서, 본 명세서에서 개시된 바와 같이 VHH는 본 명세서에 기재된 CDR1 서열, CDR2 서열 및 CDR3 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명은 다음과 같은 (일반) 구조를 가지는 중쇄 항체로부터 유래된 중쇄 가변 도메인을 제공한다:

[0047] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0048] 본 발명의 맥락 내에서, IMGT 명명법은 FR(프레임워크 영역), 즉 FR1, FR2, FR3 및 FR4 및 상응하는 CDR 영역, 즉 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 정의하는 데 사용된다. 사용된 IMGT 명명법의 정의는 본 명세서에서 이후에 본 발명의 정의를 위한 일반 파트에서 제공된다. 그러나, 가장 넓은 의미에서 본 발명은, 아미노산 잔기의 이러한 스트레치가 본 명세서에 개시된 바와 같은 가변 도메인이 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합할 수 있도록 하는 한, 아미노산 잔기의 이러한 스트레치가 본 명세서에 개시된 바와 같은 중쇄 가변 도메인에서 가질 수 있는 특정 구조적 역할 또는 기능에 제한되지 않음에 유의하여야 한다. 따라서, 일반적으로, 가장 넓은 의미에서 본 발명은 모이어티와 같은 실체에 커플링될 수 있는 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편에 관한 것이다. 본 발명의 맥락 내에서, 모이어티와 같은 실체에 커플링된 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 화합물로 불릴 수 있다.

[0049] 이러한 모이어티는 표지일 수 있다. 표지는 방사성 핵종일 수 있다. 대안적으로, 표지는 비-방사성일 수 있다. 본 발명의 화합물이 표지를 포함하는 경우, 이는 표지된 화합물로 불릴 수 있다. 방사성 표지 화합물은 바람직하게는 CAF 세포 및/또는 암 세포에서 인간 FAP의 발현과 연관된 암을 치료하는 데 사용된다. 비-방사성 표지 화합물은 바람직하게는 본 명세서에서 이후에 개시되는 바와 같이 진단적 적용에 사용된다.

[0050] 또 다른 적용에서, 모이어티는 섬유증, 상처 치유, 심근경색증, 죽상경화증, 관절염 및 다른 염증성 및 섬유성 질환을 치료하기 위한 약제일 수 있다. 이러한 적용에서, 본 발명의 항체 단편은 열거된 질환을 치료하기 위해 상기 질환의 부위에 약제를 표적화하는 데 사용된다.

[0051] 바람직한 구현예에서, 모이어티는 WO2013064508A1에 기재된 바와 같은 아드레노메둘린의 전구약물,

WO2014097151A2에 기재된 바와 같은 오토택신 억제제, WO2014091446A1에 기재된 바와 같은 피리미도[4,5-b]퀴놀린-4,5 (3h,10h)-디온 유도체, WO2013064450A1에 기재된 바와 같은 아밀로라이드 유도체, WO2014177527A1에 기재된 바와 같은 피롤로[2,3-d]피리미딘 유도체, WO2015173683A1에 기재된 바와 같은 피라졸로피리딘 유도체 또는 피라졸로피리미딘 유도체, WO201326797A1에 기재된 바와 같은 피페리디노-디하이드로티에노피리미딘 설폭사이드 유도체, WO2016061161A1에 기재된 바와 같은 2-[피리딘-3-일]-2,3-디하이드로-벤조[1,4]디옥신 유도체, WO201486705A1에 기재된 바와 같은 피리딘 유도체, WO2011113894A1에 기재된 바와 같은 피리딘 유도체 또는 피라진 유도체, WO201627195A1에 기재된 바와 같은 아미노피리미디닐 유도체, WO2015175796A1에 기재된 바와 같은 카르복스아미드 유도체, WO2010125082A1에 기재된 바와 같은 옥사졸 치환 인다졸 유도체, WO2014126979A1에 기재된 바와 같은 비스페닐 부타노익 포스폰산 유도체, WO201235158A1에 기재된 바와 같은 피라진 유도체, WO201472956A1에 기재된 바와 같은 옥사졸리딘-2-온-피리미딘 유도체, WO201696721A1에 기재된 바와 같은 피라졸로피리딘아민 유도체, WO2010101849A1에 기재된 바와 같은 N-(헤테로)아릴,2-(헤테로)아릴-치환 아세트아미드 유도체, WO2017115205A1에 기재된 바와 같은 3-아자비사이클로[3.1.0]헥산 유도체, WO201728927A1에 기재된 바와 같은 페녹시아세트아미드 유도체, WO2017221142A1에 기재된 바와 같은 N-(5-(4-아세틸피페라진-1-일)피리딘-2-일)-2-(2'-플루오로-3-메틸-2,4'-비피리딘-5-일) 아세트아미드 유도체 또는 2-(2',3-디메틸-2,4'-비피리딘-5-일)-N-(5-(피라진-2-일)피리딘-2-일)아세트아미드 유도체, WO2013171166A1에 기재된 바와 같은 잔틴 유도체, WO2013174768A1에 기재된 바와 같은 잔틴 유도체, WO2016150901A1에 기재된 바와 같은 헤테로사이클릴메틸-티에노우라실 유도체, WO201637954A1에 기재된 바와 같은 n,2-디아릴퀴놀린-4-카르복스아미드 유도체, WO2012168350A1에 기재된 바와 같은 피리딘-2-아미드 유도체, WO2005044817A1에 기재된 바와 같은 세포 부착 조절제의 역할을 하는 벤즈아미드 유도체, WO2012117000A1에 기재된 바와 같은 3-아미노-피리딘 유도체, WO201267965A1에 기재된 바와 같은 Nampt 또는 rock 억제제, WO201616242A1에 기재된 바와 같은 옥세탄 유도체, WO2018134695A1에 기재된 바와 같은 1,1,1-트리플루오로-3-하이드록시프로판-2-일 카르바메이트 유도체, WO2014135507A1에 기재된 바와 같은 피라졸 유도체, WO2009156462A1에 기재된 바와 같은 인돌 유도체, WO201815088A1에 기재된 바와 같은 [1,2,31트리아졸로[4,5-d]피리미딘 유도체, WO2016177660A1에 개시된 바와 같은 sgc 자극제, WO201760879A1에 기재된 바와 같은 CFTR 단백질, WO2018109607A1에 기재된 바와 같은 벤즈이미다졸 또는 4-아자-, 5-아자-, 7-아자- 또는 4,7-디아자-벤즈이미다졸의 6-카르복실산, WO201728926A1에 기재된 바와 같은 벤즈아미드 유도체, WO201287519A1에 기재된 바와 같은 8-아자비사이클로 [3.2.1] 옥탄 유도체, WO201671375A1에 기재된 바와 같은 트리아졸로[4,5-d]피리미딘 유도체, WO2015104354A1에 기재된 바와 같은 아릴 설탐 유도체, WO201415905A1에 기재된 바와 같은 2-(아자인돌-2-일)벤즈이미다졸 유도체, 또는 WO2005104745A1에 기재된 바와 같은 퀴누클리딘 또는 이소-퀴누클리딘 유도체이다. 바람직하게는, 본 구현예에 따른 화합물은 섬유증, 상처 치유, 심근경색증, 죽상경화증, 관절염 및/또는 다른 염증성 및 섬유성 질환을 치료하기 위한 약제이다.

[0052] WO2013064508A1, WO2014097151A2, WO2014091446A1, WO2013064450A1, WO2014177527A1, WO2015173683A1, WO201326797A1, WO2016061161A1, WO201486705A1, WO2011113894A1, WO201627195A1, WO2015175796A1, WO2010125082A1, WO2014126979A1, WO201235158A1, WO201472956A1, WO201696721A1, WO2010101849A1, WO2017115205A1, WO201728927A1, WO2017221142A1, WO2013171166A1, WO2013174768A1, WO2016150901A1, WO201637954A1, WO2012168350A1, WO2005044817A1, WO2012117000A1, WO201267965A1, WO201616242A1, WO2018134695A1, WO2014135507A1, WO2009156462A1, WO201815088A1, WO2016177660A1, WO201760879A1, WO2018109607A1, WO201728926A1, WO201287519A1, WO201671375A1, WO2015104354A1, WO201415905A1 및 WO2005104745A1은 전문이 포함되고, 거기에 개시된 모든 화합물은 본 출원의 맥락에서 항체 단편에 연결된 모이어티일 수 있다.

[0053] 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 기능적 특징 및/또는 구조적 특징으로 특성화될 수 있다. 구조적 특징의 예는 서열이 관련되고 기능적 특징의 예는 상기 항체 단편의 활성과 관련된다. 활성은 특이적 결합 활성일 수 있다. 활성은 또한 특정 결합 활성의 부재 또는 특정 결합 활성 검출의 부재일 수 있다.

[0054] 항체 단편의 특이적 결합은, 예를 들어 바이오패닝, 스캐차드 분석(Scatchard analysis) 및/또는 경쟁 결합 검정법, 예컨대 방사선 면역 검정법(RIA), 효소 면역 검정법(EIA)(또한 효소 연결 면역 흡착 검정법(ELISA)으로도 불림), 샌드위치 경쟁 검정법, 표면 플라즈몬 공명(SPR), 또는 생물층 간섭계 및 당업계에 알려진 이들의 다양한 변형을 비롯한 그 자체로 알려진 임의의 적합한 방식으로 결정될 수 있다. 이들 검정법 각각은 지지체 상 또는 용액 중에 고정될 수 있는 인간 및/또는 뮤린 FAP 재조합 단백질을 사용하여 시험관 내에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 일부 특정 상황 하에서, 이들 검정법 중 일부는 인간 및/또는 FAP를 발현하는 세포를 사용하여 시

험관 내에서 수행될 수 있다. 이러한 세포는 내인적으로 인간 및/또는 뮤린 FAP를 발현하거나 과발현할 수 있다. 평가는 보통 배양 배지 또는 PBS 또는 적합한 배지 또는 완충액에서 시험관 내에서 수행된다. 바람직한 세포는 인간 및/또는 뮤린 FAP를 발현하는 섬유아세포이다. 바람직한 세포주는 GM05389 또는 U-87 MG일 수 있다. 대안적으로 바람직한 세포는 인간 및/또는 뮤린 FAP를 발현하는 형질감염된 세포이다. 바람직한 형질감염된 세포주는 HEK293일 수 있다.

[0055] 대안적으로, 항체 단편의 결합은 인간 및/또는 뮤린 FAP를 발현하는 동물에서 생체 내에서 평가될 수 있다. 이러한 설정에서, 항체 단편은 바람직하게는 표지되고, 더 바람직하게는 방사성표지되며, 영상화 기법이 사용된다. 바람직한 영상화 기법은 SPECT/CT, PET/CT, SPECT/MRI 또는 PET/MRI이다. 인간 및/또는 뮤린 FAP를 과발현하는 세포는 또한 동물 내로 이종이식될 수 있다. 또한 인간 FAP를 발현하는 본 발명의 인간 FAP 녹인(knock-in) 마우스를 사용하는 것도 가능하다.

[0056] 따라서 용어 "시험관내"는 본 명세서에서 인간 및/또는 뮤린 FAP 재조합 단백질이 지지체 상 또는 용액 중에 고정되는 경우 무세포 검정의 맥락에서, 또는 배양 중인 세포의 맥락에서 사용된다. 이와 대조적으로, 용어 "생체내" 또는 "생체외"는 본 명세서에서 비-인간 동물 또는 이러한 비-인간 동물의 조직 또는 장기의 맥락에서 사용된다. 보통 "생체외"는 정량화가 비-인간 또는 인간 동물의 조직 또는 장기에서 수행될 경우 사용되고, "생체내"는 영상화 방법을 통한 정량화가 비-인간 또는 인간 동물에서 수행될 때 사용된다. 보통 "결합"은 시험관내 조건을 사용하여 평가되고, 생체내 조건을 사용하여 추가로 확인된다.

[0057] 본 명세서에 개시된 시험관내, 생체내 및 생체외 검정법에서, 음성 대조군을 사용하는 것이 바람직하다. 또한 본 명세서에서 이후에 설명되는 바와 같이 다른 항원의 존재 하에 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 특이적 결합을 평가하는 것도 가능하다. 실험 파트에서, 여러 검정법이 본 발명의 항체 단편의 특이적 결합을 평가하는 데 사용되었으며: 실시예 4에서는 ELISA 및 생물층 간섭계가 사용되었고, 실시예 5에서는 결합이 SPECT/CT 영상화 및/또는 해부된 조직의 생체외 감마 계수를 사용하여 인간 FAP 녹인 마우스에서 평가되었고, 실시예 6에서는 결합이 SPECT/CT 영상화 및/또는 해부된 조직의 생체외 감마 계수를 사용하여 인간 FAP를 과발현하는 세포를 포함하는 마우스에서 평가되었다.

[0058] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 "친화도", "특이적 결합", "결합", "결합 활성" 또는 "특이적 결합 활성"은 인간 및/또는 뮤린 FAP 및 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편, 바람직하게는 VHH, 또는 이의 단편을 이들의 결합에 의해 형성된 복합체의 존재 쪽으로 평형을 이동시키기 위해 항체 단편이 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하는 정도를 지칭한다. 결합은 SPR 또는 생물층 간섭계를 사용하여 평가될 수 있다. 따라서, 예를 들어 인간 및/또는 뮤린 FAP 및 항체 단편이 비교적 동일한 농도로 조합되는 경우, 고친화도의 항체 단편은 이용 가능한 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하여 평형을 생성된 복합체의 고농도 쪽으로 이동시킬 것이다. 평형 해리 상수(K_D)는 일반적으로 단백질 결합 도메인(항체 단편)과 항원 표적(인간 및/또는 뮤린 FAP) 사이의 친화도를 기재하는 데 사용된다. 통상적으로, 평형 해리 상수는 10^{-7} M 미만이다. 바람직하게는, 평형 해리 상수는 10^{-8} M 미만, 또는 10^{-9} M 미만, 또는 더 바람직하게는 10^{-9} M 내지 10^{-12} M의 범위이다.

[0059] 본 명세서에 개시된 바와 같은 임의의 항체 단편은, 바람직하게는 생물층 간섭계를 사용하여 평가된, 바람직하게는 10^{-9} 내지 10^{-12} 몰/리터 또는 10^{-10} 내지 10^{-12} 몰/리터 범위의 평형 해리 상수(K_D)로 인간 및/또는 뮤린 FAP에 (본 명세서에서 정의된 바와 같이) 특이적으로 결합하도록 한다.

[0060] 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편, 바람직하게는 VHH, 또는 이의 단편의 '특이성'은 친화도 및/또는 결합력을 기반으로 하여 결정될 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편의 '친화도'는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편 및 이 항체 단편이 결합하는 인간 및/또는 뮤린 FAP의 해리에 대한 평형 상수로 표시된다. K_D 값이 더 낮을수록, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편과 이 항체 단편이 결합하는 관심이 있는 표적 단백질 사이의 결합 강도가 더 강하다. 대안적으로, 친화도는 또한 $1/K_D$에 해당하는 평형 회합 상수(K_A)의 면에서 표현될 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편의 결합 친화도는 관심이 있는 특정 표적 단백질에 따라서 당업자에게 알려진 방식으로 결정될 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편의 '결합력'은 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편과 관심이 있는 적절한 표적 단백질 사이의 결합 강도의 척도이다. 결합력은 관심이 있는 표적 단백질 상의 결합 부위와 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편 상의 결합 부위 사이의 친화도 및 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편에 존재하는 적절한 결합 부위의 수 둘 다와 관련된다. 본 발명의 바람직한 항체 단편, 예컨대 VHH는 단 하나의 단일-도메인을 가지고 따

라서 단 하나의 단일 결합 부위를 가진다. 이러한 단일-도메인 항체 단편에 의해 보이는 친화도는 나노몰 이하의 범위이고 따라서 단일 결합 부위의 존재를 고려하면 상당히 예외적이다. 약 1 밀리몰 초과의 K_D 값은 일반적으로 비-결합 또는 비-특이적 결합을 나타내는 것으로 간주된다. 일반적으로 K_D는 또한 k_{off} 또는 k_d(초$^{-1}$ 또는 s^{-1}으로 표현됨)로 표시되는 복합체의 해리 속도 상수 대 k_{on} 또는 k_a(몰$^{-1}$ 초$^{-1}$ 또는 M^{-1} s^{-1}으로 표현됨)로 표시되는 복합체의 회합 속도 상수의 비율로 표현될 수 있는 것으로 당업계에 알려져 있다. 구체적으로, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편은 0.1 내지 0.00001 s^{-1} 범위, 또는 10^{-2} 내지 10^{-5} s^{-1} 범위의 k_{off} 및/또는 1,000 내지 10,000,000 M^{-1} s^{-1} 범위 또는 10^4 내지 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ 또는 10^5 내지 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ 범위의 k_{on}으로 관심이 있는 표적 단백질(즉, 인간 및/또는 뮤린 FAP)에 결합할 것이다. 결합 친화도, k_{off} 및 k_{on} 속도는 당업자에게 알려진 방법, 예를 들어 ELISA 방법, 등온 적정 열량측정법, SPR, 생물층 간섭계, 형광-활성화 세포 분류 분석법 등에 의해 결정될 수 있다(실시예 4 참조).

[0061] 바람직한 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편은, 바람직하게는 생물층 간섭계를 사용하여 평가된, 0.1 내지 0.00001 s^{-1} 범위, 또는 10^{-2} 내지 10^{-5} s^{-1} 또는 10^{-3} 내지 10^{-5} s^{-1} 범위의 k_{off}로 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합한다.

[0062] 바람직한 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편은 바람직하게는 생물층 간섭계를 사용하여 평가된, 10^{-9} 내지 10^{-12} 몰/리터 범위의 K_D 및/또는 10^{-2} 내지 10^{-5} s^{-1} 범위의 k_{off}, 더 바람직하게는 10^{-9} 내지 10^{-12} 몰/리터 범위의 K_D 및 10^{-2} 내지 10^{-5} s^{-1} 범위의 k_{off}로 인간 및/또는 뮤린 FAP에 (본 명세서에서 정의된 바와 같이) 특이적으로 결합하도록 한다.

[0063] 따라서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편(바람직하게는 VHH 또는 이의 단편)은, 해당 항체 단편이 해당 표적(또는 이의 적어도 일부분 또는 단편)에 대해 친화도, 특이성을 가지고/가지거나 이에 대해 구체적으로 지시될 때, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 '특이적으로 결합한다'고 한다.

[0064] 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 단편과 관련하여, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편에 존재하는 용어 '결합 영역', '결합 부위' 또는 '상호작용 부위'는 본 명세서에서 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 결합 또는 특이적 결합을 담당하는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편에 존재하는 아미노산 잔기의 특정 부위, 일부, 유전자좌, 도메인 또는 스트레치의 의미를 가진다. 항체 단편에 존재하는 이러한 결합 영역은 파라토프로 불린다. 이러한 결합 영역은 인간 및/또는 뮤린 FAP와 접촉하는 항체 단편의 본 명세서에 개시된 바와 같은 아미노산 서열 유래의 특정 아미노산 잔기를 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진다. 상기 항체 단편과 접촉하는 인간 및/또는 뮤린 FAP의 세포외 도메인의 영역 또는 일부 또는 별개 아미노산은 에피토프로 불릴 수 있고 본 명세서에서 이후에 정의된다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편의 패밀리는 본 명세서에서 이후에 정의된 바와 같은 에피토프를 공유한다(제2 구조적 특징). 항체 단편의 이러한 패밀리는 시험관내 및 생체내 둘 다에서 매력적인 특성을 보인다. 시험관내 매력적인 특성은 적어도 결합 친화도 및 동역학과 관련될 수 있거나, FAP 효소 활성을 조절하지 않을 수 있다. 생체내 매력적인 특성은 적어도 상기 항체 단편이 본 발명의 표지된 화합물에 존재할 때 생체분포 및 종양 표적화와 관련될 수 있다.

[0065] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '특이적으로 결합하다' 및 '특이적 결합'은 일반적으로 폴리펩타이드, 구체적으로 면역글로불린, 예컨대 항체, 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편이 특정 항원, 예컨대 인간 및/또는 뮤린 FAP에 우선적으로 결합하는 능력을 지칭한다. 이러한 항체 단편은 또한 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대해 생성된 항체 단편으로 식별될 수 있다.

[0066] 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 결합은 상이한 항원의 균질한 혼합물에서 평가될 수 있다. 특정 구현예에서, 특이적 결합 상호작용은 샘플에서 바람직한 항원과 바람직하지 않은 항원을, 일부 구현예에서 약 10 내지 100배 이상을 초과하여(예를 들어, 약 1000배 또는 10,000배 초과) 구별할 것이다.

[0067] 일 구현예에서, 결합은 인간 및/또는 뮤린 FAP를 발현하는 세포를 사용하여 시험관내에서, 그리고 선택적으로 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같이 생체내 또는 생체외에서 평가될 수 있다. 이들 세포는 인간 세포일 수 있으며 내인성 인간 및/또는 뮤린 FAP를 발현할 수 있다. 대안적으로, 이들 세포는 인간 및/또는 뮤린 FAP를 과발현할 수 있다. 인간 및/또는 뮤린 FAP를 과발현하는 세포는 인간 또는 비-인간 세포일 수 있다. 바람직한 세포

는 인간 및/또는 뮤린 FAP를 발현하는 섬유아세포이다. 바람직한 형질감염된 세포주는 HEK293이다. FAP를 발현하는 바람직한 세포주는 GM05389 또는 U-87 MG이다. 인간 FAP를 발현하는 바람직한 암 세포주는 U-87 MG이다.

[0068] 일 구현예에서, 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합한다. 이러한 평가는 바람직하게는 ELISA, 표면 플라즈몬 공명 또는 생물층 간섭계를 사용하여 수행된다.

[0069] 또한 본 발명의 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 인간 및/또는 뮤린 FAP의 다수의 천연 발생 또는 합성 유사체, 변이체, 돌연변이체, 대립유전자, 일부 및 단편에 결합할 것으로 예상된다.

[0070] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 적어도 항체 단편이 결합하는 (천연/야생형) 항원의 에피토프를 (여전히) 포함하는 인간 및/또는 뮤린 FAP의 유사체, 변이체, 돌연변이체, 대립유전자, 천연 발생, 합성 유사체, 일부 및 단편에 특이적으로 결합할 것이다.

[0071] 본 발명의 항체 단편의 인간 FAP의 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 26 내지 760 내에 포함된다.

[0072] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편의 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함된다.

[0073] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편의 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140을 포함한다.

[0074] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편의 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합을 포함한다.

[0075] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편의 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함된다.

[0076] 일 구현예에서, 서열번호 26의 다음 아미노산 중 적어도 하나가 항체 단편과 결합하거나 접촉하거나 상호작용한다: I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및 Y458.

[0077] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합한다:

[0078] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0079] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0080] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0081] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0082] 5) V158 및/또는 G159 및/또는

[0083] 6) R175, 및/또는

[0084] 7) D457 및/또는 Y458.

[0085] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합한다:

[0086] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0087] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0088] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0089] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0090] 5) V158 및/또는 G159 및

[0091] 6) R175, 및

[0092] 7) D457 및/또는 Y458.

[0093] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합한다:

[0094] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0095] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0096] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0097] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0098] 5) V158 및 G159 및/또는

[0099] 6) R175, 및/또는

[0100] 7) D457 및 Y458.

[0101] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합한다:

[0102] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0103] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0104] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0105] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개 아미노산, 및

[0106] 5) V158 및 G159 및

[0107] 6) R175, 및

[0108] 7) D457 및 Y458.

[0109] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합한다:

[0110] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0111] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0112] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0113] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0114] 5) V158 및 G159 및/또는

[0115] 6) R175, 및

[0116] 7) D457 및 Y458.

[0117] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산에 특이적으로 결합한다:

[0118] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0119] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0120] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0121] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0122] 5) V158 및 G159 및

[0123] 6) R175, 및

[0124] 7) D457 및 Y458.

[0125] 일 구현예에서, 서열번호 26의 다음 아미노산이 항체 단편과 결합하거나 접촉하거나 상호작용한다: I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및 Y458. 이러한 맥락에서, FAP의 인간 아미노산은 상기 아미노산이 항체 단편의 에피토프에 속할 때 본 발명의 항체 단편에 의해 결합될 수 있다.

[0126] 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편이 제2 분자에 결합하는 친화도보다 적어도 5배, 예컨대 적어도 10배, 예컨대 적어도 100배, 바람직하게는 적어도 1000배인 더 높은 친화도로 항체 단편이 관심이 있는 제1 표적 항원과 결합할 때, 제2 분자, 예컨대 FAP의 가장 가까운 상동체 중 하나(즉, DPP IV, 디펩티딜 아미노-펩티다제 IV, 문헌[Juillerat-Jeanneret, L.,et al (2017), Expert Opinion on therapeutic targets, 21: 977-991])와 대조적으로 관심이 있는 제1 표적 항원(즉, 인간 및/또는 뮤린 FAP)에 '특이적'인 것으로 지칭된다. DPP IV의 아미노산 서열은 FAP의 아미노산 서열과 52%의 동일성을 가지며(실시예 4b 참조), 또한 본 발명의 항체 단편은 2개의 관련된 프롤릴-특이적 세린 프로테아제를 구별할 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편이 제2 분자와 대조적으로 관심이 있는 제1 표적 항원에 '특이적'이라고 할 때, 항체 단편은 관심이 있는 제1 표적 항원에 (본 명세서에 정의된 바와 같이) 특이적으로 결합할 수 있지만, 제2 분자에는 그렇지 않다. 본 발명의 맥락 내에서, 항체 단편은 인간 및/또는 뮤린 FAP의 에피토프에 특이적으로 결합하고 DPP IV에는 특이적으로 결합하지 않는다. 이는 실시예 4b에서 입증되었다.

[0127] 본 명세서에서 호환 가능하게 사용되는 바와 같이 용어 '(와) 경쟁하는', '교차 차단하는', '교차 결합하는' 및 '교차 억제하는'은 일반적으로 적합한 시험관내 또는 생체내 분석을 사용하여 측정될 때, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 본 명세서에 개시된 바와 같은 다른 항체 또는 다른 단일-도메인 항체 단편 또는 다른 분자의 결합을 방해할 수 있는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 VHH를 지칭한다. 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 시험관내 결합을 시험하는 데 사용되는 바람직한 세포는 인간 및/또는 뮤린 FAP를 발현하는 세포이다. 바람직한 세포주는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 GM05389, U-87 MG 또는 형질감염된 HEK293일 수 있다. 일부 세포는 실험 파트에서 사용되었다(실시예 4c 참조). 따라서, 보다 구체적으로, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편을 사용하여 '(와) 경쟁하는', '교차 차단하는', '교차 결합하는' 및 '교차 억제하는'은, 본 명세서에 개시된 바와 같은 '교차 차단하는' 단일-도메인 항체 단편을 사용하지 않지만, 본 명세서에 개시된 바와 같은 또 다른 항체 또는 단일-도메인 항체 단편과 인간 및/또는 뮤린 FAP의 결합을 방해하거나 이와 경쟁하여, 본 명세서에 개시된 바와 같은 다른 단일-도메인 항체 단편과 인간 및/또는 뮤린 FAP의 결합과 비교하여, 적합한 시험관내, 세포 또는 생체내 검정법을 사용하여 측정될 때 적어도 10%, 그러나 바람직하게는 적어도 20%, 예를 들어 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 그 이상만큼 해당 결합을 감소시킴을 의미할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 FAP의 리간드와 이에 결합하기 위해 경쟁하지 않는다. 결과적으로, 본 발명의 항체 단편은 또한 이 수용체의 천연 기능을 방해하지 않을 것으로 예상된다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 인간 및/또는 뮤린 FAP의 천연 리간드와 경쟁하지 않으며 따라서 시험관내 또는 생체내 또는 생체외 환경에서 인간 및/또는 뮤린 FAP-발현 세포에 결합하기 위해 억제되지 않음을 의미한다. 실험 파트에서 구체적으로 예시된 모든 항체 단편은 인간 및/또는 뮤린 FAP의 천연 리간드와 실질적으로 경쟁하지 않는데, 그 이유는 본 발명의 항체 단편이 이에 결합할 때 실질적인 FAP 활성이 여전히 검출 가능하기 때문이다(실시예 4d 참조). FAP 활성은 바람직하게는 이러한 맥락에서 FAP 디펩티딜 펩티다제 활성 또는 젤라티나제 활성이다. 본 발명의 맥락 내에서, '실질적인'은 항체 단편이 존재하지 않을 때 동일한 FAP 활성과 비교하여 FAP 활성의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%가 여전히 검출 가능함을 의미할 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 FAP 활성을 실질적으로 변경하지 않으며, 이는 바람직하게는 FAP 활성을 실질적으로 억제하지 않음을 의미한다. 본 발명의 맥락 내에서, FAP 활성은 엑소펩티다제 및/또는 엔도펩티다제 활성일 수 있다. 이러한 엑소펩티다제 활성은 FAP 디펩티딜 펩티다제 활성일 수 있다. 일 구현예에서, 항체 단편은 FAP 디펩티딜 펩티다제 활성을 실질적으로 억제하지 않는다. 이러한 엔도펩티다제 활성은 젤라티나제 및/또는 콜라게나제 활성일 수 있다. 일 구현예

에서, 항체 단편은 FAP 젤라티나제 및/또는 FAP의 콜라게나제 활성을 실질적으로 억제하지 않는다. 따라서, 일 구현예에서, 항체 단편은 인간 및/또는 뮤린 FAP의 조절제가 아니다. 일 구현예에서, 항체 단편은 억제제가 아니고 인간 및/또는 뮤린 FAP의 활성화제가 아니다. 임의의 FAP 활성은 문헌[Juillerat-Jeanneret L. et al, (2017), Expert Opinion on Therapeutic Targets (http://dx.doi.org/10.1080/14728222.2017.1370455)]에 예시된 바와 같이 평가될 수 있다. FAP 디펩티딜 펩티다제 활성은 당업자에게 알려진 기법, 예컨대 실시예 4d에서 사용된 것을 사용하여 평가될 수 있다. 요컨대, 인간 FAP 효소 활성은 형광 기질인 벤질옥시카르보닐-Gly-Pro-7-아미도-4-메틸쿠마린(Z-Gly-Pro-AMC; Bachem)을 사용하여 측정될 수 있다. 인간 FAP 재조합 단백질(실시예 4a)은 1 μM HA-His_6-태그 VHH의 부재 또는 존재 하에 검정색 96-웰의 평평한 바닥 플레이트에서 검정 완충액 (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0.1% BSA, pH 7.5) 중 200 ng/ml로 희석될 수 있다. 억제제 대조군인 1 μM 탈라보스탓 메실레이트(ApexBio)를 항체 단편 대신에 첨가하였다. 결합 평형에 도달하기 위해 1시간 인큐베이션한 후, Z-Gly-Pro-AMC 기질을 최종 농도 50 μM로 첨가하였다. 기질의 Z-Gly-Pro 및 7-아미노-4-메틸쿠마린(AMC)으로의 효소 전환은 형광 마이크로플레이트 판독기(BioTek)를 사용하여 380 nm에서의 여기 및 460 nm에서의 방출 검출에 의해 관찰되었다. 형광을 1시간 동안 매 분마다 측정하였다. 곡선 기울기는 효소 활성의 속도에 해당한다(예로서 도 4 참조). 억제제 대조군이 또한 사용될 수 있다. 적합한 억제제는 탈라보스탓 메탄신(Talabostat metansine; ApexBio)이다.

[0128] 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 기능적 단편은 항체 단편이 관심이 있는 2개의 상이한 표적 단백질 둘 다에 대해 (본 명세서에 정의된 바와 같이) 특이적인 경우 관심이 있는 이들 상이한 표적 단백질에 대해 '교차 반응성'을 나타낸다고 한다. 일 구현예에서, 관심이 있는 2개의 상이한 표적 단백질은 인간 및 뮤린 FAP일 수 있다.

[0129] 하기에 본 발명자들은 본 발명의 항체 단편의 여러 가지 구조적 특징(즉, 제1, 제2, 제3, 제4 구조적 특징)을 기재한다. 본 발명의 항체 단편은 이들 4가지 구조적 특징 중 적어도 하나, 또는 전부의 존재로 특성화될 수 있다:

[0130] - 제3 및 제4 구조적 특징,

[0131] - 제1 및 제2 구조적 특징,

[0132] - 제1, 제2 및 제3 구조적 특징

[0133] - 제3 및 제4 구조적 특징,

[0134] - 제3 구조적 특징,

[0135] - 제4 구조적 특징,

[0136] - 제1, 제3 및 제4 구조적 특징,

[0137] - 제2, 제3 및 제4 구조적 특징,

[0138] - 제1 및 제3 구조적 특징,

[0139] - 제1 및 제4 구조적 특징,

[0140] - 제2 및 제3 구조적 특징,

[0141] - 제2 및 제4 구조적 특징

[0142] - 제1, 제2, 제3 및 제4 구조적 특징.

[0143] 항체 단편의 제1 구조적 특징: FAP의 접촉 영역 기반

[0144] 제1 구조적 특징은 본 발명의 항체 단편이 서열번호 26의 아미노산 26 내지 760 내에 포함되는 인간 FAP의 영역과 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합하거나 이와 상호작용한다. 본 발명의 항체 단편에 의해 특이적으로 결합되거나 표적화되는 서열번호 26의 아미노산 26 내지 760 내의 영역은 상기 1차 아미노산 서열 내의 선형 영역(즉, 선형 에피토프 또는 순차적 에피토프)일 수 있다. 대안적으로 상기 영역은 선형이 아닐 수 있고 형태적 에피토프에 해당할 수 있다. 보통 선형 에피토프는 길이가 5 내지 30개 아미노산인 아미노산의 선형 서열을 포함하며, 즉 길이가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 아미노산일 수 있다. 보통 형태적 에피토프는 단백질의 3차원 3차 구조에서

함께 합쳐지고 항체 단편에 의해 접촉되는 서열번호 26의 아미노산 26 내지 760 내의 다수의 비-연속적 아미노산으로 특성화된다.

[0145] 항체 단편의 제2 구조적 특징에 대한 다음 단락에서, 항체 단편의 선형 에피토프 및 형태적 에피토프가 정의되어 있다.

[0146] 항체 단편의 제2 구조적 특징: 항체 단편의 에피토프 기반

[0147] 인간 및/또는 뮤린 FAP의 에피토프에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체 단편은 또한 대안적으로 또는 상기에서 정의된 제1 구조적 특징과 조합하여 하기 정의된 제2 구조적 특징에 의해 추가로 정의될 수 있다.

[0148] 제2 구조적 특징은 본 발명의 항체 단편이 서열번호 26의 아미노산 26 내지 760 내의 다수의 아미노산과 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다. 서열번호 26의 아미노산 26 내지 760 내의 이들 특이적 아미노산은 하기에 추가로 정의되어 있다.

[0149] 이러한 제2 구조적 특징의 제1 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 26의 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되는 아미노산 중 적어도 하나와 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다. 따라서 식별된 66개의 아미노산으로부터 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 또는 66개 아미노산의 각각의 조합이 본 발명의 항체 단편에 의해 접촉되도록 포함된다.

[0150] 이러한 제2 구조적 특징의 제2 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 26의 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및 Y458 중 적어도 하나와 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다. 따라서 식별된 37개 아미노산으로부터 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 또는 37개 아미노산의 각각의 조합이 본 발명의 항체 단편에 의해 접촉되도록 포함된다.

[0151] 이러한 제2 구조적 특징의 제3 구현예에서, 서열번호 1의 아미노산 65 내지 90의 스트레치는 hFAP의 제1 영역을 정의하며, 이는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다. 이러한 스트레치 또는 영역 내 각각의 아미노산은 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합되지 않을 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 스트레치 또는 영역의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 아미노산은 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다. 일 구현예에서, 이러한 제1 스트레치 또는 영역은 항체 단편의 에피토프이다. 일 구현예에서, 항체 단편의 에피토프는 이러한 제1 스트레치 또는 영역 내에 포함된다.

[0152] 바람직하게는 이러한 제1 스트레치 내에서 Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90 중 적어도 하나는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다.

[0153] 더 바람직하게는 이러한 제1 스트레치 내에서 Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90 중 적어도 2개는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다.

[0154] 훨씬 더 바람직하게는, 이러한 제1 스트레치 내에서 Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89 및 L90 중 적어도 3개는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다.

[0155] 훨씬 더 바람직하게는, 바람직하게는, 이러한 제1 스트레치 내에서 Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90 전부는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다.

[0156] 가장 바람직하게는, 이러한 제1 스트레치 내에서 Q65, E66, I76, V77, L78, N80, I81, E82, T83, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90 전부는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다.

[0157] 이러한 제2 구조적 특징의 제4 구현예에서, 서열번호 26의 아미노산 101 내지 140의 스트레치는 hFAP의 제2 영역을 정의하며, 이는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다. 이러한 스트레치 또는 영역 내 각각의 아미노산은 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합될 필요가 없다. 일 구현예에서, 이러한 스트레치 또는 영역의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 아미노산은 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다. 일 구현예에서, 이러한 제2 스트레치 또는 영역은 항체 단편의 에피토프이다. 일 구현예에서, 항체 단편의 에피토프는 이러한 제2 스트레치 또는 영역 내에 포함된다.

[0158] 바람직하게는 이러한 제2 스트레치 내에서 L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137 중 적어도 하나는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다.

[0159] 더 바람직하게는 이러한 제2 스트레치 내에서 L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137 중 적어도 2개는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다.

[0160] 훨씬 더 바람직하게는 이러한 제2 스트레치 내에서 L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137 중 적어도 3개는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다.

[0161] 가장 바람직하게는 이러한 제2 스트레치 내에서 L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137 전부는 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다.

[0162] 이러한 제2 구조적 특징의 제5 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 I62, S63, G64, S91, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458과 같은 추가적인 아미노산과 추가로 접촉한다.

[0163] 이러한 제2 구조적 특징의 제6 구현예에서, 상기 정의된 제1 및 제2 스트레치 또는 영역 각각은 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다. 일 구현예에서, 이들 2개 스트레치의 조합은 항체 단편의 형태적 에피토프를 정의한다. 일 구현예에서, 형태적 에피토프는 이들 2개 스트레치의 조합 내에 포함된다. 이들 스트레치 또는 영역 각각 내 각각의 아미노산은 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합되지 않을 수 있다. 일 구현예에서, 스트레치 또는 영역 각각의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산(또는 각각의 스트레치의 길이에 따라 그 이상)은 항체 단편에 의해 접촉되거나, 결합되거나, 특이적으로 결합된다. 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 I62, S63, G64, S91, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458과 같은 추가적인 아미노산과 추가로 접촉한다.

[0164] 일 구현예에서, 인간 FAP의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 단편이 제공되며, 여기서 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함된다. 선택적으로, 항체 단편은 서열번호 26의 I62, S63, G64, S91, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458과 같은 추가적인 아미노산과 추가로 접촉한다.

[0165] 일 구현예에서, 인간 FAP의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 단편이 제공되며, 여기서 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함된다. 선택적으로, 항체 단편은 서열번호 26의 I62, S63, G64, S91, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458과 같은 추가적인 아미노산과 추가로 접촉한다.

[0166] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산과 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다:

[0167] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0168] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0169] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0170] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0171] 5) V158 및/또는 G159, 및/또는

[0172] 6) R175, 및/또는

[0173] 7) D457 및/또는 Y458.

[0174] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산과 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다:

[0175] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0176] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0177] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0178] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 1개, 또는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0179] 5) V158 및/또는 G159, 및

[0180] 6) R175, 및

[0181] 7) D457 및/또는 Y458.

[0182] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산과 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다:

[0183] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0184] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0185] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0186] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0187] 5) V158 및 G159, 및/또는

[0188] 6) R175, 및/또는

[0189] 7) D457 및 Y458.

[0190] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산과 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다:

[0191] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0192] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0193] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0194] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개 아미노산, 및

[0195] 5) V158 및 G159, 및

[0196] 6) R175, 및

[0197] 7) D457 및 Y458.

[0198] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산과 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다:

[0199] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0200] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0201] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0202] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및/또는

[0203] 5) V158 및 G159, 및/또는

[0204] 6) R175, 및/또는

[0205] 7) D457 및 Y458.

[0206] 일 구현예에서, 항체 단편은 서열번호 26의 다음 아미노산과 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다:

[0207] 1) I62, S63, G64, Q65, E66으로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0208] 2) I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0209] 3) L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0210] 4) D134, L135, S136, N137로부터 선택되는 적어도 3개의 아미노산, 및

[0211] 5) V158 및 G159, 및

[0212] 6) R175, 및

[0213] 7) D457 및 Y458.

[0214] 일 구현예에서, 서열번호 26의 다음 아미노산이 항체 단편과 결합하거나 접촉하거나 상호작용한다: I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및 Y458.

[0215] 일 구현예에서, 서열번호 26의 다음 아미노산이 항체 단편과 결합하거나 접촉하거나 상호작용한다: I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, N80, I81, E82, T83, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및 Y458.

[0216] <u>항체 단편의 제3 구조적 특징: 전장 서열 기반</u>

[0217] 제3 구조적 특징은 본 발명의 항체 단편이 본 발명의 항체 단편의 패밀리를 정의하는 방식을 나타내는 전장 아미노산 서열과 관련된다는 것이다. 본 발명은 서열번호 4 또는 이의 일부분을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열로 표시되는 구조적으로 밀접하게 관련된 항체 단편의 패밀리를 개시한다. 항체 단편 B1은 서열번호 4로 표시된다(하기 표 2 참조).

[0218] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 상기 정의된 바와 같은 제1 구조적 특징 및 하기 추가로 정의된 제3 구조적 특징에 의해 정의될 수 있다.

[0219] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 상기 정의된 바와 같은 제2 구조적 특징 및 하기 추가로 정의된 제3 구조적 특징에 의해 정의될 수 있다.

[0220] 이러한 제3 구조적 특징의 제1 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 4 또는 이의 일부분과 적어도 80% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열로 표시된다. 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 동일성은 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0221] 이러한 제3 구조적 특징의 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 4 또는 이의 일부분과 적어도 81% 서열 유사성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열로 표시된다. 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 유사성은 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0222] 이러한 제3 구조적 특징의 제2 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 4 또는 이의 일부분과 적어도 80% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지고, 서열번호 4의 정확한 길이 또는 서열번호 4의 정확한 길이보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60개의 아미노산만큼 더 긴 범위의 길이를 가지는 아미노산 서열로 표시된다.

[0223] 이러한 제3 구조적 특징의 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 4 또는 이의 일부분과 적어도 81% 서열 유사성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지고, 서열번호 4의 정확한 길이 또는 서열번호 4의 정확한 길이보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60개

의 아미노산만큼 더 긴 범위의 길이를 가지는 아미노산 서열로 표시된다.

[0224] 예를 들어, His-태그와 같은 태그가 본 발명의 항체 단편에 첨가될 수 있다. 보통 His-태그는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 히스티딘을 포함한다. 대안적인 태그는 헤마글루티닌 태그(HA-tag), 즉 YPYDVPDYA(서열번호 53); YPYDVPDYGS(서열번호 54) 또는 시스테인 태그(Cys 태그)일 수 있다. 시스테인 태그는 1개 또는 여러 개의 시스테인을 포함하는 태그이다. 시스테인 태그의 비-제한적인 예는 C; GGC; SPSTPPTPSPSTPPC(서열번호 55)이다.

[0225] 동일성 및 유사성을 평가하는 방법은 설명 말단 부분의 정의 파트에 상세히 설명되어 있다. 보통 동일성이 서열번호를 참조하여 정의될 때, 상기 동일성은 전체 서열번호에 대해 평가된다. 그러나, 또한 동일성(또한 유사성)을 상기 서열의 일부분(또는 단편)에 대해 평가하는 것은 본 발명에 포함된다. 이러한 맥락 내에서, 일부분은 서열번호의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%를 의미할 수 있다. 포함된 서열의 길이는 여전히 동일성(또는 유사성)이 서열번호의 일부분, 또는 서열번호의 정확한 길이보다 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60개 아미노산만큼 더 긴 길이에 대하여 평가되더라도 동일성(또는 유사성)(즉, 길이는 서열번호의 길이의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%임)을 평가하는 데 사용되는 서열번호의 길이보다 더 길 수 있고, 서열번호 중 하나와 동일할 수 있다.

[0226] 이러한 제3 구조적 특징의 제3 구현예에서, 항체 단편의 길이는 110 내지 130개의 아미노산이거나 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 또는 130개의 아미노산이다. 이러한 길이는 항체 단편의 서열에 첨가될 수 있는 태그, 예컨대 His 태그의 길이를 포함하지 않는다.

[0227] 일 구현예에서, 항체 단편은 길이가 서열번호 4의 정확한 길이 또는 서열번호 4의 정확한 길이보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60개 아미노산만큼 더 긴 범위이다.

[0228] 일 구현예에서, 항체 단편은 길이가 110 내지 130개 아미노산 또는 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 또는 130개 아미노산의 범위이고 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3을 포함한다.

[0229] 이러한 제3 구조적 특징의 제4 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 4 또는 이의 일부분의 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열로 표시되고 항체 단편의 길이는 80 내지 150개 아미노산 또는 90 내지 140 또는 100 내지 130 또는 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 또는 130개 아미노산이다. 일 구현예에서, 이들 서열 중 적어도 하나와의 서열 동일성은 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0230] 이러한 제3 구조적 특징의 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 4 또는 이의 일부분의 적어도 하나와 적어도 81% 서열 유사성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열로 표시되고 항체 단편의 길이는 81 내지 150개 아미노산 또는 90 내지 140 또는 100 내지 130 또는 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 또는 130개 아미노산이다. 일 구현예에서, 이들 서열 중 적어도 하나와의 서열 유사성은 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0231] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 서열번호 26의 아미노산의 스트레치 또는 영역(즉, 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140) 중 적어도 하나(바람직하게는 둘 다)와 접촉하거나, 이에 결합하거나, 이에 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 상기 항체 단편의 에피토프는 서열번호 26의 아미노산의 이들 스트레치 또는 영역 내에 포함된다.

[0232] 더욱이, 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 형태적 에피토프에 대하여 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 서열번호 26의 아미노산의 스트레치 또는 영역(즉, 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140)의 조합을 가진다. 일 구현예에서, 상기 항체 단편의 형태적 에피토프는 서열번호 26의 아미노산의 이들 스트레치 또는 영역 내에 포함된다.

[0233] 이들 에피토프는 항체 단편의 패밀리를 정의한다. 이러한 항체 단편의 패밀리는 이들 에피토프, 선형 에피토프 및/또는 이러한 형태적 에피토프 중 적어도 하나를 공유한다.

[0234] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은:

[0235] - 서열번호 4 또는 이의 일부분과 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열로 표시되고(제3 구조적 특징)

[0236] - 에피토프에 대하여 서열번호 26의 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되는 아미노산 스트레치 또는 영역을 가진다(제2 구조적 특징).

[0237] 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 동일성(또는 유사성)은 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0238] 일 구현예에서, 항체 단편은 길이가 서열번호 4의 정확한 길이 또는 서열번호 4의 정확한 길이보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60개 아미노산만큼 더 긴 범위이다.

[0239] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은:

[0240] - 서열번호 4 또는 이의 일부분과 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열로 표시되고(제3 구조적 특징)

[0241] - 서열번호 26의 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458 중 적어도 하나와 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다(제2 구조적 특징).

[0242] 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 동일성(또는 유사성)은 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0243] 일 구현예에서, 항체 단편은 길이가 서열번호 4의 정확한 길이 또는 서열번호 4의 정확한 길이보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60개 아미노산만큼 더 긴 범위이다.

[0244] 제2 구조적 특징의 다른 구현예 각각은 제3 구조적 특징의 각각의 구현예와 조합될 수 있다.

[0245] 제4 구조적 특징: CDR / CDR 이식

[0246] 제4 구조적 특징에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 본 발명의 항체 단편, 바람직하게는 VHH는 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 및 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역을 포함하는 군으로부터 선택되는 CDR 서열의 적어도 하나의 조합을 포함하는 아미노산 서열로 표시된다. 상기 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3의 1개 또는 2개의 아미노산은 수득된 항체 단편의 활성을 실질적으로 변경시키지 않으면서 또 다른 하나의 아미노산으로 치환될 수 있었다. 항체 단편의 프레임워크 영역 중 임의의 것에 대해서도 동일하게 적용된다. 이들 항체 단편 변이체 각각은 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상기 항체 단편 변이체의 활성은 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 특이적 결합 활성이다. 본 발명의 맥락 내에서, '실질적인'은 항체 단편의 활성을 초기 CDR 및/또는 FR 영역과 비교하여 상기 결합 활성의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%가 여전히 검출 가능함을 의미할 수 있다.

[0247] 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명은 다음과 같은 (일반) 구조를 가지거나 다음으로부터 유래된 중쇄 항체를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 제공한다:

[0248] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0249] 여기서, FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 지칭하고, CDR1 내지 CDR3은 각각 상보성 결정 영역 1 내지 3을 지칭하며, 본 명세서에 추가로 정의된 바와 같다(인간 및/또는 뮤린 FAP에 대해 생성된 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 열거하는 표 2 참조).

표 2

항체 단편 B1의 CDR 및 FR(본 명세서의 이후에 본 발명의 일반 정의에 대한 설명의 일반 파트에서 정의되는 IMGT 명명법을 사용함)

	아미노산 서열
B1 (서열번호 4)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRLSSSNSMAWYRQVPGKRREL VAGITGGGETNYADFVGGRFTISRDNAKNGLYLQLNGLKPEDTAAYYCN FWPPLINYWGQGTQVTVSS
B1의 CDR	
CDR1 (서열번호 1)	GRLSSSNS
CDR2 (서열번호 2)	ITGGGET
CDR3 (서열번호 3)	NFWPPLINY
B1의 FR	
FR1 (서열번호 37)	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS
FR2 (서열번호 38)	MAWYRQVPGKRRELVAG
FR3 (서열번호 39)	NYADFVGGRFTISRDNAKNGLYLQLNGLKPEDTAAYYC
FR4 (서열번호 40)	WGQGTQVTVSS

[0250]

[0251] 본 발명은 본 명세서에 개시된 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편(또는 이를 발현하는 뉴클레오타이드 서열)의 기원으로 제한되지 않거나, 본 명세서에 개시된 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편 또는 뉴클레오타이드 서열이 생성되거나 수득되는(생성되었거나 수득된) 방식으로 제한되지 않음에 유의하여야 한다. 따라서, 본 명세서에 개시된 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 천연 발생 아미노산 서열(임의의 적합한 종 유래) 또는 합성 또는 반-합성 아미노산 서열일 수 있다. 항체 단편을 단리하는 방법 및 항체 단편을 생산하는 방법뿐만 아니라, 항체 단편을 인코딩하는 핵산 분자, 이러한 핵산 분자를 포함하는 작제물 및 이러한 작제물을 포함하는 세포가 설명 말단 부분의 정의 파트에 상세히 개시되어 있다.

[0252] 본 발명의 구체적이지만 비-제한적인 양태에서, 항체 단편의 아미노산 서열은 "인간화된" 면역글로불린 서열(예컨대, 부분적으로 또는 완전히 인간화된 마우스 또는 토끼 면역글로불린 서열, 그리고 구체적으로 부분적으로 또는 완전히 인간화된 VHH 서열), "낙타화된" 면역글로불린 서열뿐만 아니라, 친화도 성숙(예를 들어, 합성, 무작위 또는 천연 발생 면역글로불린 서열로부터 출발함), CDR 이식, 베니어링(veneering), 상이한 면역글로불린 서열로부터 유래된 단편의 조합, 중첩 프라이머를 사용하는 PCR 조립, 및 당업자에게 잘 알려진 면역글로불린 서열을 조작하기 위한 유사한 기법과 같은 기법에 의해 수득된 면역글로불린 서열을 포함하지만 이에 제한되지 않는 천연 발생 면역글로불린 서열(임의의 적합한 종 유래) 또는 합성 또는 반-합성 면역글로불린 서열; 또는 상기한 것 중 임의의 것의 임의의 적합한 조합이다. 또한, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 단편은 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이 적합하게 인간화되어 본 발명의 하나 이상의 추가의 (부분적으로 또는 완전히) 인간화된 아미노산 서열을 제공할 수 있다.

[0253] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 CDR 이식을 사용하여 상기 기재된 항체 단편으로부터 유래된다.

[0254] 바람직한 항체 단편은 다음을 포함한다:

[0255] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 및 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역. FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0256] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 및 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역, FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음. CDR2 영역은 또 다른 항체 단편 유래임.

[0257] - 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 및 서열번호 3을 포함하거

나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역, FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음. CDR1 영역은 또 다른 항체 단편 유래임.

[0258] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 및 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음. CDR3 영역은 또 다른 항체 단편 유래임.

[0259] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 그리고 항체 단편은 또 다른 항체 단편 유래의 CDR2 및 CDR3 영역을 포함하고 표 2에서 식별된 바와 같은 FR을 가질 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0260] - 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 그리고 항체 단편은 또 다른 항체 단편 유래의 CDR1 및 CDR3 영역을 포함하고 표 2에서 식별된 바와 같은 FR을 가질 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0261] - 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역, 그리고 항체 단편은 또 다른 항체 단편 유래의 CDR1 및 CDR2 영역을 포함하고 표 2에서 식별된 바와 같은 FR을 가질 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0262] 유사하게, 아미노산 서열이 합성 또는 반-합성 서열(예컨대, 부분적으로 인간화된 서열)을 포함하는 경우, 상기 서열은 선택적으로 다시 본 명세서에 기재된 바와 같이 추가로 적합하게 인간화되어 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 추가의 (부분적으로 또는 완전히) 인간화된 아미노산 서열을 제공할 수 있다. 설명 말단 부분에, "효현제", "길항제", "항체 단편의 변이체", "항체 단편의 번역후 구조적 특성"의 더 상세한 정의가 제공되어 있다.

[0263] 구체적으로, 인간화된 항체 단편, 바람직하게는 VHH는 인간화 치환이고/이거나 이에 해당하는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 존재하는(구체적으로, 프레임워크 잔기 중 적어도 하나에 존재하는) 아미노산 서열로 표시될 수 있다. 추가적으로, 또는 대안적으로, 다른 잠재적으로 유용한 인간화 치환은 천연 발생 VHH 서열의 프레임워크 영역의 서열을 하나 이상의 밀접하게 관련된 인간 V_H 서열의 상응하는 프레임워크 서열과 비교함으로써 확인될 수 있으며, 후속적으로 이렇게 결정된 잠재적으로 유용한 인간화 치환(또는 이의 조합) 중 하나 이상이 상기 VHH 서열에 (본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이, 그 자체로 알려진 임의의 방식으로) 도입될 수 있고 생성된 인간화된 VHH 서열 또는 이의 기능적 단편은 표적에 대한 친화도에 대해, 안정성에 대해, 발현의 용이성 및 수준에 대해, 및/또는 다른 원하는 특성에 대해 시험될 수 있다. 이러한 방식으로, 제한된 정도의 시행착오에 의해, 다른 적합한 인간화 치환(또는 이의 적합한 조합)이 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0264] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 상기 정의된 바와 같은 제1 구조적 특징 및 본 명세서에 추가로 정의된 제4 구조적 특징에 의해 정의될 수 있다.

[0265] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 상기 정의된 바와 같은 제2 구조적 특징 및 본 명세서에 추가로 정의된 제4 구조적 특징에 의해 정의될 수 있다.

[0266] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 상기 정의된 바와 같은 제2 구조적 특징, 제3 구조적 특징 및 본 명세서에 추가로 정의된 제4 구조적 특징에 의해 정의될 수 있다.

[0267] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 서열번호 26의 아미노산의 스트레치 또는 영역(즉, 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140) 중 적어도 하나(바람직하게는 둘 다)와 접촉하거나, 이에 결합하거나, 이에 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 상기 항체 단편의 에피토프는 서열번호 26의 아미노산의 이들 스트레치 또는 영역 내에 포함된다.

[0268] 더욱이, 본 발명의 항체 단편은 형태적 에피토프에 대하여 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 서열번호 26의 아미노산의 스트레치 또는 영역(즉, 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140)의 조합을 가진다. 일 구현예에서, 상기 항체 단편의 형태적 에피토프는 서열번호 26의 아미노산의 이들 스트레치 또는 영역의 조합 내에 포함된다.

[0269] 이들 에피토프는 항체 단편의 패밀리를 정의한다. 이러한 항체 단편의 패밀리는 이들 에피토프, 선형 에피토프 및/또는 이러한 형태적 에피토프 중 적어도 하나를 공유한다.

[0270] 바람직한 항체 단편은 다음을 포함한다:

[0271] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 및 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역. FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0272] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 및 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역, FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음. CDR2 영역은 또 다른 항체 단편 유래임.

[0273] - 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 및 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역, FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음. CDR1 영역은 또 다른 항체 단편 유래임.

[0274] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 및 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음. CDR3 영역은 또 다른 항체 단편 유래임.

[0275] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 그리고 항체 단편은 또 다른 항체 단편 유래의 CDR2 및 CDR3 영역을 포함하고 표 2에서 식별된 바와 같은 FR을 가질 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0276] - 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 그리고 항체 단편은 또 다른 항체 단편 유래의 CDR1 및 CDR3 영역을 포함하고 표 2에서 식별된 바와 같은 FR을 가질 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0277] - 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역, 그리고 항체 단편은 또 다른 항체 단편 유래의 CDR1 및 CDR2 영역을 포함하고 표 2에서 식별된 바와 같은 FR을 가질 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음(제4 구조적 특징)

[0278] 그리고

[0279] - 서열번호 26의 65 내지 90 및/또는 101 내지 140에 포함되는 아미노산 스트레치 또는 영역 내에 포함되는 에피토프를 가진다(제2 구조적 특징).

[0280] 바람직한 항체 단편은 다음을 포함한다:

[0281] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 및 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역. FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0282] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 및 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역, FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음. CDR2 영역은 또 다른 항체 단편 유래임.

[0283] - 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 및 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역, FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음. CDR1 영역은 또 다른 항체 단편 유래임.

[0284] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 및 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, FR 영역은 표 2에서 식별된 바와 같을 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음. CDR3 영역은 또 다른 항체 단편 유래임.

[0285] - 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 그리고 항체 단편은 또 다른 항체 단편 유래의 CDR2 및 CDR3 영역을 포함하고 표 2에서 식별된 바와 같은 FR을 가질 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0286] - 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 그리고 항체 단편은 또 다른 항체 단편 유래의 CDR1 및 CDR3 영역을 포함하고 표 2에서 식별된 바와 같은 FR을 가질 수 있음.

대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음.

[0287] - 서열번호 3을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역, 그리고 항체 단편은 또 다른 항체 단편 유래의 CDR1 및 CDR2 영역을 포함하고 표 2에서 식별된 바와 같은 FR을 가질 수 있음. 대안적으로, FR 영역은 또 다른 항체 단편 유래일 수 있음(제4 구조적 특징)

[0288] 그리고

[0289] - 서열번호 26의 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458 중 적어도 하나와 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다(제2 구조적 특징).

[0290] 제2 구조적 특징의 다른 구현예 각각은 제4 구조적 특징의 각각의 구현예와 조합될 수 있다.

[0291] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편, 바람직하게는 VHH(또는 이의 단편)는 본 명세서에서 식별된 바와 같은 제1 및/또는 제2 및/또는 제3 및/또는 제4 구조적 특징으로 표시된다. 대안적으로 또는 상기 구조적 특징과 조합하여, 본 발명의 상기 항체 단편, 바람직하게는 VHH(또는 이의 단편)는 다음 기능적 특징 중 적어도 하나로 특성화된다:

[0292] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 것, 바람직하게는 인간 및 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 것, 및

[0293] - FAP 활성을 조절하지 않는 것.

[0294] 특이적 결합은 본 명세서에서 앞서 기재되었다. 가장 바람직하게는, 항체 단편은 바람직하게는 생물층 간섭계를 사용하여 평가된, 10^{-9} 내지 10^{-12} 몰/리터 범위의 K_D 및/또는 10^{-2} 내지 10^{-5} s^{-1} 범위의 k_{off}, 더 바람직하게는 10^{-9} 내지 10^{-12} 몰/리터 범위의 K_D 및 10^{-2} 내지 10^{-5} s^{-1} 범위의 k_{off}로 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합한다.

[0295] 항체 단편이 조절제가 아닐 수 있다(즉, 인간 및/또는 뮤린 FAP의 억제제가 아니고, 활성화제가 아님)는 사실과 관련된 제2 기능적 특징은 또한 본 명세서에 상세히 기재되었다.

[0296] 따라서 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편, VHH 또는 VHH의 단편은 구조적 특징 중 적어도 하나 및/또는 기능적 특징 중 적어도 하나를 충족시켜야 한다.

[0297] 추가적인 항체 단편

[0298] 추가 양태에서, 앞서 개시된 것과 유사한 구조적 및/또는 기능적 특성을 가지는 추가적인 항체 단편이 제공되며, 유일한 차이는 이들 단편의 전장 서열, 하기 정의된 이들 단편의 CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3, FR4 서열이다(표 3 및 추가 텍스트 참조).

[0299] 이들 추가적인 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 기능적 특징 및/또는 구조적 특징으로 특성화될 수 있다. 구조적 특징의 예는 서열이 관련되고 기능적 특징의 예는 상기 항체 단편의 활성(즉, 본 명세서에 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편에 대해 모두 앞서 정의된 FAP 활성 조절의 부재 및 결합 활성)과 관련된다. 본 명세서에서 앞서 제시되고 "항체 단편", "이의 활성", "이의 결합", "교차 결합"(즉, ~와 경쟁하는), "친화도", "결합력", 및/또는 "특이성"의 정의와 관련된 용어는 또한 이들 추가적인 항체 단편에 적용된다. 달리 나타내지 않는 한, 제1 양태의 항체 단편과 관련된 모든 정의는 또한 추가적인 항체 단편에 적용된다. 본 발명의 모든 후속 양태에 동일하게 적용되며, 여기서 항체 단편은 항체 단편을 포함하는 화합물, 표적화 적용을 위한 화합물, 표지된 화합물, 항체 단편 및 표지된 화합물의 조성물, 키트, 진단적 용도, 표지된 화합물의 치료적 용도에 사용된다.

[0300] 일 구현예에서, 본 발명의 추가적인 항체 단편은 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 서열번호 26의 아미노산의 스트레치 또는 영역(즉, 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140) 중 적어도 하나(바람직하게는 둘 다)와 접촉하거나, 이에 결합하거나, 이에 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 상기 항체 단편의 에피토프는 서열번호 26의 아미노산의 이들 스트레치 또는 영역 내에 포함된다.

[0301] 더욱이, 일 구현예에서, 본 발명의 추가적인 항체 단편은 형태적 에피토프에 대하여 본 명세서에서 앞서 정의된

바와 같은 서열번호 26의 아미노산의 스트레치 또는 영역(즉, 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140)의 조합을 가진다. 일 구현예에서, 상기 항체 단편의 형태적 에피토프는 서열번호 26의 아미노산의 이들 스트레치 또는 영역의 조합 내에 포함된다.

[0302] 이들 에피토프는 항체 단편의 패밀리를 정의한다. 이러한 항체 단편의 패밀리는 이들 에피토프, 선형 에피토프 및/또는 이러한 형태적 에피토프 중 적어도 하나를 공유한다.

[0303] 이러한 추가적인 항체 단편은 다른 것과 동일한 방식으로 사용될 수 있다. 본 명세서에서 앞서 또는 이후에 제공되는 모든 기능적 정의는 또한 추가적인 항체 단편에 적용된다. 본 명세서에 이미 정의된 항체 단편의 제1 및 제2 구조적 특징은 또한 이러한 추가적인 항체 단편에 적용된다.

[0304] 하기에 본 발명자들은 본 발명의 추가적인 항체 단편의 여러 가지 추가적인 구조적 특징을 기재한다. 본 발명의 항체 단편은 이들 구조적 특징, 즉 제1, 제2, 제3 및 제4 구조적 특징 중 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 전부의 존재로 특성화될 수 있다.

[0305] 항체 단편은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하며, 여기서 상기 항체 단편은 서열번호 8, 5, 6, 7, 12, 9, 10, 11 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열로 표시된다.

[0306] 일 구현예에서, 이러한 서열 중 임의의 것과의 서열 동일성은 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0307] 항체 단편은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하며, 여기서 상기 항체 단편은 서열번호 16, 13, 14, 15 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열로 표시된다.

[0308] 일 구현예에서, 이러한 서열 중 임의의 것과의 서열 동일성은 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0309] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 8, 5, 6, 7 또는 이의 일부분과 적어도 91% 서열 유사성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열에 의해 표시된다. 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 유사성은 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0310] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 9, 10, 11, 12 또는 이의 일부분과 적어도 89% 서열 유사성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열에 의해 표시된다. 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 유사성은 적어도 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0311] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 단편은 서열번호 13, 14, 15, 16 또는 이의 일부분과 적어도 81% 서열 유사성을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 아미노산 서열에 의해 표시된다. 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 유사성은 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0312] 일 구현예에서, 추가적인 항체 단편의 길이는 110 내지 130개의 아미노산이거나 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 또는 130개의 아미노산이다. 이러한 길이는 항체 단편의 서열에 첨가될 수 있는 태그, 예컨대 His 태그의 길이를 포함하지 않는다. 일부 His 태그는 이미 본 명세서에서 앞서 정의되었다.

[0313] 일 구현예에서, 본 발명의 추가적인 항체 단편은:

[0314] - 서열번호 8, 5, 6, 7, 12, 9, 10, 11 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하고

[0315] - 서열번호 26의 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되는 아미노산 스트레치 또는 영역 내에 포함되는 에피토프를 가진다(제2 구조적 특징).

[0316] 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 동일성(또는 유사성)은 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0317] 일 구현예에서, 본 발명의 추가적인 항체 단편은:

[0318] - 서열번호 8, 5, 6, 7, 12, 9, 10, 11 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하고

[0319] - 서열번호 26의 65 내지 90 및 101 내지 140 내에 포함되는 아미노산 스트레치 또는 영역의 조합 내에 포함되는 형태적 에피토프를 가진다(제2 구조적 특징).

[0320] 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 동일성(또는 유사성)은 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0321] 일 구현예에서, 본 발명의 추가적인 항체 단편은:

[0322] - 서열번호 8, 5, 6, 7, 12, 9, 10, 11 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 85% 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하고

[0323] - 서열번호 26의 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458 중 적어도 하나와 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다(제2 구조적 특징).

[0324] 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 동일성(또는 유사성)은 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다.

[0325] 일 구현예에서, 본 발명의 추가적인 항체 단편은 CDR 이식을 사용하여 그리고 표 3의 CDR 서열을 사용하여 상기 기재된, 선택적으로 표 2의 CDR과 조합된 항체 단편으로부터 유래된다. 표 2 및 3의 FR 영역과의 조합은 또한 조합될 수 있다.

[0326] 일 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 본 발명의 추가적인 항체 단편, 바람직하게는 VHH는 서열번호 5, 9, 13을 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR1 영역, 서열번호 6, 10, 14를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR2 영역, 및 서열번호 7, 11, 15를 포함하거나 이로 이루어지거나 이로 본질적으로 이루어진 CDR3 영역을 포함하는 군으로부터 선택되는 CDR 서열의 적어도 하나의 조합을 포함하는 아미노산 서열로 표시된다. 상기 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3의 1개 또는 2개의 아미노산은 수득된 항체 단편의 활성을 실질적으로 변경시키지 않으면서 또 다른 하나의 아미노산으로 치환될 수 있었다. 추가적인 항체 단편의 프레임워크 영역 중 임의의 것에 대해서도 동일하게 적용된다(관련된 추가적인 항체 단편의 FR 영역 각각의 서열번호에 대해서는 표 3 참조). 이들 항체 단편 변이체 각각은 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상기 항체 단편 변이체의 활성은 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 특이적 결합 활성이다. 본 발명의 맥락 내에서, '실질적인'은 항체 단편의 활성을 초기 CDR 및/또는 FR 영역과 비교하여 상기 결합 활성의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%가 여전히 검출 가능함을 의미할 수 있다.

[0327] 또한 제1 양태의 항체 단편의 CDR 및/또는 FR 영역(표 2 참조)과 추가적인 항체 단편의 CDR 및/또는 FR 영역(표 3 참조)을 조합하는 것이 포함된다.

[0328] 일 구현예에서, 본 발명의 추가적인 항체 단편은 상기 식별된 바와 같은 이의 CDR에 대한 참조에 의해 정의되고, 서열번호 26의 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되는 아미노산 스트레치 또는 영역 내에 포함되는 에피토프를 가진다(제2 구조적 특징).

[0329] 일 구현예에서, 본 발명의 추가적인 항체 단편은 상기 식별된 바와 같은 이의 CDR에 대한 참조에 의해 정의되고, 서열번호 26의 65 내지 90 및 101 내지 140 내에 포함되는 아미노산 스트레치 또는 영역의 조합 내에 포함되는 형태적 에피토프를 가진다(제2 구조적 특징).

[0330] 일 구현예에서, 본 발명의 추가적인 항체 단편은 상기 식별된 바와 같은 이의 CDR에 대한 참조에 의해 정의되고, 서열번호 26의 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458 중 적어도 하나와 접촉하거나 이에 결합하거나 이에 특이적으로 결합한다(제2 구조적 특징).

표 3

항체 단편 B2, B3 및 B4의 CDR 및 FR(본 명세서의 이후에 본 발명의 일반 정의에 대한 설명의 일반 파트에서 정의되는 IMGT 명명법을 사용함)

	아미노산 서열
B2 (서열번호 8)	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSISSANSMGW YRQAPGKQRDVVAGLTTGGRSHYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNLWPPVQGYWGQGT QVTVSS
B2의 CDR	
CDR1 (서열번호 5)	GSISSANS
CDR2 (서열번호 6)	LTTGGRS
CDR3 (서열번호 7)	NLWPPVQGY
B2의 FR	
FR1 (서열번호 41)	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVS
FR2 (서열번호 42)	MGWYRQAPGKQRDVVAG
FR3 (서열번호 43)	HYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYC
FR4 (서열번호 44)	WGQGTQVTVSS
B3 (서열번호 12)	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRLFSTNAMGW YRQAPGKQRELVAGITGGDRSNYADSVKGRFTISRDN GKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNFYPPIVGDYWGQGT QVTVSS
B3의 CDR	
CDR1 (서열번호 9)	GRLFSTNA
CDR2 (서열번호 10)	ITGGDRS
CDR3 (서열번호 11)	NFYPPIVGDY
B3의 FR	
FR1 (서열번호 45)	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVS
FR2 (서열번호 46)	MGWYRQAPGKQRELVAG
FR3 (서열번호 47)	NYADSVKGRFTISRDNGKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC
FR4 (서열번호 48)	WGQGTQVTVSS
B4 (서열번호 16)	DVQLVESGGGLVQVGGSLRLSCVASGFTFSSYYMSW VRQAPGKGLEWVASIYADGDMTYYADSVRGRFTISRD NAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPLPPYHVNQGT QVTVSS
B4의 CDR	
CDR1 (서열번호 13)	GFTFSSYY
CDR2 (서열번호 14)	IYADGDMT
CDR3 (서열번호 15)	AKDPLPPYH
B4의 FR	
FR1 (서열번호 49)	DVQLVESGGGLVQVGGSLRLSCVAS
FR2 (서열번호 50)	MSWVRQAPGKGLEWVAS
FR3 (서열번호 51)	YYADSVRGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYC
FR4 (서열번호 52)	VNQGTQVTVSS

[0331]

[0332] 항체 단편을 포함하는 화합물

[0333] 추가 양태에서, 앞서 양태에서 정의된 바와 같은 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편이 제공되며, 상기 항체 단편, 바람직하게는 상기 VHH 또는 이의 단편은 모이어티와 같은 실체에 연결되거나 커플링된다. 본 발명의 맥락 내에서, 모이어티와 같은 실체에 연결된 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 화합물로 불릴 수 있다. 따라서 본 출원의 맥락 내에서, 화합물은 본 발명의 항체 단편 및 실체를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0334] 본 명세서에서 앞서 개시된 바와 같이, 본 발명의 항체 단편, 바람직하게는 VHH(또는 이의 단편)는 본 명세서에서 식별된 바와 같은 구조적 특징(바람직하게는 제1 및/또는 제2 구조적 특징)으로 표시된다. 대안적으로 또는 상기 구조적 특징과 조합하여, 본 발명의 상기 항체 단편, 바람직하게는 VHH(또는 이의 단편)는 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는, 바람직하게는 인간 및 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 기능적 특징으로 특성화된다. 일 구현예에서, 본 발명의 상기 항체 단편, 바람직하게는 VHH(또는 이의 단편)는 항체 단편이 조절제가

아니라는(즉, 인간 및/또는 뮤린 FAP의 억제제가 아니고, 활성화제가 아님) 기능적 특징으로 특성화된다. 따라서 본 발명의 항체 단편, VHH 또는 VHH의 단편은 구조적 특징 및 기능적 특징 중 적어도 하나를 충족시켜야 한다.

[0335] 실체 및 항체 단편은 서로 연결되거나 커플링될 수 있다. 실체는 본 명세서에서 이후에 설명된 바와 같이 세포일 수 있다. 실체가 세포인 경우, 표현 "실체에 연결되거나 커플링된 항체 단편"은 항체 단편이 상기 세포에서 또는 상기 세포 상에서 발현됨을 의미한다. 본 발명의 항체 단편을 인코딩하는 핵산 분자는 본 명세서에서 이후에 개시된다.

[0336] 모이어티의 정체 및/또는 링크의 유형은 항체 단편에 대해 또는 모이어티에 대해 또는 화합물에 대해 구상되는 적용 유형에 따라 달라질 수 있다. 모이어티는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 분자 또는 표지일 수 있다.

[0337] 표적화 적용을 위한 화합물

[0338] 일 구현예에서, 항체 단편(바람직하게는 VHH 또는 이의 단편)에 연결되는 모이어티는 인간 및/또는 뮤린 FAP를 발현하는 세포, 조직, 장기로 전달되는 분자이다. 본 발명의 맥락에서, "화합물"은 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편(모두 본 명세서에 정의된 바와 같음)이거나, 이를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지며, 여기서 상기 항체 단편은 모이어티, 바람직하게는 상기 세포, 조직, 장기로 전달될 분자에 연결된다. FAP를 발현하는 세포, 조직, 장기에서 작용하는 것으로 알려진 임의의 모이어티, 분자 또는 약제는 잠재적으로 본 발명에 포함되며 본 발명의 항체 단편에 연결될 수 있다. 분자는 펩타이드, 소분자 또는 핵산일 수 있다. 펩타이드는 사이토카인일 수 있다. 소분자는 화학요법제일 수 있다. 실체는 세포, 예컨대 CAR-T 세포, CAR-NK 세포, BITE 또는 LITE일 수 있다.

[0339] 일 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 AcTakine(표적상 활성 사이토카인(Activity-on-Target cytokine)) 또는 AcTaferon(IFNα-기반 AcTakine), 바람직하게는 WO2017077382A1, WO2017134301A1, WO2017194783A1, WO2017194782A2, WO2018077893A1, WO2018141964A1, WO2018144999A1, WO2019032661A1, WO2019032663A1, WO2019032662A1, WO2019148089A1, WO2019191519A1 또는 WO2020033646A1에 기재된 바와 같은 AcTakine 또는 AcTaferon이다. 이러한 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 바람직하게는 암에 대한 약제이다. 더욱이, 항체 단편에 연결된 모이어티를 포함하는 화합물은 바람직하게는 암에 대한 약제이다.

[0340] 일 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 피롤로벤조디아제핀; 바람직하게는 WO2014057074A1, WO2015052322A1, WO2014140174A1, WO2015052321A1, WO2017186894A1, WO2017137555A1, WO2017137553A1, WO2016038383A1 또는 WO2018192944A1에 기재된 바와 같은 피롤로벤조디아제핀 이량체이고; 본 명세서에서 더 바람직하게는 상기 피롤로벤조디아제핀 이량체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0341] - (11S,11aS)-4-((2R,5R)-37-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-5-이소프로필-2-메틸-4,7,35-트리옥소-10,13,16,19,22,25,28,31-옥타옥사-3,6,34-트리아자헵타트리아콘탄아미도)벤질 11-하이드록시-8-((5-(((11S,11aS)-11-하이드록시-10-(((4-((10R,13R)-10-이소프로필-13-메틸-8,11-디옥소-2,5-디옥사-9,12-디아자테트라데칸아미도)벤질)옥시)카르보닐)-7-메톡시-2-메틸-5-옥소-5,10,11,11a-테트라하이드로-1H-피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀-8-일)옥시)펜틸)옥시)-7-메톡시-2-메틸-5-옥소-11,11a-디하이드로-1H-피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀-10(5H)-카르복실레이트,

[0342] - (S)-3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-N-(2-(2-(2-(2-(4-(((8-메톡시-2-(6-메톡시나프탈렌-2-일)-5-옥소-5,11a-디하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-7-일)옥시)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)에톡시)에톡시)에톡시)에틸)프로판아미드,

[0343] - (S)-3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-N-(2-(2-(2-(2-(4-(((2-메틸렌-5-옥소-2,3,5,11a-테트라하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-7-일)옥시)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)에톡시)에톡시)에톡시)에틸)프로판아미드,

[0344] - 1-(3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로판아미도)-N-(3-(((S)-8-((5-(((S)-7-메톡시-2-메틸-5-옥소-5,11a-디하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-8-일)옥시)펜틸)옥시)-2-메틸-5-옥소-5,11a-디하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-7-일)옥시)프로필)-3,6,9,12,15,18,21,24-옥타옥사헵타코산-27-아미드,

[0345] - 3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-N-(2-(2-(2-(2-(4-((((S)-8-((5-(((S)-7-메톡시-2-메틸-5-옥소-5,11a-디하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-8-일)옥시)펜틸)옥시)-2-메틸-5-옥소-5,11a-디하이

드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-7-일)옥시)메틸)-1H-1,2,3-트리아졸-1-일)에톡시)에톡시)에톡시)에틸)프로판아미드,

[0346] - 1-(3-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)프로판아미도)-N-((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-7-메톡시-8-((5-(((S)-7-메톡시-2-(4-(4-메틸피페라진-1-일)페닐)-5-옥소-5,11a-디하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-8-일)옥시)펜틸)옥시)-5-옥소-5,11a-디하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-2-일)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)-3,6,9,12,15,18,21,24-옥타옥사헵타코산-27-아미드,

[0347] - 6-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-N-((S)-1-(((S)-1-((4-((S)-8-(3-(((S)-2-(3-플루오로-4-메톡시페닐)-7-메톡시-5-옥소-5,11a-디하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-8-일)옥시)프로폭시)-7-메톡시-5-옥소-5,11a-디하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a]H,4]디아제핀-2-일)페닐)아미노)-1-옥소프로판-2-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)헥산아미드,

[0348] - (R)-2-((3-니트로피리딘-2-일)디설파닐)프로필(11S,11aS)-11-하이드록시-7-메톡시-8-(3-(((S)-7-메톡시-2-메틸렌-5-옥소-2,3,5,11a-테트라하이드로-1H-피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀-8-일)옥시)프로폭시)-2-메틸렌-5-옥소-2,3,11,11a-테트라하이드로-1H피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀-10(5H)-카르복실레이트,

[0349] - 4-((2S,5S)-37-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1일)-5-이소프로필-2-메틸-4,7,35-트리옥소-10,13,16,19,22,25,28,31-옥타옥사-3,6,34-트리아자헵타트리아콘탄아미도)벤질(11S,11aS)-11-하이드록시-7-메톡시-8-(3-(((S)-7-메톡시-2-메틸렌-5-옥소-2,3,511a-테트라하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-8-일)옥시)프로폭시)-2-메틸렌-5-옥소-2,3,11,11a-테트라하이드로-1H-벤조[e]피롤로[1,2-a][1,4]디아제핀-10(5H)-카르복실레이트, 및

[0350] - 4-((2S,5S)-37-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-피롤-1-일)-5-이소프로필-2-메틸-4,7,35-트리옥소-10,13,16,19,22,25,28,31-옥타옥사-3,6,34-트리아자헵타트리아콘탄아미도)벤질(11S,11aS)-11-하이드록시-8-(3-(((11S,11aS)-11-하이드록시-10-(((4-((10S,13S)-10-이소프로필-13-메틸-8,11-디옥소-2,5-디옥사-9,12-디아자테트라데칸-14-아미도)벤질)옥시)카르보닐)-7-메톡시-2-메틸렌-5-옥소-2,3,5,10,11,11a-헥사하이드로-1H-피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀-8-일)옥시)프로폭시)-7-메톡시-2-메틸렌-5-옥소-2,3,11,11a-테트라하이드로-1H-피롤로[2,1-c][1,4]벤조디아제핀-10(5H)-카르복실레이트.

[0351] 상기 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 바람직하게는 암에 대한 약제이다. 더욱이, 항체 단편에 연결된 모이어티를 포함하는 화합물은 바람직하게는 암에 대한 약제이다.

[0352] 일 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는, 예컨대 WO2017211809A1에 기재된 8자리(octadentate) 토큠 킬레이터이다. 이러한 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 바람직하게는 암에 대한 약제이다. 더욱이, 항체 단편에 연결된 모이어티를 포함하는 화합물은 바람직하게는 암에 대한 약제이다.

[0353] 일 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 WO2015162293A1에 기재된 바와 같은 돌라스타틴 또는 오리스타틴이다. 이러한 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 바람직하게는 암에 대한 약제이다. 더욱이, 항체 단편에 연결된 모이어티를 포함하는 화합물은 바람직하게는 암에 대한 약제이다.

[0354] 일 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는, 예컨대 WO2015118030A2에 기재된 세포용해소 또는 니그린-b A-사슬이다. 이러한 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 바람직하게는 암에 대한 약제이다. 더욱이, 항체 단편에 연결된 모이어티를 포함하는 화합물은 바람직하게는 암에 대한 약제이다.

[0355] 일 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는, 예컨대 WO2015103990A1에 기재된 2-프로필티아졸로 [4,5-c] 퀴놀린-4-아민, -디옥솔란-4-일)메틸]-2-(에톡시메틸)-7-(4-하이드록시메틸페닐)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민,4-[4-아미노-2-에톡시메틸-1-(2-하이드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-7-일]-N-메톡시-N-메틸벤즈아미드,2-에톡시메틸-N1-이소프로필-6,7,8,9-테트라하이드로-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1,4-디아민,1-[4-아미노-2-에틸-7-(피리딘-4-일)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]-2-메틸프로판-2-올,N-[4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸]메탄설폰아미드, 또는 N-[4-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조[4,5-c][1,5]나프티리딘-1-일)부틸]-N'-사이클로헥실우레아이다. 이러한 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 바람직하게는 암에 대한 약제이다. 더욱이, 항체 단편에 연결된 모이어티를 포함하는 화합물은 바람직하게는 암에 대한 약제이다.

[0356] 일 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는, 예컨대 WO2015051199A2에 기재된 슈도모나스(Pseudomonas) 외독소이다. 이러한 구현예에서, 항체 단편에 연결된 모이어티는 바람직하게는 암에 대한 약제이다. 더욱이, 항체

단편에 연결된 모이어티를 포함하는 화합물은 바람직하게는 암에 대한 약제이다.

[0357] WO2017137553A1, WO2016038383A1, WO2018192944A1, WO2015051199A2, WO2017211809A1, WO2014057074A1, WO2015052322A1, WO2014140174A1, WO2015052321A1, WO2017186894A1, WO2017137555A1, WO2015162293A1, WO2015118030A2, WO2015103990A1, WO2017077382A1, WO2017134301A1, WO2017194783A1, WO2017194782A2, WO2018077893A1, WO2018141964A1, WO2018144999A1, WO2019032661A1, WO2019032663A1, WO2019032662A1, WO2019148089A1, WO2019191519A1 및 WO2020033646A1은 전문이 포함되며, 거기에 개시된 모든 화합물은 본 출원의 맥락에서 항체 단편에 연결된 모이어티일 수 있다.

[0358] 표지된 화합물

[0359] 추가 양태에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는, 이전 양태 중 하나에 정의된 바와 같은 항체 단편, 바람직하게는 중쇄 항체(VHH) 또는 이의 단편을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진 표지된 화합물이 제공되며, 상기 항체 단편은 표지인 모이어티에 연결된다.

[0360] 일 구현예에서, 표지는 방사성 핵종(즉, 방사성 표지)이다. 방사성 핵종에 대하여 항체 단편을 표지화하는 공정은 설명 말단 부분의 정의 파트에 상세히 개시되어 있다. 바람직한 구현예에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편, 바람직하게는 중쇄 항체(VHH) 또는 이의 단편은 모이어티에 연결되며 모이어티는 방사성 핵종이다.

[0361] 이러한 양태에서, 방사성 핵종에 커플링되는 항체 단편, 바람직하게는 중쇄 항체(VHH) 또는 이의 단편은 표지된 또는 방사성표지된 화합물로 불릴 수 있다.

[0362] 일 구현예에서, 이러한 표지된 화합물은 본 명세서에서 앞서 정의된 구조적 특징, 즉 제1 및/또는 제2 구조적 특징 중 적어도 하나 및/또는 본 명세서에 정의된 기능적 특징(즉, 인간 및/또는 뮤린 FAP, 바람직하게는 인간 및 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하고/하거나, FAP의 조절제가 아님) 중 적어도 하나를 충족시킨다.

[0363] 특히 치료적 적용을 위한 본 발명의 항체 단편, 바람직하게는 본 명세서에 개시된 바와 같은 VHH에 연결될 수 있는 적합한 방사성 핵종의 예는, 예를 들어 임의의 제한 없이, 악티늄-225, 아스타틴-211, 비스무트-212, 비스무트-213, 세슘-137, 크로뮴-51, 코발트-60, 구리-67, 디스프로슘-165, 에르븀-169, 페르뮴-255, 금-198, 홀뮴-166, 요오드-125, 요오드-131, 이리듐-192, 철-59, 납-212, 루테튬-177, 몰리브덴-99, 팔라듐-103, 인-32, 칼륨-42, 레늄-186, 레늄-188, 사마륨-153, 라듐-223, 라듐-224, 루테늄-106, 스칸듐-47, 나트륨-24, 스트론튬-89, 테르븀-149, 테르븀-161, 테르븀-149, 토륨-227, 제논-133, 이테르븀-169, 이테르븀-177 및 이트륨-90으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방사성 동위원소를 포함하지만 이에 제한되지 않는, α-방출 방사성 동위원소 및 β^--방출 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0364] 또한 추가의 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물에 존재하는 방사성 핵종은 요오드-131이다.

[0365] 또한 추가의 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물에 존재하는 방사성 핵종은 악티늄-225이다.

[0366] 또한 추가의 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물에 존재하는 방사성 핵종은 루테튬-177이다.

[0367] 특히 진단적 적용을 위한 본 발명의 항체 단편, 바람직하게는 본 명세서에 개시된 바와 같은 VHH에 연결될 수 있는 적합한 방사성 핵종의 예는, 예를 들어 임의의 제한 없이, 요오드-131, 이트륨-90, 요오드-125, 루테튬-177, 레늄-186, 레늄-188, 스칸듐-43, 스칸듐-44, 테크네튬-99m, 테르븀-161, 인듐-111, 제논-133, 탈륨-201, 플루오린-18, 갈륨-68, 갈륨-67, 구리-67, 요오드-123, 요오드-124, 지르코늄-89 및 구리-64로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는, 양전자-방출 방사성 동위원소(PET) 또는 γ-방출 방사성 동위원소(SPECT)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0368] 또한 추가의 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물에 존재하는 방사성 핵종은 요오드-131이다.

[0369] 또한 추가의 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물에 존재하는 방사성 핵종은 악티늄-225이다.

[0370] 또한 추가의 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물에 존재하는 방사성 핵종은 루테튬-

177이다.

[0371] 특히 테라노스틱(즉, 진단 및 치료) 적용을 위한 본 발명의 항체 단편, 바람직하게는 본 명세서에 개시된 바와 같은 VHH에 연결될 수 있는 적합한 방사성 핵종의 예는, 예를 들어 임의의 제한 없이, 악티늄-225, 비스무트-213, 요오드-125, 요오드-131, 루테튬-177, 이트륨-90, 구리-67, 레늄-186, 레늄-188 및 테르븀-161로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0372] 일 구현예에서, 항체 단편, 바람직하게는 중쇄 항체(VHH) 또는 이의 단편을 분리하는 링커는 벤조에이트 링커이다. 바람직하게는, 이러한 벤조에이트 링커는 N-석신이미딜-4-구아니디노메틸-3-[1-131]요오도벤조에이트(SGMIB) 또는 이의 적합한 유도체를 포함한다. 대안적으로, 2-[비스[2-[비스(카르복시메틸)아미노]에틸]아미노]아세트산(DTPA), 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA) 또는 N,N'-비스[(6-카르복시-2-피리딜)메틸]-4,13-디아자-18-크라운-6(MACROPA) 또는 이의 유도체가 사용될 수 있다.

[0373] 일 구현예에서, 표지된 화합물은 다음과 같다:

[0374] - SGMIB를 통해 요오드-131에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편,

[0375] - DTPA 또는 DOTA를 통해 루테튬-177에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편,

[0376] - DOTA를 통해 악티늄-225에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편, 또는

[0377] - 테크네튬-99m에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편.

[0378] 이들 표지된 화합물 각각은 실험 파트에서 합성되고 시험되었다.

[0379] 바람직한 구현예에서, 표지된 화합물은 다음과 같다:

[0380] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 SGMIB를 통해 요오드-131에 연결되는 것인, 항체 단편,

[0381] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 DOTA 또는 DTPA를 통해 루테튬-177에 연결되는 것인, 항체 단편,

[0382] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 DOTA를 통해 악티늄-225에 연결되는 것인, 항체 단편, 또는

[0383] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 에피토프는 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및/또는 101 내지 140 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 테크네튬-99m에 연결되는 것인, 항체 단편.

[0384] 바람직한 구현예에서, 표지된 화합물은 다음과 같다:

[0385] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 형태적 에피토프가 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 SGMIB를 통해 요오드-131에 연결되는 것인, 항체 단편,

[0386] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 형태적 에피토프가 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 DOTA 또는 DTPA를 통해 루테튬-177에 연결되는 것인, 항체 단편,

[0387] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 형태적 에피토프가 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 DOTA를 통해 악티늄-225에 연결되는 것인, 항체 단편, 또는

[0388] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 형태적 에피토프가 서열번호 26의 아미노산 스트레치 또는 영역 65 내지 90 및 101 내지 140의 조합 내에 포함되고, 상기 항체 단편은 테크네튬-99m에 연결되는 것인, 항체 단편.

[0389] 바람직한 구현예에서, 표지된 화합물은 다음과 같다:

[0390] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 26의 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458 중 적어도 하나는 상기 항체 단편과 상호작용하고, 상기 항체 단편은 SGMIB를 통해 요오드-131에 연결되는 것인, 항체 단편,

[0391] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 26의 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458 중 적어도 하나는 상기 항체 단편과 상호작용하고, 상기 항체 단편은 DOTA 또는 DTPA를 통해 루테튬-177에 연결되는 것인, 항체 단편,

[0392] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 26의 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458 중 적어도 하나는 상기 항체 단편과 상호작용하고, 상기 항체 단편은 DOTA를 통해 악티늄-225에 연결되는 것인, 항체 단편, 또는

[0393] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 26의 아미노산 I62, S63, G64, Q65, E66, I76, V77, L78, Y79, N80, I81, E82, T83, G84, Q85, S86, Y87, T88, I89, L90, S91, L105, S106, P107, D108, R109, Q110, F111, D134, L135, S136, N137, V158, G159, R175, D457 및/또는 Y458 중 적어도 하나는 상기 항체 단편과 상호작용하고, 상기 항체 단편은 테크네튬-99m에 연결되는 것인, 항체 단편.

[0394] 바람직한 구현예에서, 표지된 화합물은 다음과 같다:

[0395] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 1, 2, 3, 4 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열로 표시되고, SGMIB를 통해 요오드-131에 연결되는 것인, 항체 단편,

[0396] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 1, 2, 3, 4 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열로 표시되고, DOTA 또는 DTPA를 통해 루테튬-177에 연결되는 것인, 항체 단편,

[0397] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 1, 2, 3, 4 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열로 표시되고, DOTA를 통해 악티늄-225에 연결되는 것인, 항체 단편, 또는

[0398] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편으로서, 서열번호 1, 2, 3, 4 또는 이의 일부분 중 적어도 하나와 적어도 80% 서열 동일성(또는 유사성)을 가지는 아미노산 서열로 표시되고, 테크네튬-99m에 연결되는 것인, 항체 단편.

[0399] 일 구현예에서, 이러한 서열과의 서열 동일성(또는 유사성)은 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 이의 일부는 이미 본 명세서에서 정의되었다.

[0400] 제1, 제2, 제3 또는 제4 구조적 특징 및/또는 기능적 특징(즉, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 것, 바람직하게는 인간 및 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 것 및 FAP 활성을 조절하지 않는 것)과 관련된 다른 구현예 각각은 조합되어 본 발명의 표지된 화합물을 추가로 정의할 수 있다.

[0401] 표지된 화합물은 구체적으로 암 항원으로 간주되는 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대해 지시된다. 표지된 화합물은 진단용 분자로서 및/또는 치료용 분자로서 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 진단 또는 치료되는 질환은 암이다.

[0402] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 인간 FAP는 '암 세포-특이적 항원', '암-특이적 항원', '암 항원', '~에 존재하는 표적 단백질', '~에서 발현되는 표적 단백질' 및/또는 '암 세포에 특이적', '암 세포-특이적 표적 (단백질)', '암 (세포)-연관 항원'인 것으로 간주되고, 이들은 본 명세서에서 호환 가능하게 사용되며, 인간 FAP가 주로 암 세포에 및 종양의 부근 및/또는 전이의 부근에 존재한다(또는 주로 여기에서 발현된다)는 사실을 지칭한다. FAP는 종양형성 기능을 가지는 암-연관 섬유아세포(CAF)에서 특이적으로 발현되고 보다 특이적으로 과발현된다. 또한 FAP는 일부 암 세포(예컨대, 본 명세서에서 이후에 개시되는 바와 같은 백혈병, 뼈암, 자궁암, 췌장암, 피부암, 근육암, 뇌암, 유방암, 결장직장암, 식도암, 위암, 간암, 폐암, 난소암, 부갑상선암, 신장암

(Puré et al 2018, Oncogene Aug;37(32):4343-4357))에서 발현된다. FAP는 건강한 세포에서 잘 발현되지 않는다. 따라서 인간 FAP는 종양 항원 또는 암 세포 항원으로 간주될 수 있으므로, 진단 및/또는 치료 표적으로서 사용될 수 있다.

[0403] 예를 들어, 인간 FAP는 암-연관 섬유아세포에서 발현된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "FAP 양성" 또는 "FAP 발현" 또는 "FAP 과발현"은 암성 또는 악성 인간 세포 및/또는 FAP 단백질 과발현으로 특성화되는 암-연관 섬유아세포 또는 조직을 지칭할 수 있으며, 따라서 정상적인 건강한 세포와 비교하여 비정상적으로 높은 수준의 FAP 유전자 및/또는 FAP 단백질을 가진다. 이러한 맥락에서, "과발현"은 발현이 대조군 세포주에서의 발현보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 또는 그 이상인 것을 의미할 수 있다. 대조군 세포주는 건강하거나 질환에 걸리지 않은 세포일 수 있다.

[0404] 또 다른 구현예에서, 표지된 화합물에 존재하는 표지는 비-방사성 표지이다. 일 구현예에서, 이러한 비-방사성 표지는 형광 표지이다. 이러한 비-방사성의 표지된 화합물은 본 명세서에 정의된 바와 같이 진단적 적용에 사용될 수 있다. 대안적인 적용은 영상-유도 수술(image-guided surgery) 또는 광역학 요법을 포함한다. 진단적 적용에 적합한 형광 표지의 예는 Alexa fluor 변종, Cy3, Cy5, FITC(플루오레세인), 쿠마린, 텍사스 레드(Texas red), 오레곤 그린(Oregon Green), 퍼시픽 블루(Pacific Blue), 퍼시픽 그린(Pacific Green), 퍼시픽 오렌지(Pacific Orange), PE-Cyanine7, PerCP-Cyanine5.5, TRITC(테트라메틸로다민)를 포함한다. 영상-유도 수술에 적합한 형광 표지의 예는 IRDye800CW, IRDye680-RD, ZW800-1, FNIR을 포함한다(예를 들어, 문헌[Pieterjan Debie et al, Front Pharmacology, 2019; 10:510, doi: 10.3389/fphar.2019.00510, PMCID: PMC6527780 PMID: 31139085] 참조). 광역학 요법에 적합한 형광 표지의 예는 IRDye700DX를 포함한다. 대부분의 표지는 ThermoFisher 또는 Licor로부터 입수할 수 있다.

[0405] 조성물

[0406] 추가 양태에서, 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 조성물이 제공된다. 추가 양태에서, 상기 항체 단편이 모이어티와 같은 실체에 연결되는 경우 화합물을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 조성물이 또한 제공된다. 조성물은 부형제를 포함한다. 부형제는 진단 및/또는 치료 목적에 허용 가능하여야 한다. 일 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물이다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 진단용 조성물이다. 또한 조성물이 약제학적 및 진단용 조성물이라는 것이 본 발명에 포함된다. 본 발명의 적합한 제형은 설명 말단 부분의 정의 파트에 개시되어 있다.

[0407] 본 명세서에 정의된 바와 같은 진단용 조성물은 스크리닝 용량 또는 계층화 용량을 포함할 수 있고, 따라서 스크리닝 조성물 또는 계층화 조성물로 불릴 수 있다.

[0408] 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 약제학적 조성물은 인간 FAP와 연관된 질환 및 장애의 예방 및/또는 치료에 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 질환은 인간 FAP의 발현 또는 과발현과 연관된 암이다. 구체적으로, 적용은 온혈 동물, 구체적으로 포유동물, 보다 구체적으로 인간에서의 예방적 및/또는 치료적 용도에 적합한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0409] 키트

[0410] 추가 양태에서 키트가 또한 제공된다. 이러한 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 진단 및 치료적 적용에 적합하다. 이러한 적용은 본 발명의 항체 단편, 모이어티와 같은 실체에 연결되는 항체 단편을 포함하는 본 발명의 화합물의 용도를 포함하며, 상기 모이어티는 방사성 또는 비-방사성 표지이다. 키트의 더 상세한 정의는 설명 말단 부분의 정의에 대한 파트에 제공되어 있다.

[0411] 항체 단편 및 표지된 화합물의 진단 용도

[0412] 추가 양태에서, 항체 단편 또는 표지된 화합물 또는 이를 포함하는 조성물이 대상체 또는 상기 대상체의 단리된 샘플에서 인간 FAP의 발현을 평가하는 데 사용되는 방법이 제공된다. 이 방법은 다음 단계를 포함할 수 있다:

[0413] a) 본 명세서에서 식별된 바와 같은 항체 단편 또는 표지된 화합물을 제공하는 단계,

[0414] b) 상기 항체 단편 또는 표지된 화합물을 대상체에게 투여하거나 이를 대상체의 단리된 샘플과 접촉시키는 단계,

[0415] c) 상기 대상체에서 또는 상기 대상체의 상기 단리된 샘플에서 인간 FAP의 발현을 평가하는 단계.

[0416] 이 방법은 진단 방법으로 불릴 수 있다. 이 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 이 방법은 대상체 또

는 상기 대상체의 단리된 샘플에서 인간 FAP의 발현의 국소화를 가능하게 할 수 있고, 상기 대상체에서 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태의 예측 및/또는 예후를 가능하게 할 수 있다. 일 구현예에서, 이 방법은 특정 치료, 예컨대 암 치료 또는 상처 치유 치료 또는 섬유증 치료에 반응할 가능성이 있는 환자를 식별하기 위한 계층화 방법일 수 있다. 따라서, 추가 양태에서, 항체 단편 또는 표지된 화합물 또는 이를 포함하는 조성물이 대상체를 계층화하고 대상체가 특정 치료, 예컨대 암 치료 또는 상처 치유 치료 또는 섬유증 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를 평가하는 데 사용되는 방법이 제공된다. 이 방법은 다음 단계를 포함할 수 있다:

[0417] a) 본 명세서에서 식별된 바와 같은 항체 단편 또는 표지된 화합물을 제공하는 단계,

[0418] b) 상기 항체 단편 또는 표지된 화합물을 대상체 또는 대상체의 단리된 샘플에 투여하는 단계,

[0419] c) 상기 대상체에서 또는 상기 대상체의 상기 단리된 샘플에서 인간 FAP의 발현을 평가하는 단계, 및

[0420] d) 대상체가 의학적 치료, 예컨대 본 발명의 표지된 화합물을 포함하는 것에 반응할 가능성이 있는지 여부를 결정하는 단계.

[0421] 본 발명의 항체 단편은 이러한 진단 방법에서 사용될 수 있다. 본 발명의 항체 단편은 그 자체로 이러한 방법에서 사용되기 위해 표지에 커플링될 필요가 없다. 이러한 방법은 ELISA일 수 있다.

[0422] 선택적으로 상기 정의된 방법이 방사성 표지된 화합물을 사용하여 수행되는 경우, 치료법에 적합한 방사성 표지된 화합물 또는 이의 형태는 치료로서 대상체에게 투여된다. 대상체는 바람직하게는 인간이다. 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 각각의 그리고 모든 방사성 표지된 화합물은 본 방법에서 적합하다. 본 명세서에서 식별된 바와 같은 표지된 화합물을 생산/제공하기 위해 그리고 이를 투여하기 위해 설명 말단 부분의 정의 파트에 상세한 정보가 개시되어 있다. 진단 목적 및 치료 목적을 위한 표지된 화합물의 투여는 유사하다. 이 양태에 따른 방법은 시험관내, 생체외 방법일 수 있다.

[0423] 일 구현예에서, 스크리닝 용량 또는 바이오마커 용량이 대상체 또는 상기 대상체의 단리된 샘플에 투여된다. 상세한 정의는 특히 치료 용량의 정의와 비교하여 이후에 제공된다.

[0424] 진단 방법의 일 구현예에서, 표지된 화합물은 다음과 같다:

[0425] - SGMIB를 통해 요오드-131에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편,

[0426] - DTPA 또는 DOTA를 통해 루테튬-177에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편, 또는

[0427] - 테크네튬-99m에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편.

[0428] 이들 표지된 화합물 각각은 실험 파트에서 합성되고 시험되었다.

[0429] 대상체에서 인간 FAP의 발현 평가는 바람직하게는 설명 말단 부분의 정의에 대한 파트에 개시된 바와 같은 영상화를 사용하여 수행된다. 대안적으로, 대상체에서 인간 FAP의 발현 평가는 바람직하게는 대상체의 단리된 샘플을 사용하여 수행된다. 본 발명의 맥락 내에서, 대상체의 단리된 샘플은 상기 대상체 유래의 조직 또는 액체 샘플일 수 있다. 액체는 혈청일 수 있다. 환자 유래의 단리된 샘플은 생검 또는 종양 생검으로 불릴 수 있다.

[0430] (표지된) 화합물의 치료 용도

[0431] 추가 양태에서, 약제로서 사용하기 위한 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편 또는 화합물 또는 표지된 화합물 또는 조성물(모두 본 명세서에 정의된 바와 같음)이 제공된다.

[0432] 일 구현예에서, 화합물은 항체 단편(바람직하게는 VHH 또는 이의 단편)에 연결되는 모이어티와 같은 실체를 포함하고, 상기 모이어티는 FAP를 발현하거나 과발현하는 세포, 조직, 장기로 전달되는 분자이다. 분자는 펩타이드 또는 소분자, 핵산일 수 있다. 펩타이드는 사이토카인일 수 있다. 소분자는 화학요법제일 수 있다. 실체는 세포, 예컨대 CAR-T 세포, CAR-NK 세포, BITE 또는 LITE일 수 있다. 이러한 화합물 또는 이를 포함하는 조성물은 FAP의 발현 또는 과발현과 연관된 질환 또는 병태를 치료하기 위한 약제일 수 있다.

[0433] FAP를 발현하는 세포, 조직, 장기에서 작용하는 것으로 알려진 임의의 모이어티, 분자 또는 약제는 잠재적으로 본 발명에 포함되며 본 발명의 항체 단편에 연결될 수 있다.

[0434] 또 다른 구현예에서, 화합물은 표지된 화합물이고, 상기 표지된 화합물 또는 이를 포함하는 조성물은 암을 치료하기 위한 약제이다. 일 구현예에서, 상기 암은 암 세포 또는 종양 세포 또는 전이된 병변 상의 인간 FAP의 발현과 연관된다. 치료되는 암은 전이성일 수 있으며, 바람직하게는 여기서 전이성 세포는 뇌, 뼈, 간, 폐에서 발

견된다. FAP의 발현과 연관된 암은 백혈병, 뼈암, 자궁암, 췌장암, GEP-NET(gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor; 위장관 및 췌장 신경내분비 종양), 피부암, 근육암, 뇌암, 유방암, 결장직장암, 식도암, 위암, 간암, 폐암, NSCLC(비소세포 폐암), 난소암, 부갑상선암, 신장 암 세포, CUP(cancer of unknown primary; 원발부위 불명암), 전립선암, 소장암, CCC(Cholangiocellular Carcinoma; 담관세포 암종), 육종 중 임의의 것일 수 있다(문헌[Puré et al 2018, Oncogene Aug;37(32):4343-4357] 및 [Frederik Giesel et al J Nucl Med May 1, 2019 vol. 60 no. supplement 1 Abstract 289]).

[0435] 그러나, 본 발명은 이러한 유형의 암에 제한되지 않는다. 대상체가 인간 FAP를 발현하거나 과발현하는 암 세포를 가지는 것으로 의심되자마자, 표지된 화합물 또는 이를 포함하는 조성물이 사용될 수 있다.

[0436] 일 구현예에서, 대상체는 본 발명의 표지된 화합물 또는 별개의 표지 화합물로 치료되기 전에, 본 발명의 표지된 화합물을 사용하여 먼저 진단되었다. 핵종의 정체는 진단 및 치료적 적용에서 동일하지 않을 수 있다.

[0437] 이러한 치료 방법 또는 용도의 일 구현예에서, 표지된 화합물은 다음과 같다:

[0438] - SGMIB를 통해 요오드-131에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편,

[0439] - DTPA 또는 DOTA를 통해 루테튬-177에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편, 또는

[0440] - DOTA를 통해 악티늄-225에 연결되는 본 명세서에서 앞서 정의된 바와 같은 항체 단편.

[0441] 이들 표지된 화합물 각각은 실험 파트에서 합성되고 시험되었다.

[0442] 본 발명의 맥락 내에서, 질환 또는 병태 또는 장애는 화합물, 표지된 화합물 각각의 투여가 수행될 때 예방 또는 치료되었으며, 다음을 초래하였다:

[0443] - 상기 질환 또는 병태 또는 장애와 연관된 적어도 하나의 증상의 개선, 및/또는

[0444] - 상기 질환 또는 병태 또는 장애와 연관된 적어도 하나의 매개변수의 개선.

[0445] 화합물, 각각의 표지된 화합물이 투여된 후 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주 후에 개선이 관찰될 수 있다. 대안적으로, 화합물, 각각의 표지된 화합물의 투여 후 적어도 1개월, 6개월째에 개선이 관찰될 수 있다. 구상된 용량 및 투여 방식은 설명 말단 부분의 정의 파트에 추가로 개시되어 있다.

[0446] 표지된 화합물 또는 이를 포함하는 조성물은 다음 중 적어도 하나가 충족될 경우 항암 활성을 보인다:

[0447] - 인간 FAP를 발현하는 종양 세포, 암 세포 및/또는 CAF를 사멸시킬 수 있음,

[0448] - 이러한 종양 세포 또는 암 세포의 성장 및/또는 증식을 감소시키거나 늦출 수 있음.

[0449] - 원발성 종양 또는 전이성 병변의 크기를 감소시킬 수 있음,

[0450] - 전이 및/또는 종양 세포 이동의 발생을 지연시킬 수 있음,

[0451] - 종양 중량 또는 성장의 증가를 지연시킬 수 있음, 및

[0452] - 환자 생존을 적어도 1개월, 수개월 또는 그 이상 연장시킬 수 있음

[0453] (대조군으로 치료하거나 치료하지 않은 것과 비교하거나 치료 개시시의 대상체와 비교함).

[0454] 항암 활성은 표지된 화합물의 투여 후 생존 가능한 암 세포 및/또는 생존 가능한 종양 세포의 수가 초기 생존 가능한 암 세포 및/또는 초기 생존 가능한 종양 세포의 수의 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만인 경우 식별되거나 결정될 수 있다.

[0455] 항암 활성은 표지된 화합물의 투여 후 원발성 종양의 크기 및/또는 전이성 병변의 크기가 상기 원발성 종양의 크기 및/또는 상기 전이성 병변의 크기의 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만인 경우 식별되거나 결정될 수 있다.

[0456] 종양 세포 사멸은 ICH와 같은 암 환자에서 시험관내에서 비침습적으로 세포 사멸을 측정하기 위한 분자 영상화제인 방사성표지된 Annexin A5의 측정에 의해 평가될 수 있다(Schutters K. et al., Apoptosis 2010; de Saint-Hubert M. et al., Methods 48: 178, 2009). ICH는 본 설명 마지막의 정의 파트에 정의되어 있다.

[0457] 종양 성장은 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75%, 또는 그 이상 억제될 수 있다. 종양 성장은 당업자에게 알려진 기법을 사용하여 평가될 수 있다. 종양 성장은 MRI(Magnetic Resonance

Imaging; 자기 공명 영상) 또는 CT(Computer Tomography; 컴퓨터 단층 촬영)를 사용하여 평가될 수 있다.

[0458] 특정 구현예에서, 종양 중량 증가 또는 종양 성장은 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75%, 또는 그 이상 억제될 수 있다. 종양 중량 또는 종양 성장은 당업자에게 알려진 기법을 사용하여 평가될 수 있다. 종양 성장의 검출 또는 종양 세포 증식의 검출은 양전자 방출 단층 촬영에 의해 글루코스 유사체인 2-[18F]-플루오르-2-데옥시-D-글루코스(FDG-PET) 또는 [18F]-'3-플루오로-'3-데옥시-L-티미딘(FLT-PET)을 이용하여 글루코스 이용의 변화를 측정함으로써 생체내에서 평가될 수 있다. 생체외 대안은 Ki67로 종양 생검을 염색하는 것일 수 있다.

[0459] 전이 및/또는 종양 세포 이동의 발생 지연은 적어도 1주, 1개월, 수개월, 1년 또는 그 이상의 지연일 수 있다. 전이의 존재는 MRI, CT 또는 초음파 검사 또는 순환 종양 세포(CTC)의 검출을 가능하게 하는 기법을 사용하여 평가될 수 있다. 후자 시험의 예는 말초 혈액으로부터의 CTC를 EpCam 기반으로 자기 분류하는 CellSearch CTC 시험(Veridex)이다.

[0460] 특정 구현예에서, 종양 성장은 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 지연되거나 억제될 수 있다. 특정 구현예에서, 전이의 발생은 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 그 이상 지연된다.

[0461] 본 발명의 표지된 화합물은 일단 암 또는 종양 세포 또는 전이성 병변 또는 인간 FAP를 발현하는 CAF에 결합되면 방사성 독성의 메커니즘을 통해 항암 활성을 발휘한다.

[0462] 종양 세포, 암 세포, 병변, 전이성 병변 및 표지된 화합물의 용량은 표제가 정의인 섹션에서 정의되었다.

[0463] 추가 양태에서, 질환 및/또는 장애 및/또는 병태의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편 또는 화합물 또는 표지된 화합물, 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 질환 및/또는 장애 및/또는 병태의 예방 및/또는 치료 방법이 제공된다. 본 방법의 모든 특징은 본 명세서에서 앞서 정의되었다.

[0464] 비-인간 포유동물

[0465] 추가 양태에서, 인간 FAP의 발현을 가능하게 하는 핵산 작제물을 포함하는 비-인간 동물이 제공된다. 비-인간 동물은 포유동물일 수 있다. 바람직한 포유동물은 마우스, 래트, 토끼를 포함한다. 이러한 동물은 당업자에게 알려진 상식 기법을 사용하여 수득될 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 비-인간 동물은 더 이상 내인성 FAP를 발현하지 않도록 변형되었을 수 있다. 일 구현예에서, 비-인간 동물의 내인성 FAP는 인간 FAP 유전자로 대체되었다. 인간 FAP 코딩 핵산은 서열번호 25로 표시된다. 이러한 유전자 대체는 당업자에게 알려진 바와 같이 상동 재조합에 의해 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 사용되는 표적화 벡터는 서열번호 27을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 비-인간 동물은 마우스이고 서열번호 27을 포함하는 표적화 벡터는 당업자에게 알려진 기법을 사용하여 마우스에 도입되었다. 생성된 마우스는 더 이상 뮤린 FAP를 발현하지 않고 그 대신에 인간 FAP를 발현한다. 일 구현예에서, 마우스는 실시예 2에 기재된 바와 같이 수득되었다. 일 구현예에서, 인간 FAP의 발현은 본 발명의 표지된 화합물에 의해 상기 비-인간 동물에서 평가된다. 대안적으로, 인간 FAP에 특이적인 것으로 알려진 다른 항체 또는 항체 단편, 예컨대 시판 마우스 항-인간 섬유아세포 활성화 단백질 알파 APC-접합 항체(R&D Systems, FAB3715A)를 사용하여 평가될 수 있다. 일단 인간 FAP의 발현이 이러한 비-인간 동물에서 검증되면, 본 발명의 항체 단편, 화합물 또는 표지된 화합물의 기능성을 평가하는 데 사용될 수 있다. 따라서 이러한 비-인간 동물은 인간 FAP에 특이적으로 결합하는 분자, 바람직하게는 본 발명의 새로운 항체 단편 또는 화합물을 스크리닝하는 방법에 사용될 수 있다.

[0466] **정의**

[0467] 다음 용어 또는 정의는 단지 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공된다. 본 명세서에서 특별히 정의되어 있지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어는 본 발명 분야의 당업자가 인식하는 것과 동일한 의미를 가진다. 실무자에게는 특히 당업계의 정의 및 용어에 대해 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainsview, New York (1989)]; 및 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999)]이 안내된다. 본 명세서에서 제공되는 정의는 당업자가 이해하는 것보다 작은 범주를 가지는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0468] 달리 표시되지 않는 한, 구체적으로 상세하게 기재되지 않은 모든 방법, 단계, 기법 및 조작이 수행될 수 있으며, 당업자에게 명백할 바와 같이 그 자체로 알려진 방식으로 수행되었다. 예를 들어 표준 핸드북, 상기에 언급

된 일반 배경 기술 및 거기에 인용된 추가 참조문헌을 다시 참조한다.

[0469] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태('a', 'an', 및 'the')는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 단수 및 복수 지시대상 둘 다를 포함한다.

[0470] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 '포함하는(comprising)', '포함한다(comprises)' 및 '~로 구성된(comprised of)'은 '포함하는(including)', '포함한다(includes)' 또는 '함유하는(containing)', '함유한다(contains)'와 동의어이고, 포괄적이거나 개방형이며, 추가적인 비-인용된 구성원, 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 생성물 또는 조성물의 맥락에서 사용되는 표현 "~로 본질적으로 이루어진"(~로 본질적으로 이루어진 생성물" 또는 "~로 본직적으로 이루어진 조성물")은 추가적인 분자가 존재할 수 있지만 이러한 분자가 상기 생성물 또는 조성물의 특성/활성/기능성을 변화/변경시키지 않음을 의미한다. 예를 들어, 조성물이 항체 단편 중 하나로서 유사한 특성/활성/기능성을 보인다면, 그러한 조성물은 항체 단편으로 본질적으로 이루어질 수 있다.

[0471] 종점에 의한 수치 범위의 인용은 각각의 범위 내에 포괄되는 모든 숫자 및 분수뿐만 아니라 인용된 종점을 포함한다.

[0472] 측정 가능한 값, 예컨대 매개변수, 양, 시간의 지속기간 등을 지칭할 때 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 '약'은 변동이 개시된 발명에서 수행하기에 적절한 범위 내에서, 명시된 값의 그리고 명시된 값으로부터 +/-10% 이하, 바람직하게는 +/-5% 이하, 더 바람직하게는 +/-1% 이하, 훨씬 더 바람직하게는 +/-0.1% 이하의 변동을 포함하는 것을 의미한다. 수식어 '약'이 지칭하는 값은 그 자체가 또한 구체적이고, 바람직하게 개시된다는 것이 이해되어야 한다.

[0473] 폴리펩타이드/핵산 분자 및 동일성/유사성

[0474] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 아미노산 잔기는 전체 명칭에 의해 또는 표준 3문자 또는 1문자 아미노산 코드에 따라 표시될 것이다.

[0475] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '폴리펩타이드' 또는 '단백질'은 호환 가능하게 사용되고, 임의의 길이의 아미노산의 중합체 형태를 지칭하며, 이는 코딩 및 비-코딩된 아미노산, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형되거나 유도체화된 아미노산, 및 변형된 펩타이드 백본을 가지는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. "펩타이드"는 또한 보통 최대 50개의 아미노산 길이를 가지는 아미노산의 중합체이다. 폴리펩타이드 또는 펩타이드는 아미노산 서열로 표시된다.

[0476] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '핵산 분자', '폴리뉴클레오타이드', '다중핵산', '핵산'은 호환 가능하게 사용되고, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 또는 이의 유사체 중 어느 하나의 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 지칭한다. 핵산 분자는 주로 염기 서열로 특성화되는 핵산 서열로 표시된다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 알려지거나 알려지지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 비-제한적인 예는 유전자, 유전자 단편, 엑손, 인트론, 전령 RNA(mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 제어 영역, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머를 포함한다. 핵산 분자는 선형 또는 고리형일 수 있다.

[0477] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '상동성'은 동일하거나 상이한 분류군으로부터 2개 거대분자 사이, 특히 2개 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 사이에서 적어도 2차 구조적 동일성 또는 유사성을 의미하며, 여기서 상기 유사성은 공유 조상에 기인한다. 따라서, 용어 '상동성'은 상기 2차 및 선택적으로 3차 구조적 유사성을 가지는 이와 관련된 거대분자를 의미한다. 2개 이상의 뉴클레오타이드 서열을 비교하기 위하여, 제1 뉴클레오타이드 서열과 제2 뉴클레오타이드 서열 사이의 '서열 동일성(의 백분율)'이 당업자에게 알려진 방법을 사용하여, 예를 들어 제2 뉴클레오타이드 서열의 상응하는 위치에 있는 뉴클레오타이드와 동일한 제1 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드의 수를 제1 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드의 총 수로 나누고 100%를 곱함으로써 또는 NCBI Blast와 같은 서열 정렬을 위한 알려진 컴퓨터 알고리즘을 사용함으로써 계산될 수 있다. 2개 아미노산 서열 사이의 서열 유사성의 정도를 결정함에 있어서, 당업자는, 일반적으로 아미노산 잔기가 유사한 화학 구조의 다른 아미노산 잔기로 대체되고 폴리펩타이드의 기능, 활성 또는 다른 생물학적 특성에 거의 영향을 미치지 않거나 본질적으로 영향을 미치지 않는 아미노산 치환으로 기재될 수 있는, 소위 '보존적' 아미노산 치환을 고려할 수 있다. 가능한 보존적 아미노산 치환은 당업자에게 명백할 것이다. 아미노산 서열 및 핵산 서열은 전체 길이에 걸쳐 100% 서열 동일성을 가지는 경우 '정확히 동일'하다고 한다.

[0478] 본 출원 전반에 걸쳐, 특정 아미노산 서열 서열번호(예로서 서열번호 Y라 함)를 지칭할 때마다, 이는 서열번호 Y의 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성 또는 유사성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드로 대체될 수 있다.

[0479] 주어진 아미노산 서열 각각과의 동일성 백분율(적어도 80%)을 바탕으로 본 명세서에 기재된 각각의 아미노산 서열은 추가의 바람직한 구현예에서 주어진 아미노산 서열 각각과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%의 동일성 또는 그 이상의 동일성을 가진다. 바람직한 구현예에서, 서열 동일성은 본 명세서에서 식별된 바와 같은 서열의 전체 길이를 비교함으로써 결정된다. 주어진 아미노산 서열 각각과의 유사성 백분율(적어도 81%)에 의해 본 명세서에 기재된 각각의 아미노산 서열은 추가의 바람직한 구현예에서 주어진 아미노산 서열 각각과 적어도 81%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 유사성의 유사성을 가진다. 바람직한 구현예에서, 서열 유사성은 본 명세서에서 식별된 바와 같은 서열의 전체 길이를 비교함으로써 결정된다. 본 명세서에 달리 표시되지 않는 한, 주어진 서열번호와의 동일성 또는 유사성은 상기 서열의 전체 길이를 기반으로 한(즉, 전체 길이에 걸쳐 또는 전체적으로) 동일성 또는 유사성을 의미한다.

[0480] "서열 동일성"은 본 명세서에서 서열을 비교함으로써 결정되는, 2개 이상 아미노산(폴리펩타이드 또는 단백질) 서열 또는 2개 이상 핵산(폴리뉴클레오타이드) 서열 사이의 관계로서 정의된다. 2개 아미노산 서열 사이의 동일성은 바람직하게는 본 명세서에서 식별된 바와 같은 전체 서열번호 또는 이의 일부 내에서 이들 서열의 동일성을 평가함으로써 정의된다. 이의 일부는 서열번호 길이의 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 90%를 의미할 수 있다.

[0481] 당업계에서, "동일성"은 또한 경우에 따라 아미노산 서열의 문자열 사이의 일치에 의해 결정되는 바와 같을 수 있는, 이러한 서열 사이의 서열 관련성의 정도를 의미한다. 2개 아미노산 서열 사이의 "유사성"은 하나의 폴리펩타이드의 아미노산 서열 및 이의 보존된 아미노산 치환체를 제2 폴리펩타이드의 서열과 비교함으로써 결정된다. "동일성" 및 "유사성"은 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993]; [Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994]; [Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987]; [Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991]; 및 [Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)]에 기재된 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 알려진 방법에 의해 쉽게 계산될 수 있다.

[0482] 동일성을 결정하는 바람직한 방법은 시험된 서열 사이의 가장 큰 일치를 제공하도록 설계된다. 동일성 및 유사성을 결정하는 방법은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 프로그램으로 코딩되어 있다. 2개 서열 사이의 동일성 및 유사성을 결정하기 위한 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법은, 예를 들어 GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, FASTA, BLASTN, 및 BLASTP(Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)), EMBOSS Needle(Madeira, F., et al., Nucleic Acids Research 47(W1): W636-W641 (2019))을 포함한다. BLAST 프로그램은 NCBI 및 다른 공급처로부터 공개적으로 이용 가능하다(BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). EMBOSS 프로그램은 EMBL-EBI로부터 공개적으로 이용 가능하다. 잘 알려진 Smith Waterman 알고리즘이 또한 동일성을 결정하는 데 사용될 수 있다. EMBOSS Needle 프로그램은 사용되는 바람직한 프로그램이다.

[0483] 폴리펩타이드 서열 비교를 위한 바람직한 매개변수는 다음을 포함한다: 알고리즘: 문헌[Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48 (3):443-453 (1970)]; 비교 매트릭스: 문헌[Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)]의 BLOSUM62; 갭 오픈 페널티: 10; 및 갭 확장 페널티: 0.5. 이들 매개변수와 함께 유용한 프로그램은 EMBL-EBI의 EMBOSS Needle 프로그램으로 공개적으로 이용 가능하다. 상기 언급한 매개변수는 단백질의 전체적인 쌍형성 서열 정렬(Global Pairwise Sequence alignment)(말단 갭에 대한 페널티 없음)에 대한 디폴트 매개변수이다.

[0484] 핵산 비교를 위한 바람직한 매개변수는 다음을 포함한다: 알고리즘: 문헌[Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)]; 비교 매트릭스: DNAfull; 갭 오픈 페널티: 10; 갭 확장 페널티: 0.5. 이들 매개변수와 함께 유용한 프로그램은 EMBL-EBI의 EMBOSS Needle 프로그램으로 공개적으로 이용 가능하다. 상기 언급한 매개변수는 뉴클레오타이드 서열의 전체적인 쌍형성 서열 정렬(말단 갭에 대한 페널티 없음)에 대한 디폴트 매개변수이다.

[0485] 선택적으로, 아미노산 유사성 정도를 결정함에 있어서, 당업자는 또한 당업자에게 명백할 바와 같이, 소위 "보존적" 아미노산 치환을 고려할 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 유사한 측쇄를 가지는 잔기의 호환 가능성을 지칭한다. 예를 들어, 지방족 측쇄를 가지는 아미노산의 그룹은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신이고; 지방족-하이드록실 측쇄를 가지는 아미노산의 그룹은 세린 및 트레오닌이며; 아미드-포함 측쇄를 가지는 아미노산의 그룹은 아스파라긴, 및 글루타민이고; 방향족 측쇄를 가지는 아미노산의 그룹은 페닐알라닌, 타이로신, 및 트립토판이며; 염기성 측쇄를 가지는 아미노산의 그룹은 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘이고; 산성 측쇄를 가지는 아미노산의 그룹은 아스파르테이트 및 글루타메이트이고; 황-포함 측쇄를 가지는 아미노산의 그룹은 시스테인 및 메티오닌이다. 천연 발생 아미노산 각각에 대한 바람직한 보존적 치환은 다음과 같다: Ala에서 Ser; Arg에서 Lys 또는 Gln; Asn에서 Asp, His 또는 Ser; Asp에서 Glu 또는 Asn; Gln에서 Glu, Lys 또는 Arg; Glu에서 Lys, Asp, Gln; His에서 Tyr 또는 Asn; Ile에서 Leu, Val, 또는 Met; Leu에서 Ile, Met 또는 Val; Lys에서 Arg, Gln 또는 Glu; Met에서 Val, Leu 또는 Ile; Phe에서 Trp 또는 Tyr; Ser에서 Thr, Ala 또는 Asn; Thr에서 Ser; Trp에서 Tyr 또는 Phe; Tyr에서 His, Trp 또는 Phe; 및 Val에서 Ile, Leu 또는 Met. 본 명세서에 개시된 아미노산 서열의 치환 변이체는 개시된 서열에서 적어도 하나의 잔기가 제거되고 상이한 잔기가 그 자리에 삽입된 것이다. 바람직하게는, 아미노산 변화는 보존적이다.

[0486] 인간 FAP에 대해 적합한 항체 단편을 단리하는 방법

[0487] 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 고형 종양 및/또는 암 세포에 존재하고/하거나 이에 특이적인 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 친화도 선택에 의해 수득된다. 특정 고형 종양 항원 또는 암 세포에 대한 친화도 선택에 의해 적합한 폴리펩타이드를 수득하는 것은, 예를 들어 종양-특이적 항원 및/또는 암 세포-특이적 항원에 대한 결합을 위해 표면에서 항체 단편, 바람직하게는 VHH를 발현하는 세포의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리(예를 들어, 박테리오파지)를 스크리닝함으로써 수행될 수 있고; 이들 모두 그 자체로 알려진 방식으로 수행될 수 있으며, 다음 비-제한적인 단계를 본질적으로 포함한다: a) 종양-특이적 또는 암 세포-특이적 단백질 표적 분자의 단리된 용액 또는 현탁액을 수득하며, 상기 분자는 잠재적인 암 약물에 대한 표적인 것으로 알려져 있는, 단계; b) 상기 단백질 표적 분자에 대한 VHH 라이브러리 유래의 파지 또는 다른 세포를 바이오패닝하는 단계; c) 종양-특이적 또는 암 세포-특이적 단백질 표적 분자에 결합하는 파지 또는 다른 세포를 단리하는 단계; d) 개별 결합 파지 또는 다른 세포로부터 VHH 삽입체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 단계; e) 재조합 단백질 발현을 사용하여 이 서열에 따라 일정량의 VHH를 생산하는 단계; f) 상기 종양-특이적 또는 암 세포-특이적 단백질 표적 분자에 대한 상기 VHH 도메인의 친화도를 결정하는 단계; 및 선택적으로 g) 생물학적 검정(bio-assay)에서 상기 VHH 도메인의 살종양 또는 항암 활성을 시험하는 단계. 예를 들어 효소 결합 면역흡착 검정법(ELISA) 또는 표면 플라즈몬 공명(SPR) 검정법을 포함하여 다양한 방법이 VHH 도메인 및 종양-특이적 또는 암 세포-특이적 단백질 표적 분자 사이의 친화도를 결정하는 데 사용될 수 있으며, 이는, 예를 들어 문헌[Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]에 기재된 바와 같이 당업계에서의 일반적인 실무이다. 평형 해리 상수는 일반적으로 폴리펩타이드와 이의 표적 분자 사이의 친화도를 설명하는 데 사용된다. 통상적으로, 평형 해리 상수는 10^{-7} M 미만이다. 바람직하게는, 평형 해리 상수는 10^{-8} M 미만, 또는 10^{-9} M 미만, 또는 더 바람직하게는 10^{-9} M 내지 10^{-12} M의 범위이다.

[0488] 항체

[0489] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '항체'는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간화된 항체, 단일-사슬 항체, 및 이의 단편, 예컨대 Fab F(ab')$_2$, scFv, VHH 및 모 항체의 항원 결합 기능을 유지하는 다른 단편을 지칭한다. 이와 같이, 항체는 면역글로불린 또는 당단백질, 또는 이의 단편 또는 일부, 또는 변형된 면역글로불린-유사 프레임워크 내에 포함된 항원-결합 부분을 포함하는 작제물, 또는 비-면역글로불린-유사 프레임워크 또는 스캐폴드를 포함하는 작제물 내에 포함된 항원-결합 부분을 지칭할 수 있다.

[0490] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '모노클로날 항체'는 균질한 항체 집단을 가지는 항체 조성물을 지칭한다. 이 용어는 항체의 종 또는 공급원과 관련하여 제한되지 않으며, 항체가 제조되는 방식에 의해 제한되고자 하지 않는다. 이 용어는 전체 면역글로불린뿐만 아니라 단편 및 항체의 항원 결합 기능을 유지하는 다른 것들을 포함한다. 임의의 포유동물 종의 모노클로날 항체는 본 발명에서 사용될 수 있다. 그러나, 실제로 모노클로날 항체를 생산하기 위해 필요한 하이브리드 세포주 또는 하이브리도마를 제조하는 데 사용하기 위한 래트 또는 뮤린 세포주의 가용성 때문에, 항체는 통상적으로 래트 또는 뮤린 기원의 것일 것이다.

[0491] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '폴리클로날 항체'는 이질적인 항체 집단을 가지는 항체 조성물을 지칭한다. 폴리클로날 항체는 종종 면역화된 동물 유래 또는 선택된 인간 유래의 풀링된 혈청으로부터 유래된다.

[0492] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 '항체 또는 이의 단편의 중쇄 가변 도메인'은 (i) 낙타류 또는 상어류의 중쇄 항체의 중쇄의 가변 도메인을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 자연적으로 경쇄가 없는 중쇄 항체의 중쇄의 가변 도메인(또는 이하 VHH로 표시함), 또는 (ii) 예컨대 이에 제한되지 않지만 종양 항원 또는 암 세포 상에 존재하는 항원에 결합하기에 특히 적합하고 본 명세서에 개시된 바와 같은 VHH에 존재하고/하거나 이에 혼입될 수 있는(또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 VHH의 CDR 서열을 기반으로 하고/하거나 이로부터 유래될 수 있는) 아미노산 잔기의 하나 이상의 스트레치(즉, 소형 펩타이드)와 같은, 통상적인 4개 사슬 항체의 중쇄의 낙타화된(본 명세서에 추가로 정의된 바와 같음) 가변 도메인(또한 이하 낙타화된 V_H로 표시함) 또는 이의 임의의 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는 통상적인 4개 사슬 항체의 중쇄의 가변 도메인(또한 이하 V_H로 표시함)을 의미한다. 일 구현예에서, VHH의 단편은 기능적 단편이다.

[0493] 그러나, 본 명세서에서 하기에 추가로 기재된 바와 같이, 항체의 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 및 구조는 이에 제한되지 않지만, 당업계 및 본 명세서 하기에서 '프레임워크 영역 1' 또는 'FR1'; '프레임워크 영역 2' 또는 'FR2'; '프레임워크 영역 3' 또는 'FR3'; 및 '프레임워크 영역 4' 또는 'FR4' 각각으로 지칭되는 4개의 프레임워크 영역 또는 'FR'로 구성되는 것으로 간주될 수 있고, 이들 프레임워크 영역에는 당업계에서 각각 '상보성 결정 영역 1' 또는 'CDR1'; '상보성 결정 영역 2' 또는 'CDR2'; 및 '상보성 결정 영역 3' 또는 'CDR3'으로 지칭되는 3개의 상보성 결정 영역 또는 'CDR'이 개재되어 있다.

[0494] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 항체의 맥락 내에서 용어 '상보성 결정 영역' 또는 'CDR'은 H(중쇄) 또는 L(경쇄) 사슬(또한 각각 VH 및 VL로 약칭됨)의 가변 영역을 지칭하며 항원 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 이들 CDR 영역은 특정 항원 결정인자 구조에 대한 항체의 기본 특이성을 설명한다. 이러한 영역은 또한 "초가변 영역"으로 지칭된다. CDR은 가변 영역 내 아미노산의 비-연속적 스트레치를 나타내지만, 종에 관계 없이 가변 중쇄 및 경쇄 영역 내에서 이러한 중요한 아미노산 서열의 주위 조건에 따른 위치는 가변 사슬의 아미노산 서열 내에서 유사한 위치를 가지는 것으로 밝혀졌다. 모든 표준 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 각각은 3개의 CDR 영역을 가지며, 각각의 CDR 영역은 각각의 경쇄(L) 및 중쇄(H)에 대해 다른 것들과 비-인접한다(L1, L2, L3, H1, H2, H3으로 명명됨).

[0495] 또한 본 명세서에서 하기에 추가로 기재되는 바와 같이, 항체의 중쇄 가변 도메인(VHH 또는 V_H를 포함함)에서 아미노산 잔기의 총 수는 110 내지 130개의 영역에 있을 수 있다. 그러나 항체의 중쇄 가변 도메인의 일부, 단편 또는 유사체가 기능적 활성(의 적어도 일부)을 유지하고/하거나, 이들 일부, 단편 또는 유사체가 유래한 항체의 원래 중쇄 가변 도메인의 결합 특이성(의 적어도 일부)을 유지하는 한, 이러한 일부, 단편 또는 유사체는 길이 및/또는 크기에 대해 특별히 제한되지 않음에 유의하여야 한다. 기능적 활성(의 적어도 일부)을 유지하고/하거나, 이들 부분, 단편 또는 유사체가 유래한 항체의 원래 중쇄 가변 도메인의 결합 특이성(의 적어도 일부)을 유지하는 일부, 단편 또는 유사체는 또한 본 명세서에서 중쇄 가변 도메인의 '기능적 단편'으로 추가로 지칭된다.

[0496] 항체의 가변 도메인(VHH 또는 V_H를 포함함)의 아미노산 잔기는 바람직하게는 문헌[Lefranc M.P. et al 1997 Immunology today, 18: 509, PMID: 9386342; Lefranc, M.-P., 1999 The Immunologist, 7: 132-136] 및 [Lefranc M.P. et al 2003, Dev. Comp. Immunol., 27: 55-77 PMID: 12477501]에 기재된 바와 같은 IMGT 명명법에 의해 주어진 V-도메인(면역글로불린 및 T 세포 수용체)에 대한 IMGT 고유 넘버링에 따라 넘버링된다. 이러한 넘버링에 따르면(예를 들어, Lefranc 2003의 표 1 참조), 보존된 아미노산은 항상 동일한 위치, 예를 들어 시스테인 23(1st-CYS), 트립토판 41(보존된-TRP), 소수성 아미노산 89, 시스테인 104(2nd-CYS), 페닐알라닌 또는 트립토판 118(J-PHE 또는 J-TRP)을 가진다. IMGT 고유 넘버링은 프레임워크 영역의 표준화된 경계(FR1-IMGT: 위치 1 내지 26, FR2-IMGT: 39 내지 55, FR3-IMGT: 66 내지 104 및 FR4-IMGT: 118 내지 128) 및 상보성 결정 영역의 표준화된 경계(CDR1-IMGT: 27 내지 38, CDR2-IMGT: 56 내지 65 및 CDR3-IMGT: 105 내지 117)를 제공한다. 갭은 비점유 위치를 나타낸다. CDR1-IMGT 및 CDR2-IMGT의 갭(각각 12 미만 및 10개 미만의 아미노산 길이)은 CDR-IMGT 루프의 상단에 배치된다. 재배열된 CDR3-IMGT의 기본 길이는 13개 아미노산(위치 105 내지 117)이며, 이는 15개 아미노산의 접합부(2nd-CYS 104 내지 J-TRP 또는 J-PHE 118)에 해당한다. CDR3-IMGT 길이가 13개 아미노산 미만인 경우, 루프 상단으로부터 111, 112, 110, 113, 109, 114 등의 순서로 갭이 형성된다. CDR3-IMGT 길이가 13개 아미노산을 초과하는 경우, CDR3-IMGT 루프의 상단에서 112.1,111.1, 112.2, 111.2, 112.3, 111.3

등의 순서로 위치 111과 112 사이에 추가적인 위치가 형성된다.

[0497] 이와 관련하여, VHH 도메인에 대해 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 각각의 CDR에서 아미노산 잔기의 총 수는 다양할 수 있으며, IMGT 넘버링에 의해 표시된 아미노산 잔기의 총 수와 일치하지 않을 수 있음에 유의하여야 한다(즉, IMGT 넘버링에 따른 하나 이상의 위치는 실제 서열에서 점유되지 않을 수 있거나, 실제 서열은 IMGT 넘버링에 의해 허용된 수보다 더 많은 아미노산 잔기를 포함할 수 있음). 이는 일반적으로 IMGT에 따른 넘버링이 실제 서열에서 아미노산 잔기의 실제 넘버링과 일치할 수 있거나 일치하지 않을 수 있음을 의미한다.

[0498] 대안적으로, 항체 가변 도메인(VHH 또는 VH를 포함함)의 아미노산 잔기는 Kabat 넘버링에 따라 넘버링될 수 있다(Kabat et al 1987, National Institute of Health; 1987. 804 pp., Publication no. 165-462.). 면역글로불린 V-영역에 대한 IMGT와 Kabat 넘버링 사이의 대응관계는, 예를 들어 Lefranc et al., 2003의 표 2에서 확인할 수 있다.

[0499] 중쇄 항체 및 이의 가변 도메인의 일반적인 설명을 위하여, 특히 일반적인 배경 기술로서 문헌[Muyldermans S., et al 2013 Annual Review of Biochemistry, 82: 775-797]을 참조한다.

[0500] 일반적으로, 본 명세서에서 가장 넓은 의미로 사용되는 용어 '중쇄 가변 도메인'은 특정 생물학적 공급원 또는 특정 제조 방법으로 제한되지 않는다는 점에 유의하여야 한다. 예를 들어, 하기에서 더 상세히 논의될 바와 같이, 본 명세서에 개시된 바와 같은 중쇄 항체로부터 유래된 중쇄 가변 도메인(즉, VHH)은 (1) 천연 발생 중쇄 항체의 VHH 도메인을 단리함으로써; (2) 천연 발생 VHH 도메인을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해; (3) 임의의 동물 종, 구체적으로 포유동물의 종, 예컨대 인간 유래의 천연 발생 V_H 도메인의 (하기 기재된 바와 같은) '낙타화'에 의해, 또는 이러한 낙타화 V_H 도메인을 인코딩하는 핵산의 발현에 의해; (4) 문헌[Weizao C., et al Methods Mol Biol 2009, 525:81-99]에 기재된 바와 같은 '도메인 항체' 또는 'dAb'의 '낙타화'에 의해, 또는 이러한 낙타화 V_H 도메인을 인코딩하는 핵산의 발현에 의해; (5) 단백질, 폴리펩타이드 또는 다른 아미노산 서열을 제조하기 위한 합성 또는 반-합성 기법을 사용하여; (6) 핵산 합성을 위한 기법을 사용하여 VHH를 인코딩하는 핵산을 제조한 후, 이렇게 수득된 핵산의 발현에 의해; 및/또는 (7) 상기한 것의 임의의 조합에 의해 수득될 수 있다. 상기한 것을 수행하기 위한 적합한 방법 및 기법은 본 명세서의 개시내용을 기반으로 하여 당업자에게 명백할 것이며, 예를 들어 본 명세서의 하기에 더 상세히 기재되는 방법 및 기법을 포함한다.

[0501] 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 단일-도메인 항체 단편이 생산된 숙주 세포 및/또는 배지로부터 추출되거나 정제되었을 때, 상기 항체 단편은 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 '본질적으로 단리된 (형태)'인 것으로 간주된다.

[0502] 항체 단편의 변이체

[0503] 본 발명은 본 발명의 항체 단편, 바람직하게는 VHH 서열 또는 이의 단편(또는 이를 발현시키는 데 사용되는 본 발명의 뉴클레오타이드 서열)의 기원에 대해 제한되지 않음에 유의하여야 한다. 게다가, 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 바람직하게는 VHH 서열 또는 뉴클레오타이드 서열이 생성되거나 수득된 방법에 대해 제한되지 않는다. 따라서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 아미노산 서열은 합성 또는 반-합성 아미노산 서열, 폴리펩타이드 또는 단백질일 수 있다.

[0504] 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편, 바람직하게는 VHH의 일부, 단편, 유사체, 돌연변이체, 변이체, 및/또는 유도체, 및/또는 이들 일부, 단편, 유사체, 돌연변이체, 변이체, 및/또는 유도체가 본 명세서에서 구상되는 목적에 적합한 한 이러한 일부, 단편, 유사체, 돌연변이체, 변이체, 및/또는 유도체 중 하나 이상을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어진 폴리펩타이드: 항체 단편에 연결되고 방사성 핵종에 연결될 때 진단 및 치료적 적용에 사용하기에 적합한 분자를 FAP를 발현하는 세포, 조직 또는 장기로 전달하는 것을 포함한다. 본 발명에 따른 이러한 일부, 단편, 유사체, 돌연변이체, 변이체, 및/또는 유도체는

[0505] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에, 바람직하게는 이들 둘 다의 FAP에 특이적으로 결합하고,

[0506] - 바람직하게는 FAP의 조절제가 아니며, 바람직하게는 FAP의 억제제가 아니다.

[0507] 예를 들어, 본 발명은 본 명세서에서 CDR 서열 또는 항체 단편의 일부로도 지칭되고 서열번호 1, 2, 3으로 식별되는 아미노산 잔기의 다수의 스트레치(즉, 소형 펩타이드), 예컨대 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편

또는 이의 일부분, 바람직하게는 VHH의 서열을 표시하는 서열번호 4와 적어도 80% 동일성을 가지는 서열을 제공하며, 이들은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하기에 특히 적합하다.

[0508] 예를 들어, 본 발명은 본 명세서에서 CDR 서열 또는 항체 단편의 일부로도 지칭되고 서열번호 5, 6, 7로 식별되는 아미노산 잔기의 다수의 스트레치(즉, 소형 펩타이드), 예컨대 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편 또는 이의 일부분, 바람직하게는 VHH의 서열을 표시하는 서열번호 8과 적어도 80% 동일성을 가지는 서열을 제공하며, 이들은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하기에 특히 적합하다.

[0509] 예를 들어, 본 발명은 본 명세서에서 CDR 서열 또는 항체 단편의 일부로도 지칭되고 서열번호 9, 10, 11로 식별되는 아미노산 잔기의 다수의 스트레치(즉, 소형 펩타이드), 예컨대 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편 또는 이의 일부분, 바람직하게는 VHH의 서열을 표시하는 서열번호 12와 적어도 80% 동일성을 가지는 서열을 제공하며, 이들은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하기에 특히 적합하다.

[0510] 예를 들어, 본 발명은 본 명세서에서 CDR 서열 또는 항체 단편의 일부로도 지칭되고 서열번호 13, 14, 15로 식별되는 아미노산 잔기의 다수의 스트레치(즉, 소형 펩타이드), 예컨대 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편 또는 이의 일부분, 바람직하게는 VHH의 서열을 표시하는 서열번호 16과 적어도 80% 동일성을 가지는 서열을 제공하며, 이들은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하기에 특히 적합하다.

[0511] 이들 스트레치는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 바람직하게는 VHH의 기능적 단편인 것으로 간주될 수 있고, 구체적으로 이들이 해당 적합한 스캐폴드 또는 VHH의 항원 결합 부위(의 일부)를 형성하는 방식으로, 임의의 적합한 스캐폴드(단백질), 예컨대 본 명세서에 개시된 바와 같은 VHH 또는 화합물 또는 표지된 화합물(이에 제한되지 않음)에 존재할 수 있고/있거나, 이에 포함될 수 있다. 그러나, 가장 넓은 의미에서 본 발명은, 아미노산 잔기의 이러한 스트레치가 본 명세서에 개시된 바와 같은 이러한 스캐폴드 또는 항체 단편(바람직하게는 VHH)이 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합할 수 있도록 하는 한, 아미노산 잔기의 이러한 스트레치가 본 명세서에 개시된 바와 같은 스캐폴드 또는 항체 단편, 바람직하게는 VHH에서 가질 수 있는 특정 구조적 역할 또는 기능에 제한되지 않음에 유의하여야 한다.

[0512] 항체 단편의 추가의 번역후 구조적 특성화

[0513] 특정 양태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같이 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 항체 단편, 바람직하게는 VHH 도메인 또는 이의 단편은 선택적으로 하나 이상의 링커를 통해 하나 이상의 추가 기, 모이어티, 또는 잔기에 연결될 수 있다. 이러한 하나 이상의 추가 기, 모이어티 또는 잔기는 관심이 있는 다른 표적에 결합하는 역할을 할 수 있다. 이러한 추가의 기, 잔기, 모이어티 및/또는 결합 부위는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편에 추가의 기능성을 제공할 수 있거나 제공하지 않을 수 있고 본 명세서에 개시된 바와 같은 특성을 변형시킬 수 있거나 변형시키지 않을 수 있음이 명백하여야 한다. 이러한 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 단위는 또한, 예를 들어 생물학적으로 활성일 수 있는 화학 기일 수 있다.

[0514] 이러한 기, 모이어티 또는 잔기는 특정 구현예에서 중쇄 가변 도메인에 N- 또는 C-말단으로 연결되고, 구체적으로 C-말단으로 연결된다.

[0515] 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같이 인간 및/또는 뮤린 FAP 항원에 특이적으로 결합하는 항체 단편, 바람직하게는 VHH 도메인 또는 이의 단편은 또한 화학적으로 변형되었을 수 있다. 예를 들어, 이러한 변형은 항체 단편, 바람직하게는 VHH 도메인 내에 또는 그 상에 하나 이상의 기능적인 기, 잔기 또는 모이어티의 도입 또는 연결을 수반할 수 있다. 이들 기, 잔기 또는 모이어티는 항체 단편, 바람직하게는 VHH 도메인에 대해 하나 이상의 원하는 특성 또는 기능성을 부여할 수 있다. 이러한 작용기의 예는 당업자에게 명백할 것이다.

[0516] 예를 들어, 항체 단편, 바람직하게는 VHH 도메인 또는 이의 단편에 대한 이러한 작용기의 도입 또는 연결은 항체 단편의 용해도 및/또는 안정성의 증가, 항체 단편의 독성의 감소, 또는 임의의 바람직하지 않은 부작용의 제거 또는 약화, 및/또는 다른 유리한 특성을 초래할 수 있다.

[0517] 특정 구현예에서, 하나 이상의 기, 잔기 또는 모이어티는 하나 이상의 적합한 링커 또는 스페이서를 통해 항체 단편, 바람직하게는 VHH 도메인 또는 이의 단편에 연결된다.

[0518] 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 단편의 둘 이상의 결합 부위 전부가 인간 및/또는 뮤린 FAP의 아미노산 잔기의 동일한 부위, 결정인자, 일부, 에피토프, 도메인 또는 스트레치에 대해 지시되거나 이에 특이적으로 결합하는 경우, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편은 '2가'(단일-도메인 항체 단편 상의 2개의 결합 부위의 경우) 또는 다가(단일-도메인 항체 단편 상의 2개 초과의 결합 부위의 경우), 예를

들어 3가로 지칭된다.

[0519] 일 구현예에서, 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편은 1가 형식으로 존재한다.

[0520] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 지칭할 때 용어 '1가'는 모노머 형태의 항체 단편을 의미한다. 1가 항체 단편은 하나의 결합 부위만을 포함한다. 이러한 맥락에서, 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 단편의 결합 부위는 서열번호 1, 2 및/또는 3으로 표시되는 하나 이상의 '상보성 결정 영역' 또는 'CDR', 및/또는 인간 및/또는 뮤린 FAP의 아미노산 잔기의 특정 부위, 결정인자, 일부, 에피토프, 도메인 또는 스트레치에 대해 지시되거나 이에 특이적으로 결합하는 항체 단편의 서열번호 4와 적어도 80% 동일성을 가지는 것으로 본 명세서에서 식별된 하나 이상의 영역을 포함한다.

[0521] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 모노머 형태, 즉 오직 하나의 VHH 도메인만 포함하는 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편을 제공한다. 이러한 분자의 작은 크기는 치료/진단적 적용에 매력적이다. 특정 적용을 위해, 이러한 작은 크기는 또한 최적의 치료 효과에 도달하기 위해 높은 조직 침투가 필요한 경우 매력적일 수 있다.

[0522] 그러나 대안적인 구현예에서, 본 발명은 또한 2가(또는 다가) 또는 이중특이적 또는 (다중특이적) 폴리펩타이드를 생성하는 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 2개 이상의 동일하거나 상이한 VHH 도메인을 포함하는 단편을 제공한다.

[0523] 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편이 모노머 형태로 존재할 수 있지만, 대안적인 특정 구현예에서, 2개 이상의 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편이 서로 연결될 수 있거나 상호연결될 수 있다. 특정 구현예에서, 2개 이상의 항체 단편, 바람직하게는 2개 이상의 VHH 또는 이의 단편은 하나 이상의 적합한 링커 또는 스페이서를 통해 서로 연결된다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 이러한 항체 단편의 커플링에 사용하기에 적합한 스페이서 또는 링커는 당업자에게 명백할 것이며, 일반적으로 펩타이드 및/또는 단백질을 연결하기 위해 당업계에서 사용되는 임의의 링커 또는 스페이서일 수 있다.

[0524] 일부 특히 적합한 링커 또는 스페이서는, 예를 들어 폴리펩타이드 링커, 예컨대 글리신 링커, 세린 링커, 혼합 글리신/세린 링커, 글리신-풍부 및 세린-풍부 링커 또는 대체로 극성인 폴리펩타이드 단편으로 구성된 링커, 또는 동종이작용성 또는 이종이작용성 화학적 가교결합 화합물, 예컨대 글루타르알데하이드, 또는 선택적으로 PEG-스페이스, 말레이미드 또는 NHS 에스테르를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0525] 예를 들어, 폴리펩타이드 링커 또는 스페이서는 길이가 1 내지 50개 아미노산, 예컨대 1 내지 30개, 구체적으로 1 내지 10개 아미노산 잔기인 적합한 아미노산 서열일 수 있다. 링커(들)의 길이, 가요성 정도 및/또는 기타 특성은 종양 표적 또는 암 세포 상의 표적에 대한 친화도, 특이성 또는 결합력, 또는 약리학적 거동을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편의 특성에 일부 영향을 미칠 수 있음이 명백할 것이다. 2개 이상 링커가 사용될 때, 이들 링커는 동일하거나 상이할 수 있음이 명백할 것이다. 본 발명의 맥락 및 개시내용에서, 당업자는 임의의 과도한 실험 부담 없이 본 명세서에 개시된 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편을 커플링하기 위해 최적의 링커를 결정할 수 있을 것이다.

[0526] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 기능적 단편을 지칭할 때 용어 '비태그'는 외래 폴리펩타이드 서열을 포함하지 않는(예를 들어, 바람직하게는 약제와 연결되고/되거나 본 명세서에 기재된 바와 같은 방사성 동위원소로 표지된, 항체 단편, 바람직하게는 VHH 서열 또는 이의 단편만을 포함하는) 항체 단편을 의미한다. 예시적인 외래 폴리펩타이드 서열은 카르복시-말단 폴리펩타이드 태그, 예를 들어 His-태그, 시스테인-포함 태그(예를 들어, 문헌[Pruszynski et al 2013 Nucl Med Biol 40: 52-59]에 기재된 바와 같은 GGC-태그), 및/또는 Myc-태그를 포함한다. His-태그는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 히스티딘을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 6개의 히스티딘이 존재한다.

[0527] 또한 일 구현예에서, 존재할 수 있는 하나 이상의 기, 잔기 또는 모이어티는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 기능적 단편의 다량체화, 예컨대 이량체화를 유도하지 않는다.

[0528] 따라서, 일 구현예에서, 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 단편에는 다량체화, 예컨대 이량체화를 유도하는 태그가 없으며, 바람직하게는 시스테인-포함 태그, 바람직하게는 GGC-태그가 없다.

[0529] 따라서, 일 구현예에서, 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 단편에는 카르복시-말단 폴리펩타이드 태그가 없으며, 바람직하게는 태그되지 않는다.

[0530] 유리하게는, 폴리펩타이드 태그된, 예컨대 His-태그 및 Myc-His-태그된 항체 단편과 비교하여 카르복시-말단 폴

리펩타이드 태그가 없는 항체 단편을 사용할 때, 신장 저류가 상당히 감소되는 것으로 나타났다(D'Huyvetter et al. (2014), Theranostics. 4(7):708-20).

[0531] 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 VHH를 지칭할 때 용어 '이중특이적'은, a) 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편의 2개 이상의 결합 부위가 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대해 지시되거나 이에 특이적으로 결합하지만 인간 및/또는 뮤린 FAP의 아미노산 잔기의 동일하지 않은(즉, 상이한) 부위, 결정인자, 일부, 에피토프, 도메인 또는 스트레치에 대해 지시되거나 특이적으로 결합하면, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편은 '이중특이적'(항체 단편 상의 2개 결합의 결합 부위의 경우) 또는 다중특이적(항체 단편 상의 2개 초과의 결합 부위의 경우)이라고 하거나 b) 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편의 2개 이상의 결합 부위가 관심이 있는 상이한 표적 분자에 대해 지시되거나 이에 특이적으로 결합하는 것을 의미한다. 용어 '다중특이적'은 2개 초과의 결합 부위가 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편에 존재하는 경우에 사용된다.

[0532] 따라서, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 '이중특이적' 항체 단편, 예컨대 '이중특이적' VHH 또는 '다중특이적' 항체 단편, 예컨대 '다중특이적' VHH는 각각 2개 또는 적어도 2개의 결합 부위를 포함하는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 VHH의 의미를 가질 것이며, 여기서 이들 2개 이상의 결합 부위는 상이한 결합 특이성을 가진다. 따라서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 예컨대 VHH는 각각 2개 이상의 상이한 결합 영역이 동일한 모노머 항체 단편에 존재하는 경우, '이중특이적' 또는 '다중특이적'으로 간주된다.

[0533] 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편의 '반감기'는 일반적으로 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편의 생체내 혈청 농도가 50%로 감소되는 데 필요한 시간으로 정의될 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편의 생체내 반감기는 당업자에게 알려진 임의의 방식으로, 예컨대 약동학 분석에 의해 결정될 수 있다. 당업자에게 명백할 바와 같이, 반감기는 t1/2-알파, t1/2-베타 및 곡선하면적(AUC)과 같은 매개변수를 사용하여 표현될 수 있다. 생체내 반감기 증가는 일반적으로 매개변수 t1/2-알파, t1/2-베타 및 곡선하면적(AUC) 중 하나 이상, 바람직하게는 3가지 전부의 증가로 특성화된다.

[0534] 본 명세서에 개시된 바와 같이 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 지칭할 때 용어 "연장된 수명"은 항체 단편이 변형되어 항체 단편의 반감기를 연장시켰음을 의미하는 데 사용된다. 항체 및 항체 단편의 반감기를 연장시키기 위한 전략은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 제한 없이, 반감기를 연장시키는 하나 이상의 기 또는 모이어티, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 소 혈청 알부민(BSA) 또는 인간 혈청 알부민(HSA), 항체 Fc 단편, 또는 혈청 알부민과 같은 혈청 단백질을 표적화하는 항체-결합 항체 단편에 대한 연결(화학적 또는 다른 방식)을 포함한다.

[0535] 따라서, 일 구현예에서, 항체 단편, 예컨대 VHH 또는 이의 기능적 단편은 수명이 연장되지 않은 것이다.

[0536] 항체 단편을 인코딩하는 핵산 분자

[0537] 추가 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 정의된 바와 같은 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 적합한 단편을 인코딩하는 핵산 서열로 표시되는 핵산 분자를 제공한다.

[0538] 일 구현예에서, 이러한 핵산 분자는 서열번호 33 내지 36 중 임의의 것과 적어도 80% 동일성을 가지는 핵산 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진 핵산 서열로 표시된다. 바람직하게는, 동일성은 적어도 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%이다. 동일성은 보통 상기 서열번호의 전장에 걸쳐 평가된다. 그러나, 동일성이 본 명세서에 정의된 바와 같은 상기 서열번호의 일부분에 걸쳐 평가되는 것이 배제되지 않는다.

[0539] 이들 핵산 서열은 또한 벡터 또는 유전자 작제물 또는 폴리뉴클레오타이드의 형태일 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 핵산 서열은 합성 또는 반-합성 서열, 라이브러리(구체적으로 발현 라이브러리)로부터 단리된 뉴클레오타이드 서열, 중첩 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 제조된 뉴클레오타이드 서열, 또는 그 자체로 알려진 DNA 합성을 위한 기법을 사용하여 제조된 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.

표 4

항체 단편을 인코딩하는 핵산 분자

VHH	서열번호	DNA 서열	하기 서열번호로 번역됨
B1	33	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGAAGGCTCTCCAGTAGCAATTCCATGGCCTGGTATCGCCAGGTTCCAGGGAAGCGTCGCGAGTTGGTCGCGGGAATTACTGGTGGTGGTGAGACAAACTATGCAGACTTCGTGGGTGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACGGGCTGTATCTGCAATTGAACGGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGCCTATTATTGTAATTTCTGGCCCCCACTTATCAACTACTGGGGCCAAGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	4
B2	34	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGTTTCTGGAAGCATCTCCAGTGCCAATAGCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGACGTGGTCGCAGGTCTTACTACTGGTGGTAGGAGTCACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAGCAGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAATTTGTGGCCGCCGGTTCAGGGCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	8
B3	35	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGAAGACTCTTCAGTACCAATGCCATGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCAGGCATTACTGGTGGTGATAGATCAAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGGCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTAATTTCTACCCGCCTATTGTGGGTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	12
B4	36	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGTTGGGGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGTATTTATGCTGACGGTGATATGACATACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAAATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAAAGATCCCCTCCCCCCCTATCATGTTAACCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA	16

[0540]

[0541] 작제물, 벡터, 숙주 세포

[0542] 본 명세서에 개시된 바와 같은 유전자 작제물은 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 바람직하게는 이중-가닥 DNA이다. 본 발명의 유전자 작제물은 또한 의도된 숙주 세포의 게놈 DNA로의 통합에 적합한 형태로 또는 의도된 숙주 유기체에서 독립적인 복제, 유지 및/또는 유전에 적합한 형태로 의도된 숙주 세포 또는 숙주 유기체의 형질전환에 적합한 형태일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 유전자 작제물은, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, YAC, 바이러스 벡터 또는 트랜스포존과 같은 벡터의 형태일 수 있다. 구체적으로, 벡터는 발현 벡터, 즉 시험관내에서 및/또는 생체내에서(예를 들어, 적합한 숙주 세포, 숙주 유기체 및/또는 발현 시스템에서) 발현을 제공할 수 있는 벡터일 수 있다.

[0543] 따라서, 또 다른 추가 양태에서, 본 발명은 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0544] 또한 추가의 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 핵산 서열 및 따라서 하나 이상의

아미노산 서열을 포함하고 바람직하게는 이를 발현하거나 발현할 수 있는 숙주 또는 숙주 세포 또는 세포를 제공한다. 숙주 또는 숙주 세포의 적합한 예는 당업자에게 명백할 것이다.

[0545] 항체 단편을 생산 및 제조하는 방법

[0546] 본 발명은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 제조 또는 생성하는 방법뿐만 아니라, 이들을 인코딩하는 핵산 및 숙주 세포, 생성물, 및 이들 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 포함하는 조성물을 생산하는 방법을 추가로 제공한다. 이러한 방법의 일부 바람직하지만 비-제한적인 예는 본 명세서의 추가 설명으로부터 명백하게 될 것이다.

[0547] 당업자에게 명백할 바와 같이, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 제조하는 특히 유용한 하나의 방법은 일반적으로 다음 단계를 포함한다:

[0548] (a) 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현시키는 단계, 및

[0549] (b) 선택적으로 상기 항체 단편을 단리 및/또는 정제하는 단계.

[0550] 항체 단편을 인코딩하는 핵산은 벡터 또는 유전자 작제물에 포함될 수 있다.

[0551] 본 명세서에서 구상되는 특정 구현예에서, 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편은 VHH 서열의 무작위 라이브러리를 생성하는 단계 및 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합할 수 있는 VHH 서열에 대한 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 단계를 수반하는 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0552] 따라서, 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 제조하는 방법은 다음 단계를 포함한다:

[0553] a) VHH 도메인의 아미노산 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 제공하는 단계; 및

[0554] b) 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하고/하거나 이에 대해 친화성을 가질 수 있는 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열의 상기 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 스크리닝하는 단계,

[0555] 및

[0556] c) 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하고/하거나 이에 대해 친화성을 가질 수 있는 아미노산 서열(들)을 단리하는 단계.

[0557] 이러한 방법에서, VHH 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리는 아미노산 서열의 임의의 적합한 세트, 컬렉션 또는 라이브러리일 수 있다. 예를 들어, 아미노산 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리는 면역글로불린 단편 서열(본 명세서에 기재된 바와 같음)의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리, 예컨대 면역글로불린 단편 서열의 미경험(naive) 세트, 컬렉션 또는 라이브러리; 면역글로불린 단편 서열의 합성 또는 반-합성 세트, 컬렉션 또는 라이브러리; 및/또는 친화성 성숙을 거친 면역글로불린 단편 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리일 수 있다.

[0558] 이러한 방법의 특정 구현예에서, VHH 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리는, 예를 들어 인간 및/또는 뮤린 FAP로 또는 이를 기반으로 하거나 이로부터 유래된 적합한 항원 결정인자, 예컨대 이의 항원 부분, 단편, 영역, 도메인, 루프 또는 다른 에피토프로 적합하게 면역화된 포유동물로부터 유래된, 면역글로불린 단편 서열의 면역 세트, 컬렉션 또는 라이브러리일 수 있다. 특정 일 양태에서, 상기 항원 결정인자는 세포외 부분, 영역, 도메인, 루프 또는 다른 세포외 에피토프(들)일 수 있다.

[0559] 상기 방법에서, VHH 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리는 파지, 파지미드, 리보솜 또는 적합한 미생물(예컨대, 효모)에서 디스플레이되어, 예컨대 스크리닝을 용이하게 할 수 있다. 아미노산 서열(의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리)을 디스플레이하고 스크리닝하는 데 적합한 방법, 기법 및 숙주 유기체는, 예를 들어 본 명세서의 추가 개시내용을 기초로 당업자에게 명백할 것이다. 또한 문헌[Hoogenboom, Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)]에서의 검토를 참조한다.

[0560] 다른 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 생성하는 방법은 적어도 다음 단계를 포함한다:

[0561] a) VHH 도메인 아미노산 서열을 발현하는 세포의 컬렉션 또는 샘플을 제공하는 단계;

[0562] b) 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하고/하거나 이에 대해 친화성을 가질 수 있는 아미노산 서열을 발현하는 세포

에 대해 상기 컬렉션 또는 세포 샘플을 스크리닝하는 단계;

[0563] 및

[0564] c) (i) 상기 아미노산 서열을 단리하는 단계; 또는 (ii) 상기 세포로부터 상기 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 단리한 후, 상기 아미노산 서열을 발현시키는 단계.

[0565] 세포의 컬렉션 또는 샘플은, 예를 들어 B-세포의 컬렉션 또는 샘플일 수 있다. 또한, 이러한 방법에서, 세포의 샘플은 인간 및/또는 뮤린 FAP로 또는 이를 기반으로 하거나 이로부터 유래된 적합한 항원 결정인자, 예컨대 이의 항원 부분, 단편, 영역, 도메인, 루프 또는 다른 에피토프로 적합하게 면역화된 포유동물로부터 유래될 수 있다. 특정 일 구현예에서, 항원 결정인자는 세포외 부분, 영역, 도메인, 루프 또는 다른 세포외 에피토프(들)일 수 있다.

[0566] 다른 구현예에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대해 지시된 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 생성하는 방법은 적어도 다음 단계를 포함할 수 있다:

[0567] a) VHH 도메인 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 제공하는 단계;

[0568] b) 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합하고/하거나 이에 대해 친화성을 가질 수 있는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열에 대한 핵산 서열의 상기 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 스크리닝하는 단계;

[0569] 및

[0570] c) 상기 핵산 서열을 단리한 후, 상기 아미노산 서열을 발현시키는 단계.

[0571] 상기 방법에서, 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리는, 예를 들어 면역글로불린 단편 서열의 미경험 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 인코딩하는 핵산 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리; 면역글로불린 단편 서열의 합성 또는 반-합성 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 인코딩하는 핵산 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리; 및/또는 친화성 성숙을 거친 면역글로불린 단편 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 인코딩하는 핵산 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리일 수 있다.

[0572] 구체적으로, 이러한 방법에서, 핵산 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리는 인간 및/또는 뮤린 FAP(본 명세서에 정의된 바와 같음)에 대해 지시된 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 인코딩한다.

[0573] 상기 방법에서, 뉴클레오타이드 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리는 파지, 파지미드, 리보솜 또는 적합한 미생물(예컨대, 효모)에서 디스플레이되어, 예컨대 스크리닝을 용이하게 할 수 있다. 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열(의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리)을 디스플레이하고 스크리닝하는 데 적합한 방법, 기법 및 숙주 유기체는, 예를 들어 본 명세서의 추가 개시내용을 기초로 당업자에게 명백할 것이다. 또한 문헌 [Hoogenboom, Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005)]에서의 검토를 참조한다.

[0574] 본 발명은 또한 상기 방법에 의해, 또는 대안적으로 상기 방법 중 하나 및 추가적으로 적어도 본 명세서에 개시된 바와 같은 상기 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편의 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열을 결정하는 단계; 및 그 자체로 알려진 방식으로, 예컨대 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서의 발현에 의해 또는 화학적 합성에 의해 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 발현시키거나 합성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득 가능한 또는 수득되는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편에 관한 것이다.

[0575] 일부 경우에서, 본 명세서에서 구상되는 바와 같이 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 생산하는 방법은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 검출 가능한 결합 친화성, 또는 이에 대한 검출 가능한 시험관내 효과를 가지는 본 명세서에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편의 아미노산 서열 라이브러리로부터 단리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0576] 이러한 방법은 인간 및/또는 뮤린 FAP의 활성에 대한 검출 가능한 결합 친화성, 또는 이에 대한 검출 가능한 시험관내 효과를 가지는 본 명세서에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 인코딩하는 서열을 증폭시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 방법의 선택 단계로부터 수득된, 특정 아미노산 서열을 디스플레이하는 파지 클론은 숙주 박테리아의 재감염 및 성장 배지에서의 인큐베이션에 의해 증폭될 수 있다.

[0577] 특정 구현예에서, 이러한 방법은 인간 및/또는 뮤린 FAP에 결합할 수 있는 하나 이상의 아미노산 서열의 서열을 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0578] 아미노산 서열의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리에 포함된, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편이 적합한 세포 또는 파지 또는 입자 상에 디스플레이되는 경우, 상기 세포 또는 파지 또는 입자로부터 해당 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 단리하는 것이 가능하다. 이러한 방식으로, 선택된 아미노산 서열 라이브러리 구성원(들)의 뉴클레오타이드 서열은 일상적인 서열결정 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0579] 추가의 특정 구현예에서, 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 생산하는 방법은 적합한 조건 하에 숙주 유기체에서 상기 뉴클레오타이드 서열(들)을 발현시켜 실제 원하는 아미노산 서열을 수득하는 단계를 포함한다. 이러한 단계는 당업자에게 알려진 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0580] 추가적으로, 인간 및/또는 뮤린 FAP의 활성에 대한 검출 가능한 결합 친화성, 및/또는 이에 대한 검출 가능하지 않은 시험관내 효과를 가지는 본 명세서에 개시된 바와 같은 수득된 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편은, 선택적으로 이들 서열이 식별된 후에, 가용성 단백질 작제물로서 합성될 수 있다.

[0581] 예를 들어, 상기 방법에 의해 수득되거나 수득 가능하거나 선택되는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편은 당업계에 알려진 재조합 또는 화학적 합성 방법을 사용하여 합성될 수 있다. 또한, 상기 방법에 의해 수득되거나 수득 가능하거나 선택되는 아미노산 서열은 유전자 조작 기법에 의해 생산될 수 있다. 따라서, 상기 방법에 의해 수득되거나 수득 가능하거나 선택되는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 합성하는 방법은 인간 및/또는 뮤린 FAP의 활성에 대한 검출 가능한 결합 친화성, 및/또는 이에 대한 검출 가능하지 않은 시험관내 효과를 가지는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 또는 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키거나 감염시키는 단계를 포함할 수 있다. 따라서, 인간 및/또는 뮤린 FAP의 활성에 대한 검출 가능한 결합 친화성, 및/또는 검출 가능하지 않은 시험관내 효과를 가지는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편은 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 아미노산 서열을 인코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 쉽게 합성될 수 있다. 일단 제조되면, DNA는 발현 벡터 내로 도입되고, 그 다음 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이(E. coli) 또는 임의의 적합한 발현 시스템 내로 형질전환 또는 형질감염되어 재조합 숙주 세포에서 및/또는 이들 재조합 숙주 세포가 상주하는 배지에서 아미노산 서열의 발현을 달성할 수 있다.

[0582] 단백질 발현 및 정제 업계의 당업자에게 알려진 바와 같이, 적합한 발현 시스템을 사용하여 발현 벡터로부터 생산된 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편은, 예를 들어 His-태그 또는 용이한 정제를 위한 다른 서열 태그로 (통상적으로 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에서) 태그될 수 있음이 이해될 것이다.

[0583] 숙주 세포로의 핵산 또는 벡터의 형질전환 또는 형질감염은 인산칼슘-DNA 공침전, DEAE-덱스트란-매개 형질감염, 폴리브렌-매개 형질감염, 전기천공법, 미세주입법, 리포좀 융합, 리포펙션, 원형질체 융합, 레트로바이러스 감염, 및 유전자총을 포함하는 당업자에게 알려진 다양한 수단에 의해 달성될 수 있다.

[0584] 원하는 중쇄 가변 도메인 서열의 발현에 적합한 숙주 세포는 시험관내 또는 생체내 위치 여부에 관계없이 임의의 진핵 세포 또는 원핵 세포(예를 들어, 박테리아 세포, 예컨대 이. 콜라이, 효모 세포, 포유동물 세포, 조류 세포, 양서류 세포, 식물 세포, 어류 세포, 및 곤충 세포)일 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 유전자이식 식물에 위치할 수 있다.

[0585] 따라서, 본 출원은 또한 인간 및/또는 뮤린 FAP의 활성에 대한 검출 가능한 결합 친화성, 또는 이에 대한 검출 가능한 시험관내 효과를 가지는 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편의 생산 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 명세서에 개시된 바와 같은 이러한 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 인코딩하는 핵산 서열 또는 벡터로 숙주 세포를 형질전환, 형질감염 또는 감염시키는 단계 및 적합한 조건 하에 이의 아미노산 서열을 발현시키는 단계를 포함한다.

[0586] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 약제학적 조성물을 제조(동등한 용어인 '또는 ~의 생산')하는 방법을 추가로 제공한다.

[0587] 특정 구현예에서, 본 발명은 적어도 다음 단계를 포함하는, 본 명세서에 개시된 바와 같은 약제학적 조성물을 생산하는 방법을 제공한다:

[0588] - 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는, 본 명세서에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 수득하는 단계, 및

[0589] - 약제학적 조성물에서 상기 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 제형화하는 단계.

[0590] 이러한 방법의 특정 구현예에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는, 본 명세서에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 수득하는 단계는 다음을 포함한다:

[0591] (a) 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는, 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현시키는 단계, 및 선택적으로

[0592] (b) 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 단리 및/또는 정제하는 단계.

[0593] 이러한 방법의 다른 특정 구현예에서, 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하는, 본 명세서에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 항체 단편, 구체적으로 예컨대 VHH 또는 이의 단편을 수득하는 단계는 다음을 포함한다:

[0594] a) VHH 도메인 서열 또는 VHH 서열의 단편의 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 제공하는 단계;

[0595] b) 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하고/하거나 이에 대해 친화성을 가지는 서열에 대한 VHH 도메인 서열 또는 이의 단편의 서열의 상기 세트, 컬렉션 또는 라이브러리를 스크리닝하는 단계, 및 선택적으로

[0596] c) 인간 및/또는 뮤린 FAP에 특이적으로 결합하고/하거나 이에 친화성을 가지는 VHH 서열 또는 이의 단편의 서열을 단리하는 단계.

[0597] 항체 단편을 표지하는 공정

[0598] 방사성 핵종을 단백질에 혼입시키는 데 이용 가능한 다양한 방사성표지화 전략이 있다. 방사 화학자에 있어서 기법의 선택은 주로 사용되는 방사성 핵종에 따라 다르다. 요오드의 방사성 동위원소는 친전자성 치환에 의해 분자에 직접 통합되거나 접합을 통해 간접적으로 통합되는 능력을 가진다. 반면에 방사성 금속은 킬레이트제와의 착화를 통해 표지된다. 많은 금속성 방사성 핵종은 킬레이트제와 안정적인 복합체를 형성하는 능력을 가지고 있으며, 따라서 단백질과 접합이 가능하다. 요오드 핵종을 가진 방사성표지 분자는 약제학적 방사화학에서 매우 중요하다. 30가지가 넘는 상이한 요오드 동위원소가 식별되었지만, 방사성 요오드 화학에서 일반적으로 사용되는 것은 단지 4가지, 즉 ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I 및 ^{131}I만 사용된다.

[0599] 단백질의 직접적인 방사성 요오드화는 종양-표적화 또는 암 세포-표적화 방사성의약품의 합성을 위한 핵심 방법이다. 일반적으로, 단백질 방사성 요오드화에는 2가지 기본 접근법이 있다. 가장 간단한 접근법은 타이로신 및 히스티딘 잔기에서 친전자성 치환을 사용하는 직접적인 단백질 표지화이다. 방사성 요오드화물은 동일계내(*in situ*)에서 산화되어 친전자체 $^{*}I^{+}$를 형성한다. 이는 클로라민 T, Iodogen® 및 N-할로석신이미드와 같은 산화제를 사용하여 수행된다. 생성된 친전자체는 아미노산 타이로신의 전자-풍부 방향족 고리를 공격하여 σ-복합체를 형성한다. 이러한 치환은 σ-복합체를 안정화시키는 전자 공여 하이드록실 기로 인해 타이로신 잔기에서 수행된다. 단백질의 표지화는 온화한 조건 하에서 이루어져야 하므로, 타이로신에 요오드를 부착하는 것이 매우 적합하다.

[0600] 이 방법은 단백질을 표지화하는 데 최적인 온화한 조건 하에서 수행된다. 그러나 이는 단백질이 접근 가능한 타이로신 또는 히스티딘 잔기를 포함하는 경우에만 가능하다.

[0601] 접합을 통한 단백질의 간접적인 요오드화는 자주 사용되는 대안적인 방법이다. 이 접근법에서, 요오드는 2개의 작용기를 포함하는 보결 분자단의 적용에 의해 통합되어 단백질에 대한 방사성 요오드화 및 통합 둘 다를 가능하게 한다. 다양한 보결 분자단이 방사성 요오드화에 사용되지만, 가장 빈번하게 사용되는 것은 *N*-석신이미딜-5-[*I]요오도-3-피리딘카르복실([^{131}I]SIPC) 및 *N*-석신이미딜-3-[*I]-요오도벤조에이트([*I]SIB)이다. 활성 에스테르 둘 다는 단백질의 아미노 기에 접합되고 높은 생체내 안정성을 보인다.

[0602] 방향족 기의 아실화를 위한 다른 보결 분자단은 *N*-석신이미딜-4-구아니디노메틸-3-[I-131]요오도벤조에이트([I-131]SGMIB)이다.

[0603] 본 발명의 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물은 *N*-석신이미딜-4-구아니디노메틸-3-[I-131]요오도벤조에이트([I-131]SGMIB) 또는 이의 적합한 유도체 또는 변이체를 사용하여 요오드-131로 표지된

다.

[0604] 방사선요법을 위한 상세한 프로토콜은 전문가가 쉽게 이용 가능하다(Cancer Radiotherapy: Methods and Protocols (Methods in Molecular Medicine), Huddart RA Ed., Human Press 2002). 당업자는 질환의 성질 및 환자의 체질에 따라 적절한 투약 및 적용 스케줄을 결정하는 방법을 안다. 구체적으로, 당업자는 선량-제한 독성(DLT)를 평가하는 방법 및 이에 따라 최대 허용 선량(MTD)을 결정하는 방법을 안다.

[0605] 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 이의 표지된 화합물은 약 800 mCi 미만, 예컨대 약 150 mCi 미만, 예컨대 약 30 mCi 미만, 예컨대 약 15 mCi 미만의 방사성 투약량으로 투여된다.

[0606] 특정 구현예에서, 방사성면역접합체는 방사성 핵종에 따라 비활성이 약 0.5 mCi/mg 내지 약 8000 mCi/mg, 예컨대 1 mCi/mg 내지 약 1500 mCi/mg, 예컨대 1 mCi/mg 내지 약 300 mCi/mg, 예컨대 1 mCi/mg 내지 약 150mCi/mg이고, 정맥내, 복강내 또는 척수강내 경로와 같은 다른 경로를 통해 투여될 수 있다. 치료의 원하는 기간 및 효과에 따라, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물은 1회 또는 수회, 다른 치료 약물 또는 방사선 감작제와 조합하여 투여될 수 있다. 적용되는 표지된 화합물의 양은 암종의 정확한 성질에 따라 다르다. 투여당 방사능 선량은 효과적일 만큼 충분히 높아야 하지만, 선량 제한 독성(DLT) 미만이어야 한다.

[0607] 치료법/진단에서의 제형/용도

[0608] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 이상의 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편 및/또는 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 핵산 서열 및 선택적으로 적어도 하나의 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0609] 구체적인 특정 구현예에 따르면, 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 조성물은 선택적으로 적어도 하나의 다른 화합물을 추가로 포함할 수 있다.

[0610] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "스크리닝 용량" 또는 "바이오마커 용량"은 치료를 위해 대상체를 선택하기에 충분한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 작용제, 예컨대 표지된 화합물의 용량, 예컨대 대상체에서 암 세포 또는 고형 종양에 결합할 수 있고, 선택적으로 비핵 영상화 기법, 예컨대 X-선 영상화, 컴퓨터 단층 촬영 및/또는 자기 공명 영상과 조합되는, 예를 들어 감마 카메라 영상화, 예컨대 평면 감마 카메라 영상화, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층 촬영, 또는 양전자 방출 단층 촬영을 사용하여 대상체를 영상화함으로써 후속적으로 암 세포 또는 고형 종양의 위치에서 검출될 수 있는 용량이다. 일부 구현예에서, 스크리닝 용량은 치료적으로 유효하지 않은 용량이다. 일부 구현예에서, 스크리닝 용량은 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료 용량과 상이하다(예를 들어, 치료 용량 미만임).

[0611] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "치료 용량"은 치료를 필요로 하는 대상체(암에 걸린 대상체)의 적어도 1%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%에서 치료적으로 효과적인, 본 명세서에 기재된 바와 같은 작용제, 예컨대 표지된 화합물의 용량이다. 일부 구현예에서, 치료 용량은 본 명세서에 기재된 스크리닝 용량보다 더 많다.

[0612] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "대상체를 영상화하는 것"은 본 명세서에 기재된 바와 같은 표지된 화합물을 검출할 수 있는 장치를 사용하여 대상체의 하나 이상의 영상을 캡처하는 것을 지칭한다. 하나 이상의 영상은 (예를 들어, 하나 이상의 영상의 콘트라스트 또는 밝기를 조정함으로써) 이미지를 향상시키기 위해 컴퓨터 프로그램 및/또는 당업자에 의해 추가로 변경될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 표지된 화합물을 검출할 수 있는 임의의 장치는, 예컨대 감마 카메라 영상화, 예컨대 평면 감마 카메라 영상화를 위한 장치, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층 촬영, 또는 양전자 방출 단층 촬영을 위한 장치, 또는 핵 영상화 기법을 해부학적 영상화 기법, 예컨대 X-선 영상화, 컴퓨터 단층 촬영 및/또는 자기 공명 영상과 조합할 수 있는 장치의 사용이 고려된다. 예를 들어, 이러한 장치는 단일 광자 방출 컴퓨터 단층 촬영/컴퓨터 단층 촬영(SPECT/CT) 또는 양전자 방출 컴퓨터 단층 촬영/컴퓨터 단층 촬영(PET/CT) 영상화를 위한 장치일 수 있다. 이러한 장치는 당업계에 알려져 있으며, 상업적으로 입수 가능하다.

[0613] 일부 구현예에서, 스크리닝 용량의 투여 및 영상화에 의한 검출은 적어도 약 1분, 적어도 약 5분, 적어도 약 10분, 적어도 약 20분, 적어도 약 30분, 적어도 약 40분, 적어도 약 50분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 1.5시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 3시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 5시간, 적어도 약 6시간, 적어도 약 7시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 9시간, 적어도 약 10시간, 적어도 약 11시간, 적어도 약 12시간, 적어도 약 24시간, 적어도 약 2일, 또는 적어도 약 7일만큼 떨어져 있다. 일부 구현예에서, 스크리닝 용량의 투여 및 검출은 약 1

시간 내지 약 24시간만큼 떨어져 있다.

[0614] 일부 구현예에서, 스크리닝 용량 및 치료 용량은 적어도 약 1일, 적어도 약 2일, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 1개월, 적어도 약 2개월, 또는 적어도 약 6개월 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 스크리닝 용량 및 치료 용량은 약 1일 내지 약 6개월 간격(예를 들어, 약 1일 내지 약 2개월, 약 1일 내지 약 1개월, 또는 약 1일 내지 약 1주 간격)으로 투여된다.

[0615] 스크리닝 용량 및 치료 용량은 임의의 적합한 경로, 예컨대 전신, 국부 또는 국소로 각각 독립적으로 투여될 수 있다. 예시적인 경로는 정맥내, 복강내, 및 척수강내 투여를 포함한다. 이용되는 특정 경로는, 일부 구현예에서, 질환의 성질(예를 들어, 종양 또는 암 세포의 유형, 등급, 위치 및 병기 등) 및 대상체의 유형(예를 들어, 종, 체질, 연령, 성별, 체중 등)에 따라 다를 수 있다.

[0616] 모든 진단 및 치료적 적용에 대해 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 일반적으로 포유동물, 예컨대 인간, 비-인간 영장류, 래트, 마우스, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 말, 염소, 또는 양을 지칭한다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다. 일부 구현예에서, 대상체는 암에 걸린 대상체(예를 들어, 암에 걸린 인간 대상체)이다. 암에 걸린 대상체를 식별하기 위한 방법은 종양 항원 또는 다른 종양 바이오마커의 검출, 유전자 검사, MRI, X-선, PET 또는 SPECT 스캔, 생검, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0617] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 '진단', '예측' 및/또는 '예후'는 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태를 진단, 예측 및/또는 예후하여, 이에 의해 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태의 발병 및/또는 존재를 예측하는 것, 및/또는 질환 및/또는 장애 및/또는 병태의 진행 및/또는 기간을 예측하는 것, 및/또는 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태를 앓고 있는 환자의 치료법에 대한 반응을 예측하는 것을 포함한다.

[0618] 표지된 화합물, 이를 포함하는 조성물, 또는 제공되는 진단 또는 치료적 적용 중 임의의 하나의 일부 구현예에서, 스크리닝 용량(즉, 진단 방법에서 사용됨)은 치료적으로 유효하지 않은 용량이다. 일부 구현예에서, 스크리닝 용량은 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료 용량보다 더 적다(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료 용량보다 적어도 약 10배, 적어도 약 20배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배 또는 적어도 약 1000배 미만, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료 선량보다 적어도 약 10, 적어도 약 20, 적어도 약 30, 적어도 약 40, 적어도 약 50, 적어도 약 60, 적어도 약 70, 적어도 약 80, 적어도 약 90, 적어도 약 100, 적어도 약 120, 적어도 약 130, 적어도 약 140, 적어도 약 150, 적어도 약 160, 적어도 약 170, 적어도 약 180, 적어도 약 190, 적어도 약 200, 적어도 약 210, 적어도 약 220, 적어도 약 230, 적어도 약 240, 적어도 약 250, 적어도 약 260, 적어도 약 270, 적어도 약 280, 적어도 약 290, 적어도 약 300, 적어도 약 320, 적어도 약 340, 적어도 약 360, 적어도 약 380, 적어도 약 400, 적어도 약 450, 적어도 약 500, 적어도 약 1000, 적어도 약 5000, 적어도 약 10000, 적어도 약 13000, 적어도 약 15000, 적어도 약 18000, 또는 적어도 약 20000 MBq 미만). 일부 구현예에서, 스크리닝 용량은 약 10 MBq 내지 약 400 MBq, 약 20 MBq 내지 약 400 MBq, 약 30 MBq 내지 약 400 MBq, 약 40 MBq 내지 약 400 MBq, 약 50 MBq 내지 약 400 MBq, 약 100 MBq 내지 약 400 MBq, 약 200 MBq 내지 약 400 MBq, 약 300 MBq 내지 약 400 MBq, 약 10 MBq 내지 약 300 MBq, 약 20 MBq 내지 약 300 MBq, 약 30 MBq 내지 약 300 MBq, 약 40 MBq 내지 약 300 MBq, 약 50 MBq 내지 약 300 MBq, 약 100 MBq 내지 약 300 MBq, 또는 약 200 MBq 내지 약 300 MBq.이다. 일부 구현예에서, 스크리닝 용량은 3 약 7 MBq 내지 약 370 MBq이다. 본 명세서에 기재된 임의의 스크리닝 용량은 본 명세서에 기재된 바와 같은 치료 용량과 조합될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0619] 일부 구현예에서, 치료 용량은 본 명세서에 기재된 바와 같은 스크리닝 용량보다 더 높다(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 스크리닝 용량보다 적어도 약 10배, 적어도 약 20배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 100배, 적어도 약 200배, 적어도 약 300배, 적어도 약 400배, 적어도 약 500배 또는 적어도 약 1000배 초과, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 스크리닝 용량보다 적어도 약 10, 적어도 약 20, 적어도 약 30, 적어도 약 40, 적어도 약 50, 적어도 약 60, 적어도 약 70, 적어도 약 80, 적어도 약 90, 적어도 약 100, 적어도 약 120, 적어도 약 130, 적어도 약 140, 적어도 약 150, 적어도 약 160, 적어도 약 170, 적어도 약 180, 적어도 약 190, 적어도 약 200, 적어도 약 210, 적어도 약 220, 적어도 약 230, 적어도 약 240, 적어도 약 250, 적어도 약 260, 적어도 약 270, 적어도 약 280, 적어도 약 290, 적어도 약 300, 적어도 약 320, 적어도 약 340, 적어도 약 360, 적어도 약 380, 적어도 약 400, 적어도 약 450, 적어도 약 500, 적어도 약

1000, 적어도 약 5000, 적어도 약 10000, 적어도 약 13000, 적어도 약 15000, 적어도 약 18000, 또는 적어도 약 20000 MBq 초과). 일부 구현예에서, 치료 용량은 약 300 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 400 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 500 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 1000 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 2000 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 3000 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 4000 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 5000 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 10000 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 5000 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 10000 MBq 내지 약 20000 MBq, 약 300 MBq 내지 약 10000 MBq, 약 400 MBq 내지 약 10000 MBq, 약 500 MBq 내지 약 10000 MBq, 약 1000 MBq 내지 약 10000 MBq, 약 2000 MBq 내지 약 10000MBq, 약 3000 MBq 내지 약 10000 MBq, 약 4000 MBq 내지 약 10000 MBq, 또는 약 5000 MBq 내지 약 10000 MBq이다. 제공된 방법 중 임의의 하나의 일부 구현예에서 치료 용량은 약 370 MBq 내지 약 18500 MBq이다.

[0620] 스크리닝 및/또는 치료 용량은 단일 용량으로 또는 적절한 간격으로 투여되는 분할 용량(또한 하위 용량일 수 있음)으로 편리하게 제공될 수 있다. 치료 용량의 투여 요법은 장기(예를 들어, 적어도 2주, 예를 들어 수개월 또는 수년) 또는 매일 치료를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 치료 용량의 투여 요법은 1일 1회 내지 1개월 1회, 예컨대 1일 1회 내지 2주 1회, 예컨대 1주 1회(이에 제한되지 않음)로 다양할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 약제학적 조성물은 1회 또는 수회, 또한 간헐적으로, 예를 들어 수일, 수주 또는 수개월 동안 매일 투여될 수 있다.

[0621] 이용되는 특정 스크리닝 용량 및 치료 용량은, 일부 구현예에서, 질환의 성질(예컨대, 암뿐만 아니라, 종양 또는 암 세포의 유형, 등급, 및 병기 등, 또는 예컨대 본 명세서에서 식별된 다른 질환 중 임의의 것) 및 대상체의 유형(예를 들어, 종, 체질, 연령, 성별, 체중 등)에 따라 다를 수 있다.

[0622] 일부 양태에서, 본 발명은 키트, 예컨대 본 명세서에 기재된 바와 같은 진단 및 치료적 적용용 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 표지된 화합물의 스크리닝 용량 및 동일한 화합물의 치료 용량을 포함한다. 스크리닝 용량 및 치료 용량은 본 명세서에 기재되어 있다.

[0623] 키트 중 어느 하나의 일부 구현예에서, 키트는 스크리닝 용량 및 치료 용량의 주사를 위한 하나 이상의 수단을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 스크리닝 용량 및 치료 용량은 주사용 수단에 각각 개별적으로 수용된다. 일부 구현예에서, 주사용 수단은 주사기이다. 키트 중 어느 하나의 일부 구현예에서, 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이 대상체를 계층화하고 치료하는 방법)을 수행하기 위한 지침을 추가로 포함한다. 지침은 임의의 적합한 형태, 예를 들어 인쇄된 형태(예를 들어, 종이 또는 적층 삽입물 또는 라벨) 또는 전자 형태(예를 들어, 디스크 또는 USB 스틱)일 수 있다.

[0624] 용량, 투여 경로, 적용 계획, 반복 및 치료 기간은 일반적으로 질환의 성질(종양 또는 암 세포의 유형, 등급, 및 병기 또는 본 명세서에 추가로 정의된 질환 또는 병태의 유형, 등급 및 병기) 및 환자(체질, 연령, 성별 등)에 따라 다를 것이고, 치료를 담당하는 숙련된 의료 전문가에 의해 결정될 것이다. 상기 기재된 개시된 조합물의 구성요소에 대한 가능한 용량과 관련하여, 치료를 담당하는 의료 전문가가 임의의 용량-제한 독성 또는 다른 심각한 부작용이 발생하는지 여부를 주의 깊게 모니터링하고 이의 관리에 필요한 조치를 수행할 것임이 명백하다.

[0625] 일반적으로, 약제학적(진단 및 치료) 용도를 위해, 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편을 포함하는 (표지된) 화합물은 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 (표지된) 화합물 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제 및/또는 아쥬반트, 및 선택적으로 하나 이상의 추가의 약제학적으로 활성인 폴리펩타이드 및/또는 화합물을 포함하는 약제학적 제제 또는 조성물로 제형화될 수 있다. 이러한 표지된 화합물 또는 이를 포함하는 조성물은 복강내, 정맥내 또는 척수강내와 투여와 같은 다른 투여에 적합할 수 있다. 따라서, (표지된) 화합물 및/또는 이를 포함하는 조성물은, 예를 들어, 종양 또는 암 세포의 위치, 유형 및 기원에 따라 관심이 있는 조직 또는 장기로, 전신, 국부 또는 국소로, 바람직하게는 사용되는 특정 약제학적 제형 또는 조성물에 따라 복강내, 정맥내 또는 척수강내로 투여될 수 있다. 임상의는 적합한 투여 경로 및 이러한 투여에 사용되는 적합한 약제학적 제형 또는 조성물을 선택할 수 있을 것이다. FAP를 발현하거나 과발현하는 세포, 조직 또는 장기에 약제를 전달하는 화합물에 대해서도 동일하게 적용된다.

[0626] 주사 또는 주입에 적합한 약제학적 투약 형태는, 선택적으로 리포좀에 캡슐화된, 멸균 주사가능 또는 주입가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조에 적당한 활성 성분을 포함하는 멸균 수용액 또는 분산액 또는 멸균 분말을 포함할 수 있다. 모든 경우에, 최종 투약 형태는 제조 및 보관 조건 하에서 멸균 상태이고, 유동적이며 안정적이어야 한다. 액체 담체 또는 비히클은, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 오일, 무독성 글리세릴 에스테르, 및 적합한 이들의 혼합물을 포함하는 용매

또는 액체 분산 매질일 수 있다.

[0627] 예방 및/또는 치료에 사용하는 데 필요한 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 (표지된) 화합물의 양은 특정 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 기능적 단편에 따라 다를 뿐 아니라, 투여 경로, 치료될 병태의 성질 및 환자의 연령 및 상태에 따라 다를 수 있으며, 궁극적으로 주치의 또는 임상의의 재량에 따를 것이다. 또한, 본 명세서에서 구상되는 (표지된) 화합물의 투약량은 표적 세포, 종양, 조직, 이식편, 또는 장기에 따라 다를 수 있다.

[0628] 구체적으로, 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 (표지된) 화합물은 특히 치료될 병태의 중증도 및 환자를 기반으로 의사에 의해 결정될 양으로 투여될 것이다. 통상적으로, 각각의 질환 적응증에 대해, 최적 투약량은 하루에 체중(kg)당 투여될 양, 연속적으로(예를 들어, 주입), 단회 1일 용량으로서 또는 하루 동안의 다회 분할 용량으로서 지정하여 결정될 것이다. 임상의는 일반적으로 본 명세서에 언급된 인자에 따라 적합한 1일 용량을 결정할 수 있을 것이다. 또한 특정 경우에, 임상의는, 예를 들어 상기 언급된 인자 및 그의 전문적인 판단에 기초하여, 이들 양을 벗어나도록 선택할 수 있음이 명백할 것이다.

[0629] 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 이의 (표지된) 화합물의 유용한 투약량은 시험관내 활성, 및/또는 동물 모델에서 생체내 활성을 결정함으로써 결정될 수 있다. 본 발명의 비-인간 동물은 이를 위해 사용될 수 있다(실시예 2 참조).

[0630] 특정 구현예에서, 본 발명은 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 표지된 화합물을 10 μg 내지 10 mg 또는 10 μg 내지 7 mg 또는 10 μg 내지 5 mg 또는 10 μg 내지 2 mg 또는 10 g 내지 1.5 mg 또는 10 g 내지 1 mg 범위의 VHH의 용량으로 투여함으로써 암(바람직하게는 암 세포 및/또는 CAF에서 인간 FAP의 발현과 연관된 암)의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물을 제공한다. 추가의 특정 구현예에서, 본 발명은 암의 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 표지된 화합물을 10 μg 내지 2 mg의 표지된 화합물, 예컨대 구체적으로 10 g 내지 1.5 mg의 범위 또는 100 μg 내지 1 mg 범위의 표지된 화합물의 용량으로 투여함으로써 암의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물을 제공한다.

[0631] 따라서, 투여당 환자에게 적용되는 방사능 선량은 효과적일 만큼 충분히 높아야 하지만, 선량 제한 독성(DLT) 미만이어야 한다. 예를 들어 131-요오드로 방사성표지된 항체를 포함하는 약제학적 조성물의 경우, 치료 환경에서 초과해서는 안 되는 최대 허용 선량(MTD)이 결정되어야 한다.

[0632] 본 명세서에서 구상되는 바와 같은 화합물 및 표지된 화합물 및/또는 이를 포함하는 조성물은 예방 또는 치료될 질환 또는 장애를 예방 및/또는 치료하는 데 적합한 치료 요법에 따라 투여된다. 임상의는 일반적으로 적합한 치료 요법을 결정할 수 있을 것이다. 일반적으로, 치료 요법은 표지된 화합물, 또는 이를 포함하는 하나 이상의 조성물을 하나 이상의 약제학적으로 유효한 양 또는 용량으로 투여하는 것을 포함할 것이다.

[0633] 원하는 용량은 단일 용량으로 또는 적절한 간격으로 투여되는 분할 용량(또한 하위 용량일 수 있음)으로 편리하게 제공될 수 있다. 투여 요법은 장기(즉, 적어도 2주, 예를 들어 수개월 또는 수년) 또는 매일 치료를 포함할 수 있다. 구체적으로, 투여 요법은 1일 1회 내지 1개월 1회, 예컨대 1일 1회 내지 2주 1회, 예컨대 1주 1회(이에 제한되지 않음)로 다양할 수 있다. 따라서, 원하는 치료 기간 및 유효성에 따라, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물 또는 이를 포함하는 조성물은 1회 또는 수회, 또한 간헐적으로, 예를 들어 수일, 수주 또는 수개월 동안 매일 그리고 상이한 투약량으로 투여될 수 있다. 본 명세서에 개시된 표지된 화합물 또는 조성물의 적용된 양은 특정 암 질환의 성질에 따라 다르다. 다중 투여가 바람직하다. 그러나, 방사성표지된 물질은 통상적으로 1 내지 20주, 2 내지 10주, 또는 2 내지 8주, 또는 3 내지 6주, 또는 3 내지 5주, 또는 각각 4주의 간격으로 투여된다. 그러나 숙련된 기술자는 투여를 2회 이상의 적용으로 분할하는 것을 선택하는 방법을 알고 있으며, 이는 서로 직후에, 또는 예를 들어 1일 내지 4주 범위의 일부 다른 미리 결정된 간격으로 적용될 수 있다.

[0634] 구체적으로, 본 명세서에서 구상되는 바와 같이 표지된 화합물은 본 명세서에 인용된 질환 및 장애의 예방 및/또는 치료에 사용되거나 사용될 수 있는 다른 약제학적으로 활성인 화합물 또는 원리와 함께 사용될 수 있으며, 그 결과 시너지 효과를 얻을 수 있거나 얻지 못할 수 있다. 이러한 화합물 및 원리뿐만 아니라 이들을 투여하기 위한 경로, 방법 및 약제학적 제형 또는 조성물의 예는 임상의에게 명백할 것이다.

[0635] 본 발명의 맥락에서, "~와 조합하는", "병용 요법으로" 또는 "병용 치료로"는 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 이러한 표지된 화합물을 포함하는 조성물이 하나 이상의 다른 약제학적으로 활성인 화합물 또는 원리와 함께 환자가 이러한 조합의 유익한 효과로부터 이익을 얻을 수 있는

요법으로 환자에게 적용되는 것을 의미할 것이다. 구체적으로, 두 치료 모두는 시간적으로 근접하여 환자에게 적용된다. 바람직한 구현예에서, 두 치료 모두는 4주(28일) 이내에 환자에게 적용된다. 더 바람직하게는 두 치료 모두는 2주(14일) 이내, 더 바람직하게는 1주(7일) 이내에 적용된다. 바람직한 구현예에서, 2가지 치료는 2 또는 3일 이내에 적용된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 2가지 치료는 동일한 날에, 즉 24시간 이내에 적용된다. 또 다른 구현예에서, 2가지 치료는 4시간, 또는 2시간 이내에, 또는 1시간 이내에 적용된다. 또 다른 구현예에서, 2가지 치료는 병행하여, 즉 동시에 적용되거나, 2가지 투여는 시간상 중첩된다.

[0636] 비-제한적인 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물 또는 이러한 표지된 화합물을 포함하는 조성물은 분자 또는 이를 포함하는 조성물과 함께 적용되며, 여기서 상기 분자 또는 이를 포함하는 조성물은 최적화될 수 있고 따라서 표지된 화합물의 신장 저류를 감소시킬 수 있다. 본 발명의 문맥에서, "함께 적용된"은 광범위하게 해석되어야 한다. 이는 하나 또는 2가지의 별개 조성물로 동시에 적용되는 것을 포함함을 의미한다. 또한 2가지 별개 조성물로 순차적으로 적용되는 것도 포함한다.

[0637] 이러한 분자는 혈장 또는 혈액 대체물, 예컨대 변형된 젤라틴일 수 있다. 이와 관련하여 사용될 수 있는 변형된 젤라틴의 예는 Gelofusine™이다. 이러한 혈장 또는 혈액 대체물의 사용은 최적화되고 따라서 신장에서 표지된 화합물의 저류를 감소시키며, 따라서 원치않는 부작용을 최적화할 것으로 예상된다. 이러한 혈장 또는 혈액 대체물을 본 발명의 화합물과 함께 사용하는 이점은 실시예 8 및 9에서 입증되었다.

[0638] 이러한 분자의 또 다른 예는 양으로 하전된 아미노산 또는 적어도 하나의 양으로 하전된 아미노산을 포함하는 조성물일 수 있다. 적합한 양으로 하전된 아미노산의 예는 아르기닌, 라이신 및/또는 히스티딘이다. 이러한 조성물의 예는 Aminomedix™이다. 양으로 하전된 아미노산의 사용은 참조로 명시적으로 포함된 WO 2014/204854에 광범위하게 기재되어 있다.

[0639] 비-제한적인 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물 또는 이러한 표지된 화합물을 포함하는 조성물은 면역요법과 함께 적용된다. 일 구현예에서, 하나 이상의 치료용 항체 또는 치료용 항체 단편으로. 따라서, 이러한 비-제한적인 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물 또는 이러한 표지된 화합물을 포함하는 조성물을 이용한 방사선면역요법은 하나 이상의 치료용 항체 또는 치료용 항체 단편을 이용하는 일반 면역요법과 조합된다. 추가의 특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 이러한 표지된 화합물을 포함하는 조성물은 하나 이상의 치료용 항체 또는 치료용 항체 단편을 이용하는 병용 요법 또는 병용 치료 방법으로 사용된다.

[0640] 일 구현예에서, 본 명세서에 정의된 바와 같은 표지된 화합물 및 추가적인 항체 또는 항체 단편을 포함하는 병용 요법이 제공된다.

[0641] 예를 들어, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물 또는 이러한 표지된 화합물을 포함하는 조성물 및 하나 이상의 치료용 항체 또는 치료용 항체 단편은 동시에 주입될 수 있거나, 주입은 시간상 중첩될 수 있다. 2가지 약물이 동시에 투여되는 경우, 이들 약물은 하나의 단일 약제학적 제제로 함께 제형화될 수 있거나, 예를 들어 하나의 단일 주입 용액으로 용해하거나 희석함으로써, 2가지 상이한 약제학적 제제로부터 투여 직전에 함께 혼합될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 2가지 약물은 별도로, 즉 2가지 독립적인 약제학적 조성물로 투여된다. 바람직한 일 구현예에서, 2가지 치료제의 투여는 환자의 신체 내 종양 세포가 유효량의 세포독성 약물 및 방사선에 동시에 노출되는 방식이다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 표지된 화합물 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 이러한 표지된 화합물을 포함하는 조성물 및 하나 이상의 치료용 항체 또는 치료용 항체 단편 모두의 유효량이 동시에 종양 부위에 존재한다. 본 발명은 또한 추가 작용제의 사용을 포함하며, 이는 정의된 바와 같은 조합에 추가적으로 투여된다. 이는, 예를 들어 하나 이상의 추가 화학요법제(들)일 수 있다. 이는 또한 다른 주어진 약물 중 임의의 것의 원치않는 부작용을 예방, 억제, 또는 개선하기 위해 적용되는 하나 이상의 작용제(들)일 수 있다. 예를 들어, 백혈구의 증식을 자극하는 사이토카인은 백혈구감소증 또는 호중구감소증의 효과를 개선하기 위해 적용될 수 있다.

[0642] 본 명세서에 기재된 화합물 또는 표지된 화합물, 및 이를 포함하는 조성물의 효능은 수반되는 특정 질환 또는 장애에 따라 임의의 적합한 시험관내 검정법, 세포-기반 검정법, 생체내 검정법 및/또는 그 자체로 알려진 동물 모델, 또는 이들의 임의의 조합을 사용하여 시험될 수 있다. 적합한 검정법 및 동물 모델은 당업자에게 명백할 것이다. 적합한 동물 모델은 본 발명의 양태로서 실시예 2에 개시되고 인간 FAP를 발현하는 비-인간 동물이다.

[0643] 당업자는 일반적으로 적합한 시험관내 또는 생체내 검정법, 세포 검정법 또는 동물 모델을 선택하여 항체 단편, 바람직하게는 VHH 또는 이의 단편 또는 화합물 또는 표지된 화합물 또는 이를 포함하는 조성물(모두 본 명세서

에 정의됨)을 인간 및/또는 뮤린 FAP에 대한 결합뿐만 아니라, 하나 이상의 암-관련 질환 및 섬유성 장애에 관한 치료 및/또는 예방 효과에 대하여 시험할 수 있을 것이다. 이러한 검정법은 본 명세서에 개시된 바와 같은 영상화 검정법일 수 있다.

[0644] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '유효량'은 원하는 결과 또는 결과들을 달성하는 데 필요한 양을 의미한다.

[0645] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '결정하는', '측정하는', '평가하는', '모니터링하는' 및 '분석하는'은 호환 가능하게 사용되며, 정량적 및 정성적 결정 둘 다를 포함한다.

[0646] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '예방 및/또는 치료'는 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태를 예방 및/또는 치료하는 것, 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태의 발병을 예방하는 것, 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태의 진행을 늦추거나 역전시키는 것, 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태와 연관된 하나 이상의 증상의 발병을 예방하거나 늦추는 것, 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태와 연관된 하나 이상의 증상을 감소 및/또는 완화시키는 것, 특정 질환 및/또는 장애 및/또는 병태의 중증도 및/또는 지속 기간을 감소시키는 것, 그리고 일반적으로 치료될 대상체 또는 환자에게 유익한 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체 단편의 임의의 예방 또는 치료 효과를 포함한다.

[0647] 암/종양/전이 세포

[0648] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '종양 세포'는 원발성 또는 전이성 종양 병변에 존재하는 세포를 지칭한다. 이러한 맥락에서, 종양은 암 세포로 이루어질 뿐만 아니라, 형질전환된 세포와 비-형질전환 세포 사이에 복잡한 양방향 상호작용이 존재하는 장기-유사 구조로서 간주되어야 한다. 형질전환된 세포의 악성 잠재력은 섬유아세포, 지방세포, 혈액 및 림프관으로 이루어질 수 있지만 또한 광범위한 면역 세포에 의해 상당히 침윤될 수 있는 기질로부터 적절한 지지 구조를 필요로 한다. 본 발명의 맥락 내에서, 종양 세포는 또한 섬유아세포, 바람직하게는 CAF일 수 있다.

[0649] "고형 종양(들)" 또는 "종양(들)"은 원발성 종양 및/또는 전이(위치에 관계없음)를 의미한다.

[0650] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '암 세포'는 성장이 제어되지 않으면서 비정상적이고 무한하게 분열하고 번식하며, 떨어져 나가서 신체의 다른 부분으로 이동하고 전이로 지칭되는 또 다른 부위를 설정할 수 있는 세포를 지칭한다.

[0651] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 '병변'은 상해 또는 질환으로 인한 신체 조직 또는 장기의 비정상적인 변화를 지칭할 수 있다. 암 용어에서, 병변은 통상적으로 종양을 지칭한다.

[0652] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 '원발성 종양(들)'은 종양 진행이 시작되고 진행되어 암성 덩어리를 생성하는 해부학적 부위에서 성장하는 종양이다.

[0653] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 '전이성 병변(들)'은 원래 위치에서 신체의 다른 부분으로 퍼진 악성, 또는 암성의 종양을 지칭한다. 호환 가능하게 사용될 수 있는 관련된 의학 용어는 후기 암, 진행성 암, 또는 전이성 질환을 포함한다. 일반적으로, 전이성 병변은 치료가 불가능한 것으로 간주되지만, 암성 세포의 확산을 제어하고 개인의 기대 수명을 잠재적으로 증가시키는 치료가 종종 이용 가능하다.

[0654] 전이는 신체의 원래 부위를 넘어 암이 퍼지는 것에 대한 용어이다. 따라서, 전이성 병변은 원발성 종양의 원래 시작점과 떨어진 위치에서 발견되는 암성 종양이다. 전이성 종양은 원발성 종양 유래의 세포가 떨어져 나와 림프계 및 혈류를 통해 신체의 먼 부분으로 이동할 때 발생한다. 대안적으로, 원래 종양 유래의 세포는 인접한 장기 또는 조직에서 새로운 종양을 뿌릴 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 '전이성 질환'은 말기 암으로 지칭되며, 암의 의학적 분류는 암 세포가 원래 종양 근처의 림프절에서 발견되는 경우 III기인 것으로 지칭되거나, 암 세포가 원발성 종양 부위를 넘어 신체의 먼 부위로 이동한 경우 IV기로 지칭된다. 전이성 병변은 뇌, 폐, 간, 또는 뼈에서 가장 흔하게 발견된다. 전이성 암이 있는 개체는 임의의 증상을 경험할 수 있거나 경험하지 않을 수 있고, 증상은 전이된 세포가 재배치된 영역과 관련될 수 있다. 일단 전이성 병변이 신체에 존재하면, 개체의 암은 대부분의 암 유형에 대해 불치인 것으로 간주될 것이다. 이는 이용 가능한 치료로 기존의 모든 암 세포를 근절시키는 것이 매우 어렵다는 것을 의미한다. 이 경우에, 치료 목표는 종양의 성장을 늦추어 가능한 최고의 삶의 질을 유지하고 잠재적으로 개체의 기대 수명을 연장하는 것이다. 일부 경우에, 전이성 병변이 있는 사람은 증상 관리를 위한 적절한 치료를 받으면 수년 동안 살 수 있다.

[0655] 방사성표지/표지/방사성 핵종/선량

[0656] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "표지된 화합물"에서와 같이 용어 "표지된"은 해당 항체 단편 또는 VHH 또는 이의 단편의 방사성 동위원소 표지화를 지칭하며, 여기서 항체 단편 또는 VHH 또는 이의 단편은 방사성 핵종을 이의 아미노산 서열 구조에 포함시키거나, 커플링시키거나, 화학적으로 연결시킴으로써 표지화된다.

[0657] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 '방사성 핵종', '방사능 핵종', '방사성 동위원소', '방사능 동위원소'는 본 명세서에서 호환 가능하게 사용되며, 핵 내부에 또는 내부 전환을 통해 새로 형성된 방사선 입자로 부여될 이용 가능한 과도한 에너지로 특성화되는 불안정한 핵이 있는 원자를 지칭한다. 이러한 과정 동안, 방사성 핵종은 방사능 붕괴를 겪어 감마선(들), 및/또는 아원자 입자, 예컨대 알파 또는 베타 입자의 방출을 초래한다고 한다. 이러한 방출은 이온화 방사선을 구성한다. 방사성 핵종은 자연적으로 발생하거나 인위적으로 생산될 수 있다.

[0658] IHC 기법

[0659] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 '면역조직화학(IHC)'은 생물학적 조직 절편의 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 원리를 활용함으로써 조직 절편 세포에서 항원(예를 들어, 단백질)을 검출하는 과정을 지칭한다. 면역조직화학적 염색은 비정상적인 세포, 예컨대 암성 종양에서 발견되는 세포의 진단에 광범위하게 사용된다. IHC는 또한 생물학적 조직의 상이한 부분에서 바이오마커 및 차별적으로 발현되는 단백질의 분포 및 위치를 이해하기 위한 기초 연구에서 광범위하게 사용된다.

표 5

[0660] 서열 목록

서열번호	아미노산/핵산	서열의 특성화
1	아미노산	B1의 CDR1
2	아미노산	B1의 CDR2
3	아미노산	B1의 CDR3
4	아미노산	B1
5	아미노산	B2의 CDR1
6	아미노산	B2의 CDR2
7	아미노산	B2의 CDR3
8	아미노산	B2
9	아미노산	B3의 CDR1
10	아미노산	B3의 CDR2
11	아미노산	B3의 CDR3
12	아미노산	B3
13	아미노산	B4의 CDR1
14	아미노산	B4의 CDR2
15	아미노산	B4의 CDR3
16	아미노산	B4
17	아미노산	HA-His6-태그가 있는 B1
18	아미노산	HA-His6-태그가 있는 B2
19	아미노산	HA-His6-태그가 있는 B3
20	아미노산	HA-His6-태그가 있는 B4
21	아미노산	His6-태그가 있는 B1
22	아미노산	His6-태그가 있는 B2
23	아미노산	His6-태그가 있는 B3
24	아미노산	His6-태그가 있는 B4
25	핵산	인간 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP)를 인코딩하는 핵산, 전사 변이체 1
26	아미노산	인간 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP), 전사 변이체 1
27	핵산	표적화 벡터
28	아미노산	인간 FAP 재조합 단백질
29	아미노산	뮤린 FAP 재조합 단백질
30	아미노산	뮤린 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP)
31	아미노산	인간 시스타틴-S 신호 펩타이드

32	아미노산	비표적화 대조군 VHH R3B23
33	핵산	B1을 인코딩하는 핵산
34	핵산	B2를 인코딩하는 핵산
35	핵산	B3을 인코딩하는 핵산
36	핵산	B4를 인코딩하는 핵산
37	아미노산	B1의 FR1
38	아미노산	B1의 FR2
39	아미노산	B1의 FR3
40	아미노산	B1의 FR4
41	아미노산	B2의 FR1
42	아미노산	B2의 FR2
43	아미노산	B2의 FR3
44	아미노산	B2의 FR4
45	아미노산	B3의 FR1
46	아미노산	B3의 FR2
47	아미노산	B3의 FR3
48	아미노산	B3이 FR4
49	아미노산	B4의 FR1
50	아미노산	B4의 FR2
51	아미노산	B4의 FR3
52	아미노산	B4의 FR4
53	아미노산	예시적인 HA 태그
54	아미노산	예시적인 HA 태그
55	아미노산	예시적인 시스테인 태그

[0661] 본 명세서에 인용된 모든 문서는 본 명세서에 전문에 참조로 포함된다. 달리 정의되지 않는 한, 기술 및 과학 용어를 비롯하여 본 발명을 개시하는 데 사용된 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 같은 의미를 가진다. 추가 지침에 의해, 용어 정의는 본 발명의 교시내용을 더 잘 이해하기 위해 포함된다. 본 명세서에 기재된 각각의 구현예는 달리 표시되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 임의의 다른 구현예와 함께 조합될 수 있다.

[0662] 본 발명은 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되는 하기 실시예에 의해 추가로 기재된다.

[0663] **실시예**

[0664] 실시예 1: VHH B1, B2, B3 및 B4, 및 이의 변이체의 생산

[0665] VHH B1, B2, B3 및 B4(서열번호 17 내지 20)의 헤마글루티닌- 및 헥사히스티딘-태그(HA-His_6-태그) 변이체를 VHH 파지미드 벡터로 형질도입된 이. 콜라이 WK6 세포에서 생산하고, 문헌[Vincke, C., et al. (2012). Methods in Molecular Biology 907: 145-176]의 프로토콜과 같은 표준 프로토콜에 따라 동결-해동 또는 삼투 충격 방법에 의해 주변세포질로부터 추출하였다. 요컨대, 박테리아를 TB(Terrific Broth) 배지에서 성장시키고 지수 성장 단계에서 VHH 발현을 유도하였다. 밤새 성장하는 동안 VHH를 주변 세포질로 이동시키고, 이로부터 동결-해동 사이클에 의해 VHH를 추출하였다. 대안적으로, 삼투 충격에 의해 주변세포질로부터 VHH를 수집하고, HIS-선택 현탁액(Sigma-Aldrich)과 함께 배치 인큐베이션 및 0.5 M 이미다졸을 이용한 단계적 용리에 의해 고정화-금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)를 통해 80% 초과의 순도로 정제하였다. PBS에서 평형화된 Zeba Spin 탈염 컬럼(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 겔-여과 크로마토그래피를 통해 용출액을 탈염시켰다.

[0666] VHH B1, B2, B3 및 B4(서열번호 21 내지 24)의 헥사히스티딘-태그(His_6-태그) 변이체를 VHH 재조합 발현 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 WK6 세포에서 생산하고, 문헌[Vincke, C., et al. (2012). Methods in Molecular Biology 907: 145-176]의 프로토콜과 같은 표준 프로토콜에 따라 IMAC 및 크기-배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 주변세포질로부터 정제하였다. 요컨대, 박테리아를 TB(Terrific Broth) 배지에서 성장시키고 지수 성장 단계에서 VHH 발현을 유도하였다. 밤새 성장하는 동안 VHH를 주변 세포질로 이동시키고, 이로부터 삼투 충격 후 VHH를 수집하였다. HIS-선택 현탁액(Sigma-Aldrich)과 함께 배치 인큐베이션에 이어 0.5 M 이미다졸을 이용한 단계적 용리에 의해 IMAC를 통해 주변세포질 추출물로부터 VHH를 정제하였다. PBS에서 평형화된, HiLoad 16/600 Superdex 75 PG 컬럼(GE Healthcare) 또는 Superquilibdex 75 10/300 GL(GE Healthcare) 상에서 후속

SEC를 수행하였다.

[0667] VHH B1(서열번호 4)의 비태그 변이체를 문헌[Baldi, et al. (2005) Biotechnol Prog. 21(1):148-53]의 프로토콜과 같은 표준 프로토콜에 따라 내독소가 없는 플라스미드 DNA로 일시적으로 형질감염된 HEK-293 세포에서 생산하였다. 형질감염 6일 후, VHH를 포함하는 조정 배지(conditioned medium)를 원심분리에 의해 수확하였다. 20 mM NaAc, pH 4.0에서 평형화된 Capto SP ImpRes 컬럼(GE Healthcare)을 사용하고 염 구배를 이용하는 양이온-교환 크로마토그래피를 통해 수확된 배지로부터 VHH를 정제하였다. 용출액 분획을 1 M Tris-HCl(pH 8.0)을 이용하여 pH 7.0으로 중화시켰다. PBS에서 평형화된, Superdex 75 26/600 컬럼(GE Healthcare) 상에서 후속 SEC를 수행하였다.

표 6

VHH B1, B2, B3 및 B4의 변이체.

클론	변이체	서열번호	
B1	HA-His6-태그	17	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRLSSSNSMA WYRQVPGKRRELVAGITGGGETNYADFVGGRFTISR DNAKNGLYLQLNGLKPEDTAAYYCNFWPPLINYWG QGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH
B1	His6-태그	21	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRLSSSNSMA WYRQVPGKRRELVAGITGGGETNYADFVGGRFTISR DNAKNGLYLQLNGLKPEDTAAYYCNFWPPLINYWG QGTQVTVSSHHHHHH
B1	비태그	4	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRLSSSNSMA WYRQVPGKRRELVAGITGGGETNYADFVGGRFTISR DNAKNGLYLQLNGLKPEDTAAYYCNFWPPLINYWG QGTQVTVSS
B2	HA-His6-태그	18	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSISSANSMG WYRQAPGKQRDVVAGLTTGGRSHYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNLWPPVQGYW GQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH
B2	His6-태그	22	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSISSANSMG WYRQAPGKQRDVVAGLTTGGRSHYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKAEDTAVYYCNLWPPVQGYW GQGTQVTVSSHHHHHH
B3	HA-His6-태그	19	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRLFSTNAMG WYRQAPGKQRELVAGITGGDRSNYADSVKGRFTIS RDNGKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNFYPPIVGDYW GQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH
B3	His6-태그	23	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRLFSTNAMG WYRQAPGKQRELVAGITGGDRSNYADSVKGRFTIS RDNGKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNFYPPIVGDYW GQGTQVTVSSHHHHHH
B4	HA-His6-태그	20	QVQLQESGGGLVQVGGSLRLSCVASGFTFSSYYMS WVRQAPGKGLEWVASIYADGDMTYYADSVRGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPLPPYHV NQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSHHHHHH
B4	His6-태그	24	DVQLVESGGGLVQVGGSLRLSCVASGFTFSSYYMS WVRQAPGKGLEWVASIYADGDMTYYADSVRGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPLPPYHV NQGTQVTVSSHHHHHH

[0668]

[0669] 실시예 2: 녹인 마우스

[0670] 인간 FAP 녹인(KI) 마우스를 C57BL/6 마우스에서 염색체 2에 있는 뮤린 FAP 유전자(유전자 ID: 14089, NCBI 수탁 번호 NM_007986.3)의 엑손 1의 개시 코돈 다음에 인간 FAP cDNA(NM_004460.5로부터 유래됨; 서열번호 25,

서열번호 26을 코딩함)의 상동 재조합을 통한 도입에 의해 생성하였다. 이는 정상적인 뮤린 FAP 유전자의 기능적 발현을 방해하고, 대신에 뮤린 FAP 프로모터 하에서 인간 FAP의 발현을 유도한다.

[0671] KI 마우스에서, 엑손 1의 ATG 개시 코돈에서 뮤린 FAP의 인트론 2의 부분까지의 영역을 "인간 FAP CDS-폴리A" 카세트로 대체한다.

[0672] 표적화 벡터의 상이한 요소가 도 1에 개략적으로 도시되어 있다. "인간 FAP CDS-폴리A" 카세트는 "5'아암(arm)"에서 "3'아암"까지 뻗어 있다. 표적화 벡터의 17086 bp 서열은 서열번호 27이다.

[0673] "인간 FAP CDS-폴리A" 카세트는 다음 관련 요소를 포함한다:

[0674] 1. 뮤린 FAP 5' 비번역 영역 및 엑손 1의 일부(개시 코돈까지)를 포함하는 제1 상동성 아암(도 1의 "5'아암")은 뉴클레오타이드 1704 내지 3821이다. 주형으로서 C57BL/6 BAC 라이브러리의 BAC 클론 RP23-161B24 또는 RP24-308I10을 사용하여 PCR에 의해 상동성 아암을 생성한다.

[0675] 2. 뮤린 FAP 엑손 1은 뉴클레오타이드 3652에서 시작한다

[0676] 3. 뮤린 FAP 개시 코돈은 뉴클레오타이드 3822 내지 3824이다

[0677] 4. 도 1에서 "인간 FAP CDS로 표시된, 인간 FAP 코딩 서열(NCBI 참조 서열 NM_004460.5로부터 유래됨; 서열번호 25)은 뉴클레오타이드 3822 내지 6104이다

[0678] 5. 토끼 베타-글로빈 폴리아데닐화 서열(도 1의 "rBGpA")은 뉴클레오타이드 6105 내지 6626이다

[0679] 6. ES 세포의 양성 선택에 사용되는, 네오마이신-내성 유전자(도 1의 "Neo 카세트")는 rBGpA 신호 서열과 제2 상동성 아암 사이에 있으며 2개의 LoxP 부위(도 1의 "loxP(r)", 뉴클레오타이드 6640 내지 6673 및 10406 내지 10439)가 측접되어 있다

[0680] 7. 뮤린 FAP 인트론 2의 일부를 포함하는 제2 상동성 아암(도 1의 "3'아암")은 뉴클레오타이드 10506 내지 14426이다. 주형으로서 C57BL/6 BAC 라이브러리의 BAC 클론 RP23-161B24 또는 RP24-308I10을 사용하여 PCR에 의해 상동성 아암을 생성한다.

[0681] 표적화 벡터는 추가적으로 다음을 포함한다:

[0682] 1. 상동 재조합을 거치지 않은 ES 세포의 음성 선택에 사용되고, 제1 상동성 아암의 상류에 위치하는 디프테리아 독소 A 유전자(도 1의 "DTA 카세트")

[0683] 2. 이. 콜라이에서 표적화 벡터의 양성 선택에 사용되는 암피실린-내성 유전자(도 1의 "Amp")

[0684] RFLP 분석 및 서열결정에 의해 표적화 벡터를 검증한다. NotI DNA 제한 효소를 이용하여 표적화 벡터를 선형화하고, C57BL/6N 배아 줄기(ES) 세포에서 전기천공한다. 네오마이신에 대한 양성 선택 후 개별 클론을 선택하였다. 핵형(karyotype) 분석, 긴 범위의 게놈 PCR(long-range genomic PCR) 및 서던 블롯 분석에 의해 선택된 ES 클론의 유전자형을 검증한다.

[0685] 선택된 ES 세포 클론을 C57BL/6 알비노 배반포에 미세주입한 다음, CD-1 유사 임신 암컷에 재이식하였다. 수컷 F0 창시자 마우스를 이의 외피 색상 및 게놈 PCR에 의해 식별하였다. F0 창시자 마우스를 C57BL/6 암컷과 교배하였다. 생식세포계열 유전시, 네오마이신 카세트는 게놈으로부터 자가 결실된다. 게놈 PCR 분석에 의해 F1 자손의 유전자형을 결정하였다. 3가지 상이한 ES 클론으로부터 F1 이형접합 KI 마우스를 생성하고 이종교배하였다. 이형접합 KI 마우스를 예상되는 자손의 멘델 유전 비율로 사육하였으며, 이는 인간 FAP 녹인 작제물의 충분성과 독성 결여를 나타낸다. 이형접합 및 동형접합 유전자형 둘 다는 어떠한 가시적 이상 없이 적어도 1년 동안 생존 가능하였다.

[0686] 발표된 전임상 데이터로부터 뮤린 FAP가 여러 장기 및 조직, 예컨대 혈액, 림프절, 뼈, 자궁, 췌장, 피부 및 근육에 존재하는 것으로 나타났다(Puré et al 2018, Oncogene Aug;37(32):4343-4357; Keane et al 2014, FEBS Open Bio 4, 43-54). 몇몇 보고서에서는 이러한 상승된 흡수의 적어도 일부를 뮤린 FAP(인간 FAP가 아님)가 혈류로 활발히 배출되는 것과 관련이 있다(Keane et al 2014, FEBS Open Bio 4, 43-54). 인간 FAP 녹인 마우스를 사용한 실시예 5(실시예 5a)에 기재된 결과는 인간/뮤린 교차 반응성 FAP-표적화 VHH B1이 정맥내로 투여될 때 이러한 상승된 흡수가 부재함을 나타내며, 이는 인간 FAP가 그 정도까지 배출되지 않음을 나타낸다. 이는 본 명세서에 기재된 인간 FAP 녹인 마우스가 인간 상황을 정확하게 나타냄을 의미한다.

[0687] 실시예 5(실시예 5b)에 기재된 추가적인 결과는 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 VHH B1이 야생형 C57BL/6 마우스에서의 상처 치유에 있어 뮤린 FAP 발현 섬유아세포 및 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스에서 인간 FAP 발현 섬유아세포에 특이적으로 결합하지만, 뮤린 FAP-표적화 VHH B4는 야생형 마우스에서의 상처 치유에 있어 뮤린 FAP 발현 섬유아세포만 표적화할 수 있고 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스에서는 그렇지 않음을 나타낸다. 이러한 관찰로 실시예 5에서 사용된 인간 FAP 녹인 동물 모델의 실제 검증이 이루어진다.

[0688] 실시예 3: 표지된 화합물의 합성

[0689] 테크네튬-99m(^{99m}Tc)은 140 keV의 광자 에너지로 검출 가능한 감마선을 방출하기 때문에 진단 목적으로 His_6-태그 VHH를 테크네튬-99m(^{99m}Tc)으로 방사성표지하였다. 요컨대, 앞서 문헌[Xavier et al. Methods Mol Biol. 2012;911:485-90]에 기재된 바와 같이 His_6-태그에서 VHH를 [$^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3$]로 표지한다. [$^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3$]를 1 mg/ml VHH 용액에 첨가하고 37 내지 50℃에서 90분 동안 인큐베이션한다. 표지화 후, PBS로 사전 평형화된 일회용 크기-배제 컬럼에서 ^{99m}Tc-VHH 용액을 정제하여 미결합 [$^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3$]를 제거하고 추가 사용 전에 0.22 μm 필터를 통과시켰다. 즉각적인 박층 크로마토그래피에 의해 품질 관리(QC)를 수행하였다.

[0690] 하기 실시예에서, FAP-표적화 His_6-태그 VHH B1, B2, B3 및 B4(서열번호 21 내지 24)를 진단용 방사성 동위원소 ^{99m}Tc로 방사성표지하고, 후속적으로 진단적 적용을 위해 시험관내 및 생체내에서 특성화하였다.

[0691] 테라노스틱 목적을 위해 VHH를 ^{131}I로 방사성표지하였으며, 이는 동일하게 방사성표지된 VHH가 진단 및 치료 목적 둘 다에 사용될 수 있음을 의미한다. 이는 진단(예를 들어, 감마 방사선) 및 치료(예를 들어, 베타-방사선) 목적에 사용될 수 있는 다양한 유형의 방사선을 방출하는 방사성 동위원소를 적용함으로써 달성될 수 있다. 한 가지 이러한 방사성 동위원소는 요오드-131(^{131}I)이며, 이는 364 keV의 감마선과 최대 에너지가 606 keV인 베타-마이너스 입자 둘 다를 방출한다. 요컨대, 문헌[D'Huyvetter M et al. Clin Cancer Res. 2017 Nov 1;23(21):6616-6628]에서 조정된 절차에 따라 [^{131}I]SGMIB를 합성 및 정제하였다. 나트륨 [^{131}I] 요오다이드를 RT에서 20분 동안 아세토니트릴 중 트리메틸스타닐 전구체와 반응시킨 후, 트리플루오로아세트산을 첨가하여 비스Boc-[^{131}I]SGMIB를 탈보호화하고, 후속적으로 역상 HPLC를 사용하여 정제하였다. 정제된 [^{131}I]SGMIB를 RT에서 20분 동안 0.1 M 보레이트 완충액(pH 8.5) 중 150 μg VHH와 함께 인큐베이션하고, 이를 친핵성 치환을 통해 라이신 측쇄 아민 반응성 기에 접합시킨 후, PBS로 사전 평형화된 일회용 크기 배제 컬럼을 사용하여 [^{131}I]SGMIB-VHH를 정제하여 미반응 [^{131}I]SGMIB를 제거하고 추가 사용 전에 0.22 μm 필터를 통과시켰다. 즉각적인 박층 크로마토그래피에 의해 품질 관리(QC)를 수행하였다.

[0692] 하기 기재된 실시예에서, 다음의 FAP-표적화 VHH를 테라노스틱 방사성 동위원소인 ^{131}I로 방사성표지하고, 후속적으로 테라노스틱 적용을 위해 시험관내 및 생체내에서 특성화하였다: His6-태그 VHH B1, B2, B3 및 B4(서열번호 21 내지 24) 및 태그되지 않은 VHH B1(서열번호 4).

[0693] 진단 목적을 위해 VHH를 또한 ^{111}In으로 방사성표지한다. 인듐-111은 약 172 및 246 keV의 감마선을 방출한다. 요컨대, 이작용성 킬레이터 *p*-SCN-Bn-DOTA를 0.05 M 탄산나트륨 완충액(pH 8.5) 중 VHH의 라이신 측쇄 아민 반응성 기에 접합하였다. 크기 배제 정제 후, 생성된 VHH-DOTA를 0.1 M 암모늄 아세테이트 완충액(pH 7.0)에서 재구성하였다. 필요한 양의 ^{111}In을 금속이 없는 0.1 M 암모늄 아세테이트 완충액(pH 5.0)을 포함하는 시험용 바이알에 첨가하였다. 그 다음, 25 내지 100 μg의 VHH-DOTA를 첨가하고 55℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 크기 배제 컬럼 정제를 통해 ^{111}In-DOTA-VHH를 정제하고, 추가 사용 전에 0.22 μm 필터를 통과시켰다. 즉각적인 박층 크로마토그래피에 의해 품질 관리(QC)를 수행하였다. 하기 실시예에서, FAP-표적화 비태그 VHH B1(서열번호 4)을 진단용 방사성 동위원소 ^{111}In으로 방사성표지하고, 후속적으로 진단적 적용을 위해 시험관내 및 생체내에서 특성화하였다.

[0694] 테라노스틱 목적을 위해 VHH를 또한 ^{177}Lu로 방사성표지한다(D'Huyvetter et al. (2012) Contrast Media Mol Imaging 7(2):254-264). 루테튬-177은 약 113 및 210 keV의 감마선과 최대 에너지가 497 keV인 베타-마이너스

입자 둘 다를 방출한다. 요컨대, 이작용성 킬레이터 *p*-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA를 0.05 M 탄산나트륨 완충액(pH 8.5) 중 VHH의 라이신 측쇄 아민 반응성 기에 접합하였다. 크기 배제 정제 후, 생성된 VHH-DTPA를 0.1 M 암모늄 아세테이트 완충액(pH 7.0)에서 재구성하였다. 필요한 양의 ^{177}Lu을 금속이 없는 0.1 M 암모늄 아세테이트 완충액(pH 5.0)을 포함하는 시험용 바이알에 첨가하였다. 그 다음, 25 내지 100 μg의 VHH-DTPA를 첨가하고 55℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 크기 배제 컬럼 정제를 통해 ^{177}Lu-DTPA-VHH를 정제하고, 추가 사용 전에 0.22 μm 필터를 통과시켰다. 즉각적인 박층 크로마토그래피에 의해 품질 관리(QC)를 수행하였다.

[0695] 하기 실시예에서, FAP-표적화 비태그 VHH B1(서열번호 4)을 테라노스틱용 방사성 동위원소 ^{177}Lu로 방사성표지하고, 후속적으로 테라노스틱 적용을 위해 시험관내에서 특성화하였다.

[0696] 마지막으로, 치료 목적을 위해 VHH를 또한 ^{225}Ac로 방사성표지한다 (Pruszynski et al. (2018) Mol Pharm 15(4):1457-1466). 악티늄-225는 5.8 MeV의 알파 입자를 방출한다. 요컨대, 이작용성 킬레이터 *p*-SCN-Bn-DOTA를 0.05 M 탄산나트륨 완충액(pH 8.5) 중 VHH의 라이신 측쇄 아민 반응성 기에 접합하였다. 크기 배제 정제 후, 생성된 VHH-DOTA를 0.1 M 암모늄 아세테이트 완충액(pH 7.0)에서 재구성하였다. ^{225}Ac의 원하는 활성을 0.8 M 암모늄 아세테이트(pH 5.0)를 포함하는 시험용 바이알에 첨가한 후, VHH-DOTA(25 내지 100 μg)와 함께 55℃에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 RT까지 냉각시키고 50 mM DTPA(0.8 M 암모늄 아세테이트 중) 및 Chelex 100으로 퀀칭하여 임의의 자유 ^{225}Ac를 복합체화하였다. 크기 배제 컬럼 정제를 통해 ^{225}Ac-DOTA-VHH를 정제하고, 추가 사용 전에 0.22 μm 필터를 통과시켰다. 즉각적인 박층 크로마토그래피에 의해 품질 관리(QC)를 수행하였다.

[0697] 하기 실시예에서, FAP-표적화 비태그 VHH B1(서열번호 4)을 치료용 방사성 동위원소 ^{225}Ac로 방사성표지하고, 후속적으로 치료적 적용을 위해 시험관내에서 특성화하였다.

[0698] 실시예 4: VHH 또는 VHH를 포함하는 표지된 화합물의 결합 활성

[0699] 실시예 4a: 재조합 단백질 생산

[0700] VHH 결합 활성 시험을 위해, 인간 및 뮤린 FAP 재조합 단백질을 문헌[Baldi, et al. (2005) Biotechnol Prog. 21(1):148-53]의 프로토콜과 같은 표준 프로토콜에 따라 내독소가 없는 플라스미드 DNA로 일시적으로 형질감염된 HEK-293 세포에서 생산하였다. 인간 FAP의 세포외 도메인(아미노산 L26 내지 D760, Uniprot 등록 Q12884, NCBI 참조 서열 NP_004451.2) 및 뮤린 FAP의 세포외 도메인(아미노산 L26 내지 D761, Uniprot 등록 P97321, NCBI 참조 서열 NP_032012.1)을, 배지에서의 분비를 위해 인간 시스타틴-S 신호 펩타이드(서열번호 31)를 사용하여, N-말단 His_6-태그(각각 서열번호 28 내지 29)를 붙여 생산하였다. 분비 시, 신호 펩타이드는 재조합 FAP 단백질로부터 단백질분해로 제거된다. 형질감염 6일 후, 재조합 단백질을 포함하는 조정 배지를 원심분리에 의해 수확하였다. Ni Sepharose Excel 친화성 배지(Sigma-Aldrich)와의 배치 인큐베이션에 의해 IMAC를 통해 수확된 배지로부터 FAP 재조합 단백질을 정제하였다. 25 mM Tris, 500 mM NaCl(pH 8.2) 및 25 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM 이미다졸(pH 8.2)로 세척한 후, 25 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM 이미다졸(pH 8.2)로 단백질을 용리하였다. PBS에서 평형화된, Superdex 200 16/600 컬럼(GE Healthcare) 상에서 후속 SEC를 수행하였다.

[0701] 재조합 FAP 단백질은 용액에서 동종이량체를 형성하였는데, 이는 실시예 4d에서 측정된 바와 같이, 이것이 효소 활성에 대한 전제 조건이기 때문이다 (Aertgeerts K et al. (2005) J Biol Chem 280(20):19441-4).

[0702] 실시예 4b: ELISA: 특이적 결합: 인간/뮤린 FAP, DPP IV

[0703] 실시예의 이 파트는 ELISA에서 시험될 때 인간 및/또는 뮤린 FAP의 세포외 도메인(각각 NCBI 참조 서열 NP_004451.2 및 NP_032012.1)에 대한 VHH B1, B2, B3 및 B4의 특이적 결합 및 인간 DPP IV의 세포외 도메인(NCBI 참조 서열 NP_001926.2)에 대한 결합의 부재를 설명한다. DPPIV 및 FAP 둘 다는 디펩티딜 펩티다제의 패밀리에 속하지만, DPP IV는 FAP의 가장 가까운 상동체이며, 아미노산 서열에서 약 50% 상동성을 공유한다 (Juillerat-Jeanneret L et al. (2017). Expert Opin Ther Targets 21(10):977-991).

[0704] 측정 전 날, 100 mM $NaHCO_3$(pH 8.2) 중 1 μg/mL의 농도로 0.1 μg의 재조합 단백질로 96-웰 ELISA 플레이트(Nunc MaxiSorp)를 코팅하였다. VHH 클론당 또한 블랭크 코팅된 웰도 예견하였다(완충액 단독). 웰을 단백질이 없는 T20(PBS) 차단 완충액(Pierce)으로 오버코팅하였다. PBS(pH 7.4), 0.05% Tween으로 세척한 후, VHH-포함 박테리아 동결-해동 추출물을 모든 웰에 첨가하였다. 1차 Ab로서 마우스 항-HA.11 에피토프 태그(클론 16B12,

Biolegend)를 사용하고 2차 Ab로서 염소 항-마우스 IgG(전체 분자) 알칼리 포스파타제 접합체(Sigma-Aldrich)를 사용함으로써 HA-His_6-태그 VHH의 결합을 검출하였으며, 이 사이에 PBS(pH 7.4), 0.05% Tween으로 철저히 세척하였다. AP 블롯 완충액(100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris, pH 9.5) 중 포스파타제 기질(Sigma-Aldrich)을 사용하여 신호를 전개시켰다. 흡광도 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 결정하였다. 클론마다 항원-코팅 웰 대 항원이 없는 웰에서의 흡광도 사이의 비율을 결정하였다.

[0705] 도 2에 나타낸 바와 같이, VHH B1, B2 및 B3(서열번호 17 내지 19)은 인간 FAP 재조합 단백질(서열번호 28)로 코팅된 웰에 대해 25 초과의 신호 대 배경 비율을 나타내어, 인간 FAP에 대한 특이적 결합을 확인하였다. VHH B1 및 B2는 또한 뮤린 FAP 재조합 단백질(서열번호 29)에 특이적으로 결합할 수 있지만, VHH B3의 경우에는 그렇지 않음을 나타내었다. 결론적으로, VHH B4(서열번호 20)는 뮤린 FAP 재조합 단백질로 코팅된 웰에 대해 30 초과의 신호 대 배경 비율을 나타내어, 뮤린 FAP에 대해 특이적으로 결합하지만 인간 FAP에는 결합하지 않음을 확인하였다. 이들 실험은 VHH B1 및 B2가 뮤린/인간 FAP-교차 반응성이고, VHH B3이 인간 FAP-특이적이며, VHH B4가 뮤린 FAP-특이적임을 입증한다.

[0706] 모든 인간 FAP-결합 VHH는 신호 대 배경 비율이 약 1로 인간 DPPIV(Sino Biological)에 대한 결합의 부재를 나타내었다.

[0707] 실시예 4c: 유세포 분석: GM05389 및 HEK-뮤린 FAP

[0708] 실시예의 이 파트는 인간 FAP-발현 섬유아세포 세포주 GM05389(코리엘 의학 연구소(Coriell Institute for Medical Research)의 NIGMS 인간 유전자 세포 저장소(Human Genetic Cell Repository)에서 입수함) 및 뮤린 FAP 형질감염 세포주 HEK293(폭스 체이스 암 센터(Fox Chase Cancer Center; 미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재)의 Jonathan D. Cheng으로부터 입수함; 문헌[Cheng, J. D., et al. (2002) Cancer Research 62(16): 4767-4772]에 기재됨)에서 자연적으로 발현된 수용체를 표적화하는 VHH의 능력을 설명한다.

[0709] 세포 결합을 유세포 분석 실험으로 시험하였다. 시험 조건에 따라 PBS, 0.5% BSA에서 세척한 1 × 10^5 내지 2 × 10^5개 세포를 96-웰 U-바닥 플레이트의 웰에서 펠렛화하였다. 세포 펠렛을 재현탁하고 VHH-함유 박테리아 동결-해동 추출물(PBS, 0.5% BSA에 희석함)과 함께 인큐베이션하였다. 1차 검출 항체로서 마우스 항-HA.11 에피토프 태그(클론 16B12, Biolegend)를 사용하고 2차 검출 항체로서 PE-접합 래트 항-마우스 IgG1(클론 A85-1, BD Pharmingen)을 사용함으로써 HA-His_6-태그 VHH의 결합을 검출하였으며, 이 사이에 PBS, 0.05% BSA로 세척하고, 최종적으로 PBS, 0.5% BSA에 재현탁하였다.

[0710] FACS Canto II(BD Biosciences)에서 유세포 분석을 수행하였다. FlowJo 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다. 전방 산란-측방 산란 플롯을 기반으로 하여, 단일 세포 게이트를 그렸다. 단일 세포의 피코에리트린 신호에 대한 히스토그램에서 중앙 형광 강도를 결정하였다. 중앙 형광 강도의 차이(Δmfi)를 VHH의 인큐베이션이 없는 시험 조건(세포 + 1차 Ab + 2차 Ab)에 대하여 계산하였으며, 이는 도 3에 나타나 있다.

[0711] 재조합 단백질을 사용한 실시예 4b의 ELISA 결과에 따르면, VHH B1, B2 및 B3(서열번호 17 내지 19)은 인간 FAP-발현 세포주 GM05389에 결합할 수 있는 한편, VHH B1, B2 및 B4(서열번호 20)는 뮤린 FAP 형질감염 세포주 HEK293에 결합할 수 있었다.

[0712] 실시예 4d: 효소 활성

[0713] 실시예의 이 파트는 VHH 결합 시 인간 FAP 디펩티딜 펩티다제 효소 활성에 대한 비-억제 효과를 설명한다.

[0714] 형광 기질인 벤질옥시카르보닐-Gly-Pro-7-아미도-4-메틸쿠마린(Z-Gly-Pro-AMC; Bachem)을 사용하여 인간 FAP 효소 활성을 측정하였다.

[0715] 인간 FAP 재조합 단백질(서열번호 28)을 1 μM HA-His_6-태그 VHH의 부재 또는 존재 하에 검정색 96-웰의 평평한 바닥 플레이트에서 검정 완충액(50 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.1% BSA, pH 7.5) 중 200 ng/ml로 희석하였다. 억제제 대조군인 1 μM 탈라보스탓 메실레이트(ApexBio)를 VHH 대신에 첨가하였다. 결합 평형에 도달하기 위해 1시간 인큐베이션한 후, Z-Gly-Pro-AMC 기질을 최종 농도 50 μM로 첨가하였다. 기질의 Z-Gly-Pro 및 7-아미노-4-메틸쿠마린(AMC)으로의 효소 전환은 형광 마이크로플레이트 판독기(BioTek)를 사용하여 380 nm에서의 여기 및 460 nm에서의 방출 검출에 의해 관찰되었다. 형광을 1시간 동안 매 분마다 측정하였다. 도 4에 도시된 곡선 기

울기는 효소 활성의 속도에 해당한다.

[0716] 인간 FAP 결합 VHH B1, B2 및 B3(서열번호 17 내지 19)은 Z-Gly-Pro-AMC를 Z-Gly-Pro 및 AMC로 전환시키는 인간 FAP 디펩티딜 펩티다제 효소 활성에 대해 효과를 나타내지 않았다. VHH의 존재 하에 효소 활성의 비율은 VHH가 없는 조건(양성 대조군)과 일치하는 한편, 탈라보스탓 메실레이트(억제제 대조군)와의 공동 인큐베이션은 기질 가수분해 비율의 감소를 나타내어 더 낮은 형광 수준을 초래하였다.

[0717] 실시예 4e: 항원 결합 동역학

[0718] 실시예의 이 파트는 항원 결합 동역학의 결정을 설명한다.

[0719] 이 정도로, 인간 및 뮤린 FAP 재조합 단백질(서열번호 29 내지 29)을 5× 몰 과량의 설포-NHS-SS-비오틴(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 PBS 완충액에서 비오틴화하였다. PBS에서 평형화된 Zebaspin 탈염 컬럼(hermo Fisher Scientific)을 사용하여 과량의 비오틴을 제거하였다.

[0720] 정제된 VHH에 의한 항원 결합의 동역학적 매개변수를 Octet RED96 기기(ForteBio)를 이용하여 생물층 간섭계를 통해 결정하였다. 1000 rpm에서 진탕하면서 25℃에서 검정을 수행하였다. 스트렙타비딘으로 코팅된 SA 센서를 검정 완충액(0.5% BSA, 0.1% Tween이 보충된 HBS)에서 평형화시킨 후, 5 μg/ml 농도의 비오틴화 FAP 재조합 단백질로 5분 동안 로딩하였다. 검정 완충액 중 30 nM에서 0.4 nM까지의 3배 연속 희석액에서 His_6-태그 VHH를 분석하였다(1000 nM에서 1.6 nM까지의 5배 연속 희석액을 이용한 VHH B3 결합 뮤린 FAP 재조합 단백질은 예외). 먼저 기준선을 검정 완충액에서 180초 동안 측정한 후, 농도 증가 순서로 VHH 제제와 함께 180초의 5개의 후속 회합 단계, 사이에 검정 완충액에서 75초의 중간 해리 단계, 그리고 검정 완충액에서 30분의 최종 해리 단계로 측정하였다. 모든 검정에서, 회합 단계 동안 검정 완충액에서 인큐베이션된, FAP 재조합 단백질과 함께 로딩된 참조 센서를 포함하였다.

[0721] BIAevaluation 분석 소프트웨어(GE Healthcare)를 사용하여 결합 곡선을 내보내고 분석하였다. 먼저 상이한 곡선의 y-축을 기준선 측정의 마지막 5초의 중앙값에 정렬하였다. 이후, 다른 모든 센서그램에서 참조 센서의 센서그램을 차감하였다. '드리프트에 의한 동역학 적정' 결합 모델을 이용한 일반적인 피트를 사용하여 생성된 결합 곡선을 피팅하였으며(1:1 (항원;분석물) 모델; Karlsson, R. et al (2006), Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. Analytical Biochemistry 349: 136-147), 이때 Rmax는 전체로, RI는 국소로 피팅되고, 드리프트는 0으로 설정하였다.

[0722] 표 7은 센서 상에 로딩된 비오틴화 인간 또는 뮤린 FAP 재조합 단백질을 이용한 생물층 간섭계에 의해 결정될 때 His_6-태그 VHH B1, B2, B3 및 B4(서열번호 21 내지 24)에 대한 항원 결합의 동역학 매개변수의 개요를 제공한다.

[0723] VHH B1, B2 및 B3은 1 nM보다 더 작은 평형 해리 상수(K_D)로 인간 FAP에 결합하기 위한 적어도 나노몰 이하의 친화도를 나타내었다. 구체적으로, 가장 우수한 결합 특성은 VHH B1에 대해 관찰되었으며, 이때 K_D 값은 50 pM 미만이고, 해리 반응 속도 상수(k_d)는 5 10^{-5} s^{-1} 미만이었다.

[0724] VHH B1 및 B4는 뮤린 FAP에 1 nM 미만의 K_D 값으로 결합할 수 있었다. VHH B2는 뮤린 FAP에 대해 24 nM의 중간 친화도(K_D)를 가졌다.

표 7

[0725] 정제된 His_6-태그 VHH B1, B2, B3 및 B4의 동역학 결합 매개변수 k_a, k_d 및 K_D.

	$k_a(M^{-1}\ s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(M)$
인간 FAP			
B1	7.0 E+05	2.7 E-05	37.8 E-12
B2	4.2 E+05	3.1 E-05	74.4 E-12
B3	3.4 E+05	5.4 E-05	160.0 E-12
B4	결정되지 않음		
뮤린 FAP			
B1	1.9 E+06	1.4 E-03	742.0 E-12
B2	3.4 E+05	8.2 E-03	24.3 E-9

B3	결합하지 않음		
B4	1.1 E+06	5.6 E-04	512.0 E-12

[0726] 실시예 4f. FAP에 대한 방사성표지된 VHH의 시험관내 및 생체내 결합 활성

[0727] 다음으로, 본 발명자들은 진단용 방사성 동위원소인 ^{99m}Tc로 방사성표지한 후 상이한 VHH의 시험관내 및 생체내 인간 및 뮤린 FAP 결합 잠재력을 설명한다. 인간 FAP-발현 HEK-293 및 GM05389 세포뿐만 아니라, 뮤린 FAP-발현 HEK-293 세포에 대해 상이한 ^{99m}Tc-표지 VHH의 EC50 값을 결정하였다(GM05389는 코리엘 의학 연구소의 NIGMS 인간 유전자 세포 저장소에서 입수하고; FAP 형질감염 HEK-293 세포주는 폭스 체이스 암 센터(미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재)의 Jonathan D. Cheng으로부터 입수함; 문헌[Cheng, J. D., et al. (2002) Cancer Research 62(16): 4767-4772]에 기재됨). 실시예 3에 기재된 방사화학 절차에 따라, His_6-태그 인간/뮤린 FAP-표적화 VHH를 진단용 방사성 동위원소인 ^{99m}Tc로 방사성표지하였다.

[0728] 다음으로, 0 내지 300 nM 범위 농도의 상이한 ^{99m}Tc-표지 His_6-태그 VHH를 포함하는 연속 희석액과 함께 상이한 세포주를 인큐베이션하였다. 100배 과량의 상응하는 비표지 VHH를 동시에 첨가하여 암 세포 표면 상에서 인간 또는 뮤린 FAP 단백질을 포화시켜 비-특이적 결합을 평가하였다. VHH 각각에 대한 결과 EC50 값은 표 8에 서술되어 있다. 이들 데이터로부터 VHH B1 및 B2 둘 다가 ^{99m}Tc로 방사성표지된 후에 인간 및 뮤린 FAP 세포 표면 단백질 둘 다에 결합하는 능력을 유지함을 나타낸다. 비표적화 대조군 VHH R3B23(서열번호 32; Lemaire et al. (2014) Leukemia 28(2):444-447)은 평가된 3가지 세포주 중 임의의 것에 대하여 어떠한 관련된 결합도 나타내지 않았다. 본 발명자들은 시험관내에서 ^{99m}Tc-표지 VHH B4만이 뮤린 FAP 세포 표면 단백질에 결합하는 반면, VHH B3만이 인간 FAP 세포 표면 분자에 결합한다는 것을 확인하였다.

표 8

[0729] 3가지 상이한 세포주, 즉 인간 FAP-발현 HEK-293 및 GM05389 세포뿐만 아니라, 뮤린 FAP-발현 HEK-293 세포에 대한 VHH의 결과 EC50. 데이터는 평균 ± SD(n=3)로 표현되어 있다.

	EC50(평균 ± SD, nM)		
VHH	GM05389 인간 FAP	HEK-293 인간 FAP	HEK-293 뮤린 FAP
B1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.3	5.8 ± 0.4
B2	3.2 ± 0.5	13.0 ± 3.5	139.1 ± 30.0
B3	2.7 ± 0.2	2.4 ± 0.4	결합하지 않음
B4	결합하지 않음	결합하지 않음	7.6 ± 0.5
R3B23	결합하지 않음	결합하지 않음	결합하지 않음

[0730] 상이한 ^{99m}Tc-표지 인간-단독, 뮤린-단독 또는 인간/뮤린 교차 반응성 FAP-표적화 VHH를 해부 연구를 통해 정상적인 암컷 C57BL/6 마우스에서 생체내에서 평가하였다. 마우스(VHH당 n=3)에 약 1 mCi(± 4 μg) ^{99m}Tc-표지 VHH를 정맥내 주사하였다. 다음으로, 심장 천자에 의해 혈액을 채취하고, 그 다음 주사 1시간 후 경추탈구로 마우스를 안락사시켰다. 마우스를 해부하고 여러 장기 및 조직을 수집하였다. 관심이 있는 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주입된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다.

[0731] 이들 데이터로부터 VHH B1, B2 및 B4는 ^{99m}Tc로 방사성표지된 후에 뮤린 FAP에 결합하는 능력을 유지하며, 순환 FAP를 발현하고/하거나 포함하는 여러 장기 및 조직, 예컨대 혈액, 림프절, 뼈, 자궁, 췌장, 피부 및 근육에서 방사능 저류가 상승되었음을 나타낸다(Keane et al 2014, FEBS Open Bio 4, 43-54). 저류 정도(뮤린 FAP 결합에 대한 척도)는 뮤린 FAP에 대한 상응하는 결합 친화도와 일치한다(B4 > B1 > B2). 비-표적화 대조군 VHH R3B23은 뮤린 FAP의 어떠한 관련 표적화를 나타내지 않았다. ^{99m}Tc-표지, His_6-태그, 인간 FAP-표적화 VHH B3은 비-표적화 방사성표지 His_6-태그 VHH에 대해 통상적인 마우스에서의 생체분포를 나타내었다(표 9). 신장을 제외

한 모든 장기 및 조직에서 낮은 방사능 신호가 측정되었다.

표 9

[0732] 정상적인 암컷 C57BL/6 마우스에서 ^{99m}Tc-표지 His_6-태그 VHH B2, B1, B3, B4 및 비-표적화 대조군 R3B23의 주입 1시간 후 해부로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/g로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	^{99m}Tc-B2		^{99m}Tc-B1		^{99m}Tc-B3		^{99m}Tc-B4		^{99m}Tc-R3B23	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	0.97	0.09	2.52	0.03	0.59	0.11	2.74	0.18	0.89	0.30
림프절	1.27	0.19	4.54	0.23	0.56	0.09	3.30	0.35	0.60	0.27
심장	0.38	0.04	0.78	0.01	0.29	0.08	0.91	0.07	0.36	0.09
폐	0.84	0.07	1.35	0.26	0.73	0.12	1.30	0.22	0.80	0.13
간	1.18	0.14	1.59	0.14	0.77	0.04	0.90	0.08	0.54	0.06
췌장	0.39	0.04	1.27	0.13	0.21	0.04	1.49	0.13	0.23	0.01
비장	0.50	0.04	0.82	0.15	0.30	0.03	0.67	0.05	0.29	0.01
부신	1.05	0.23	2.75	0.40	0.55	0.12	2.13	0.29	0.51	0.43
신장	242.15	15.68	244.68	29.15	408.44	95.18	50.83	5.97	334.43	114.92
위	1.50	0.06	1.62	0.17	0.88	0.08	1.05	0.19	1.09	0.16
소장	0.55	0.06	1.67	0.07	0.31	0.05	0.89	0.18	0.35	0.08
대장	0.53	0.05	1.01	0.09	0.49	0.12	0.89	0.05	0.43	0.08
자궁	1.51	0.31	2.69	0.72	0.72	0.23	2.86	0.55	0.62	0.05
피부	0.66	0.13	1.27	0.03	0.58	0.07	1.89	0.20	0.46	0.16
근육	0.46	0.21	0.94	0.16	0.22	0.12	1.38	0.17	0.26	0.12
뼈	1.26	0.13	3.41	0.45	0.22	0.04	3.81	0.87	0.45	0.39
뇌	0.05	0.01	0.08	0.02	0.03	0.02	0.09	0.02	0.02	0.01

[0733] 여러 장기 및 조직에서 관찰된 흡수 상승이 특이적 표적화로 기인한 것인지 여부를 평가하기 위하여, ^{99m}Tc-표지 VHH B1을 단독으로 그리고 100배 몰 과량의 비표지 VHH B1과 조합하여 건강한 암컷 C57BL/6 마우스에게 투여한 후, 이의 생체분포를 해부 연구를 통해 평가하였다. 마우스(조건당 n=3)에 약 1 mCi(± 4 μg) ^{99m}Tc-표지 VHH를 정맥내 주사하였다. 비표지 VHH, 또는 동량의 비히클 용액을 추적자 투여 30분 전에 투여하였다. 다음으로, 심장 천자에 의해 혈액을 채취하고, 그 다음 주사 1시간 후 경추탈구로 마우스를 안락사시켰다. 마우스를 해부한 다음, 관심이 있는 분리된 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주입된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다. 결과는 혈액, 림프절, 뼈, 자궁, 췌장, 피부 및 근육에서의 흡수 상승이 비표지 VHH B1과의 공동 투여에 의해 완전히 감소됨을 나타내며(표 10), 이는 흡수 상승이 비-특이적 저류보다는 VHH B1의 특이적 표적화 능력에 기인한 것임을 나타낸다.

표 10

[0734] 정상적인 암컷 C57BL/6 마우스에서 ^{99m}Tc-표지 His_6-태그 VHH B1 단독 및 100배 몰 과량의 비표지화 VHH와 함께 주입 1시간 후 해부로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/g로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	^{99m}Tc-B1		^{99m}Tc-B1 + 100배 과량의 비표지 B1	
장기/조직	평균	SD	평균	SD
혈액	1.90	0.27	0.78	0.10
림프절	3.19	0.28	0.64	0.23
심장	0.75	0.05	0.37	0.15
폐	1.01	0.13	0.72	0.09
담낭	3.01	0.52	1.32	0.52
간	1.05	0.20	0.81	0.01
췌장	1.39	0.13	0.24	0.01
비장	0.59	0.09	0.35	0.03

부신	2.39	0.42	0.75	0.02
신장	198.25	31.22	233.90	14.29
위	1.19	0.11	0.87	0.03
소장	0.92	0.40	0.61	0.09
대장	0.94	0.11	0.45	0.07
자궁	2.83	0.45	0.93	0.08
피부	1.92	0.26	0.75	0.06
근육	1.15	0.12	0.29	0.02
뼈	2.54	0.23	0.35	0.06
뇌	0.07	0.00	0.03	0.00

[0735] 실시예 5:

[0736] 이 실시예에서, 본 발명자들은 정상적인 C57BL/6 마우스 및 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스 둘 다, 및 상처 치유를 겪은 마우스에서 진단용 방사성 동위원소 ^{99m}Tc(실시예 3에 기재된 바와 같음)로 방사성표지 후 관련 인간 또는 뮤린 FAP-발현을 측정하기 위한 인간-단독 또는 인간/뮤린 교차 반응성 FAP-표적화 VHH의 잠재력을 설명한다.

[0737] 실시예 5a.

[0738] 이 실시예의 첫 번째 파트에서, 정상적인 암컷 C57BL/6 마우스뿐만 아니라, 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스 둘 다에서 인간/뮤린 교차 반응성 FAP-표적화 VHH B1, 뮤린 FAP-표적화 VHH B4 및 비-표적화 대조군 VHH R3B23의 생체분포를 평가하였다. 모든 마우스의 꼬리 정맥에 약 1 mCi(± 4 μg)의 ^{99m}Tc-표지 VHH를 정맥내 주사하였다. 다음으로, 1.5시간 후 경추탈구로 마우스를 안락사시키고, 해부한 후 여러 장기 및 조직을 수집하였다. 관심이 있는 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 자동 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주사된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다.

[0739] 결과는 ^{99m}Tc-표지 B1 및 B4의 i.v. 투어 후 정상적인 마우스의 혈액, 림프절, 뼈, 자궁, 췌장, 피부 및 근육에서 흡수 상승을 나타내며, ^{99m}Tc-표지 B1 및 B4 둘 다는 뮤린 FAP를 표적화한다(표 11). ^{99m}Tc-R3B23의 경우에 흡수 상승은 없다. 이러한 관찰은, 정상적인 마우스에서, 뮤린 FAP가 혈류로 활발히 배출되어 혈액에서 추적자 흡수 증가 및 고도로 관류된 장기 및 조직을 야기한다는 사실에 의해 설명될 수 있다(Keane et al 2014, FEBS Open Bio 4, 43-54). 이러한 흡수 상승은 인간/뮤린 교차 반응성 FAP-표적화 VHH B1이 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스로 i.v. 투여될 때에는 없으며, 이는 인간 FAP가 인간 상황을 정확하게 나타내는 정도까지 배출되지 않음을 나타낸다.

표 11

[0740] 야생형 C57BL/6 마우스(WT) 및 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스(KI) 둘 다에서 ^{99m}Tc-표지 His_6-태그 VHH의 주사 1.5시간 후 해부로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/g로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

장기	WT 마우스에서 ^{99m}Tc-B1		KI 마우스에서 ^{99m}Tc-B1		WT 마우스에서 ^{99m}Tc-B4		KI 마우스에서 ^{99m}Tc-B4		WT 마우스에서 ^{99m}Tc-R3B23		KI 마우스에서 ^{99m}Tc-R3B23	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	1.81	0.07	0.77	0.07	2.74	0.18	0.54	0.03	0.89	0.3	0.5	0.07
림프절	3.26	1.63	0.23	0.03	3.3	0.35	0.23	0.07	0.6	0.27	0.14	0.09
췌장	1.38	0.11	0.2	0.02	1.49	0.13	0.14	0.01	0.23	0.01	0.12	0.01
자궁	2.07	1.02	0.87	0.06	2.86	0.55	0.76	0.14	0.62	0.05	0.61	0.14
피부	1.68	0.74	0.89	0.17	189	0.2	0.63	0.12	0.46	0.16	0.64	0.21
근육	0.65	0.24	0.2	0.03	1.38	0.17	0.15	0.04	0.26	0.12	0.11	0.01
뼈	2.2	0.51	0.42	0.02	3.81	0.87	0.25	0.07	0.45	0.39	0.13	0.01

[0741] 실시예 5b.

[0742] 둘째로, 섬유아세포가 상처 치유 과정에 관여하는 것은 알려져 있다(Giesel et al 2019 J Nucl Med 60(3):386-392; Dienus K et al. Arch Dermatol Res. 2010 Dec;302(10):725-31; Gao Y et al. Fa Yi Xue Za Zhi. 2009 Dec;25(6):405-8). 본 발명자들은 FAP-발현 섬유아세포를 시각화하기 위해 ^{99m}Tc-표지 VHH의 진단 잠재력을 추가로 뒷받침하기 위해 이러한 현상을 이용하였다. 이를 위해, 야생형 C57BL/6 마우스와 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스 둘 다의 허리에 작은 절개를 하였고, 이를 즉시 봉합하였다. 하루 후, 모든 마우스의 꼬리 정맥에 약 1 mCi(± 4 μg)의 ^{99m}Tc-표지 VHH를 정맥내 주사하였다. Vector^{+}/CT MILabs 시스템을 사용하여 추적자 투여 1시간 후 SPECT/CT를 수행한 다음, 1.5시간 후에 부검 연구를 수행하였다. SPECT 콜리메이터와 6개 층 위치(위치당 2.5분)의 나선형 스캔 모드를 사용하여 SPECT/CT 영상화를 수행하였다. CT의 경우, 단지 1개의 위치에서의 일반 스캔 모드를 사용하였다. 수득된 SPECT 데이터를 0.4 복셀 크기, 2개 하위 집합 및 4번의 반복으로 재구성하고, 그 후 영상을 융합하고 CT 스캔을 기반으로 감쇠를 위해 보정한다. 의료 영상 데이터 분석 도구(AMIDE)를 사용하여 영상을 분석하였다. 선택된 장기 및 조직에서의 흡수 값을 분석하고 cm^3당 주사된 활성 %(%IA/cc)로 표현하였다.

[0743] 다음으로, 1.5시간 후 경추탈구로 마우스를 안락사시키고, 해부한 후 여러 장기 및 조직을 수집하였다. 관심이 있는 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 자동 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주사된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다.

[0744] 하기 표 7 및 8에 기재된 결과는 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 VHH B1이 생체내 상처 치유에 있어서 야생형 C57BL/6 마우스에서의 뮤린 FAP 발현 섬유아세포 및 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스에서의 인간 FAP 발현 섬유아세포에 특이적으로 결합함을 나타낸다. 해부를 통해 수득한 흡수 값은 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스의 상처 치유에 있어서 뮤린 FAP-특이적 VHH B4(p=0.0044), 및 비-표적화 대조군 VHH R3B23(p=0.0055)에 대해 측정한 값과 비교하여 현저하게 더 높았다. 녹인 및 야생형 마우스 각각에서 상처 치유에 있어서 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 B1의 흡수는 독립표본 t-검정(unpaired t-test)을 통해 결정될 때 유의한 차이가 없었다 (p=0.1756).

표 12

[0745] 야생형 C57BL/6 마우스(WT) 및 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스(KI) 둘 다에서 ^{99m}Tc-표지 His_6-태그 VHH의 주사 1시간 후 SPECT/CT 영상화로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/cc로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

장기	WT 마우스에서 ^{99m}Tc-B1		KI 마우스에서 ^{99m}Tc-B1		KI 마우스에서 ^{99m}Tc-B4		KI 마우스에서 ^{99m}Tc-R3B23	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
심장	0.80	0.03	0.22	0.04	0.23	0.03	0.27	0.07
폐	0.65	0.04	0.15	0.05	0.17	0.01	0.15	0.04
신장	78.53	2.43	101.66	8.94	22.54	2.72	84.70	29.32
관절	1.72	0.12	0.27	0.06	0.22	0.03	0.19	0.06
뼈	0.82	0.09	0.13	0.07	0.10	0.08	0.15	0.06
상처	1.21	0.01	0.45	0.24	0.13	0.03	0.15	0.03
근육	0.50	0.02	0.10	0.01	0.10	0.06	0.15	0.06
간	0.76	0.04	0.33	0.05	0.26	0.01	0.28	0.02

표 13

[0746] 야생형 C57BL/6 마우스(WT) 및 동형접합 인간 FAP 녹인 마우스(KI) 둘 다에서 ^{99m}Tc-표지 His_6-태그 VHH의 주사 1.5시간 후 해부로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/g로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

장기	WT 마우스에서 ^{99m}Tc-B1		KI 마우스에서 ^{99m}Tc-B1		KI 마우스에서 ^{99m}Tc-B4		KI 마우스에서 ^{99m}Tc-R3B23	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	1.81	0.07	0.77	0.07	0.54	0.03	0.50	0.07
림프절	3.26	1.63	0.23	0.03	0.23	0.07	0.14	0.09

흉선	0.61	0.25	0.22	0.05	0.12	0.03	0.13	0.02
심장	0.75	0.05	0.34	0.03	0.24	0.03	0.22	0.01
폐	1.06	0.17	0.85	0.05	0.73	0.05	0.53	0.02
담낭	0.92	0.20	0.86	0.40	0.30	0.04	1.27	0.74
간	1.27	0.36	0.82	0.21	0.57	0.03	0.40	0.02
췌장	1.38	0.11	0.20	0.02	0.14	0.01	0.12	0.01
비장	0.61	0.11	0.39	0.03	0.29	0.01	0.23	0.02
부신	1.91	0.39	0.48	0.09	0.39	0.13	0.28	0.00
신장	270.42	138.31	399.96	39.56	76.80	9.53	334.82	17.17
위	0.87	0.16	0.51	0.06	0.60	0.24	0.37	0.03
소장	0.55	0.03	0.37	0.04	0.26	0.01	0.24	0.02
대장	0.82	0.07	0.43	0.04	0.30	0.02	0.34	0.02
난소	1.90	0.42	0.73	0.13	0.68	0.18	0.64	0.23
자궁	2.07	1.02	0.87	0.06	0.76	0.14	0.61	0.14
피부	1.68	0.74	0.89	0.17	0.63	0.12	0.64	0.21
근육	0.65	0.24	0.20	0.03	0.15	0.04	0.11	0.01
뼈	2.20	0.51	0.42	0.02	0.25	0.07	0.13	0.01
관절	3.51	0.81	0.83	0.04	0.41	0.05	0.33	0.03
뇌	0.07	0.02	0.03	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00
상처	2.36	0.82	1.17	0.10	0.59	0.05	0.58	0.10

[0747] 실시예 6: 방사성표지된 VHH의 진단 용도

[0748] 이 실시예에서, 본 발명자들은 진단용 방사성 동위원소 ^{99m}Tc 및 ^{111}In(실시예 3에 기재된 바와 같음)으로 방사성표지 후 관련 인간 또는 뮤린 FAP-발현을 시각화하는 능력을 조사함으로써 인간-단독 또는 인간/뮤린 교차 반응성 FAP-표적화 VHH의 진단 잠재력을 설명한다. 진단 잠재력은 뮤린 FAP를 발현하는 천연 침윤성 암-연관 섬유아세포와 함께 인간 MDA-MB-231 종양을 보유하는 무흉선 누드 마우스 및 인간 FAP 수용체를 발현하는 HEK-293 종양을 보유하는 무흉선 누드 마우스에서 확인된다.

[0749] 실시예 6a.

[0750] 이 실시예의 첫 번째 파트에서, 뮤린 FAP-특이적 VHH B4, 비-표적화 대조군 VHH R3B23, 및 인간 FAP-발현 VHH B3과 함께 ^{99m}Tc-표지 인간/뮤린 교차 반응성 FAP-표적화 VHH B1 및 B2의 진단 잠재력을 뮤린 FAP를 발현하는 천연 침윤성 암-연관 섬유아세포와 함께 MDA-MB-231 종양을 보유하는 무흉선 누드 마우스에서 평가하였다.

[0751] 이를 위해, 무흉선 마우스(VHH당 n=3)에 Matrigel 중 10×10^6개 MDA-MB-231 세포를 접종하였다. 종양 성장(평균 크기 약 200 mm^3)의 검증 후, 마우스의 꼬리 정맥에 약 1 mCi(± 4 μg)의 ^{99m}Tc-표지 VHH를 정맥내 주사하였다. 다음으로, 상기 기재된 바와 같이, Vector$^+$/CT MILabs 시스템을 사용하여 추적자 투여 1시간 후 SPECT/CT를 수행한 다음, 1.5시간 후에 부검 연구를 수행하였다.

[0752] 결과는 뮤린 FAP-특이적 VHH B4 및 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 VHH B1 둘 다는 MDA-MB-231 종양에 특이적으로 축적된 한편, 이 조직에서의 흡수 증가는 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 VHH B2에 대해 더 낮았고, ^{99m}Tc-표지 비-표적화 대조군 VHH R3B23 및 인간 FAP-특이적 VHH B3에 대해서는 없었음을 나타내며, 이는 뮤린 FAP에 대한 이들 VHH의 상응하는 친화도와 일치한다. 뮤린 FAP-특이적 VHH B4 및 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 VHH B1 둘 다의 특이적 축적은 일원 ANOVA-다중 비교에 의해 나타낸 바와 같이 추가적으로 평가된 VHH와 비교하여 현저하게 더 높았다($p < 0.05$)(표 9 및 10). 이는 VHH가 뮤린 FAP-수용체를 표적화함으로써 정상적인 마우스에서 암-연관 섬유아세포를 시각화할 수 있음을 나타낸다. 이는 VHH B1이 또한 높은 결합 친화도로 인간 FAP에 결합한다는 것을 알고 있기 때문에, 중요한 발견이다. 따라서, 교차 반응성 인간/뮤린 FAP-표적화 VHH B1이 또한 인간 상황에서 인간 FAP-발현 종양-연관 섬유아세포를 표적화할 것이라고 가정하는 것이 적절하다.

표 14

[0753] MDA-MB-231 종양을 보유하는 무흉선 누드 마우스에서 ^{99m}Tc-표지 His_6-태그 VHH의 주사 1시간 후 SPECT/CT 영상화로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/cc로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제

시되어 있다.

	^{99m}Tc-B2		^{99m}Tc-B1		^{99m}Tc-R3B23		^{99m}Tc-B3		^{99m}Tc-B4	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
신장	65.02	2.22	58.25	11.32	71.82	4.49	80.24	2.86	15.15	1.65
심장	0.37	0.07	0.65	0.09	0.27	0.09	0.14	0.02	0.92	0.14
폐	0.30	0.06	0.54	0.10	0.23	0.10	0.12	0.03	0.84	0.02
간	0.37	0.04	0.52	0.10	0.25	0.05	0.23	0.02	0.71	0.09
근육	0.20	0.06	0.54	0.05	0.04	0.02	0.07	0.01	0.69	0.14
종양	0.34	0.06	0.86	0.11	0.15	0.01	0.15	0.03	1.38	0.27

표 15

[0754] MDA-MB-231 종양을 보유하는 무흉선 누드 마우스에서 ^{99m}Tc-표지 His_6-태그 VHH의 주사 1.5시간 후 해부로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/g로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	^{99m}Tc-B2		^{99m}Tc-B1		^{99m}Tc-R3B23		^{99m}Tc-B3		^{99m}Tc-B4	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	0.41	0.06	0.83	0.19	0.46	0.22	0.24	0.03	1.38	0.13
림프절	0.78	0.54	3.98	1.46	0.32	0.11	0.26	0.03	2.76	1.71
심장	0.24	0.03	0.42	0.10	0.20	0.07	0.12	0.01	0.60	0.05
폐	0.49	0.08	0.58	0.09	0.43	0.12	0.29	0.03	0.79	0.09
간	0.59	0.04	0.69	0.05	0.41	0.08	0.49	0.05	0.82	0.11
췌장	0.16	0.02	0.64	0.23	0.14	0.05	0.08	0.00	0.94	0.10
비장	0.18	0.01	0.24	0.03	0.15	0.04	0.11	0.01	0.38	0.03
부신	0.34	0.03	1.02	0.38	0.29	0.07	0.18	0.03	0.96	0.13
신장	191.74	2.74	169.55	25.44	219.80	3.07	249.34	26.52	36.96	0.64
위	0.67	0.58	0.60	0.45	0.53	0.17	0.32	0.15	0.58	0.04
소장	0.31	0.10	0.30	0.09	0.22	0.05	0.14	0.02	0.42	0.17
대장	0.38	0.09	0.41	0.08	0.30	0.09	0.18	0.04	0.45	0.02
자궁	0.77	0.26	1.40	0.49	0.32	0.05	0.22	0.16	1.88	0.50
피부	0.63	0.09	1.91	0.72	0.36	0.10	0.26	0.02	2.49	0.20
근육	0.25	0.01	0.78	0.25	0.14	0.08	0.08	0.01	0.94	0.15
뼈	0.33	0.10	0.62	0.39	0.14	0.06	0.10	0.05	1.74	0.39
종양	0.57	0.11	0.99	0.47	0.31	0.01	0.36	0.07	1.71	0.27
뇌	0.02	0.01	0.04	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.07	0.03

[0755] 실시예 6b.

[0756] 둘째로, 비태그 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 VHH B1을 ^{111}In으로 방사성표지한 후, 이의 시험관내 및 생체내 진단 잠재력을 평가하였다. 생성된 방사성-접합체의 결합 잠재력을 평가하여 이것이 VHH의 아미노산 서열에 대한 ^{111}In-DOTA의 접합에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다. 이를 위해, 인간 FAP-발현 GM05389 세포를 0 내지 33 nM 범위 농도의 ^{111}In-표지 VHH를 포함하는 연속 희석액과 함께 인큐베이션하였다. 100배 과량의 상응하는 비표지 VHH를 동시에 첨가하여 암 세포에서 발현되는 인간 FAP 수용체를 포화시켜 비-특이적 결합을 평가하였다. 0.6 ± 0.08 nM의 EC50이 얻어졌기 때문에, 인간 FAP 수용체에 대한 결합은 방해받지 않았다.

[0757] ^{111}In으로 방사성표지된 비태그 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 VHH B1의 생체내 진단 잠재력을 인간 FAP 수용체를 발현하는 HEK-293 종양을 보유하는 무흉선 누드 마우스에서 평가하였다. 이를 위해, 무흉선 누드 마우스(시점당 n=4)에 인간 FAP-발현 HEK-293 종양 세포를 목에 피하로 접종하였다. 종양 성장(크기 약 100 내지 200 mm^3)의 검증 후, 모든 마우스의 꼬리 정맥에 약 450 μCi(± 7 μg)의 ^{111}In-표지 VHH를 정맥내 주사하였다. MILabs VECTor$^+$/CT 시스템을 사용하여 추적자 주사 1, 4 및 24시간 후 Micro-SPECT/CT 영상화를 수행하였다. 요컨대,

래트 SPECT 콜리메이터와 6개 층 위치(위치당 3분)의 나선형 스캔 모드를 사용하여 영상화를 수행하였다. CT의 경우, 단지 1개의 위치에서의 일반 스캔 모드를 사용하였다. 수득된 Micro-SPECT/CT 데이터를 0.4 복셀 크기, 2개 하위 집합 및 4번의 반복으로 재구성하고, 그 후 영상을 융합하고 CT 스캔을 기반으로 감쇠를 위해 보정한다. 의료 영상 데이터 분석 도구(AMIDE)를 사용하여 영상을 분석한다. 장기 및 조직에서의 흡수 값을 분석하고 cm^3당 주사된 활성 %(%IA/cc)로 표현하였다. 마지막으로, 각각의 스캔 후에 마우스를 희생시키고 상기 기재된 바와 같이 처리하였다. 관심이 있는 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 자동 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주사된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다.

[0758] 결과는 ^{111}In-표지 VHH B1이 인간 FAP를 발현하는 종양에서 특이적으로 축적된다는 것을 나타내었다. 종양에서의 흡수는 시간이 경과함에 따라 일관되었으며, 이때 1시간 후 에는 약 2.52 ± 0.16%IA/g 및 1.01 ± 0.18%IA/cc이고 24시간 후에는 약 1.90 ± 0.65%IA/g 및 0.74 ± 0.58%IA/cc의 값을 보였다(표 16 및 17).

[0759] VHH B1은 ^{111}In로 방사성표지된 후에 뮤린 FAP에 결합하는 능력을 유지하며, 순환 뮤린 FAP를 발현하고/하거나 포함하는 여러 장기 및 조직, 예컨대 혈액, 림프절, 뼈, 자궁, 췌장, 피부 및 근육에서 방사능 저류가 상승되었다(실시예 4f와 일치함). 상기 언급된 장기 및 조직에서의 이러한 흡수는 시간이 경과함에 따라 감소되었고 주사 후 24시간 째에 배경 값에 근접하였다.

표 16

[0760] 인간 FAP-발현 HEK-293 종양을 가지는 마우스에서 ^{111}In-표지 비태그 B1의 주사 후 1, 4 및 24시간 후 SPECT/CT 영상화로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/cc로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

%IA/cc	1시간 pi		4시간 pi		24시간 pi	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD
종양	1.01	0.18	0.94	0.60	0.74	0.58
신장	7.92	1.13	8.95	0.87	4.37	0.63
간	0.40	0.08	0.21	0.03	0.09	0.01
심장	0.62	0.12	0.19	0.04	0.04	0.002
폐	0.49	0.06	0.20	0.05	0.04	0.01
관절	1.29	0.17	0.75	0.05	0.25	0.01
뼈	0.84	0.21	0.54	0.16	0.11	0.02
근육	0.42	0.16	0.33	0.07	0.07	0.01

표 17

[0761] 인간 FAP-발현 HEK-293 종양을 가지는 마우스에서 ^{111}In-표지 비태그 B1의 주사 후 1.5, 4.5 및 24.5시간 후 해부로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/g로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

%IA/g	1.5시간 pi		4.5시간 pi		24.5시간 pi	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	0.85	0.22	0.31	0.10	0.02	0.002
림프절	2.21	0.64	1.23	0.65	0.31	0.07
심장	0.34	0.09	0.13	0.01	0.04	0.002
폐	0.48	0.05	0.20	0.05	0.06	0.01
담낭	0.26	0.13	0.18	0.05	0.06	0.01
간	0.35	0.02	0.31	0.05	0.17	0.01
췌장	0.47	0.12	0.18	0.03	0.04	0.003
비장	0.20	0.04	0.12	0.02	0.07	0.004
부신	0.64	0.12	0.33	0.01	0.09	0.01
신장	20.96	1.52	26.42	2.81	15.08	1.46
위	0.43	0.25	0.15	0.02	0.04	0.003
소장	0.23	0.04	0.12	0.02	0.04	0.004
대장	0.33	0.06	0.23	0.11	0.05	0.004

난소	0.80	0.13	0.38	0.10	0.14	0.04
자궁	1.57	0.28	0.74	0.13	0.53	0.20
피부	1.77	0.15	1.14	0.12	0.34	0.02
근육	0.67	0.06	0.50	0.14	0.11	0.01
뼈	1.42	0.45	0.72	0.25	0.31	0.01
관절	2.32	0.45	1.39	0.18	0.58	0.08
종양	2.52	0.16	2.04	0.57	1.90	0.65
뇌	0.04	0.01	0.02	0.01	0.004	0.001

[0762] 실시예 7: ^{131}I로 표지된 VHH의 테라노스틱 용도

[0763] 테라노스틱 용도는 진단 및 치료적 적용 둘 다에 적용 가능한 하나의 동일한 표지된 화합물의 능력을 지칭한다. 이 실시예에서, 본 발명자들은 테라노스틱용 방사성 핵종 ^{131}I로 방사성표지 후 표적화 잠재력을 조사함으로써 (실시예 3에 기재된 바와 같음) His_6-태그 형태 및 이의 비태그 형태 둘 다에서 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 VHH B1, 인간/뮤린 FAP-교차 반응성 VHH B2 및 뮤린 FAP-특이적 VHH B4의 테라노스틱 잠재력을 설명한다. 테라노스틱 잠재력은 인간 FAP-발현 세포에 결합하는 능력(포화 결합 및 세포 저류)을 통해 시험관내에서 그리고 관련 마우스 모델에서의 생체분포를 평가함으로써 생체내에서 평가된다.

[0764] 실시예 7a.

[0765] 제1 파트에서, 시간 경과에 따른 세포 결합 및 저류를 조사함으로써 시험관내 거동을 평가하였다. 생성된 방사성접합체의 결합 잠재력을 평가하여 이것이 VHH의 아미노산 서열로의 ^{131}I-SGMIB의 도입에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다. 이를 위해, 인간 FAP-발현 GM05389(His_6-태그 및 비태그 VHH B1) 및 인간 FAP-형질감염 HEK-293 세포(His_6-태그 및 비태그 VHH B1; His_6-태그 VHH B2)를 0 내지 33 nM 범위 농도의 상이한 ^{131}I-표지 VHH를 포함하는 연속 희석액과 함께 인큐베이션하였다. 100배 과량의 상응하는 비표지 VHH를 동시에 첨가하여 암 세포에서 발현되는 인간 FAP 수용체를 포화시켜 비-특이적 결합을 평가하였다.

[0766] 모든 ^{131}I-표지 VHH는 인간 FAP-발현 GM05389 및 HEK-293 세포에 대한 세포-결합 실험에서 비슷한 용량-반응 곡선을 나타내었으며, 이는 ^{131}I-표지화가 결합 잠재력에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. GM05389 세포의 경우에, His_6-태그 B1 및 비태그 B1에 각각 0.6 ± 0.1 및 2.7 ± 0.1 nM의 EC50 값을 수득한 한편, HEK-293에 대해서는, His_6-태그 B1, 비태그 B1 및 His_6-태그 B2에 대해 각각 1.4 ± 0.5, 2.8 ± 0.7, 및 3.8 ± 3.3. nM의 EC50 값이 관찰되었다.

[0767] 인간 FAP-발현 GM05389 세포에서 ^{131}I-표지 His_6-태그 B1 및 비태그 B1의 시험관내 세포 저류를 평가하였다. 이러한 특정 경우에, 세포를 10 nM ^{131}I-표지 VHH와 함께 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 결합되지 않은 분획을 수집하였다. 100배 과량의 상응하는 비표지 VHH를 첨가하여 비-특이적 결합을 평가하였다. 다음으로, 세포를 신선한 배지와 함께 37℃에서 최대 24시간까지 인큐베이션한 후, 해리된 분획을 수집하였다. 그 후, 세포를 0.05 M 글리신(pH 2.8)으로 세척하여 막-결합 분획을 수집하였다. 마지막으로, 세포를 실온에서 1 M NaOH로 가용화하여 내재화 분획을 수집하였다. 막-결합 및 내재화 분획의 합은 총 세포-회합 분획에 해당한다.

[0768] His_6-태그 B1 및 비태그 B1 둘 다는 인간 FAP-수용체 결합 시 시간 경과에 따라 매우 높은 수준의 세포-연관 활성을 나타낸다. 24시간 인큐베이션 후, (비태그 및 His_6-태그 B1에 대하여 각각) 약 80% 및 70%의 초기 결합 활성이 종양 세포에서 여전히 유지되었으며, 이는 교차 반응성 인간/뮤린 FAP-표적화 VHH B1의 광범위하고 유지된 표적화 능력을 반영한다(도 5). 이러한 특징은 세포독성 페이로드에 대한 표적 세포의 장기간 노출을 가능하게 하므로, VHH를 사용하는 치료적 적용에 매우 중요하다.

[0769] 실시예 7b.

[0770] 다음으로, ^{131}I-표지 B1, B2 및 B4의 테라노스틱 잠재력을 인간 FAP-발현 HEK 293 종양을 가지는 마우스에서 평가하였다. 이를 위해, 무흉선 누드 마우스(시점당 n=3)에 인간 FAP-발현 HEK-293 종양 세포를 목에 피하로 접종

하였다. 종양 성장(크기 약 100 내지 200 mm^3)의 검증 후, 모든 마우스의 꼬리 정맥에 약 400 μCi(± 25 μg)의 ^{131}I-표지 VHH를 정맥내 주사하였다. MILabs VECTor$^+$/CT 시스템을 사용하여 그리고 문헌[D'Huyvetter et al. Clin Cancer Res. 2017 Nov 1;23(21):6616-6628]에 기재된 절차에 따라 추적자 주사 2시간 후 Micro-SPECT/CT 영상화를 수행하였다. 요컨대, 마우스 ECT 콜리메이터와 94개 층 위치(위치당 19초)의 나선형 스캔 모드를 사용하여 영상화를 수행하였다. CT의 경우, 단지 1개의 위치에서의 일반 스캔 모드를 사용하였다. 수득된 Micro-SPECT/CT 데이터를 0.6 복셀 크기, 2개 하위 집합 및 7번의 반복으로 재구성하고, 그 후 영상을 융합하고 CT 스캔을 기반으로 감쇠를 위해 보정한다. 의료 영상 데이터 분석 도구(AMIDE)를 사용하여 영상을 분석하였다. 장기 및 조직에서의 흡수 값을 분석하고 cm^3당 주사된 활성 %(%IA/cc)로 표현하였다. 마지막으로, 2.5시간 후에 마우스를 희생시키고 상기 기재된 바와 같이 처리하였다. 관심이 있는 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 자동 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주사된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다.

[0771] 결과는 인간 FAP-발현 HEK-293 종양에서 ^{131}I-표지 B2 및 B1의 특이적 축적을 나타내는 한편, B4에 대해서는 훨씬 더 낮은 흡수가 관찰되었다(표 18 및 19). 종양 흡수는 B2, B1, 및 B4에 대해 각각 2.96 ± 0.47, 3.47 ± 0.24, 1.15 ± 0.44%IA/g으로 측정되었다. 그러나 모든 추가적인 장기 및 조직, 예컨대 림프절, 자궁 및 뼈에서 ^{131}I-표지 B1의 흡수는 비슷하게 ^{111}In-표지 변이체에 대해 관찰된 절대 수에서 더 낮았으며(실시예 6b) B4에 대해 관찰된 것보다 더 낮았다. 2.5시간 후 신장에서의 저류는, B2, B1, 및 B4에 대해 각각 단지 7.95 ± 1.62, 4.77 ± 1.01, 18.35 ± 3.07%IA/g으로, 모든 방사성접합체에 대해 낮았다. 영상 정량화는 유사한 결과를 생성하였다. 이것으로 치료 지수(종양-대-신장 비율)가 부검 연구에서 수득한 B2, B1, 및 B4에 대해서는 각각 0.45 ± 0.08; 0.65 ± 0.21, 및 0.06 ± 0.02로 계산되고, 영상화 정량화로부터는 각각 0.6 ± 0.03, 0.9 ± 0.28, 및 0.13 ± 0.04의 비율로 계산된다. B2 및 B1에 대한 치료 지수는, 일원 ANOVA에 의해 표시된 바와 같이, B4에 대해 수득한 것과 비교하여 현저하게 더 높았다($p < 0.05$). ^{131}I-표지 B1의 치료 지수는 ^{131}I-표지 B2에 대해 수득된 것과 비교하여 유의하지는 않지만, 더 높았다.

표 18

[0772] 인간 FAP-발현 HEK-293 종양을 가지는 마우스에서 ^{131}I-표지 His_6-태그 B2, B1, 및 B4의 주사 후 2시간 후 SPECT/CT 영상화로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/cc로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	^{131}I-B2		^{131}I-B1		^{131}I-B4	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD
신장	3.41	0.22	2.34	0.30	4.66	1.04
심장	0.14	0.02	0.32	0.02	0.42	0.02
폐	0.18	0.00	0.32	0.00	0.42	0.06
간	0.92	0.10	0.75	0.26	0.44	0.08
근육	0.20	0.05	0.35	0.09	0.43	0.08
종양	2.05	0.21	1.98	0.54	0.61	0.26
종양-대-신장 비율	0.6	0.03	0.9	0.28	0.13	0.04

표 19

[0773] 인간 FAP-발현 HEK-293 종양을 가지는 마우스에서 ^{131}I-표지 His_6-태그 B2, B1, 및 B4의 주사 후 2.5시간 후 해부로부터 수득한 여러 장기 및 조직에서의 흡수. 데이터는 %IA/g로 표현되어 있으며 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	^{131}I-B2		^{131}I-B1		^{131}I-B4	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	0.13	0.03	0.28	0.02	0.75	0.14
림프절	0.52	0.21	1.74	0.29	1.86	0.81
갑상선	0.45	0.15	1.12	0.36	2.18	1.13

심장	0.16	0.02	0.20	0.01	0.41	0.05
폐	0.27	0.03	0.26	0.04	0.68	0.14
담낭	0.45	0.15	0.45	0.32	0.56	0.19
간	1.68	0.21	0.97	0.28	0.66	0.21
췌장	0.40	0.04	0.45	0.02	0.81	0.28
비장	0.41	0.05	0.36	0.16	0.42	0.10
부신	0.24	0.02	0.42	0.06	0.88	0.12
신장	7.95	1.62	4.77	1.01	18.35	3.07
위	0.26	0.10	0.20	0.01	0.53	0.21
소장	0.31	0.20	0.18	0.02	0.32	0.06
대장	0.18	0.01	0.19	0.04	0.34	0.01
자궁	0.31	0.05	0.67	0.19	2.47	1.98
피부	0.55	0.24	0.79	0.02	2.05	0.35
근육	0.25	0.09	0.41	0.00	0.71	0.10
뼈	0.28	0.15	0.70	0.14	1.55	0.57
종양	3.47	0.24	2.96	0.47	1.15	0.44
뇌	0.03	0.02	0.03	0.01	0.04	0.01
종양-대-신장 비율	0.45	0.08	0.65	0.21	0.06	0.02

[0774] 실시예 7c.

[0775] 다음으로, ^{131}I-표지 비태그 VHH B1의 장기적인 생체분포 및 종양 표적화 잠재력을 i.v. 주사 후 5일에 걸쳐 인간 FAP-발현 HEK-293 종양을 가지는 마우스에서 평가하였다. 이를 위해, 무흉선 누드 마우스(시점당 n=3)에 인간 FAP-발현 HEK-293 종양 세포를 목에 피하로 접종하였다. 종양 성장(크기 315.98 ± 346.80 mm^3)의 검증 후, 모든 마우스의 꼬리 정맥에 약 25 μCi(± 5 μg)의 ^{131}I-표지 비태그 VHH B1을 정맥내 주사하였다. 다음으로, 주사 후 최대 120시간까지 경추탈구로 마우스를 안락사시키고, 해부한 후 여러 장기 및 조직을 수집하였다. 관심이 있는 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 자동 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주사된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다.

[0776] ^{131}I-표지 비태그 VHH B1의 정맥내 주사는 장기 및 조직, 예컨대 림프절, 자궁, 뼈 및 피부에서 약간 상승하였지만 일시적인 흡수(약 2 내지 3%IA/g, 그러나 시간 경과에 따라 감소함)를 나타낸다(표 20). 신장에서의 활성량은 2시간 후에 13.14 ± 3.38%IA/g의 값으로 적절했지만, 24시간 후에는 0.5%IA/g 미만으로 급격히 감소하였다. 종양에서의 흡수는 2시간 후에 2.79 ± 1.37%IA/g의 값으로 유의하였으며, 24시간 후에는 종양에서 0.97 ± 0.41%IA/g의 값으로 신장에서의 흡수를 능가하였다. 모든 장기 및 조직에서의 흡수는 모든 시점에서 낮았다.

표 20

[0777] %IA가 사용되는 갑상선을 제외하고, 조직 그램당 주사된 활성 %(%IA/g)로 표현된, i.v. 주사 후 최대 120시간까지 ^{131}I-표지 비태그 VHH B1에 대한 여러 장기 및 조직에서의 흡수 값. 데이터는 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	2시간		4시간		24시간		48시간		72시간		96시간		120시간	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	0.63	0.06	0.40	0.05	0.04	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
림프절	2.86	1.16	1.56	0.65	0.18	0.10	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
갑상선	0.04	0.04	0.04	0.02	0.11	0.04	0.01	0.02	0.07	0.03	0.07	0.02	0.05	0.05
심장	0.32	0.02	0.26	0.04	0.03	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03
폐	0.49	0.01	0.36	0.03	0.04	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.05	0.08
간	0.87	0.11	0.60	0.04	0.14	0.02	0.07	0.01	0.06	0.00	0.05	0.01	0.06	0.02
췌장	0.81	0.09	0.50	0.03	0.06	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
비장	0.28	0.03	0.24	0.03	0.06	0.02	0.03	0.01	0.02	0.00	0.02	0.01	0.04	0.03
신장	13.14	3.38	5.15	0.72	0.47	0.04	0.19	0.01	0.14	0.05	0.08	0.01	0.07	0.03
위	0.55	0.04	0.33	0.04	0.05	0.01	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.03	0.03

소장	0.50	0.09	0.23	0.05	0.03	0.01	0.05	0.06	0.01	0.00	0.01	0.00	0.03	0.03
대장	0.38	0.07	0.26	0.07	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.14	0.13
자궁	1.70	0.39	0.95	0.23	0.20	0.12	0.05	0.03	0.02	0.01	0.01	0.00	0.23	0.31
피부	2.32	0.25	1.83	0.31	0.40	0.13	0.06	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.04	0.04
근육	0.68	0.20	0.67	0.08	0.07	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.07	0.07
뼈	1.52	0.24	1.07	0.11	0.18	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.18	0.20
종양	2.79	1.37	2.48	0.94	0.97	0.41	0.31	0.22	0.21	0.23	0.11	0.12	0.16	0.08
뇌	0.07	0.02	0.03	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02

[0778] 종합하면, 이 실시예는 시험관내 세포 상에서 및 생체내 종양에서 인간 FAP-발현의 표적화가 ^{131}I-표지 교차 반응성 인간/뮤린 FAP-표적화 VHH B1을 이용하여, His_6-태그(서열번호 21) 및 비태그 형식(서열번호 4) 둘 다에서 실현가능함을 나타낸다. 추가적인 장기 및 조직에서의 방사능의 낮은 저류와 결합된 생체내 종양 표적화 잠재력은 이의 치료적 적용을 뒷받침한다.

[0779] 실시예 8: ^{177}Lu로 표지된 VHH의 테라노스틱 용도

[0780] 테라노스틱 용도는 진단 및 치료적 적용 둘 다에 적용 가능한 하나의 동일한 표지된 화합물의 능력을 지칭한다. 이 실시예에서, 본 발명자들은 테라노스틱용 방사성 핵종 ^{177}Lu으로 방사성표지 후 표적화 잠재력을 조사함으로써(실시예 3에 기재된 바와 같음) 교차 반응성 인간/뮤린 FAP-표적화, 비태그 VHH B1의 테라노스틱 잠재력을 설명한다. 테라노스틱 잠재력은 인간 FAP-발현 세포에 결합하는 능력(포화 결합 및 세포 저류)을 통해 시험관내에서 그리고 관련 마우스 모델에서의 생체분포를 평가함으로써 생체내에서 평가된다.

[0781] 제1 파트에서, 시간 경과에 따른 세포 결합 및 저류를 조사함으로써 시험관내 거동을 평가하였다. 생성된 방사성접합체의 결합 잠재력을 평가하여 이것이 VHH의 아미노산 서열로의 ^{177}Lu-DTPA의 도입에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다. 이를 위해, 인간 FAP-발현 GM05389 및 HEK-293 세포를 0 내지 33 nM 범위 농도의 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1을 포함하는 연속 희석액과 함께 인큐베이션하였다. 100배 과량의 상응하는 비표지 VHH를 동시에 첨가하여 암 세포에서 발현되는 인간 FAP 수용체를 포화시켜 비-특이적 결합을 평가하였다.

[0782] 세포주 둘 다에서, ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 결합은 인간 FAP-발현 GM05389 및 HEK-293 세포에 대해 비슷한 용량-반응 곡선을 나타내었으며, 이는 ^{177}Lu-DTPA의 도입이 결합 잠재력에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. GM05389 세포의 경우에, 0.5 ± 0.1 nM의 EC50 값이 수득된 한편, HEK-293에 대해서는 0.8 ± 0.1 nM의 EC50 값이 관찰되었다.

[0783] ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 시험관내 세포 저류를 인간 FAP-발현 GM05389 및 HEK-293 세포에서 평가하였다. 이러한 특정 경우에, 세포를 10 nM ^{177}Lu-표지 비태그 B1과 함께 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 결합되지 않은 분획을 수집하였다. 100배 과량의 상응하는 비표지 VHH를 사용하여 비-특이적 결합을 평가하였다. 다음으로, 세포를 신선한 배지와 함께 37℃에서 최대 24시간까지 인큐베이션한 후, 해리된 분획을 수집하였다. 그 후, 세포를 0.05 M 글리신(pH 2.8)으로 세척하여 막-결합 분획을 수집하였다. 마지막으로, 세포를 실온에서 1 M NaOH로 가용화하여 내재화 분획을 수집하였다. 막-결합 및 내재화 분획의 합은 총 세포-회합 분획에 해당한다.

[0784] 2가지 경우 모두에 있어서, 비태그 VHH B1은 인간 FAP-수용체 결합 시 시간 경과에 따라 매우 높은 수준의 세포-연관 활성을 나타낸다. 24시간 인큐베이션 후, 약 80% 및 65%의 초기 결합 활성이 HEK-293 및 GM05389 세포 각각에서 여전히 유지되었으며, 이는 교차 반응성 인간/뮤린 FAP-표적화 VHH B1의 광범위하고 유지된 표적화 능력을 반영한다(도 6). 이러한 특징은 세포독성 페이로드에 대한 표적 세포의 장기간 노출을 가능하게 하므로, VHH를 사용하는 치료적 적용에 매우 중요하다.

[0785] 다음으로, ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 장기적인 생체분포 및 종양 표적화 잠재력을 i.v. 주사 후 5일에 걸쳐 인간 FAP-발현 HEK-293 종양을 가지는 마우스에서 평가하였다. 이를 위해, 무흉선 누드 마우스(시점당 n=3)에 인간 FAP-발현 HEK-293 종양 세포를 목에 피하로 접종하였다. 종양 성장(크기 43.67 ± 26.61 mm^3)의 검증 후, 모든 마우스의 꼬리 정맥에 약 80 μCi(± 5 μg)의 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1을 정맥내 주사하였다. 다음으로, 주사 후 최대 120시간까지 경추탈구로 마우스를 안락사시키고, 해부한 후 여러 장기 및 조직을 수집하였다. 관

심이 있는 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 자동 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주사된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다.

[0786] ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 정맥내 주사는 장기 및 조직, 예컨대 부신, 자궁, 뼈 및 피부에서 약간 상승하였지만 일시적인 흡수(약 2 내지 3%IA/g, 그러나 시간 경과에 따라 감소함)를 나타낸다(표 16 및 17). 신장에서의 활성량은 2시간 후에 94.05 ± 9.58%IA/g의 값으로 적절했지만, ^{131}I-표지 VHH B1에 대해 관찰된 것과는 대조적으로 시간 경과에 따라 급격히 감소하지 않았다. 실제로 신장에서의 흡수는 24시간 후에도 여전히 31.72 ± 1.68%IA/g이었다. 종양에서의 흡수는 2시간 후에 3.90 ± 0.35%IA/g의 값으로 유의하였고, 24시간 후에도 여전히 2.15 ± 0.98%IA/g으로 시간 경과에 따라 높은 상태를 유지하였으며, 이는 ^{131}I-표지 VHH B1에 대해 관찰된 것과 비교하여 더 높다. 모든 장기 및 조직에서의 흡수는 모든 시점에서 낮았다.

표 21

[0787] %IA가 사용되는 림프절을 제외하고, 조직 그램당 주사된 활성 %(%IA/g)로 표현된, i.v. 주사 후 최대 24시간까지 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1에 대한 여러 장기 및 조직에서의 흡수 값. 데이터는 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	1시간		2시간		6시간		24시간	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	0.80	0.14	0.69	0.03	0.21	0.03	0.01	0.01
림프절	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
심장	0.35	0.03	0.33	0.03	0.14	0.02	0.05	0.01
폐	0.62	0.03	0.71	0.16	0.30	0.04	0.09	0.02
담낭	0.59	0.29	0.77	0.93	0.31	0.23	0.18	0.08
간	0.38	0.03	0.48	0.03	0.47	0.04	0.28	0.01
췌장	0.62	0.06	0.55	0.02	0.26	0.07	0.07	0.01
비장	0.28	0.08	0.23	0.05	0.20	0.01	0.11	0.03
부신	1.77	0.29	1.49	0.34	0.81	0.14	0.33	0.11
신장	81.65	4.86	94.05	9.58	75.68	6.29	31.72	1.68
위	0.58	0.25	0.40	0.04	0.22	0.03	0.07	0.01
소장	0.38	0.08	0.27	0.04	0.15	0.04	0.05	0.01
대장	0.56	0.08	0.41	0.07	0.22	0.08	0.09	0.02
자궁	1.73	0.18	2.26	0.32	1.04	0.51	0.26	0.07
피부	2.25	0.37	2.19	0.23	1.39	0.20	0.39	0.06
근육	0.78	0.13	0.77	0.21	0.34	0.03	0.06	0.02
뼈	1.75	0.52	1.65	0.14	1.02	0.21	0.23	0.02
종양	3.68	0.60	3.90	0.35	5.31	0.12	2.15	0.98
뇌	0.04	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01

표 22

[0788] %IA가 사용되는 림프절을 제외하고, 조직 그램당 주사된 활성 %(%IA/g)로 표현된, i.v. 주사 후 48시간 내지 120시간까지 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1에 대한 여러 장기 및 조직에서의 흡수 값. 데이터는 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	48시간		72시간		96시간		120시간	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
림프절	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
심장	0.05	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
폐	0.07	0.01	0.05	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01
담낭	0.04	0.04	0.21	0.30	0.03	0.05	0.03	0.04
간	0.20	0.02	0.21	0.04	0.15	0.01	0.11	0.03
췌장	0.03	0.01	0.04	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01
비장	0.09	0.02	0.14	0.11	0.07	0.01	0.06	0.02

부신	0.35	0.06	0.12	0.08	0.10	0.09	0.09	0.06
신장	23.12	4.84	11.86	2.02	6.68	0.78	4.56	1.04
위	0.05	0.01	0.04	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01
소장	0.03	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
대장	0.06	0.01	0.05	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01
자궁	0.13	0.01	0.11	0.04	0.08	0.04	0.11	0.05
피부	0.25	0.04	0.16	0.04	0.14	0.01	0.12	0.03
근육	0.05	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02
뼈	0.26	0.06	0.31	0.05	0.15	0.08	0.13	0.06
종양	1.54	0.37	1.16	0.38	0.48	0.20	0.44	0.15
뇌	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

[0789] 150 mg/kg 젤로푸신(gelofusin)과의 공동 투여는 1시간 후에 이미 수득한 단지 15.58 ± 1.46%IA/g인 신장에서의 흡수 값으로, ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 신장 저류를 상당히 감소시킬 수 있었다(표 23). ^{177}Lu-표지 비-표적화 대조군 VHH R3B23의 흡수는 동일 시점에서 단지 0.28 ± 0.24%IA/g으로 측정되었기 때문에, 종양 축적은 높고 특이적으로 유지되었다.

표 23

[0790] 조직 그램당 주사된 활성 %(%IA/g)로 표현된, i.v. 주사 후 1시간째에 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1 및 비-표적화 대조군 VHH R3B23에 대한 여러 장기 및 조직에서의 흡수 값. 데이터는 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	^{177}Lu-B1		^{177}Lu-R3B23	
장기/조직	평균	SD	평균	SD
혈액	0.58	0.07	0.13	0.02
림프절	2.15	0.83	0.28	0.07
심장	0.28	0.04	0.10	0.02
폐	0.37	0.04	0.21	0.04
담낭	0.86	0.25	0.61	0.37
간	0.27	0.05	0.20	0.04
췌장	0.68	0.20	0.07	0.01
비장	0.17	0.04	0.09	0.01
부신	0.50	0.05	0.10	0.00
신장	15.58	1.46	15.27	0.56
위	0.37	0.14	0.16	0.02
소장	0.26	0.07	0.11	0.02
대장	0.24	0.02	0.17	0.03
자궁	1.15	0.16	0.23	0.07
피부	1.90	0.19	0.44	0.04
근육	0.61	0.12	0.10	0.01
뼈	1.21	0.33	0.07	0.01
종양	2.79	0.42	0.28	0.24
뇌	0.03	0.01	0.01	0.00

[0791] 종합하면, 이 실시예는 시험관내 세포 상에서 및 생체내 종양에서 인간 FAP-발현의 표적화가 ^{177}Lu-표지 교차 반응성 인간/뮤린 FAP-표적화 VHH B1을 이용하여, 둘 다에서 실현가능함을 나타낸다. 신장에서의 흡수가 (젤로푸신과의 공동 주사에 의해) ^{131}I-SGMIB 표지 변이체에 대하여 관찰된 것과 비슷한 수준으로 현저하게 감소될 수 있다는 사실과 결합된 생체내 종양 표적화 잠재력은 이의 치료적 적용을 뒷받침한다.

[0792] 실시예 9: ^{225}Ac로 표지된 VHH의 치료적 용도

[0793] 이 실시예에서, 본 발명자들은 치료용 방사성 핵종 ^{225}Ac으로 방사성표지 후 표적화 능력을 조사함으로써(실시예 3에 기재된 바와 같음) 교차 반응성 인간/뮤린 FAP-표적화, 비태그 VHH B1의 치료적 잠재력을 설명한다. 치료적 잠재력은 인간 FAP-발현 세포에 결합하는 능력(포화 결합 및 세포 저류)을 통해 시험관내에서 그리고 관련 마우

스 모델에서의 생체분포를 평가함으로써 생체내에서 평가된다.

[0794] 제1 파트에서, 시간 경과에 따른 세포 결합 및 저류를 조사함으로써 시험관내 거동을 평가하였다. 생성된 방사성접합체의 결합 잠재력을 평가하여 이것이 VHH의 아미노산 서열로의 ^{225}Ac-DOTA의 도입에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다. 이를 위해, 인간 FAP-발현 GM05389 세포를 0 내지 33 nM 범위 농도의 ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1을 포함하는 연속 희석액과 함께 인큐베이션하였다. 100배 과량의 상응하는 비표지 VHH를 동시에 첨가하여 암 세포에서 발현되는 인간 FAP 수용체를 포화시켜 비-특이적 결합을 평가하였다.

[0795] ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1의 결합은 ^{131}I-SGMIB 및 ^{177}Lu-DTPA 변이체에 대해 관찰된 것과 비슷한 인간 FAP-발현 GM05389 세포에 대한 용량-반응 곡선을 나타내었으며, 이는 ^{225}Ac-DOTA의 도입이 결합 잠재력에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 0.4 ± 0.1 nM의 EC50 값이 수득되었다.

[0796] ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1의 시험관내 세포 저류를 인간 FAP-발현 GM05389 세포에서 평가하였다. 이러한 특정 경우에, 세포를 10 nM ^{1225}Ac-표지 비태그 VHH B1과 함께 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 결합되지 않은 분획을 수집하였다. 100배 과량의 상응하는 비표지 VHH를 사용하여 비-특이적 결합을 평가하였다. 다음으로, 세포를 신선한 배지와 함께 37℃에서 최대 24시간까지 인큐베이션한 후, 해리된 분획을 수집하였다. 그 후, 세포를 0.05 M 글리신(pH 2.8)으로 세척하여 막-결합 분획을 수집하였다. 마지막으로, 세포를 실온에서 1 M NaOH로 가용화하여 내재화 분획을 수집하였다. 막-결합 및 내재화 분획의 합은 총 세포-회합 분획에 해당한다.

[0797] ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1은 인간 FAP-수용체 결합 시 시간 경과에 따라 매우 높은 수준의 세포-연관 활성을 나타낸다. 24시간 인큐베이션 후, 약 80%의 초기 결합 활성이 GM05389 세포에서 여전히 유지되었으며, 이는 교차반응성 인간/뮤린 FAP-표적화 VHH B1의 광범위하고 유지된 표적화 능력을 반영한다(도 7). 이러한 특징은 세포독성 페이로드에 대한 표적 세포의 장기간 노출을 가능하게 하므로, VHH를 사용하는 치료적 적용에 매우 중요하다.

[0798] 다음으로, ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1의 장기적인 생체분포 및 종양 표적화 잠재력을 i.v. 주사 후 4일에 걸쳐 인간 FAP-발현 HEK-293 종양을 가지는 마우스에서 평가하였다. 이를 위해, 무흉선 누드 마우스(시점당 n=3)에 인간 FAP-발현 HEK-293 종양 세포를 목에 피하로 접종하였다. 종양 성장(크기 60.71 ± 39.10 mm^3)의 검증 후, 모든 마우스의 꼬리 정맥에 약 1.6 μCi(± 5 μg)의 ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1을 정맥내 주사하고, 150 mg/kg 젤로푸신을 공동 주사하였다. 다음으로, 주사 후 최대 96시간까지 경추탈구로 마우스를 안락사시키고, 해부한 후 여러 장기 및 조직을 수집하였다. 관심이 있는 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 자동 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주사된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다.

[0799] ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1의 정맥내 주사는 장기 및 조직, 예컨대 창자, 자궁 및 피부에서 약간 상승하였지만 일시적인 흡수(약 2 내지 4%IA/g, 그러나 시간 경과에 따라 감소함)를 나타낸다. 뼈에서의 흡수는 모든 시점에서 약 5%IA/g의 범위이었다(표 24). 신장에서의 활성량은 1시간 후에 13.48 ± 1.58%IA/g의 값으로 적절하였고, 96시간 후에는 약 6.35 ± 1.30%IA/g으로 감소하였다. 종양에서의 흡수는 1시간 후에 3.83 ± 0.53%IA/g의 값으로 유의하였고, 24시간 후에 3.12 ± 0.62%IA/g, 및 96시간 후에 2.54 ± 2.07%IA/g으로 여전히 시간 경과에 따라 높은 상태를 유지하였으며, 이는 ^{131}I-표지 및 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1에 대해 관찰된 것과 비교하여 더 높다. 모든 장기 및 조직에서의 흡수는 모든 시점에서 낮았다.

표 24

[0800] %IA가 사용되는 림프절을 제외하고, 조직 그램당 주사된 활성 %(%IA/g)로 표현된, i.v. 주사 후 최대 96시간까지 ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1에 대한 여러 장기 및 조직에서의 흡수 값. 데이터는 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

장기	1시간		4시간		24시간		72시간		96시간	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	1.14	0.53	1.02	0.46	1.27	0.97	0.57	0.33	0.97	0.38
림프절	0.09	0.02	0.08	0.01	0.07	0.02	0.09	0.00	0.10	0.03
심장	1.10	0.20	0.94	0.13	0.72	0.11	0.70	0.19	0.90	0.09

폐	1.72	1.29	1.56	0.86	0.94	0.21	4.31	2.13	1.91	0.11
간	1.65	0.20	2.08	0.20	2.18	0.44	2.00	0.11	2.12	0.57
췌장	1.07	0.15	0.59	0.05	0.48	0.10	0.51	0.08	0.67	0.18
비장	0.93	0.22	0.68	0.05	0.74	0.18	0.70	0.06	0.79	0.17
신장	13.48	1.58	17.94	1.02	13.74	2.56	8.49	0.79	6.35	1.30
위	0.83	0.17	0.82	0.18	0.76	0.22	0.56	0.07	0.71	0.14
소장	1.16	0.37	0.74	0.02	0.75	0.26	0.62	0.22	0.64	0.16
대장	2.47	0.68	1.67	0.36	2.27	0.89	1.89	0.23	3.05	1.31
자궁	2.60	1.02	2.74	0.69	2.01	0.69	2.70	0.56	1.91	0.47
피부	2.06	0.43	1.53	0.22	1.03	0.54	1.11	0.16	1.51	0.57
근육	1.29	0.28	1.16	0.17	0.85	0.29	1.05	0.33	1.15	0.16
뼈	4.10	0.41	4.10	0.74	3.12	0.62	6.71	3.05	7.05	3.53
종양	3.83	0.53	4.17	0.77	4.25	1.10	2.51	1.10	2.54	2.07
뇌	0.24	0.05	0.19	0.03	0.25	0.06	0.25	0.06	0.37	0.14

[0801] **실시예 10: 비태그 VHH B1의 방사성표지 변이체의 생체분포**

[0802] 실시예 7, 8 및 9에 기재된 결과에 추가적으로, ^{131}I-표지; ^{225}Ac-표지 및 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 장기적인 생체분포 및 종양 표적화 잠재력을 i.v. 주사 후 4일에 걸쳐 인간 FAP를 자연적으로 발현하는 인간 교모세포종 종양(U87 MG)을 가지는 마우스에서 평가하였다. 이를 위해, 무흉선 누드 마우스(시점당 n=3)에 인간 FAP-발현 HEK-293 종양 세포를 목에 피하로 접종하였다. 종양 성장(150 내지 250 mm^3)의 검증 후, 마우스의 꼬리 정맥에 약 80 μCi(± 5 μg)의 ^{131}I-표지; 0.5 μCi(± 5 μg) ^{225}Ac-표지 또는 100 μCi(± 5 μg) ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1을 정맥내 주사하였다. 다음으로, 주사 후 최대 96시간까지 경추탈구로 마우스를 안락사시키고, 해부한 후 여러 장기 및 조직을 수집하였다. 관심이 있는 장기 및 조직의 무게를 측정하고 주사 표준물과 함께 자동 감마 계수기를 사용하여 방사능을 측정하였다. 결과를 주사된 활성(IA)/조직(g)의 %로서 표현하였다.

[0803] ^{131}I-표지 비태그 VHH B1의 정맥내 주사는 장기 및 조직, 예컨대 림프절, 자궁, 뼈 및 피부에서 약간 상승하였지만 일시적인 흡수(약 2 내지 3%IA/g, 그러나 시간 경과에 따라 감소함)를 나타낸다(표 1). 신장에서의 활성량은 3시간 후에 8.64 ± 0.56%IA/g의 값으로 적절했지만, 24시간 후에는 1%IA/g 미만으로 급격히 감소하였다. 종양에서의 흡수는 3시간 후에 10.89 ± 3.81%IA/g의 값으로 유의하였으며, 3시간 후에 이미 신장에서의 흡수를 능가하였다. 모든 다른 장기 및 조직에서의 흡수는 모든 시점에서 낮았다.

[0804] ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1의 투여는 장기 및 조직, 예컨대 림프절, 자궁, 뼈 및 피부에서 약간 상승하였지만 일시적인 흡수(약 2 내지 3%IA/g, 그러나 시간 경과에 따라 감소함)를 나타낸다(표 2). 신장에서의 활성량은 3시간 후에 12.30 ± 0.53%IA/g의 값으로 적절하였고, 24시간 후에는 8.07 ± 1.39%IA/g로, 그리고 96시간 후에는 2.47 ± 0.18%IA/g로 서서히 감소하였다. 종양에서의 흡수는 3시간 후에 5.03 ± 1.74%IA/g의 값으로 유의하였지만, 결코 신장에서의 흡수를 능가하지 못하였다. 모든 다른 장기 및 조직에서의 흡수는 모든 시점에서 낮았다.

[0805] ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 투여는 장기 및 조직, 예컨대 림프절, 자궁, 뼈 및 피부에서 약간 상승하였지만 일시적인 흡수(약 2 내지 3%IA/g, 그러나 시간 경과에 따라 감소함)를 나타낸다(표 3). 신장에서의 활성량은 4시간 후에 42.27 ± 1.58%IA/g의 값으로 적절하였고, 24시간 후에는 28.38 ± 2.02%IA/g로, 그리고 96시간 후에는 5.02 ± 0.53%IA/g로 서서히 감소하였다. 종양에서의 흡수는 4시간 후에 10.52 ± 2.25%IA/g의 값으로 유의하였지만, 결코 신장에서의 흡수를 능가하지 못하였다. 모든 다른 장기 및 조직에서의 흡수는 모든 시점에서 낮았다. ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1에 대한 신장에서의 흡수가 조사된 모든 시점에서 ^{225}Ac-표지 변이체에 대해 수득된 값보다 현저하게 더 많았다는 점은 중요하다.

[0806] 흡수 값으로부터, 시간 경과에 따른 상응하는 종양-대-신장(T/K) 비율을 비태그 VHH B1의 방사성표지 변이체 각각에 대해 계산하였다. 비태그 VHH B1의 ^{131}I-표지 변이체의 경우, 투여부터 3시간 후 시점에 T/K > 1을 수득하였으며, 주사 후 48시간 째에는 피크 값이 11.13 ± 3.02이었다. ^{225}Ac-표지 및 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 경우 둘 다, T/K 비율 > 1이 수득되지 않았지만, ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1의 경우에는 48시간째에 0.79 ± 0.19의 피

크 T/K 비율이 계산된 한편, ^{177}Lu-표지 변이체의 경우에는 72시간 후에 피크 T/K가 단지 0.37 ± 0.05로 측정되었다.

표 25

[0807] %IA가 사용되는 갑상선을 제외하고, 조직 그램당 주사된 활성 %(%IA/g)로 표현된, i.v. 주사 후 최대 96시간까지 ^{131}I-표지 비태그 VHH B1에 대한 여러 장기 및 조직에서의 흡수 값. 데이터는 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	1시간		3시간		6시간		24시간		48시간		72시간		96시간	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	1.48	0.50	0.51	0.02	0.34	0.15	0.03	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
림프절	3.19	0.63	1.32	0.20	1.22	0.38	0.11	0.04	0.03	0.02	0.07	0.01	0.02	0.01
갑상선(%IA)	0.07	0.02	0.05	0.04	0.03	0.04	0.11	0.08	0.11	0.01	0.24	0.05	0.10	0.03
흉선	0.05	0.05	0.51	0.11	0.23	0.03	0.07	0.01	0.02	0.01	0.05	0.06	0.01	0.01
심장	0.68	0.13	0.27	0.01	0.20	0.06	0.03	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00	0.01
폐	0.98	0.13	0.53	0.06	0.28	0.09	0.04	0.01	0.03	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01
간	1.12	0.10	0.73	0.04	1.04	1.03	0.16	0.02	0.13	0.01	0.22	0.01	0.09	0.01
췌장	1.27	0.11	0.47	0.12	0.38	0.18	0.04	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
비장	0.62	0.08	0.85	0.74	0.34	0.14	0.09	0.02	0.05	0.01	0.16	0.07	0.04	0.02
부신	1.85	0.02	0.58	0.40	0.67	0.25	0.07	0.03	0.03	0.01	0.03	0.00	0.03	0.01
신장	43.97	3.61	8.64	0.56	4.68	0.82	0.73	0.18	0.41	0.01	0.62	0.21	0.16	0.02
위	0.79	0.01	0.66	0.35	0.32	0.17	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01
소장	0.70	0.10	0.26	0.07	0.24	0.15	0.03	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
대장	1.31	0.19	0.37	0.04	0.29	0.16	0.02	0.01	0.01	0.00	0.03	0.02	0.02	0.02
자궁	2.39	0.35	1.35	0.22	0.60	0.03	0.13	0.04	0.02	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01
난소	0.98	0.90	0.26	0.23	0.64	0.57	0.05	0.01	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01
피부	3.53	0.29	1.92	0.03	1.35	0.30	0.14	0.08	0.03	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01
근육	1.21	0.18	0.62	0.14	0.53	0.09	0.02	0.02	0.02	0.00	0.04	0.05	0.00	0.00
뼈	2.59	0.29	1.43	0.47	1.16	0.27	0.13	0.03	0.04	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01
관절	4.89	1.31	2.20	0.49	1.80	0.47	0.25	0.05	0.05	0.02	0.04	0.02	0.01	0.00
종양	15.61	2.49	10.89	3.81	12.45	2.30	7.23	6.07	4.53	1.25	5.93	1.00	0.72	0.69
뇌	0.08	0.02	0.04	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
종양-신장 비율	0.35	0.03	1.28	0.52	2.68	0.36	8.96	6.30	11.13	3.02	10.08	2.69	4.78	4.74

표 26

[0808] 조직 그램당 주사된 활성 %(%IA/g)로 표현된, i.v. 주사 후 최대 96시간까지 ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1에 대한 여러 장기 및 조직에서의 흡수 값. 데이터는 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	1시간		3시간		6시간		24시간		48시간		72시간		96시간	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	0.43	0.22	0.20	0.01	0.11	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01
심장	0.27	0.03	0.10	0.01	0.08	0.02	0.04	0.03	0.03	0.00	0.03	0.01	0.02	0.01
폐	0.38	0.01	0.18	0.03	0.15	0.03	0.07	0.00	0.27	0.26	0.02	0.02	0.03	0.01
간	0.33	0.03	0.26	0.01	0.36	0.01	0.41	0.09	0.38	0.04	0.34	0.03	0.42	0.02
췌장	0.45	0.04	0.21	0.03	0.14	0.02	0.05	0.03	0.02	0.01	0.04	0.01	0.02	0.01

비장	0.20	0.03	0.11	0.01	0.11	0.03	0.12	0.05	0.08	0.02	0.06	0.01	0.06	0.01
부신	0.48	0.11	0.25	0.09	0.17	0.13	0.20	0.07	0.10	0.07	0.14	0.10	0.30	0.18
신장	12.41	1.52	12.30	0.53	13.51	1.18	8.07	1.39	4.44	0.51	3.68	0.56	2.47	0.18
위	0.26	0.04	0.13	0.02	0.15	0.06	0.06	0.00	0.04	0.01	0.03	0.02	0.04	0.01
소장	0.22	0.03	0.16	0.05	0.15	0.07	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01
대장	0.34	0.04	0.20	0.03	0.24	0.09	0.06	0.01	0.09	0.03	0.07	0.07	0.06	0.03
자궁	1.13	0.31	0.65	0.10	0.39	0.10	0.28	0.06	0.20	0.14	0.14	0.10	0.13	0.08
난소	0.43	0.08	0.20	0.02	0.07	0.02	0.08	0.03	0.08	0.05	0.07	0.00	0.06	0.01
피부	1.87	0.31	0.94	0.24	0.85	0.16	0.31	0.08	0.14	0.05	0.22	0.08	0.18	0.07
근육	0.45	0.10	0.25	0.03	0.21	0.04	0.09	0.04	0.04	0.03	0.13	0.15	0.03	0.02
뼈	1.34	0.16	0.72	0.65	0.72	0.12	0.73	0.44	0.50	0.18	0.50	0.22	0.25	0.09
관절	2.31	0.68	1.06	0.20	0.96	0.12	0.78	0.22	0.57	0.27	0.79	0.26	0.48	0.05
종양	4.18	0.54	5.03	1.74	6.51	1.77	3.49	0.49	3.44	0.40	1.90	0.17	1.68	0.65
뇌	0.03	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01
종양-신장비율	0.34	0.07	0.41	0.14	0.48	0.09	0.43	0.02	0.79	0.19	0.53	0.11	0.62	0.29

표 27

[0809] 조직 그램당 주사된 활성 %(%IA/g)로 표현된, i.v. 주사 후 최대 96시간까지 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1에 대한 여러 장기 및 조직에서의 흡수 값. 데이터는 평균 ± SD(n = 3)로 제시되어 있다.

	1시간		4시간		6시간		24시간		48시간		72시간		96시간	
장기/조직	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
혈액	0.89	0.07	0.43	0.07	0.27	0.06	0.06	0.02	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
심장	0.33	0.01	0.20	0.03	0.13	0.01	0.06	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00
폐	0.48	0.09	0.27	0.07	0.20	0.03	0.12	0.07	0.08	0.04	0.03	0.01	0.03	0.00
간	0.39	0.08	0.36	0.03	0.37	0.11	0.23	0.06	0.79	1.13	0.09	0.01	0.06	0.02
췌장	0.81	0.08	0.33	0.06	0.25	0.05	0.07	0.01	0.04	0.01	0.02	0.00	0.01	0.00
비장	0.21	0.02	0.19	0.01	0.14	0.02	0.10	0.02	0.06	0.01	0.05	0.00	0.03	0.00
부신	1.05	0.13	0.79	0.04	0.60	0.05	0.30	0.07	0.18	0.06	0.11	0.04	0.09	0.01
신장	28.94	4.27	42.27	1.58	42.16	4.41	28.38	2.02	17.73	1.51	8.87	1.36	5.02	0.53
위	0.33	0.08	0.24	0.02	0.17	0.03	0.09	0.00	0.07	0.03	0.02	0.01	0.02	0.01
소장	0.38	0.10	0.31	0.14	0.14	0.03	0.08	0.02	0.04	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01
대장	0.69	0.10	0.71	0.24	0.25	0.03	0.17	0.01	0.08	0.02	0.05	0.02	0.03	0.00

난소	1.17	0.42	0.63	0.31	0.42	0.07	0.36	0.07	0.19	0.03	0.12	0.03	0.13	0.01
자궁	1.91	0.68	1.13	0.35	0.73	0.11	0.55	0.16	0.24	0.09	0.08	0.04	0.07	0.02
피부	2.36	0.21	1.42	0.06	1.38	0.18	0.40	0.02	0.40	0.36	0.10	0.01	0.06	0.01
근육	0.79	0.06	0.50	0.12	0.60	0.10	0.15	0.00	0.06	0.01	0.05	0.01	0.02	0.01
뼈	1.34	0.20	1.15	0.23	1.07	0.46	0.61	0.12	0.21	0.02	0.14	0.03	0.12	0.01
관절	2.83	0.44	1.88	0.13	1.56	0.24	0.77	0.02	0.40	0.00	0.18	0.07	0.17	0.01
종양	4.56	0.42	10.52	2.25	9.20	0.91	10.12	3.55	4.88	1.29	3.25	0.09	1.39	0.05
뇌	0.05	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00
종양-신장 비율	0.16	0.04	0.25	0.06	0.22	0.00	0.35	0.11	0.27	0.05	0.37	0.05	0.19	0.03

[0810] 종합하면, 이 실시예는 인간 교모세포종 종양(U87 MG)에 대한 천연 인간 FAP-발현의 표적화가 ^{131}I-표지 ^{225}Ac-표지 및 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1을 이용하여 실현 가능하다는 것을 나타낸다. 추가적인 장기 및 조직에서의 방사능의 제한된 저류와 결합된 생체내 종양 표적화 잠재력은 이의 치료적 적용을 뒷받침한다. 비태그 VHH B1의 ^{131}I-변이체에 대해 가장 최적의 생체분포가 수득되었으며, 신장으로부터 빠른 세척과 함께 종양 표적화가 높고 지속되었다. ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1은 신장으로부터의 더 느린 소거와 결합된 높고 지속되는 종양 표적화를 나타내었다. 마지막으로, ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1은 hFAP-발현 인간 교모세포종 종양을 효율적으로 표적화하지만, 비태그 VHH B1의 2가지 다른 방사성표지 변이체와 비교하여 시간 경과에 따라 현저하게 더 많이 신장에서 유지된다.

[0811] **실시예 11: 비태그 VHH B1의 방사성표지 변이체의 치료 효능**

[0812] 이 실시예에서, 본 발명자들은 인간 FAP 발현 종양을 가지는 마우스에서 평가된, ^{131}I-표지; ^{225}Ac-표지 및 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 치료 잠재력을 설명한다. 3가지 모든 경우에서, 확립된 작은 종양을 가지는 마우스를 (i) 고용량 또는 (ii) 저용량의 방사성표지 비태그 VHH B1, (iii) 높은 방사능 선량의 방사성표지 R3B23 또는 마지막으로 (iv) 비히클 용액으로 6회 연속하여 처리하였다. 종양 부피 및 동물 체중을 반복하여 측정하였다. 다음 평가변수 중 하나에 도달하였을 경우, 중간탈락으로 간주하였다: 피하 종양의 경우 (i) 1500 ㎣ 초과의 종양 크기, (ii) 20% 초과의 체중 감소 또는 (iii) 괴사성 종양 조직의 존재.

[0813] ^{131}I-표지 비태그 VHH B1의 경우, 무흉선 누드 마우스(그룹당 n=10)에 인간 FAP를 자연적으로 발현하는 인간 교모세포종 종양(U87 MG)을 피하로 접종하였다. 작은 종양이 확립되었을 때, 마우스의 꼬리 정맥에 약 6000 μCi (± 5 μg) 또는 3000 μCi (± 2.5 μg) ^{131}I-표지 비태그 VHH B1; 6000 μCi(± 5 μg) ^{131}I-표지 R3B23 또는 비히클 용액을 정맥내 주사하였다. 도 1a에 도시한 바와 같이, ^{131}I-표지 비태그 VHH B1으로 처리한 마우스는 ^{131}I-표지 R3B23 또는 비히클 용액으로 처리한 마우스와 비교하여 현저하게 더 오래 살았다($p < 0.0001$, 로그-순위 맨텔-콕스 검정(Log-rank Mantel-cox test)).

[0814] 다음으로, ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1의 치료 효능을 인간 FAP-발현 HEK-293 종양을 보유하는 무흉선 누드 마우스(그룹당 n=10)에서 평가하였다. 작은 종양이 확립되었을 때, 마우스의 꼬리 정맥에 약 6.5 μCi(± 5 μg) 또는 3.25 μCi(± 2.5 μg) ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1; 6.5 μCi(± 5 μg) ^{225}Ac-표지 R3B23 또는 비히클 용액을 정맥내 주사하였다. 도 1b에 도시한 바와 같이, ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1으로 처리한 마우스는 ^{225}Ac-표지 R3B23 또는 비히클 용액으로 처리한 마우스와 비교하여 현저하게 더 오래 살았다($p < 0.0001$, 로그-순위 맨텔-콕스 검

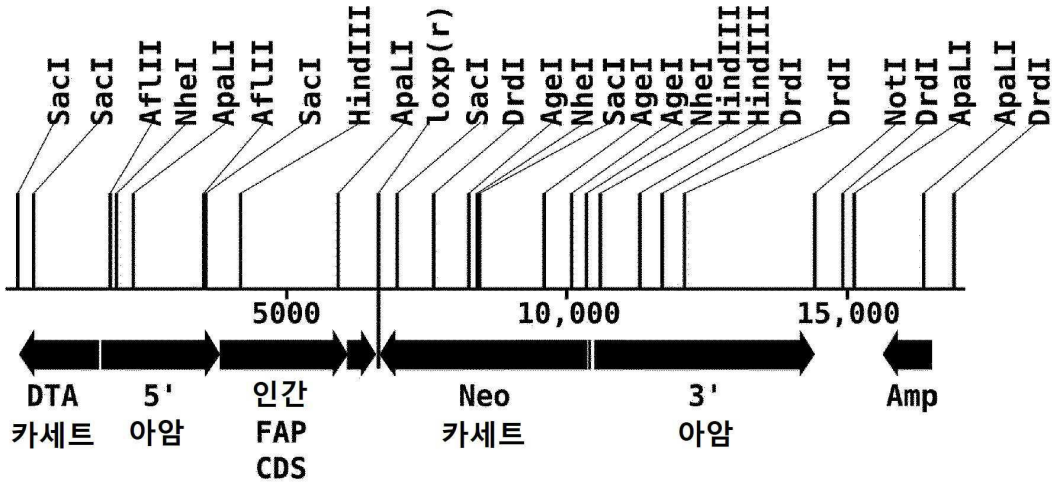
정). 더욱이, 고방사능 ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1을 이용한 처리는 저방사능 ^{225}Ac-표지 비태그 VHH B1과 비교하여 더 효과적이었다($p < 0.005$, 로그-순위 맨텔-콕스 검정).

[0815] 마지막으로, ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1의 치료 효능을 인간 FAP를 자연적으로 발현하는 인간 교모세포종 종양(U87 MG)을 보유하는 무흉선 누드 마우스(그룹당 n=10)에서 평가하였다. 작은 종양이 확립되었을 때, 마우스의 꼬리 정맥에 약 3000 μCi(± 5 μg) 또는 1500 μCi(± 2.5 μg) ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1; 3000 μCi(± 5 μg) ^{177}Lu-표지 R3B23 또는 비히클 용액을 정맥내 주사하였다. 도 1c에 도시한 바와 같이, ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1로 처리한 마우스는 ^{177}Lu-표지 R3B23 또는 비히클 용액으로 처리한 마우스와 비교하여 현저하게 더 오래 살았다($p < 0.0001$, 로그-순위 맨텔-콕스 검정). 더욱이, 고방사능 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1을 이용한 처리는 저방사능 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1과 비교하여 더 효과적이었다($p < 0.05$, 로그-순위 맨텔-콕스 검정).

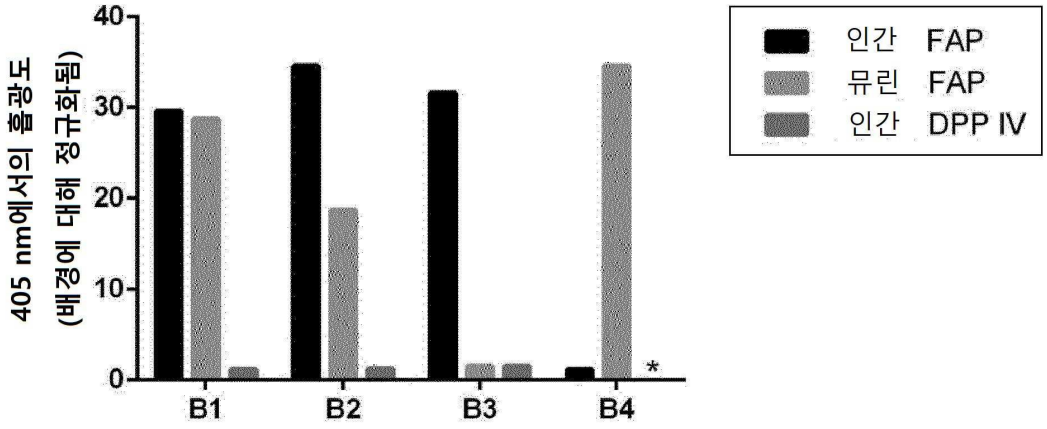
[0816] 결론적으로, ^{131}I-표지, ^{225}Ac-표지 및 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1은 hFAP-발현 종양 이종이식된 마우스 모델에서 효과적인 것으로 밝혀졌다. 실시예 10에 기재된 ^{131}I-표지 변이체에 대한 최적의 T/K 비율은 우수한 치료 잠재력과 조합을 이루며 비태그 VHH B1의 이러한 방사성표지 변이체를 테라노스틱 용도에 대해 바람직한 화합물로 만든다. ^{225}Ac-표지 및 ^{177}Lu-표지 비태그 VHH B1 또한 마우스에서 효과적인 것으로 나타났지만, 실시예 10에 기재된 바와 같이 T/K 비율이 덜 최적이라는 점이 중요하다.

도면

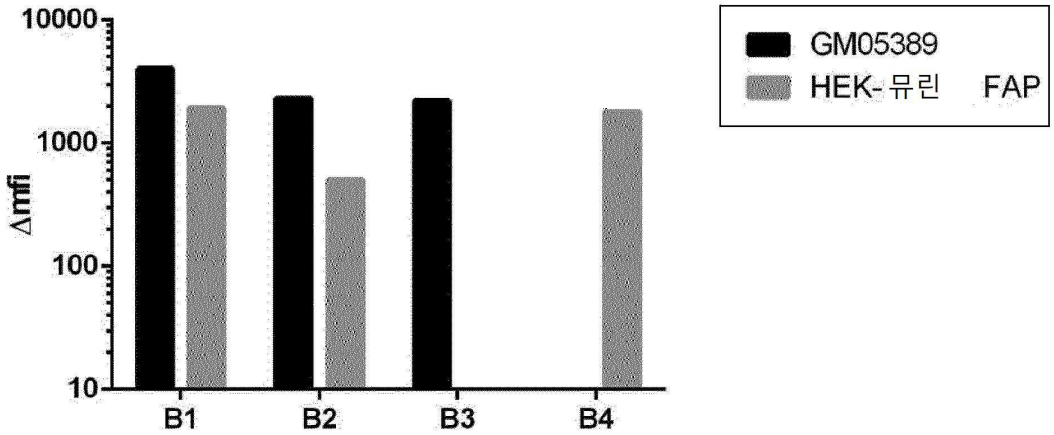
도면1



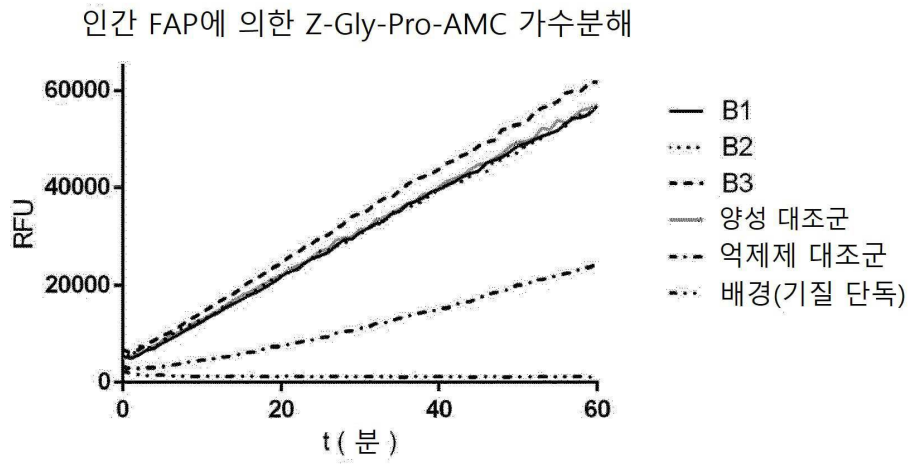
도면2


405 nm에서의 흡광도
(배경에 대해 정규화됨)
40
30
20
10
0
B1
B2
B3
B4
*
인간 FAP
뮤린 FAP
인간 DPP IV

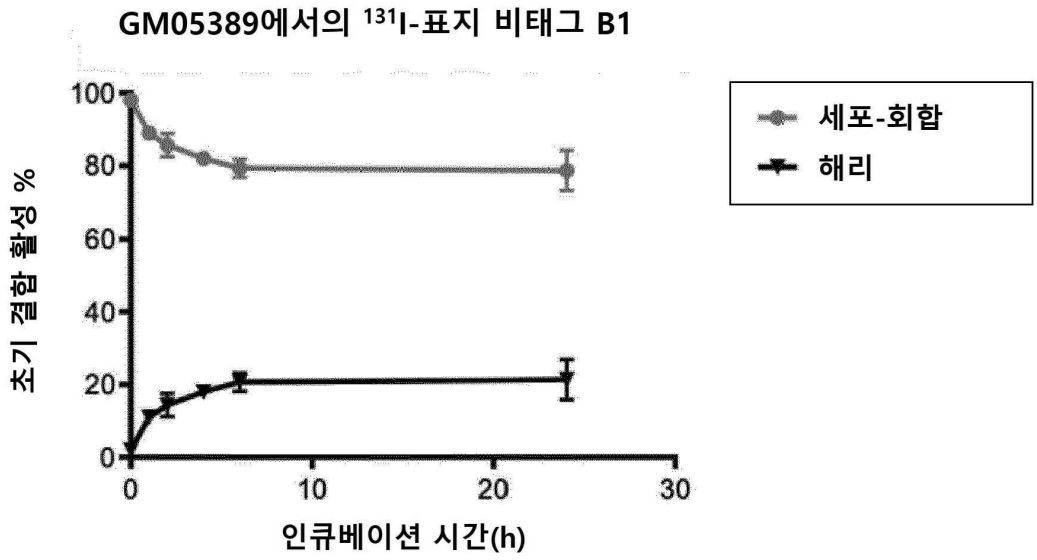
도면3

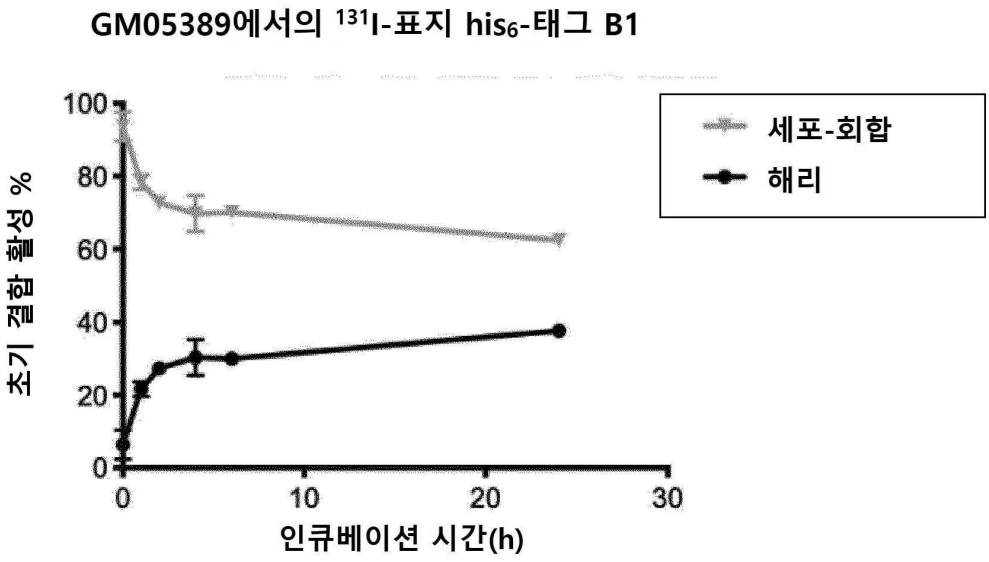

10000
1000
100
10
Δmfi
B1
B2
B3
B4
GM05389
HEK-뮤린 FAP

도면4

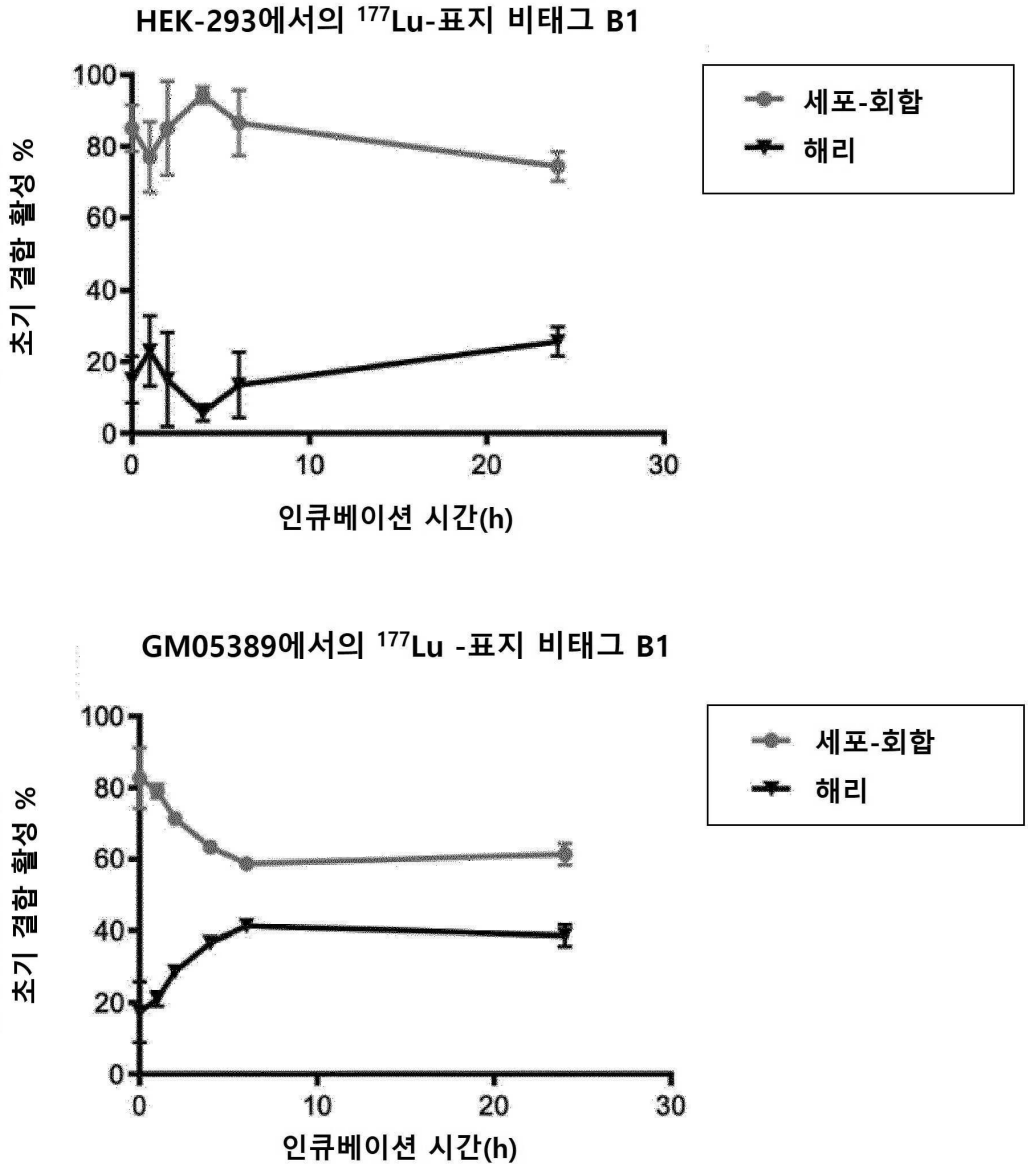

인간 FAP에 의한 Z-Gly-Pro-AMC 가수분해
60000
40000
20000
0
RFU
0
20
40
60
t (분)
B1
B2
B3
양성 대조군
억제제 대조군
배경(기질 단독)

도면5

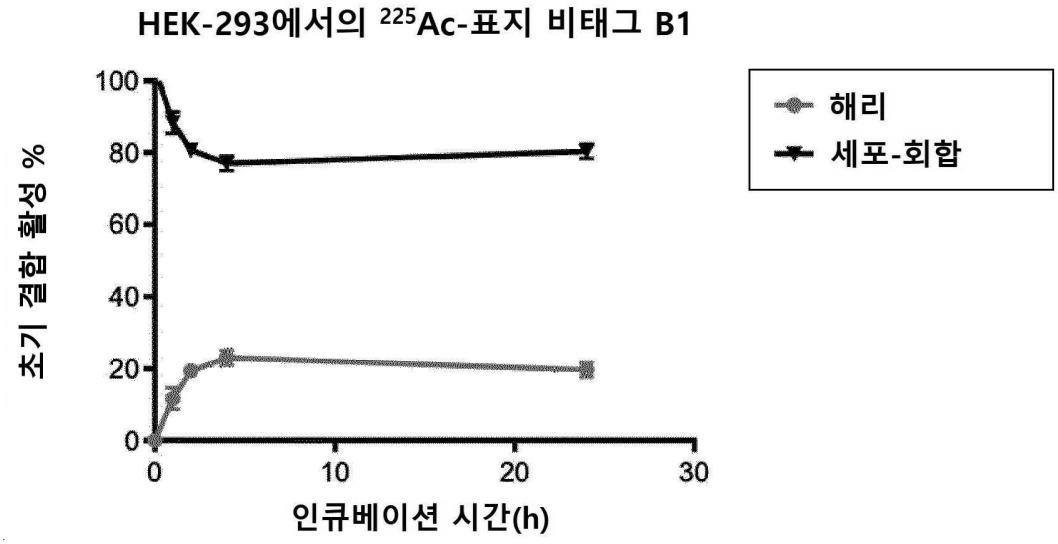

GM05389에서의 ^{131}I-표지 비태그 B1
초기 결합 활성 %
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
인큐베이션 시간(h)
세포-회합
해리


GM05389에서의 ^{131}I-표지 his_6-태그 B1
초기 결합 활성 %
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
인큐베이션 시간(h)
세포-회합
해리

도면6


HEK-293에서의 177Lu-표지 비태그 B1
초기 결합 활성 %
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
인큐베이션 시간(h)
세포-회합
해리
GM05389에서의 177Lu -표지 비태그 B1
초기 결합 활성 %
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
인큐베이션 시간(h)
세포-회합
해리

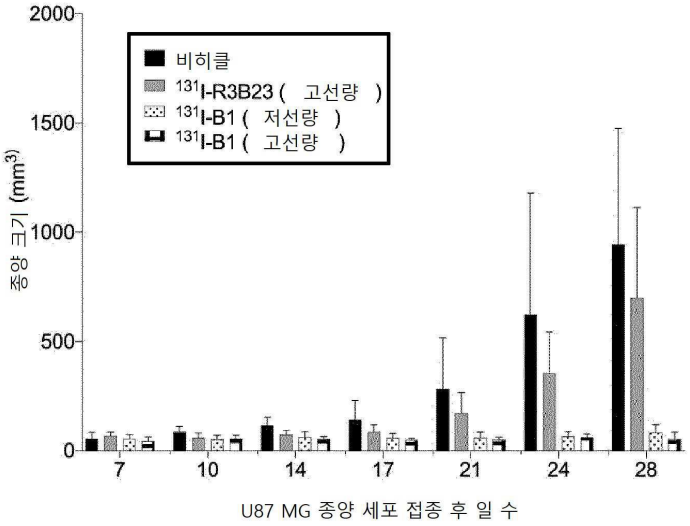
도면7


HEK-293에서의 225Ac-표지 비태그 B1
초기 결합 활성 %
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
인큐베이션 시간(h)
해리
세포-회합

도면8a

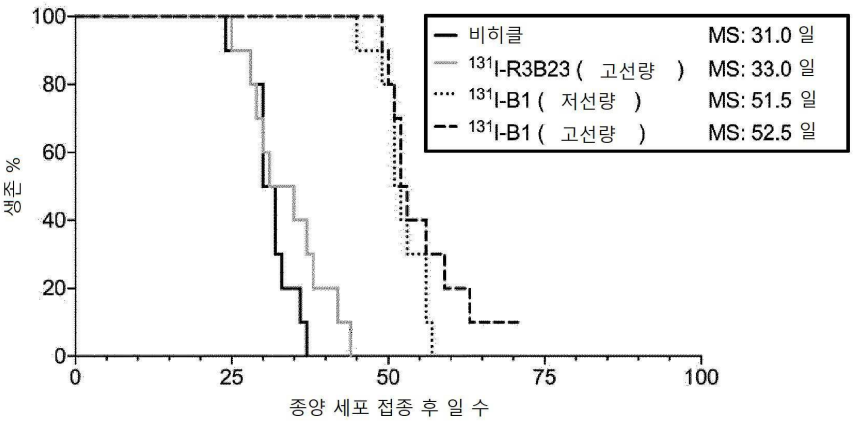
A1

^{131}I-B1로 처리한 후 U87 MG 종양 부하의 진행



A2

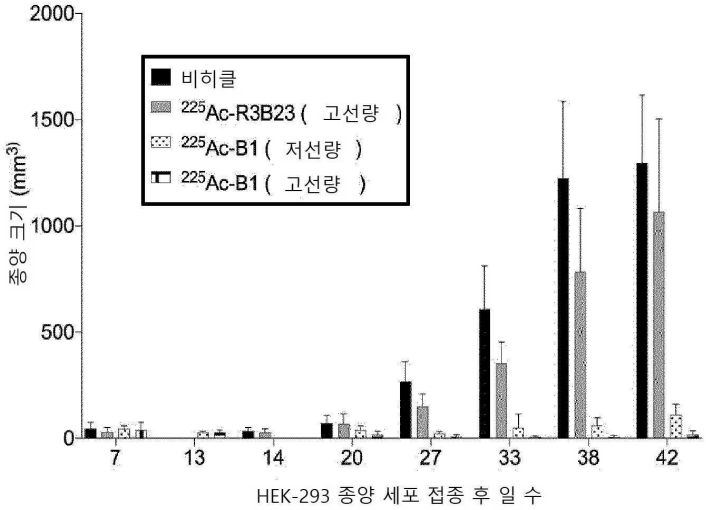
hFAP+ U87 MG 이종이식편을 보유하는 마우스에서
^{131}I-표지 비태그 B1의 생존 곡선



도면8b

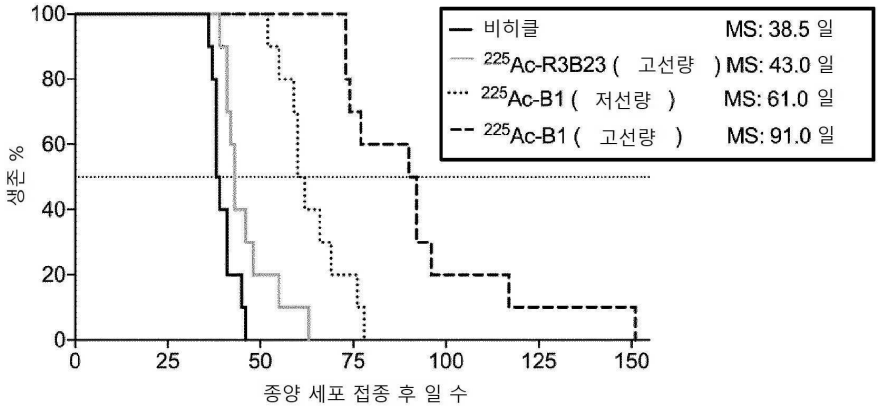
B1

^{225}Ac-B1로 처리한 후 HEK-293 종양 부하의 진행



B2

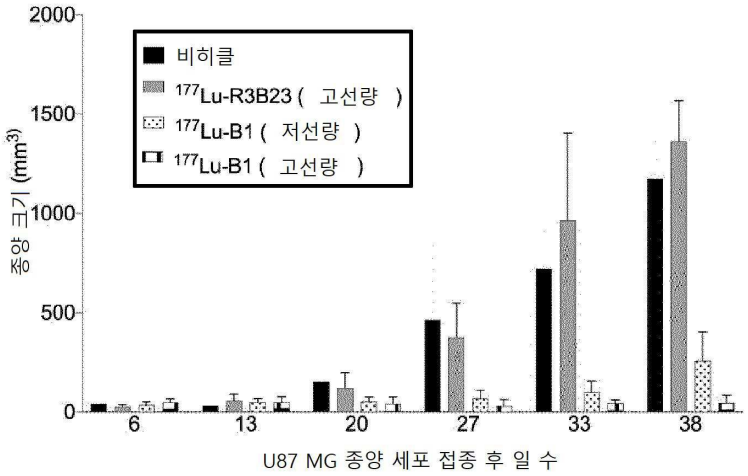
hFAP+ HEK-293 이종이식편을 보유하는 마우스에서
^{225}Ac-표지 비태그 B1의 생존 곡선



도면8c

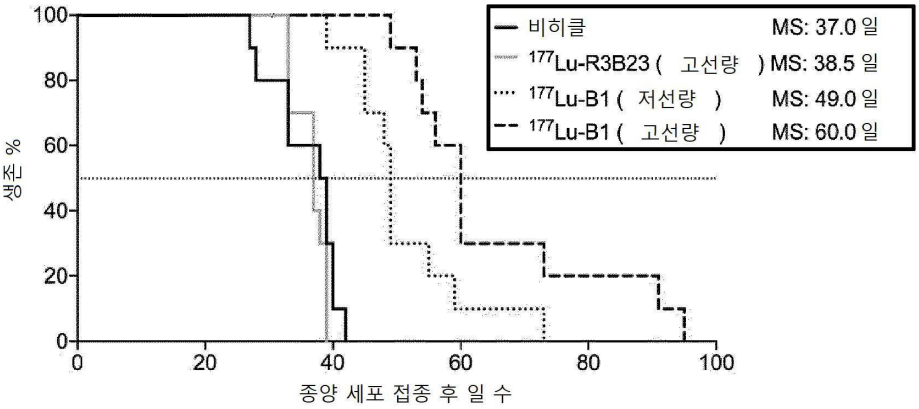
C1

^{177}Lu-B1로 처리한 후 U87 MG 종양 부하의 진행



C2

hFAP+ U87 MG 이종이식편을 보유하는 마우스에서
^{177}Lu-표지 비태그 B1의 생존 곡선



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Precirix N.V.

<120> Antibody fragment against FAP

<130> P6091373PCT

<150> 20195428.6

<151> 2020-09-10

<160> 55

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR1 of B1

<400> 1

Gly Arg Leu Ser Ser Ser Asn Ser

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR2 of B1

<400> 2

Ile Thr Gly Gly Gly Glu Thr

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR3 of B1

<400> 3

Asn Phe Trp Pro Pro Leu Ile Asn Tyr

1 5

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B1

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Leu Ser Ser

20 25 30

Ser Asn Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Val Pro Gly Lys Arg Arg

35 40 45

Glu Leu Val Ala Gly Ile Thr Gly Gly Gly Glu Thr Asn Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75

Asn Gly Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr

80 85 90

Ala Ala Tyr Tyr Cys Asn Phe Trp Pro Pro Leu Ile Asn Tyr Trp

95 100 105

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

110 115

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR1 of B2

<400> 5

Gly Ser Ile Ser Ser Ala Asn Ser

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR2 of B2

<400> 6

Leu Thr Thr Gly Gly Arg Ser

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR3 of B2

<400> 7

Asn Leu Trp Pro Pro Val Gln Gly Tyr
1 5

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B2

<400> 8

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Ile Ser Ser
20 25 30

Ala Asn Ser Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg
35 40 45

Asp Val Val Ala Gly Leu Thr Thr Gly Gly Arg Ser His Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
65 70 75

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr
80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Leu Trp Pro Pro Val Gln Gly Tyr Trp
95 100 105

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR1 of B3

<400> 9

Gly Arg Leu Phe Ser Thr Asn Ala

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR2 of B3

<400> 10

Ile Thr Gly Gly Asp Arg Ser

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR3 of B3

<400> 11

Asn Phe Tyr Pro Pro Ile Val Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B3

<400> 12

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Arg Leu Phe Ser

20 25 30

Thr Asn Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg

35 40 45

Glu Leu Val Ala Gly Ile Thr Gly Gly Asp Arg Ser Asn Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Tyr Pro Pro Ile Val Gly Asp Tyr

95 100 105

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

110 115

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR1 of B4

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR2 of B4

<400> 14

Ile Tyr Ala Asp Gly Asp Met Thr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> CDR3 of B4

<400> 15

Ala Lys Asp Pro Leu Pro Pro Tyr His

1 5

<210> 16

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B4

<400> 16

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Val Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

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

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

50 55 60

Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Leu Pro Pro Tyr His
95 100 105

Val Asn Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 17

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B1 with HA-His6-tag

<400> 17

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Leu Ser Ser
20 25 30

Ser Asn Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Val Pro Gly Lys Arg Arg
35 40 45

Glu Leu Val Ala Gly Ile Thr Gly Gly Gly Glu Thr Asn Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75

Asn Gly Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr

80 85 90

Ala Ala Tyr Tyr Cys Asn Phe Trp Pro Pro Leu Ile Asn Tyr Trp

95 100 105

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Tyr Pro

110 115 120

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Gly Ser His His His His His His

125 130

<210> 18

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B2 with HA-His6-tag

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Ile Ser Ser

20 25 30

Ala Asn Ser Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg

35 40 45

Asp Val Val Ala Gly Leu Thr Thr Gly Gly Arg Ser His Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr

80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Leu Trp Pro Pro Val Gln Gly Tyr Trp

95 100 105

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Tyr Pro

110 115 120

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Gly Ser His His His His His His

125 130

<210> 19

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B3 with HA-His6-tag

<400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Arg Leu Phe Ser

20 25 30

Thr Asn Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg

35 40 45

Glu Leu Val Ala Gly Ile Thr Gly Gly Asp Arg Ser Asn Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Tyr Pro Pro Ile Val Gly Asp Tyr

95 100 105

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Tyr

110 115 120

Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Gly Ser His His His His His His

125 130 135

<210> 20

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B4 with HA-His6-tag

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Leu Pro Pro Tyr His

95 100 105

Val Asn Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Tyr

110 115 120

Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Gly Ser His His His His His His

125 130 135

<210> 21

<211

> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B1 with His6-tag

<400> 21

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Leu Ser Ser

20 25 30

Ser Asn Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Val Pro Gly Lys Arg Arg

35 40 45

Glu Leu Val Ala Gly Ile Thr Gly Gly Gly Glu Thr Asn Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75

Asn Gly Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr

80 85 90

Ala Ala Tyr Tyr Cys Asn Phe Trp Pro Pro Leu Ile Asn Tyr Trp

95 100 105

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His His

110 115 120

His

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B2 with His6-tag

<400> 22

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Ile Ser Ser

20 25 30

Ala Asn Ser Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg

35 40 45

Asp Val Val Ala Gly Leu Thr Thr Gly Gly Arg Ser His Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr

80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Leu Trp Pro Pro Val Gln Gly Tyr Trp

95 100 105

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His His

110 115 120

His

<210> 23

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B3 with His6-tag

<400> 23

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Arg Leu Phe Ser

20 25 30

Thr Asn Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg

35 40 45

Glu Leu Val Ala Gly Ile Thr Gly Gly Asp Arg Ser Asn Tyr Ala

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Phe Tyr Pro Pro Ile Val Gly Asp Tyr

95 100 105

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His

110 115 120

His His

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> B4 with His6-tag

<400> 24

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Val Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

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

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

50 55 60

Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Leu Pro Pro Tyr His
95 100 105

Val Asn Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His
110 115 120

His His

<210> 25

<211> 2283

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> nucleic acid encoding human fibroblast activation protein alpha (FAP), transcript variant 1

<400> 25

atgaagactt gggtaaaaat cgtatttgga gttgccacct ctgctgtgct 50

tgccttattg gtgatgtgca ttgtcttacg cccttcaaga gttcataact 100

ctgaagaaaa tacaatgaga gcactcacac tgaaggatat tttaaatgga 150

acattttctt ataaaacatt ttttccaaac tggatttcag gacaagaata 200

tcttcatcaa tctgcagata acaatatagt actttataat attgaaacag 250

gacaatcata taccattttg agtaatagaa ccatgaaaag tgtgaatgct 300

tcaaattacg gcttatcacc tgatcggcaa tttgtatatc tagaaagtga 350

ttattcaaag ctttggagat actcttacac agcaacatat tacatctatg 400

accttagcaa tggagaattt gtaagaggaa atgagcttcc tcgtccaatt 450

cagtatttat gctggtcgcc tgttgggagt aaattagcat atgtctatca 500

aaacaatatc tatttgaaac aaagaccagg agatccacct tttcaaataa 550

catttaatgg aagagaaaat aaaatattta atggaatccc agactgggtt 600

tatgaagagg aaatgcttgc tacaaaatat gctctctggt ggtctcctaa 650

tggaaaattt ttggcatatg cggaatttaa tgatacggat ataccagtta 700

ttgcctattc ctattatggc gatgaacaat atcctagaac aataaatatt 750

ccatacccaa aggctggagc taagaatccc gttgttcgga tatttattat 800

cgataccact taccctgcgt atgtaggtcc ccaggaagtg cctgttccag 850

caatgatagc ctcaagtgat tattatttca gttggctcac gtgggttact 900

gatgaacgag tatgtttgca gtggctaaaa agagtccaga atgtttcggt 950

cctgtctata tgtgacttca gggaagactg gcagacatgg gattgtccaa 1000

agacccagga gcatatagaa gaaagcagaa ctggatgggc tggtggattc 1050

tttgtttcaa caccagtttt cagctatgat gccatttcgt actacaaaat 1100

atttagtgac aaggatggct acaaacatat tcactatatc aaagacactg 1150

tggaaaatgc tattcaaatt acaagtggca agtgggaggc cataaatata 1200

ttcagagtaa cacaggattc actgttttat tctagcaatg aatttgaaga 1250

ataccctgga agaagaaaca tctacagaat tagcattgga agctatcctc 1300

caagcaagaa gtgtgttact tgccatctaa ggaaagaaag gtgccaatat 1350

tacacagcaa gtttcagcga ctacgccaag tactatgcac ttgtctgcta 1400

cggcccaggc atccccattt ccacccttca tgatggacgc actgatcaag 1450

aaattaaaat cctggaagaa aacaaggaat tggaaaatgc tttgaaaaat 1500

atccagctgc ctaaagagga aattaagaaa cttgaagtag atgaaattac 1550

tttatggtac aagatgattc ttcctcctca atttgacaga tcaaagaagt 1600

atcccttgct aattcaagtg tatggtggtc cctgcagtca gagtgtaagg 1650

tctgtatttg ctgttaattg gatatcttat cttgcaagta aggaagggat 1700

ggtcattgcc ttggtggatg gtcgaggaac agctttccaa ggtgacaaac 1750

tcctctatgc agtgtatcga aagctgggtg tttatgaagt tgaagaccag 1800

attacagctg tcagaaaatt catagaaatg ggtttcattg atgaaaaaag 1850

aatagccata tggggctggt cctatggagg atacgtttca tcactggccc 1900

ttgcatctgg aactggtctt ttcaaatgtg gtatagcagt ggctccagtc 1950

tccagctggg aatattacgc gtctgtctac acagagagat tcatgggtct 2000

cccaacaaag gatgataatc ttgagcacta taagaattca actgtgatgg 2050

caagagcaga atatttcaga aatgtagact atcttctcat ccacggaaca 2100

gcagatgata atgtgcactt tcaaaactca gcacagattg ctaaagctct 2150

ggttaatgca caagtggatt tccaggcaat gtggtactct gaccagaacc 2200

acggcttatc cggcctgtcc acgaaccact tatacaccca catgacccac 2250

ttcctaaagc agtgtttctc tttgtcagac taa 2283

<210> 26

<211> 760

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> human fibroblast activation protein alpha (FAP), transcript variant 1

<400> 26

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala

1 5 10 15

Val Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg

20 25 30

Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys

35 40 45

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

50 55 60

Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn

65 70 75

Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu

80 85 90

Ser Asn Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu

95 100 105

Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys

110 115 120

Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu
125 130 135
Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile
140 145 150
Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val
155 160 165
Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro
170 175 180
Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly
185 190 195
Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr
200 205 210
Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu
215 220 225
Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
230 235 240
Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala
245 250 255
Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr
260 265 270
Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met
275 280 285
Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr
290 295 300
Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val
305 310 315
Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
320 325 330
Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly
335 340 345
Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp
350 355 360
Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys
365 370 375
His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile
380 385 390

Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln
395 400 405

Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly
410 415 420

Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser
425 430 435

Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr
440 445 450

Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val
455 460 465

Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
470 475 480

Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu
485 490 495

Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys
500 505 510

Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro
515 520 525

Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val
530 535 540

Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val
545 550 555

Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
560 565 570

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu
575 580 585

Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln
590 595 600

Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu
605 610 615

Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser
620 625 630

Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile
635 640 645

Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr
650 655 660

Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu
665 670 675

His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg
680 685 690

Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val
695 700 705

His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly
725 730 735

Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His
740 745 750

Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 27

<211> 17086

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> targeting vector

<400> 27

cgcttacaat ttccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 50

gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa aggggatgt 100

gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg 150

ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat 200

tggagctcca ccgcccgggc tggttctttc cgcctcagaa gccatagagc 250

ccaccgcatc cccagcatgc ctgctattgt cttcccaatc tcccccttg 300

ctgtcctgcc ccaccccacc ccccagaata gaatgacacc tactcagaca 350

atgcgatgca atttcctcat tttattagga aaggacagtg ggagtggcac 400

cttccagggt caaggaaggc acgggggagg ggcaaacaac agatggctgg 450

caactagaag gcacagtcga ggctgatcag cgagctctag gatctgcatt 500

ccaccactgc tcccattcat cagttccata ggttggaatc taaaatacac 550

aaacaattag aatcagtagt ttaacacatt atacacttaa aaattttata 600

tttaccttag agctttaaat ctctgtaggt agtttgtcca attatgtcac 650

accacagaag taaggttcct tcacaaagag atcgcctgac acgatttcct 700

gcacaggctt gagccatata ctcatacatc gcatcttggc cacgttttcc 750

acgggtttca aaattaatct caagttctac gcttaacgct ttcgcctgtt 800

cccagttatt aatatattca acgctagaac tcccctcagc gaagggaagg 850

ctgagcacta cacgcgaagc accatcaccg aacctttga taaactcttc 900

cgttccgact tgctccatca acggttcagt gagacttaaa cctaactctt 950

tcttaatagt ttcggcatta tccactttta gtgcgagaac cttcgtcagt 1000

cctggatacg tcactttgac cacgcctcca gcttttccag agagcgggtt 1050

ttcattatct acagagtatc ccgcagcgtc gtatttattg tcggtactat 1100

aaaaacccttt ccaatcatcg tcataatttc cttgtgtacc agattttggc 1150

ttttgtatac ctttttgaat ggaatctaca taaccaggtt tagtcccgtg 1200

gtacgaagaa aagttttcca tcacaaaaga tttagaagaa tcaacaacat 1250

catcaggatc catggcacgc gcttctacaa ggcgctggcc gaagaggtgc 1300

gggagtttca cgccaccaag atctgcggca cgctgttgac gctgttaagc 1350

gggtcgctgc agggtcgctc ggtgttcgag gccacacgcg tcaccttaat 1400

atgcgaagtg gacctgggac cgcgccgccc cgactgcatc tgcgtgttcg 1450

aattcgccaa tgacaagacg ctgggcgggg tttgctcgac attgggtgga 1500

aacattccag gcctgggtgg agaggctttt tgcttcctct tgcaaaacca 1550

cactgctcga cattgggtgg aaacattcca ggcctgggtg gagaggcttt 1600

ttgcttcctc ttgaaaacca cactgctcga tttgttagca gcctcgaatc 1650

aacccgggcg atcctaggcg atgagatcta gctgtcgcga agagtggcgc 1700

gccacccagt cacatcctcc ttaaaacagt tcaaacagct agaactatcc 1750

cagatgttct agttagattc aaccagcttt ctaaagaaaa tacaaacata 1800

aataaaatgt ttattcaacc ttaaaatgtc cccgtatact agtactttca 1850

acttaatgtt gcttcttaag atgtcccaat ttctccataa aacctgtcag 1900

acgagtcttt ggagtcctaa gtggtaccca ttaccagtca tgtgacaatg 1950

attaattgct aaagctagca gtatgcattt taattatacc ttaatcactt 2000

attgcattta gtttctgtct agtaaaggag gtcttgggaa tcactcacta 2050

caaaggactt gctgattttt ttgggggtgg ggggtggggg ggtgggcgtt 2100

ggcgagctgg gacagaagtt ctgagaaagt actatgtgga tgttccaaag 2150

aaagcaacaa atttgagaag accctctaga gggcagttca catgggaccc 2200

ggctgatggc tttctctcgg attgacgcct cacaatcaag gcacatggag 2250

atgtcagtaa gtgcactgta cacctgtgat gatgcctggt actgcttcaa 2300

tttgtaaatc gatagctcat taaccgcatg gggagtggga ttcatccggg 2350

agctgcagtg ggctttgaat actcttctct gccaatgcat actagtgact 2400

cactctgctc accagaactt tcctaaggct agaattcagg gacagctgtc 2450

tggagaatgg cagggaggaa gttcacaagc cactgtgctg gtttgtggtg 2500

gagaaagttt cctgtggcag ccagaccagt caactaaagc aaacagcaac 2550

acagaacagt gatgttttct cgttatttttt catgcacagt ttgtgaaaga 2600

tcagcatgaa acttagcata gtcaggcaaa agatattaca aacttcttga 2650

gaaagccagc aatggaaaaa ctggagacac catattctag caacagtatc 2700

catgtggaaa ccaggaatct gccctaggaa attgctctgg accacagaga 2750

aggtttaaaa aaaaattgtg tctgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 2800

ttgtgaattc agtcatttta ctgatctgcc aagatgaccg atcactttga 2850

aatatgtgga cttagccaaa atgaagtaca catgacttct cttttcactt 2900

gccttttttaa aatttatttt aaggtcttta taattactaa atgttctcct 2950

ttctcagaag atattctgag agcaaagcaa aaatatcact cttgtaaagc 3000

catttccatt cttccaaagg tctgctggca aattattccc gctgatcttt 3050

ccatctttct agcctgtgca aacacaccta acccatacta catttcaaca 3100

gatggcgctt catttcttta aaggaaagca gccgtgggtt tagacagttg 3150

aatttttaaa cttctgtatt tactgaaagt gcatatggtg ctatacggac 3200

aaagaaattg tgctgaaaga aaaacatttg tgcctgcagc acctcatagg 3250

ctcccgggag aagagtgtgc agtcacaccg tgtacctctc acaaagccgg 3300

atttggctcc actgttcttc ccttccccaa acatttgata tgtacaatgc 3350

accctcaaaa agtttctcca tttgaaatcc ttcctctcag ctgcaaacaa 3400

gaggagtgta gaaaagattg ttactaaagt gactcgagtg atttttgagg 3450

agaatatgaa atataaacct gaacaacaac aaaaaggtga aataaaacgg 3500

cctctgtatg acaacttaag cagatgttgg tgtaaattta caaggatgag 3550

agagctctag agcctccctc cagccactca tagttcactt aaaggccaag 3600

aacgccccca aaatctgttt ctaattttac agaaatcttt cgaaatttgg 3650

cacggtagtc aaaagtccgt gggaaaggga ggaggggagc gggaagcaac 3700

tcatgtcctg acttcagctt ccaagtggaa gacagacttg cttcttttca 3750

acagttttca cagatgcggt gacccacgct gtgcagtgag aatcagctaa 3800

cttgcaaaaa catctggaaa aatgaagact tgggtaaaaa tcgtatttgg 3850

agttgccacc tctgctgtgc ttgccttatt ggtgatgtgc attgtcttac 3900

gcccttcaag agttcataac tctgaagaaa atacaatgag agcactcaca 3950

ctgaaggata ttttaaatgg aacattttct tataaaacat tttttccaaa 4000

ctggatttca ggacaagaat atcttcatca atctgcagat aacaatatag 4050

tactttataa tattgaaaca ggacaatcat ataccatttt gagtaataga 4100

accatgaaaa gtgtgaatgc ttcaaattac ggcttatcac ctgatcggca 4150

atttgtatat ctagaaagtg attattcaaa gctttggaga tactcttaca 4200

cagcaacata ttacatctat gaccttagca atggagaatt tgtaagagga 4250

aatgagcttc ctcgtccaat tcagtattta tgctggtcgc ctgttgggag 4300

taaattagca tatgtctatc aaaacaatat ctatttgaaa caaagaccag 4350

gagatccacc ttttcaaata acatttaatg gaagagaaaa taaaatattt 4400

aatggaatcc cagactgggt ttatgaagag gaaatgcttg ctacaaaata 4450

tgctctctgg tggtctccta atggaaaatt tttggcatat gcggaattta 4500

atgatacgga tataccagtt attgcctatt cctattatgg cgatgaacaa 4550

tatcctagaa caataaatat tccataccca aaggctggag ctaagaatcc 4600

cgttgttcgg atatttatta tcgataccac ttaccctgcg tatgtaggtc 4650

cccaggaagt gcctgttcca gcaatgatag cctcaagtga ttattatttc 4700

agttggctca cgtgggttac tgatgaacga gtatgtttgc agtggctaaa 4750

aagagtccag aatgtttcgg tcctgtctat atgtgacttc agggaagact 4800

ggcagacatg ggattgtcca aagacccagg agcatataga agaaagcaga 4850

actggatggg ctggtggatt ctttgtttca acaccagttt tcagctatga 4900

tgccatttcg tactacaaaa tatttagtga caaggatggc tacaaacata 4950

ttcactatat caaagacact gtggaaaatg ctattcaaat tacaagtggc 5000

aagtgggagg ccataaatat attcagagta acacaggatt cactgtttta 5050

ttctagcaat gaatttgaag aataccctgg aagaagaaac atctacagaa 5100

ttagcattgg aagctatcct ccaagcaaga agtgtgttac ttgccatcta 5150

aggaaagaaa ggtgccaata ttacacagca agtttcagcg actacgccaa 5200

gtactatgca cttgtctgct acggcccagg catccccatt tccacccttc 5250

atgatggacg cactgatcaa gaaattaaaa tcctggaaga aaacaaggaa 5300

ttggaaaatg ctttgaaaaa tatccagctg cctaaagagg aaattaagaa 5350

acttgaagta gatgaaatta ctttatggta caagatgatt cttcctcctc 5400

aatttgacag atcaaagaag tatcccttgc taattcaagt gtatggtggt 5450

ccctgcagtc agagtgtaag gtctgtattt gctgttaatt ggatatctta 5500

tcttgcaagt aaggaaggga tggtcattgc cttggtggat ggtcgaggaa 5550

cagctttcca aggtgacaaa ctcctctatg cagtgtatcg aaagctgggt 5600

gtttatgaag ttgaagacca gattacagct gtcagaaaat tcatagaaat 5650

gggtttcatt gatgaaaaaa gaatagccat atggggctgg tcctatggag 5700

gatacgtttc atcactggcc cttgcatctg gaactggtct tttcaaatgt 5750

ggtatagcag tggctccagt ctccagctgg gaatattacg cgtctgtcta 5800

cacagagaga ttcatgggtc tcccaacaaa ggatgataat cttgagcact 5850

ataagaattc aactgtgatg gcaagagcag aatatttcag aaatgtagac 5900

tatcttctca tccacggaac agcagatgat aatgtgcact ttcaaaactc 5950

agcacagatt gctaaagctc tggttaatgc acaagtggat ttccaggcaa 6000

tgtggtactc tgaccagaac cacggcttat ccggcctgtc cacgaaccac 6050

ttatacaccc acatgaccca cttcctaaag cagtgtttct ctttgtcaga 6100

ctaatcctca ggtgcaggct gcctatcaga aggtggtggc tggtgtggcc 6150

aatgccctgg ctcacaaata ccactgagat ctttttccct ctgccaaaaa 6200

ttatggggac atcatgaagc cccttgagca tctgacttct ggctaataaa 6250

ggaaatttat tttcattgca atagtgtgtt ggaatttttt gtgtctctca 6300

ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat ttaaaacatc agaatgagta 6350

tttggtttag agtttggcaa catatgccca tatgctggct gccatgaaca 6400

aaggttggct ataaagaggt catcagtata tgaaacagcc ccctgctgtc 6450

cattccttat tccatagaaa agccttgact tgaggttaga tttttttttat 6500

attttgtttt gtgttatttt tttctttaac atccctaaaa ttttccttac 6550

atgttttact agccagattt ttcctcctct cctgactact cccagtcata 6600

gctgtccctc ttctcttatg gagatcctcg agggacctaa taacttcgta 6650

tagcatacat tatacgaagt tatattaagg gttccgcaag ctctagtcga 6700

gccccagctg gttctttccg cctcagaagc catagagccc accgcatccc 6750

cagcatgcct gctattgtct tcccaatcct ccccccttgct gtcctgcccc 6800
accccacccc ccagaataga atgacaccta ctcagacaat gcgatgcaat 6850
ttcctcattt tattaggaaa ggacagtggg agtggcacct tccagggtca 6900
aggaaggcac gggggagggg caaacaacag atggctggca actagaaggc 6950
acagtcgagg ctgatcagcg agctctagag aattgatccc ctcagaagaa 7000
ctcgtcaaga aggcgataga aggcgatgcg ctgcgaatcg ggagcggcga 7050
taccgtaaag cacgaggaag cggtcagccc attcgccgcc aagctcttca 7100

gcaatatcac gggtagccaa cgctatgtcc tgatagcggt ccgccacacc 7150
cagccggcca cagtcgatga atccagaaaa gcggccattt tccaccatga 7200
tattcggcaa gcaggcatcg ccatgggtca cgacgagatc atcgccgtcg 7250
ggcatgcgcg ccttgagcct ggcgaacagt tcggctggcg cgagcccctg 7300
atgctcttcg tccagatcat cctgatcgac aagaccggct tccatccgag 7350
tacgtgctcg ctcgatgcga tgtttcgctt ggtggtcgaa tgggcaggta 7400
gccggatcaa gcgtatgcag ccgccgcatt gcatcagcca tgatggatac 7450

tttctcggca ggagcaaggt gagatgacag gagatcctgc cccggcactt 7500
cgcccaatag cagccagtcc cttcccgctt cagtgacaac gtcgagcaca 7550
gctgcgcaag gaacgcccgt cgtggccagc cacgatagcc gcgctgcctc 7600
gtcctgcagt tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg acaaaaagaa 7650
ccgggcgccc ctgcgctgac agccggaaca cggcggcatc agagcagccg 7700
attgtctgtt gtgcccagtc atagccgaat agcctctcca cccaagcggc 7750
cggagaacct gcgtgcaatc catcttgttc aatggccgat cccatggttt 7800

agttcctcac cttgtcgtat tatactatgc cgatatacta tgccgatgat 7850
taattgtcaa caggctgcag gtcgaaaggc ccggagatga ggaagaggag 7900
aacagcgcgg cagacgtgcg cttttgaagc gtgcagaatg ccgggcctcc 7950
ggaggacctt cgggcgcccg ccccgcccct gagcccgccc ctgagcccgc 8000
ccccggaccc acccccttccc agcctctgag cccagaaagc gaaggagcaa 8050
agctgctatt ggccgctgcc ccaaaggcct acccgcttcc attgctcagc 8100
ggtgctgtcc atctgcacga gactagtgag acgtgctact tccatttgtc 8150

acgtcctgca cgacgcgagc tgcggggcgg gggggaactt cctgactagg 8200

ggaggagtag aaggtggcgc gaaggggcca ccaaagaacg gagccggttg 8250

gcgcctaccg gtggatgtgg aatgtgtgcg aggccagagg ccacttgtgt 8300

agcgccaagt gcccagcggg gctgctaaag cgcatgctcc agactgcctt 8350

gggaaaagcg cctcccctac ccggtagaat ttcgacgacc tgcagccaag 8400

ctagcttcgc gagctcgacc gaacaaacga cccaacaccc gtgcgtttta 8450

ttctgtcttt ttattgccgc tcagctttac agtgacaatg acggctggcg 8500

actgaatatt agtgcttaca gacagcacta catattttcc gtcgatgttg 8550

aaatcctttc tcatatgtca ccataaatat caaataatta tagcaatcat 8600

ttacgcgtta atggctaatc gccatcttcc agcaggcgca ccattgcccc 8650

tgtttcacta tccaggttac ggatatagtt catgacaata tttacattgg 8700

tccagccacc agcttgcatg atctccggta ttgaaactcc agcgcgggcc 8750

atatctcgcg cggctccgac acgggcactg tgtccagacc aggccaggta 8800

tctctgacca gagtcatcct tagcgccgta aatcaatcga tgagttgctt 8850

caaaaatccc ttccagggcg cgagttgata gctggctggt ggcagatggc 8900

gcggcaacac catttttct gacccggcaa aacaggtagt tattcggatc 8950

atcagctaca ccagagacgg aaatccatcg ctcgaccagt ttagttaccc 9000

ccaggctaag tgccttctct acacctgcgg tgctaaccag cgttttcgtt 9050

ctgccaatat ggattaacat tctcccaccg tcagtacgtg agatatcttt 9100

aaccctgatc ctggcaattt cggctatacg taacagggtg ttataagcaa 9150

tccccagaaa tgccagatta cgtatatcct ggcagcgatc gctattttcc 9200

atgagtgaac gaacctggtc gaaatcagtg cgttcgaacg ctagagcctg 9250

ttttgcacgt tcaccggcat caacgttttc ttttcggatc cgccgcataa 9300

ccagtgaaac agcattgctg tcacttggtc gtggcagccc ggaccgacga 9350

tgaagcatgt ttagctggcc caaatgttgc tggatagttt ttactgccag 9400

accgcgcgcc tgaagatata gaagataatc gcgaacatct tcaggttctg 9450

cgggaaacca tttccggtta ttcaacttgc accatgccgc ccacgaccgg 9500

caaacggaca gaagcatttt ccaggtatgc tcagaaaacg cctggcgatc 9550

cctgaacatg tccatcaggt tcttgcgaac ctcatcactc gttgcatcga 9600

ccggtaatgc aggcaaattt tggtgtacgg tcagtaaatt ggacaccttc 9650

ctcttcttct tgggcatggc cgcaggaaag cagagccctg aagctcccat 9700

caccggccaa taagagccaa gcctgcagtg tgacctcata gagcaatgtg 9750

ccagccagcc tgaccccaag ggccctcagg cttgggcaca ctgtctctag 9800

gaccctgaga gaaagacata cccatttctg cttagggccc tgaggatgag 9850

cccaggggtg gcttggcact gaagcaaagg acactggggc tcagctggca 9900

gcaaagtgac caggatgctg aggctttgac ccagaagcca gaggccagag 9950

gccaggactt ctcttggtcc cagtccaccc tcactcagag ctttaccaat 10000

gccctctgga tagttgtcgg gtaacggtgg acgccactga ttctctggcc 10050

agcctaggac ttcgccattc cgctgattct gctcttccag ccactggctg 10100

accggttgga agtactccag cagtgccttg gcatccaggg catctgagcc 10150

taccaggtcc ttcagtacct cctgccaggg cctggagcag ccagcctgca 10200

acacctgcct gccaagcaga gtgaccactg tgggcacagg ggacacaggg 10250

tggggcccac aacagcacca ttgtccactt gtccctcact agtaaaagaa 10300

ctctagggtt gcgggggtg ggggaggtct ctgtgaggct ggtaagggat 10350

atttgcctgg cccatggagc tagcttggct ggacgtaaac tcctcttcag 10400

acctaataac ttcgtatagc atacattata cgaagttata ttaagggtta 10450

ttgaatatga tcggaattgg gctgcaggaa ttcgatagct tggctgcagg 10500

tcgacactgg cgatgtaagg gtaggaagag ctttacagtg ttatttcagc 10550

aacagaaaaa cctgagagct attctgtacc cctcccacca ccccccaaa 10600

atacacgcag aagacaagct ttgataggcc tctcaagact gtatttttaa 10650

ctagcattgt tttctattac tagatttgcc tggtagcaag aaaaaaaata 10700

atgagtaaga atagaaacgt taaaaaaaga acctatggag gctttgaaat 10750

cactaaatag tgcttccaaa aaatttaagg aagatgttca gaatagaaat 10800

ctcaggaata gccatatagg aaaagtaaaa ctcttgttct atatatagta 10850

gcaattagtc attcaattaa gaggcttgtt acagttacgc aaacattatc 10900

aaggtaaatt ggttggggtg tttgtttgtt tgtttgtttg ttttttattt 10950

ttacagaaag gcttaggctg gcaacaatgt cacttgactg agacctagaa 11000

gatgttatgc actgattttg aaactagttt taattttaat attatccatt 11050

ggtaataaac tatgccccta ttattccaaa ccttcttatg aacagcaatg 11100

tatgcttcta aagcagagat gtaatgtaac agtgacagag actgtactat 11150

aggatctggg aagaacaaat gctccgagtt gatcagaacc agggaacgtc 11200

tgtggttaaa gtgaacggac tctgaacaag ggttagtggt ccagcctgaa 11250

ccagcaaaca cgtcagtcct gaattctctg ttgcttttta aaattgaaac 11300

atgtacaacg tacaaaagct tgaagagttc aaaaatgtcc acatcctttc 11350

acagaattgc aatgtgcagg ataacctgat gaaggcagtc tccttggagc 11400

tgcactttta atttttagct tgcatcttca tgtcctaaag cacaagattt 11450

cccctgggcc atcaaggtgt atcctcctat tgtcatttta ttaagctaga 11500

ctctcacctc aattcttaga ggacacactg cctccaacca ggagcttctg 11550

agtgcctggc caggtctctg acccctttaa tccagtctag tagaaatcag 11600

cctctggctt ttgcatacac ttaccagagc ttgagatgga tattctgctc 11650

cctcaaaaat taacagtttt tggaagcaaa agtacatgaa ttttgttgag 11700

acagactttt ctgtccacaa gtgttgccct ttggactttg aagaatattc 11750

ccaatgagaa gcatatttat ccattgcaaa tagcatataa ggatagatat 11800

ttgggtctat acttacattt atagatatag acatttgtgt aattacatat 11850

aatcccaatc tttatcttct ttccaagttt ttttatgaat agcatactca 11900

aaaatatgtt ataaactata tataacataa aagtcctgtg ttttttttata 11950

acatagattt ctattttcaa tggaaaagat aattctctaa gtaatttcct 12000

gttattgtga aataatcaaa ttaacctcaa gatgaattat tttgcattca 12050

tttacttctt ctgcagaagt aaacaatgct taggcctgct gtctggactg 12100

taaagtcact gcctcttcat tattacggac acctcagcat gtcacctgag 12150

cagcattgtc ttcttgtgcc cataccttca ccatgtccag gctggggacc 12200

aggcccaact ttactcacat ttcttccatg ggaaggaatg aagtaaaaag 12250

tatgaaaaag taaagacttc ccatgggaag tcaaggaaaa gtagcaatgg 12300

aacagaaagg agaagaaaaa gctaggtagg cccctatacc acttcgtcag 12350

aaatgtcacc actgtacgtt tgtctcctgt gcccttgggt tgctagtcca 12400

ggagctactt gacaaggtaa cagaagtcaa gaaatatcca tctattccat 12450

tatttataaa ctaaatgtac tgggttcccc aaaatacctc ctatcacttg 12500

ctgttgctga agttacaaag ttcagtagtc tcaatttccc tcagacaggc 12550

aaacaaggaa taatttgtca ttctacacac cctaaaacac atggccacag 12600

ccatcattat ggagaaatgt ctctgtcgct caagtataag tgaaatgaat 12650

agagttgggg cgtaggggtc ttttcattcc caggtggaag tccacaaaga 12700

atcagccttc actttagaga agttttgggg gggggggggg agagagcaga 12750

cacagacagt aagaatgagt ggaagtggag tagtgaatga gaatgcctgt 12800

ttaactcact tacatattaa aaataaatgt gttgcagctc tttctggaaa 12850

tcctaaggta tttcattttc attttaattt taatctaaac tgaagacaaa 12900

catgcctttg tgccctgcag gccatgtggt ccttggcttc tgccccttca 12950

cctgactgac tccctttatt ttcctgcctc catttattct ctcttgagga 13000

ttttttttttc cttgcaccct tacaccagta tgaagatgga accaggtaaa 13050

aagtcagcac aatatccctt ggcttccctt tgtctaccct gatgccaatc 13100

atacagactt tcttgcttca agagatttac aaagatgatg aaaataaaaa 13150

ccagaactag aaagtttcag aggccttaga attaaaaaaa aaatctctat 13200

agccttcttt gagtcatgat ttacatttta tgaatatcac cctttcttcc 13250

tccatttgtt tgtttgtttg tttattggtt tttgtggtac attaccctat 13300

ggagtgatat ataagcactc aatacatgtt agctataatt ttacacattt 13350

atttatttta tatgtgtgcc tctgtgtatg tatgtaggca tggttgtaag 13400

gatgtcagag ggcaatctgt aggggttgat tctttccttc taccatagga 13450

gttcctgaga ccaaactcag gtagtcaggc ctactggctg tcacctttac 13500

ttgctaaacc atctcaattt cccaactatg atttttttaa tttcaaaatt 13550

tatcacacaa aagaaattgt gcctacaact ctctctcttt tcttttacct 13600

cctaatatgg ggatctatat gtgataaaat atgtttctta gacttttctg 13650

tttggtatat taatttttta aacattttct cctgaattct ggtcgtagtc 13700

accattactc ttgagtgtta ccctatacta tactcggcct gcttggacct 13750

aaagcaataa atagtttaga aacgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 13800

agagagagag agagagagag agagagagag agagagacag agacagagac 13850

agagacagag acagagagac acagagacaa agagagggag ccttaaaata 13900

aaaaaaaaca cagaaagaaa aggggagttg ggggcagaaa gataagggga 13950

gttggggtgt gaagatgaag aagagaaagc aaaaaggaca caccatgtgg 14000

aagatcacag agtctctgga agtgtgactc tggtgcttcc taaggaagtt 14050

caggcactgc cactttagcc ttgagccatc ccgactttct cttctctgcc 14100

tttgcactct cttcctctgt tggccatagc tgtcaatttg gcttaataca 14150

ttttctggaa atttgtattg gatgccaatt ttaaagtcag atttcacatt 14200

aaaaaaatga agacttgggc tgttttacaa agtacttgcc acagcagctt 14250

cttattccct aggtctgaaa gtagtctgtt ctggccgcca ggacaacttg 14300

aacagaactt tattttctca cagttctgag gtttggaagt ctaagatcaa 14350

agtgccaact tgtttcttcc tgtagactgc ctttggctta caggccactg 14400

tatccttgct agacctttcc cttatggcgg ccgcgtacca gcttttgttc 14450

cctttagtga gggttaattt cgagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt 14500

ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc 14550

ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac 14600

attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt 14650

gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 14700

attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt 14750

tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 14800

ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 14850

caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag 14900

gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 14950

ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 15000

tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 15050

cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 15100

ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 15150

gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct 15200

tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 15250

gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg 15300

aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg 15350

cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat 15400

ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag 15450

cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 15500

tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 15550

tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 15600

tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag 15650

ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc 15700

gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg 15750

gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagacccacg 15800

ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 15850

agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 15900

tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa 15950

cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta 16000

tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 16050

cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt 16100

cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 16150

ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt 16200

gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 16250

ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 16300

taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 16350

atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa 16400

ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 16450

caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt 16500

tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 16550

ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 16600

aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgcgccc 16650

tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 16700

cgctacactt gccagcgccc tagcgcccgc tcctttcgct ttcttccctt 16750

cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg 16800

ctcccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa 16850

acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg 16900

tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg 16950

ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 17000

ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt 17050

aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa tattaa 17086

<210> 28

<211> 745

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> human FAP recombinant protein

<400> 28

Gly Ser His His His His His His Gly Ser Leu Arg Pro Ser Arg
1 5 10 15

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

80 85 90
Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys
95 100 105
Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu
110 115 120
Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile
125 130 135
Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val
140 145 150

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

230 235 240

Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr

245 250 255

Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met

260 265 270

Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr

275 280 285

Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val

290 295 300

Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp

305 310 315

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly

320 325 330

Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp

335 340 345

Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys

350 355 360

His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile

365 370 375

Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln

380 385 390

Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly

395 400 405

Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser

410 415 420

Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr

425 430 435

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

440 445 450

Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg

455 460 465

Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu

470 475 480

Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys

485 490 495

Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro

500 505 510

Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val

515 520 525

Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val

530 535 540

Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala

545 550 555

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu

560 565 570

Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln

575 580 585

Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu

590 595 600

Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser

605 610 615

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

620 625 630

Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr

635 640 645

Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu

650 655 660

His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg

665 670 675

Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val

680 685 690

His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala

695 700 705

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly

710 715 720

Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His

725 730 735

Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp

740 745

<210> 29

<211> 746

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> murine FAP recombinant protein

<400> 29

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

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

125 130 135
Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val
140 145 150
Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro
155 160 165
Phe Gln Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly
170 175 180
Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr
185 190 195
Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Val Glu
200 205 210
Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly

215 220 225

Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala

230 235 240

Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr

245 250 255

Tyr Pro His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met

260 265 270

Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser

275 280 285

Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val

290 295 300

Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp

305 310 315

Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly

320 325 330

Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp

335 340 345

Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys

350 355 360

His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile

365 370 375

Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln

380 385 390

Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly

395 400 405

Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser

410 415 420

Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr

425 430 435

Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val

440 445 450

Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg

455 460 465

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

470 475 480

Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys

485 490 495

Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro

500 505 510

Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val

515 520 525

Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val

530 535 540

Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala

545 550 555

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu

560 565 570

His Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln

575 580 585

Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu

590 595 600

Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser

605 610 615

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

620 625 630

Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr

635 640 645

Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu

650 655 660

His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg

665 670 675

Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val

680 685 690

His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala

695 700 705

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly

710 715 720

Ile Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr

725 730 735

His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp

740 745

<210> 30

<211> 761

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><223> murine fibroblast activation protein alpha (FAP)

<400> 30

Met Lys Thr Trp Leu Lys Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Ala Leu Val Val Ile Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg
20 25 30

Val Tyr Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu Thr Leu Lys

35 40 45

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

Trp Ile Ser Glu Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp Asn
65 70 75

Ile Val Phe Tyr Asn Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu
80 85 90

Ser Asn Ser Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Thr Asp Tyr Gly Leu
95 100 105

Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys
110 115 120

Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu
125 130 135

Gln Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Tyr Glu Leu Pro Arg Pro Ile
140 145 150

Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val
155 160 165

Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro
170 175 180

Phe Gln Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly
185 190 195

Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr
200 205 210

Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Val Glu
215 220 225
Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
230 235 240
Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala
245 250 255
Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr
260 265 270
Tyr Pro His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met
275 280 285
Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser
290 295 300
Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val
305 310 315
Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp
320 325 330
Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly
335 340 345
Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp
350 355 360
Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys
365 370 375
His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile
380 385 390
Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln
395 400 405
Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly
410 415 420
Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser
425 430 435
Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr
440 445 450
Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val
455 460 465
Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
470 475 480

Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu
485 490 495
Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys
500 505 510
Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro
515 520 525
Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val
530 535 540
Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val
545 550 555
Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
560 565 570
Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu
575 580 585
His Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln
590 595 600
Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu
605 610 615
Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser
620 625 630
Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile
635 640 645
Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr
650 655 660
Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu
665 670 675
His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg
680 685 690
Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val
695 700 705
His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
710 715 720
Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly
725 730 735
Ile Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr
740 745 750

His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp

755 760

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> human Cystatin-S signal peptide

<400>

31

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu

1 5 10 15

Ala Gly Ala Leu Ala

20

<210> 32

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> nontargeting control VHH R3B23

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75

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

80 85 90

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

95 100 105

Pro Trp Thr Trp Arg Glu Ile Tyr Arg Tyr Asn Val Trp Gly Gln
110 115 120

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser His His His His His His
125 130

<210> 33

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> nucleic acid encoding B1

<400> 33

gatgtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggGtc 50

tctgagactc tcctgtgtag cctctggaag gctctccagt agcaattcca 100

tggcctggta tcgccaggtt ccagggaagc gtcgcgagtt ggtcgcggga 150

attactggtg gtggtgagac aaactatgca gacttcgtgg gtggccgatt 200

caccatctcc agagacaacg ccaagaacgg gctgtatctg caattgaacg 250

gcctgaaacc tgaggacacg gccgcctatt attgtaattt ctggccccca 300

cttatcaact actggggcca agggacccag gtcaccgtct cctca 345

<210> 34

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> nucleic acid encoding B2

<400> 34

gatgtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggGtc 50

tctgagactc tcctgtgcag tttctggaag catctccagt gccaatagca 100

tgggctggta ccgccaggct ccagggaagc agcgcgacgt ggtcgcaggt 150

cttactactg gtggtaggag tcactatgca gactccgtga agggccgatt 200

caccatctcc agagacaatg ccaagaacac ggtgtatctg caaatgaaca 250

gcctgaaagc agaggacacg gccgtctatt actgtaattt gtggccgccg 300

gttcagggct actggggcca ggggacccag gtcaccgtct cctca 345

<210> 35

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> nucleic acid encoding B3

<400> 35

gatgtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtgcagg ctgggggggtc 50

tctgagactc tcctgtgcag tctctggaag actcttcagt accaatgcca 100

tgggctggta ccgccaggct ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcaggc 150

attactggtg gtgatagatc aaactatgca gactccgtga agggccgatt 200

caccatctcc agagacaatg gcaagaacac gctgtatctg caaatgaaca 250

gcctgaaacc tgaggacacg gccgtctatt actgtaattt ctacccgcct 300

attgtgggtg actactgggg ccaggggacc caggtcaccg tctcctca 348

<210> 36

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> nucleic acid encoding B4

<400> 36

gatgtgcagc tggtggagtc tgggggagga ttggtgcagg ttgggggctc 50

tctgagactc tcctgtgtag cctctggatt caccttcagt agctactaca 100

tgagctgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtggccagt 150

atttatgctg acggtgatat gacatactat gcagactccg tgaggggccg 200

attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga 250

acagtctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagatccc 300

ctccccccct atcatgttaa ccaggggacc caggtcaccg tctcctca 348

<210> 37

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1 of B1

<400> 37

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser

20 25

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2 of B1

<400> 38

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

1 5 10 15

Ala Gly

<210> 39

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3 of B1

<400> 39

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

1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Gly Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Gly Leu Lys Pro

20 25 30

Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys

35

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4 of B1

<400> 40

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1 of B2

<400> 41

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

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser

20 25

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2 of B2

<400> 42

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Val Val

1 5 10 15

Ala Gly

<210> 43

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3 of B2

<400> 43

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

1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala

20 25 30

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4 of B2

<400> 44

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 45

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1 of B2

<400> 45

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2 of B2

<400> 46

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
1 5 10 15
Ala Gly

<210> 47

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3 of B2

<400> 47

Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Gly Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro

20 25 30

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4 of B2

<400> 48

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 49

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR1 of B4

<400> 49

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Val Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser

20 25

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR2 of B4

<400> 50

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

1 5 10 15

Ala Ser

<210> 51

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR3 of B4

<400> 51

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

1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser

20 25 30

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> FR4 of B4

<400> 52

Val Asn Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary HA tag

<400> 53

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary HA tag

<400> 54

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Gly Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Exemplary cysteine tag

<400> 55

Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Cys

1 5 10 15