



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월20일

(11) 등록번호 10-2353885

(24) 등록일자 2022년01월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 51/10* (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2815 (2013.01)
A61K 51/1027 (2020.05)
- (21) 출원번호 10-2021-7003074(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월10일
 심사청구일자 2021년02월25일
- (85) 번역문제출일자 2021년01월29일
- (65) 공개번호 10-2021-0016067
- (43) 공개일자 2021년02월10일
- (62) 원출원 특허 10-2015-7028748
 원출원일자(국제) 2014년03월10일
 심사청구일자 2019년02월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/022782
- (87) 국제공개번호 WO 2014/164553
 국제공개일자 2014년10월09일
- (30) 우선권주장
 61/780,286 2013년03월13일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 EP02476754 A1
 WO2011069019 A1

- (73) 특허권자
 이미지넵 인코포레이티드
 미국, 캘리포니아 90301, 인글우드, 유닛 디, 423
 힌드리 애비뉴
- (72) 발명자
 호, 데이비드, 티.
 미국, 캘리포니아 90815, 롱 비치, 아파트 8104
 호, 1813 터미노애비뉴
 올라프슨, 토브
 미국, 캘리포니아 91335, 레세다, 19208 함핀 스트리트
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 이명진

전체 청구항 수 : 총 22 항

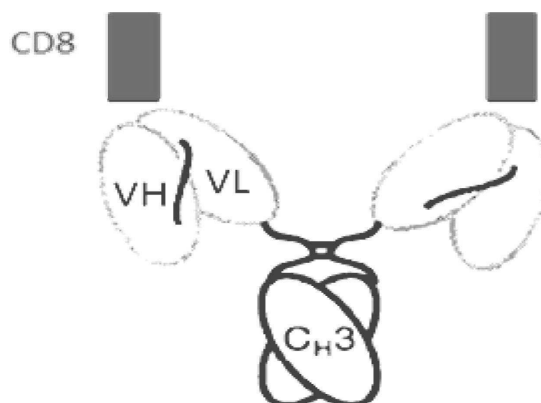
심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 CD 8 에의 항원 결합 구조체들

(57) 요약

CD8에 결합하는, 항체 단편들 (scFv, 미니바디들, 및 시스(cys)-디아바디들과 같다)를 포함하는, 예컨대 항체들인, CD8에 결합하는 항원 결합 구조체들이 여기에 서술되어 있다. 사용 방법들은 여기에 서술된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 33/566 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/624 (2013.01)

C07K 2317/626 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2333/70517 (2013.01)

(72) 발명자

아가히, 지티

미국, 캘리포니아 90025, 로스 앤젤레스, 아파트
5호, 11963월넛 레인

베런브러치, 크리스티안, 피.

미국, 캘리포니아 90301, 인글우드, 유닛 디, 423
힌드리애비뉴

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 항원 결합 구조체:

서열번호 48을 포함하는 가변(variable) 중(heavy) (V_H) 도메인; 및

서열번호 42를 포함하는 가변(variable) 경(light) (V_L) 도메인.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 구조체는 CD8에 특이적으로 결합하는, 항원 결합 구조체.

청구항 3

제1항에 있어서,

검출가능한 마커를 더 포함하는, 항원 결합 구조체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 검출가능한 마커는 ^{89}Zr 또는 ^{18}F 를 포함하는, 항원 결합 구조체.

청구항 5

제1항에 있어서,

치료제를 더 포함하는, 항원 결합 구조체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 구조체는 2중특이성(bispecific)인, 항원 결합 구조체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 구조체는 1가의(monovalent) scFv인, 항원 결합 구조체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 구조체는 시스-디아바디 또는 미니바디인, 항원 결합 구조체.

청구항 9

CD8에 결합하는 인간화된 시스-디아바디로서,

하기를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 인간화된 시스-디아바디:

가변(variable) 경(light) (V_L) 도메인에 연결(link)되는 가변(variable) 중(heavy) (V_H) 도메인을 포함하는 단일-사슬(single-chain) 가변(variable) 단편(fragment) (scFv); 및

C-말단 시스테인,

여기서 상기 V_H 도메인은 서열번호 48을 포함하고, 상기 V_L 도메인은 서열번호 42를 포함함.

청구항 10

제9항에 있어서,

폴리펩타이드의 N 말단부터 C 말단까지, 가변 도메인들의 순서(order)는 V_L , V_H 인, 인간화된 시스-디아바디.

청구항 11

제9항에 있어서,

폴리펩타이드의 N 말단부터 C 말단까지, 가변 도메인들의 순서(order)는 V_H , V_L 인, 인간화된 시스-디아바디.

청구항 12

제9항에 있어서,

검출가능한 마커를 더 포함하는, 인간화된 시스-디아바디.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 검출가능한 마커는 ^{89}Zr 또는 ^{18}F 를 포함하는, 인간화된 시스-디아바디.

청구항 14

CD8에 결합하는 인간화된 미니바디로서, 상기 인간화된 미니바디는, N-말단부터 C-말단까지:

가변(variable) 경(light) (V_L) 도메인에 연결된 가변(variable) 중(heavy) (V_H) 도메인을 포함하는 scFv인,

CD8에 결합하는 단일-사슬(single-chain) 가변(variable) 단편(fragment) (scFv);

인간 IgG1 힌지(hinge) 영역(region)을 포함하는 힌지-연장(extension) 도메인; 및

인간 IgG CH3 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고,

여기서 상기 가변 중 (V_H) 도메인은 서열번호 48을 포함하고, 가변 경 (V_L) 도메인은 서열번호 42를 포함하는,

인간화된 미니바디.

청구항 15

제14항에 있어서,

폴리펩타이드의 N 말단부터 C 말단까지, 가변 도메인들의 순서(order)는 V_L , V_H 인, 인간화된 미니바디.

청구항 16

제14항에 있어서,

폴리펩타이드의 N 말단부터 C 말단까지, 가변 도메인들의 순서(order)는 V_H , V_L 인, 인간화된 미니바디.

청구항 17

제14항에 있어서,

검출가능한 마커를 더 포함하는, 인간화된 미니바디.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 검출가능한 마커는 ^{89}Zr 또는 ^{18}F 를 포함하는, 인간화된 미니바디.

청구항 19

제1항, 제2항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 결합 구조체, 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 인간화된 시스-디아바디, 또는 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 인간화된 미니바디를 코딩하는 핵산.

청구항 20

제1항, 제2항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 결합 구조체, 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 인간화된 시스-디아바디, 또는 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 인간화된 미니바디를 생산하는 세포주.

청구항 21

인 비보 또는 대상 유래 샘플 내의 CD8의 존재 또는 부존재 검출용 키트로서,

제1항, 제2항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 결합 구조체,

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 인간화된 시스-디아바디,

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 인간화된 미니바디,

제1항, 제2항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 결합 구조체, 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 인간화된 시스-디아바디, 또는 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 인간화된 미니바디를 코딩하는 핵산, 또는

제1항, 제2항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 결합 구조체, 제9항 내지 제11항 중 어느 한 항의 인간화된 시스-디아바디, 또는 제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 인간화된 미니바디를 생산하는 세포주 중 적

어도 하나; 및
검출가능한 마커를 포함하는, 키트.

청구항 22

제21항에 있어서,
상기 검출가능한 마커는 ^{89}Zr 또는 ^{18}F 를 포함하는, 키트.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 여기에 기재된 예들은 일반적으로 (미니바디들, 시스-디아바디들, scFv와 같이) CD8 에 결합하는, 항체 단편들을 포함하는 항체들과 같은, 항원 결합 구조체들, 게다가 그것들의 사용 방법들에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] CD8 (분화(differentiation) 8의 클러스터((cluster)))는 (세포독성 T-세포들을 포함하는) T-세포들의 하위 종류들에 대한 특이적 마커인 막관통(transmembrane) 당단백질(glycoprotein)이다. CD8은 CD8 알파 및 CD8 베타 서브유닛들의 헤테로다이머(heterodimer) 또는 CD8 알파 호모다이머(homodimer)로서 조립된다. 조립된 다이머의(dimeric) CD8 복합체는 MHC 클래스 I 세포들에 의한 항원 제시를 인식하기 위하여 T-세포 수용체(-cell receptor) (TCR)와 함께 공수용체(co-receptor)로서 작용한다. CD8은 성숙 T-세포들의 활성화 및 T-세포들의 발달에 역할을 한다. T-세포 위치(localization)의 변화들은 면역 반응의 진행을 반영할 수 있고, 시간이 지나면 발생할 수도 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 항체 단편들을 포함하는 항체들과 같은, 항원 결합 구조체들, 게다가 그것들의 사용 방법들에 대한 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 여기에 기재된 것은 타겟 분자, CD8에 결합하는 시스(cys)-디아바디들 및 미니바디들과 같은, 항체들 및 그것들의 단편들을 포함하는 항원 결합 구조체들이다.

[0007] 몇몇 예들에서, (항체들, 및 시스(cys)-디아바디들 및/또는 미니바디들과 같은 구조체들을 포함하는) 항원 결합 구조체들을 이용하는 방법들이 타겟 분자(또는 "타겟")의 존재 또는 부존재를 감지하기 위하여 제공된다. 몇몇 예들에서, 약학적 목적들을 위하여 항원 결합 구조체들을 이용한 방법들이 제공된다.

발명의 효과

[0008] 이러한 항원 결합 구조체들은 (예컨대, 특정 종류의 T-세포들인, CD8 및/또는 CD8+ 세포들) 타겟 분자의 존재, 위치, 및/또는 양을 감지하는 데에 유용할 수 있다. 이러한 항원 결합 구조체들은 또한 타겟 분자를 발현하는 세포들에 치료제들을 타겟팅하는데 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1A는 CD8에 결합하는 2가(bivalent)를 갖는 미니바디의 모형도(schematic)의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 1B는 미니바디의 모형도(schematic)의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 1C는 CD8 알파(alpha)의 예를 제공한다.
 도 2A는 인간화된 V_H 영역 (huOKT8 구조체(construct)) 및 인간 항체에 대항하여 쥐(murine) OKT8 가변(Variable) 중(Heavy) (V_H) 영역의 정렬(alignment)의 몇몇 예들을 보여준다. CDR 영역들 (초시아(Chothia))의 몇몇 예들은 박스된 영역으로 표시된다.
 도 2B는 huOKT8 구조체 및 인간화된 V_L 영역에 대항하여 쥐(murine) OKT8 가변(Variable) 경(Light) (V_L) 영역의 정렬(alignment)의 몇몇 예들을 보여준다. CDR 영역들 (초시아(Chothia))의 몇몇 예들은 박스된 영역에 의하여 표시된다.
 도 3A는 항원에 결합하는 2가(bivalent)를 보여주는 시스(cys)-디아바디의 모형도(schematic)의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 3B는 항원에 결합하는 2가(bivalent)를 보여주는 시스(cys)-디아바디의 모형도(schematic)를 보여준다.
 도 4는 키메라(chimeric) OKT8 미니바디 V_L - V_H 서열의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 5는 키메라(chimeric) OKT8 미니바디 V_H - V_L 서열의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 6은 인간화된 OKT8 미니바디 V_L - V_H 서열의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 7은 인간화된 OKT8 미니바디 V_H - V_L 서열의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 8은 인간화된 OKT8 시스(cys)-디아바디 V_L -5- V_H 서열의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 9는 인간화된 OKT8 시스(cys)-디아바디 V_H -5- V_L 서열의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 10은 인간화된 OKT8 시스(cys)-디아바디 V_L -8- V_H 서열의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 11은 인간화된 OKT8 시스(cys)-디아바디 V_H -8- V_L 서열의 몇몇 예들을 보여준다.
 도 12A는 시스(cys)-디아바디들을 위한 서열들의 몇몇 예들을 묘사한다.
 도 12B는 미니바디들을 위한 서열들의 몇몇 예들을 묘사한다.
 도 12C는 V_L 을 위한 서열들의 몇몇 예들을 묘사한다.
 도 12D는 hu V_L 를 위한 서열들의 몇몇 예들을 묘사한다.
 도 12E는 V_H 를 위한 서열들의 몇몇 예들을 묘사한다.
 도 12F는 hu V_H 를 위한 서열들의 몇몇 예들을 묘사한다(버전(Version) 1로부터 버전 "a").
 도 12G는 hu V_H 를 위한 서열들의 몇몇 예들을 묘사한다(버전(Version) 1로부터 버전 "b").
 도 12H 는 hu V_H 를 위한 서열들의 몇몇 예들을 묘사한다(버전(Version) 2로부터 버전 "c").
 도 12I는 hu V_H 를 위한 서열들의 몇몇 예들을 묘사한다(버전(Version) 2로부터 버전 "c").

- 도 13은 pcDNA™ 3.1/myc-His(-) 버전(Versions) A, B, C를 위한 벡터 지도(map)의 몇몇 예들을 보여준다.
- 도 14는 타겟의 존재 또는 부존재를 검출하는 방법의 몇몇 예들을 보여준다.
- 도 15 는 키메라(chimeric) 및 인간화된 OKT8 미니바디들의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다.
- 도 16 은 ELISA에 의하여 정제된 rhCD8에 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants)의 결합을 보여주는 그래프이다.
- 도 17A-17D는 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants)의 유동세포분석(flow cytometry) 분석으로부터의 결과들을 묘사한다.
- 도 18A 및 18B는 인간화된 OKT8 미니바디들의 웨스턴 블롯들의 겔들의 묘사들이다.
- 도 19는 ELISA에 의한 IAb_Mb_CD8 발현 분석을 보여주는 그래프이다.
- 도 20은 ELISA에 의하여 rhCD8 에 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants) A 및 B의 결합을 묘사하는 그래프이다.
- 도 21은 ELISA에 의하여 rhCD8에의 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants) C 및 D의 결합을 묘사하는 그래프이다.
- 도 22A 및 22B는 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants) A 및 B의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 보여주는 그래프이다.
- 도 23A 및 23B는 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants) C 및 D의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 보여주는 그래프들이다.
- 도 24는 IAb_Cys-Db3b_CD8 변이체들(variants)의 웨스턴 블롯 분석의 이미지(image)를 묘사한다.
- 도 25는 ELISA에 의한 rhCD8 로의 IAb_Cys-Db3b_CD8 변이체들(variants)의 결합을 묘사하는 그래프이다.
- 도 26A 및 26B는 IAb_Cys-Db3b_CD8 변이체들(variants)의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 보여준다.
- 도 27은 IAb_Cys-Db3b_CD8 변이체들(variants)의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 보여주는 그래프들의 세트이다.
- 도 28 은 여기의 몇몇 예들에 따라 OKT8 구조체의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 묘사하는 그래프이다.
- 도 29A 는 여기의 몇몇 예들에 따른 IAb M1b CD8 및 IAb M2b CD8 구조체의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 묘사하는 그래프이다.
- 도 29B는 여기의 몇몇 예들에 따른 IAb M1b CD8 및 IAb M2b CD8 구조체의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 묘사하는 그래프이다.
- 도 29C는 여기의 몇몇 예들에 따른 IAb M1b CD8 및 IAb M1b CD8-Df 구조체의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 묘사하는 그래프이다.
- 도 29D는 여기의 몇몇 예들에 따른 IAb M1b CD8 및 IAb M1b CD8-Df 구조체의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 묘사하는 그래프이다.
- 도 29E는 여기의 몇몇 예들에 따른 IAb M1b CD8, IAb_M1bCD8 IgG2 EH, 및 IAb M1b CD8 IgG2 NH 구조체의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 묘사하는 그래프이다.
- 도 30A는 여기의 몇몇 예들에 따라 IAb_CysDb3b_CD8 구조체의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 묘사하는 그래프이다.
- 도 30B는 여기의 몇몇 예들에 따른 IAb_CysDb3b_CD8 구조체의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 묘사하는 그래프이다.
- 도 30C은 여기의 몇몇 예들에 따른 IAb_CysDb3b_CD8 및 IAb_Cys-Db3b_CD8-Df 구조체의 유동세포분석(flow cytometry) 분석을 묘사하는 그래프이다.
- 도 31은 여기의 몇몇 예들에 따른 ⁸⁹Zr-Df-IAb_Cys-Db3b_CD8 구조체들로 표지된 마우스들의 일련의 PET 이미지들이다.
- 도 32A는 여기의 몇몇 예들에 따른 ⁸⁹Zr-Df-IAb_M1b_CD8 구조체들로 표지된 마우스들의 일련의 관상(coronal)

MIP PET/CT 중첩(overlay) 이미지들(images)이다.

도 32B는 여기의 몇몇 예들에 따른 ^{89}Zr -Df-IAb_M1b_CD8 구조체들로 표시된 잘라낸(excised) 종양들의 표지를 묘사하는 영상과 병치된(juxtapose) 표이다.

도 33은 여기의 몇몇 예들에 따른 ^{64}Cu -NODAGA-IAb_M1B_CD8 IgG2 EH (Cys) 구조체들로 표시된 마우스들의 일련의 MIP 영상들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 관련된 출원들과의 상호 참조
- [0011] 본 출원은 2013년 3월 13일 출원된 미국 가출원 61/780,286호의 우선권을 주장하며, 이는 여기에 그 전체가 참조로써 포함된다.
- [0013] 서열 목록, 표 또는 컴퓨터 프로그램 목록에 대한 참조
- [0014] 본 출원은 전자 포맷의 서열 목록과 함께 출원된다. 상기 서열 목록은 68,230 바이트 크기로, 2014년 2월 28일 만들어진 SeqListIGNAB014W0.txt이라는 제목의 파일로서 제공된다. 서열 목록인 전자 포맷 내 정보는 여기에 그 전체로서 참조로 포함된다.
- [0016] 개요
- [0017] 여기에 제공된 일부 예들은 서열번호 3 또는 6 내 HCDR1 서열의 HCDR1 ("중쇄 상보 결정 영역(heavy chain complementary determining region) 1"); 서열번호: 3 또는 6 내 HCDR2 서열의 HCDR2 ("heavy chain complementary determining 영역 2"); 서열번호: 3 또는 6 내 HCDR3 서열의 HCDR3 ("heavy chain complementary determining 영역 3"); 서열번호: 9 내 LCDR1 서열의 LCDR1 ("light chain complementary determining 영역 1"); 서열번호: 9 내 LCDR2 서열의 LCDR2 ("light chain complementary determining 영역 2"); 및 서열번호: 9 내 LCDR3 서열의 LCDR3 ("light chain complementary determining 영역 3")를 포함하는 항체 단편들을 포함하는, 항체들과 같은, 항원 결합 구조체들에 대한 것이다. 일부 예들에서, 항원 결합 구조체는 CD8에 특이적으로 결합한다. 일부 예들에서, 항원 결합 구조체는 여기에 기재된 검출가능한 마커를 포함한다. 일부 예들에서, 항원 결합 구조체는 여기에 기재된 치료적 체제(agent)를 포함한다.
- [0019] 여기에 제공된 일부 예들은 CD8에 결합하는 인간화된(humanized) 시스(cys)-디아바디(diabody)에 대한 것이다. 인간화된 시스-디아바디는 N-말단부터 C-말단까지를 포함하는 폴리펩타이드; 가변(variable) 경(light) (V_L) 영역에 연결(link)된 가변(variable) 중(heavy) (V_H) 영역을 포함하는 단일 사슬(single-chain) 가변(variable) 단편(fragment) (scFv); 및 C-말단 시스테인(cysteine)을 포함할 수 있다.
- [0021] 여기에 제공된 몇몇 예들은 CD8에 결합하는 인간화된 미니바디에 대한 것이다. 인간화된 미니바디는 N-말단부터 C-말단까지 포함하는 폴리펩타이드; 가변 경(V_L) 영역에 연결된 가변 중(V_H) 영역을 포함하는 단일 사슬 가변 단편(scFv); 인간 IgG1 또는 IgG2 힌지(hinge) 영역을 포함하는 힌지-연장(extension) 영역; 및 인간 IgG CH3 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 힌지 연장 영역은, 예컨대 서열번호: 55의 IgG2 힌지 서열을 포함하는 힌지 서열인, 원래의(native) IgG2 힌지 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 힌지 연장 영역은, 예컨대, 서열번호: 79의 힌지-연장 서열을 포함하는 힌지-연장 서열인, 인공의 IgG2 힌지 서열을 포함한다.
- [0023] 여기에 제공된 몇몇 예들은 예컨대 CD8 항체 또는 항체 단편(fragment)인, 여기에 기재된 대로 항원 결합(binding) 구조체(construct)를 코딩하는 핵산에 대한 것이다.
- [0025] 여기에 제공된 몇몇 예들은 예컨대 CD8 항체 또는 항체 단편(fragment)인, 여기에 기재된 항원 결합 구조체를 생산하는 세포주에 대한 것이다.
- [0027] 여기에 제공된 몇몇 예들은 키트(kit)에 대한 것이다. 상기 키트는 예컨대 CD8 항원 결합(binding) 단편(fragment)인, 여기에 기재된 항원 결합 구조체를 포함한다. 몇몇 예들에서, 상기 키트는 검출가능한 마커를 포함한다.
- [0029] 여기에 제공된 몇몇 예들은 CD8의 존재 또는 부재를 탐지하는(detecting) 방법에 대한 것이다. 상기 방법은 예컨대, 샘플에 대하여 CD8 항원 결합 구조체인, 여기에 기재된 항원 결합 구조체를 적용하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 CD8에 대하여 항원 결합 구조체의 결합 또는 결합의 부재를 탐지하는 단계를 포함할 수 있다. 몇몇

예들에서, 상기 방법은 인(in) 비보(vivo)로 수행된다. 몇몇 예들에서, 상기 방법은 인(in) 비보(vitro)로 수행된다. 몇몇 예들에서, 상기 방법의 일부는 인 비보로 수행되고, 상기 방법의 일부는 인 비트로로 수행된다.

[0031] 여기에 제공된 몇몇 예들은 CD8에 대하여 치료제를 타겟팅(targeting)하는 방법에 대한 것이다. 상기 방법은 예컨대 CD8 항체 또는 항체 단편(fragment)인, 여기에 기재된 항원 결합 구조체를 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서 그 항원 결합 구조체는 치료제에 복합(conjugated)되어 있다.

[0033] 상세한 설명

[0035] 여기에 기재된 것은 타겟 분자, CD8에 결합하는 시스(cys)-디아바디들 및 미니바디들과 같은, 항체들 및 그것들의 단편들을 포함하는 항원 결합 구조체들이다. 이러한 항원 결합 구조체들은 (예컨대, 특정 종류의 T-세포들인, CD8 및/또는 CD8+ 세포들) 타겟 분자의 존재, 위치, 및/또는 양을 감지하는 데에 유용할 수 있다. 이러한 항원 결합 구조체들은 또한 타겟 분자를 발현하는 세포들에 치료제들을 타겟팅하는데 유용할 수 있다. 몇몇 예들에서, (항체들, 및 시스(cys)-디아바디들 및/또는 미니바디들과 같은 구조체들을 포함하는) 항원 결합 구조체들을 이용하는 방법들이 타겟 분자(또는 "타겟")의 존재 또는 부존재를 감지하기 위하여 제공된다. 몇몇 예들에서, 약학적 목적들을 위하여 항원 결합 구조체들을 이용한 방법들이 제공된다.

[0037] 정의들 및 다양한 예들

[0038] 질환(condition)의 "치료" 또는 "치료하는"은 질환을 예방하는 것, 질환의 발달 속도 및/또는 시작을 늦추는 것, 질환이 발달하는 위험을 감소시키는 것, 질환과 관계된 증상들의 발달을 늦추거나 및/또는 예방하는 것, 증상과 관계된 증상들을 끝내거나 또는 감소시키는 것, 증상의 완전한 또는 부분적인 퇴보를 발생시키는 것 또는 이것들의 몇몇 조합을 가리킬 수 있다. 용어 "예방하다"는 장애 또는 질병(disease)의 완전한 금지를 요구하는 것은 아니다.

[0040] "약학적으로 효과적인 양" 또는 "약학적으로 효과적인 투여량(dose)"은 타겟인 질환을 치료하는 것, 예방하는 것, 장애 및/또는 증상들의 시작을 늦추는 것, 및/또는 질환과 관계된 증상들을 완화시키는 것과 같은, 대상에서 바라는 약학적 효과를 만드는 양이다. 이 양은 (활성(activity), 약물동력학(pharmacokinetics), 약력학(pharmacodynamics) 및 생물학적 이용가능성을 포함하는) 약학적 화합물의 특성들, (연령, 성별, 질병 타입 및 단계, 일반적인 신체 조건, 정해진 복용량(dosage)에 대한 반응성 및 약물(medication)의 타입을 포함하는) 대상의 생리학적 조건, 제형(formulation) 및/또는 투여 루트에서 약학적으로 허용가능한 담체 또는 담체들의 성질을 포함하는 다양한 요인들에 따라 다를 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 임상 및 약학 분야의 당업자는 예컨대 화합물의 투여에 대한 대상의 반응을 모니터링하고, 따라서 본 공개에 주어진 것에 따라 복용량을 조정함으로써, 통상적인 실험을 통하여 약학적으로 효과적인 양을 결정할 수 있을 것이다. 추가적인 안내를 위하여, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st Edition, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2005 참조.

[0042] 용어 "항원 결합 구조체(construct)"는 그것의 결합 단편들을 포함하여, 모든 종류의 항체들을 포함한다. 더 포함되는 것은 1, 2, 3, 4, 5, 및/또는 6 CDR들을 포함하는 구조체들이다. 몇몇 예들에서, 이들 CDR들은 전통적인 항체에서 그것들의 적절한 프레임워크(architecture) 영역들 사이에 분포될 수 있다. 몇몇 예들에서, CDR들은 중-heavy 또는 경(light) 사슬 가변 영역 내 포함될 수 있다. 몇몇 예들에서, CDR들은 중쇄(heavy chain) 및/또는 경쇄(light chain) 내 있을 수 있다. 몇몇 예들에서, CDR들은 단일 펩타이드 사슬 내 있을 수 있다. 몇몇 예들에서, CDR들은 서로 공유(covalently) 연결된 둘 또는 그 이상의 펩타이드들 내 있을 수 있다. 몇몇 예들에서, 그것들은 다이설파이드(disulfide) 결합에 의하여 서로 공유 연결될 수 있다. 몇몇 예들에서, 그것들은 링크하는 분자 또는 모이어티(moiety)를 통하여 연결될 수 있다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 단백질들은, 디아바디(diabody) 및 1가(monovalent) scFv와 같은, 비-공유이다. 여기에 다르게 기재되지 않는한, 여기에 기재된 항원 결합 구조체들은 언급한 타겟 분자에 결합한다. 용어 "타겟(target)" 또는 "타겟 분자"는 CD8 단백질을 나타낸다. CD8 단백질들의 예들은 당업계에 알려져 있으며, 예컨대 도 1C의 서열번호: 24의 CD8 단백질을 포함한다.

[0044] 용어 "항체"는 인트라바디들(intrabodies), 키메라(chimeric) 항체들, 완전히 인간 항체들, 인간화된 항체들, 항체 단편들, 및 헤테로콘주게이트(heteroconjugate) 항체들 (예컨대, 2중특이적(bispecific) 항체들, 디아바디들(diabodies), 트리아바디들(triabodies), 테트라바디들(tetrabodies), 등)과 같은, 면역글로불린들(immunoglobulins)의 유전적으로 조작된 또는 그렇지 않으면 변형된 형태들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 용어 "항체"는 시스(cys)-디아바디들 및 미니바디들을 포함한다. 이와 같이, "항체"와 관련하여 여기에

제공된 각각의 그리고 모든 예는, 명백히 다르게 언급하지 않는 한, 시스(cys)-디아바디(diabody) 및/또는 미니바디(minibody) 예들로도 그려진다(envisioned). 용어 "항체"는 비공유로, 원상회복이 가능하게(reversibly), 그리고 특이적 방식으로 해당하는 항원에 결합할 수 있는, 면역글로불린의 단편들을 포함하는 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 패밀리(family)의 폴리펩타이드를 포함한다. 모범적인 항체 구조 단위(unit)은 테트라머(tetramer)를 포함한다. 몇몇 예들에서, 전장(full length) 항체는, 각각의 쌍들이 (다이설파이드 결합을 통하여 연결된) 하나의 "경쇄" 및 하나의 "중쇄"인, 두 개의 동일한 쌍들의 폴리펩타이드 사슬들로 이루어질(compose) 수 있다. 인식된 면역글로불린 유전자들은 카파(kappa), 람다(lambda), 알파(alpha), 감마(gamma), 델타(delta), 엡실론(epsilon), 및 뮤(mu) 불변(constant) 영역 유전자들과 더불어, 무수히 많은 수(myriad) 면역글로불린(immunoglobulin) 가변(variable) 영역(region) 유전자들을 포함한다. 전장 사슬에 대하여, 경쇄는 카파 또는 람다 중 하나로 분류된다. 전장 사슬에 대하여, 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되는데, 이는 결국 각각 IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 인, 면역글로불린 종류들(classes)로 정의된다. 각각의 사슬의 N-말단은 항원 인식에 주로 책임이 있는, 약 100 내지 110 또는 그보다 많은 아미노산들의 가변 영역으로 정의된다. 용어 가변(variable) 경쇄(light chain) (V_L) 및 가변(variable) 중쇄(heavy chain) (V_H)는 각각 경쇄 및 중쇄의 이들 영역들을 가리킨다. 본 출원에서 사용된 대로, "항체"는 항체 및 그 단편의 모든 변형들(variation)을 포함한다. 이런 식으로, 이 범위 내에서, 개념은 동일한 결합 특이성을 갖고, 전장 항체들, 키메라(chimeric) 항체들, 인간화된 항체들, 단일 사슬 항체들(scFv), Fab, Fab', 및 이들 단편들의 다합체의(multimeric) 버전들(versions)(예컨대, F(ab')₂)이다. 몇몇 예들에서, 항체는 원하는 타겟에 특이적으로 결합한다.

[0046] "상보적(Complementarity)-결정하는(determining) 도메인들(domains)" 또는 "상보적(omplementarity)-결정하는(determining) 영역들(regions) ("CDRs")은 V_L 및 V_H 의 초가변(hypervariable) 영역들을 교환적으로 가리킨다. CDR들은 항체 사슬들의 타겟 단백질-결합 위치(site)로, 이러한 타겟 단백질에 대한 특이성을 준다(harbor). 몇몇 예들에서, 각각의 V_L 및/또는 V_H 에는 3개의 CDR들이 있는데(CDR1-3, N-말단으로부터 연속하여 숫자를 붙인다), 이는 가변 도메인들의 약 15-20% 를 이룬다. CDR들은 타겟 단백질의 에피토프(epitope)에 구조적으로 상보적이며, 이런 식으로 결합 특이성에 대하여 직접적으로 책임이 있다. V_L 또는 V_H 의 남은 구간들(stretches), 소위 프레임워크(framework) 영역들(regions) (FRs)은, 아미노산 서열에 있어 덜 변형(variation)을 보인다(Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0048] CDR 및 프레임워크 영역들의 위치들(positions)은 다양한 당업계에 잘 알려진 정의들을 이용하여 결정될 수 있는데, 예컨대 Kabat (Wu, T. T., E. A. Kabat. 1970. An assay of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J. Exp. Med. 132: 211-250; Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H., Gottesman, K., and Foeller, C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242, Bethesda, MD), Chothia (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature, 342:877-883 (1989); Chothia et al., J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol., 273:927-748 (1997)), ImMunoGeneTics database (IMGT) (on the worldwide web at imgt.org/) Giudicelli, V., Duroux, P., Ginestoux, C., Folch, G., Jabado-Michaloud, J., Chaume, D. and Lefranc, M.-P. IMGT/LIGM-DB, the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences Nucl. Acids Res., 34, D781-D784 (2006), PMID: 16381979; Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, G., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003). PMID: 12477501; Brochet, X., Lefranc, M.-P. and Giudicelli, V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis Nucl. Acids Res, 36, W503-508 (2008); AbM (Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); the contact definition (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996)), and/or the automatic modeling and 분석 tool Honegger A, Pluckthun A. (world wide web at bioc dot uzh dot ch/antibody/Numbering/index dot html)이다.

[0050] 용어 "결합(binding) 특이성(specificity) 결정요인(determinant)" 또는 "BSD"는 항체에서 결합 특이성을 결정하기 위하여 필요한 영역을 결정하는 상보성 내에서 비-인접(contiguous) 또는 최소 인접 아미노산 서열을 교환적으로 가리킨다. 최소 결합 특이성 결정요인은 하나 또는 그보다 많은 CDR 서열들 내 있을 수 있다. 몇몇 예들

에서, 최소 결합 특이성 결정요인들은 항체의 중쇄 및 경쇄의 CDR3 서열들의 전장 또는 부분(즉, 오로지 그것에 의하여 결정된다) 내 있다. 몇몇 예들에서 중쇄 가변 영역의 CDR3는 항원 결합 구조체 특이성에 충분하다.

[0052] 여기에 사용된 대로 "항체 가변 경쇄" 또는 "항체 가변 중쇄"는 V_L 또는 V_H , 각각을 포함하는 폴리펩타이드를 가리킨다. 내생(endogenous) V_L 은 유전자 조각들(segments) V (가변(variable)) 및 J (분기의(junctional))에 의하여, 그리고 내생(endogenous) V_H 는 V, D (다양성(diversity)), 및 J에 의하여 코드된다. V_L 또는 V_H 각각은 CDR들에 더하여, 프레임워크(framework) 영역들을 포함한다. 이 출원에서, 항체 가변 경쇄들 및/또는 항체 가변 중쇄들은 가끔 "항체 사슬들"로서 총괄하여 가리켜질 수 있다. 이들 용어들은 당업자가 쉽게 인식하는 대로, V_L 또는 V_H 의 기본 구조를 파괴하지 않는, 돌연변이를 포함하는 항체 사슬들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 전장 중쇄 및/또는 경쇄들이 고려된다. 몇몇 예들에서, 중쇄 및/또는 경쇄들의 가변 영역만 존재하는 것(present)으로 고려된다.

[0054] 항체들은 온전한(intact) 면역글로불린들 또는 다양한 펩티다제들(peptidases)로 소화됨으로써 생산되는 다수의 단편들로서 존재할 수 있다. 이런 식으로, 펩신(pepsin)은 힌지(hinge) 영역 내 다이설파이드 연결(linkages)들 아래로 항체를 소화시켜, 그것 자체가 다이설파이드 결합에 의하여 V_H -CH1에 연결된(join) 경쇄(V_L -CL)인, Fab'의 다이머(dimer)인 F(ab')₂를 생산한다. F(ab')₂는 온전한 조건 하 환원되어(reduced) 힌지(hinge) 영역에서 다이설파이드 연결(linkage)을 깨뜨리고, 이로써 F(ab')₂ 다이머(dimer)를 Fab' 모노머(monomer)로 전환시킨다. Fab' 모노머는 힌지(hinge) 영역의 부분을 갖는 Fab이다. (Paul, Fundamental Immunology 3d ed. (1993). 다양한 항체 단편들이 항체의 소화 면에서 정의되는 반면, 당업자는 이러한 단편들이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론(methodology)을 이용하여, 새로이(de novo) 합성될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 이런 식으로, 여기 사용된 대로 용어 "항체"는 또한 전체(whole) 항체들의 변경(modification)에 의하여 생산된 항체 단편들 또는 재조합 DNA 방법론들을 이용하여 새로이(de novo) 합성된 것들(예컨대, 단일 사슬 Fv) 또는 파지(phage) 디스플레이(display) 라이브러리들(libraries)을 이용하여 확인된 것들(예컨대 Nature 348:552-554 (1990) 참조.)을 포함한다.

[0056] 단일클론(monoclonal) 또는 폴리클론(polyclonal) 항체들의 준비를 위하여, 당업계에 알려진 임의의 기술들(예컨대, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985; Advances in the production of human monoclonal antibodies Shixia Wang, Antibody Technology Journal 2011:1 1-4; J Cell Biochem. 2005 Oct 1;96(2):305-13; Recombinant polyclonal 항체들 for 암 therapy; Sharon J, Liebman MA, Williams BR; and Drug Discov Today. 2006 Jul, 11(13-14):655-60, Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of 항체 therapeutics?, Haurum JS 참조)가 사용될 수 있다. 단일 사슬 항체들 (U.S. Pat. No. 4,946,778)의 생산을 위한 기술들은 이 발명의 폴리펩타이드들에 대한 항체들을 생산하기 위하여 조정될 수 있다. 또한, 형질전환(transgenic) 마우스들, 또는 다른 포유동물들과 같은 다른 생물들(organisms)은 완전히 인간 단일클론 항체들을 발현시키는데 사용될 수 있다. 대체하여 파지(phage) 디스플레이 기술은 선택된 항원들에게 높은 친화도(affinity) 결합하는 것들(binders)을 확인하는데 사용될 수 있다(예컨대, McCafferty et al., supra; Marks et al., Biotechnology, 10:779-783, (1992)) 참조.).

[0058] 비-인간 항체들을 인간화 또는 프리마타이징(primatizing)하는 방법들은 당업계에 잘 알려져 있다. 일반적으로, 인간화된(humanized) 항체는 인간이 아닌 소스(source)로부터 그것 내로 도입되는 하나 또는 그보다 많은 아미노산 잔기들을 갖는다. 이들 비(non)-인간 아미노산 잔기들은 보통 수입(import) 다양한 도메인로부터 취하는(taken) 것인, 수입(import) 잔기들을 종종 가리킨다. 몇몇 예들에 있어서, 용어들 "도너(donor)" 및 "수용자(acceptor)" 서열들이 이용될 수 있다. 인간화(humanization)는, 인간 항체의 해당하는 서열들에 대하여 설치류(rodent) CDR들 또는 CDR 서열들을 대체함으로써, Winter 및 동업자들의 방법에 따라 본질적으로 수행될 수 있다(예컨대, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988) and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) 참조). 따라서, 이러한 인간화된 항체들은 키메라(chimeric) 항체들 (U.S. Pat. No. 4,816,567)로, 이 때, 온전한(intact) 인간 가변 도메인보다 상당히 덜 비(non)-인간 종들로부터 해당하는 서열에 의하여 치환되었다. 실제로, 인간화된 항체들은 보통, 몇몇 상보적(complementarity) 결정하는(determining) 영역 ("CDR") 잔기들 및 아마 몇몇 프레임워크 ("FR") 잔기들이 설치류 항체들 내 유사한(analogous) 위치들로부터의 잔기들에 의하여 치환된, 인간 항체들이다.

- [0060] "키메라(chimeric) 항체" 는 (a) 불변 영역, 또는 그 부분이 바뀌거나, 대체되거나 또는 교환되어, 항원 결합 위치(가변 영역)이 다르거나 또는 바뀐 종류, 이펙터(effector) 기능 및/또는 중독, 또는 예컨대, 항체, 독(toxin), 호르몬, 성장 인자 및 약물인, 키메라(chimeric) 항체에 새로운 특성들을 부여하는 완전히 다른 분자의 불변 영역에 연결되거나; 또는 (b) 가변 영역 또는 그 부분이 다르거나 또는 바뀐 항원 특이성을 갖는 가변 영역으로 바뀌거나 대체되거나 교환된 항체 분자이다.
- [0062] 항체들은 다른 단백질들과 같이 융합 단백질들로 발현되거나 또는 화학적으로 콘주게이트된 하나 또는 그보다 많은 면역글로불린 사슬들을 더 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체들은 1가 scFv 구조체들일 수 있다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체들은 2중특이적(bispecific) 구조체들일 수 있다. 2중특이적 또는 2기능적 항체는 두 개의 다른 중쇄/경쇄 쌍들 및 두 개의 다른 결합 위치들을 갖는 인공적인 하이브리드 항체이다. 본 발명의 다른 항원-결합 단편들 또는 항체 부분들은 2가(bivalent) scFv (디아바디), 2중특이적 scFv 항체들로 상기 항체 분자는 2개의 다른 에피토프들을 인식하는 것, 단일 결합 도메인들 (sdAb 또는 나노바디들(nanobodies)), 및 미니바디들을 포함한다.
- [0064] 용어 "항체 단편"은 단독, 또는 Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG (환원된(reduced) IgG), scFv 단편들 (1가(monovalent), 3가(tri-valent), 등), 단일 도메인 단편들 (나노바디들), 펩티바디들(peptibodies), 미니바디들, 디아바디들(diabodies), 및 시스(cys)-디아바디들을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 분자들과 조합된, 항체들의 하나 또는 그보다 많은 항원 결합 단편들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 용어 "scFv"는 전통적인 두 개 사슬 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인들이 연결(join)되어 하나의 사슬을 형성한 단일 사슬 Fv ("단편(fragment) 가변(variable)") 항체를 가리킨다.
- [0066] 약학적으로 허용가능한 담체는 하나의 조직, 기관 또는 신체의 부분으로부터 또다른 조직, 기관 또는 신체의 일부로 관심있는 화합물을 나르거나(carrying) 또는 운반하는(transporting)에 관련되는, 약학적으로 허용가능한 비히클(vehicle), 조성물 또는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 담체는 액체 또는 고체 필러(filler), 희석제(diluent), 첨가제(excipient), 용제(solvent), 또는 캡슐화하는(encapsulating) 물질 또는 그것들의 몇몇 조합일 수 있다. 상기 담체의 각각의 요소(component)는 제형의 다른 성분들과 맞는다(compatible) "약학적으로 허용가능"하다. 그것은 또한 그것이 맞닥뜨릴 수 있는 임의의 조직, 기관 또는 신체의 일부와의 접촉에 적합해야 하는데, 이는 그것이 독성, 자극(irritation), 알레르기 반응, 면역원성 또는 그것의 치료적 이점보다 지나치게 과도하게 큰 임의의 다른 합병증(complication)의 위험을 가져서는 안된다는 것을 의미한다. 여기에 기재된 약학적 조성물들은 임의의 적절한 투여 경로(route)에 의하여 투여될 수 있다. 투여 경로(route)는 에어로졸(aerosol), 장관(enteral), 비강(nasal), 안구(ophthalmic), 구강(oral), 장관외(parenteral), 직장(rectal), (예컨대, 국소(topical) 크림 또는 연고, 패치(patch)인) 경피(transdermal), 또는 질(vaginal)을 포함하나, 여기에 제한되지 않는 당업계에 알려진 임의의 투여 경로(pathway)를 가리킬 수 있다. "경피(Transdermal)" 투여는 경피 패치의 수단에 의하여 또는 연고 또는 국부 크림을 이용하여 해낼 수 있다. "장관외(parenteral)"는 눈 아래(infraorbital), 주입(infusion), 동맥내(intraarterial), 낭내(intracapsular), 심장내(intracardiac), 피내(intradermal), 근육내(intramuscular), 복강내(intraperitoneal), 폐내(intrapulmonary), 척수내(intraspinal), 흉골내(intrasternal), 척수강내(intrathecal), 자궁내(intrauterine), 정맥내(intravenous), 지주막하(subarachnoid), 피막하(subcapsular), 피하(subcutaneous), 점막관통의(transmucosal), 또는 경기관(transtracheal)을 포함하는 주사(injection)과 일반적으로 관련된 투여 경로를 가리킨다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 개입(intervention) 또는 절제(resection) 동안 국소적(local) 투여로서 수술중 전달(deliver)될 수 있다.
- [0068] 용어 "CD8 의존적(dependent) 장애(disorder)"는 폐, 난소, 결장(직장)(colorectal) 흑색종(melanoma) 등을 포함하나, 여기에 제한되지 않는 암들, 자가면역 장애들(disorder) 염증 장애들, (암 면역치료에 대한 반응을 포함하는) 면역(immunological) 요소가 있는 암들을 포함한다.
- [0070] 미니바디는 항원에 대한 2가(bivalent) 결합 특성을 유지하는 전장 항체보다 더 작은 분자량을 갖는 항체 형식(format)이다. 그것의 더 작은 크기 때문에, 미니바디는 종양(tumor) 조직을 타겟팅할 때, 증강된 침투(penetration) 및 몸(system)으로부터 더 빠른 제거(clearance)를 갖는다. 신속한 제거(clearance)와 결합된 강한 타겟팅 능력을 갖고, 미니바디는 장기적인 순환 시간들이 불리한 환자 복용량(dosing) 또는 선량측정(dosimetry)을 야기할 수 있는, 세포독성/방사성 탑재물(payloads)의 전달(delivery) 및 영상 진단(diagnostic imaging)에 유리하다.
- [0072] 항체 또는 항체-유래 결합 제제에 대한, 항원, 예컨대, 단백질 사이의 상호작용을 기재하는 본 문맥 내에서 사

용될 때 "특이적으로 (또는 선택적으로) 결합하다"는 구절은 단백질들 및 다른 생물체제들(biologics), 예컨대, 생물학적 시료(sample)에서, 예컨대, 혈액, 혈청(serum), 혈장(plasma) 또는 조직 시료의 혼성(heterogeneous) 군(population) 내 항원의 존재의 결정 요인(determinative)인 결합 반응을 가리킨다. 이런 식으로, 지정된 면역분석(immunoassay) 조건들 하, 몇몇 예들에서, 항체들 또는 특정 결합 특이성을 갖는 결합 제제들은 적어도 두 배 백그라운드(background)로 특정 항원에 결합하고, 시료 내 존재하는 다른 항원들에는 많은 양으로 상당히 결합하지 않는다. 이러한 조건들 하 항체 또는 결합 제제에의 특이적 결합은 특정 단백질에 대한 그것의 특이성 때문에 선택된 항체 또는 제제를 요구할 수 있다. 여러가지 면역분석 형식들은 특정 단백질과 특이적 면역반응성인 항체들을 선택하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 고체-상 ELISA 면역분석들은 단백질에 특이적으로 면역반응성인 항체들을 선택하는데 통상적으로 사용된다(예컨대, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific 면역반응성 참조). 보통 특이적 또는 선택적 결합 반응은 백그라운드 신호보다 적어도 두 배인, 더 전형적으로 백그라운드보다 적어도 10 내지 100 배인 신호를 생산할 것이다.

[0074] 용어 "평형(equilibrium) 해리(dissociation) 상수(constant)(K_D , M)"는 결합(association) 속도(rate) 상수(constant) (k_a , time^{-1} , M^{-1})에 의하여 나누어지는(divided) 해리(dissociation) 속도(rate) 상수(constant) (k_d , time^{-1})를 가리킨다. 평형 해리 상수들은 당 업계에서 임의의 알려진 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 본 발명의 항체들은 약 10^{-7} 또는 10^{-8} M 보다 적은, 예컨대, 약 10^{-9} M 또는 10^{-10} M보다 적은, 몇몇 예들에서는 약 10^{-11} M, 10^{-12} M, 또는 10^{-13} M 보다 적은, 평형 해리 상수를 가질 것이다.

[0076] 핵산 또는 단백질에 적용될 때, 용어 "분리된(isolated),"는 핵산 또는 단백질이 그것이 자연 상태에서 결합되는, 다른 세포 성분들이 본질적으로 없는 것을 가리킨다. 몇몇 예들에서, 건조 또는 수성 용액(solution)일 수 있다. 순도(purity) 및 균질성(homogeneity)은 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 또는 고성능(high performance) 액체 크로마토그래피와 같은 분석적 화학 기술들을 이용하여 결정될 수 있다. 조제용 물질(preparation) 내 존재하는 두드러진 종류인 단백질은 상당히 정제되어 있다. 특히, 분리된 유전자는 유전자 옆에 배치된 오픈(open) 리딩(reading) 프레임들(frames)로부터 분리되고, 관심있는 유전자가 아닌 단백질을 코딩한다. 용어 "정제된(purified)"는 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드를 생기게 하는 핵산 또는 단백질을 가리킨다. 몇몇 예들에서, 이것은 상기 핵산 또는 단백질이 인 비보 조건들 하 존재하는 분자들의 적어도 85% 순수한, 더욱 바람직하게는 적어도 95% 순수한, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 99% 순수한 것을 가리킬 수 있다.

[0078] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 디옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA) 및 단일- 또는 이중-가닥 형태인 그것의 폴리머들(polymers)을 가리킨다. 특별히 제한되지 않는 한, 그 용어는 참고 핵산들과 유사한 결합 특성들을 갖고, 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드들과 유사한 방식으로 대사작용을 하는 자연적인 뉴클레오타이드들의 알려진 유사체들(analogues)을 포함하는 핵산들을 포괄한다. 다르게 표시하지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 내재하여, 그것의 보존적 변형된 변형들(예컨대, 축퇴성(degenerate) 코돈 치환들), 대립 형질들(alleles), 오솔로그들(orthologs), SNP들, 및 상보적 서열들에 더하여 명시적으로 표시된 서열을 가리킨다. 특이적으로, 축퇴 코돈 치환들은 하나 또는 그보다 많은 선택된 (또는 모든) 코돈들의 세 번째 위치가 혼합된-염기 및/또는 디옥시이노신(deoxyinosine) 잔기들(residues)로 치환되는 서열들을 만들어냄으로써 달성될 수 있다 (Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); and Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[0080] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기들의 폴리머를 가리키기 위하여 여기에서 교환적으로 사용된다. 그 용어는 하나 또는 그보다 많은 아미노산 잔기가 해당하는 자연적으로 발생하는 아미노산 잔기의 인공적인 화학적 모방체(mimetic)인 아미노산 폴리머들에 더하여, 자연적으로 발생하는 아미노산 폴리머들 및 비-자연적으로 발생하는 아미노산 폴리머에 적용된다.

[0082] 용어 "아미노산"은 자연적으로 발생하는 그리고 합성 아미노산들, 에 더하여 아미노산 유사체들(analogs) 및 자연적으로 발생하는 아미노산들과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 모방체들(mimetics)을 가리킨다. 자연적으로 발생하는 아미노산들은 유전 코드에 의하여 코드되는 것들, 에 더하여, 나중에 변형되는 그 아미노산, 예컨대, 하이드록시프롤린(hydroxyproline), 감마(gamma)-카르복시글루타메이트(carboxyglutamate), 및 O-포스포세린(phosphoserine)이다. 아미노산 유사체들은 자연적으로 발생하는 아미노산, 즉, 수소에 결합하는 알파-탄소,

카르복실기, 아미노기, 및 R 기, 예컨대, 호모세린(homoserine), 노르류신(norleucine), 메티오닌(methionine) 설펍사이드(sulfoxide), 메티오닌(methionine) 메틸(methyl) 설펍늄(sulfonium)과 동일한 기초 화학적 구조를 갖는 화합물들을 가리킨다. 이러한 유사체들은 변형된 R 기들(예컨대, 노르류신(norleucine)) 또는 변형된 펩타이드 백본(backbones)들을 가지나, 자연적으로 발생하는 아미노산과 동일한 기초 화학적 구조를 유지한다. 아미노산 모방체들(mimetics)은 아미노산의 일반적인 화학적 구조와 다르지만, 자연적으로 발생하는 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는, 구조를 갖는 화학적 화합물들을 가리킨다.

[0083]

[0084] "보존적으로(Conservatively) 변형된(modified) 변이체들(variants)"은 아미노산 및 핵산 서열들 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열들에 대하여, 보존적으로 변형된 변이체들은 동일한 또는 근본적으로 동일한(identical) 아미노산 서열들을 코딩하는 그 핵산들, 또는 아미노산 서열을 코딩하지 않는 핵산에서, 근본적으로 동일한 서열들을 가리킨다. 유전 코드의 축퇴(degeneracy) 때문에, 많은 수의 기능적으로 동일한 핵산들은 임의의 정해진 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈들 GCA, GCC, GCG 및 GCU 은 모두 아미노산 알라닌(alanine)을 코딩한다. 이런 식으로, 알라닌이 코돈에 의하여 특정되는 곳인 모든 위치에서, 상기 코돈은 코딩된 폴리펩타이드를 바꾸지 않고 기재된 해당하는 코돈들 중 임의의 것으로 변형될 수 있다. 이러한 핵산 변형들은 보존적으로 변형된 변형들 중 하나의 종류인 "침묵(silent) 변형들(variations)"이다. 폴리펩타이드를 코딩하는 여기의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변형을 말한다. 기술 중 하나는 핵산 내 각각의 코돈(보통 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 보통 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG를 제외함)이 변형되어 기능적으로 동일한 분자를 만들어내는 것을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변형은 각각의 말한 서열에서 내포되어 있다.

[0086]

아미노산 서열들에 대하여, 기술중 하나는 코딩된 서열 내 아미노산들의 작은 퍼센트 또는 단일 아미노산을 바꾸거나, 더하거나 또는 결실시키는 핵산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질 서열에의 각각의 치환들, 결실들 또는 첨가들이, 그 변화가 화학적으로 유사한 아미노산으로 아미노산의 치환을 야기하는 "보존적으로 변형된 변이체"라는 것을 인식할 것이다. 기능적으로 유사한 아미노산들을 제공하는 보존적 치환 표들은 당업계Dp 잘 알려져 있다. 이러한 보존적으로 변형된 변이체들은 다형적(polymorphic) 변이체들, 이종간의(interspecies) 동족체들(homologs), 및 본 발명의 대립형질(alleles)에 추가되나, 이를 배제하는 것은 아니다.

[0088]

하기 8 개 그룹들은 각각 서로 보존적 치환들인 아미노산들을 포함한다: 1) 알라닌(Alanine) (A), 글라이신(Glycine) (G); 2) 아스파르트산(Aspartic acid) (D), 글루탐산(Glutamic acid) (E); 3) 아스파라긴(Asparagine) (N), 글루타민(Glutamine) (Q); 4) 아르기닌(Arginine) (R), 라이신(Lysine) (K); 5) 이소류신(Isoleucine) (I), 류신(Leucine) (L), 메티오닌(Methionine) (M), 발린(Valine) (V); 6) 페닐알라닌(Phenylalanine) (F), 티로신(Tyrosine) (Y), 트립토판(Tryptophan) (W); 7) 세린(Serine) (S), 트레오닌(Threonine) (T); 및 8) 시스테인(Cysteine) (C), 메티오닌(Methionine) (M) (예컨대, Creighton, Proteins (1984) 참조).

[0090]

"서열 동일성(identity)의 퍼센트"는 비교(comparison) 창(window)로 두 개의 선택적으로 정렬된 서열들을 비교함으로써 결정될 수 있고, 이 때, 상기 비교 창 내 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는, 두 서열들의 선택적 정렬을 위한 첨가들 또는 결실들을 포함하지 않는, 참조 서열 (예컨대, 본 발명의 폴리펩타이드)과 비교할 때 첨가들 또는 결실들 (즉, 갭들)을 포함할 수 있다. 퍼센트는 매치된(matched) 위치들의 수를 만들기 위하여 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 양쪽 서열들에서 발생하는 위치들의 수를 결정함으로써, 비교의 창에서 위치 총 수에 의하여 매치된(matched) 위치들의 수를 나눔으로써, 그리고 서열 동일성(identity)의 퍼센트를 만들어내기 위하여 결과에 100 을 곱함으로써 계산된다.

[0092]

둘 또는 그보다 많은 핵산들 또는 폴리펩타이드 서열들의 문맥 내에서 용어 "동일한(identical)" 또는 퍼센트 "동일성(identity),"는 둘 또는 그보다 많은 서열들 또는 동일 서열들인 그 다음 것들(subsequences)을 가리킨다. 만약 두 개의 서열들이 비교 창으로 최대 관련성(correspondence)을 위하여 정렬되고 비교될 때, 또는 다음 서열 비교 알고리즘들 중 하나를 이용하여 측정된 지정된(designated) 영역 또는 매뉴얼(manual) 정렬(alignment) 및 외관(visual) 검사(inspection)에 의하여, 동일한 아미노산 잔기들 또는 뉴클레오타이드들의 특정된 퍼센트를 가질 때(예를 들어, 특정된 영역에 대하여, 또는 특정되지 않을 때, 참조 서열의 전체 서열에 대하여, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성(identity), 두 개의 서열들은 "상당히(substantially) 동일(identical)"하다. 여기에 제공된 몇몇 예들은 여기에 예시된(예컨대, 임의의 도 2A, 2B, 또는 4-11, 12C-12I의 하나에서 예시된 가변 영역들; 임의의 2A, 2B, 또는 12C 내지 12I의 하나에서 예시된

CDR들; 임의의 도 2A, 2B, 또는 12C-12I의 하나에서 예시된 FR들; 및 임의의 도 12A-12I 또는 4-11의 하나에서 예시된 핵산 서열들), 각각 폴리펩타이드들 또는 폴리뉴클레오타이드들과 상당히 동일한 폴리펩타이드들 또는 폴리뉴클레오타이드들을 제공한다. 선택적으로, 동일성은 길이가 적어도 약 15, 25 또는 50 뉴클레오타이드들인 영역에서, 또는 더욱 바람직하게는 길이가 100 내지 500 또는 1000 또는 그보다 많은 뉴클레오타이드들인 영역에서, 또는 참고 서열의 전장에서 존재한다. 아미노산 서열들에 대하여, 동일성 또는 상당한 동일성은 길이가 적어도 길이가 5, 10, 15 또는 20 아미노산들, 선택적으로 길이가 적어도 약 25, 30, 35, 40, 50, 75 또는 100 아미노산들, 선택적으로 적어도 길이가 약 150, 200 또는 250 아미노산들인 영역에서, 또는 참고 서열의 전체 길이에서 존재할 수 있다. 더 짧은 아미노산 서열들, 예컨대, 20 또는 더 적은 아미노산들의 아미노산 서열들에 대하여, 몇몇 예들에서, 여기에서 정의된 보존적 치환들에 따라, 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기들이 보존적으로 치환될 때, 상당한 동일성이 존재한다.

[0094] 서열 비교를 위하여, 보통 하나의 서열이 테스트 서열들이 비교되는 참고 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 이용할 때, 테스트 및 참고 서열들이 컴퓨터로 들어가고, 다음(subsequence) 좌표들(coordinate)이 지정되고, 그리고, 만약 필요하다면, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터들(parameters)이 지정된다. 디폴트(default) 프로그램 파라미터들이 사용될 수 있고, 또는 대체(alternative) 파라미터들이 지정될 수 있다. 그 다음에 프로그램 파라미터들에 기초하여, 서열 비교 알고리즘이 참고 서열에 대한, 테스트 서열들을 위한 퍼센트 서열 동일성들을 계산한다.

[0095]

[0096] 여기에 사용된 "비교(comparison) 창(window)"은 두 개의 서열들이 최적으로 정렬된 후 서열이 동일한 수의 인접한(contiguous) 위치들의 참고 서열에 비교될 수 있는, 20 부터 600까지, 보통 약 50 내지 약 200, 더욱 보통 약 100 내지 약 150 으로 구성된 군으로부터 선택되는 인접한(contiguous) 위치들의 수 중 임의의 하나의 분절(segment)에 대한 참고(reference)를 포함한다. 비교를 위한 서열들의 정렬의 방법들은 당업계에 잘 알려져 있다. 비교를 위한 서열들의 최적의 정렬은, 예컨대, Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c의 국지적 상동성(homology) 알고리즘에 의하여, Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443의 상동성(homology) 알고리즘에 의하여, Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444의 유사도(similarity) 방법을 위한 검색(search)에 의하여, (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) 이들 알고리즘들의 컴퓨터화된 실행들(implementations)에 의하여, 또는 매뉴얼(manual) 정렬 및 외관(visual) 검사(inspection)에 의하여(예컨대, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)참고), 수행될 수 있다.

[0098] 퍼센트 서열 동일성(identity) 및 서열 유사도(similarity)를 결정하기에 적합한 알고리즘들의 두 예들은 각각 Altschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 및 Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410에 기재된 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘들이다. BLAST 분석들을 수행하기 위한 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information을 통하여 공개적으로 이용할 수 있다. 이 알고리즘은 데이터베이스 서열에서 동일 길이의 워드(word)로 정렬될 때, 몇몇 양성(positive)-값인(valued) 문턱(threshold) 값(score)을 맞추거나(match) 또는 만족시키는 문의(query) 서열에서 길이 W의 짧은 워드(words)들을 확인하기 위하여 높은(high) 값(scoring) 서열(sequence) 쌍들(pairs) (HSPs)을 처음 확인하는 것을 포함한다. T는 이웃(neighborhood) 워드(word) 값(score) 문턱(threshold)으로서 언급된다(Altschul et al., supra). 이들 초기 이웃 워드 히트(hits)들은 그것들을 포함하는 더 긴 HSP들을 찾기 위하여 검색들을 시작하기 위한 씨앗들로서 작용한다. 상기 워드 히트들은 누적된 정렬 값이 증가될 수 있는 한, 각각의 서열을 따라 양 방향으로 연장(extend)된다. 누적된 값들은 뉴클레오타이드 서열들을 위하여, 파라미터들 M (매칭되는 잔기들의 쌍을 위한 보상(reward) 값(score); 항상 > 0) 및 N (잘못 매치된 잔기들을 위한 페널티(penalty) 값; 항상 < 0)을 이용하여 계산된다. 아미노산 서열들을 위하여, 스코어링(scoring) 매트릭스(matrix)는 누적된 값(score)을 계산하기 위하여 이용된다. 각각의 방향의 워드 히트들의 연장(extension)은 하기의 경우에 중단된다: 누적된 정렬 값이 그것의 최대 달성된 값으로부터 양(quantity) X에 의하여 줄어든 때; 하나 또는 그보다 많은 음성(negative)-스코어링(scoring) 잔기 정렬들의 누적 때문에 누적된 값이 0 또는 그 밑으로 갈 때; 또는 어느 서열의 끝이 도달할 때. BLAST 알고리즘 파라미터들 W, T, 및 X은 정렬의 속도 및 감도(sensitivity)를 결정한다. (뉴클레오타이드 서열들을 위한) BLASTN 프로그램은 11의 워드길이(wordlength) (W), 예상(expectation)(E) 또는 10, M=5, N=-4 및 양 가닥들의 비교를 디폴트(defaults)들로 이용한다. 아미노산 서열들에 대하여, BLASTP 프로그램은 디폴트들로, 3의 워드길이(wordlength), 및 10의 예상(expectation) (E), 및 50의 BLOSUM62 스코어링(scoring)

매트릭스(matrix) (Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 참조) 정렬들 (B), 10의 예상(expectation) (E), $M=5$, $N=-4$, 및 양 가닥들의 비교를 이용한다.

[0100] BLAST 알고리즘은 또한 두 개 서열들 간의 유사도(similarity)의 통계적 분석을 수행한다(예컨대, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 참조). BLAST 알고리즘에 의하여 제공되는 유사도(similarity)의 한 척도(measure)는, 그것에 의하여 두 개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열들 사이의 매치(match)가 우연할 발생할 개연성의 징후(indication)을 제공하는, 가장 작은 총합(sum) 개연성(probability) ($P(N)$)이다. 예를 들어, 참고 핵산에 대한 테스트 핵산의 비교에서 가장 작은 총합(sum) 개연성(probability)이 약 0.2보다 적다면, 더욱 바람직하게는 약 0.01보다 적다면, 그리고 가장 바람직하게는 약 0.001보다 적다면, 참고 서열에 대하여 유사하다고 여겨진다.

[0102] 두 개의 핵산 서열들 또는 폴리펩타이드들이 상당히 동일하다는 징후(indication)는, 하기에 기재된 대로 첫 번째 핵산에 의하여 코드되는 폴리펩타이드가 두 번째 핵산에 의하여 코드되는 폴리펩타이드에 대항하여 발생하는 (raised) 항체들과 면역학적으로 교차반응성이라는 것이다. 이런 식으로, 몇몇 예들에서, 폴리펩타이드는 예컨대, 두 펩타이드들이 보존적 치환들에 의하여만 다른 때, 두 번째 폴리펩타이드에 보통 상당히 동일하다(identical). 두 핵산 서열들이 상당히 동일하다는 또다른 징후는 두 분자들 또는 그것들의 보완물들(complements)이 하기 기재한 바와 같이 엄격한(stringent) 조건들 하 서로 혼성화한다는 것이다. 거기에 두 두 핵산 서열들이 상당히 동일하다는 또다른 징후는 동일한 프라이머들이 서열을 증폭시키는데 사용될 수 있다는 것이다.

[0103]

[0104] 용어 "대상(subject)", "환자" 및 "개인(individual)"은 시험되거나 및/또는 치료되는 개체(entity)를 교환적으로 가리킨다. 이는 예컨대, 포유동물, 예컨대, 인간 또는 비(non)-인간 연장류 포유동물을 포함할 수 있다. 포유동물은 또한 실험실 포유동물, 예컨대, 마우스(mouse), 래트(rat), 토끼, 햄스터일 수 있다. 몇몇 예들에서, 포유동물은 농업의 포유동물 (예컨대, 말, 양, 소, 돼지, 낙타) 또는 가축 포유동물 (예컨대, 개, 고양이)일 수 있다.

[0105]

[0106] 용어 "치료적으로 허용가능한 양" 또는 "치료적으로 효과적인 투여량(dose)"은 희망했던 결과를 가져오기에 충분한 양을 교환적으로 가리킨다. 몇몇 예들에서, 치료적으로 허용가능한 양은 원하지 않는 부작용들을 유도하거나 또는 야기하지 않는다. 치료적으로 허용가능한 양은 처음 낮은 투여량으로 투여되고, 그리고 다음에 희망했던 효과가 달성될 때까지 그 투여량을 증가하여 증가시킴으로써 결정될 수 있다.

[0108] 용어 "함께(co)-투여한다(administer)"는 테스트되는 샘플 내에서 또는 개인의 혈액 내에서 두 개의 활성 제제들(active agents)의 투여를 가리킨다. 함께-투여되는 활성 제제들은 동시에 또는 연속적으로 전달(deliver)될 수 있다.

[0110] (항체들 및 결합 단편들을 포함하는)항원 결합 구조체들

[0111] 타겟에 결합하는 항원 결합 구조체들은 여기에 서술된다. 항원 결합 구조체는 타겟 분자에 면역학적으로 반응성이거나 또는 특이적으로 결합하는 면역글로불린 또는 면역글로불린-관련(related) 분자의 하나 또는 그보다 많은 부분들을 포함하는 분자이다.

[0113] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체들은 면역 시스템의 영상 진단(diagnostic imaging)을 위하여 T-세포들의 서브 세트(subset)의 표면에서 발견되는 특이적 바이오마커인 인간 CD8의 검출을 가능하게 한다. CD8의 영상화(imaging)는 T-세포 위치(localization)의 인 비보 검출을 가능하게 한다. T-세포 위치(localization)의 변화들은 면역 반응의 진행을 반영할 수 있으며, 그 결과 시간이 지나면 다양한 치료적 치료들 또는 심지어 질병 상태들을 발생시킬 수 있다.

[0115] 몇몇 예들에서, 이것은 면역치료를 위한 T-세포 위치(localization)를 영상화(imaging)하기에 유용하다. 입양(adoptive) 면역치료(immunotherapy)는 환자의 자신의 T-세포들이 인 비트로(in vitro)에서 처리되고 환자 내로 다시 도입되는 치료의 형태이다. 이러한 형태의 치료를 위하여, T-세포들의 영상화(imaging)는 치료의 상황을 결정하는데 유용하다.

[0117] 추가하여, CD8은 바이러스성 병원체들을 치우고(clear) 종양들에 대한 면역력을 제공하는 기능을 하는 세포용해(cytolytic) T 세포들의 활성화에 중요한 다운스트림(downstream) 신호 전달체들을 활성화하는데 역할을

한다. CD8 양성(positive) T 세포들은 항원 제시 세포들의 MHC I 단백질 내 제시되는 짧은 펩타이드들을 인식할 수 있다. 몇몇 예들에서, CD8로 향하는(directed) 조작된(engineered) 단편들은 T 세포 수용체를 통한 신호를 가능하게 하고(potentiate) 그리고 바이러스성 병원체들을 치우기 위하여 대상의 능력을 증강시키고 종양 항원들에 반응할 수 있다. 이런 식으로 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 항원 결합 구조체들은 작용제들(agonists)일 수 있고, CD8 타겟을 활성화할 수 있다. 몇몇 예들에서, 작용제(agonist) scFv, 미니바디, 시스(cys)-디아바디, 및/또는 항체가 제공된다. 몇몇 예들에서, 작용제(agonist) 항원 결합 구조체는, 여기에 제공된, 하나 또는 그보다 많은 CDR들, 중쇄 가변 영역들 또는 경쇄 가변 영역들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 작용제(agonist)는 바이러스성 병원체들을 치우고 종양들에 면역력을 제공하는 기능을 하는 세포용해(cytolytic) T 세포들의 활성화를 위하여 CD8을 통한 다운스트림(downstream) 신호 전달체계들을 활성화시킬 수 있다.

[0119] 몇몇 상황들에서, 영상화(imaging)를 위하여 전장 항체들을 이용하는 것은, 그것들이 보통 전장 항체들의 긴 혈청(serum) 반감기들 때문에 투여 후 1 주보다 많이 스케줄되어야 하는 영상화(imaging) 시간들을 요구하기 때문에, 최적이지 않다.

[0121] 면역 세포들의 영상화(imaging) 서브타입들(subtypes)을 위한 또다른 타겟에 기초한 접근은 작은 분자들을 수반한다. 예를 들어, 내생(endogenous) 면역 시스템의 영상 진단(diagnostic imaging)을 위한 하나의 접근은 18F-플루오로아세테이트(fluoroacetate) ([18F]FAC)와 같은 세포의 대사 경로 내 변화들을 검출하는 작은 분자 추적자들(tracers)의 이용을 포함한다. 이러한 추적자들은 대사 경로 내 변화들을 검출하기 때문에, 그것들은 주로 활성화된 T-세포들을 포함하는 증가된 대사 활성들을 갖는 세포 군들(populations)을 타겟으로 한다. 이 접근의 제한은 그것이 오직 T-세포들의 활성화된 서브세트(subset)를 검출하는 반면, 타겟이 활성화된 그리고 휴식하고 있는(resting) CD8 세포들 모두에서 발현되기 때문에, 항-CD8 항체 단편들은 T-세포들을 발현시키는 CD8의 전체 군을 감지하는 것이다.

[0123] OKT8 항체의 가변 영역들은 다양한 대체의 항원 결합 구조체들 내로 단백질 조작을 통하여 다시 형식이 만들어졌다(reformatted). 미니바디 형식(format)은 인간 IgG1 CH3 도메인(domain)에 연결된 단일(single)-사슬(chain) 가변(variable) 단편(fragment) (scFv)를 갖는 각각의 모노머를 갖는 호모다이머(homodimer)이다(도 1A 및 1B 참조). 몇몇 예들에서, scFv는 가변(variable) 중(heavy) (V_H) 및 경(light) (V_L) 도메인들을 포함하며(compose) 18 아미노산 GlySer-풍부 링커(linker)에 의하여 연결된다. 몇몇 예들에서, scFv는 인간 IgG1 상부(upper) 및 코어(core) 힌지(hinge) 영역들 (15 잔기들)에 뒤이어 10 아미노산 GlySer 링커(linker)에 의하여 인간 IgG1 CH3 도메인에 묶인다(tethered). 미니바디 (V_H - V_L -CH3)는 CH3 도메인들 사이의 결합(association)에 더하여 힌지(hinge) 영역들 내 다이설파이드 결합들의 형성 때문에 안정된 다이머로서 존재한다. 미니바디의 분비를 가능하게 하기 위하여, 신호 서열이 가변 중(heavy) 도메인의 N-말단에서 융합된다. 몇몇 예들에서, GlySer 잔기들은 유연성(flexibility)을 가능하게 한다. 몇몇 예들에서, 글루타민(glutamine) 및/또는 라이신(lysine) 잔기들은 용해성을 증강시키기 위하여 첨가될 수 있다.

[0124]

[0125] 키메라(chimeric) OKT8 미니바디의 2 개의 변이체들(variants)은 가변 영역들(V_H 내지 V_L 및 V_L 내지 V_H)의 성향(orientation)이 다르게 조작되었다. 모든 항체 V 도메인은 다이설파이드-내(intra-disulfide) 결합을 형성하는 2 개의 시스테인들(cysteine)을 포함한다. 쥐(murine) OKT8 V_H 는, 그것이 응집 및 따라서 소포체(endoplasmic reticulum) (ER) 내 유지(retention)를 이끌 수 있기 때문에, 단백질의 발현을 갖고 간섭할 수 있는 프레임워크(framework) 3 (FR3) 내 추가의(extra) 시스테인(cysteine)을 갖는다. 키메라(chimeric) 미니바디들은 프레임워크 내 추가의 시스테인을 대체하는 세린(serine)을 갖고 만들어졌다(쥐(murine) V_H 의 C84S). 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 예들 중 임의의 것은 C84S 조정을 포함하도록 조정될 수 있다. 표들 0.1, 0.2, 및 0.3는 여기에 제공된 다양한 항원 결합 구조체들의 배열(arrangements)들의 몇몇(come) 예들의 개요를 제공한다.

[0127] <표 0.1> 미니바디들

1	2	3	4	5	6
명칭	리더(Leader)	영역(Region) 1	링커	영역(Region) 2	나머지(Remander)
키메라(Chimeric)IAb_Mb1_CD8	리더 서열번호: 34	쥐(murine) V _L 서열번호: 40	18 aa 링커(linker) 서열번호: 36	쥐(Murine) V _H 서열번호: 44	IgG1 힌지(hinge)/링커(linker)-C _H 3 도메인 서열번호: 38
키메라(Chimeric)IAb_Mb2_CD8	리더 서열번호: 34	쥐(murine) V _H 서열번호: 44	18 aa 링커 서열번호: 36	쥐(Murine) V _L 서열번호: 40	IgG1 힌지/링커-C _H 3 도메인 서열번호: 38
인간화된 IAb_Mb1_CD8	리더 서열번호: 34	hu V _L 서열번호: 9	18 aa 링커 서열번호: 36	huV _H (2 nd) 서열번호: 6	IgG1 힌지/링커-C _H 3 도메인 서열번호 O: 38
인간화된 IAb_Mb2_CD8	리더 서열번호: 34	Hu V _H (2 nd) 서열번호: 6	18 aa 링커 서열번호: 36	huV _L 서열번호: 9	IgG1 힌지/링커-C _H 3 도메인 서열번호: 38

[0128]

[0130] <표 0.2> 친화도(Affinity) 성숙된(Matured) 미니바디들(Minibodies)

1	2	3	4	5	6
명칭	리더(Leader)	영역(Region) 1	링커(Linker)	영역(Region) 2	나머지(Remander)
IAb_Mb1a_CD8	리더 서열번호: 34	huV _L 서열번호: 42	18aa 링커 서열번호: 36	huV _H (버전 a) 서열번호: 46	IgG1 힌지(hinge)/ 링커(linker)- C _H 3 도메인 서열번호: 38
IAb_Mb2a_CD8	리더 서열번호: 34	huV _H (버전 a) 서열번호: 46	18aa 링커 서열번호: 36	huV _L 서열번호: 42	IgG1 힌지/링커-C _H 3 도메인 서열번호: 38
IAb_Mb1b_CD8	리더 서열번호: 34	huV _L 서열번호: 42	18aa 링커 서열번호: 36	huV _H (버전 b) 서열번호: 48	IgG1 힌지/링커-C _H 3 도메인 서열번호: 38
IAb_M1b_CD8 IgG2 NH	리더 서열번호: 34	huV _L 서열번호: 42	18aa 링커 서열번호: 36	huV _H (버전 b) 서열번호: 48	IgG2 원래의(native) 힌지 SEQ ID NO: 55, IgG2 C _H 3 도메인, 서열번호: 80
IAb_M1b_CD8 IgG2 EH	리더 서열번호: 34	huV _L 서열번호: 42	18aa 링커 서열번호: 36	huV _H (버전 b) 서열번호: 48	IgG2 힌지- 연장(extension) SEQ ID NO: 79, IgG2 C _H 3 도메인, 서열번호: 80
IAb_Mb2b_CD8	리더 서열번호: 34	huV _H (버전 b) 서열번호: 48	18aa 링커 서열번호: 36	huV _L 서열번호: 42	IgG1 힌지/링커-C _H 3 도메인 서열번호: 38
IAb_Mb1c_CD8	리더 서열번호: 34	huV _L 서열번호: 42	18aa 링커	huV _H (버전 c)	IgG1 힌지/링커-C _H 3

[0131]

	34	42	서열번호: 36	서열번호: 50	도메인 서열번호: 38
IAb_Mb2c_CD8	리더 서열번호: 34	huV _H (버전 c) 서열번호: 50	18aa 링커 서열번호: 36	huV _L 서열번호: 42	IgG1 힌지/링커-C _H 3 도메인 서열번호: 38
IAb_Mb1d_CD8	리더 서열번호: 34	huV _L 서열번호: 42	18aa 링커 서열번호: 36	huV _H (버전 d) 서열번호: 52	IgG1 힌지/링커-C _H 3 도메인 서열번호: 38
IAb_Mb2d_CD8	리더 서열번호: 34	huV _H (버전 d) 서열번호: 52	18aa 링커 서열번호: 36	huV _L 서열번호: 42	IgG1 힌지/링커-C _H 3 도메인 서열번호: 38

[0132]

[0134] <표 0.3> 시스-디아바디들(Diabodies)

1	2	3	4	5	6
명칭	리더(Leader)	영역(Region) 1	링커(Linker)	영역(Region) 2	나머지(Remainder)
IAb_Cys- Db1b_CD8	리더 서열번호: 26	huV _L 서열번호: 42	5aa 링커 서열번호: 28	huV _H (버전 b) 서열번호: 48	Cys 꼬리 서열번호: 32
IAb_Cys- Db2b_CD8	리더 서열번호: 26	huV _H (버전 b) 서열번호: 48	5aa 링커 서열번호: 28	huV _L 서열번호: 42	Cys 꼬리 서열번호: 32
IAb_Cys- Db3b_CD8	리더 서열번호: 26	huV _L 서열번호: 42	8aa 링커 서열번호: 30	huV _H (버전 b) 서열번호: 48	Cys 꼬리 서열번호: 32
IAb_Cys- Db4b_CD8	리더 서열번호: 26	huV _H (버전 b) 서열번호: 48	8aa 링커 서열번호: 30	huV _L 서열번호: 42	Cys 꼬리 서열번호: 32

[0135]

[0137]

표들 0.1, 0.2, 및 03에서 묘사된 것들은 미니바디들 (표 0.1 및 0.2) 및 시스(cys)-디아바디들 (표 0.3)에서 사용될 수 있는 모노머들을 위한 서열들의 배열들이다. 표의 각각의 행(row)은 N-말단부터 C-말단으로 나타내는 왼쪽-부터-오른쪽으로, 모노머 구조체의 서열을 나타낸다. 몇몇 예들에서, 각각의 모노머 구조체의 보여진 서열들은 서로 직접 연결된다. 이런 식으로, 몇몇 예들에서, 구조체는 표 0.1, 표 0.2, 또는 표 0.3에서 단일 행(row) 상 구조체들의 임의의 것을 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 구조체들은 표 0.1, 표 0.2, 또는 표 0.3에서 임의의 조합을 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 예컨대, 칼럼 2, 첫 번째 행(row) 내 첫 번째 아이템은 칼럼 6, 첫 번째 행(row)에 대하여, 칼럼 5 첫 번째 행(row)에 대하여, 칼럼 4 첫 번째 행(row)에 대하여, 칼럼 3 첫 번째 행(row)과 조합될 수 있다. 몇몇 예들에서, 칼럼 3 및 칼럼 6은 서로 교환될(swap) 수 있다. 몇몇 예들에서, 칼럼 2, 첫 번째 행(row) 내 첫 번째 아이템은 칼럼 6 두 번째 행(row)에 대하여, 칼럼 5 두 번째 행(row)에 대하여, 칼럼 4 두 번째 행(row)에 대하여, 칼럼 3 첫 번째 행(row)과 조합될 수 있다. 이런 식으로 그 표들은 (교환된 칼럼들과) 다양한 행들(rows)을 가로질러 그리고 단일 행(row) 내 모두의 모든 가능한 조합들을 나타낸다.

[0139]

몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호들(SEQ ID NO): 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52 인 HCDR1의 중쇄 CDR1 (HCDR1); 서열번호(SEQ ID NO): 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52 인 HCDR2의 중쇄 CDR2 (HCDR2); 서열번호들(SEQ ID NO): 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52 인 HCDR3의 중쇄 CDR3 (HCDR3); 서열번호들(SEQ ID NO): 9 또는 42 인 LCDR1의 경쇄 CDR1 (LCDR1); 서열번호들(SEQ ID NO): 9 또는 42 인 LCDR2의 경쇄 CDR2 (LCDR2); 및/또는 서열번호들(SEQ ID NO): 9 또는 42 인 LCDR3의 경쇄 CDR3 (LCDR3)를 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 48 인 HCDR1의 HCDR1, 서열번호: 48 인 HCDR2의 HCDR2, 서열번호: 48인 HCDR3의 HCDR3, 서열번호: 42 인 LCDR1의 LCDR1, 서열번호: 42 인 LCDR2의 LCDR2, 및 서열번호: 42 인 LCDR3의 LCDR3을 포함한다.

[0141]

몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 상기 CDR들, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1을 포함한다(CDR들의 몇몇 예들은 도 2A, 2B, 12C-12I에 나타난다). 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 HCDR3를 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 타겟 분자에 특이적으로 결합한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 여기에서 제공된 CDR들을 갖는 항체들의 하나 또는 그보다 많은 것에 결합하기 위하여 경쟁한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 적어도 여기에 언급된 3 중쇄 CDR들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 중쇄 CDR3를 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 여기에 제공된 중쇄 CDR2 서열들 중 임의의 하나를 더 포함한다.

[0143]

몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 인간 또는 인간화된다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 적어도 하나의 인간 프레임워크 영역, 또는 인간 프레임워크 영역에 대하여 적어도 약 80% 서열 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 프레임워크 영역을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52 인 HFR1의 중쇄 FR1 (HFR1); 서열번호: 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52 인 HFR2의 중쇄 FR2 (HFR2); 서열번호: 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52 인 HFR3의 중쇄 FR3 (HFR3); 서열번호: 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52 인 HFR4의 중쇄 FR4 (HFR4); 서열번호: 9

또는 42 인 LFR1의 경쇄 FR1 (LFR1); 서열번호: 9 또는 42 인 LFR2의 경쇄 FR2 (LFR2); 서열번호: 9 또는 42 인 LFR3의 경쇄 FR3 (LFR3); 및 서열번호: 9 또는 42 인 LFR4의 경쇄 FR4 (LFR4)를 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 중쇄 FR1 (HFR1) of the HFR1 in 서열번호: 48 인 HFR1의 중쇄 FR1 (HFR1); 서열번호: 48 인 HFR2의 중쇄 FR2 (HFR2); 서열번호: 48 인 HFR3의 중쇄 FR3 (HFR3); 서열번호: 48 인 HFR4의 중쇄 FR4 (HFR4); 서열번호: 42 인 LFR1의 경쇄 FR1 (LFR1); 서열번호: 42 인 LFR2의 경쇄 FR2 (LFR2); 서열번호: 42 인 LFR3의 경쇄 FR3 (LFR3); 및 서열번호: 42 인 LFR4의 경쇄 FR4 (LFR4)를 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 리스트된 FR들 중 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1을 포함한다.

[0145] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 검출가능한 마커를 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 치료제를 포함한다.

[0147] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 2가(bivalent)이다. 2가 항원 결합 구조체는 적어도 첫 번째 항원 결합 도메인, 예컨대 첫 번째 scFv, 및 적어도 두 번째 항원 결합 도메인, 예컨대 두 번째 scFv를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 2가(bivalent) 항원 결합 구조체는 각각이 항원 결합 도메인을 갖는, 적어도 두 개의 모노머들, 예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 모노머들을 포함하는 멀티머(multimer)이다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 미니바디이다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 예컨대, 시스(cys)-디아바디를 포함하는 디아바디이다. scFv, 및/또는 미니바디 및/또는 시스(cys)-디아바디는 여기에 제공된 CDR 및 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역 예들 중 임의의 것을 포함할 수 있다(예컨대, 도 2A, 2B, 및 12C-12I에 제공된 CDR 서열들). 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 1가의(monovalent) scFv이다. 몇몇 예들에서, 1가의(monovalent) scFv는 도 2A, 도 12E-12I, 또는 서열번호: 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52의 HCDR1 내 HCDR1; 도 2A, 도 12E-12I, 또는 서열번호: 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52의 HCDR2 내 HCDR2; 도 2A, 도 12E-12I, 또는 서열번호: 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52의 HCDR3 내 HCDR3; 도 2B, 도 12C, 도 12D, 서열번호: 9 또는 42의 LCDR1 내 LCDR1; 도 2B, 도 12C, 도 12D, 서열번호: 9 또는 42의 LCDR2 내 LCDR2, 및 도 2B, 도 12C, 도 12D, 서열번호: 9 또는 42의 LCDR3 내 LCDR3를 포함하는 것이 제공된다. 몇몇 예들에서, 1가의(monovalent) scFv는 서열번호: 48의 HCDR1인 HCDR1, 서열번호: 48의 HCDR2인 HCDR2, 서열번호: 48의 HCDR3인 HCDR3, 서열번호: 42의 LCDR1인 LCDR1, 서열번호: 42의 LCDR2인 LCDR2, 및 서열번호: 42의 LCDR3인 LCDR3를 포함하는 것이 제공된다. 몇몇 예들에서, CDR들은 도 12D에 나타난 것처럼 초시아(Chothia)에 따라 정의된다.

[0149] 몇몇 예들에서, 1가의(monovalent) scFv는 도 2A, 도 4-11, 도 12C-12I, 또는 서열번호: 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52의 중쇄 가변 영역의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 몇몇 예들에서, 1가의(monovalent) scFv는 도 2B, 4-11, 12C, 12D, 서열번호: 9, 42, 또는 40 내 경쇄 가변 영역의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 몇몇 예들에서, 1가의(monovalent) scFv는 도 2A, 도 4-11, 도 12C-12I, 또는 서열번호: 3, 6, 44, 46, 48, 50, 또는 52 내 중쇄 가변 영역의 중쇄 가변 영역 및 도 2B, 4-11, 12C, 12D, 서열번호: 9, 42, 또는 40 내 경쇄 가변 영역의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 몇몇 예들에서, 1가의(monovalent) scFv는 서열번호: 48인 중쇄 가변 영역의 중쇄 가변 영역 및 서열번호: 42인 경쇄 가변 영역의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0151] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 2중특이적(bispecific)이다. 2중특이적 항체들은 적어도 첫 번째 결합 도메인, 예컨대 첫 번째 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는 예컨대 scFv, 및 적어도 두 번째 결합 도메인, 예컨대 두 번째 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합하는 scFv를 포함할 수 있다. 이런 식으로, 2중특이적 항원 결합 구조체들은 둘 또는 그보다 많은 에피토프들에 결합할 수 있다. 몇몇 예들에서, 첫 번째 에피토프 및 두 번째 에피토프는 동일한 항원의 부분이고, 그리고 2중특이적 항원 결합 구조체는 이런 식으로 동일한 항원의 두 개의 에피토프들에 결합할 수 있다. 몇몇 예들에서, 첫 번째 에피토프는 첫 번째 항원의 부분이고, 두 번째 에피토프는 두 번째 항원의 부분이고, 그리고 2중특이적 항원 결합 구조체는 이런 식으로 두 개의 다른 항원들에 결합할 수 있다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 동시에 두 개의 에피토프들에 결합한다.

[0153] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 3, 6, 16, 18, 20, 22, 44, 46, 48, 50, 또는 52의 중쇄 가변 영역의 중쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 3에 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 6에 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 44에 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호:

46에 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)를 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 48에 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 50에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 52에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는다.

[0155] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 9, 16, 18, 20, 22, 40, 또는 42를 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 9에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 40에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)를 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 42에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 인간 항원 결합 구조체이고, 적어도 앞서 언급한 중쇄 및/또는 경쇄 가변(variable) 서열들과 동일한 중쇄 및 경쇄, 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역을 갖는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 서열번호: 48에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 42에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)를 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0157] 여기에 제공된 몇몇 예들은 여기에 제공된 하나 또는 그보다 많은 항원 결합 구조체들을 갖는 타겟 분자에 결합하기 위하여 경쟁하는 항원 결합 구조체를 포함한다. 몇몇 예들에서, 경쟁하는 항원 결합 구조체는 참고 항원 결합 구조체로서 타겟 분자 상 동일한 에피토프에 결합한다. 몇몇 예들에서, 참고 항원 결합 구조체는 타겟 분자의 첫 번째 에피토프에 결합하고, 경쟁하는 항원 결합 구조체는 타겟 분자의 두 번째 에피토프에 결합하지만, 예컨대 참고 항원 결합 구조체의 결합을 입체구조적으로 차단(blocking)함으로써, 또는 타겟 분자의 구조적(conformational) 변화를 유도함으로써, 타겟 분자에 대한 참고 항원 결합 구조체의 결합을 방해한다. 몇몇 예들에서, 첫 번째 에피토프는 두 번째 에피토프와 중첩(overlap)된다. 몇몇 예들에서, 0.1 및/또는 0.2의 칼럼들 3 및 5는 교환될 수 있다. 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 중쇄들 가변 영역들 중 임의의 것은 scFv, 미니바디, 및/또는 디아바디를 위하여 여기의 경쇄 가변 영역들 중 임의의 것과 조합될 수 있다. 몇몇 예들에서, 표들 0.1, 0.2, 및 0.3의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역들 중 임의의 것(칼럼들 3 및 5)은 서로 교환되거나 또는 다른 경쇄 또는 중쇄 가변 영역과, 교환되어, (scFv, 시스(cys)-디아바디, 미니바디, 또는 항체와 같은) 항원 결합 구조체를 생산할 수 있다.

[0159] 몇몇 예들에서, 미니바디 및 시스(cys)-디아바디 형식들(formats)은 영상 진단(diagnostic imaging)을 위한 유리한 약동학(pharmacokinetic) 특성들 및 부모(parental) 항체의 특이성 및 높은 결합 친화도(affinity)를 유지하면서도 특정 치료적 적용들을 갖는다. 전장 부모(parental) 항체로 영상화(imaging)와 비교하여, 약물동력학(pharmacokinetics)은 그것들이 항원을 타겟으로 할 수 있고, 그리고나서 선명한(high-contrast) 이미징(imaging)을 위하여 시스템(system)을 신속하게 치울 수 있다는 점에서 이들 단편들에 더욱 바람직하다. 몇몇 예들에서, 미니바디 및 시스(cys)-디아바디를 위한 더 짧은 혈청(serum) 반감기들은 미니바디에 대해 주사 후 대략 8-48 시간 및 시스(cys)-디아바디에 대해 주사 후 2-24 시간인, 시간 범위 동안 영상화(imaging)가 일어나는 것을 가능하게 한다. 더 좋은 조직 침투(penetration)와 함께 더 빠른 혈청(serum) 정리(clearance)는 동일한 날에 영상화(imaging)을 가능하게 하고, 환자를 돌보는 관리에 대하여 병원에 중요한 이익을 제공한다.

[0161] 게다가, 시스(cys)-디아바디 항체 형식(format)은 C-말단 시스테인 꼬리(tail)를 특징으로 한다. 이들 두 개의 설프하이드릴(sulfhydryl) 기들(그 다음의 온화한 환원(reduction))은 시스(cys)-디아바디의 결합 활성을 방해할 필요가 없는 방사성표지들(radiolabels)과 같은 기능적 모이어티들(moieties)의 위치-특이적 콘주게이션

(conjugation)에 전략(strategy)을 제공한다.

[0163] 타겟 분자에 결합하는 디아바디들

[0164] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 디아바디일 수 있다. 디아바디는 첫 번째 폴리펩타이드 사슬 상에 경쇄 가변(variable) 도메인 (V_L)과 연결된(connect) 중쇄(heavy) (V_H) (chain) 가변(variable) 도메인을 포함하는 첫 번째 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 경(light) 그리고 중(heavy) 가변(variable) 사슬(chain) 도메인들은 링커에 의하여 연결될 수 있다. 너무 짧아 두 번째 폴리펩타이드 사슬 상 두 개의 도메인들 사이에 중요한 페어링(pairing)을 가능하게 할 수 없는 링커에 의하여 연결(connect)된 두 번째 폴리펩타이드 상 중쇄 가변(variable) 도메인 V_H 에 링크(link)된 경쇄 가변(variable) 도메인 (V_L) 을 포함하는 첫 번째 폴리펩타이드 사슬 및 두 번째 폴리펩타이드 사슬 상 두 개의 도메인들 사이의 페어링 가능성을 감소시키기 위하여 그 링커는 적절한 길이일 수 있다.

[0166] 몇몇 예들에서, 링커의 적절한 길이는 첫 번째 및 두 번째 폴리펩타이드 사슬들의 상보적 도메인들 사이의 사슬 페어링(pairing)을 장려(encourage)하고, 2 개의 기능적 항원 결합 위치들을 갖는 다이머 분자의 조립을 촉진할 수 있다. 이런 식으로 몇몇 예들에서, 디아바디는 2가(bivalent)이다. 몇몇 예들에서, 디아바디는 디아바디 링크된 시스템일 수 있다(시스-Db). 2 개의 항원 위치들에 대하여 결합한 Cys-Db의 도해(schematic)는 도 3A 및 3B에 나타나 있다.

[0168] 몇몇 예들에서, 링커는 펩타이드일 수 있다. 몇몇 예들에서, 링커는 예컨대, 1 및 20 아미노산들 사이의, 5 및 10 아미노산들 길이와 같은, 이러한 조립(assembly)를 촉진하는 적절한 임의의 길이일 수 있다. 여기에 더 서술된 대로, 몇몇 시스(cys)-디아바디들은 5 내지 8 아미노산들 길이인 펩타이드 링커를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 링커는 아미노산들로부터 만들어지거나 이것만으로 만들어질 필요는 없으며, 예컨대, 변형된(modified) 아미노산들을 포함할 수 있다 (예컨대, Increased Resistance of Peptides to Serum Proteases by Modification of their Amino Groups, Rossella Galati, Alessandra Verdina, Giuliana Falasca, and Alberto Chersi, (2003) Z. Naturforsch, 58c, 558-561 참조). 몇몇 예들에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 아미노산들 길이일 수 있다. 몇몇 예들에서, 링커는 2 부터 30 앙스트롬(angstroms)까지의 길이, 예컨대 2.5 내지 27 앙스트롬일 수 있다.

[0170] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 인간화된(humanized) 시스(cys)-디아바디를 포함한다. 인간화된 시스(cys)-디아바디는 C-말단 시스템 및 가변(variable) 경(light) (V_L) 도메인에 링크된 가변(variable) 중(heavy) (V_H) 도메인을 포함하는 단일-사슬 가변(variable) 단편 (scFv)를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 인간화된 시스(cys)-디아바디는 호모다이머(homodimer)이다. 몇몇 예들에서, 인간화된 디아바디는 헤테로다이머(heterodimer)이다. 몇몇 예들에서, 개개의 모노머들은 각각 시스템 말단 잔기를 갖는 것이 제공된다.

[0172] 몇몇 예들에서, 인간화된 시스(cys)-디아바디의 scFv는 V_H - V_L 성향(orientation) 또는 V_L - V_H 성향(orientation)을 갖는다. 여기에 사용된 대로, V_H - V_L (여기에서 또한 " $V_H V_L$ "로 나타내질 수 있다) 성향(orientation)은 scFv의 가변(variable) 중(heavy) 도메인 (V_H)이 가변(variable) 경(light) 도메인 (V_L)로부터 업스트림(upstream)이라는 것을 의미하고, $V_L V_H$ 성향(orientation)은 scFv의 V_L 도메인이 V_H 도메인으로부터 업스트림(upstream)이라는 것을 의미한다. 여기에서 사용된 대로 "업스트림(upstream)은 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단(end)을 향하는 것 또는 아미노산의 N-말단을 향하는 것을 의미한다.

[0174] 항체 variable 영역들은 여기에 서술된 대로 링커에 의하여 서로 연결(link)될 수 있다. 몇몇 예들에서, 링커는 여기에 기술된 대로, GlySer 링커이다.

[0176] 몇몇 예들에서, 시스(cys)-디아바디는 검출가능한(detectable) 마커를 포함한다.

[0178] 몇몇 예들에서, 시스(cys)-디아바디는 모노머들의 페어(pair)를 포함한다. 각각의 모노머는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 모노머들의 폴리펩타이드들은 동일하다((예컨대, 시스(cys)-디아바디는 호모다이머일 수 있다). 몇몇 예들에서, 모노머들의 폴리펩타이드들은 다르다(예컨대, 시스(cys)-디아바디는 헤테로다이머일 수 있다).

[0180] 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 서열번호: 12 를 포함한다(도 8 참조). 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 서열번호: 12 (시스-디아바디 (V_L -5- V_H))에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도

약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)를 갖는 서열을 포함한다.

[0182] 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 서열번호: 13을 포함한다(도 9 참조). 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 서열번호: 13 (시스-디아바디 (V_H -5- V_L))에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)를 갖는 서열을 포함한다.

[0184] 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 서열번호: 14 (V_L -8- V_H)를 포함한다(도 10 참조). 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 서열번호: 14 에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성(identity)를 갖는 서열을 포함한다.

[0186] 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 서열번호: 15 (인간화된 OKT8 시스(cys)-디아바디 (V_H -8- V_L))를 포함한다(도 11 참조). 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 서열번호: 15에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성(identity)를 갖는 서열을 포함한다.

[0188] 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 표 0.3에 제시된 바와 같이 모노머들에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성(identity)의 서열들을 갖는 모노머의 폴리펩타이드들을 포함하는, 표 0.3 에 표시된 대로 조합된 섹션들(sections) 중 임의의 것을 포함한다.

[0190] 몇몇 예들에서, 시스템들은 서로 교차 연결(cross-link)된다. 몇몇 예들에서, 시스템들은 환원되고(reduce), 그리고 이런 식으로 시스템들을 형성하는 그것들의 꼬리는 서로 다이설파이드 결합을 형성하지 않는다. 몇몇 예들에서, "꼬리(tail) 형성(forming)" 시스템들 중 하나 또는 그보다 많은 것들은 형광 프로브와 같은, 하나 또는 그보다 많은 검출가능한 마커와 공유 결합을 형성한다.

[0192] 당업자에 의하여 인식될 것이 듯이, 본 공개는 일반적으로 "시스-디아바디들"을 언급하고 있는 반면, 대체 배열들(arrangements)은 동일하거나 또는 유사한 목적들(ends)을 달성하기 위하여 사용될 수 있다. 몇몇 예들에서, 임의의 공유적으로 변형가능한 모이어티가 시스템들의 하나 또는 그보다 많은 것들을 대신하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 이것은 짧은 태그(tag) 후 삽입(insert) 시스템, 및/또는 GlyLeu 링커, GlySer 링커를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 연결(connection)은 감긴(coiled) 코일(coil) 또는 류신(leucine) 지퍼(zipper)를 통하여 달성될 수 있다. 몇몇 예들에서, "꼬리" 그 자체는 그것의 끝에 기능적 기들을 포함하여, 다이설파이드 결합 그 자체를 대체하여, 그것이 각각의 폴리펩타이드들의 끝(ends)들에서 위치 및/또는 원하는 잔기에 선택적으로 결합할 수 있도록 할 수 있다. 몇몇 예들에서, 두 개의 폴리펩타이드 사슬들 사이에 공간을 제공하는 꼬리 보다는, 공유적으로 변형가능한(modifiable) 모이어티들(moieties)은 중(heavy) 또는 경(light) 사슬(chain) 폴리펩타이드의 말단에 직접 부착될 수 있으나, 두 개의 공유적으로 변형가능한 모이어티들은 링커에 의하여 연결될 수 있다.

[0194] 몇몇 예들에서, 타겟 분자에 결합하는 키메라(chimeric) 시스(cys)-디아바디가 제공된다. 몇몇 예들에서, 키메라(chimeric) 시스(cys)-디아바디는 V_L - V_H 형식(format)의 모노머를 포함하고, 서열번호: 12 또는 14의 서열, 또는 그것에 적어도 약 80% 동일성(identity)을, 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 키메라(chimeric) 시스(cys)-디아바디는 V_H - V_L 형식(format)의 모노머를 포함하고, 서열번호: 13 또는 15의 서열, 또는 그것에 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 그것에 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함한다.

[0195]

[0196] 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 구조들 중 임의의 것은 (시스(cys)-디아바디 예들로 언급된 대로 이들 배열들(arrangements)을 포함하는) 것은 scFv 예로서 제공될 수 있다. 이러한 예들에서, 구조체는 여전히 꼬리 상에 시스템을 포함할 수 있으나, 단순히 교차-연결(cross-link)되지 않는다. 다른 예들에서, 구조체는 꼬리에 시스템 또는 꼬리를 조금도 가질 필요가 없다.

- [0198] 링커 및/또는 꼬리 선택들(options)
- [0199] 몇몇 예들에서, 개개의 항체들을 위하여, 중(heavy) 및 경(light) 사슬(chain) 가변(variable) 도메인들은 다른 방식들로 관련될 수 있다. 이 이유로, 다른 링커 길이들의 사용은 다이설파이드 결합들의 형성을 확실히 하기 위하여 동작의 범위(range-of-motion) 및 구조적(conformational) 유연성(flexibility)을 가능하게 한다.
- [0200]
- [0201] 몇몇 예들에서, 2 개의 링커 길이들은 약 1 to 50 아미노산들 사이(및 이를 포함하는), 예컨대, 2 내지 15, 2 내지 14, 3 내지 13, 4 내지 10, 또는 5 아미노산들 내지 8 아미노산들의 어딘가일 수 있다. 몇몇 예들에서, 디아바디를 위한 페어 내 각각의 링커는 동일한 길이일 수 있다. 몇몇 예들에서, 페어(pair) 내 각각의 링커는 다른 길이일 수 있다. 몇몇 예들에서, 그것들이 원하는 조합들을 가능하게 하고/하거나 촉진하는 한, 링커 길이 페어들의 임의의 조합이 사용될 수 있다. 몇몇 예들에서, 변형된 아미노산이 사용될 수 있다.
- [0203] 도 8-11은 4 개의 Cys-Db 변이체들(variants), V_H -5- V_L , V_H -8- V_L , V_L -5- V_H , 및 V_L 8 V_H 를 제공한다(도 8 - 11, 및 표 0.3 참조). 4개 모두의 변이체들(variants)의 결합 및 발현을 생산하고 테스트하는 것은 각각의 신규 Cys-Db를 위한 단백질 생산을 위한 원하는 형식(format)의 확인(identification)을 가능하게 한다. 변이체들(variants)의 세트(set)를 평가하는 것은, 다이설파이드 다리(bridge)가 이용가능할 때, 고품질, 안정적 단백질이 생산되는 것을 확실히 하는 것을 도울 수 있다. 그러므로 Cys-Db를 조작하는 것은 미니바디 내로서, 하나가 아니라, 더하여 가변 영역들, V_H - V_L 및 V_L - V_H 의 두 성향(orientations)들인, 두 개의 구별되는 링커 길이들을 이용하는 것을 포함한다.
- [0205] 몇몇 예들에서, 링커는 GlySer 링커이다. GlySer 링커는 Gly 및/또는 Ser 잔기들이 풍부한 폴리펩타이드일 수 있다. 몇몇 예들에서, GlySer 링커의 아미노산 잔기들의 적어도 약 40%은 Gly, Ser, 또는 Gly 및 Ser의 조합, 예컨대 적어도 약 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%이다. 몇몇 예들에서, GlySer 링커는 적어도 약 2 아미노산들 길이, 예컨대 적어도 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 또는 40 아미노산들 길이이다. 몇몇 예들에서, 링커는 서열번호: 28, 30, 및/또는 36 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0207] 몇몇 예들에서, 시스테인은 디아바디의 C-말단에 추가된다. 이 시스테인은 디아바디 복합체가 공유 시스테인 결합들을 형성하는 것을 가능하게 할 수 있고, 방사성표지들과 같은 기능적 모이어티들의 위치-특이적 콘주게이션(conjugation)을 위한 이용가능한 황(sulfur) 잔기들을 위한 선택(option)을 제공한다. 몇몇 예들에서, 항체 그 자체의 말단 끝은 변화되어 시스테인을 포함한다. 몇몇 예들에서, 꼬리 서열, 예컨대 (Gly-Gly-Cys)이 C-말단에 추가된다. 몇몇 예들에서, 시스테인 꼬리 서열은 서로 다이설파이드 결합을 형성하기 위하여 시스(cys)-디아바디의 두 개의 모노머들을 가능하게 한다. 몇몇 예들에서, 시스테인 꼬리 서열은 시스(cys)-디아바디가 검출 가능한 마커 및/또는 치료제와 같은 검출가능한 모이어티를 갖는 다이설파이드 연결들(linkages)을 형성하는 것을 가능하게 한다. 시스테인 꼬리의 설프하이드릴(sulfhydryl) 기들은 예컨대 검출가능한 마커 및/또는 치료제인, 원하는 기능적 모이어티의 위치-특이적 콘주게이션에 앞서, 온화한 환원(reduction)을 겪을 수 있다. 몇몇 예들에서, 꼬리는 적어도 약 1 아미노산 길이, 예컨대 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 또는 40 아미노산들 길이이다. 몇몇 예들에서, 꼬리는 서열번호: 32의 적어도 하나를 포함한다. 몇몇 예들에서, 꼬리는 3 내지 8 아미노산들 길이이다. 몇몇 예들에서, 꼬리는 감긴(coiled) 코일(coil) 및/또는 루신 지퍼를 포함하고/하거나 할 수 있다. 상기 언급한 대로, 몇몇 예들에서, 시스테인은 C-말단에 위치한다; 그러나 이것은 시스테인이 C-말단 아미노산으로서 위치하는 것을 요구하지는 않는다. 대신, 이것은 시스테인이 단백질의 C-말단 내 위치하는 잔기들 중 임의의 것의 일부일 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0209] 몇몇 예들에서, 2개의 C-말단들 사이의 연결(linking) 선택(option)은 직접 및/또는 간접적, 교차-연결을 위하여, 시스테인에 의하여 달성될 수 있다.
- [0210]
- [0211] 타겟 분자에 결합하는 미니바디들
- [0212] 여기에 서술된 "미니바디(minibody)"는 호모다имер를 포함하며, 이때 각각의 모노머는 힌지(hinge) 서열과 같은 링커에 의하여 인간 IgG1 CH3 도메인과 연결된(link) 단일-사슬 variable 단편(scFv)이다. 몇몇 예들에서, 힌지(hinge) 서열은 도 12B, 서열번호들(SEQ ID NO): 53-60 에 나타난 바와 같이, 인간 IgG1 또는 IgG2 힌지

(hinge) 서열이다. 몇몇 예들에서, CH3 서열은 도 12B, 서열번호들(SEQ ID NO): 37-38 및 80-81 에 나타난 바와 같이, IgG1 CH3, 또는 IgG2 CH3 서열을 포함한다.

[0214] 몇몇 예들에서, 힌지(hinge) 서열은 인공적인 힌지(hinge) 서열이다. 몇몇 예들에서, 힌지(hinge) 서열은 4 종류들(classes)의 임의의 하나 또는 그보다 많은 것으로부터 IgG 힌지(hinge)일 수 있다. 인공적인 힌지(hinge) 서열은 GlySer 링커 (V_H 및 V_L 영역들을 연결하는 포괄적인(generic) 링커 서열로부터 이 섹션(section)을 구별할 때, "연장(extension)"으로도 또한 알려져 있다) 서열 및 인간 IgG1 또는 IgG2 힌지(hinge)의 일부를 포함할 수 있다.

[0216] 몇몇 예들에서, 인공적인 힌지(hinge) 서열은 인간 IgG1 힌지(hinge)의 거의 첫 번째 14 또는 15 잔기들, 뒤이어 연장(extension) 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 연장(extension)은 여기에 제공된 것들 중 임의의 것일 수 있다. 몇몇 예들에서, 연장(extension)은 6, 7, 8, 9 또는 10 아미노산들 길이인 GlySer 연장(extension) 서열일 수 있다. 몇몇 예들에서, 인공적인 힌지(hinge) 서열은 IgG1 힌지(hinge)의 거의 첫 번째 15 잔기들 및 뒤이어 약 10 아미노산들 길이인 GlySer 연장(extension) 서열 을 포함한다. 몇몇 예들에서, CH3 도메인들 사이의 결합(association)은 안정한 다이머로서 존재하기 위하여 미니바디를 야기한다.

[0218] 몇몇 예들에서, 힌지(hinge) 서열은 인간 IgG2 힌지(hinge) 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 힌지(hinge) 서열은 IgG2 힌지(hinge) 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 힌지(hinge) 서열은 원래의(native) hIgG2IgG2 서열 ("NH")을 포함한다. 여기의 예들로 콘주게이션되어 이용될 수 있는 모범적인 원래의(native) 힌지(hinge) 서열은 도 12B, 서열번호: 55에 나타나 있다. 몇몇 예들에서, 여기에서 제공된 임의의 그리고 모든 구조체들은 hIgG2 힌지(hinge) 영역과 이용될 수 있다.

[0220] 몇몇 예들에서, 힌지(hinge) 서열은 서열번호: 55의 원래의(native) 인간 IgG2 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 힌지(hinge) 서열은 인공적인 IgG2 힌지(hinge) 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 원래의(native) IgG2 서열은 인공적인 힌지(hinge)-연장(extension) (EH) 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 인공적인 힌지-연장들 서열은 서열번호: 79를 포함한다. 몇몇 예들에서, 인공적인 힌지(hinge) 서열은 예컨대 인간 IgG2 힌지(hinge) 서열의 12 잔기들, 거의 첫 번째 12 내지 15 잔기들, 뒤이어 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12 아미노산들 길이인 GlySer 연장(extension) 서열을 포함한다. 여기의 예들과 콘주게이션으로 이용될 수 있는 모범적인 인공적인 힌지(hinge) 서열들은 도 12B, 서열번호: 79 에 나타나 있다. 몇몇 예들에서, 앞서 언급한 힌지(hinge) 영역 선택들(options) 중 임의의 것 (예컨대, 표 0.1 또는 0.2)은 미니바디에서 사용될 수 있다. 몇몇 예들에서, 표 0.1 또는 0.2 에 언급된 힌지(hinge) 영역들 중 임의의 것은 IgG2 힌지(hinge) 영역으로 대체될 수 있다. 몇몇 예들에서, 표 0.1 또는 0.2의 구조체들 중 임의의 것, 및/또는 도면들에 묘사된 구조체들 중 임의의 것은 hIgG2 또는 IgG2 로부터의 힌지(hinge) 영역 중 부분 또는 모든 것으로 대체된, 묘사된 힌지(hinge) 영역을 가질 수 있다.

[0222] 몇몇 예들에서, 미니바디 scFv 서열은 여기에 서술된 디아바디 서열과 유사한 및/또는 동일한 가변(variable) 영역 서열들 및 또는 FR, 및/또는 CDR을 포함할 수 있다(예를 들어, 도 2A, 2B, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 12C-12I 및 표들 0.1 및 0.2에 발견된 바와 같다). 몇몇 예들에서, 미니바디 scFv는 여기에 서술된 시스(cys)-디아바디의 scFv 와 동일한 서열 (CDR, CDRs, 6 CDRs의 전체 세트(set), 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 중(hheavy) 및 경(light) 사슬(chain) 가변 영역들 등)을 갖는다.

[0224] 몇몇 예들에서, 미니바디는 서열번호: 3, 6, 9, 16, 18, 20, 22, 34, 36, 38, 53-60, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 및 52인 서열에 약 80% 동일한(identical) 서열, 및/또는 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)인, 표 0.1 및/또는 0.2인 배열들(arrangements)을 위한 서열을 갖는다.

[0226] 몇몇 예들에서, 미니바디는 서열번호: 3, 6, 9, 16, 18, 20, 22, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 및 52인 서열에 적어도 약 80% 동일한(identical), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)인 가변(variable) 사슬(chain) 영역을 갖는다.

[0228] scFv는 V_H - V_L 또는 V_L - V_H 성향(orientation)을 가질 수 있다. 몇몇 예들에서, V_H 및 V_L 는 아미노산 링커 서열에 의하여 서로 연결(link)된다. 아미노산 링커는 여기에 서술된 링커일 수 있다. 몇몇 예들에서, 링커는 GlySer-풍부 그리고 거의 15-20 아미노산들 길이이다. 다른 예에서, 링커는 GlySer 풍부이고 18 아미노산들 길이이다. 몇몇 예들에서, 링커 길이는 약 1 내지 50 아미노산들 사이(그리고 포함한다), 예컨대, 2 내지 30, 3 내지 20, 4 내지 15, 또는 5 아미노산들 내지 8 아미노산들에서, 다르다. 몇몇 예들에서, 미니바디 scFv는 여기에 서술된

시스(cys)-디아바디의 scFv와 적어도 약 80% 동일한(identical), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)인 서열을 갖는다. scFv는 V_HV_L 또는 V_LV_H 성향(orientation)을 가질 수 있다.

[0230] 몇몇 예들에서, 미니바디의 각각의 모노머는 하기 요소들, N-말단부터 C-말단까지를 포함한다: (a) V_L 도메인에 연결된 V_H 도메인을 포함하고, 그리고 타겟 분자에 결합하는 scFv 서열, (b) 인간 IgG1 힌지(hinge) 영역을 포함하는 힌지-연장 도메인, 및 (c) 인간 IgG CH3 서열. 몇몇 예들에서, 미니바디의 각각의 모노머는 하기 요소들을, N-말단부터 C-말단까지를 포함한다: (a) V_L 도메인에 연결(link)된 V_H 도메인을 포함하고, 그리고 타겟 분자에 결합하는 scFv 서열, (b) 여기에 서술된 IgG2 힌지(hinge) 영역을 포함하는 힌지-연장 도메인, 및 (c) 인간 IgG CH3 서열. 몇몇 예들에서, 미니바디의 각각의 모노머는 IgG2, IgG3, 또는 IgG4 CH3를 포함한다. 몇몇 예들에서, 미니바디의 각각의 모노머는 IgA 또는 IgD 의 CH3 도메인 및/또는 IgM 및/또는 an IgE 의 CH4 도메인을 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 미니바디는 세포, 세포주 또는 여기에 서술된 다른 적합한 발현 시스템에 의하여 발현될 수 있는 핵산에 의하여 코드된다. 이런 식으로 신호 서열은 세포 또는 세포주에서 발현될 때 미니바디의 분비를 가능하게 하기 위하여 scFv의 N-말단에 융합될 수 있다.

[0232] 몇몇 예들에서, scFv, 미니바디, 시스(cys)-디아바디 및/또는 항체는 도 2A 및/또는 2B에 나타나고, 별표로 표시된 인간화된 서열인 잔기들의 하나 또는 그보다 많은 것을 포함한다. 몇몇 예들에서, 도 2A 또는 2B에서 별표로 표시된 잔기들 중 하나 또는 그보다 많은 것이 존재하는 반면, 남은 서열은 다를 수 있다. 예를 들어, 서열은 서열의 남은 섹션들에 대하여 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 퍼센트 또는 더 큰 동일성(identity)일 수 있다. 몇몇 예들에서, 인간 및/또는 인간화된 항원 결합 구조체는 도 2A의 별표를 붙인 잔기들 중 하나 또는 그보다 많은 것들, 예컨대 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 또는 47을 포함할 것이다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 도 2A 내 밀줄친 잔기들 중 하나 또는 그보다 많은 것을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 도 2A 내 밀줄치지 않은 잔기들 중 하나 또는 그보다 많은 것을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 도 2A 내 밀줄치지 않은 잔기들 중 하나 또는 그보다 많은 것과 함께 박스로 된 CDR 섹션들을 포함하는 반면, 다른 잔기들은 달라질(vary) 것을 가능하게 한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체.

[0234] 대체하여, 및/또는 추가하여, 항원 결합 구조체는 도 2A 또는 2B에서 별표 표시된 잔기들 중 하나 또는 그보다 많은 것, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20을 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 도 2A 또는 2B에서 밀줄 쳐지지 않은 잔기들 중 하나 또는 그보다 많은 것을 포함한다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 도 2A 또는 2B 내 밀줄쳐지지 않은 잔기들 중 하나 또는 그보다 많은 것과 더불어 박스표시된 CDR 섹션들(sections)을 포함하는 반면, 다른 잔기들은 달라질(vary) 것을 가능하게 한다. 몇몇 예들에서, CDR 잔기들은 유지되고, 별표를 갖는 잔기들은 유지되나, 다른 잔기들 중 하나 또는 그보다 많은 것이 달라질(vary) 것을 가능하게 한다.

[0236] 몇몇 예들에서, 타겟 분자에 결합하는 키메라(chimeric) 미니바디가 제공된다. 몇몇 예들에서, 키메라(chimeric) 미니바디는 V_L-V_H 형식(format)인 모노머를 포함하고, 그리고 서열번호: 16 또는 20의 서열, 또는 그것에 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 키메라(chimeric) 미니바디는 V_H-V_L 형식(format)의 모노머를 포함하고, 그리고 서열번호: 18 또는 22의 서열, 또는 그것에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 그것에 대하여 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함한다.

[0238] 몇몇 예들에서, 모노머의 폴리펩타이드는 표 0.1 및 0.2에 제시된 대로, 모노머들에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성(identity)의 서열들을 갖는 모노머의 폴리펩타이드들을 포함하는 표 0.1 및 0.2에 표시된 대로 조합된 섹션들 중 임의의 것을 포함한다.

[0240] 핵산들

[0241] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체들의 폴리펩타이드들은 핵산들에 의하여 1-코드되고 인 비보(in vivo) 또는 인 비트로(in vitro)로 발현될 수 있고, 또는 이들 펩타이드는 화학적으로 합성될 수 있다. 이런 식으로, 몇몇 예

들에서, 항원 결합 구조체를 코딩하는 핵산이 제공된다. 몇몇 예들에서, 핵산은 시스(cys)-디아바디 또는 미니바디의 모노머 또는 한 부분을 코딩한다. 몇몇 예들에서, 핵산은 둘 또는 그보다 많은 모노머들, 예컨대, 적어도 2 모노머들을 코딩한다. 다수의 모노머들을 코딩하는 핵산들은 적어도 두 모노머들 사이의 핵산 절단(cleavage) 위치들을 포함할 수 있고, 둘 또는 그보다 많은 모노머들 사이의 전사 또는 번역 시작 위치를 코딩할 수 있고, 그리고/또는 둘 또는 그보다 많은 모노머들 사이의 단백질가수분해의(proteolytic) 타겟 위치들을 코딩할 수 있다.

[0243] 몇몇 예들에서, 발현 벡터는 여기에 서술된 대로 항원 결합 구조체를 코딩하는 핵산을 포함한다. 몇몇 예들에서, 발현 벡터는 포유류 발현을 위한 pcDNA3.1™/myc-His (-) 버전(Version) A 벡터(vector) (Invitrogen, Inc.), 또는 그 변이체(variant)를 포함한다(도 13 참조). pcDNA3.1 발현 벡터는 포유류(네오마이신(Neomycin)) 및 박테리아(암피실린(Ampicillin)) 선택(selection) 마커들 모두 및 포유류 발현을 위하여 CMV 프로모터를 특징으로 한다(도 10 참조). 몇몇 예들에서, 발현 벡터는 플라스미드를 포함한다. 몇몇 예들에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 또는 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 예들에서, 벡터는 코스미드(cosmid), YAC, 또는 BAC를 포함한다.

[0244]

[0245] 몇몇 예들에서, 미니바디 모노머들 중 적어도 하나를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호들(SEQ ID NO): 17, 19, 21, 23, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 또는 그것들에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 더 큰 동일성(identity)을 갖는 서열 중 적어도 하나를 포함한다.

[0247] 몇몇 예들에서, 시스(cys)-디아바디 모노머들의 적어도 하나를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호들(SEQ ID NO): 77, 78, 10, 11, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 또는 그것에 대하여 적어도 약 80% 동일성(identity), 예컨대 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 더 큰 동일성(identity)을 갖는 서열을 포함한다.

[0249] 세포주들

[0250] 몇몇 예들에서, 세포주는 여기에 서술된 항원 결합 구조체들 중 적어도 하나를 발현시키는 것이 제공된다. 몇몇 예들에서, 포유류 세포주 (예컨대, CHO-K1 세포주)는 여기에 서술된 대로 미니바디들, 시스(cys)-디아바디들 또는 다른 항체들을 생산하기 위한 발현 시스템이다. 몇몇 예들에서, 여기에 서술된 미니바디들, 시스(cys)-디아바디들 및 다른 항체들 또는 항체 단편들은 글리코실화되어 있지 않고(non-glycosylate), 그리고 포유류 발현 시스템은 요구되지 않고, 보통 말하는 번역-후 변형들(modifications)은 필요로 하지 않는다. 이런 식으로, 몇몇 예들에서, 포유류 발현 시스템들 (예컨대, CHO-K1 세포들), 박테리아 발현 시스템들 (예컨대, 대장균(E. Coli), B. 서브틸리스(subtilis)) 효모 발현 시스템들 (예컨대, 피키아(Pichia), S. 세레비지애(cerevisiae)) 또는 임의의 다른 알려진 발현 시스템을 포함하나, 여기에 제한되지 않는, 포유류 또는 비-포유류 발현 시스템들의 하나 또는 그보다 많은 것이 여기에 서술된 항원 결합 구조체들을 생산하는데 사용된다(예를 들어, 항-CD8 미니바디들 및 시스(cys)-디아바디들). 다른 시스템들은 곤충 세포들 및/또는 식물 세포들을 포함할 수 있다.

[0252] 항원 결합 구조체 변형들

[0253] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 적어도 하나의 변형을 포함한다. 모범적인 변형들은 글리코실화(glycosylation), 아세틸화(acetylation), 페길레이션(pegylation), 인산화(phosphorylation), 아마이드화(amidation), 알려진 보호/차단 기들에 의한 유도체화(derivatization), 단백질가수분해의(proteolytic) 절단 및 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결에 의하여 변형된 항원 결합 구조체들을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 많은 화학적 변형들은 특정 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화(formylation) 및 튜니카마이신(tunicamycin)을 포함하나 이에 제한되지 않는 알려진 기술들에 의하여 수행될 수 있다. 몇몇 예들에서, 그 파생물은 하나 또는 그보다 많은 비-자연적 아미노산들을 포함할 수 있다.

[0255] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 항-타겟 콘주게이트를 형성하기 위하여 다른 성분과 콘주게이트된다. 여기에 서술된 콘주게이트들은 지질들, 탄수화물들, 단백질 또는 다른 원자들 및 분자들로 항원 결합 구조체들을 연결하는 알려진 방법들에 의하여 제조될 수 있다. 몇몇 예들에서, 콘주게이트(conjugate)는 적절한 연결(linkage) 또는 결합을 이용하여 위치-특이적 콘주게이션(conjugation)에 의하여 형성된다. 위치-특이적 콘주게이션은 좀더 항원 결합 구조체의 결합 활성을 보존할 것 같다. 성분은 다이설파이드 결합 형성을 통하여 환원된(reduced) 항원 결합 구조체의 힌지(hinge) 영역에서 부착되거나 또는 콘주게이트될 수 있다. 예를 들어, 여기

에 서술된 시스(cys)-디아바디들 내에 도입될 수 있는 것들과 같은, scFv 단편의 C-말단에서 시스테인 잔기들의 도입은, 위치-특이적 티올(thiol)-반응성 커플링이 항원 결합 위치로부터 벗어난 위치에서 매우 다양한 제제들로 가능하게 된다. 콘쥬게이트를 형성하기 위하여 사용된 다른 연결들(linkages) 또는 결합들(bonds)은 공유결합, 비-공유 결합, 설파이드 연결, 하이드라존(hydrazone) 연결, 하이드라진(hydrazine) 연결, 에스터 연결, 아미도(amido) 연결 및 아미노(amino) 연결, 이미노(imino) 연결, 티오세미카바존(thiosemicarbazone) 연결, 에미카바존(emicarbazone) 연결, 옥심(oxime) 연결(linkage) 및 탄소-탄소 연결을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0257] 검출가능한 마커들

[0258] 몇몇 예들에서, 변형된 항원 결합 구조체는 검출가능한 마커로 콘쥬게이트된다. 여기에서 사용된 대로, "검출가능한 마커"는 타겟 분자, 세포, 조직, 기관(organ) 등의 양 및/또는 위치를 진단, 검출 또는 가시화(visualizing)하는데 유용한 원자, 분자, 또는 화합물을 포함한다. 여기의 예들에 따라 사용될 수 있는 검출가능한 마커들은 방사성 성분들 (예컨대, 방사성동위원소(radioisotopes), 방사성핵종(radionuclides), 방사성표지(radiolabels) 또는 방사성추적자들(radiotracers)), 염료들, 조영제들(contrast agents), 형광 화합물들 또는 분자들, 생물발광(bioluminescent) 화합물들 또는 분자들, 효소들 및 강화작용제들(enhancing agent) (예컨대, 상자성(paramagnetic) 이온들)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 게다가, 몇몇 나노입자들, 예컨대 양자점들(quantum dots) 및 금속 나노입자들(하기 서술됨)은 검출 제제로서 사용하기에 적절할 수 있다. 몇몇 예들에서, 검출가능한 마커는 IndoCyanine Green (ICG)이다.

[0260] 여기의 예들에 따른 검출가능한 마커들로서 사용될 수 있는 모범적인 방사성(radioactive) 성분들은 ^{18}F , ^{18}F -FAC, ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , 154 - ^{158}Gd , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra 및 ^{225}Ac 을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 검출가능한 마커들로서 사용될 수 있는 모범적인 상자성(Paramagnetic) 이온들 성분들은 전이 및 란타늄족(lanthanide) 금속들의 이온들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다(예컨대 6 내지 9, 21-29, 42, 43, 44, 또는 57-71의 원자 번호들을 갖는 금속들). 이들 금속들은 Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb 및 Lu 의 이온들을 포함한다.

[0261]

[0262] 몇몇 예들에서, 검출가능한 마커가 방사성(radioactive) 금속 또는 상자성(paramagnetic) 이온일 때, 마커는 이들 이온들에의 결합을 위한 긴 꼬리에 부착된 하나 또는 그보다 많은 킬레이팅(chelating) 기들을 갖는 긴 꼬리를 갖는 시약과 반응될 수 있다. 긴 꼬리는 이온들에의 결합을 위하여 킬레이트 기(group)에 결합될 수 있는 펜던트(pendant) 기들을 갖는 다른 유도체합성된(derivatized) 또는 유도체합성가능한(derivatizable) 사슬, 또는 다당류(polysaccharide), 폴리라이신(polylysine)과 같은 폴리머일 수 있다. 여기의 예들에 따라 사용될 수 있는 킬레이트(chelating) 그룹들(groups)의 예들은 에틸에네디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid) (EDTA), 디에틸에테트리아미네펜타아세트산(diethylenetriaminepentaacetic acid) (DTPA), DOTA, NOTA, NOGADA, NETA, 디페록사민(deferoxamine) (DfO), 포르피린들(porphyrins), 폴리아민들(polyamines), 크라운 에터들(crown ethers), 비스(bis)-티오세미카바존들(thiosemicarbazones), 폴리옥심들(polyoximes), 및 유사 그룹들을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 킬레이트(chelate)는 면역반응성의 최소의 손실 및 최소의 응집(agggregation) 및/또는 내부의 교차-연결을 갖고 분자에의 결합을 형성하는 것을 가능하게 하는 그룹에 의하여 항원 결합 구조체에 연결될 수 있다. 망간(manganese), 철 및 가돌리늄(gadolinium)과 같은 비-방사성 금속들과 복합(complexed)될 때, 여기에 서술된 담체들 및 항원 결합 구조체들과 함께 사용될 때, 동일한 킬레이트들은, MRI에 유용하다. NOTA, NOGADA, DOTA, 및 TETA와 같은 대환식(macrocyclic) 킬레이트들은 각각 갈륨(gallium), 이트륨(yttrium) 및 구리의 방사성핵종들을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 여러가지 방사성금속들(radiometals) 및 금속들과 유용하다. RAIT를 위한 Radium-223과 같은, 안정적인 결합 방사성핵종들을 위하여 관심있는, 대환식(macrocyclic) 폴리에터들(polyethers)과 같은, 다른 고리-타입 킬레이트들이 사용될 수 있다. 특정 예들에서, 킬레이트 모이어티들은 PET 분석에서의 사용을 위한 분자 타겟팅에, Aluminum- ^{18}F 과 같은, PET 영상화(imaging) 제제에 부착하기 위하여 사용될 수 있다.

[0264] 본 공개의 예들에 따른 검출가능한 마커들로서 사용될 수 있는 모범적인 조영제들(contrast agent)은 바륨

(barium), 디아트리조에이트(diatrizoate), 에티오다이즈된 오일(ethiodized oil), 갈륨(gallium) 시트레이트(citrate), 이오카르믹엑시드(iocarmic acid), 이오세타믹 엑시드(iocetamic acid), 이오다마이드(iodamide), 이오디파미드(iodipamide), 이오독사믹 엑시드(iodoxamic acid), 이오굴라미드(iogulamide), 이오헥신(iohexyl), 이오파미돌(iopamidol), 이오파노익 엑시드(iopanoic acid), 이오프로세믹 엑시드(ioprocemic acid), 이오세파믹 엑시드(iosefamic acid), 이오세릭 엑시드(ioseriac acid), 이오설라미드(iosulamamide) 메글루민(meglumine), 이오세메틱 엑시드(iosemetac acid), 이오타술(iotasul), 이오테트릭 엑시드(iotetric acid), 이오탈라믹 엑시드(iothalamic acid), 이오트록식 엑시드(iotroxic acid), 이옥사글릭 엑시드(ioxaglic acid), 이옥소트리졸릭 엑시드(ioxotrizoic acid), 이포데이트(ipodate), 메글루민(meglumine), 메트리자마이드(metrizamide), 메트리조에이트(metrizoate), 프로필리돈(propyliodone), 탈로우스(thallous) 클로라이드(chloride), 또는 그 조합들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0266] 본 공개의 예에 따라 검출가능한 마커들로 사용될 수 있는 생물발광 및 형광 화합물들 또는 분자들 및 염료들은 플루오레세인(fluorescein), 플루오레세인(fluorescein) 이소티오시아네이트(isothiocyanate) (FITC), OREGON GREEN™, 로다민(rhodamine), 텍사스(Texas) 레드(red), 테트라호디민(tettrahodimine) 이소티오시아네이트(isothiocyanate) (TRITC), Cy3, Cy5, 등), 형광 마커들 (예컨대, 그린(green) 형광 단백질 (GFP), 피코에리트린(phycoerythrin), 등), 중앙-관련 프로테아제들에 의하여 활성화되는 오토퀸치된(autoquenched) 형광 화합물들, 효소들 (예컨대, 루시페라제(luciferase), 서양고추냉이(horseradish) 페록시다제(peroxidase), 알칼라인(alkaline) 포스파타제(phosphatase), 등), 나노입자들, 비오틴(biotin), 디곡시제닌(digoxigenin) 또는 그것의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0268] 본 공개의 예들에 따라 검출가능한 마커들로서 사용될 수 있는 효소들은, 서양고추냉이(horseradish) 페록시다제(peroxidase), 알칼라인(alkaline) 포스파타제(phosphatase), 엑시드(acid) 포스파타제(phosphatase), 글루코스(glucose) 옥시다제(oxidase), β -갈락토시다제(galactosidase), β -글루코니다제(glucuronidase) 또는 β -락타마제(lactamase)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 효소들은 검출가능한 신호를 만들어내기 위하여 크로모젠(chromogen), 형광원(fluorogenic) 화합물 또는 발광원(luminogenic) 화합물과 조합하여 사용될 수 있다.

[0270] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 나노입자에 콘주게이트된다. 용어 "나노입자"는 나노미터로 크기가 측정되는 미세한 입자, 예컨대, 약 100 nm보다 적은 적어도 하나의 치수를 갖는 입자를 가리킨다. 그것을 흡수하는 대신, 그것들은 가시광선을 흡수하기 위해 충분히 작기 때문에 나노입자들은 검출가능한 성분들로 사용될 수 있다. 예를 들어, 금 나노입자들은 중요한 가시광 소멸(extinction) 물성들을 지니고, 용액 내 심홍색(deep red) 내지 검정으로 나타난다. 그 결과, 나노입자들에 콘주게이트된 항원 결합 구조체들을 포함하는 조성물들은 대상에서 T-세포들의 인 비보(in vivo) 영상화(imaging)에 사용될 수 있다. 크기 범위의 작은 끝에서, 나노입자들은 가끔 클러스터들(clusters)로 언급된다. 금속, 유전체(dielectric) 및 반도체 나노입자들이 더불어 하이브리드 구조체들(예컨대 코어-셸 나노입자들)과 형성되었다. 나노스피어들(nanospheres), 나노로드들(nanorods), 및 나노컵들(nanocups)은 성장해온 형상들 중 몇 개일 뿐이다. 반도체 양자점들(quantum dots) 및 나노크리스탈들(nanocrystals)은 나노입자들의 추가적인 타입들 중 예들이다. 항원 결합 구조체와 콘주게이트될 때, 이러한 나노스케일 입자들은 여기에 서술된 대로 T-세포들의 인 비보(in vivo) 검출을 위한 영상화(imaging) 제제들로서 사용될 수 있다.

[0272] 치료제들

[0273] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 치료제에 콘주게이트된다. 여기에서 사용된 대로 "치료제"는 암, 염증, 다른 질병 질환들의 치료에 유용한 원자, 분자, 또는 화합물, 또는 그렇지 않으면, 면역 반응, 예컨대 장기 이식들에서 면역억제를 억제하기 위한, 것이다. 치료제들의 예들은 약물, 화학치료제들, 치료적 항체들 및 항체 단편들, 독소들, 방사성동위원소들(radioisotope), 효소들 (예컨대, 항원 결합 구조체 결합의 위치에서 세포독성(cytotoxic) 제제로 프로드러그들(prodrugs)을 절단하기 위한 효소들), 뉴클레아제들, 호르몬들, 면역조절제들(immunomodulators), 안티센스 올리고뉴클레오타이드들, 킬레이터들, 붕소(boron) 화합물들, 광활성(photoactive) 제제들 및 염료들, 및 나노입자들을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0275] 화학요법제들(Chemotherapeutic agents)은 가끔 현실적으로 세포독성 또는 세포증식억제이며, 알킬화제들, 항대사물질들(antimetabolites), 항-중앙 항생제들, 토포이소메라제(topoisomerase) 억제제들, 유사분열(mitotic) 억제제들 호르몬 요법, 타겟된 치료법들 및 면역치료법들을 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 본 공개의 예들에 따라 검출가능한 마커들로서 이용될 수 있는 화학요법제들은 13-시스(cis)-레티노산(Retinoic Acid),

2-클로로디옥시아데노신(Chlorodeoxyadenosine), 5-아자시티딘(Azacitidine), 5-플루오로우라실(Fluorouracil), 6-머캅토피린(Mercaptopurine), 6-티오구아닌(Thioguanine), 액티노마이신(actinomycin)-D, 아드리마이신(adriamycin), 알데스류킨(aldesleukin), 알레투주맙(alemtuzumab), 알리트레티노인(alitretinoin), 모든(all)-트랜스레티노산(transretinoic acid), 알파 인터페론, 알트레타민(altretamine), 아메토펙테린(amethopterin), 아미포스틴(amifostine), 아나그레리드(anagrelide), 아나스트로졸(anastrozole), 아라비노실사이토신(arabinosylcytosine), 아르제닉(arsenic) 트리옥사이드(trioxide), 암사크린(amsacrine), 아미노캄프토펙신(aminocamptothecin), 아미노글루테티미드(aminoglutethimide), 아스파라기나제(asparaginase), 아자사이티딘(azacytidine), 바실러스(bacillus) 칼메트(calmette)-구에린(guerin) (BCG), 벤다무스틴(bendamustine), 베바시주맙(bevacizumab), 벡사로텐(bexarotene), 비칼루타미드(bicalutamide), 보르테조밐(bortezomib), 블레오마이신(bleomycin), 부설펜(busulfan), 칼슘(calcium) 류코보린(leucovorin), 시트로보륨(citrovorum) 인자(factor), 카페시타빈(capecitabine), 카네르티닙(canertinib), 카르보플라틴(carboplatin), 카르무스틴(carmustine), 세툽시맙(cetuximab), 클로람부실(chlorambucil), 시스플라틴(cisplatin), 클라드리빈(cladribine), 코르티존(cortisone), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 시타라빈(cytarabine), 다르베포에틴(darbepoetin) 알파(alfa), 다사티닙(dasatinib), 다우노마이신(daunomycin), 데시타빈(decitabine), 데니류킨(denileukin) 디프티톡스(diftitox), 텍사메타손(dexamethasone), 텍사손(dexasone), 텍스라조산(dexrazoxane), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노르부신(daunorubicin), 데카르바진(decarbazine), 도세탁셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 독시플루리딘(doxifluridine), 에닐루라실(eniluracil), 에피루비신(epirubicin), 에포에틴(epoetin) 알파(alfa), 에르로티닙(erlotinib), 에베롤리무스(everolimus), 엑세메스탄(exemestane), 에스트라무스틴(estrामustine), 에토포사이드(etoposide), 필그라스티ם(filgrastim), 플루옥시메스테론(fluxymesterone), 플베스트란트(fulvestrant), 플라보피리돌(flavopiridol), 플록수리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 플루오로우라실(fluorouracil), 플루타마이드(flutamide), 게피티닙(gefitinib), 겐시타빈(gemcitabine), 겐투주맙(gemtuzumab) 오조가미신(ozogamicin), 고세렐린(goserelin), 그라눌로사이트(granulocyte)-콜로니(colony) 자극(stimulating) 인자(factor), 그라눌로사이트(granulocyte) 마크로파지(macrophage)-콜로니(colony) 자극(stimulating) 인자(factor), 헥사메틸멜라민(hexamethylmelamine), 하이드로코르티손(hydrocortisone) 하이드록시우레아(hydroxyurea), 이브리투모맙(ibritumomab), 인터페론(interferon) 알파(alpha), 인터루킨(interleukin)-2, 인터루킨(interleukin)-11, 이소트레티노인(isotretinoin), 익사베필론(ixabepilone), 이다루비신(idarubicin), 이마티닙(imatinib) 메실레이트(mesylate), 이포스파마이드(ifosfamide), 이리노테칸(irinotecan), 라파티닙(lapatinib), 레날리도마이드(lenalidomide), 레트로졸(letrozole), 류코보린(leucovorin), 류프롤라이드(leuprolide), 리포조말(liposomal) 아라(Ara)-C, 로무스틴(lomustine), 메클로레타민(mechlorethamine), 메게스트롤(megestrol), 멜팔란(melphalan), 머캅토피린(mercaptopurine), 메스나(mesna), 메토티렉세이트(methotrexate), 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 미토마이신(mitomycin) C, 미토탄(mitotane), 미토헨트론(mitoxantrone), 넬라라빈(nelarabine), 닐루타마이드(nilutamide), 옥트레오타이드(octreotide), 오프렐베킨(oprelvekin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel), 파미드로네이트(pamidronate), 페메트렉세드(pemetrexed), 파니투무맙(panitumumab), PEG 인터페론(Interferon), 페가스파라가스(pegaspargase), 페그필그라스티ם(pegfilgrastim), PEG-L-아스파라기나제(asparaginase), 펜토스타틴(pentostatin), 플리카마이신(plicamycin), 프레드니솔론(prednisolone), 프레드니손(prednisone), 프로카바진(procarbazine), 랄록시펜(raloxifene), 리툽시맙(rituximab), 로미플로스티ם(romiplostim), 랄리트렉세드(ralitrexed), 사파시타빈(sapacitabine), 사르그라모스티ם(sargramostim), 사트라플라틴(satraplatin), 소라페닙(sorafenib), 수니티닙(sunitinib), 세무스틴(semustine), 스트렙토조신(streptozocin), 타모시펜(tamoxifen), 테가푸르(tegafur), 테가푸르(tegafur)-우라실(uracil), 템실로리무스(temsirolimus), 테모졸라마이드(temozolamide), 테니포사이드(teniposide), 탈리도마이드(thalidomide), 티오구아닌(thioguanine), 티오테파(thiotepa), 토포테칸(topotecan), 토레미펜(toremifene), 토시투모맙(tositumomab), 트라스투주맙(trastuzumab), 트레티노인(tretinoin), 트리미트렉세이트(trimetrexate), 알루비신(alrubicin), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 빈데스틴(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 보리노스타트(vorinostat), 또는 졸레드로닉 엑시드(zoledronic acid)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0277] 본 공개의 예들에 따른 검출가능한 마커들로서 사용될 수 있는 독소들은 리신(ricin), 아브린(abrin), 리보뉴클레아제(ribonuclease) (RNase), DNase I, 스태필로코칼(Staphylococcal) 엔테로톡신(enterotoxin)-A, 미국자리공(pokeweed) 항바이러스(antiviral) 단백질, 겔로닌(gelonin), 디프테리아(diphtheria) 독소, 슈도모나스(Pseudomonas) 엑소톡신(exotoxin), 및 슈도모나스(Pseudomonas) 엔도톡신(endotoxin)을 포함하나, 여기에 제

한되는 것은 아니다.

[0279] 몇몇 예들에서, 나노입자들은 항원 결합 구조체에 콘주게이트될 때, 화학요법제들, 호르몬 치료제들, 방사선치료제들(radiotherapeutic agents), 독소들, 또는 세포 표면 상 타겟을 과발현시키는 암 세포들에 대하여 당업계에 알려진, 임의의 다른 세포독성 또는 항암제를 전달(deliver)하는 약물 담체들로서 치료적 적용들에 사용된다.

[0281] 여기에 서술된 임의의 항원 결합 구조체들은 하나 또는 그보다 많은 추가적인 치료제들, 검출가능한 마커들, 나노입자들, 담체들 또는 그 조합과 더 콘주게이트될 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 구조체는 Iodine 131 로 방사성표지되고, 지질 담체에 콘주게이트되어, 항-CD8-지질 콘주게이트가 마이셀(micelle)을 형성할 수 있다. 마이셀은 하나 또는 그보다 많은 therapeutic 또는 검출가능한 마커들을 포함(incorporate)할 수 있다. 대체하여, 추가로, 항원 결합 구조체는 Iodine 131로 방사성표지되어(예컨대, 티로신(tyrosine) 잔기) 그리고 약물(예컨대, 라이신 잔기의 엡실론(epsilon) 아미노 기에서)에 콘주게이트될 수 있고, 그리고 담체는 추가적인 치료적 또는 검출가능한 마커를 포함할 수 있다.

[0283] 키트들

[0285] 몇몇 예들에서, 키트들(kits)이 제공된다. 몇몇 예들에서, 키트는 여기 상술한대로 항원 결합 구조체를 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 여기 상술한대로 항원 결합 구조체를 코딩하는 핵산을 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 여기 상술한대로 항원 결합 구조체를 생산하는 세포주를 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 여기 상술한대로 검출가능한 마커를 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 여기 상술한대로 치료제를 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 버퍼들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 양성 대조군들, 예컨대 CD8, CD8+ 세포들, 또는 그것들의 단편들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 음성 대조군들, 예컨대 상당히 CD8이 없는(free) 용액 또는 표면(surface)을 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 포장을 포함한다. 몇몇 예들에서, 키트는 지침서를 포함한다.

[0287] 타겟 분자의 존재 또는 부존재를 검출하는 방법들

[0288] 항원 결합 구조체들은 인 비보(in vivo) 및/또는 인 비트로(in vitro)에서 타겟 분자의 존재 또는 부존재를 검출하기 위하여 사용될 수 있다. 따라서 몇몇 예들은 타겟의 존재 또는 부존재를 검출하는 방법들을 포함한다. 그 방법은 샘플에 대하여 항원 결합 구조체를 적용하는 단계를 포함한다. 그 방법은 타겟 분자, CD8에 대하여 항원 결합 구조체의 결합의 부존재 또는 결합을 검출하는 것을 포함할 수 있다.

[0290] 도 14는 CD8의 존재 또는 부존재를 검출하는 방법들의 몇몇 예들을 보여준다. 그것은 도 14에 나타난 단계들이 임의의 서열로 수행될 수 있고, 그리고/또는 선택적으로 반복되고 그리고/또는 제거될 수 있고, 그리고 추가적인 단계들이 그 방법에 선택적으로 추가될 수 있다는 것으로 인식될 것이다. 여기에 기재된 대로 항원 결합 구조체는 샘플 100에 적용될 수 있다. 선택적 세척 110이 수행될 수 있다. 선택적으로 이차의(secondary) 항원 결합 구조체가 샘플 120에 적용될 수 있다. 선택적 세척이 수행될 수 있다 130. 타겟 분자에 대한 항원 결합 구조체의 결합의 부존재 또는 결합이 검출될 수 있다 140.

[0292] 몇몇 예들에서, 여기에 서술된 대로 항원 결합 구조체는 인 비보(in vivo)로 샘플에 적용된다. 항원 결합 구조체는 대상에 투여될 수 있다. 몇몇 예들에서, 대상은 인간이다. 몇몇 예들에서, 대상은 비(non)-인간 포유동물, 예컨대 래트, 마우스, 기니피그, 햄스터, 토끼, 개, 고양이, 소, 말, 염소, 양, 당나귀, 돼지, 원숭이 또는 유인원이다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 대상 내로 주입(infused)된다. 몇몇 예들에서, 주입은 정맥내이다. 몇몇 예들에서, 주입은 복강내이다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 대상에 (개입적인(interventional) 또는 수술중(intraoperative) 적용의 경우로서) 국부적으로(locally) 또는 국소적으로(topically) 적용된다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체를 포함하는 캡슐이 예컨대 구강으로 또는 복강내로 대상에 적용된다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 대상에 의하여 면역성(immunogenic) 반응의 위험을 감소시키기 위하여 선택된다. 예를 들어, 인간 대상을 위하여 항원 결합 구조체는 여기에 상술한 대로 인간화될 수 있다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체의 비보(in vivo) 적용 다음에, 샘플 또는 샘플의 일부가 숙주로부터 제거된다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 인 비보(in vivo)로 적용되고, 여기에 상술된 시간 기간 동안 인 비보(in vivo)로 배양되고, 그리고 샘플이 인 비트로(in vitro)에서 분석을 위하여, 여기에 상술된 대로 타겟 분자에 결합된 항원 결합 구조체의 인 비트로(in vitro) 검출 또는 그것의 부존재를 위하여 제거된다.

[0294] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 인 비트로에서 샘플에 적용된다. 몇몇 예들에서, 샘플은 대상, 예컨대, 생체검사(biopsy)로부터 신선하게 수확된다. 몇몇 예들에서, 샘플은 대상으로부터 수득한 후 배양된다. 몇몇 예들에서, 샘플이 고정된다. 몇몇 예들에서, 샘플은 전체 장기(organ) 및/또는 조직을 포함한다. 몇몇 예들에서,

샘플은 하나 또는 그보다 많은 전체 세포들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 샘플은 세포 추출물로부터, 예컨대, 용해물(lysates)로부터의 것이다. 몇몇 예들에서, 용액 내 항원 결합 구조체는 샘플 내 용액에 첨가된다. 몇몇 예들에서, 용액 내 항원 결합 구조체는 용액을 포함하지 않는 샘플, 예컨대 감압하 동결건조된(lyophilized) 샘플에 첨가되고, 이런 식으로 샘플을 다시 구성한다. 몇몇 예들에서, 동결건조된(lyophilized) 항원 결합 구조체는 용액을 포함하는 샘플에 첨가되고, 이런 식으로 항원 결합 구조체를 다시 구성한다.

[0296] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 선택적으로 샘플과 배양된다. 항원 결합 구조체는 약 10 일(days)보다 많지 않은, 예컨대 10 일(days), 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 일보다 많지 않은, 또는 약 23 시간(hours)보다 많지 않은, 예컨대 약 23 시간(hours), 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 또는 0.1 시간보다 많지 않은 기간 동안, 리스트된 값들 중 임의의 두 개 사이의 범위들을 포함하여, 배양될 수 있다. 몇몇 예들에서, 배양은 항원 결합 구조체가 투여되는 대상 내에서의이다. 몇몇 예들에서, 배양은 배양기(incubator) 내이다. 몇몇 예들에서, 배양기는 고정된 온도, 예컨대 약 21 °C, 실온, 25 °C, 29 °C, 34 °C, 37 °C, 또는 40 °C에서 유지된다.

[0298] 몇몇 예들에서, 타겟에 결합하지 않는 항원 결합 구조체가 샘플에서 선택적으로 제거된다. 몇몇 예들에서, 샘플은 세척된다. 샘플을 세척하는 것은 결합되지 않은 항원 결합 구조체를 포함하는 용액을 제거하는 것, 및 항원 결합 구조체를 포함하지 않는 용액, 예컨대 버퍼(buffer) 용액을 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 예컨대 흡입하는 것(aspirating), 피펫팅, 펌핑, 또는 결합되지 않은 항원 결합 구조체를 포함하는 용액을 빼내는 것(drainage), 및 항원 결합 구조체를 포함하지 않는 용액을 첨가하는 것에 의하여, 인 비트로(in vitro) 샘플이 세척된다. 몇몇 예들에서, 예컨대 대상에게 항원 결합 구조체를 포함하지 않는 용액을 투여함으로써 또는 국소의(topical) 항원 결합 구조체 투여의 위치를 세척함으로써, 인 비보(in vivo) 샘플이 세척된다. 몇몇 예들에서, 세척은 적어도 2 회, 예컨대 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 또는 20 회 수행된다. 몇몇 예들에서, 세척 또는 세척들 후 결합되지 않은 항체의 적어도 약 50%가, 예컨대 적어도 약 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 그보다 큰 것이, 샘플로부터 제거된다.

[0300] 몇몇 예들에서, 결합되지 않은 항원 결합 구조체는 샘플로부터 제거된다. 샘플로의 항원 결합 구조체의 적용 후, 타겟에 결합한 항원 결합 구조체는 타겟으로 결합되지 않은 항원 결합 구조체와 평형에 도달하게 되어, 항원 결합 구조체의 적용 후 언젠가 타겟에 결합한 항원 결합 구조체의 양이 상당히 증가한다. 이 때 이후, 타겟에 결합되지 않은 항원 결합 구조체의 양의 적어도 일부는 제거될 수 있다. 몇몇 예들에서, 결합되지 않은 항원 결합 구조체는 항체 또는 단편이 전달되는 대상의 대사성 또는 다른 신체의 프로세스들에 의하여 제거된다. 몇몇 예들에서, 결합되지 않은 항원 결합 구조체는 결합되지 않은 항원 결합 구조체, 예컨대 프로테아제(protease) 또는 중화(neutralizing) 항체를 불안정하게 만들었거나 파괴하는 제제의 첨가에 의하여 제거된다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체의 적용 1일 후, 적용된 항원 결합 구조체의 약 30%, 예컨대 적어도 약 30%, 40%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.9%가 제거된다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체의 적용 2일 후, 적용된 항원 결합 구조체의 적어도 약 40%, 예컨대 적어도 약 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.9%가 제거된다.

[0302] 몇몇 예들에서, 타겟, CD8의 존재 또는 부존재는 검출(detected)된다. 타겟의 존재 또는 부존재는 샘플 내 항원 결합 구조체의 존재 또는 부존재에 기초하여 검출될 수 있다. 예컨대 세척 및/또는 대사(metabolic) 제거(elimination)에 의하여, 샘플로부터 항원 결합 구조체의 제거(removal) 및/또는 제거(elimination) 후, 샘플 내 남아있는 항원 결합 구조체는 타겟의 존재를 나타낼 수 있는 반면, 샘플 내 항원 결합 구조체의 부존재는 타겟의 부존재를 나타낼 수 있다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 구성되어(configured) 그것이 신장들을 통하여 제거에 편향적(biased)이다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 구성되어 간을 통한 제거에 편향적이다. 몇몇 예들에서, 여기에 서술된 대로 hIgG2 또는 IgG2 힌지(hinge) 및/또는 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 항원 결합 구조체는 구성되어(configured) 그것은 간을 통하여 상당히 치워진다(clear). 몇몇 예들에서, 여기에 서술된 대로 IgG2 힌지(hinge) 및/또는 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 항원 결합 구조체는 구성되어(configured), 그것은 간을 통하여 상당히 치워지나, 신장을 통하여는 상당히 치워지지 않는다. 몇몇 예들에서, 간에서 제거된 항원 결합 구조체의 신장에서 제거된 항원 결합 구조체에 대한 비율은 적어도 약 2:1, 예컨대 약 2:1, 3:1, 3.5:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 100:1, 또는 200:1이며, 리스트된 값들 중 임의의 것 사이의 범위들을 포함한다. 몇몇 예들에서, 신장 대신에 간을 통하여 제거할 가능성을 증가시키는 분자량을 갖도록 항원 결합 구조체는 제거 동안 다이머로써 남는다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 약 60 kDa, 예컨대 약 65 kDa, 70 kDa, 80 kDa, 90 kDa, 100 kDa, 120 kDa, 150 kDa, 또는 200 kDa의, 리스트된 값들 중 임의의 두 개 사이의 범위들을 포함하여, 신장(renal) 문턱(threshold) 보다 더 큰 원

자 질량(mass)을 유지한다.

- [0304] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 여기에 서술된 검출가능한 마커를 포함한다. 이런 식으로, 항원 결합 구조체의 존재는 검출가능한 마커를 검출함으로써 추론될 수 있다.
- [0306] 몇몇 예들에서, 2차(secondary) 항원 결합 구조체는 항원 결합 구조체를 검출하는데 사용된다. 2차(secondary) 항원 결합 구조체는 항원 결합 구조체에 특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 2차(secondary) 항원 결합 구조체는, 항체의 숙주 타입에 대항하여, 또는 항원 결합 구조체 그 자체에 대항하여, 폴리클론(polyclonal) 또는 단일클론 항체, 디아바디, 미니바디, 등을 포함할 수 있다. 2차(secondary) 항원 결합 구조체는 여기에 서술된 대로 검출가능한 마커에 콘주게이트될 수 있다. 2차(secondary) 항원 결합 구조체는 샘플에 적용될 수 있다. 몇몇 예들에서, 2차(secondary) 항원 결합 구조체는 항원 결합 구조체와 상당히 동일한 방식으로 샘플에 적용된다. 예를 들어서, 만약 항원 결합 구조체가 대상에 주입되었을 때, 2차(secondary) 항원 결합 구조체는 또한 대상에 주입될 수 있다.
- [0308] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체의 결합의 부존재 또는 결합은 하기 중 적어도 하나를 통하여 검출된다: 양전자(positron) 방사(emission) 단층촬영(tomography) (PET), 단(single)-광자(photon) 방출(emission) 컴퓨터(computed) 단층촬영(tomography) (SPECT), 자기(magnetic) 공명(resonance) 영상(imaging) (NMR), 형광(fluorescence) 방사들(emissions)의 검출. PET는 마이크로PET 영상화(imaging)를 포함하나, 이에 제한되지 않았다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체의 결합의 부존재의 결합은 영상화의 둘 또는 그보다 많은 형태들을 통하여 검출된다. 몇몇 예들에서, 검출은 근적외선(near-infrared) (NIR) 및/또는 체렌코프(Cerenkov)를 통하여 될 수 있다.
- [0310] 세포에 대한 치료제를 타겟팅하는 방법들
- [0311] 항원 결합 구조체들은 CD8을 발현하는 세포와 같은, 예컨대, 타겟 양성(positive) 세포로의 세포독소(cytotoxin)인, 치료적 분자를 타겟으로 하는데 이용될 수 있다. 이런 식으로, 몇몇 예들은 타겟 양성 세포로 치료제를 타겟팅하는 방법들을 포함한다. 그 방법은 여기에 서술된 대로 항원 결합 구조체를 대상에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 대상은 필요로 하는 대상, 예컨대 적어도 일부 타겟 양성 세포들의 중화(neutralization) 또는 제거를 필요로 하는 대상일 수 있다. 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체는 적어도 여기에 서술된 대로 치료제 상에 포함한다. 몇몇 예들에서, 그 치료제(therapeutic)는 다이설파이드 결합과 같은, 공유 결합을 통한 항원 결합 구조체에 직접 콘주게이트될 수 있다. 몇몇 예들에서, 대상은 CD8 양성(positive) 세포의 위치(localization)부터 다른 세포 또는 제제까지에서 득을 볼 수 있다.
- [0313] 선택적으로, 적어도 one 치료제를 포함하는 항원 결합 구조체의 투여 전 및/또는 후, 환자의 타겟 양성 세포들의 수 및/또는 위치(localization)가 결정된다. 예를 들어, 투여 전 타겟 양성 세포들의 수 및/또는 위치를 결정하는 것은 환자가 타겟 양성 세포들의 중화 및/또는 제거로부터 이득을 볼 개연성이 있는지 여부를 나타낼 수 있다. 투여 후 타겟 양성 세포들의 수 및/또는 위치를 결정하는 것은 타겟 양성 세포들이 환자에서 제거되었는지 여부를 나타낼 수 있다.
- [0315] 추가적인 예들
- [0316] 몇몇 예들은 면역 시스템의 영상 진단(diagnostic imaging)을 위한 T-세포의 서브세트(subset)의 표면 상에서 발견된 특이적 바이오마커인 인간 CD8의 검출을 포함한다. 타겟 분자를 영상화하는 것은 T-세포 위치(localization)의 인 비보 검출을 가능하게 할 수 있다. T-세포 위치(localization)의 변화들은 면역 반응의 진행을 반영할 수 있고, 시간이 지남에 따라 다양한 치료적 치료들 또는 심지어 질병 상태들의 결과로서 발생할 수 있다. 예를 들어, 영상화(imaging) T-세포 위치(localization)는 면역치료에 유용할 수 있다. 입양(adoptive) 면역치료는 환자 자신의 T-세포들이 인 비트로에서 조작되고 그리고 환자 내로 다시 도입되는 요법의 형태이다. 치료의 이 형태를 위하여, T-세포들의 영상화(imaging)는 치료의 상태를 결정 및/또는 모니터링하는데 유용할 수 있다. 이런 식으로, 몇몇 예들에서, 타겟 분자의 위치를 모니터링하는 것은 질병의 임상적 관리를 돕고 그리고/또는 약물들의 개발에서 안전성 및/또는 약효, 작용의 메커니즘을 분석하는데 유용할 수 있다.
- [0318] 몇몇 예들에서, 예컨대, 항체 OKT8을 위한, 타겟에 특이적으로 결합하는 항원 결합 구조체의 CDR들은 미니바디 및 시스(cys)-디아바디 배열들(arrangements)로 조정되었다. 쥐(murine) 항체는 인간 미니바디 및 시스(cys)-디아바디 프레임워크 상으로 그래프트되어(graft), 이런 식으로 키메라(chimeric) 미니바디를 생산하였다. 항체 V 도메인들은 보통 인트라(intra)-다이설파이드 결합들을 형성하는 두 개의 시스테인들을 포함한다. OKT8 V_H는 단백질의 발현을 방해할 수 있는 프레임워크 3 (FR3) 내 추가의(extra) 시스테인을 갖는데, 이는 그것이 소포체

(endoplasmic reticulum) 내 응집(aggregation) 및 따라서 보유(retention)를 이끌 수 있기 때문이다. 이런 식으로 몇몇의 예들은 프레임워크에서 추가의 시스테인을 대체하는 세린(serine)으로 만들어진 미니바디들을 포함한다(예컨대, 서열번호: 16, 18, 20, 및 22 참조).

[0320] 몇몇 예들에서, 첫 번째 항원에 CD8+ 세포를 타겟팅하는 방법이 제공된다. 그 방법은 샘플에 2중특이적 항원 결합 구조체를 적용하는 것을 포함할 수 있다. 2중특이적 항원 결합 구조체는 여기에 서술된 대로 CD8 항원 결합 구조체를 포함할 수 있다. 2중특이적 항체는 첫 번째 항원, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 CDR's, scFv, 또는 시스(cys)-디아바디 또는 미니바디의 모노머에 결합하는 항원 결합 구조체를 포함할 수 있다. 몇몇 예들에서, 2중특이적 항체는 여기에 서술된 대로 항원 결합 구조체의 1, 2, 또는 3 LCDR's 및/또는 여기에 서술된 대로 항원 결합 구조체의 1, 2, 또는 3 HCDR's를 포함한다. 몇몇 예들에서, 2중특이적 항원 결합 구조체는 여기에 서술된 대로 항원 결합 구조체의 scFv를 포함한다. 몇몇 예들에서, 2중특이적 항원 결합 구조체는 여기에 서술된 대로 V_H 또는 V_L 서열을 포함한다. 몇몇 예들에서, 2중특이적 항원 결합 구조체는 여기에 서술된 대로 미니바디 또는 시스(cys)-디아바디 모노머를 포함한다. 몇몇 예들에서, 2중특이적 항원 결합 구조체는 인 비보(in vivo)로 샘플에, 예컨대 대상의 조직 또는 장기에 적용된다. 몇몇 예들에서, 2중특이적 항원 결합 구조체는 비트로(in vitro) 샘플에 적용된다. 임의의 하나의 이론에 제한되지 않고, 몇몇 예들에서, 2중특이적 항원 결합 구조체는 타겟 양성 세포 상 타겟에 결합하고, 그리고 첫 번째 세포 상 첫 번째 항원(CD8과 다를 수 있다)에 결합하고, 그리고 이런 식으로 첫 번째 세포에 근접하여 타겟 양성 세포를 가져온다. 예를 들어, CD8+ T 세포는 암 세포 가까이로 가져가질 수 있고, 암 세포에 대항하여 면역 반응을 가능하게 할 수 있다.

[0321]

[0322] 몇몇 예들에서, 항-CD8 항원 결합 구조체들은 인간 CD8+ T-세포들을 특이적으로 타겟으로 하는 영상화(imaging) 제제(agents)일 수 있다. 몇몇 예들에서, 항-CD8 단편들은 CD8을 발현시키는 T-세포들의 특이적 서브클래스(subclass)의 위치를 검출하고 직접 결합할 수 있다. 몇몇 예들에서, CD8과 교차 연결(link)될 수 있는 조작된 단편들은 T 세포 수용체를 통하여 신호를 가능하게 하고, 바이러스성 병원체들을 치우기 위하여 대상의 능력을 증강시키고, 종양 항원들 및 백신들에 반응한다.

[0324] 몇몇 예들에서, 미니바디 및 시스(cys)-디아바디 항체 형식들(formats)은 부모(parental) 항체의 특이성 및 높은 결합 친화도를 유지하는 반면 영상 진단(diagnostic imaging)을 위한 원하는 약동학 특성을 갖는다. 전장 부모(parental) 항체로 영상화(imaging)하는 것에 비교하여, 이들 단편들은 훨씬 빠르게 치운다:그러나 그것들은 빠른(rapid) 선명한(high-contrast) 이미지(imaging)를 위하여 항원을 타겟으로 할 수 있다. 동일한 좋은 약동학(pharmacokinetic) 물성들은 더욱 통제된 T 세포 자극(stimulation)을 가능하게 하고, 그리고 과자극(overstimulation)의 원하지 않는 효과를 방지하는 것을 가능하게 하는 면역 반응들(예컨대 사이토카인(cytokine) 스톰들(storm))을 타겟팅하는데 유리하다. 임상전(preclinical) 모델에서, 미니바디 및 시스(cys)-디아바디의 더 짧은 혈청(serum) 반감기들은, 미니바디의 경우 주사(injection) 후 거의 16-20 시간, 그리고 시스(cys)-디아바디의 경우 주사 후 2-6 시간에서, 최적의 영상화를 가능하게 한다. 동일한 날에, 영상화(imaging)는 환자 돌봄 관리와 관련하여 클리닉에 중요한 이점을 줄 수 있다.

[0326] 게다가, 시스(cys)-디아바디 항체 형식(format)은 C-말단 시스테인 꼬리를 특징으로 한다. 이들 두 개의 설피드릴(sulfhydryl)기들 (그 다음 온화한 환원(reduction)은 시스(cys)-디아바디의 결합 활성을 방해하지 않을 방사성표지와 같은, 기능적 모이어티들의 위치-특이적 콘주게이션을 위한 전략을 제공한다.

[0328] 몇몇 예들에서, 이들 항원 결합 구조체들은 영상 진단(diagnostic imaging) 제제일 수 있다(그 다음 Iodine-124, Cu-64 또는 Zr-89 (PET 영상화를 위한 것이다) 또는 형광단(fluorophore) (형광 영상화를 위한 것이다))과 같은 적절한 방사성동위원소로 라벨링한다. 임상적 영상화(imaging) 제제들로서, 이들 CD8 항원 결합 구조체들은 치료를 모니터링하는 것을 도울 수 있고, 환자 선택 수단으로서 사용될 수 있다.

[0330] 몇몇 예들에서, 항원 결합 구조체들은 CD8에 대하여 매우 특이적이고 높은-친화도 결합이 요구되는 적용들에 사용될 수 있다. 진단(diagnostic) 영상(imaging) 외에, 이들 단편들은 다른 기능적 기들의 부착에 의존하는 다른 목적들을 제공할 수 있다.

[0332] 적절한 적외선(infrared) 또는 형광 염료의 부착으로, 이들 구조체들은 이미지-가이드되는 수술중(intraoperative) 수술(surgery)을 위한 타겟팅 제제로서 사용될 수 있다.

[0334] 몇몇 예들에서, 단편들에 부착된 기능적 기들의 변형들에 더하여, 2중특이적 단편들(단편이 2 개의 다른 항원들에 결합할 수 있다)의 이용을 통하여, 두 번째 항원으로 CD8+ 세포들을 모으는(bring together) 것이 가능하다.

2중특이적 전장 항체들은, 면역 시스템의 세포독성 세포들을 종양 세포들에 가져가기 위하여, 암 면역치료에서 사용되어 왔다. 이런 식으로, 이러한 예들은 또한 적절한 항원 결합 구조체들을 위하여 고려된다.

[0336] 몇몇 예들에서, 여기에 제공된 것들은 인 비트로(in vitro) 및 인 비보(in vivo) 모두에서 인간 CD8 알파(alpha)에 결합하고 특이적으로 타겟으로 할 수 있는, 조작된 scFv, 미니바디, 및 시스(cys)-디아바디 항체 단편들이다.

[0338] 실시예 1: CD8 항체들 및 항체 단편들의 인간화

[0339] OKT8 항체의 쥐(murine) 가변(variable) 영역들은 인간 프레임워크 상에 쥐(murine) 상보적(Complimentary) 결정(Determining) 영역(Region) (CDR)을 그래프트(graft)함으로써 인간화되었다. 쥐(murine) V 유전자들은 인간 V 생식계열(germ-line) 데이터베이스에 대하여(against) 작동(run)되었다. 가장 높은 서열 상동성(homology)을 갖는 인간 V 유전자가 항원 결합(binding) 루프(loop) (CDRs) 구조들에 대한 유사도(similarity) 및 기능성 잔기들에 대하여 시험되었다. 쥐(murine) OKT8의 V_L 및 V_H CDR들은 그 다음에 인간 수용자(acceptor)가변(variable) 영역 프레임워크 내로, 인간 CDR들을 대체하여, 포함되었다(incorporated). 인간화된 서열들 및 해당하는 쥐(murine), 인간 생식계열(germline)의 정렬(alignment)은 중쇄 가변 영역들 (도 2A) 및 경쇄 가변 영역들 (도 2B)에 대하여 나타나 있다. 이들 도면들에서, CDR들은 박스로 되고, 별표들은 서로 다른 잔기들을 가리킨다. 루프(loop) 구조에서 작용하는 것을 알려진 선택된 마우스 잔기들이 인간 프레임워크에 두어졌다(kept).

[0341] 실시예 2: CD8 미니바디들의 발현

[0342] OKT8 미니바디 구조체들(표 0.1에 나타낸(outline) 서열 조합들)은 발현을 입증하기(validate) 위하여 CHO-K1 세포들 내로 순간적으로 형질감염(transfect)되었다. 형질감염들(transfections)은 리포펙타민(Lipofectamine) 시약(reagent) (Invitrogen)을 이용하여 6-웰(well) 플레이트(plate)에서 수행되었다. CO₂ 배양기 내 37 °C에서 72 시간 배양 후, 상청액들을 수확하고 임의의 세포들을 제거하기 위하여 여과하였다.

[0344] 웨스턴(Western) 블롯(blot) 분석은, 항체 단편들의 발현을 확실히 하기(confirm) 위하여, 순간적인 형질감염들(transfections)로부터의 상청액 상에서 수행되었다. 빈 벡터 형질감염(transfection)로부터의 상청액은 음성 대조군으로서 포함되었고, 무관한(irrelevant) 미니바디의 형질감염(transfection)로부터의 상청액은 양성 대조군으로서 사용되었다. 환원되지 않는(non-reducing) 조건들 하, 미니바디들은 80-90 kDa의 예상되는 분자량에서 운영(run)되었다(도 15). 모노머 형태를 나타내는 마이너(minor) 밴드 또한 거의 40 kDa에서 검출된다. 이들 결과들은 키메라(chimeric) 및 인간화된(humanized) 미니바디들의 제대로 된 발현을 확인해준다.

[0346] 실시예 3: 결합

[0347] 인간화된 변이체들(variants)이 CD8에 대한 임의의 중요한 결합을 보이지 않은 반면, 키메라(chimeric) 미니바디 변이체(variant) 1는 ELISA에 의한 CD8 에의 가장 높은 결합을 입증하였다(도 16). 인간화된 변이체들(variants)의 SPR 분석이 용해성(soluble) CD8에의 결합을 보여주기는 하지만, 친화도(affinity)에 있어 키메라(chimeric) 미니바디 및 부모(parental) OKT8 항체에 비하여 몇-배(fold) 상실(loss)이 관찰되었다. 96 웰 플레이트들이 재조합 인간 CD8 항원으로 코팅되고, 순간적 형질감염(transfection)으로부터 수득된 상청액과 배양되었다. 결합은 405nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하는 색원체(chromogenic) 기질(substrate) 3,3', 5,5'-테트라메틸벤지딘(Tetramethylbenzidine) (TMB) 및 서양고추냉이(horseradish) 페록시다제(peroxidase) (HRP) 콘쥬게이트된 염소 항-인간 IgG (Fc-특이적)으로 검출되었다. 희석들은 3회 되었다. 데이터는 상대적 흡광도(absorbance)의 평균으로 나타내어진다.

[0349] 도 17A-17D는 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants)의 유동세포 분석법의 결과들을 보여준다. 모든 막대그래프들은 알로피코시아닌(allophycocyanin) (APC) 신호 vs. 수들(counts)을 보여준다. 다른 희석들에서의 변이체들(variants)의 형질감염(transfection)으로부터의 상청액들은 CD8+ 세포들과 함께 배양되었다. 세포들은 세척되었고, 그 다음에 2차(secondary) 항-인간 IgG (Fc-특이적) APC 콘쥬게이트된 항체로 염색되었다. 1X10⁵ 세포들은 포인트(point) 당 염색되었고, 분석은 10,000 이벤트들(events) / 포인트로 수행되었다.

[0351] 키메라(chimeric) 및 인간화된 미니바디들은 CD8+ 세포들로의 농도-의존적결합을 보여주었다(도 17A-17D). 인간화된 미니바디들이 키메라보다 더 잘 발현된 것에도 불구하고, 키메라(chimeric) 미니바디들은 유동세포분석에 의하여 더 강한 신호를 보였는데, 이는 키메라(chimeric) 미니바디들이 더 강한 결합 친화도를 갖는다는 것을

제안하는 것이다.

[0353] 실시예 4: 항원 결합 구조체들의 4-성숙

[0354] 인간화된 항체 단편들의 결합 친화도를 개선하기 위하여, 두 개의 인간화된 V_H 영역들이 더 친화도 성숙(mature)되었다. 1번째 버전(version) V_H 를 위하여, 친화도(affinity) 성숙(maturation)은 서브(sub)-버전들 a 및 b를 야기하였다. 2번째 버전(version) V_H 를 위하여, 친화도(affinity) 성숙(maturation)은 서브(sub)-버전들 c 및 d를 야기하였다. 도 12F-12I는 그 결과인 항체 가변(variable) 경(light) (V_L) 및 가변(variable) 중(heavy) (V_H) 유전자들을 보여준다. 아미노산 서열들을 갖는 DNA가 보여진다. CDR들은 초시아(Chothia) 정의를 이용하여 박스로 되어 있다.

[0356] 친화도(affinity) 성숙된 인간화된 OKT8 V 유전자들은 scFv의 V 유전자들의 성향(orientation) ; 숫자 1)로 언급된 V_L - V_H 성향(orientation) 및 번호 2로 언급된 V_H - V_L 성향(orientation)에서 다른 두 개의 미니바디 변이체들(variants) 내로 조작되었다. 특이적 서열 조합들은 표 0.2에 나타내어져 있다.

[0358] 실시예 5: CD8 미니바디들의 발현

[0359] 상기 IAb_Mb_CD8 발현 구조체들은 순간적으로 CHO-K1 세포들 내로 형질감염(transfect)되었다. 형질감염들(transfections)로부터의 상청액은 미니바디들의 적절한 발현을 확실히 하기 위하여 웨스턴 블롯으로 분석되었다. 빈 벡터 형질감염(transfection)으로부터의 상청액은 음성 대조군으로서 포함되었고, 상관없는(irrelevant) 미니바디의 정제된 단백질은 양성 대조군으로 사용되었다. 모든 변이체들(variants)은 조립된 미니바디 복합체(~95 kDa)에 대한 예상되는 분자량에서의 밴드로 입증되듯이 발현되었다(도 18A 및 도 18B). ~45 kDa에 존재하는 밴드는 모노머를 나타낸다. 순간적 형질감염체들(transfectants)로부터의 형질감염(transfection) 상청액들은 SDS-PAGE 상에서 운영되고(run), 그리고 PVDF 멤브레인으로 이동된다(transfer). 멤브레인은 알칼라인(alkaline) 포스파타제(phosphatase) (AP)-콘주게이트된 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체로 프로브되고, AP 기질(substrate) BCIP/NBT과 배양됨으로써 발달되었다. 이것은 복수의 실험들의 대표적인 블롯(blot)이다.

[0361] 정량적(quantitative) ELISA들은 CHO-K1 세포들 내 순간적(transient) 형질감염(transfection)으로부터 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants) 발현 레벨들을 측정하기 위하여 수행되었다. IAb_Mb_CD8 미니바디 변이체들(variants)는 전에 발현되었던 참고 대조군 미니바디에 필적하는 범위의 더 높은 끝으로, ~0.5-1.9 $\mu\text{g/ml}$ 사이의 범위에서 발현되었다(도 19). 염소 항-인간 IgG (Fc 특이적)은 미니바디를 캡처(capture)하는데 사용되었고, AP-콘주게이트된 염소 항-인간 IgG (Fc 특이적)는 검출에 사용되었다. 정제된 상관없는(irrelevant) 동종형(isotype) 대조군 미니바디 단백질은 표준으로서 사용되었다. IAb_Mb_CD8 상청액들은 표준 곡선의 선형 범위 내에 적합한 희석 포인트들을 찾기 위하여 연속적으로 희석되었다.

[0363] 실시예 6: 미니바디들의 기능적 활성

[0364] IAb_Mb_CD8 미니바디 변이체들(variants)의 기능적 활성을 입증하기 위하여, 순간적(transient) 형질감염(transfection)으로부터 상청액들이 ELISA에 의하여 정제된 재조합 인간 CD8 단백질에의 결합이 테스트되었다. 변이체들(variants) IAb_Mb1b_CD8, IAb_Mb2b_CD8, 및 IAb_Mb1a_CD8 의 농도는 도 19에 나타난 정량적 ELISA에 기초하여 IAb_MB2a_CD8 (0.5 $\mu\text{g/ml}$)의 농도를 맞추기 위하여 정규화되었다(normalize). 샘플들은 그 다음에 일련의 농도들 동안 결합을 평가하기 위하여 연속적으로 희석되었다. 부모(parental) OKT8 항체는 또한 분석을 위하여 양성 대조군으로서 포함되었다(데이터는 도시하지 않음). 모든 미니바디 변이체들(variants)은 용해성 재조합 인간 CD8 (rhCD8)에 대하여 농도 의존적 결합을 보였다.

[0366] 도 20은 IAb_Mb1a_CD8 뒤에는 IAb_Mb1b_CD8가 항원과의 결합의 가장 높은 레벨을 갖는다는 것을 나타낸다. 96 웰 플레이트들은 rhCD8 항원으로 코팅되었고, 순간적(transient) 형질감염(transfection)으로부터 수득되는 상청액과 배양되었다. 결합은 HRP-콘주게이트된 염소 항-인간 (Fc-특이적) IgG 및 TMB 기질(substrate)로 검출되었다. 흡광도(absorbance)는 405nm에서 측정되었다. 희석들은 3회 되었다. 데이터들은 상대적 흡광도(absorbance)의 평균으로서 나타내어 있다.

[0368] 도 21은 변이체(variant) 1c가 가장 높은 결합 레벨을 갖고 뒤이어 변이체(variant) 1c라는 것을 나타내었다. 96 웰 플레이트들은 rhCD8 항원으로 코팅되었고, 순간적(transient) 형질감염(transfection)으로부터 수득된 상청액과 배양되었다. 결합은 HRP-콘주게이트된 염소 항-인간 (Fc-특이적) IgG 및 TMB 기질로 검출되었다. 흡광도는 405nm에서 측정되었다. 희석들은 3회 되었다. 데이터들은 상대적 흡광도(absorbance)의 평균으로 나타낸다.

[0370] 실시예 7: 세포 인간 CD8에의 결합

[0371] IAb_Mb_CD8 변이체들(variants)은 유동세포분석(flow cytometry)을 이용하여 세포(cellular) 인간 CD8에 결합하는 것을 평가하였다. 순간적(transient) 형질감염(transfection)으로부터의 상청액들은 PC3-CD8 세포들(인간 CD8로 안정적으로 형질감염된(transfect) PC3 세포들)에의 결합을 테스트되었다(도 22A 및 22B 및 23A 및 23B). 미니바디 상청액들은 유동세포분석(flow cytometry) 실험을 위하여 정규화(normalize)되었다. 부모(parental) OKT8는 결합을 위하여 양성 대조군으로서 포함되었다(데이터는 도시하지 않음). PC3 세포들은 음성 대조군으로서 사용되었고, 미니바디 변이체들(variants)가 결합하지 않았다는 것이 확인되었다(데이터는 도시하지 않음). IAb_Mb1b_CD8는 4 개의 미니바디 변이체들의 가장 높은 평균(Mean) 형광(Fluorescence) 강도(Intensity) (MFI)를 입증하였다.

[0373] 도 22A 및 22B에 나타난 결과들에 대하여, 모든 막대그래프들은 APC 신호 vs. 수들(counts)을 보여준다. 변이체들(variants)의 형질감염(transfection)으로부터의 상청액들은 PC3-CD8 세포들과 배양되었다. 세포들은 세척되었고, 그 뒤에 APC-콘주게이트된 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체로 염색되었다. 1×10^5 세포들은 포인트 당 염색되었고, 분석은 10,000 이벤트들(events)/포인트로 수행되었다.

[0375] 도 23A 및 23B에 나타난 결과에 대하여, 모든 막대그래프들은 APC 신호 vs. 수들(counts)을 보였다. 변이체들(variants)의 형질감염(transfection)으로부터 상청액들은 PC3-CD8 세포들과 배양되었다. 세포들은 세척되었고, 그 다음에 APC-콘주게이트된 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체로 염색되었다. 1×10^5 세포들은 포인트 당 염색되었고, 분석은 10,000 이벤트들/포인트로 수행되었다.

[0377] 그 결과들은 구조체들이 아직 세포 인간 CD8에 결합한다는 것을 나타내었다.

[0379] 실시예 8: SPR 분석

[0380] 표면(surface) 혈장(plasma) 공명(resonance) (SPR)이 모든 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants)에 대하여 재조합 인간 CD8에 대한 결합 친화도를 결정하기 위하여 이용되었다(표 8.0). 상청액 내 미니바디 단백질은 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체를 이용하여 BIA코어(core) 칩 상에 캡쳐되었다. 칩 상에 캡쳐된 미니바디의 양은 친화도들의 순위를 매기기 위하여 키네틱(kinetic) "스카우팅(scouting)"으로서, 변이체들(variants) 사이의 결합 친화도의 직접적인 비교를 가능하게 하기 위하여 정규화(normalize)되었다. rhCD8 단백질은 결합을 측정하기 위하여 캡쳐된 미니바디 단백질로 주어졌다(passed over). 모든 변이체들(variants)은 부모(parental) OKT8 mAb과 유사했던 CD8 단백질에 강하게 결합하는 것을 보였다.

[0382] <표 8.0>

리간드	분해물질(analyte)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	분해물질의 농도	K_A (1/M)	K_D (M)
OKT8 mAb	hCD8	5.6×10^5	1.0×10^{-3}	50 nM	5.5×10^8	1.8×10^{-9}
IAb_Mb1b_CD8	hCD8	6.4×10^5	1.2×10^{-3}	50 nM	5.4×10^8	1.9×10^{-9}
IAb_Mb2b_CD8	hCD8	5.4×10^5	2.1×10^{-3}	50 nM	2.6×10^8	3.9×10^{-9}
IAb_Mb1a_CD8	hCD8	6.5×10^5	1.2×10^{-3}	50 nM	5.3×10^8	1.9×10^{-9}
IAb_Mb2a_CD8	hCD8	4.8×10^5	2.2×10^{-3}	50 nM	2.2×10^8	4.6×10^{-9}
IAb_Mb1d_CD8	hCD8	7.0×10^5	2.0×10^{-3}	50 nM	3.4×10^8	2.9×10^{-9}
IAb_Mb2d_CD8	hCD8	5.4×10^5	2.9×10^{-3}	50 nM	1.8×10^8	5.5×10^{-9}
IAb_Mb1c_CD8	hCD8	7.0×10^5	1.8×10^{-3}	50 nM	4.0×10^8	2.5×10^{-9}
IAb_Mb2c_CD8	hCD8	7.2×10^5	3.2×10^{-3}	50 nM	2.2×10^8	4.5×10^{-9}

[0383]

[0385] 표 8.0은 재조합 hCD8에 결합한 IAb_Mb_CD8 변이체들(variants)를 위한 측정된 결합(association) (k_a), 해리(dissociation) (k_d), 및 k_D 상수들을 정리하고 있다. 변이체들(variants)은 항-인간 Fc-특이적 IgG 항체를 이용하여 BIA코어(core) 칩 상에서 캡쳐되었다.

[0387] 몇몇 예들에서, 나노몰(nanomolar) 범위로 결합하는(예를 들어 1 내지 2, 2 내지 10, 10 내지 100, 또는 100 내지 1,000 nM) 항원 결합 구조체들이 제공되며, 미니바디, 시스(cys)-디아바디, 및 scFv 배열들(arrangements)을 (예를 들어) 포함한다.

[0389] 실시예 9: CD8 시스-디아바디들의 발현

[0390] 표 0.3에 나타내어진 시스(cys)-디아바디 구조체들(인간화된 버전 b)는 발현을 입증하기(validate) 위하여 CHO-K1 세포들 내로 순간적으로(transiently) 형질감염(transfect)되었다. 형질감염들(transfections)은 리포펙타민(Lipofectamine) 시약을 이용하여 6-웰 플레이트에서 수행되었다. CO2 배양기 내에서 37 °C에서 72 시간 배양한 후, 상청액들이 수집되고, 임의의 세포들을 제거하기 위하여 여과되었다.

[0392] 웨스턴 블롯 분석이 항체 단편들의 발현을 확실히 하기 위하여 순간적(transient) 형질감염들(transfections)로부터의 상청액을 이용하여 수행되었다. 빈 벡터 형질감염(transfection)로부터의 상청액은 음성 대조군으로서 배양되었고, 그리고 상관없는(irrelevant) 시스(cys)-디아바디의 형질감염(transfection)으로부터의 상청액은 양성 대조군으로서 사용되었다. 환원되지 않는(non-reducing) 조건 하, 인간화된 OKT8 시스(cys)-디아바디의 모든 네 개의 변이체들(variants)은 거의 55 kD의 적절한 분자량에서 운반(ran)되었다(도 24). 모노머 형태를 나타내는 마이너한 밴드는 또한 거의 25 kD에서 검출된다. 이들 결과들은 인간화된 OKT8 시스(cys)-디아바디들의 적절한 발현을 확실히 해준다. 웨스턴 블롯을 위하여, 상청액들이 수집되었고 뒤이어 CHO-K1 세포들 내로 순간적(transient) 형질감염(transfection)이 되었다. 형질감염(transfection) 상청액들은 환원되지 않는(non-reducing) 조건들 하 SDS-PAGE 에 의하여 전기영동되었고(electrophoresed), PVDF 멤브레인으로 이동되었다. 그 멤브레인은 HRP-콘주게이트된 항-His 항체로 프로브되었고, HRP 기질(substrate) TMB와 발달되었다.

[0394] 실시예 10: CD8 시스-디아바디들을 위한 결합

[0395] IAb_Cys-Dbb_CD8 변이체들(variants)의 순간적(transient) 형질감염(transfection)으로부터의 상청액들이 ELISA에 의한 재조합 인간 CD8 (rhCD8) 단백질에의 결합이 테스트되었다. CD8과의 배양 전 다양한 농도에 대하여 결합을 평가하기 위하여 샘플들은 연속적으로 희석되었다. 96 웰 플레이트들이 rhCD8 항원으로 코팅되었다. 코팅된 플레이트들은 상청액들로 배양되었고, 뒤이어 다른 시스(cys)-디아바디 변이체들(variants)의 순간적(transient) 형질감염(transfection)이 되고, 그리고 나서 HRP-콘주게이트된 항-His 항체와 배양되었다. 신호는 TMB를 이용하여 검출되었고, 405nm에서 흡광도가 측정되었다.

[0397] 모든 4개 변이체들(variants)이 rhCD8 단백질에 대한 농도-의존적 결합을 보여주었다(도 25). 분석에 포함된 음성 대조군 시스(cys)-디아바디로부터의 형질감염(transfection) 상청액은 CD8에 대한 어떠한 결합도 보이지 않았다(도 25).

[0399] 모든 4개 IAb_Cys-Dbb_CD8 변이체들(variants)은 유동세포분석을 이용하여 세포 인간 CD8에 대한 결합이 더 테스트되었다. 순간적(transient) 형질감염(transfection)으로부터의 상청액들은 PC3-CD8 세포들에의 결합이 테스트되었다(도 26A 및 26B). 부모(parental) OKT8는 결합을 위하여 양성 대조군으로서 포함되었다(데이터는 도시하지 않음). PC3 세포들은 음성 대조군으로서 포함되었고, 이 세포에 대한 시스(cys)-디아바디 변이체들(variants)의 비-특이적 결합이 없다는 것을 확실히 하였다(데이터는 도시하지 않음). IAb_Cys-Db1b_CD8 및 IAb_Cys-Db3b_CD8 는 다른 두 개의 변이체들에 비교하여 더 높은 평균(Mean) 형광(Fluorescence) 강도(Intensity) (MFI)를 입증하였다. 도 26A 및 26B 내 모든 막대그래프들은 APC 신호 vs. 수들(counts)을 보였다. 변이체들(variants)의 형질감염(transfection)으로부터의 상청액들은 PC3- CD8 세포들에의 결합이 평가되었다. 세포들은 그 다음에 APC-콘주게이트된 항-His 항체로 염색(stain)되었다. 1×10^5 세포들/포인트 및 10,000 이벤트들이 각각의 포인트에 대하여 분석되었다.

[0401] IAb_Cys-Dbb_CD8 변이체들(variants)은 내생(endogenous) CD8 발현하는(expressing) HPB-ALL 세포들에 결합하는 그것들의 능력이 평가되었다. 모든 IAb_Cys-Db 1b 및 3b 변이체들(variants)는 HPB-ALL 세포들에 결합되었다(도 27). 부모(parental) OKT8는 결합을 위하여 양성 대조군으로서 포함되었고, 그리고 PC3 세포들은 음성(negative) 세포주로서 포함되었다. CD8을 발현시키지 않는 PC3 세포들 상에서 시스(cys)-디아바디 변이체들(variants)에 의하여 결합은 보이지 않았다(데이터는 도시하지 않음). 변이체들(variants)의 형질감염(transfection)으로부터의 상청액들은 내생(endogenous) CD8 발현(expressing) HPB-ALL 세포들에의 결합이 평가되었다. 세포들은 그 다음에 APC-콘주게이트된 항-His 항체로 염색되었다. 모든 막대그래프들(histograms)은 APC 신호 vs. 수들(counts)을 보여준다. 1×10^5 세포들/포인트 및 10,000 이벤트들은 각각의 포인트에 대하여 분석되었다.

[0403] 실시예 11: CD8의 인 비보 검출

[0404] 표 0.3의 인간화된 CD8 시스(cys)-디아바디는 시스(cys)-디아바디 상의 C-말단 시스테인들을 통하여 관련있는

킬레이터와 콘주게이트되고, 그 다음에 In111의 동위원소로 방사성표지된다(또는 대체제로, Zr-89 또는 Cu-64). 대체하여, 시스(cys)-디아바디는 라이신(Lysine) 잔기들에 관련있는 킬레이터들을 부착한 후 방사성표지될 수 있고, 또는 아이오다인(Iodine)으로 직접 방사성표지될 수 있다.

[0406] 시스(cys)-디아바디는 건강한 인간 대상 내로 정맥안으로(intravenously) 주입(infuse)된다. 시스(cys)-디아바디는 주입(infusion) 후 10 분 동안 인간 대상 내에서 배양된다. 배양과 동일한 날에, 시스(cys)-디아바디의 위치(localization)는 PET 스캔 또는 외부의(external) 신틸레이션(scintillation) 시스템을 통하여 검출된다.

[0408] 시스(cys)-디아바디의 위치(localization)는 대상 내에서 CD8의 위치를 결정하는데 이용된다.

[0410] 실시예 12: CD8의 인 비보 검출

[0411] 표 0.2로부터의 미니바디는 미니바디 상 라이신(Lysine) 잔기들을 통하여 관련있는 킬레이터와 콘주게이트되고, 그 다음에 동위원소인 In111 (또는 대체하여, Zr89 또는 Cu64)로 방사성표지된다. 대체하여, 미니바디는 티로신(Tyrosine) 잔기를 통한 아이오다인(Iodine)으로 직접 방사성표지를 함으로써 방사성표지될 수 있다.

[0413] 미니바디는 건강한 인간 대상 내로 정맥안으로(intravenously) 주입된다(infuse). 미니바디는 주입 후 10 분 동안 인간 대상에서 배양된다. 배양과 동일한 날에, 미니바디의 위치는 PET 스캔 또는 외부의(external) 신틸레이션(scintillation) 시스템을 통하여 검출된다.

[0415] 시스(cys)-디아바디의 위치는 대상 내 CD8의 위치를 결정하기 위하여 사용된다.

[0417] 실시예 13: CD8의 인 비보 검출

[0418] 서열번호: 22의 모노머들의 호모다имер인 인간화된 CD8 미니바디가 제공된다. 미니바디는 건강한 인간 대상 내로 정맥안으로(intravenously) 주입된다. 미니바디는 주입 후 1 시간 동안 인간 대상에서 배양된다. 2차(secondary) 항체, CD8 미니바디에 특이적으로 결합되고 3P에 콘주게이트되는 인간화된 시스(cys)-디아바디가 제공된다. 배양과 동일한 날에, 2차(secondary) 항체는 대상 내로 주입된다. 2차(secondary) 항체는 1 시간 동안 배양된다. 미니바디의 위치는 PET 영상화를 통하여, 2차(secondary) 항체 상 마커를 통하여 검출된다.

[0420] 미니바디의 위치는 대상 내 CD8의 위치를 결정하는데 사용된다.

[0422] 실시예 14: 시스-디아바디를 이용한 치료적 치료

[0423] 표 0.3의 모노머들의 호모다имер인 CD8 시스(cys)-디아바디가 제공된다. 시스(cys)-디아바디는, CD8 관련된 장애의 증상들의 완화(lessening)를 제공하기 위하여, 충분한 레벨의 대상 내 CD8과 결합하기에 적합한 양으로, CD8 관련 장애를 갖는 대상 내로 정맥안으로(intravenously) 주입된다. 시스(cys)-디아바디는 이트륨(Yttrium) 90에 콘주게이트된다.

[0425] 실시예 15: 미니바디를 이용한 치료적 치료

[0426] 표 0.2의 CD8 미니바디가 제공된다. 미니바디는 감염성 질환에 대한 항원으로 또는 종양 관련 항원으로 백신접종된 환자 내로 주입된다. CD8 지시된(directed) 단편들은 면역 반응을 높이고, 그리고 CD8 발현 T 세포들의 세포용해(cytolytic) 활성을 증강시킨다.

[0428] 실시예 16: 시스-디아바디를 이용한 치료적 치료

[0429] 표 0.3의 모노머의 호모다имер인 CD8 시스(cys)-디아바디가 제공된다. 시스(cys)-디아바디는 CD8 관련된 장애(disorder)의 증상의 완화를 제공하기 위하여 대상 내 충분한 레벨의 CD8에 결합하기에 적합한 양으로 CD8 관련 장애를 갖는 대상 내로 정맥안으로(intravenously) 주입된다. 시스(cys)-디아바디는 Lu177Tx에 콘주게이트된다. CD8 시스(cys)-디아바디는 CD8을 발현시키는 세포에 결합되고, Lu177Tx는 세포의 죽음을 야기한다.

[0431] 실시예 17: HPB-ALL 세포들 CD8에 결합하는 OKT8 mAb의 유동세포 분석

[0432] HPB-ALL 세포들 상 세포-표면 인간 CD8에 결합하는 OKT8 mAb 구조체의 유동세포 분석이 수행되었다. 세포들은 각각의 농도들의 항체로 염색되고, 세척되고, 그리고 나서 2차(secondary) 항-mouse IgG (Fc-특이적) APC-콘주게이트된 항체로 염색되었다. 분석은 각각의 농도에 대해 3 회 10,000 이벤트들/포인트로 수행되었다. 결과들은 도 28 에 그래프 형식으로 나타나 있다. 그래프는 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) (MFI) vs. 농도 (nM)의 로그로 나타낸다. 에러(error) 바(bar)들은 표준 오차를 나타낸다. 데이터들은 0.22nM의 EC50을 가

리킨다.

[0434] 실시예 18A: HPB-ALL 세포들 상 CD8에 결합하는 미니바디의 유동세포 분석

[0435] HPB-ALL 세포들 상 세포-표면 인간 CD8에 결합한 미니바디들의 유동세포 분석이 수행되었다. 세포들은 각각의 농도들의 미니바디로 염색되고, 세척되고, 그리고 나서 2차(secondary) 항-인간 IgG (Fc-특이적) APC-콘주게이트된 항체로 염색되었다. 분석은 각각의 농도에 대하여 3 회로 10,000 이벤트들/포인트로 수행되었다. 결과들은 도 29A 에 그래프 형식으로 나타내어져 있다. 그래프는 정규화된(normalized) 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) (MFI) vs. 농도 (nM)의 로그(log)를 나타낸다. 에러 바들은 표준 오차를 나타낸다. 데이터들은 0.15nM 및 0.19nM 의 EC50를 나타낸다.

[0437] 실시예 18B: CD8+ T 세포들 상 CD8에 결합하는 미니바디의 유동세포(Flow cytometry) 분석

[0438] 1차(primary) 인간 CD8+ T 세포들 상 세포-표면 인간 CD8에 결합하는 미니바디들의 유동세포 분석이 수행되었다. 세포들은 각각의 농도들의 미니바디로 염색되고, 세척되고, 그 다음에 2차(secondary) 항-인간 IgG (Fc-특이적) APC-콘주게이트된 항체로 염색되었다. 분석은 각각의 농도에 대하여 3 회 10,000 이벤트들/포인트로 수행되었다. 결과들은 도 29B에서 그래프 형식으로 나타내어 있다. 그래프는 정규화된(normalized) 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) (MFI) vs. 농도(nM)의 로그를 제시한다. 에러 바들은 표준 오차를 나타낸다. 데이터들은 0.1nM 및 0.26nM의 EC50를 나타낸다.

[0440] 실시예 18C: HPB-ALL 세포들 상 CD8에 결합하는 표지되지 않은 그리고 Df-표지된 미니바디의 유동세포 분석

[0441] HPB-ALL 세포들 상 세포-표면 인간 CD8에 결합하는 미니바디(테스페록사민(Desferoxamine) (Df)에의 +/- 라이신(lysine) 콘주게이션)의 유동세포 분석이 수행되었다. 세포들은 각각의 농도들의 미니바디로 염색되었고, 세척되었고, 그리고 나서 2차(secondary) 항-인간 IgG (Fc-특이적) APC-콘주게이트된 항체로 염색되었다. 분석은 각각의 농도에 대하여 3 회 10,000 이벤트들 / 포인트로 수행되었다. 결과들은 도 29C로 그래프 형식으로 나타나 있다. 그 그래프는 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) (MFI) vs. 농도(nM)의 로그를 제시한다. 에러 바들은 표준 오차를 나타낸다. 데이터들은 0.13nM 및 0.12nM의 EC50를 나타낸다.

[0443] 실시예 18D: PC3 세포들 상 CD8에 결합하는 Df-표지된 그리고 표지되지 않은 유동세포 분석

[0445] CD8을 과발현시키는 PC3 세포들에 결합하는 미니바디 (테스페록사민(Desferoxamine)에 대한 +/- 라이신(lysine) 콘주게이션)의 유동세포 분석이 수행되었다. 세포들은 각각의 농도들의 미니바디로 염색되고, 세척되고, 그리고 난 후 2차(secondary) 항-인간 IgG (Fc-특이적) APC-콘주게이트된 항체로 염색되었다. 분석은 각각의 농도에 대하여 3 회 10,000 이벤트들/포인트로 수행되었다. 결과들은 도 29D로 그래프 형식으로 나타나 있다. 그 그래프는 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) (MFI) vs. 농도(nM)의 로그를 제시한다. 에러 바들은 표준 오차를 나타낸다. 데이터들은 0.64nM 및 0.83nM의 EC50를 나타낸다.

[0447] 실시예 18E: PC3 세포들 상 CD8에 결합하는 Df-표지된 또는 표지되지 않은 미니바디의 유동세포 분석

[0448] HPB-ALL 세포들 상 세포-표면 인간 CD8에 결합된 IgG2 미니바디들의 유동세포(Flow cytometry) 분석이 수행되었다. 세포들은 각각의 농도들의 미니바디로 염색되고, 세척되고, 그리고 나서 2차(secondary) 항-인간 IgG (Fc-특이적) APC-콘주게이트된 항체로 염색되었다. 분석은 각각의 농도에 대하여 3 회로 10,000 이벤트들/포인트로 수행되었다. 결과들은 도 29E로 그래프 형식에서 나타나 있다. 그래프는 정규화된(normalized) 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) (MFI) vs. 농도(nM)의 로그를 제시한다. 에러 바들은 표준 오차를 나타낸다. 데이터는 0.1nM, 0.13 nM, 및 0.08nM의 EC50를 가리킨다.

[0450] 실시예 19A: HPB-ALL 세포들 상 CD8에 결합하는 시스(cys)-디아바디의 유동세포 분석

[0451] HPB-ALL 세포들 상 세포-표면 인간 CD8에 결합하는 시스(cys)-디아바디의 유동세포 분석이 수행되었다. 세포들은 각각의 농도들 of 시스(cys)-디아바디로 염색되었고, 세척되었고, 비오틴(Biotin)에 콘주게이트된 2차(secondary) 단백질(Protein) L로 염색되었고, 세척되었고, 그리고 나서 3차(tertiary) 스트렙타비딘(streptavidin)-APC로 염색되었다. 분석은 각각의 농도에 대하여 3 회 10,000 이벤트들/포인트로 수행되었다. 결과들은 도 30A에 그래프 형식으로 나타내어 있다. 그래프는 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) (MFI) vs. 농도(nM)의 로그를 제시한다. 에러 바들은 표준 오차를 나타낸다. 데이터들은 0.04nM의 EC50를 나타낸다.

[0453] 실시예 19B: CD8+ T 세포들 상 CD8에 결합하는 시스(cys)-디아바디의 유동세포 분석

[0454] 1차(primary) 인간 CD8+ T 세포들 상 세포-표면 인간 CD8에 결합하는 시스(cys)-디아바디의 유동세포 분석이 수행되었다. 세포들은 각각의 농도들 of 시스(cys)-디아바디로 염색되고, 세척되고, 비오틴(Biotin)에 콘쥬게이트된 2차(secondary) 프로틴(Protein) L로 염색되고, 세척되고, 그리고 나서 3차(tertiary) 스트렙타비딘(streptavidin)-APC로 염색되었다. 분석은 각각의 농도에 대하여 3회로 10,000 이벤트들/포인트로 수행되었다. 결과들은 도 30B로 그래프 형식으로 나타내어 있다. 그래프는 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) (MFI) vs. 농도(nM)의 로그를 제시한다. 에러 바들은 표준 오류를 나타낸다. 데이터들은 0.02nM의 EC50을 나타낸다.

[0456] 실시예 19C: HPB-ALL 세포들 상 CD8에 결합하는 Df-표지된 그리고 표지되지 않은 시스(cys)-디아바디의 유동세포 분석

[0457] HPB-ALL 세포들 상 세포-표면 인간 CD8에 결합하는 시스(cys)-디아바디 (데스페록사민(Desferoxamine)에 대한 +/- C-말단 시스테인 콘쥬게이션)의 유동세포 분석이 수행되었다. 세포들은 각각의 농도들의 시스(cys)-디아바디로 염색되고, 세척되고, 비오틴(Biotin)에 콘쥬게이션된 2차(secondary) 프로틴(Protein) L로 염색되고, 세척되고, 그리고 나서 3차(tertiary) 스트렙타비딘(streptavidin)-APC로 염색된다. 분석은 각각의 농도에 대하여 3 회로 10,000 이벤트들/포인트로 수행되었다. 결과들은 도 30C에 그래프 형식으로 나타내어 있다. 그 그래프는 평균(mean) 형광(fluorescence) 강도(intensity) (MFI) vs. 농도(nM)의 로그를 제시한다. 에러 바들은 표준 오차를 나타낸다. 데이터들은 0.04nM 및 0.06nM의 EC50을 나타낸다.

[0459] 실시예 20: 유동세포분석(flow cytometry)에 의한 구조체들의 특성화(characterization)

[0460] 하기 나타난 표 9는 실시예들 18A-18E 및 19A-19C로부터의 미니바디 및 시스(cys)-디아바디 구조체들의 특성화(characterization)의 결과들을 요약한다.

[0462] <표 9>

구조체(Construct) 명칭(Name)	세포(Cell) 결합(Binding) (EC50)	SPR
OKT8	0.33 nM HPB-ALL	K _D 1.8 nM
IAb_M1b_CD8	0.1 nM HPB-ALL 0.1 nM huCD8+ 0.6 nM CD8-PC3	K _D 1.9 nM
IAb_M2b_CD8	0.19 nM HPB-ALL 0.26 nM huCD8+	K _D 3.6 nM
IAb_M1b_CD8 IgG2 NH	0.08 nM HPB-ALL	N/A
IAb_M1b_CD8 IgG2 EH	0.13 nM HPB-ALL	N/A
IAb_Cys-Db3b_CD8	0.04 nM HPB-ALL 0.02 nM huCD8+	N/A

[0463]

[0465] 실시예 21: ⁸⁹Zr-Df-IAb_Cys-Db3b_CD8를 갖는 인간 CD8-발현 종양 이종이식들(xenografts) 인간 CD8 종양 이종 이식들(Xenografts)의 영상화

[0466] 여덟 마리(8) 암컷 SCID 마우스들이 연구되었다. 네 마리(4) 마우스들이 5x10⁶ PC3-hCD8 세포들로 이식되었고, 다른 네 마리 (4) 가 PC3 (hCD8 negative) 세포들로 오른쪽 어깨 부분에 이식되었다. 그 마우스들은 ⁸⁹Zr-Df-IAb_Cys-Db3b_CD8 (C-말단 시스테인 잔기들에 Df-콘쥬게이트됨)로 정맥내(i.v.) 주입되었다. 여섯 마리(6) 마우스들 (4 마리는 양성이고 2 마리는 음성 종양)이 PET에 의하여 4h, 6h 및 24h에 영상화되었다(10분 정적(static) 스캔들(scans)). 한 마리 마우스가 또한 0-2h 동적(dynamic) 스캔(scan)되었다. 생물학적분포

(biodistribution)가 마지막 스캔 후 24 시간에 수행되었다.

[0468] 수득된 이미지들은 도 31에 나타내어져 있다. 도 31은 오른쪽 어깨 부분에 PC3-hCD8 이종이식(xenograft)을 갖는 동일한 SCID 마우스의 4, 6 및 24 시간에서의 관상(coronal) 및 횡단(transverse) PET 이미지들을 나타내고 있다(화살촉들 참조). 마우스는 거의 120 μCi 의 ^{89}Zr -Df-IAb_Cys-Db3b_CD8 으로 정맥내(i.v.) 주입되었다(특이적 활성화는 4.96 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 이었다). 이론에 의하여 제한되는 것 없이, Cys-Db는 명확히 6 시에 종양을 기술하고(delineates), 예상된 대로 신장들을 통하여 치운다(clears). 24 시간에, 평균 양성(positive)의 음성(negative) 종양(PC3-hCD8의 PC3에 대한) 비율은 ~1.6-배였다. 평균 양성 종양의 혈액에 대한 비율은 16.0 이었다(음성(negative)의 혈액에 대한 것 9.5).

[0470] 실시예 22: ^{89}Zr -Df-IAb_M1b_CD8 A로 인간 CD8-발현 종양 이종이식들(xenografts) 인간(Human) CD8 종양 이종이식들(Xenografts) 영상화 ...

[0471] 여덟 마리 (8) 암컷 SCID 마우스들이 연구되었다. 네 마리 (4) 마우스들이 5×10^6 PC3-hCD8 세포들로 이식되었고, 다른 네 마리 (4)가 오른쪽 어깨 부분에 PC3 (hCD8 음성) 세포들로 이식되었다. 마우스들은 힌지(hinge) 영역에서 시스템인 잔기들에 Df-콘주게이트된 것을 갖는 CH3 및 IgG1 힌지-연장을 갖는 ^{89}Zr -Df-IAb_M1b_CD8 (Cys)-미니바디로 정맥내(i.v.) 주입되었다. 여섯 마리 (6) 마우스들 (4 마리는 양성이고 2 마리는 음성 종양)이 4h, 24h 및 48h에 PET (10 분 정적(static) 스캔(scans)) 로 이미지되고, 뒤이어 해부상(anatomical) 참조로 10 분 CT 스캔되었다. 한 마리의 마우스는 또한 0-2h 동적(dynamic) 스캔(scan)되었다. 생물학적분포(biodistribution)는 마지막 스캔 후 48 시간(hr)에 수행되었다.

[0473] 수득된 이미지들은 도 32A에 나타내어져 있다. 도 32A는 오른쪽 어깨 부분(화살촉 참조)에 PC3-hCD8 이종이식(xenograft)을 갖는 동일한 SCID 마우스의 2, 4 및 24 시간(hrs)에서 관상(coronal)관상(Coronal) MIP PET/CT 중첩(overlay) 영상들(images)을 나타낸다. 마우스는 거의 116 μCi of ^{89}Zr -Df-IAb_M1b_CD8 (Cys)로 정맥내(i.v.) 주사되었다(특이적 활성화는 5.16 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 였다). 몇몇 종양 흡수(uptake)는 4 및 24 시간(hrs)에서 보여졌다. 활성화의 다수는 48 시간(hrs)에서의 간보다 4-5-배(fold) 더 높은 흡수(uptake)를 갖는 신장을 통하여 치워졌다(clear). 이론에 의하여 제한되지 않고, 높은 신장 흡수는 Mb가 80 kDa의 다이머가 아닌 40 kDa (60 kDa의 신장(renal) 문턱(threshold) 아래(below)인 크기)의 모노머(반(half)-분자)로서 존재하기 위하여 Df와의 콘주게이션 후 망가진다(fall apart)는 것을 가리킨다. 48 시간 및 종양 및 기관들이 수확되고 방사성(radioactivity)을 위하여 카운트(count)되었다. 양성 종양 내 흡수는 음성 종양 내 그것보다 상당히 더 높았다($P = 0.02933$). 양성 종양의 혈액에 대한 비율은 11.0이었다(음성 종양의 혈액에 대한 5.6).

[0475] 잘라낸(excised) 종양들이 각기 48 시간(hrs)에 영상화되었다. 도 32B에 나타난 대로, 주로 모노머인데도 불구하고, 양성 종양 (+) 내에서, Mb를 갖고 음성 종양(-)의 그것보다(vs.) 훨씬 높은 활성이 유지된다. 앞서 논한 결과들에 의하여 표시된 바와 같이, 미니바디 구조체들은, 3개보다 많은 시스템인들이 힌지(hinge) 영역의 각각의 반(half)에 존재할 때, 추가적인 이점들을 가질 수 있는 것으로 나타난다.

[0477] 실시예 23: ^{64}Cu -NODAGA- IAb_M1b_CD8 IgG2 EH로 인간인간 CD8 T 세포들세포들을 영상화

[0478] 6 마리 암컷 NOD Scid 감마(Gamma) (NSG) 마우스들이 연구되었다. 3 마리 마우스들은, 측면(lateral) 꼬리 정맥 내로 주사(injection)함으로써, 20×10^6 신선한 인간 말초 혈액 단핵 세포들(PBMC; 98% 생존력(viability))로 생착되었다(engraft). 이 치료는 사용된 도너(donor)에 상관없이 비장(spleen)에서 균일하게(uniformly) 높은 생착(engraftment)을 야기하였다. 3-4 주 후, 모든 마우스들은 힌지(hinge) 영역 내 시스템인 잔기들에 콘주게이트된 NODAGA로 CH3 도메인 및 IgG2 힌지-연장으로 ^{64}Cu -NODAGA- IAb_M1b_CD8 IgG2 EH (Cys)-Mb로 정맥내(i.v.) 주사되었다. 모든 6 마리 마우스들은 4 시간에 영상화되었다. 각각의 그룹으로부터의 한 마리 마우스가 7 시간에 영상화되었다. 생물학적분포(biodistribution)는 7 시간에 수행되었다.

[0480] 수득된 영상(images)들은 도 33에 나타나 있다. 도 33은 4 및 7 시간에 스캔된, 2 마리 NSG 마우스들(하나는 PBMC 생착된(engrafted) 그리고 되지 않은)의 MIP 이미지들을 나타낸다. 거의 84 μCi 의 ^{64}Cu -NODAGA- IAb_M1b_CD8 IgG2 EH (Cys) (7.41 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 의 특이적 활성화)이 각각의 마우스 내로 투여되었다. 아마 겨드랑이의(axillary) 림프절들(lymph nodes)(LN) 내 그리고 비장(Sp) 내 높은 흡수가 PBMC 생착된(engrafted) 마우스에서 보여진다. NSG 마우스에서, Mb는 간을 통하여 주로 치워진다(clear)(Li). 이론에 대하여 제한되지 않고, 간 정리(clearance)는 80 kDa 단편(fragment)로 예상되었다. 음성 대조군 마우스에서 혈액 활성화는 계속 높았고,

활성은 간 및 신장들 모두에 분포되었다(Ki). 7시간에, PBMC 생착된(engrafted) NSG 마우스들 내 생물학적분포(biodistribution)는 하기를 보였다: 대조군의 그것에 대하여 상대적으로 혈액에서 3.1-배(fold) 더 낮은 활성, 간에서 1.7-배(fold) 더 높은 활성, 신장에서 4.0-배(fold) 더 낮은 활성, 비장에서 2.1-배(fold) 더 높은 흡수.

[0482] 이 출원에서, 단수형(singular)의 사용은 특히 다르게 기재하지 않는 한, 또는 단수형이 기능적 예일 뿐이 아니면, 본 공개의 측면에서 당업자에 의하여 이해될 것이듯이, 복수형을 포함할 수 있다. 이런 식으로, 예컨대 "하나(a)"는 하나(one)보다 많은 것을 의미할 수 있으며, "한(one) 예"는 명세서가 복수의 예들에 적용된다는 것을 의미할 수 있다.

[0484] 참고문헌에 의한 포함

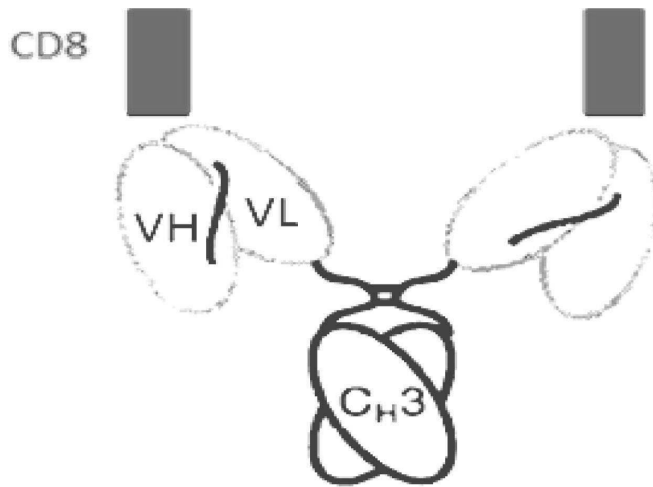
[0485] 특허들, 특허출원들, 논문들, 교과서들, 등을 포함하는 여기에 인용된 모든 참고문헌들, 그리고 여기에서 인용된 참고문헌들은, 그것들이 이미(already)가 아닌 때까지, 여기에 그 전체가 참고문헌으로써 포함된다. 정의된 용어, 용어 사용, 서술된 기술들, 또는 유사한 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는, 포함되는 문헌 및 유사한 자료들 중 하나 또는 그보다 많은 것이 본 출원과 다르거나 또는 모순되는 경우; 이 출원이 통제한다.

[0487] 등가물들(Equivalents)

[0488] 앞서 말한 서술(description) 및 실시예들은 특정 예들을 상세히 알린다. 그러나 앞서 말한 것이 글에서 얼마나 상세하게 나타날 수 있든지 간에, 본 발명은 많은 방식으로 실시될 수 있고 본 발명은 첨부된 특허청구범위들 및 그것의 임의의 등가물들(equivalents)에 따라 이해되어야 할 것이라는 것이 이해될 것이다.

도면

도면1a



도면1b

SP	VH	L	VL	H/E	CH3
----	----	---	----	-----	-----

도면1c

```

10          20          30          40          50          60
MALPVTALLL PLALLLHAAR PSQFRVSPLD RTWNLGETVE LKCQVLLSNP TSGCSWLFQP

70          80          90          100         110         120
RGAAASPTFL LYLSQNKPKA AEGLDTQRFS GKRLGDTFVL TLSDFRRENE GYYFCSALSN

130         140         150         160         170         180
SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT PAPRPPTPAP TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA

190         200         210         220         230
CDIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYCNHRN RRRVCKCPRP VVKSGDKPSL SARYV
SEQ ID NO: 24

```

도면2a

Humanized VH (1 st version) :		HCDR1	HCDR2
muOKT8	EVQLQSGAEELVKPGASVKLSCTAS	GENIKD	TYIHVVRORPEQGLEWIG RIDPANDNT LY
	** ** *		** ** *
4D5v8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GENIKD	TYIHWVROAPGKLEWVA RIYPTNGYT RY
huOKT8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GENIKD	TYIHWVROAPGKLEWVA RIDPANDNT LY
		HCDR3	
muOKT8	ASKFOGKATITADTSNTAYMHLCSLTSGDTAVYYCGR	GYG--YYVFDH	WGQGTTLTVSS
	**** ** *	** ** *	**
4D5v8	ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRSEDTAIVYYCSR	WGGDGFYAMDY	WGQGTTLTVSS
huOKT8	ASKFOGRATISADTSKNTAYLQMSLRSEDTAIVYYCGR	GYG--YYVFDH	WGQGTTLTVSS
Humanized VH (2 nd version) :		HCDR1	HCDR2
muOKT8	QVQLQSGAEELVKPGASVKLSCTAS	GENIKD	TYIHVVRORPEQGLEWIG RIDPANDNT LY
	* ** *	****	** ** *
Human	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVS	GYFTD	YYMHWQQAAPGKLEWVG LVDPEDGET IY
huOKT8	QVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVS	GENIKD	TYIHWVROAPGKLEWVG RIDPANDNT LY
		HCDR3	
muOKT8	ASKFOGKATITADTSNTAYMHLCSLTSGDTAVYYCGR	GYGYVFDH	WGQGTTLTVSS
	* ** *	***** **	**
Human	AEKFOGRVTITADTSTDYAMELSLRSEDTAIVYYCAT	A---EYFQH	WGQGTTLTVSS
huOKT8	ASKFOGRVTITADTSTDYAMELSLRSEDTAIVYYCAR	GYGYVFDH	WGQGTTLTVSS

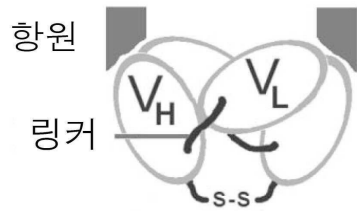
도면2b

Humanized VL:		LCDR1		LCDR2	
muOKT8	DVQINQSPSFLAASPGETTINC	RTSRISQYLA	WYQEKPGKTNKLLIY	SGSTILQS	GIPS
	* * * * *	* * * *	* * *	**	*
Human	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	RASGISNYLA	WYQQKPGKVPKLLIY	AASTILQS	GVPS
huOKT8	DVQITQSPSSLSASVGDRTITC	RTSRISQYLA	WYQQKPGKVPKLLIY	SGSTILQS	GVPS

LCDR3		서열번호: 7
muOKT8	RFSGSGGTFTLTISGLEPEDFAMYC	FGAGTKLEIK
	* * *	* *
Human	RFSGSGGTFTLTISLQPEDVATYIC	FGGKTKVEIK
huOKT8	RFSGSGGTFTLTISLQPEDVATYIC	FGGKTKVEIK

LCDR3		서열번호: 8
muOKT8	RFSGSGGTFTLTISLQPEDVATYIC	FGGKTKVEIK
	* * *	* *
Human	RFSGSGGTFTLTISLQPEDVATYIC	FGGKTKVEIK
huOKT8	RFSGSGGTFTLTISLQPEDVATYIC	FGGKTKVEIK

도면3a



도면3b

SS	V _H	L	V _L	GGC
----	----------------	---	----------------	-----

도면4

Tctagagccgccacc 서열번호: 61
XbaI Kozak
 1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 1 ATGGAGACAGACACCCCTGCTCCTGTGGGTCTGCTCCTCTGGGTCCCTGGATCCACCGGC
Signal Peptide
 21 D V Q I N Q S P S F L A A S P G E T I T
 61 GATGTCCAGATCAACCAAGCCCCAGCTTCTGGCTGCCTCCCTGGAGAGACAATCACC
VL
 41 I N C R T S R S I S Q Y L A W Y Q E K P
 121 ATCAATTGCCGACCAGCCGGAGCATTTCCAGTACCTCGCTGGTACCAGGAAAAGCCT

 61 G K T N K L L I Y S G S T L Q S G I P S
 181 GGCAAGACCAACAAGCTGCTGATCTACTCCGGCTCCACACTCCAGAGCGGCATTCCCTCC
 81 R F S G S G S G T D F T L T I S G L E P
 241 AGGTTTAGCGGATCCGGATCCGGAACCGACTTCACACTCACCATCTCCGGCTGGAGCCC
 101 E D F A M Y Y C Q Q H N E N P L T F G A
 301 GAGGACTTCGCCATGTATTATTGCCAGCAGCACAAATGAGAACCCCTGACCTTCGGCGCT

 121 G T K L E L K G S T S G G G S G G G S G
 361 GGCAACAGCTGGAGCTGAAAGGCTCCACCAGCGGAGCGGATCCGGAGGAGGAAAGCGGC
Linker
 141 G G G S S E V Q L Q Q S G A E L V K P G
 421 GCGGAGGCTCCTCCGAGTGCAGTGCAACAGAGCGGCGCGAACTGGTGAAGCCTGGA
VH
 161 A S V K L S C T A S G F N I K D T Y I H
 481 GCTTCCGTGAAACTCAGCTGTACCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGATACCTACATCCAC
 181 F V R Q R P E Q G L E W I G R I D P A N
 541 TTCGTGGGCAAGGCTGAGCAGGGCTGGAATGGATCGGAGGATCGACCCCGCCAAC
 201 D N T L Y A S K F Q G K A T I T A D T S
 601 GACAACACCCCTCTACGCTCCAAGTCCAAGGCAAGGCCACAATCACCCTGATACAAGC
 221 S N T A Y M H L S S L T S G D T A V Y Y
 661 TCCAACACCGCTACATGCACCTCAGCTCCCTGACCAGCGGAGACACCGCGTGTACTAC
 241 C G R G Y G Y Y V F D H W G Q G T T L T
 721 TGCGGACGGGATACGGCTACTATGTGTTCCAGCCACTGGGGCCAAGGCACCACTCACC
 261 V S S E P K S C D K T H T C P P C G G G
 781 GTGTCTCCGAGCCCAAGTCTCGGACAAGACACACCTGTCCCCCTTGTGGAGGAGGA
Hinge/Extension
 281 S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
 841 TCCTCCGAGGCGGCTCCGGGGACAGCCTAGGGAGCCCGAGGTGTACACACTGCCCCCT
CH3
 301 S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
 901 TCCAGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGATTCTAC
 321 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 961 CCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGAGTCCAACGGCCAACCCGAGACAATTACAAGACC
 341 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D
 1021 ACCCCCCCTGTGCTCGATTCCGACGGCTCCTTCTCCTGTACTCCAAGCTCACCCTGGAC
 361 K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H
 1081 AAGTCCCGGTGGCAACAGGCAATGTGTTCTCCTGCAGCTCATGCACGAGGCCCTGCAT
 381 N H Y T Q K S L S L S P G K - 서열번호: 16

 1141 AACCACTACACCCAGAAATCCCTCAGCCTCTCCCTGGAAAATGA 서열번호: 17
 aagctt_ 서열번호: 64 _HindIII

도면5

TCTAGAGCCGCCACC 서열번호 : 62

XbaI Kozak

1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 1 ATGGAGACGACACACTCCTGCTCTGGGTGCTCCTGCTGTGGGTGCCTGGCAGCACAGGA
Signal Peptide
 21 E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L
 61 GAAGTGCAGTGCAGCAGTCCGGCGCCGAACCTCGTCAAACCCGAGCCTCCGTCAAACCTG
VH
 41 S C T A S G F N I K D T Y I H F V R Q R
 121 TCCTGCACAGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCATTTTCGTGCGGCAAAGG
 61 P E Q G L E W I G R I D P A N D N T L Y
 181 CCTGAACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGGATCGACCCCGCAACGACAATACCCTCTAC
 81 A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y
 241 GCCTCCAAGTTCAGGGAAAGGCCACCATACCGCCGACACATCCAGCAACACCGCCTAC
 101 M H L S S L T S G D T A V Y Y C G R G Y
 301 ATGCACCTCAGCTCCCTGACATCCGGCGACACCGCGTGTACTACTGCGGCAGGGGCTAC
 121 G Y Y V F D H W G Q G T T L T V S S G S
 361 GGCTACTACGTGTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACAACCTGACCGTGTCCAGCGGCTCC
Linker
 141 T S G G G S G G G S G G G S S D V Q I
 421 ACCTCCGAGGCGGAAGCGCGGAGGATCCGAGGAGGAGCTCCTCCGAGTGCAAATC
VL
 161 N Q S P S F L A A S P G E T I T I N C R
 481 AACCATCCCTAGCTTCTTGCCGCTAGCCCTGGCGGACAAATCACAATCAATTGTGCG
 181 T S R S I S Q Y L A W Y Q E K P G K T N
 541 ACCAGCCGTCCTATCTCCAGTATCTGGCCTGGTACCAGGAGAAGCCCGGCAAGACAAAC
 201 K L L I Y S G S T L Q S G I P S R F S G
 601 AAGCTGCTCATCTACAGCGCAGCACCTCCAATCCGGCATCCCTTCCCGGTTTAGCGGC
 221 S G S G T D F T L T I S G L E P E D F A
 661 TCCGATCCGGAACCGACTTTACCCTGACCATCAGCGGCTGGAACCCGAGGATTTGCGC
 241 M Y Y C Q Q H N E N P L T F G A G T K L
 721 ATGTACTACTGCCAGCAGCACAACGAGAATCCCTGACCTTTGGAGCCGGCACAAGCTC
 261 E L K E P K S C D K T H T C P P C G G G
 781 GAGCTGAAGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCCACCTGTCCCTTTCGGAGGAGGA
Hinge/Extension
 281 S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
 841 TCCTCCGCGCGGGAAGCGGAGGACAACCCAGGGAGCCCAGGTCTACACCTGCCTCCT
CH3
 301 S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
 901 AGCCGGGACGAAGTACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTCAAGGGCTTCTAC
 321 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 961 CCTTCCGACATCGCCGTGAGTGGAAAGCAACGGCCAGCCCGAGACAATTACAAGACC
 341 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D
 1021 ACACCCCGCTCCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTCTACTCCAAGCTGACCGTGGAC
 361 K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H
 1081 AAGAGCCGTGGCAACAAGGCAACGTGTCTCCTGCAGCGTCATGCATGAGGCCCTGCAC
 381 N H Y T Q K S L S L S P G K - 서열번호: 18
 1141 AATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTCTCCCCGGCAAGTGA 서열번호: 19
 Stop

AAGCTT 서열번호 : 63 HindIII

도면6

Tctagagccgccacc 서열번호: 65

XbaI Kozak

1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 1 ATGGAGACAGACACCTCCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCTGGCAGCACAGGA
Signal Peptide
 21 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 61 GACATCCAAATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTCAGCGCTTCCGTCGGAGACAGGGTCACC
VL
 41 I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
 121 ATCACATGCAGGACCTCCAGGTCCATCAGCCAGTATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCC
 61 G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
 181 GGCAAGGTGCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGGCAGCACACTCCAGAGCGAGTGCCCGC
 81 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 241 CGGTTTTCGGGAGCGGATCCGGAACCGACTTCAACCTGACCATTTCCAGCCTGCAACCT
 101 E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
 301 GAAGACGTGGCCACCTACTACTGTACGAGCACAACGAGAACCCCTCACCTTCGGCGGA
 121 G T K V E I K G S T S G G G S G G G S G
 361 GGCAACCAAGTCGAGATCAAGGGCAGCACCGGAGGAGGAAGCGCGGAGGCTCCGGA
Linker
 141 G G G S S Q V Q L V Q S G A E V K K P G
 421 GGAGGAGGTCCTCCCAAGTCAGCTCGTCCAAAGCGCGCTGAGGTGAAAAAGCCCGGC
VH
 161 A T V K I S C K V S G F N I K D T Y I H
 481 GCCACAGTCAAATCTCCTGCAAGGTCAGCGGCTTCAACATCAAGGATACCTACATCCAC
 181 W V Q Q A P G K G L E W M G R I D P A N
 541 TGGGTGCAACAGGCCCGCGCAAAGGACTCGAATGGATGGGCCGGATCGACCTGCTAAC
 201 D N T L Y A S K F Q G R V T I T A D T S
 601 GACAACACTCTACGCCTCCAAGTTCAGGGCAGGGTGACCATCACCGCGGATACCTCC
 221 T D T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y
 661 ACCGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGTCCGAGGACACCGCGTCTATTAC
 241 C A R G Y G Y Y V F D H W G Q G T L V T
 721 TGCGCCCGGGATACGGCTACTACGTGTTTGACCATGGGGACAGGGAACATCGTGACC
 261 V S S E P K S C D K T H T C P P C G G G
 781 GTGAGCTCCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACATGTCTCTTGGGAGGAGGC
Hinge/Extension
 281 S S G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
 841 AGCTCCGGAGGCGGATCCGGCGGACAACCTAGGGAGCCCAGGTCTATACCTGCCCCC
CH3
 301 S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
 901 AGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTCTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGATCTAC
 321 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 961 CCCAGCAGATCGCTGTGCAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACA
 341 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D
 1021 ACCCCCCCGTGTGGATTCCGACGGCAGCTTCTTCTCTACTCCAAGCTGACCGTCGAC
 361 K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H
 1081 AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCTCTGCTCCGTGATGCATGAGGCCCTGCAC
 381 N H Y T Q K S L S L S P G K - 서열번호: 20
 1141 AACCCTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTCAGCCCTGGCAAGTGA 서열번호: 21
 Stop
 aagctt 서열번호: 66 HindIII

도면7

Tettagagcgcgcacc 서열번호 : 67

XbaI Kozak

1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
 1 ATGGAGACCGGATACACTGCTGCTCTGGGTGCTGCTGTGGGTGCCTGGAAGCACCCTGGA
Signal Peptide
 21 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
 61 CAGGTGCAACTGGTCCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAAAAGCCTGGCGCCACCGTCAAGATC
VH
 41 S C K V S G F N I K D T Y I H W V Q Q A
 121 TCCTGTAAGGTGAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTGCAGCAGGCT
 61 P G K G L E W M G R I D P A N D N T L Y
 181 CCCGAAAGGACTGGAGTGGATGGCAGGATCGACCTGCCAATGACAACACCCCTCTAC
 81 A S K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y
 241 GCCAGCAAGTTCAGGACGGGTGACCATCACAGCCGACATCCACCGACACAGCCTAT
 101 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y
 301 ATGGAGTCTCCAGCCTGAGGTCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGGGGATAC
 121 G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S G S
 361 GGCTATTACGTGTTCCGACCACTGGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGAAGC
Linker
 141 T S G G G S G G G S G G G G S S D I Q M
 421 ACCAGCGCGGAGGCAGCGGAGGCGGAAGCGCGGCGCGGATCCTCCGATTCAGATG
VL
 161 T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
 481 ACCCAATCCCCCTCCAGCCTGTCGCTAGCGTGGGAGACAGGTGACAATCACATGTCGG
 181 T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P G K V P
 541 ACCTCCAGGTCCATCAGCCAATATCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCGGCAAGGTGCC
 201 K L L I Y S G S T L Q S G V P S R F S G
 601 AAGCTCTGATCTACAGCGGCTCCACCTCCAAAGCGGAGTGCCTTCCCGGTTTAGCGGA
 221 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D V A
 661 AGCGGCAGCGGCACAGACTTTACCTGACAATCAGTCCCTGCAACCTGAGGACGTCGCC
 241 T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G G T K V
 721 ACATACTACTGCCAGCAGCAACGAGAACCCTCTACCTTTGGCGGCGGCACCAAGTG
 261 E I K E P K S C D K T H T C P P C G G G
 781 GAGATCAAGGAGCCCAATCCTGCGACAAGACACACCTGCCCCCTTGTGGAGGAGGC
Hinge/Extension
 281 S S G G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P
 841 AGCTCCGCGCGGCAGCGGCGGACAAACCCGGGAACCTCAGGTGTATACACTCCCCCT
CH3
 301 S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y
 901 TCCAGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGCTTCTAC
 321 P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T
 961 CCCTCCGACATCGCTGTCGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAAAACAACTATAAGACC
 341 T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D
 1021 ACCCCCCCTGCTCGATTCCGATGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAGCTCACAGTCGAC
 361 K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H
 1081 AAGAGCGGTGGCAACAGGGCAACGTCTTCTCCTGTAGCGTCATGCACGAGGCCCTCCAC
 381 N H Y T Q K S L S L S P G K - 서열번호 : 22
 1141 AACCCTACACCCAGAAGTCCCTCTCCCTGAGCCCCGAAAAATGA 서열번호 : 23
 Stop

aagctt 서열번호 : 68 _HindIII

도면8

Tctagagccgccacc 서열번호 : 69

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTCCCTGGCAGCACAGGA
Signal Peptide
21  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61  GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCTTCCGTGGGAGATAGGGTGACC
VL
41  I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
121  ATCACATGCCGGACCTCCAGGTCCATCTCCAGTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC

61  G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
181  GGCAAGGTGCCCAAGCTGCTCATCTATAGCGGCAGCACCCCTGCAGAGCGGAGTGCCTTCC

81  R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
241  CGGTTTTCCGGATCCGCTCCGGCACAGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCT

101  E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
301  GAGGATGTCGCCACCTACTACTGCCAACAGCACAAAGAGAACCCCTGACCTTCGGCGGC

121  G T K V E I K S G G G G Q V Q L V Q S G
361  GGAACCAAGGTGAGATCAAGTCCGGAGGAGGAGGCCAAGTGCAGCTGGTCCAATCCGGC
Linker VH
141  A E V K K P G A T V K I S C K V S G F N
421  GCCGAAGTGAAAAAGCCCGCGCCACCGTGAAGATCAGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAAC

161  I K D T Y I H W V Q Q A P G K G L E W M
481  ATCAAGGACACCTATATCCACTGGGTCCAGCAAGCCCCGAAAAGGCCTGGAGTGGATG

181  G R I D P A N D N T L Y A S K F Q G R V
541  GGACGGATTGACCCCGCAACGACAACACTCTATGCCTCCAAGTTCAGGGCAGGGTG

201  T I T A D T S T D T A Y M E L S S L R S
601  ACAATCACCGCGACACCAGCACCAGACAGCTTATATGGAGCTGTCTCCCTCCGGTCC

221  E D T A V Y Y C A R G Y G Y Y V F D H W
661  GAGGATACCGCGTCTACTACTGCGCCAGGGGCTACGGCTACTACGTGTTTGACCACTGG

241  G Q G T L V T V S S G G C 서열번호 : 12
721  GGCCAGGGCACCCTGGTGACAGTGTCCAGCGGAGGCTGC 서열번호 : 77
Cys

```

aagctt 서열번호 : 70

HindIII

도면9

Tctagagccgccacc 서열번호 : 71

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGACACCTGCTGCTCTGGGTCTCTGCTGTGGGTGCCTGGCAGCACAGGA
Signal Peptide
21  Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
61  CAGGTGCAACTGGTGCAGAGCGGCCGAGGTCAAGAAACCTGGCGCCACCGTGAAGATC
    VH
41  S C K V S G F N I K D T Y I H W V Q Q A
121 AGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCCAACAAGCC

61  P G K G L E W M G R I D P A N D N T L Y
181 CCCGGAAGGGCTTGAATGGATGGGCCGGATTGACCCCGCCAACGACAACCCCTCTAT

81  A S K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y
241 GCCAGCAAGTTCAGGGCAGGGTCACCATCACCGCCGACACGACCGACACCGCCTAC

101 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y
301 ATGGAGCTGAGCAGCTGCGGAGCGAAGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCTAC

121 G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S S G
361 GGCTACTACGTCTTCGACCATTTGGGACAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCCAGTCCCGGC
Linker
141 G G G D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
421 GGAGGAGGAGATATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGAGAT
    VL
161 R V T I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q
481 CGGGTGACCATCACATGCAGGACCTCCAGGTCCATCTCCAGTACCTGGCCTGGTACCAA

181 Q K P G K V P K L L I Y S G S T L Q S G
541 CAGAAGCCCGCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGGCAGCACACTGCAATCCGGC

201 V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S
601 GTCCCTTCCCGGTTTTCCGGATCCGGATCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCC

221 L Q P E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T
661 CTGCAACCCGAGGACGTGGCCACCTACTACTGTCAGCAGCAACGAGAACCCCTCACC

241 F G G G T K V E I K G G C 서열번호 : 13
721 TTTGGCGGGGAACCAAGGTCGAGATCAAGGGCGGCTGC 서열번호 : 78
Cys

```

aagctt 서열번호 : 72

HindIII

도면10

Tctagagccgccacc 서열번호 : 73

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGCTGGGTCCCTGGCAGCACAGGA
Signal Peptide
21  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61  GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCCTGAGCGCTTCCGTGGGAGATAGGGTGACC
VL
41  I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
121 ATCACATGCCGGACCTCCAGGTCCATCTCCAGTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCC

61  G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
181 GGCAAGGTGCCCAAGTGCTCATCTATAGCGGCAGCACCTGCAGAGCGGAGTGCTTCC

81  R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
241 CGGTTTTCCGGATCCGGTCCGGCACAGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCT

101 E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
301 GAGGATGTGCCACCTACTACTGCCAACAGCACACGAGAACCCCTGACCTTCGGCGGC

121 G T K V E I K G G G S G G G G Q V Q L V
361 GGAACCAAGGTCGAGATCAAGGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCCAAGTGCAGCTGGTC
Linker VH
141 Q S G A E V K K P G A T V K I S C K V S
421 CAATCCGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCGGCGCCACCGTGAAGATCAGCTGCAAGGTGTCC

161 G F N I K D T Y I H W V Q Q A P G K G L
481 GGCTTCAACATCAAGGACACCTATATCCACTGGGTCCAGCAAGCCCCGAAAAGGCCTG

181 E W M G R I D P A N D N T L Y A S K F Q
541 GAGTGGATGGGACGGATTGACCCCGCCAACGACACACACTCTATGCCTCCAAGTCCAG

201 G R V T I T A D T S T D T A Y M E L S S
601 GGCAGGGTGACAATCACCGCCGACACCAGCACCAGACAGCTTATATGGAGCTGTCCTCC

221 L R S E D T A V Y Y C A R G Y G Y Y V F
661 CTCCGGTCCGAGGATACCGCCGTCTACTACTGCGCCAGGGGCTACGGCTACTACGTGTTT

241 D H W G Q G T L V T V S S G G C 서열번호 : 14
721 GACCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCCAGCGGAGGCTGC 서열번호 : 10
CYS

```

aagctt 서열번호 : 74

HinDIII

도면11

Tctagagccgccacc 서열번호 : 75

XbaI Kozak

```

1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
1  ATGGAGACCGACACCTGCTGCTCTGGGTCCTCCTGCTGTGGGTGCCTGGCAGCACAGGA
   Signal Peptide
21  Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
61  CAGGTGCAACTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTCAAGAAACCTGGCGCCACCGTGAAGATC
   VH
41  S C K V S G F N I K D T Y I H W V Q Q A
121 AGTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATCCACTGGGTCCAACAAGCC

61  P G K G L E W M G R I D P A N D N T L Y
181 CCCGAAAGGGCCTTGAATGGATGGGCGGATTGACCCGCCAACGACAACACCTCTAT

81  A S K F Q G R V T I T A D T S T D T A Y
241 GCCAGCAAGTTCAGGGCAGGGTCACCATCACCGCCGACACCAGCACCGACACCGCCTAC

101 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G Y
301 ATGGAGCTGAGCAGCTGCGGAGCGAAGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGTAC

121 G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S G G
361 GGCTACTACGTCTTCGACCATTTGGGACAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCCAGCGGAGGA
   Linker
141 G S G G G G D I Q M T Q S P S S L S A S
421 GGATCCGGCGGAGGAGGATATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCC
   VZ
161 V G D R V T I T C R T S R S I S Q Y L A
481 GTGGGAGATCGGGTGACCATCACATGCAGGACCTCCAGGTCCATCTCCAGTACCTGGCC

181 W Y Q Q K P G K V P K L L I Y S G S T L
541 TGGTACCAACAGAAGCCCGCAAGTGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGGCAGCACACTG

201 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T
601 CAATCCGGCGTCCCTTCCCGGTTTTCCGGATCCGGATCCGGCACCGACTTCACCCTGACC

221 I S S L Q P E D V A T Y Y C Q Q H N E N
661 ATCAGTCCCTGCAACCCGAGGACGTGGCCACCTACTACTGTGACGAGCACAAACGAGAAC

241 P L T F G G G T K V E I K G G C   서열번호 : 15
721 CCCCTCACCTTTGGCGGCGGAACCAAGGTCGAGATCAAGGGCGGCTGC   서열번호 : 11
      CYS

```

aagctt 서열번호 : 76

HinDIII

도면12a

시스-디아바디들

Leader sequence:

atggaacacgacaccctgctgctgtggtgctgctgctgtgggtcccagggtccaccggt 서열번호: 25
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G 서열번호: 26

Five aa linker:

agtgttgaggaggc 서열번호: 27
S G G G G 서열번호: 28

Eight aa linker:

ggcggaggagtggtggcggaggcggc 서열번호: 29
G G G S G G G G 서열번호: 30

Cysteine tail:

ggcggctgc 서열번호: 31
G G C 서열번호: 32

도면12b

Leader sequence:
atggaacccgacaccctgctgctgtgggtgctgtgctgtgggtccagggtccaccggt 서열번호 : 33
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G 서열번호 : 34

Eighteen aa linker:
ggctccacatccggcggaggctctggcggtggatctggcggaggcggtcatcc 서열번호 : 35
G S T S G G G S G G G S G G G S S 서열번호 : 36

IgG1 힌지/링커-CH3 도메인:
gagcctaagtccctgcgacaagaccacacctgtcccccttgccggcggaggaagcagcgga
E P K S C D K T H T C P P C G G G S S G
ggcggatccggtggccagcctcgggagcctcaggtgtacacctgcctccctcccgggac
G G S G G Q P R E P Q V Y T L P P S R D
gagctgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctgtcaagggttctaccctccgat
E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
atcgccgtggagtgggagtcacaacggccagcctgagaacaactacaagaccaccctcct
I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
gtgctggactccgacggctccttcttctgtactccaagctcacagtggtgataagtcccg
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
tggcagcagggaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactat
W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
accagaagtccctgtccctgtctcctggcaag 서열번호 : 37
T Q K S L S L S P G K 서열번호 : 38

힌지 영역들:

IgG 힌지 영역들 및 변이체들의 아미노산 서열들.

	상류	중간	하류/연장
IgG1 (서열번호: 53)	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP
IgG1v1 (서열번호: 54)	EPKSCDKTHT	CPPCP	GGSSGGGSG
IgG2.NH (서열번호: 55)	ERK	CCVECPPCP	APPVA-GP
IgG3 (서열번호: 56)	ELKTPLGDTTHT	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) X3	APELLGGP
IgG3v1 (서열번호: 57)	ELKTPLGDTTHT	CPRCP	APELLGGP
IgG3v2 (서열번호: 58)	EPKSCDTPPP	CPRCP	APELLGGP
IgG4 (서열번호: 59)	ESKYGPP	CPSCP	APEFLGGP
IgG4v1 (서열번호: 60)	ESKYGPP	CPPCP	APEFLGGP
IgG2.EH (서열번호: 79)	ERK	CCVECPPCP	GGSSGGGSG

CH3 도메인들 :

hIgG2 CH3 vs hIgG1 CH3 의 정렬 (아미노산 서열들) :

hIgG2 CH3 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS
hIgG1 CH3 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
*****:*:*****

hIgG2 CH3 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호: 80)
hIgG1 CH3 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK- (서열번호: 81)

도면12c

Murine VL

gatgtccagataaaccagtcctccatcttttcttgctgcgtctcctggagaaaccattact
D V Q I N Q S P S F L A A S P G E T I T
ataaatgacaggacaagtaggagtagtattagtagtcaatatttagcc | tggatcaagagaaacct
I N C R T S R S I S Q Y L A W Y Q E K P
gggaaaactaataagcttcttatctac | tctggatccactctgcaatct | ggaattccatca
G K T N K L L I Y S G S T L Q S G I P S
aggttcagtgaggagtgatctggtagacagatttcactctcaccatcagtgagcctggagcct
R F S G S G S G T D F T L T I S G L E P
gaagattttgcaatgtattactgt | caacagcataatgaaaacccgctcag | ttcggtgct
E D F A M Y Y C Q Q H N E N P L T F G A
gggaccaagctggagctgaag 서열번호: 39
G T K L E L K 서열번호: 40

도면12d

huVL

gacgtccagataaaccagtcctccatctcctctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
D V Q I T Q S P S S L S A S V G D R V T
atacattgacaggacaagtaggagtagtattagtagtcaatatttagcc | tggatcagcagaaacca
I T C R T S R S I S Q Y L A W Y Q Q K P
gggaaagtctcctaagctcctgactctat | tctggatccactctgcaatct | ggagtcocatct
G K V P K L L I Y S G S T L Q S G V P S
cggttcagtgaggagtgatctggtagacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
gaagatgttgcaacttattactgt | caacagcataatgaaaacccgctcag | ttcgcgga
E D V A T Y Y C Q Q H N E N P L T F G G
gggaccaaggtggagatcaaa 서열번호: 41
G T K V E I K 서열번호: 42

도면12e

Murine VH

gagggtccagctgcagcagtcctggggcagagcctgtgaagccaggggcctcagtcagggtg
E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L
tctgtcacagcttct | ggcttcaacattaaagac | acctatatacacttcgtgaggcagagg
S C T A S G F N I K D T Y I H F V R Q R
cctgaacaggggcctggagtgattgga | aggattgatcctgcgaatgataatact | ttatat
P E Q G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcctcaaagttccagggaaggccactataacagcagacacatcatccaacacagcctac
A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y
atgcacctctgcagcctgacatctggggacactgccgtctattactgtggtaga | ggttat
M H L C S L T S G D T A V Y Y C G R G Y
ggttactacgtatttgaccac | tggggccaaggcaccactctcacagtcctccta 서열번호: 43
G Y Y V F D H W G Q G T T L T V S S 서열번호: 44

도면12f

huVH 버전 a (VH 버전 1로부터)

```

gaagtgcagctggtgaaagcggcgcgccctggtgcagccggcgagcctgcgcctg
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
agctgcgcggcgagc ggctttaacattaaagat acctatatcattttgtgcgcagcg
S C A A S G F N I K D T Y I H F V R Q A
ccgggcaaaggcctggaatggattggc cgcattgatccggcgaacgataacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcgagcaaatttcagggcaaagcgaccattagcgggataccagcaaaaacaccgctat
A S K F Q G K A T I S A D T S K N T A Y
ctgcagatgaacagcctgcgcgcgggagataccgcggtgtattattgcggccgc ggctat
L Q M N S L R A G D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc 서열번호: 45
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S 서열번호: 46

```

도면12g

huVH 버전 b (VH 버전 1로부터)

```

gaagtgcagctggtgaaagcggcgcgccctggtgcagccggcgagcctgcgcctg
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
agctgcgcggcgagc ggctttaacattaaagat acctatatcattttgtgcgcagcg
S C A A S G F N I K D T Y I H F V R Q A
ccgggcaaaggcctggaatggattggc cgcattgatccggcgaacgataacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcgagcaaatttcagggcaaagcgaccattagcgggataccagcaaaaacaccgctat
A S K F Q G K A T I S A D T S K N T A Y
ctgcagatgaacagcctgcgcgcgggagataccgcggtgtattattgcggccgc ggctat
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc 서열번호: 47
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S 서열번호: 48

```

도면12h

huVH 버전 c (VH 버전 2로부터)

```

caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaiaaaacggcgcgaccgtgaaatt
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
agctgcaaagtgaagc ggctttaacattaaagat acctatatcattttgtgcagcaggcg
S C K V S G F N I K D T Y I H F V Q Q A
ccgggcaaaggcctggaatggattggc cgcattgatccggcgaacgataacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcgagcaaatttcagggcaaagcgaccattacggcgataccagcaccgataaccgctat
A S K F Q G K A T I T A D T S T D T A Y
atggaactgagcagcctgcgcagcggagataccgcggtgtattattgcggccgc ggctat
M E L S S L R S G D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc 서열번호: 49
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S 서열번호: 50

```

도면12i

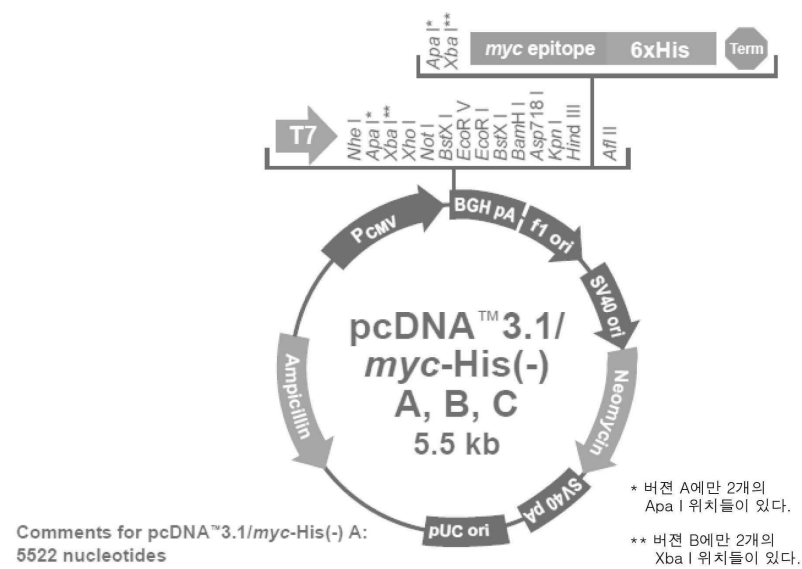
huVH 버전 d (VH 버전 2로부터)

```

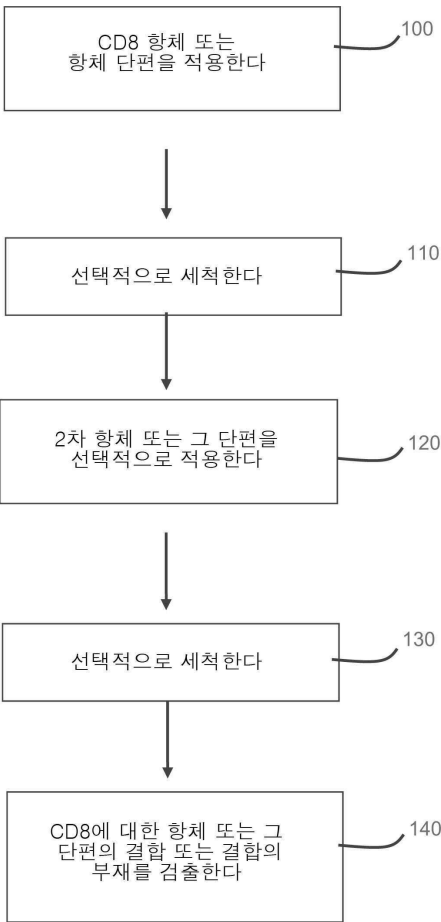
caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaiaaaacggcgcgaccgtgaaatt
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A T V K I
agctgcaaagtgaagc ggctttaacattaaagat acctatatcattttgtgcagcaggcg
S C K V S G F N I K D T Y I H F V Q Q A
ccgggcaaaggcctggaatggattggc cgcattgatccggcgaacgataacacc ctgtat
P G K G L E W I G R I D P A N D N T L Y
gcgagcaaatttcagggcaaagcgaccattacggcgataccagcaccgataaccgctat
A S K F Q G K A T I T A D T S T D T A Y
atggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcggtgtattattgcggccgc ggctat
M E L S S L R S E D T A V Y Y C G R G Y
ggctattatgtgtttgatcat tggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc 서열번호: 51
G Y Y V F D H W G Q G T L V T V S S 서열번호: 52

```

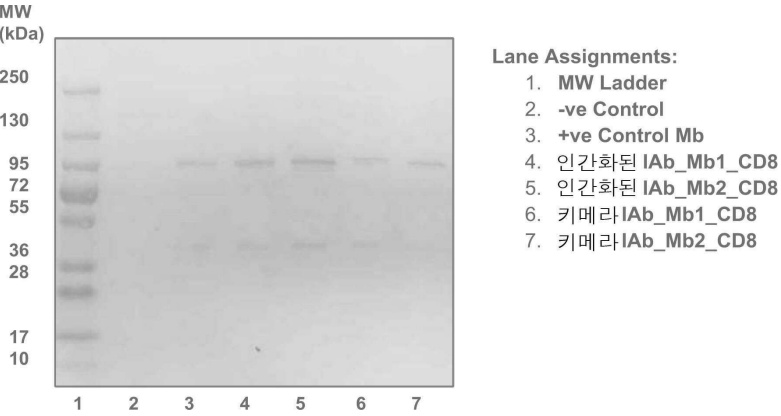
도면13



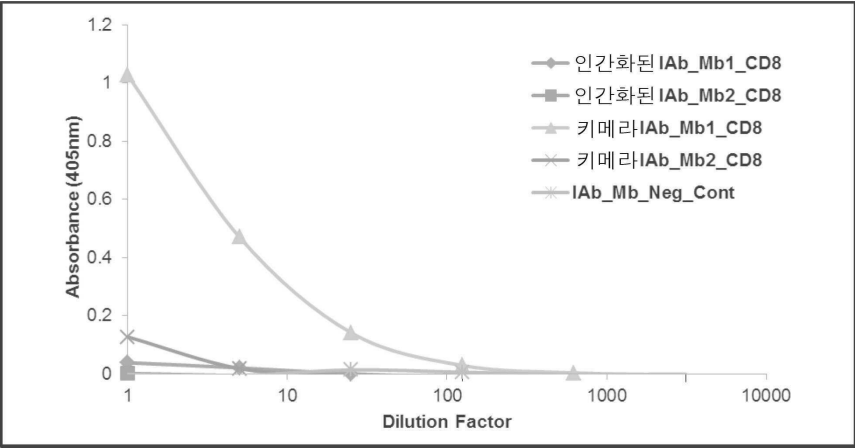
도면14



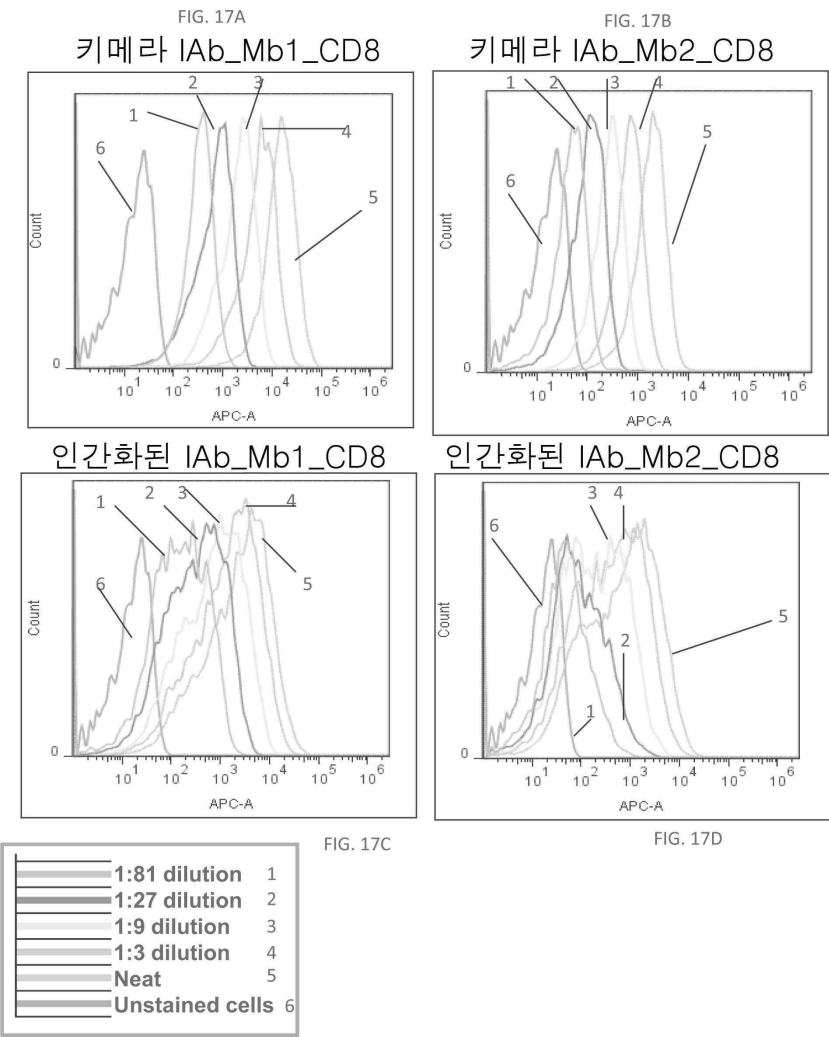
도면15



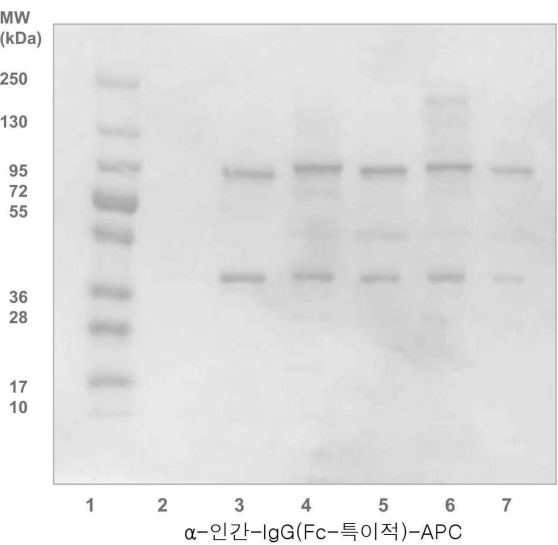
도면16



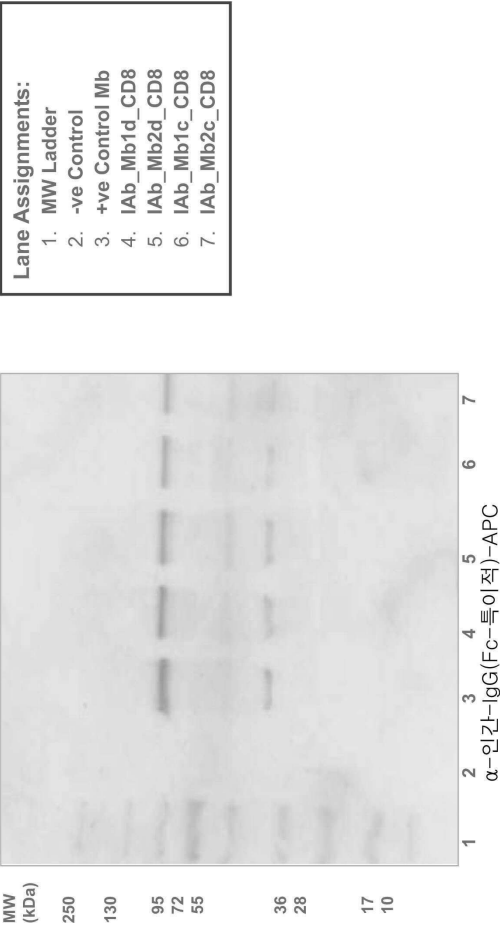
도면17



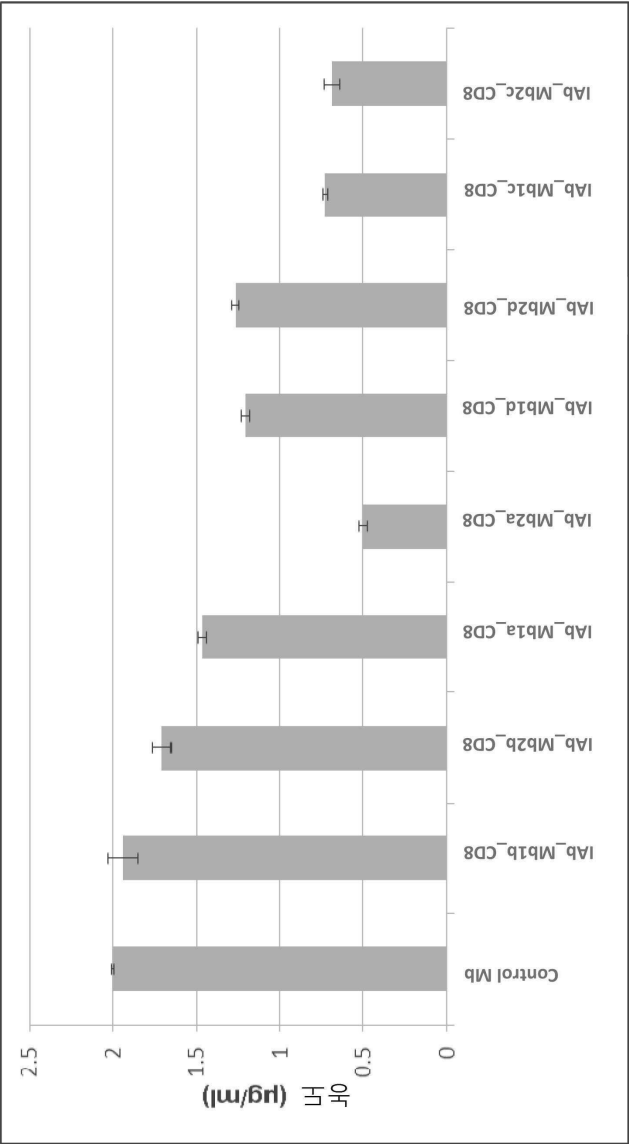
도면18a



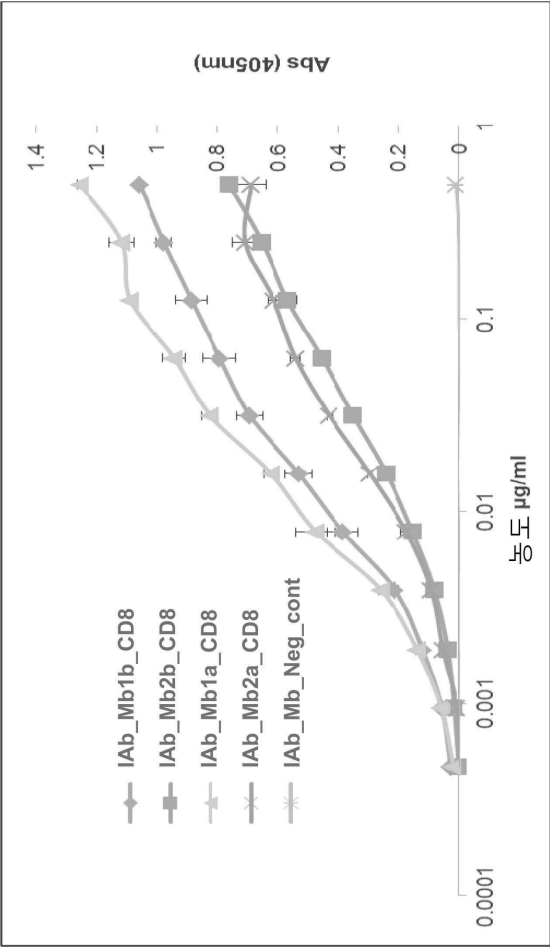
도면18b



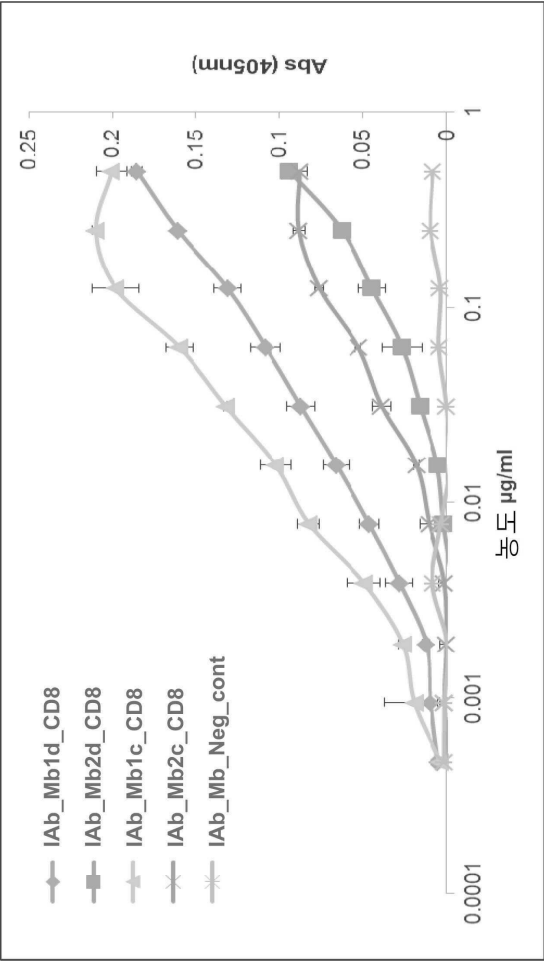
도면19



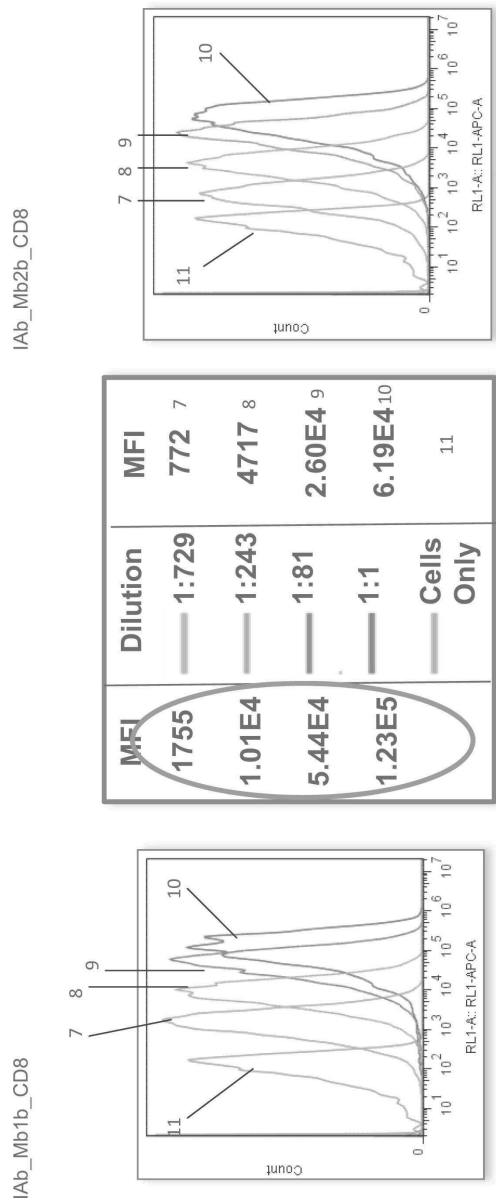
도면20



도면21

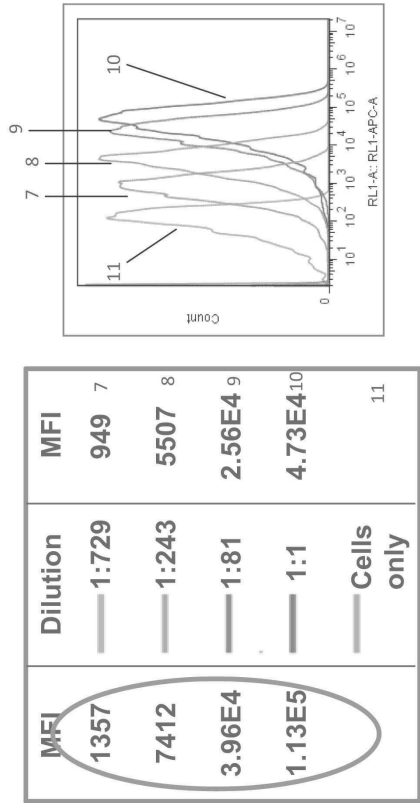


도면22a

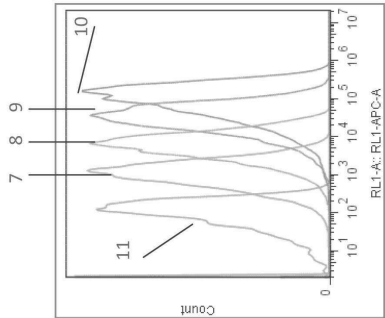


도면22b

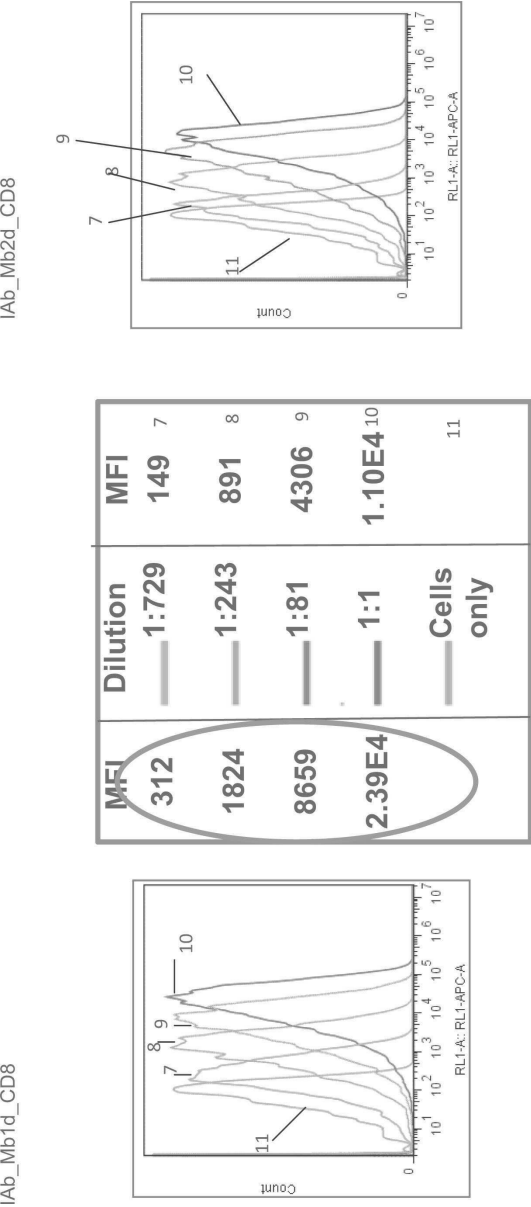
IAb_Mb2a_CD8



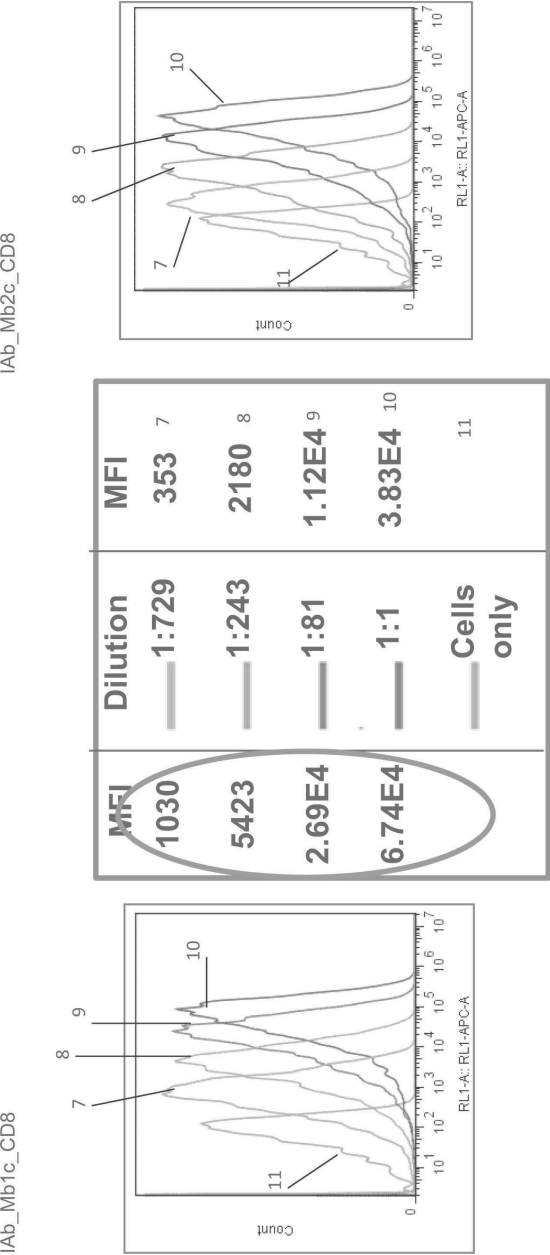
IAb_Mb1a_CD8



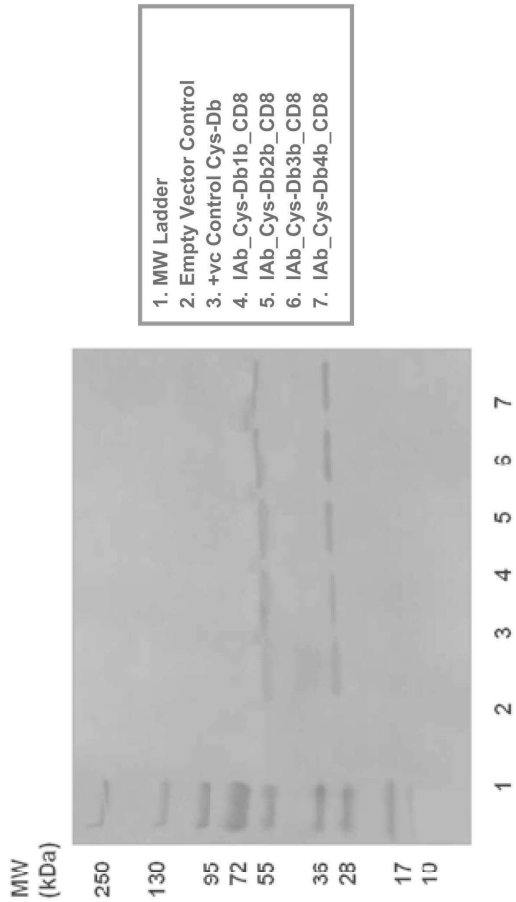
도면23a



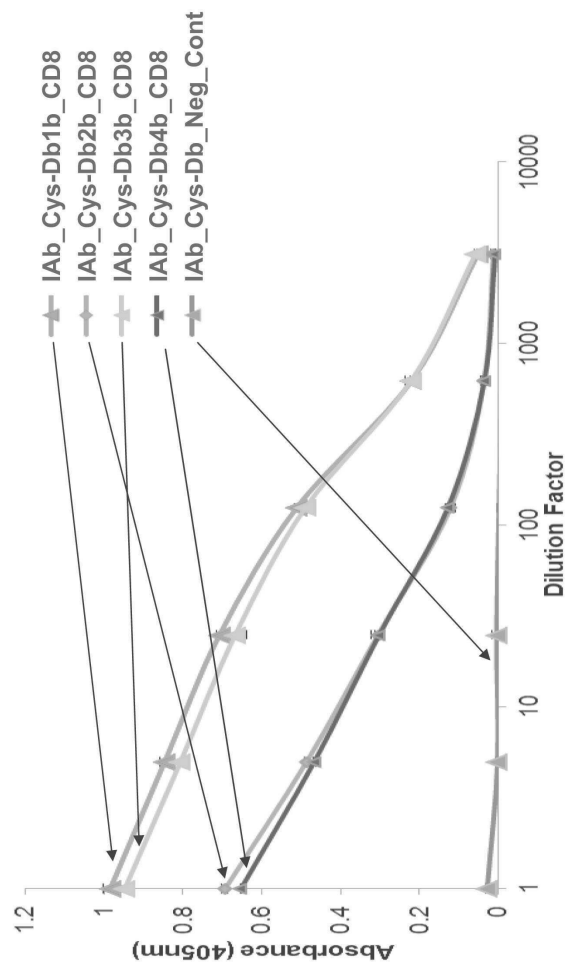
도면23b



도면24

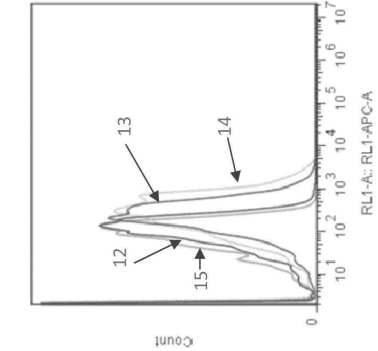


도면25



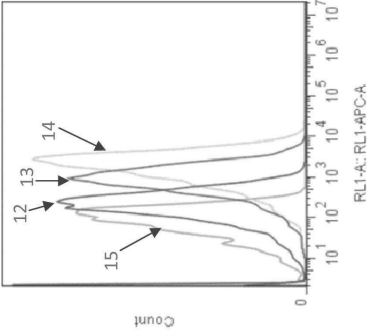
도면26a

IAb_Cys-Db2b_CD8

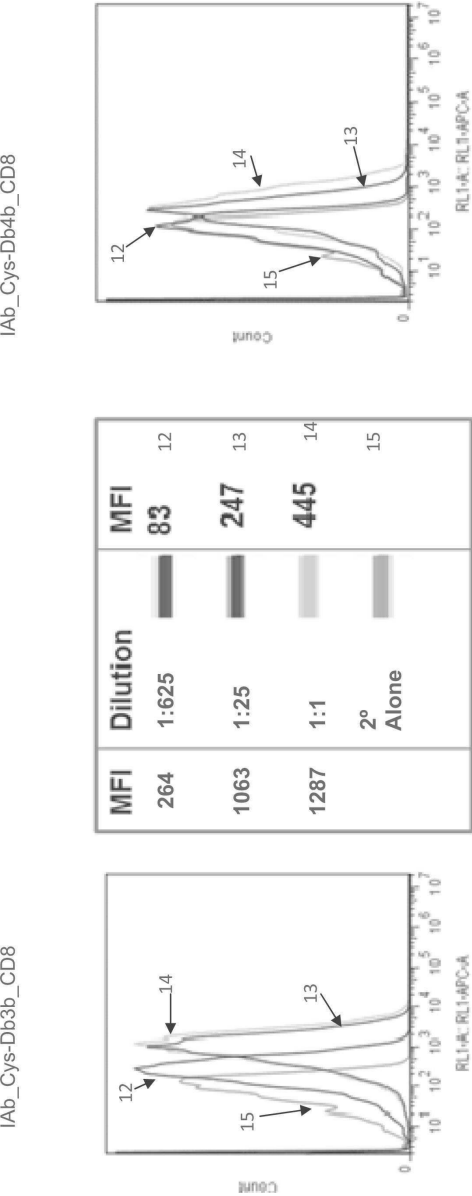


MFI	Dilution	MFI
228	1:625	147
1062	1:25	317
2404	1:1	322
	Cells only	

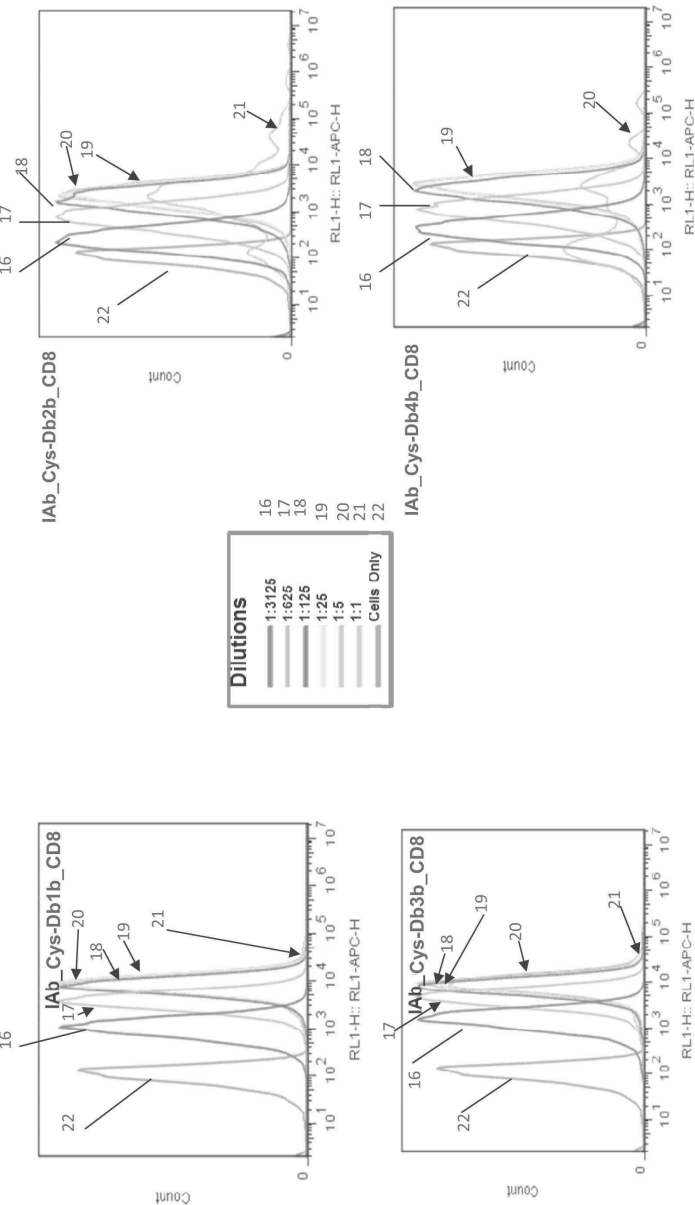
IAb_Cys-Db1b_CD8



도면26b

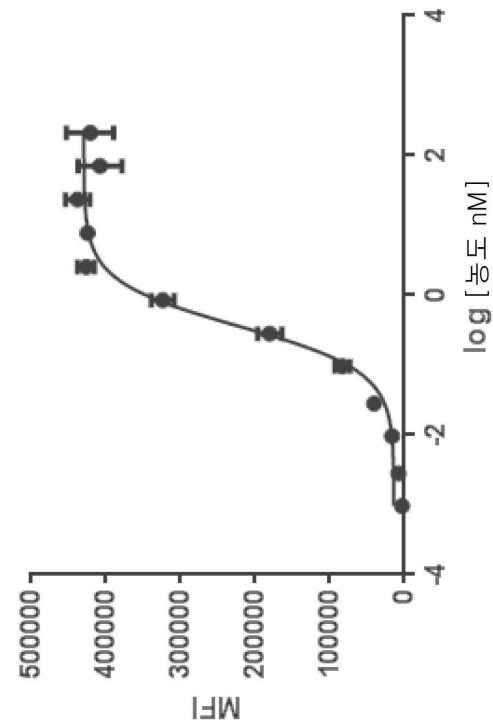


도면27

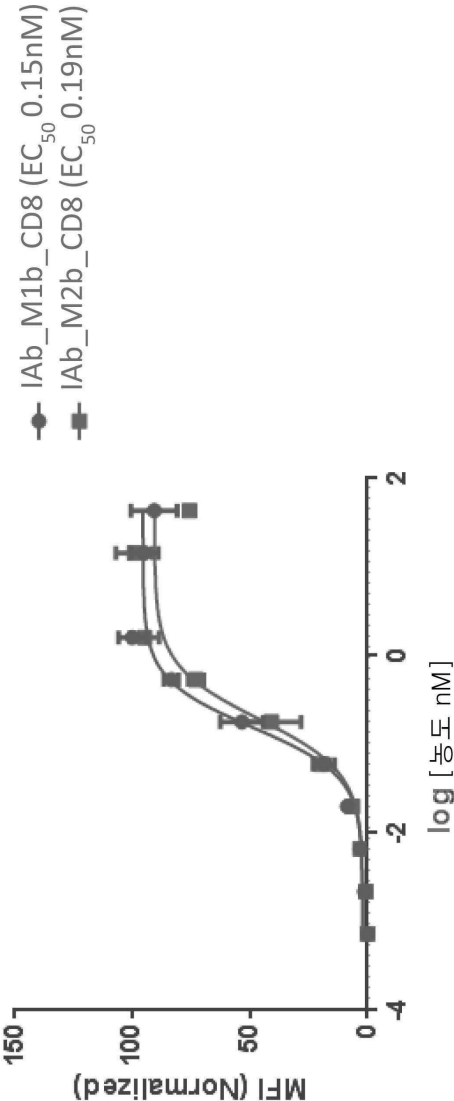


도면28

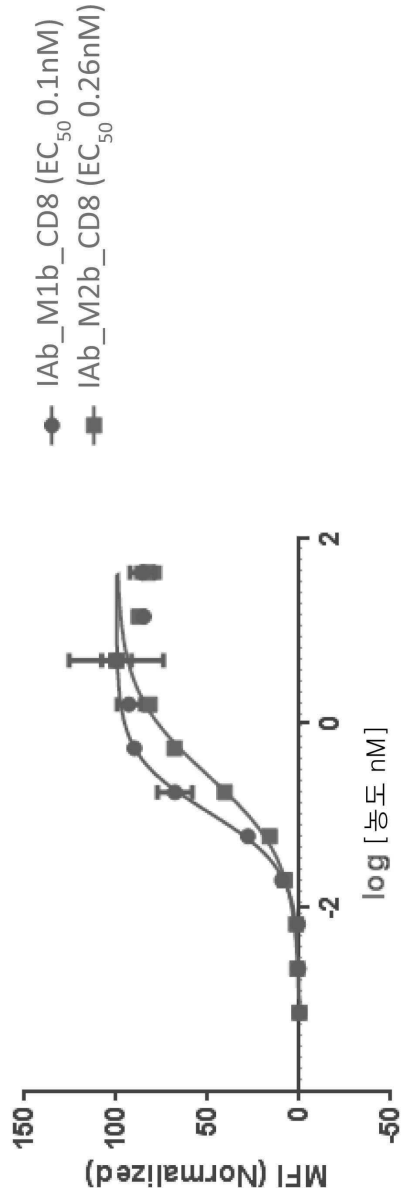
OKT8 (EC₅₀ 0.33 nM)



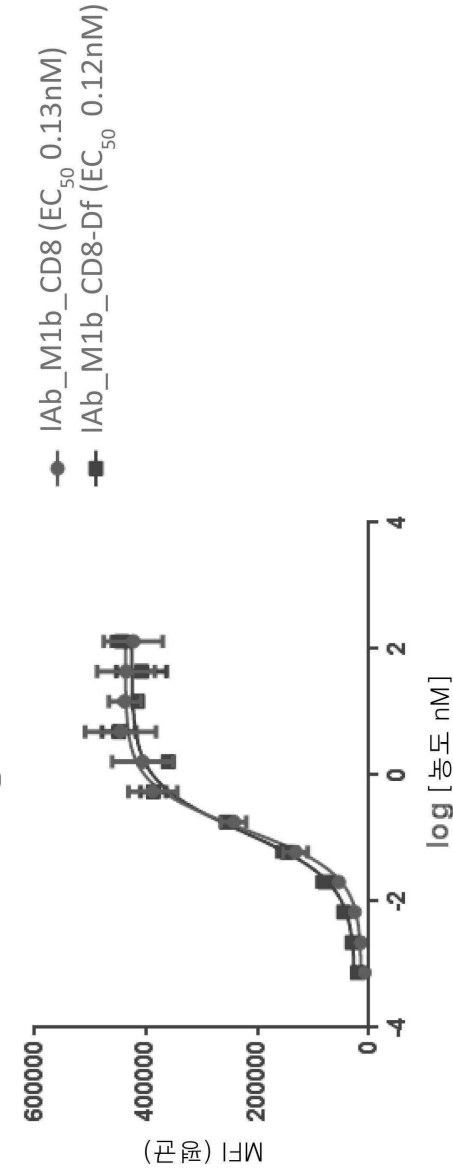
도면29a



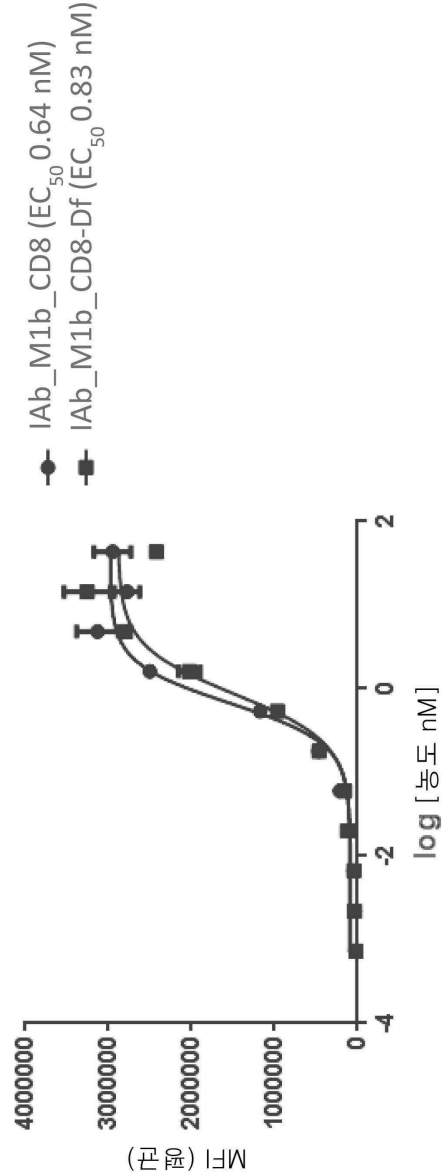
도면29b



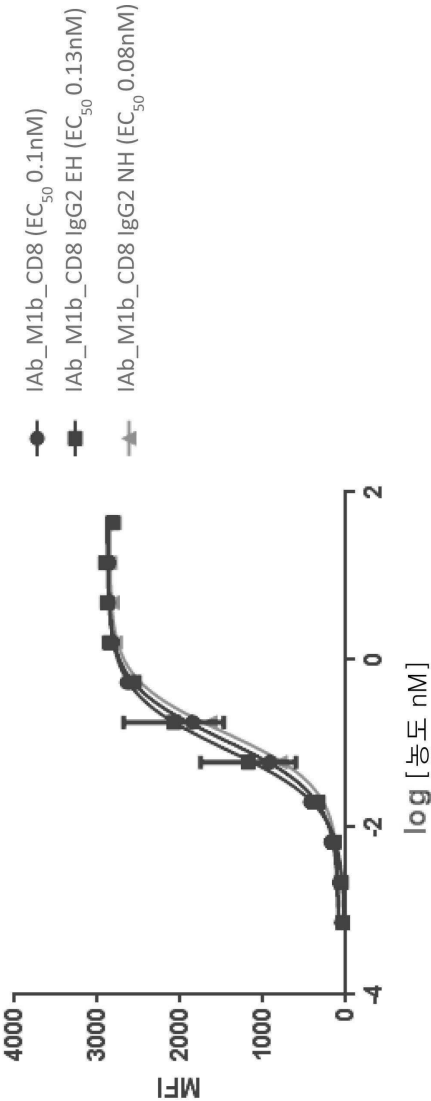
도면29c



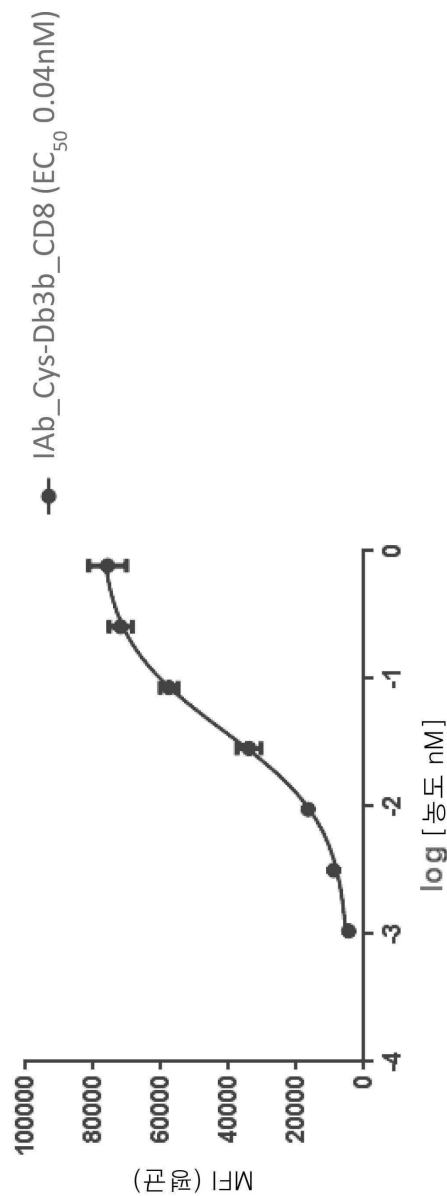
도면29d



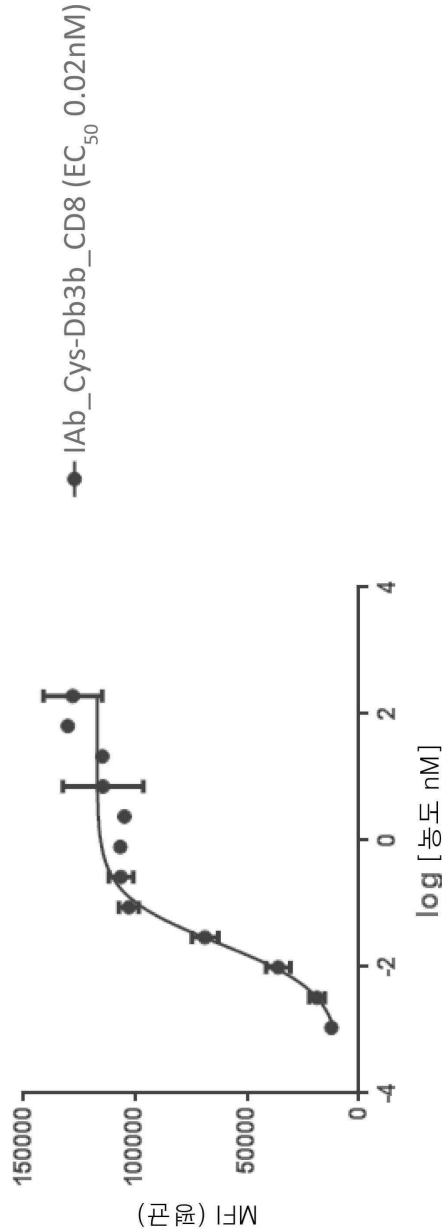
도면29e



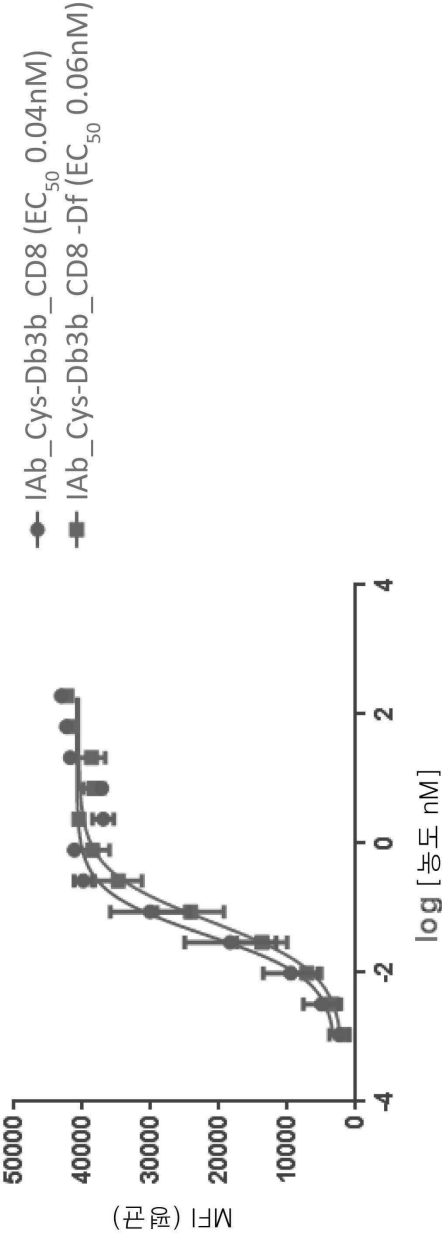
도면30a



도면30b

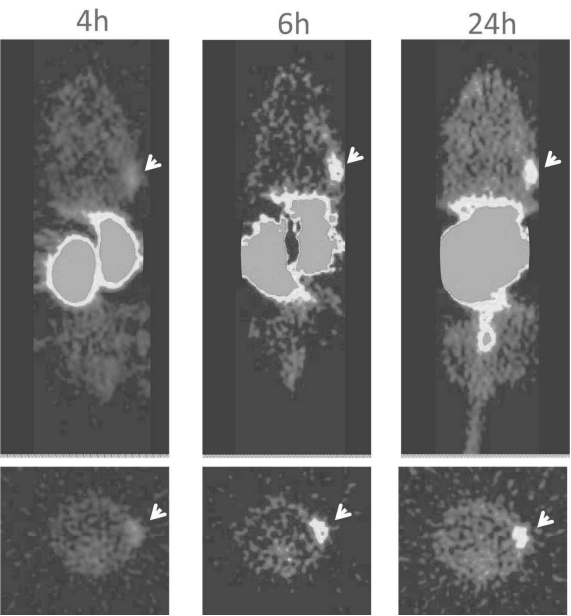


도면30c

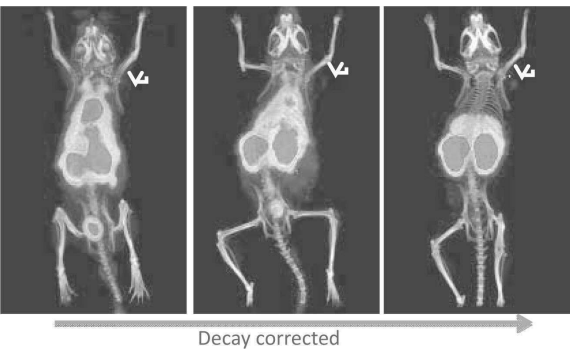


도면31

⁸⁹Zr-Df-IAb_Cys-Db3b_CD8: PET Imaging



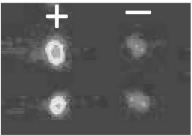
도면32a



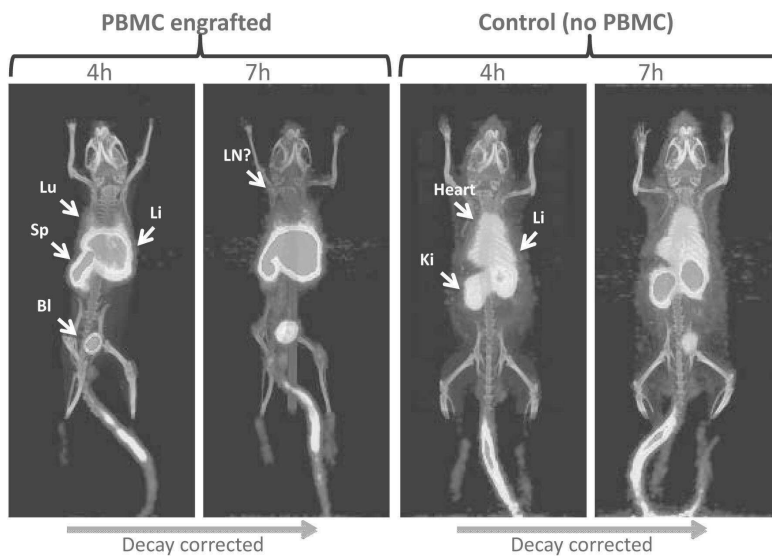
도면32b

48 시간에 %ID/g

PC3-hCD8 (+)	PC3 (-)
2.67	0.70
2.75	1.09



도면33



7 시간 후 PBMC 생착된(engrafted) NSC마우스들에서의 생물학적 분포는 하기를 보여준다:
 비장에서 2.1 배 더 높은 흡수
 신장에서 4.0 배 더 낮은 활성
 간에서 1.7 배 더 높은 활성, 그리고
 대조군에 비하여 상대적으로 혈액에서 3.1 배 더 낮은 활성

서열 목록

<110> Imaginab, Inc.

Ho, David T.

Olafsen, Tove

Agahi, Giti

Behrenbruch, Christian P.

<120> ANTIGEN BINDING CONSTRUCTS TO CD8 REFERENCE TO SEQUENCE LISTING,
 TABLE, OR COMPUTER PROGRAM LISTING

<130> IGNAB.014WO

<150> 61/780286

<151> 2013-03-13

<160> 81

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Murine

<400> 1

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

1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Murine

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Ala Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 6

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Murine

<400> 7

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

<210> 9

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 9
 Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105
 <210> 10
 <211> 768
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 10
 atggagaccg atacactgct gctgtgggtg ctgctgctct gggtccttgg cagcacagga 60
 gacatccaga tgacacagag ccctagctcc ctgagcgctt ccgtgggaga tagggtgacc 120
 atcacatgcc ggacctccag gtccatctcc cagtacctgg cctggtacca gcagaagccc 180
 ggcaaggtgc ccaagctgct catctatagc ggcagcaccc tgcagagcgg agtgccttcc 240
 cggttttccg gatccggctc cggcacagac ttaccctga ccatctccag cctgcagcct 300
 gaggatgtcg ccacctacta ctgccaacag cacaacgaga acccctgac cttcggcggc 360
 ggaaccaagg tcgagatcaa gggaggaggc tccggaggag gaggccaagt gcagctggtc 420

caatccggcg ccgaagtga aaagcccgcc gccaccgtga agatcagctg caaggtgtcc 480
 ggcttcaaca tcaaggacac ctatatccac tgggtccagc aagcccccg aaaaggcctg 540
 gagtggatgg gacggattga ccccgccaac gacaacacac tctatgcctc caagttccag 600
 ggcagggtga caatcacgc cgacaccagc accgacacag cttatatgga gctgtcctcc 660

ctccgggtccg aggataccgc cgtctactac tgcgccaggg gctacggcta ctacgtgttt 720
 gaccactggg gccagggcac cctggtgaca gtgtccagcg gaggtctg 768

<210> 11

<211> 768

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 11

atggagaccg acaccctgct gctctgggtc ctctgtctgt gggtgcctgg cagcacagga 60
 caggtgcaac tgggtcagag cggcgccgag gtcaagaaac ctggcgccac cgtgaagatc 120
 agctgcaagg tgiccggctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt ccaacaagcc 180

cccggaaagg gcctggaatg gatgggccgg attgaccccg ccaacgacaa caccctctat 240
 gccagcaagt tcagggcgag ggtcaccatc accgccgaca ccagcaccga caccgcctac 300
 atggagctga gcagcctgcg gagcgaagac accgccgtgt actactgcgc caggggctac 360
 ggctactacg tcttcgacca ttggggacag ggcaccctcg tgacagtgtc cagcggagga 420
 ggatccggcg gaggaggaga tatccagatg acccagagcc cttccagcct gtccgcttcc 480
 gtgggagatc gggtagcat ccatgcagg acctccaggt ccatctcca gtacctggcc 540
 tggtagaac agaagcccg caaggtgcc aagctgtga tctacagcg cagcacactg 600

caatccggcg tcccttccc gttttccgga tccgatccg gcaccgactt caccctgacc 660
 atcagctccc tgcaaccga ggacgtggcc acctactact gtcagcagca caacgagaac 720
 cccctcacct ttggcggcgg aaccaaggtc gagatcaagg gcggtctg 768

<210> 12

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 12

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

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

<210> 13
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 13
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 20 25 30
 Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn
 35 40 45
 Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 50 55 60
 Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr
 85 90 95
 Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Asp
 130 135 140
 Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 145 150 155 160
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu
 165 170 175
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 180 185 190
 Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 195 200 205

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 210 215 220
 Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr
 225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Cys
 245 250

<210> 14
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 14

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser

35 40 45

Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn
 100 105 110

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 130 135 140

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser
 145 150 155 160

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro
165 170 175
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn
180 185 190
Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
195 200 205
Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
210 215 220
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe
225 230 235 240
Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
245 250 255

<210> 15
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
<400> 15

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp

115 120 125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140
Gly Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
145 150 155 160

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser
165 170 175
Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
180 185 190

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
195 200 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
210 215 220

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn
225 230 235 240

Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Cys
245 250 255

<210> 16

<211

> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala
20 25 30

Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser
35 40 45

Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn

50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Gly Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn
 100 105 110
 Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

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

 195 200 205
 Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala
 210 215 220
 Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
 245 250 255
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 260 265 270

 Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 290 295 300
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

305 310 315 320
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

 325 330 335
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

 340 345 350
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

 355 360 365
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

 370 375 380
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

385 390
<210> 17

<211> 1185
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 17

atggagacag acaccctgct cctgtgggtg ctgctcctct gggtccttgg atccaccggc 60
gatgtccaga tcaaccaaag cccagcttt ctggtgcct cccctggaga gacaatcacc 120
atcaattgcc ggaccagccg gagcatttcc cagtacctcg cctggtacca ggaaaagcct 180
ggcaagacca acaagctgct gatctactcc ggctccacac tccagagcgg cattccctcc 240
aggtttagcg gatccggatc cggaaccgac ttcacactca ccatctccgg cctggagccc 300
gaggacttcg ccatgtatta ttgccagcag cacaatgaga acccctgac cttcggcgct 360
ggcaccaagc tggagctgaa aggtccacc agcggaggcg gatccggagg aggaagcggc 420

ggcggaggct cctccgaagt gcagctgcaa cagagcggcg ccgaactggt gaagcctgga 480
gcttccgtga aactcagctg taccgccagc ggcttcaaca tcaaggatac ctacatccac 540
ttcgtcggcg aaaggcctga gcaggcctg gaatggatcg gcaggatcga ccccgccaac 600
gacaacaccc tctacgctc caagttccaa ggcaaggcca caatcaccgc tgatacaagc 660
tccaacaccg cctacatgca cctcagctcc ctgaccagcg gagacaccgc cgtgtactac 720
tgcggacggg gatacggcta ctatgtgttc gaccactggg gccaaaggcac cacactcacc 780
gtgtcctccg agcccaagtc ctgcgacaag acacacacct gtcccccttg tggaggagga 840

tcctccggag gcggctccgg cggacagcct agggagcccc aggtgtacac actgccccct 900
tccagggacg aactcaccaa gaaccaggtg tccttgacct gcctggtgaa gggattctac 960
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagtcc aacggccaac ccgagaacaa ttacaagacc 1020
acccccctg tgctcgattc cgacggctcc ttcttctgt actccaagct caccgtggac 1080
aagtcccggt ggcaacaggg caatgtgttc tcctgcagcg tcatgcacga ggccctgcat 1140
aaccactaca ccagaaaac cctcagcctc tccctggaa aatga 1185

<210> 18

<211> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn

35 40 45

Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Ala Ser Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser

85 90 95

Asn Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp

115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Val Gln Ile

145 150 155 160

Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly Glu Thr Ile Thr
 165 170 175
 Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr
 180 185 190
 Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser
 195 200 205
 Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 225 230 235 240
 Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala
 245 250 255
 Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 260 265 270
 Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 275 280 285
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 290 295 300
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 305 310 315 320
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 325 330 335
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 340 345 350
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 355 360 365
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 370 375 380
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 385 390
 <210> 19
 <211> 1185

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 19

```
atggagaccg acacactcct gctctgggtg ctctgtgtgt gggcgctgg cagcacagga      60
gaagtgcagc tgcagcagtc cggcgccgaa ctctgcaaac cgggagcctc cgtcaaactg      120
tcctgcacag ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tccatttcgt gcggcaaagg      180
cctgaacagg gactcgagtg gatcggcagg atcgaccccg ccaacgacaa taccctctac      240
gcctccaagt tccagggaaa ggccaccatt accgcccaga catccagcaa caccgcctac      300
atgcacctca gtcacctgac atccggcgac accgccgtgt actactgcgg caggggctac      360
ggctactacg tgtttgacca ctggggccag ggaacaaccc tgaccgtgtc cagcggctcc      420
```

```
acctccggag gcggaagcgg cggaggatcc ggaggaggag gctcctccga cgtgcaaadc      480
aaccagtccc ctactttcct ggccgctagc cctggcgaga caatcacaat caattgtcgg      540
accagccggt ccacttccca gtatctggcc tggtagcagg agaagcccg caagacaaac      600
aagctgctca tctacagcgg cagcaccttc caatccggca tcccttcccg gtttagcggc      660
tccgatccg gaaccgactt taccctgacc atcagcggcc tggaaaccga ggatttcgcc      720
atgtactact gccagcagca caacgagaat ccctgacct ttggagccgg cacaagctc      780
gagctgaagg agcccaagag ctgcgacaaa acccacacct gtcccccttg cggaggagga      840
```

```
tcctccggcg gcggaagcgg aggacaaccc agggagcccc aggtctacac cctgcctcct      900
agccgggacg aactgacaaa gaaccagggt tcctgacct gtctcgtaa gggcttctac      960
ccttccgaca tcgccgtcga gtgggaaagc aacggccagc ccgagaacaa ttacaagacc      1020
acaccccccg tctggacag cgatggcagc ttcttctct actccaagct gaccgtggac      1080
aagagccggt ggcaacaagg caactgttct tcctgcagcg tcatgcatga ggccctgcac      1140
aatcactaca ccagaagag cctgagcctc tccccggca agtga                        1185
```

<210> 20

<211> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 20

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

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

 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn
 100 105 110
 Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125

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

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

260	265	270
Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
275	280	285
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
290	295	300
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
305	310	315
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
325	330	335
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
340	345	350
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
355	360	365
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
370	375	380
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
385	390	
<210>	21	
<211>	1185	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Antigen binding construct or fragment thereof	
<400>	21	
atggagacag acaccctcct gctgtgggtc ctgctgctgt gggtgcctgg cagcacagga	60	
gacatccaaa tgacceagtc ccctagcagc ctcagcgctt ccgtcggaga cagggtcacc	120	
atcacatgca ggacctccag gtccatcagc cagtatctgg cctggatatca gcagaaacct	180	
ggcaaggtgc ctaagctgct gatctacagc ggacgacac tccagagcgg agtgcccagc	240	
cggttttccg gaagcggatc cggaaccgac ttcacctga ccatttcag cctgcaacct	300	
gaagacgtgg ccacctacta ctgtcagcag cacaacgaga acccctcac cttcggcgga	360	
ggcaccaaag tcgagatcaa gggcagcacc agcggaggag gaagcggcgg aggctccgga	420	
ggaggaggct cctcccaagt gcagctcgtc caaagcggcg ctgagggtgaa aaagcccggc	480	

gccacagtca aaatctcctg caaggtcagc ggcttcaaca tcaaggatac ctacatccac 540
 tgggtgcaac agggcccccgg caaaggactc gaattggatgg gccggatcga cctgctaac 600
 gacaacacac tctacgcctc caagttccag ggcagggtga ccatcaccgc cgatacctcc 660
 accgacacag cctacatgga gctgagcagc ctgaggtcgg aggacaccgc cgtctattac 720
 tgcgccccgg gatacggcta ctacgtgttt gaccattggg gacagggaac actcgtgacc 780
 gtgagctccg agcccaagag ctgcgacaag acccacacat gtctctcttg cggaggaggc 840

agctccggag gcggatccgg cggacaacct agggagcccc aggtctatac cctgcccccc 900
 agcaggagc agctgacaaa gaaccaggtc tccctgacct gcctggtgaa aggattctac 960
 cccagcgaca tcgtgtcga atgggagtcc aacggccagc ccgagaacaa ctacaagaca 1020
 acccccccg tgctggattc cgacggcagc ttcttctct actccaagct gaccgtcgac 1080
 aagtccaggt ggcagcaggg caacgtgttt tctgtctccg tgatgcatga ggccctgcac 1140
 aaccactaca ccagaagtc cctgagcctc agccctggca agtga 1185

<210> 22
 <211> 394
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 22

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ile Gln Met
145 150 155 160

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
165 170 175

Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr
180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser
195 200 205

Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
210 215 220

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala
225 230 235 240

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly
245 250 255

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
260 265 270

Thr Cys Pro Pro Cys Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275 280 285

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
290 295 300

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
305 310 315 320

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
325 330 335

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
340 345 350

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

355	360	365	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
370	375	380	
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
385	390		
<210>	23		
<211>	1185		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Antigen binding construct or fragment thereof		
<400>	23		
atggagaccg atacactgct gctctgggtg ctgctgctgt gggcgcttgg aagcacccgga		60	
caggtgcaac tgggtccagtc cggcgccgag gtgaaaaagc ctggcgccac cgtcaagatc		120	
tcctgtaagg tgagcggctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt gcagcaggct		180	
cccggaaagg gactggagtg gatgggcagg atcgaccctg ccaatgacaa caccctctac		240	
gccagcaagt tccaaggacg ggtgaccatc acagccgaca catccaccga cacagcctat		300	
atggagctct ccagcctgag gtccgaggac accgccgtgt actactgtgc caggggatac		360	
ggctattacg tgttcgacca ctggggacag ggcaccctgg tgaccgtgag cagcgggaagc		420	
accagcggcg gaggcagcgg aggcggaagc ggcgccggcg gatcctccga cattcagatg		480	
acccaatccc cctccagcct gtccgctagc gtgggagaca gggtgacaat cacatgtcgg		540	
acctccaggt ccatcagcca atatctgcc tggatcagc agaagcccgg caaggtgccc		600	
aagtcctga tctacagcgg ctccaccctc caaagcggag tgccttcccg gtttagcgga		660	
agcggcagcg gcacagactt taccctgaca atcagctccc tgcaacctga ggacgtcgcc		720	
acatactact gccagcagca caacgagaac cctctcacct ttggcggcgg caccaaagtg		780	
gagatcaagg agcccaaate ctgcgacaag acacacacct gcccccttg tggaggaggc		840	
agctccggcg gcggcagcgg cggacaaccc cgggaacctc aggtgtatac actccccct		900	
tccagggatg agctgaccaa gaaccaagtc tccctgacct gtctggtgaa aggtttctac		960	
ccctccgaca tcgtgtcga gtgggagagc aacggccagc ccgaaaacaa ctataagacc		1020	
acccccccg tgctcgattc cgatggcagc ttcttctgt actccaagct cacagtcgac		1080	
aagagccggt ggcaacaggg caacgtcttc tcctgtagcg tcattgcacga ggccctccac		1140	
aaccactaca ccagaagtc cctctccctg agccccgaa aatga		1185	
<210>	24		

<211> 235

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr

20 25 30

Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser

35 40 45

Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala

50 55 60

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala

65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp

85 90 95

Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr

100 105 110

Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe

115 120 125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

130 135 140

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg

145 150 155 160

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly

165 170 175

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

180 185 190

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His

195 200 205

Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser

210	215	220	
Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val			
225	230	235	
<210>	25		
<211>	60		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Antigen binding construct or fragment thereof		
<400>	25		
atggaaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctct ggggccagg ctccaccgt			60
			60
<210>	26		
<211>	20		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Antigen binding construct or fragment thereof		
<400>	26		
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro			
1	5	10	15
Gly Ser Thr Gly			
	20		
<210>	27		
<211>	15		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Antigen binding construct or fragment thereof		
<400>	27		
agtgtggag gaggc			15
<210>	28		
<211>	5		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Antigen binding construct or fragment thereof		

<400> 28

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 29

ggcggaggga gtggcggagg cggc

24

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 31

ggcggctgc

9

<210> 32

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 32

Gly Gly Cys

1

<210> 33

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 33

atggaaaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctct ggggccagg ctccaccgt 60
60

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 34

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 35

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 35

ggctccacat ccggcggagg ctctggcgt ggatctggcg gaggcggctc atcc 54

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 36

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 37

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 37

gagcctaagt cctgcgacaa gaccacacc tgtccccctt gcggcggagg aagcagcggg 60
ggcggatccg gtggccagcc tcgggagcct caggtgtaca cctgcctcc ctcccgggac 120
gagctgacca agaaccaggt gtcctgacc tgtctgttca agggcttcta cccttccgat 180
atgccgtgg agtgggagtc caacggccag cctgagaaca actacaagac caccctcct 240
gtgtggact ccgacggctc cttcttctg tactccaagc tcacagtgga taagtccgg 300

tggcagcagg gcaacgtgtt ctctgtctcc gtgatgcacg aggccttgca caaccactat 360
accagaagt ccctgtcct gtctcctggc aag 393

<210> 38

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 38

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

1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

115 120 125
Pro Gly Lys

130
<210> 39
<211> 321
<212> DNA
<213> Murine
<400> 39

gatgtccaga taaaccagtc tccatctttt ctgtctgcgt ctctggaga aaccattact 60
ataaattgca ggacaagtag gagtattagt caatatttag cctggatatca agagaaacct 120
gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactc tgcaatctgg aattccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tggtagatg ttcactctca ccatcagtg cctggagcct 240
gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag cataatgaaa acccgctcac gtccggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa g 321

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> Murine
<400> 40

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15
Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

<210> 41

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 41

gacgtccaga taaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca ggacaagtag gagtattagt caatatttag cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagttc ctaagctcct gatctattct ggatccactc tgcaatctgg agtcccatct 180

cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagatgttg caacttatta ctgtcaacag cataatgaaa acccgctcac gttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 42

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

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

65

70

75

80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 43

<211> 354

<212> DNA

<213> Murine

<400> 43

gaggtccagc tgcagcagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60

tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tacacttcgt gaggcagagg 120

cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg attgatcctg cgaatgataa tactttatat 180

gcctcaaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcatcaa cacagcctac 240

atgcacctct gcagcctgac atctggggac actgccgtct attactgtgg tagaggttat 300

ggttactacg tatttgacca ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 44

<211> 118

<212> PRT

<213> Murine

<400> 44

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20

25

30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

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

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser

115
 <210> 45
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 45
 gaagtgcagc tgggtggaaag cggcggcggc ctggtgcagc cgggcggcag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcggctt taacattaaa gataacctata ttcattttgt gcgccaggcg 120
 ccgggcaaag gcctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180
 gcgagcaaat ttcagggcaa agcgaccatt agcgcggata ccagcaaaaa caccgcgtat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcgggagat accgcggtgt attattgcgg ccgcggctat 300

ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354
 <210> 46
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 47

gaagtgcagc tgggtggaaag cggcggcggc ctggtgcagc cgggcggcag cctgcgcctg 60

agctgcgcgg cgagcggctt taacattaaa gatacctata ttcattttgt gcgccaggcg 120

ccgggcaaag gcctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180

gcgagcaaat ttcagggcaa agcgaccatt agcgcggata ccagcaaaaa caccgcgtat 240

ctgcagatga acagcctgcg cgcggaagat accgcggtgt attattgcgg cgcggtat 300

ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 48

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

115
 <210> 49
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 49

caggtgcagc tgggtcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgac cgtgaaaatt 60
 agctgcaaag tgagcggctt taacattaaa gataacctata ttcattttgt gcagcaggcg 120
 ccgggcaaag gcctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180
 gcgagcaaat ttcagggcaa agcgaccatt accgcggata ccagcaccga taccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg cagcggagat accgcggtgt attattgcgg ccgcggctat 300
 ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> 50
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 50

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

Tyr Ile His Phe Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 51

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 51

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgcgga gtaaaaaaac cggcgcgac cgtgaaaatt 60
 agctgcaaag tgagcggctt taacattaaa gataacctata ttcattttgt gcagcaggcg 120
 ccgggcaaag gcctggaatg gattggccgc attgatccgg cgaacgataa caccctgtat 180
 gcgagcaaat ttcagggcaa agcgaccatt accgcggata ccagcaccga taccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat accgcggtgt attattgcgg ccgcggctat 300
 ggctattatg tgtttgatca ttggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> 52

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 52

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

Tyr Ile His Phe Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser

115
 <210> 53
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 53

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

20
 <210> 54
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 54

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

20 25
 <210> 55

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 55
 Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 1 5 10 15

Ala Gly Pro

<210> 56
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 56
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 20 25 30
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
 35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
 50 55 60
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 65 70

<210> 57
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Antigen binding construct or fragment thereof
 <400> 57
 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

20 25

<210> 58

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 58

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

1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

20

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 59

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro

20

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 60

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro

20

<210> 61

<211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Restriction site

<400> 61
 tctagagccg ccacc 15

<210> 62
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Restriction site

<400> 62
 tctagagccg ccacc 15

<210> 63
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Restriction site

<400> 63
 aagctt 6

<210> 64
 <211> 6

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Restriction site

<400> 64
 aagctt 6

<210> 65
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Restriction site

<400> 65

tctagagccg ccacc	15
<210> 66	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Restriction site	
<400> 66	
aagctt	6
<210> 67	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Restriction site	
<400> 67	
tctagagccg ccacc	15
<210> 68	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Restriction site	
<400> 68	
aagctt	6
<210> 69	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Restriction site	
<400> 69	
tctagagccg ccacc	15
<210> 70	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	Restriction site	
<400>	70	
aagctt		6
<210>	71	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Restriction site	
<400>	71	
tctagagccg ccacc		15
<210>	72	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Restriction site	
<400>	72	
aagctt		6
<210>	73	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Restriction site	
<400>	73	
tctagagccg ccacc		15
<210>	74	
<211>	6	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Restriction site	
<400>	74	
aagctt		6
<210>	75	
<211>	15	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Restriction site

<400> 75

tctagagccg ccacc 15

<210> 76

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Restriction site

<400> 76

aagctt 6

<210> 77

<211> 759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 77

atggagaccg atacactgct gctgtgggtg ctgctgctct gggtccttg cagcacagga 60

gacatccaga tgacacagag ccctagctcc ctgagcgctt ccgtgggaga tagggtgacc 120

atcacatgcc ggacctccag gtccatctcc cagtacctgg cctggtacca gcagaagccc 180

ggcaagggtgc ccaagctgct catctatagc ggacagcacc tgcagagcgg agtgccttcc 240

cggttttccg gatccggctc cggcacagac ttacctga ccatctccag cctgcagcct 300

gaggatgtcg ccacctacta ctgccaacag cacaacgaga acccctgac cttcggcggc 360

ggaaccaagg tcgagatcaa gtccggagga ggaggccaag tgcagctggt ccaatccggc 420

gccgaagtga aaaagcccgg cgccaccgtg aagatcagct gcaagggtgc cggcttcaac 480

atcaaggaca cctatatcca ctgggtccag caagccccg gaaaaggcct ggagtggatg 540

ggacggattg accccgcca cgacaacaca ctctatgcct ccaagtcca gggcagggtg 600

acaatcaccg ccgacaccag caccgacaca gcttatatgg agctgtcctc cctccggtcc 660

gaggataccg ccgtctacta ctgcgccagg ggctacggct actacgtgtt tgaccactgg 720

ggccagggca cctggtgac agtgtccagc ggaggctgc 759

<210> 78

<211> 759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 78

```

atggagaccg acaccctgct gctctgggtc ctctgtgtgt gggcgcctgg cagcacagga      60
caggtgcaac tggcgcagag cggcgccgag gtcaagaaac ctggcgccac cgtgaagatc      120
agctgcaagg tgtccggctt caacatcaag gacacctaca tccactgggt ccaacaagcc      180
cccgaaagg gcctggaatg gatgggccgg attgaccccg ccaacgacaa caccctctat      240
gccagcaagt tccagggcag ggtcaccatc accgccgaca ccagcaccga caccgcctac      300
atggagctga gcagcctgcg gagcgaagac accgccgtgt actactgcgc caggggctac      360

ggctactacg tcttcgacca ttggggacag ggcaccctcg tgacagtgtc cagctccggc      420
ggaggaggag atatccagat gaccagagc ccttcagcc tgtccgttc cgtgggagat      480
cgggtgacca tcacatgcag gacctccagg tccatctccc agtacctggc ctggtaccaa      540
cagaagcccc gcaaggtgcc caagctgctg atctacagcg gcagcacact gcaatccggc      600
gtcccttccc ggttttccgg atccggatcc ggcaccgact tcacctgac catcagctcc      660
ctgcaaccgg aggacgtggc cacctactac tgtcagcagc acaacgagaa cccctcacc      720
tttggcggcg gaaccaaggt cgagatcaag ggcggctgc      759

```

<210> 79

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 79

```

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gly Gly Ser
  1           5           10           15
Ser Gly Gly Gly Ser Gly
          20

```

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 80

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu

1	5	10	15
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
20	25	30	
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
35	40	45	
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
50	55	60	
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
65	70	75	80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 81

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antigen binding construct or fragment thereof

<400> 81

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

85

90

95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100

105