

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0066090

(43) 공개일자 2022년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)*G01N 33/573* (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/40 (2013.01)*G01N 33/573* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7011620

(22) 출원일자(국제) 2020년09월23일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년04월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US2020/052121

(87) 국제공개번호 WO 2021/061708

국제공개일자 2021년04월01일

(30) 우선권주장

62/904,272 2019년09월23일 미국(US)

(71) 출원인

더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아

미국, 19104 펜실베이니아주, 필라델피아, 9층, 씨빅 센터 빌리바드 3600

(72) 발명자

푸레 엘렌

미국, 펜실베이니아 19010, 브린 마, 710 코너스톤 레인

토드 레슬리

미국, 펜실베이니아 19428, 콘쇼호켄, 529 파머 로드

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **마우스 및 인간 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)과 교차 반응하는 개과 섬유아세포 활성화 단백질에 대한 모노클로날 항체****(57) 요약**

본 발명은 개과, 마우스 및 인간 FAP와 교차 반응할 수 있는 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적인 항체, 결합 폴리펩티드 및 scFv에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/57492 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

G01N 2333/948 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 및 개과(canine)의 에피토프(epitope), 및/또는 뮤린 섬유아세포 활성화 단백질(murine fibroblast activation protein; FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인(antigen-binding domain)을 포함하는, 단리된 결합 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항원-결합 도메인이

(a) 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EIPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및

(b) 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역

을 포함하는, 결합 폴리펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 결합 폴리펩티드가

(a) 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 결합하고/하거나;

(b) 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고/하거나;

(c) 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고/하거나;

(d) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고/하거나;

(e) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역으로 이루어지고/지거나;

(f) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고/하거나;

(g) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고/하거나;

(h) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로 이루어지는, 결합 폴리펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 상기 항원-결합 단편이 Fab, 일본쇄(single-chain) 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나;

(b) 상기 항원-결합 단편이 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 항체는 전장(full-length) 항체이고/이거나;

(c) 상기 항원-결합 단편이 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 결합 폴리펩티드.

청구항 5

(a) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 결합 폴리펩티드.

청구항 6

인간 및 개과의 에피토프 및/또는 무린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는, 일본쇄 가변 단편(scFv).

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 항원-결합 도메인이

(a) 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EIPANGDHNHFSEKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및

(b) 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역

을 포함하고,

여기서, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 링커(linker)에 의해 분리되어 있는, scFv.

청구항 8

일본쇄 가변 단편(scFv)으로서,

(a) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

(b) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

여기서, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있고, 임의로 상기 링커는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 일본쇄 가변 단편(scFv).

청구항 9

일본쇄 가변 단편(scFv)으로서,

(a) 서열번호 11 또는 13에 기재된 아미노산 서열을 포함하거나;

(b) 서열번호 11 또는 13에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는, 일본쇄 가변 단편(scFv).

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 결합 폴리펩티드 또는 scFv를 코딩하는(encoding) 단리된 핵산.

청구항 11

인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 무린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 항원-결합 도메인이

(a) 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)을 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EIPANGDHNHFSEKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)을 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및

(b) 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열

QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역
을 포함하는, 핵산.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

- (a) 상기 결합 폴리펩티드가 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 임의로 상기 항체는 전장 항체이고/이거나;
- (b) 상기 항원-결합 단편이 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나;
- (c) 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 인간화 항체 또는 이의 단편인, 핵산.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 8에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩되고/되거나;
- (b) 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩되고/되거나;
- (c) 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 핵산에 의해 코딩되고/되거나;
- (d) 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 10에 기재된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩되고/되거나;
- (e) 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩되고/되거나;
- (f) 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 핵산에 의해 코딩되는, 핵산.

청구항 15

- (a) 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 경쇄 가변 영역
을 포함하는 결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 16

단리된 핵산으로서,

- (a) (i) 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)을 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EIPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFWYFDV(서열번호 3)을 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및
- (ii) 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역
을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하거나;
- (b) (i) 서열번호 8에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- (ii) 서열번호 10에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하고, 여기서 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있고, 임의로 상기 링커는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하고/하거나,

(c) 서열번호 12 또는 14에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하고/하거나;

(d) 서열번호 12 또는 14에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는, 단리된 핵산.

청구항 17

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항의 단리된 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서,

(a) 상기 벡터가 발현 벡터이고/이거나;

(b) 상기 벡터가 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 벡터.

청구항 19

숙주 세포로서,

(a) 제17항 또는 제18항의 벡터를 포함하고/하거나;

(b) 상기 숙주 세포가 진핵생물 또는 원핵생물 기원의 것이고/이거나;

(c) 상기 숙주 세포가 포유동물 기원의 것이고/이거나;

(d) 상기 숙주 세포가 세균 기원의 것인, 숙주 세포.

청구항 20

제19항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, FAP에 결합하는 결합 폴리펩티드 또는 scFv를 생산하는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 결합 폴리펩티드 또는 scFv를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 22

섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 대한 입양 세포 요법(adoptive cell therapy)에 적합한 대상체(subject)를 확인하는 방법으로서, 상기 방법은

(a) 대상체로부터 병변 조직(diseased tissue)을 단리하는 단계;

(b) 단리된 조직을 FAP에 특이적으로 결합하는 결합 폴리펩티드와 접촉시키는 단계; 및

(c) 단리된 조직 중의 FAP-발현 세포를 검출하는 단계를 포함하고,

이에 의해, 입양 세포 요법에 적합한 대상체를 확인하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 결합 폴리펩티드가

(a) 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH (서열번호 1)을 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)을 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및

(b) 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSVSYMY

(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함하는, 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서,

- (a) 상기 결합 폴리펩티드가 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고/하거나;
- (b) 상기 항원-결합 단편이 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv) 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 임의로 상기 항체는 전장 항체이고/이거나;
- (c) 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고/이거나;
- (d) 상기 결합 폴리펩티드가 치료 분자 또는 진단 분자에 접합되고/되거나;
- (e) 상기 결합 폴리펩티드가 진단 분자에 접합되고, 여기서 상기 진단 분자는 검출 가능한 표지(detectable label)를 포함하고/하거나;
- (f) 상기 결합 폴리펩티드가 진단 분자에 접합되고, 여기서 상기 진단 분자는 검출 가능한 표지를 포함하고, 추가로 상기 검출 가능한 표지는 방사성표지, 형광단, 효소, 합텐(hapten), 비오틴(biotin) 또는 발색단인, 방법.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 적합한 대상체로서 확인된 후에 상기 대상체는 입양 세포 요법을 실시(administering)하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,

- (a) 상기 입양 세포 요법이 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함하고/하거나;
- (b) 상기 입양 세포 요법이 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함하고, 여기서 상기 면역 세포는 T 림프구이고/이거나;
- (c) 상기 입양 세포 요법이 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함하고, 여기서 상기 면역 세포는 NK 세포이고/이거나;
- (d) 상기 입양 세포 요법이 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함하고, 여기서 상기 CAR은 FAP에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 폴리펩티드가

- (a) 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고/하거나;
- (b) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고/하거나;
- (c) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역으로 이루어지고/되거나;
- (d) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고/하거나;
- (e) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고/하거나;
- (f) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로 이루어지는, 방법.

청구항 28

이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

상기 대상체에게

- (a) 서열번호 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
 - (b) 서열번호 9와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,

- (a) 상기 암이 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)-발현 세포와 연관되어 있고/있거나;
- (b) 상기 FAP-발현 세포가 암-연관 세포(cancer-associated cell)이고/있거나;
- (c) 상기 FAP-발현 세포가 암-연관 세포이고, 여기서 상기 암-연관 세포는 암-연관 섬유아세포(CAF)이고/있거나;
- (d) 상기 FAP-발현 세포가 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 FAP-발현 지방세포이고/있거나;
- (e) 상기 FAP-발현 세포가 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 종양-연관 마크로파지(TAM)이고/있거나;
- (f) 상기 FAP-발현 세포가 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 종양-연관 호중구(TAN)이고/있거나;
- (g) 상기 FAP-발현 세포가 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 골수-유래 억제 세포(MDS C)이고/있거나;
- (h) 상기 FAP-발현 세포가 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 암-개시 세포인, 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서,

- (a) 상기 결합 폴리펩티드가 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하고/하거나;
- (b) 상기 결합 폴리펩티드가 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고/하거나;
- (c) 상기 항원-결합 단편이 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 임의로 상기 항체는 전장 항체이고/있거나;
- (d) 상기 항체 또는 항원-결합 단편이 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 방법.

청구항 31

이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

- (a) 대상체를 적합한 대상체로서 확인하는 단계로서, 상기 확인은
 - (i) 대상체로부터 병변 조직을 단리하고;
 - (ii) 상기 단리된 조직을 FAP에 특이적으로 결합하는 결합 폴리펩티드와 접촉시키고;
 - (iii) 상기 단리된 조직 중의 FAP-발현 세포를 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및
- (b) 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 T 세포를 포함하는 입양 세포 요법을 적합한 대상체에게 실시하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은, 35 U.S.C. § 119(e)하에, 2019년 9월 23일에 출원된 미국 가특허출원 제62/904,272호에 대한 우선권을 갖고, 이는 참조에 의해 그 전체가 본 명세서에 도입된다.

[0003] 연방정부가 후원하는 연구 및 개발에 관한 진술

[0004] 이 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 수여된 조성금 번호 CA172921하에 정부 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 일정의 권리를 갖고 있다.

배경 기술

[0005] 종양은 형질전환된 세포 및 다수의 비형질전환 세포를 포함하는 불균일한 세포 모집단으로 구성된다. 상이한 세포 유형의 유병률은 종양 사이 및 종양 진행의 상이한 단계에서 상이하지만, 이들에는 침윤성 염증 세포 및 면역 세포, 내피 세포, 중간엽-유래 평활근 세포, 혈관주위 세포 및 종양-관련 섬유아세포(TAF)가 포함되고, 이는 본 명세서에서 집합적으로 간질 세포로서 지칭한다. TAF는 표현형적으로 정상 섬유아세포와 구별될 수 있는 불균일 모집단이다. 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)은 종양, 육아 조직 및 섬유성 병변에서 반응성 섬유아세포의 마커로서 부상했다.

[0006] FAP는, 포스트프롤린 디펩티딜 아미노펩티다제 계열에 속하는 유형 II 막관통 세포 표면 단백질이고, 디펩티딜 펩티다제 IV(DPPIV/CD26)와 가장 높은 유사성을 공유한다. FAP는 검사된 인간 상피암의 90% 이상에서 TAF 및 혈관주위 세포에 의해 선택적으로 발현된다. 이는 또한, 배아의 발달 동안, 치유 중의 창상의 조직, 간경변 및 특발성 폐 섬유증 등의 만성 염증성 및 섬유성 병태, 게다가 골 및 연조직 육종 및 일부 흑색종에서 발현된다. 그러나, FAP의 발현은 양성 병변 또는 정상 성인 조직에서 검출되지 않는 반면, DPPIV는 다양한 세포 유형에서 보다 광범위하게 발현된다. 시험관내 연구는, FAP가 젤라틴 및 유형 I 콜라겐을 분해할 수 있는 콜라겐 분해 활성을 포함하여 디펩티딜 펩티다제 및 엔도펩티다제 활성을 모두 갖는 것을 나타냈지만, 이는 생체내 기질이 아직 정의되지 않았다.

[0007] 개과, 마우스 및 인간 섬유아세포 활성화 단백질과 교차 반응할 수 있는 항체의 개발이 당해 기술분야에 필요하다. 본 발명은 이러한 필요성에 대처한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0008] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명은 개과, 마우스 및 인간 FAP와 교차 반응할 수 있는 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적인 항체, 결합 폴리펩티드 및 scFv에 관한 것이다.

[0009] 일 태양에서, 본 발명은, 인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 무린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는, 단리된 결합 폴리펩티드를 제공한다.

[0010] 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은, 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0011] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는, (a) 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 결합하고/하거나; (b) 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고/하거나; (c) 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적

어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고/하거나; (d) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고/하거나; (e) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역으로 이루어지고/지거나; (f) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고/하거나; (g) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고/하거나; (h) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로 이루어진다.

[0012] 특정 실시형태에서, (a) 상기 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나; (b) 상기 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 항체는 전장 항체이고/이거나; (c) 상기 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0013] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 결합 폴리펩티드를 제공한다.

[0014] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 인간 및 개과의 에피토프 및/또는 무린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는, 일본쇄 가변 단편(scFv)을 제공한다.

[0015] 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은, 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EIPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWFYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSVSYSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있다.

[0016] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있고, 임의로 상기 링커는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 일본쇄 가변 단편(scFv)을 제공한다.

[0017] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 서열번호 11 또는 13에 기재된 아미노산 서열을 포함하거나; 서열번호 11 또는 13에 기재된 아미노산 서열로 이루어지는, 일본쇄 가변 단편(scFv)을 제공한다.

[0018] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 명세서에서 고려되는 임의의 결합 폴리펩티드 또는 임의의 scFv를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0019] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 무린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0020] 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은, 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EIPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWFYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSVSYSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0021] 특정 실시형태에서, (a) 상기 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 임의로 상기 항체는 전장 항체이고/이거나; (b) 상기 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나; (c) 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 단편이다.

[0022] 특정 실시형태에서, (a) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 8에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩되고/되거나; (b) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩되고/되거나; (c) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 핵산에 의해 코딩되고/되거나; (d) 상

기 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩되고/되거나; (e) 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩되고/되거나; (f) 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어진 핵산에 의해 코딩된다.

[0023] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0024] 또 다른 태양에서, 본 발명은, (a) 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 E1NPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하거나; (b) 서열번호 8에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 10에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있고, 임의로 상기 링커는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하고/하거나, (c) 서열번호 12 또는 14에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하고/하거나; (d) 서열번호 12 또는 14에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어진 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는, 단리된 핵산을 제공한다.

[0025] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 명세서에서 고려되는 임의의 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0026] 특정 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터이고/이거나; 벡터는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0027] 또 다른 태양에서, 본 발명은, (a) 본 명세서에서 고려되는 임의의 벡터를 포함하고/하거나; (b) 상기 숙주 세포가 진핵생물 또는 원핵생물 기원의 것이고/이거나; (c) 상기 숙주 세포가 포유동물 기원의 것이고/이거나; (d) 상기 숙주 세포가 세균 기원의 것인, 숙주 세포를 제공한다.

[0028] 또 다른 태양에서, 본 발명은 FAP에 결합하는 결합 폴리펩티드 또는 scFv를 생산하는 방법을 제공한다. 이 방법은 본 명세서에서 고려되는 임의의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0029] 또 다른 태양에서, 본 발명은 임의의 결합 폴리펩티드 또는 본 명세서에서 고려되는 임의의 scFv를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0030] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 대한 입양 세포 요법에 적합한 대상체를 확인하는 방법을 제공한다. 이 방법은 (a) 대상체로부터 병변 조직을 단리하는 단계; (b) 단리된 조직을 FAP에 특이적으로 결합하는 결합 폴리펩티드와 접촉시키는 단계; 및 (c) 단리된 조직 중의 FAP-발현 세포를 검출하는 단계를 포함하고, 이에 의해 입양 세포 요법에 적합한 대상체를 확인한다.

[0031] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는, 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 E1NPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0032] 특정 실시형태에서, (a) 상기 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고/하거나; (b) 상기 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv) 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 임의로 상기 항체는 진장 항체이고/이거나; (c) 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이고/이거나; (d) 상기 결합 폴리펩티드는 치료 분자 또는 진단 분자에 접합되고/되거나; (e) 상기 결합 폴리펩티드는 진단 분자에 접합되고, 여기서 상기 진단 분자는 검출 가능한 표지를 포함하고/하거나; (f) 상기 결합 폴리펩티드는 진단 분자에 접합되고, 여기서 상기 진단 분자는 검출 가능한 표지를 포함하고, 추가로 상기

검출 가능한 표지는 방사성표지, 형광단, 효소, 합텐, 비오틴 또는 발색단이다.

- [0033] 특정 실시형태에서, 대상체가 적합한 대상체로서 확인된 후에 대상체에게 입양 세포 요법을 실시한다.
- [0034] 특정 실시형태에서, (a) 상기 입양 세포 요법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함하고/하거나; (b) 상기 입양 세포 요법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함하고, 여기서 상기 면역 세포는 T 림프구이고/이거나; (c) 상기 입양 세포 요법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함하고, 여기서 상기 면역 세포는 NK 세포이고/이거나; (d) 상기 입양 세포 요법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함하고, 여기서 상기 CAR은 FAP에 특이적으로 결합한다.
- [0035] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는, (a) 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고/하거나; (b) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고/하거나; (c) 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역으로 이루어지고/지거나; (d) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고/하거나; (e) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고/하거나; (f) 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로 이루어진다.
- [0036] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 서열번호 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 9와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0037] 특정 실시형태에서, (a) 상기 암은 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)-발현 세포와 연관되어 있고/있거나; (b) 상기 FAP-발현 세포는 암-연관 세포이고/이거나; (c) 상기 FAP-발현 세포는 암-연관 세포이고, 여기서 상기 암-연관 세포는 암-연관 섬유아세포(CAF)이고/이거나; (d) 상기 FAP-발현 세포는 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 FAP-발현 지방세포이고/이거나; (e) 상기 FAP-발현 세포는 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 종양-연관 마크로파지(TAM)이고/이거나; (f) 상기 FAP-발현 세포는 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 종양-연관 호중구(TAN)이고/이거나; (g) 상기 FAP-발현 세포는 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 골수-유래 억제 세포(MDSC)이고/이거나; (h) 상기 FAP-발현 세포는 암-연관 세포이고, 여기서 상기 FAP-발현 암-연관 세포는 암-개시 세포이다.
- [0038] 특정 실시형태에서, (a) 상기 결합 폴리펩티드는 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하고/하거나; (b) 상기 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고/하거나; (c) 상기 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 임의로 상기 항체는 전장 항체이고/이거나; (d) 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0039] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, (a) 대상체를 적합한 대상체로서 확인하는 단계로서, 상기 확인은 (i) 대상체로부터 병변 조직을 단리하고; (ii) 상기 단리된 조직을 FAP에 특이적으로 결합하는 결합 폴리펩티드와 접촉시키고; (iii) 상기 단리된 조직 중의 FAP-발현 세포를 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 T 세포를 포함하는 입양 세포 요법을 적합한 대상체에게 실시하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 본 발명의 바람직한 실시형태의 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때에 더 잘 이해될 것이다. 본 발명을 설명할 목적으로, 현재 바람직한 실시형태가 도면에 도시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 도시된 실시형태의 정확한 배치 및 수단으로 한정되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

도 1은 NCBI 데이터베이스(XM_005640252.2)에 수록된 개과 FAP 유전자 서열과, NCBI 서열을 사용하여 생성된 2개의 프라이머를 사용한 개과 FAP 유전자의 PCR 증폭 산물 사이의 서열 정렬이다. 뉴클레오타이드 수준에서, 생성물은 T127 및 A603에서 2개의 보존적 염기쌍 치환을 보유했다(박스화된 잔기, 좌측; 삽입 서열, 우측).

도 2A-2C는 재조합 개과 FAP-발현 세포의 생성을 예시하는 벡터 맵 및 그래프이다. 개과 FAP PCR 산물을 진핵생

물 발현 플라스미드(pcDNA3.1)에 클로닝하고(도 2A), 이어서 렌티바이러스 플라스미드(pLenti6/v5-D-TOPO)에 서브클로닝했다(도 2B). 렌티바이러스 플라스미드를 패키징 플라스미드로 HEK293 세포에 형질감염시켰고, 이를 사용하여 바이러스 함유 상청액을 생성했다. 수득된 바이러스 입자 함유 상청액을 사용하여, BALB/c 3T3 세포를 형질도입했다. 재조합 개과 FAP의 발현은 양 항-인간 FAP 항체를 사용하여 유세포 분석에 의해 확인했다(도 2C).

도 3은 항-FAP 항체 생성 하이브리도마 세포의 생성을 입증하는 유세포 분석 플롯이다. 개과 FAP 형질도입된 BALB/c 3T3 세포를 사용하여, 14주령 BALB/c 마우스를 면역화시켰다. 비장세포를 sp2/0 세포에 융합하고, 수득된 하이브리도마를 PKH-표지된 MC KOSA 양친(FAP null) 세포 및 개과 FAP-도입유전자 MC KOSA.K9FAP 세포에 대해 스크리닝했다. 1차 염색은 하이브리도마 생산 항체에 의해 제공되었다. 염소 항-마우스 IgG 2차 항체를 사용하여 2차 염색을 수행하고, 이어서 유세포 분석을 통해 판독했다.

도 4A-4C는 새롭게 생성된 4G5 항-개과 FAP 항체의 동형의 특성화를 예시한다. 이 연구에서는 ELISA 기반 시판 동형분석 키트를 사용했다. 도 4A는 ELISA로부터의 비색 데이터를 나타낸다. 열은 각 열의 복제 웰을 나타낸다. 양성 반응은 A열과 G열에 존재한다. 도 4B는 열 A 및 G에서 유의한 양성 신호를 나타내는 ELISA 플레이트의 이미지이다. 도 4C는 4G5 항체가 IgG1 및 카파 동형 면역글로불린에 대해 양성인 것으로 시험되었음을 나타내는 연구의 플레이트 맵이다.

도 5는 4G5 항체 및 마우스 IgG1 동형 대조군 항체가 유사한 밴딩 패턴을 생성하는 것을 입증하는 단백질 겔을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

A. 정의

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료를 본 발명의 시험의 실시에 사용할 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 본 발명을 설명하고 청구할 때에 하기의 용어가 사용될 것이다.

본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 설명하는 것을 목적으로 하고, 한정하는 것을 의도하는 것이 아님을 이해해야 한다.

관사 "a" 및 "an"은 본 명세서에서는 관사의 문법적 목적어 중 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들면, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

양, 시간적 지속시간 등의 측정 가능한 값을 지칭할 때에 본 명세서에서 사용된 "약"은 지정된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$, 더욱 더 바람직하게는 $\pm 1\%$, 더욱 더 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포함하는 것을 의미하고, 이는 이러한 변동이 개시된 방법을 수행하기에 적절하기 때문이다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 유래하는 무손상 면역글로불린일 수 있고, 무손상 면역글로불린의 면역 반응성 부분일 수 있다. 항체는 통상 면역글로불린 분자의 사량체이다. 사량체는 천연에 존재하는 경우도 있거나, 일본쇄 항체 또는 항체 단편으로부터 재구성될 수 있다. 항체는 또한 천연에 존재하거나, 일본쇄 항체 또는 항체 단편으로부터 구성될 수 있는 이량체를 포함한다. 본 발명의 항체는, 예를 들면, 폴리클로날 항체, 모노클로날(monoclonal) 항체, Fv, Fab 및 F(ab')₂, 게다가 일본쇄 항체(scFv), 인간화 항체 및 인간 항체를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수 있다[참조: Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426].

용어 "항체 단편"은 무손상 항체의 일부를 지칭하고, 무손상 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 선형 항체, scFv 항체, 단일-도메인 항체, 예컨대, 표적에 대해 충분한 친화성을 나타내는 VL 또는 VH 도메인 중 어느 하나로 구성된 낙타류 항체[참조: Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38], 및 항체 단편으로 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 항체 단편은 또한, 인간 항체 또는 인간화 항체 또는 인간 항체 또는 인간화 항체의 일부

를 포함한다.

- [0048] 본 명세서에 사용된 "항체 중쇄"는 이들의 천연 존재 형태로 모든 항체 분자에 존재하는 2개 유형의 폴리펩티드 중의 더 큰 것을 지칭한다.
- [0049] 본 명세서에 사용된 "항체 경쇄"는 이의 천연 존재 형태로 모든 항체 분자에 존재하는 2개 유형의 폴리펩티드 중의 더 작은 것을 지칭한다. κ 및 λ 경쇄는 2개의 주요 항체 경쇄 동형을 나타낸다.
- [0050] 본원에 사용된 용어 "합성 항체"는, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 박테리오파지에 의해 발현되는 항체 등의 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 항체를 의미한다. 이 용어는 또한, 항체를 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되고, 그 DNA 분자가 항체 단백질, 또는 항체를 특정하는 아미노산 서열을 발현하는 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하고, 여기서 DNA 또는 아미노산 서열은, 이용 가능하고 당해 기술분야에 공지되어 있는 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 수득된다.
- [0051] 본 명세서에 사용된 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발하는 분자로서 정의된다. 이 면역 반응은 항체 생산, 또는 특정 면역학적-적격 세포의 활성화 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 숙련된 기술자는 사실상 모든 단백질 또는 펩티드를 포함하는 임의의 거대분자가 항원으로 작용할 수 있음을 이해할 것이다. 추가로, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래할 수 있다. 당업자는 면역 반응을 유발하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가, 따라서, 그 용어가 본 명세서에서 사용되는 "항원"을 코딩한다는 것을 이해할 것이다. 게다가, 당업자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 코딩될 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명이 하나 이상의 유전자의 부분 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하지만 이들로 한정되지 않는다는 것, 및 이러한 뉴클레오티드 서열이 다양한 조합으로 배열되어 목적하는 면역 반응을 유도한다는 것은 용이하게 명백하다. 추가로, 당업자는 항원이 "유전자"에 의해 전혀 코딩될 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 항원을 합성하여 생성할 수 있거나, 또는 생물학적 샘플로부터 유도할 수 있다는 것은 용이하게 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0052] 본 명세서에 사용된 용어 "항종양 효과"는 종양 용적의 감소, 종양 세포 수의 감소, 전이 수의 감소, 기대 수명의 증가, 또는 암 병태와 연관된 다양한 생리학적 증상의 개선에 의해 나타날 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항종양 효과"는 또한, 우선 종양의 발생을 예방하는 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체의 능력에 의해 나타날 수 있다.
- [0053] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "자가"는, 이후에 그 개체 내로 재도입되는 동일한 개체로부터 유래하는 임의의 재료를 지칭하는 것을 의미한다.
- [0054] "동종이계"는 동일한 종의 상이한 동물에서 유래하는 이식편을 지칭한다.
- [0055] "이종"은 상이한 종의 동물에서 유래하는 이식편을 지칭한다.
- [0056] 본 명세서에 사용된 용어 "암"은 비정상 세포의 급속하고 제어되지 않는 성장을 특징으로 하는 질환으로 정의된다. 암 세포는 국소적으로, 또는 혈류와 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 확산할 수 있다. 다양한 암의 예에는 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0057] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특성에 유의한 영향을 미치거나 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 보존적 변형에는 아미노산 치환, 부가 및 결실이 포함된다. 변형은 부위-특이적 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발 등의 당해 기술분야에 공지된 표준 기술에 의해 본 발명의 항체에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되어 있는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당해 기술분야에 정의되어 있다. 이러한 패밀리에는 염기성 측쇄(예: 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예: 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예: 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타 분지형 측쇄(예: 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예: 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산이 포함된다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 치환할 수 있고, 변경된 항체를 본 명세서에 기재된 기능적 검정을 사용하여 FAP에 결합하는 능력에 대해 시험할 수 있다.

- [0058] "공-자극 리간드"는, 본 명세서에 사용되는 용어로서, T 상의 동족 공-자극 분자에 특이적으로 결합하여, 예를 들면, TCR/CD3 복합체와 펩티드가 로딩된 MHC 분자의 결합에 의해 제공되는 1차 신호에 추가하여, 증식, 활성화, 분화 등을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공하는, 항원 기제 세포 상의 분자(예를 들면, aAPC, 수지상 세포, B 세포 등)를 포함한다. 공-자극 리간드는 CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공-자극 리간드(ICOS-L), 세포간 접착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림프독소 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, Toll 리간드 수용체에 결합하는 작용제 또는 수용체 및 B7-H3와 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 공-자극 리간드는 또한, 특히, T 세포에 존재하는 공-자극 분자, 예를 들면, 이들로 한정되지 않지만, CD27, CD28, 41BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.
- [0059] "공-자극 분자"는 공-자극 리간드와 특이적으로 결합하고, 이에 의해 T 세포에 의한 공-자극 반응, 예를 들면, 증식(이들로 한정되지 않음)을 매개하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공-자극 분자에는 MHC 클래스 I 분자, BTLA 및 Toll 리간드 수용체가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0060] FAP의 발현 또는 활성 수준의 문맥에서 사용되는 경우의 용어 "조절장애"는, 다른 점에서는 동일한 건강한 동물, 생물, 조직, 세포 또는 이의 성분에서 FAP의 발현 수준 또는 활성과는 상이한 발현 또는 활성 수준을 지칭한다. 또한, 용어 "조절장애"는, 다른 점에서는 동일한 건강한 동물, 생물, 조직, 세포 또는 이의 성분에서 조절과 비교하여 FAP의 발현 및 활성 수준의 변화된 조절을 지칭한다.
- [0061] "코딩"은 유전자, cDNA 또는 mRNA 등의 폴리뉴클레오타이드에서 뉴클레오타이드의 특정 서열의 고유 특성을 지칭하고, 뉴클레오타이드의 정의된 서열(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA) 또는 아미노산의 정의된 서열 중의 어느 하나 및 이로부터 생성되는 생물학적 특성을 갖는 생물학적 프로세스에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 작용한다. 따라서, 이의 유전자에 대응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 기타 생물학적 시스템에서 단백질을 생성하는 경우, 유전자는 단백질을 코딩한다. 뉴클레오타이드 서열이 mRNA 서열과 동일하고, 통상은 서열 목록에 제공되는 코딩 쇠 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비-코딩 가닥 모두는, 해당 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 기타 산물을 코딩하는 것으로 지칭될 수 있다.
- [0062] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열"은, 서로의 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 단백질 및 RNA를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에는 인트론이 포함될 수 있다.
- [0063] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 본 명세서에서 호환적으로 사용되고, 특정 생물학적 결과를 달성하는 데 효과적인 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물, 제형, 물질 또는 조성물의 양을 지칭한다. 이러한 결과는 당해 기술분야에 적합한 임의의 수단에 의해 결정되는 바이러스 감염의 억제를 포함할 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0064] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "내인성"은 생물, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 또는 그 내부에서 생성된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0065] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "외인성"은 생물, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 도입되거나, 그 외부에서 생성된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0066] 본 명세서에 사용된 용어 "발현"은 이의 프로모터에 의해 구동되는 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역으로서 정의된다.
- [0067] "발현 벡터"는 발현될 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현에 충분한 시스-작용 요소를 포함하고; 발현을 위한 기타 요소는 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 코스미드, 플라스미드(예: 네이키드 또는 리포솜에 함유됨) 및 재조합 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 바이러스(예: 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스) 등의 당해 기술분야에 공지된 모든 것을 포함한다.
- [0068] 본 명세서에 사용된 "상동성"은 2개의 중합체 분자 사이, 예를 들면, 2개의 DNA 분자 또는 2개의 RNA 분자 등의 2개의 핵산 분자 사이, 또는 2개의 폴리펩티드 분자 사이의 아단위 서열 동일성을 지칭한다. 2개 분자 모두의 아단위 위치가 동일한 단량체 아단위에 의해 점유되는 경우; 예를 들면, 2개의 DNA 분자 각각의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 이들은 그 위치에서 상동이다. 2개 서열 사이의 상동성은 일치하는 위치 또는 상동인

위치의 수의 직접적 함수이고; 예를 들면, 2개의 서열의 위치의 절반(예를 들면, 10개 아단위 길이의 중합체에서 5개의 위치)이 상동인 경우, 2개 서열은 50% 상동이고; 위치의 90%(예: 10개 중 9개)가 일치 또는 상동인 경우, 2개 서열은 90% 상동이다.

[0069] "인간화" 및 "키메라" 형태의 비인간(예: 무린) 항체는 면역글로불린, 면역글로불린 쇠, 또는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래하는 최소 서열을 함유하는 이의 단편(예: Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 기타 항원 결합 부분서열 등)이다. 대부분의 경우, 인간화 및 키메라 항체는 인간 면역글로불린(수용자 항체)이고, 여기서 수용자의 상보적 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 마우스, 랫트 또는 래빗 등의 비-인간 종(공여자 항체)의 CDR로부터의 잔기로 치환된다. 일부 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 대응하는 비-인간 잔기로 치환된다. 추가로, 인간화 및 키메라 항체는 수용자 항체나 이입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 추가로 개선하고 최적화하기 위해 수행된다. 일반적으로, 인간화 및 키메라 항체는 적어도 하나, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하고, 여기서 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 비-인간 면역글로불린의 영역에 상응하고, FR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 면역글로불린 서열의 영역이다. 인간화 및 키메라 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 부분을 포함하는 것이 최적이다. 세계 보건 기구(WHO)의 국제 일반명(INN) 전문가 그룹은 비인간 유래 항체가 "인간화"로 간주되기 위한 요건을 정의했다. 가이드라인에 따르면, 후보 항체와 인간 서열의 비교는 국제 면역유전학 정보 시스템(International Immunogenetics Information System®; IMGT®) DomainGapAlign 도구(www.imgt.org)를 통해 수행해야 한다. 이 도구는 항체 생식세포계 가변 영역 유전자의 IMGT® 데이터베이스를 문의하고, 여기서 정렬 스코어는 생식세포계 가변 영역 엑손에 대해서만 작성되고, 따라서 CDR3 및 J 영역의 일부가 분석으로부터 제외된다. 항체가 "인간화"되기 위해서는, "기타 종보다 인간에 더 근접한다"는 것 외에도, 상위 "히트(hit)"는 인간이어야 하고, 인간 서열에 대한 동일성이 적어도 85%이어야 하고, 그렇지 않은 경우, 항체는 "키메라"로 지정된다. 추가의 상세에 대해서는 문헌[참조: Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992]을 참조한다.

[0070] "완전한 인간"은 전체 분자가 인간 유래이거나, 또는 인간 형태의 항체와 동일한 아미노산 서열로 이루어지는 항체 등의 면역글로불린을 지칭한다.

[0071] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "설명 자료"는 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 전달하기 위해 사용될 수 있는 간행물, 기록, 도표, 또는 임의의 기타 표현 매체를 포함한다. 본 발명의 키트의 설명 자료는, 예를 들면, 본 발명의 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 포함하는 용기에 부착되거나, 또는 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기와 함께 출하될 수 있다. 또는, 설명 자료 및 화합물을 수령자가 공동으로 사용하는 것을 목적으로 하여, 설명 자료는 용기와 별도로 출하될 수 있다.

[0072] 본 명세서에 사용된 "동일성"은 2개의 중합체 분자, 특히 2개의 아미노산 분자, 예를 들면, 2개의 폴리펩티드 분자 사이의 아단위 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 아미노산 서열이 동일한 위치에 동일한 잔기를 갖는 경우; 예를 들면, 2개 폴리펩티드 분자 각각의 위치가 아르기닌에 의해 점유되어 있는 경우, 그들은 그 위치에서 동일하다. 2개의 아미노산 서열이 정렬의 동일한 위치에 동일한 잔기를 갖는 동일성 또는 정도는 종종 백분율로 표시된다. 2개 아미노산 서열 사이의 동일성은 정합하는 위치 또는 동일한 위치의 수의 직접적인 함수이고; 예를 들면, 2개 서열의 위치의 절반(예를 들면, 10개 아미노산 길이 중합체의 5개 위치)이 동일한 경우, 2개 서열은 50% 동일하고; 위치의 90%(예: 10개 중 9개)가 정합하거나 동일한 경우, 2개 아미노산 서열은 90% 동일하다.

[0073] "단리된"은 자연 상태에서부터 변화되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들면, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리"되지 않지만, 이의 자연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리"된다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 또는, 예를 들면, 숙주 세포 등의 비-천연 환경에 존재할 수 있다.

[0074] 본 발명의 문맥에서, 일반적으로 존재하는 핵산 염기에 대해 하기 약어가 사용된다. "A"는 아데노신, "C"는 시토신, "G"는 구아노신, "T"는 티미딘, "U"는 우리딘을 지칭한다.

[0075] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"은 서로의 축퇴 버전이고, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이라는 어구는 또한 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 포함할 수 있는 정도까지

인트론을 포함할 수 있다.

- [0076] 본 명세서에 사용된 "렌티바이러스"는 레트로비리대(Retroviridae) 과의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 비분열 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 레트로바이러스 중에서 독특하다. 이들은 숙주 세포의 DNA에 대량의 유전 정보를 전달할 수 있기 때문에, 유전자 전달 벡터의 가장 효율적 방법 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 예이다. 렌티바이러스에서 유래하는 벡터는 체 내에서 유의한 수준의 유전자 전달을 달성하는 수단을 제공한다.
- [0077] 용어 "작동가능하게 연결된"은 조절 서열과 이중 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭하고, 후자의 발현을 초래한다. 예를 들면, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계에 위치하는 경우, 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우, 프로모터는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 인접하고, 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하는 데 필요한 경우는 동일한 판독 프레임 내에 있다.
- [0078] 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는, 예를 들면, 피하(s.c.), 정맥내(i.v.), 근육내(i.m.), 또는 흉골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0079] 본 명세서에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 채로서 정의된다. 추가로, 핵산은 뉴클레오티드의 중합체이다. 따라서, 본 명세서에 사용된 핵산 및 폴리뉴클레오티드는 호환 가능하다. 당업자는 핵산이 폴리뉴클레오티드이고, 이를 가수분해하여 단량체의 "뉴클레오티드"로 할 수 있다는 일반 지식을 갖고 있다. 단량체 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 본 명세서에 사용된 폴리뉴클레오티드는 재조합 수단, 즉, 통상의 클로닝 기술 및 PCRTM 등을 사용하여 재조합 라이브러리 또는 세포 게놈으로부터 핵산 서열의 클로닝을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 당해 기술분야에서 이용 가능한 임의의 수단에 의해 및 합성 수단에 의해 수득되는 모든 핵산 서열을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.
- [0080] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 호환적으로 사용되고, 펩티드 결합에 의해 공유 결합된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 포함해야 하고, 단백질 또는 펩티드의 서열을 구성할 수 있는 아미노산의 최대 수에는 제한이 없다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 이 용어는, 예를 들면, 당해 기술분야에서 일반적으로 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로도 지칭되는 단쇄 및 당해 기술분야에서 일반적으로 다수 유형이 있는 단백질로서 지칭되는 장쇄 둘 다를 지칭한다. "폴리펩티드"는, 예를 들면, 생물학적으로 활성인 단편, 실질적으로 상동인 폴리펩티드, 올리고펩티드, 호모이량체, 헤테로이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질 등을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0081] 본 명세서에 사용된 용어 "프로모터"는 폴리뉴클레오티드 서열의 특이적 전사를 개시하는데 필요한 세포의 합성 기구에 의해 인식되거나, 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열로서 정의된다.
- [0082] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "프로모터/조절 서열"은 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자 산물의 발현에 필요한 핵산 서열을 의미한다. 일부 경우에, 이 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 다른 경우에, 이 서열은 또한 유전자 산물의 발현에 필요한 인핸서 서열 및 기타 조절 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절 서열은, 예를 들면, 조직 특이적 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.
- [0083] "구성적" 프로모터는 유전자 산물을 코딩 또는 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결된 경우에, 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건하에 유전자 산물을 세포 내에서 생성하도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0084] "유도성" 프로모터는 유전자 산물을 코딩 또는 특정하는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결된 경우, 프로모터에 대응하는 유도인자가 세포 내에 존재하는 경우에만, 실질적으로 세포 내에서 유전자 산물을 생성하도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0085] "조직 특이적" 프로모터는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결된 경우에, 유전자에 의해 코딩 또는 특정되는 경우, 세포가 프로모터에 대응하는 조직 유형의 세포인 경우에만, 실질적으로 세포 내에서 유전자 산물을 생성하도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0086] "신호 전달 경로"는 세포의 한 부분으로부터 세포의 또 다른 부분으로 신호를 전달하는 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자 사이의 생화학적 관계를 지칭한다. 문구 "세포 표면 수용체"는 세포의 원형질막을 횡단하여 신호

를 수신하고, 신호를 전달할 수 있는 분자 및 분자 복합체를 포함한다.

- [0087] "일본쇄 항체"는, 조작된 아미노산 스펠을 사용하여 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 단편이 서로 연결되어, 항체의 Fv 영역을 단일 폴리펩티드로서 재현하는 재조합 DNA 기술에 의해 형성된 항체를 지칭한다. 일본쇄 항체 항체를 생성하는 다양한 방법은 문헌[참조: 미국 특허 제4,694,778호; Bird (1988) Science 242:423-442; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Ward et al. (1989) Nature 334:54454; Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041]에 기재된 것들을 포함하여 공지되어 있다.
- [0088] 용어 "대상체"는 면역 반응을 유도할 수 있는 살아있는 생물(예를 들면, 포유동물)를 포함하는 것을 의도한다. 본원에 사용된 "대상체" 또는 "환자"는 인간 또는 비-인간 포유동물일 수 있다. 비인간 포유동물은, 예를 들면, 가축 및 애완동물, 예를 들면, 양, 소, 돼지, 개, 고양이 및 무린 포유동물을 포함한다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다.
- [0089] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "실질적으로 정제된" 세포는 다른 세포 유형을 실질적으로 포함하지 않는 세포이다. 실질적으로 정제된 세포는 또한, 이의 자연 발생 상태에서 통상 관련되어 있는 기타 세포 유형으로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 경우에, 실질적으로 정제된 세포의 모집단은 세포의 균질한 모집단을 지칭한다. 다른 경우에, 이 용어는 이들의 자연 상태에서 자연적으로 결합된 세포로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 세포는 시험관내에서 배양된다. 다른 실시형태에서, 세포는 시험관내에서 배양되지 않는다.
- [0090] 본 명세서에 사용된 용어 "치료적"은 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료 효과는 질환 상태의 억제, 관해 또는 근절에 의해 수득된다.
- [0091] 본 명세서에 사용된 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달 또는 도입되는 프로세스를 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포에는 1차 대상체 세포 및 이의 자손이 포함된다.
- [0092] 본원에 사용된 문구 "전사 조절하에" 또는 "작동적으로 연결된"는 프로모터가 RNA 폴리머라제에 의한 전사의 개시 및 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하기 위해 폴리뉴클레오타이드에 대하여 정확한 위치 및 배향에 있는 것을 의미한다.
- [0093] "벡터"는 단리된 핵산을 포함하고 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오타이드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다수의 벡터가 당해 기술분야에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "벡터"는 자가 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 이 용어는 또한, 예를 들면, 폴리리신 화합물, 리포솜 등의 핵산의 세포 내로의 전달을 촉진하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하지만 이들로 한정되지 않는다.
- [0094] 본 명세서에 사용된 용어 "특이적으로 결합한다"는, 샘플 내 존재하는 동족 결합 파트너(예: T 세포에 존재하는 자극 및/또는 공-자극 분자) 단백질을 인식하고 이에 결합하지만, 어느 항체 또는 리간드가 샘플 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항체 또는 리간드를 의미한다.
- [0095] 용어 "자극"은, 자극 분자(예: TCR/CD3 복합체)와 이의 동족 리간드의 결합에 의해 유도되는 1차 반응을 의미하고, 이에 의해 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달(이들로 한정되지 않음) 등의 신호 전달 이벤트를 매개한다. 자극은 TGF- β 의 하향조절 및/또는 세포골격 구조의 재구성 등의 특정 분자의 발현의 변화를 매개할 수 있다.
- [0096] 본원에 사용된 용어로서 "자극 분자"는 항원 기재 세포 및/또는 종양 세포 상에 존재하는 동족 자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 의미한다.
- [0097] 본 명세서에 사용된 "자극 리간드"는 항원 기재 세포(예를 들면, aAPC, 수지상 세포, B-세포 등) 또는 종양 세포 상에 존재하는 경우, T 세포 상의 동족 결합 파트너(본 명세서에서 "자극 분자"로 지칭됨)와 특이적으로 결합하고, 이에 의해 활성화, 면역 반응의 개시, 증식 등을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 T 세포에 의한 1차 반응을 매개하는 리간드를 의미한다. 자극 리간드는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 특히 펩티드가 로딩된 MHC 클래스 I 분자, 항-CD3 항체, 초작용제 항-CD28 항체 및 초작용제 항-CD2 항체를 포함한다.
- [0098] 범위: 본 개시 전체를 통해, 본 발명의 다양한 태양을 범위 형식으로 기재할 수 있다. 범위 형식의 설명은 단순히 편의 및 간결함을 위한 것이고, 본 발명의 범위에 대한 유연성 없는 제한으로서 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위에 대한 설명은 이의 범위 내의 개별 수치뿐만 아니라, 모든 가능한 하위 범위

를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들면, 1 내지 6 등의 범위의 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등의 하위 범위, 게다가 해당 범위 내의 개별 수치(예: 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6)를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0099] **B. 결합 폴리펩티드, 항체 및 scFv**

[0100] 본 발명의 결합 폴리펩티드 및 항체는 항체의 특정 기능적 특징 또는 특성을 특징으로 한다. 이러한 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 이중단 반응성으로 지칭될 수 있다. 예를 들면, 결합 폴리펩티드 및 항체는 개과 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하고, 또한 마우스 및 인간 FAP에 교차 반응한다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 폴리펩티드 및 항체는 개, 마우스 및 인간 FAP에 높은 친화성으로 결합한다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 폴리펩티드 및 항체는 세포 상에서 자연적으로 발현된 개과 FAP 단백질을 특이적으로 인식하고, 그 세포 상의 기타 표면 분자와 교차 반응하지 않는다.

[0101] 특정 태양에서, 본 발명은 인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 무인 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 제공한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0102] 특정 실시형태에서, 본 발명은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 제공한다. 특정 실시형태에서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EIPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDRSRFWYFDV(서열번호 3)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함한다.

[0103] 특정 태양에서, 본 발명은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하는 HCDR1을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 제공한다. 또한, 아미노산 서열 GYTITSYSLH(서열번호 17)를 포함하는 HCDR1을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다. 또한, 아미노산 서열 EIPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하는 HCDR2를 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다. 또한, 아미노산 서열 LDRSRFWYFDV(서열번호 3)를 포함하는 HCDR3을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다. 또한, 아미노산 서열 TRLDLDRSRFWYFDV(서열번호 19)를 포함하는 HCDR3을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다. 또한, 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하는 LCDR1을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다. 또한, 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하는 LCDR2를 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다. 또한, 아미노산 서열 LTSNLAS(서열번호 20)를 포함하는 LCDR2를 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다. 또한, 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함하는 LCDR3을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.

[0104] 특정 실시형태에서, 본 발명은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EIPANGDHNFSKFEIKAT(서열번호 18)을 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 TRLDLDRSRFWYFDV(서열번호 19)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함한다.

[0105] 특정 태양에서, 본 발명은 아미노산 서열 GYTITSYSLH(서열번호 17)를 포함하는 HCDR1, 아미노산 서열 EIPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하는 HCDR2, 아미노산 서열 LDRSRFWYFDV(서열번호 3)을 포함하는 HCDR3, 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하는 LCDR1, 아미노산 서열 LTSNLAS(서열번호 20)를 포함하는 LCDR2, 및 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 제공한다.

[0106] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 중 임의의 것을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 제공한다. 특정 실시형태에서, 단리된 결합 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 바와 같은 3개의 경쇄 상보성 결정 영역, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 중 임의의 것을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 단리된 결합 폴리펩티드는

본 명세서에 기재된 바와 같은 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 임의의 조합을 포함한다. 당업자는 본 명세서에 제공된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 고려하여 아미노산 넘버링에 기초하여 관련 상보성 결정 영역을 용이하게 결정할 수 있을 것이다.

- [0107] 상보성 결정 영역(CDR) 서열의 허용 가능한 변동은 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 17, 18, 19 또는 20에 기재된 임의의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 상보성 결정 영역(HCDR 또는 LCDR)을 포함한다.
- [0108] 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 결합한다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 추가 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다. 또 다른 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 마우스 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0109] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역으로 이루어진다.
- [0110] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0111] 또한, 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드가 제공된다.
- [0112] 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 항체와 동일한 인간, 마우스 또는 개과 FAP 상의 에피토프에 결합하는 항체(즉, 개과 FAP에 대한 결합에 대해 본 발명의 임의의 항체와 교차-경쟁하는 능력을 갖는 항체)를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 교차-경쟁 연구를 위한 참조 항체는 본 명세서에 기재된 항체 중 하나(예를 들면, 4G5)일 수 있다. 예를 들면, 비아코어(Biacore) 분석, ELISA 검정 또는 유세포 분석을 사용하여, 본 발명의 항체와의 교차 경쟁을 입증할 수 있다. 예를 들면, 개과 FAP에 대한 4G5의 결합을 억제하는 시험 항체의 능력은 시험 항체가 개과, 마우스 및 인간 FAP에 대한 결합에 대해 4G5와 경쟁할 수 있음을 나타내고, 따라서 4G5와 동일한 FAP의 에피토프에 결합하는 것으로 간주된다.
- [0113] 본 발명의 항체는 변형된 항체를 조작하기 위한 출발 물질로서 본 명세서에 개시된 하나 이상의 VH 및/또는 VL 서열을 갖는 항체를 사용하여 제조할 수 있고, 변형된 항체는 출발 항체와 비교하여 변화된 특성을 가질 수 있다. 항체는 하나 이상의 가변 영역(즉, VH 및/또는 VL) 내, 예를 들면, 하나 이상의 CDR 영역 내 및/또는 하나 이상의 프레임워크 영역 내에서 하나 이상의 아미노산을 변형함으로써 조작될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 항체는, 예를 들면, 항체의 이펙터 기능(들)을 변경하기 위해, 불변 영역(들) 내의 잔기를 변형함으로써 조작될 수 있다.
- [0114] 또한, 인간 및/또는 개과 및/또는 무린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)이 제공된다.
- [0115] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "일본쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 VH:VL 헤테로이량체를 형성하기 위해 공유적으로 연결된 면역글로불린(예: 마우스 또는 인간)의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 영역의 융합 단백질이다. 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)는 직접 결합되거나, VH의 N-말단을 VL의 C-말단에 또는 VH의 C-말단을 VL의 N-말단에 연결하는 펩티드-코딩 링커에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, 항원-결합 도메인(예를 들면, FAP 결합 도메인)은 N-말단으로부터 C-말단까지의 구성, VH - 링커 - VL을 갖는 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 N-말단으로부터 C-말단으로의 구성, VL - 링커 - VH를 갖는 scFv를 포함한다. 당업자는 본 발명에서 사용하기 위한 적절한 구성을 선택할 수 있을 것이다.

- [0116] 링커는 통상 유연성을 위해 글리신이 풍부하고, 뿐만 아니라 용해도를 위해 세린 또는 트레오닌이 풍부하다. 링커는 세포의 항원-결합 도메인의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 연결할 수 있다. 링커의 비제한적 예는 문헌[참조: Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) and WO 2014/087010]에 개시되어 있고, 그 내용은 참조에 의해 그 전체가 본 명세서에 도입된다. (GS)_n, (GSGGS)_n(서열번호 21), (GGGS)_n(서열번호 22) 및 (GGGGS)_n(서열번호 23)(여기서, n은 적어도 1의 정수를 나타낸다) 등의 글리신 세린(GS) 링커를 포함하지만 이들로 한정되지 않는 다양한 링커 서열이 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예시적 링커 서열은 GSGG(서열번호 24), GSGGG(서열번호 25), GSGSG(서열번호 26), GSGGG(서열번호 27), GGGSG(서열번호 28), GSSSG(서열번호 29), GGGGS(서열번호 30), GGGSGGGSGGGGS(서열번호 15) 등을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 아미노산 서열을 포함한다. 당업자는 본 발명에 사용하기 위한 적절한 링커 서열을 선택할 수 있을 것이다. 일 실시형태에서, 본 발명의 scFv는 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하고, 여기서 VH 및 VL은 아미노산 서열 GGGSGGGSGGGGS(서열번호 15)을 갖는 링커 서열에 의해 분리되어 있고, 이는 핵산 서열 GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGT GGGTCGGTGGCGGCGATCT(서열번호 31)에 의해 코딩될 수 있다.
- [0117] 불변 영역의 제거 및 링커의 도입에도 불구하고, scFv 단백질은 원래 면역글로불린의 특이성을 유지한다. 일본 채 Fv 폴리펩티드 항체는 문헌[참조: Huston, et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)]에 기재된 바와 같이 VH- 및 VL-코딩 서열을 포함하는 핵산으로부터 발현시킬 수 있다. 또한, 문헌[참조: 미국 특허 제5,091,513호, 제5,132,405호 및 제4,956,778호; 및 미국 특허 공보 제20050196754호 및 제20050196754호]을 참조한다. 억제 활성을 갖는 길항적 scFv는 문헌[참조: Zhao et al., Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10:31-40)]에 기재되어 있다. 자극 활성을 갖는 작용적 scFv는 문헌[참조: Peter et al., J Biochem 2003 25278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66]에 기재되어 있다.
- [0118] 특정 태양에서, 본 발명은 인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 류린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 일본채 가변 단편(scFv)을 제공하고, 여기서 항원-결합 도메인은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0119] scFv의 특정 실시형태에서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNHFSEKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)을 포함하고/하거나, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함한다. 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있다.
- [0120] scFv의 특정 실시형태에서, HCDR1은 아미노산 서열 GYTITSYSLH(서열번호 17)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNHFSEKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)을 포함하고/하거나, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLAS(서열번호 20)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함한다. 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있다.
- [0121] 또한, 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 일본채 가변 단편(scFv)이 제공된다. 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있다.
- [0122] 또 다른 태양에서, 서열번호 11 또는 13에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 일본채 가변 단편(scFv)이 제공된다. 또 다른 태양에서, 서열번호 11 또는 13에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 일본채 가변 단편(scFv)이 제공된다.
- [0123] scFv 서열의 허용 가능한 변형은 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서 scFv는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 19 또는 20에 기재된 임의의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도

97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

표 1

아미노산 및 뉴클레오타이드 서열

서열 번호	명칭	아미노산/핵산 서열
1	4G5 HCDR1	YTITSYSLH
2	4G5 HCDR2	EINPANGDHNHSEKFEIK
3	4G5 HCDR3	LDSDRFHWYFDV
4	4G5 LCDR1	TASSSVSYMY
5	4G5 LCDR2	LTSNLA
6	4G5 LCDR3	QQWSGYPPIT
7	4G5 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTITSYSLHWVKQRPQGLEWIGEINPANGDHNHSEKFEIKATLTVDSSTAFMQLSRLTSEDSAVYYCTRLDDSRFHWYFDVWGAGTTVTVSS
8	4G5 VH	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAAGCTGTAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGGCGTCTGCTACACCATCACCAGCTACTCTCTGCACTGGGTGAAGCAGAGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTGCCAATGGTGATCATAAAGTTCAGTGAGAAGTTCGAGATCAAGGCCACACTGACTGTAGACAGCTCCTCCAACACAGCATTCATGCAACTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATTGGACGATAGTAGGTTCCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
9	4G5 VL	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCTASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIFLTSNLSASGVPARFSGRSGTSFSLTISSMEAEADAATYYCQQWSGYPPITFGSGTKLEIK
10	4G5 VL	CAAAATGTTCTCAGCAGTCTCCAGCGCTCATGTCTGCTTCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCACGATCCTCCCCAAACCTGGATTTTCTCACCTCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCCGTGGGTCTGGGACCTCTTCTCTCTCAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTTACCCACCCATCACATTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAA
11	4G5 scFv (VL>VH)	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCTASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIFLTSNLSASGVPARFSGRSGTSFSLTISSMEAEADAATYYCQQWSGYPPITFGSGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTITSYSLHWVKQRPQGLEWIGEINPANGDHNHSEKFEIKATLTVDSSTAFMQLSRLTSEDSAVYYCTRLDDSRFHWYFDVWGAGTTVTVSS
12	4G5 scFv (VL>VH)	CAAAATGTTCTCAGCAGTCTCCAGCGCTCATGTCTGCTTCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCACGATCCTCCCCAAACCTGGATTTTCTCACCTCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCCGTGGGTCTGGGACCTCTTCTCTCTCAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTTACCCACCCATCACATTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAAAGGTGGAGGTGGCAGCGGAGGAGTGGGTCCGGCGGTGGAGGAAGCCAGGTCCAAGTGCAGCCTGGGGCTGAAGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGGCGTCTGGCTACACCATCACCAGCTACTCTCTGCACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTGCCAATGTGATCATAAAGTTCAGTGAGAAGTTCGAGATCAAGGCCACACTGACTGTAGACAGCTCCTCAACACAGCATTCATGCAACTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATTGGACGATAGTAGGTTCCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
13	4G5 scFv (VH>VL)	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTITSYSLHWVKQRPQGLEWIGEINPANGDHNHSEKFEIKATLTVDSSTAFMQLSRLTSEDSAVYYCTRLDDSRFHWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQIVLTQSPALMSASPEKVTMTCTASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIFLTSNLSASGVPARFSGRSGTSFSLTISSMEAEADAATYYCQQWSGYPPITFGSGTKLEIK
14	4G5 scFv (VH>VL)	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAAGCTGTAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGGCGTCTGCTACACCATCACCAGCTACTCTCTGCACTGGGTGAAGCAGAGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTGCCAATGGTGATCATAAAGTTCAGTGAGAAGTTCGAGATCAAGGCCACACTGACTGTAGACAGCTCCTCAACACAGCATTCATGCAACTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATTGGACGATAGTAGGTTCCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
15	링커	GGGGSGGGSGGGGS

16	전장 개과 FAP	ATGAAGACGTGGTTAAAAATTGTATTTGGAGTTGCCACCTCTGCTGTGCTTGTATTTGGTGATGTGCATTGTCT TACGTCCTTCAAGAGTTTCATGACTCCGAAGGAGGTACAACAAGAGCACTCACACTGGAGGATATTTTAAATGGGAC ATTTACCTATAAAACATTTTTCCTCAAACTGGATTTTCAGGACAAGAATATCTTCATCAGTCTACAGATAATGATATA GTATATTACAATATTGAAACAGGAGAATCATATACCATTTTGAGTAATGCCACCATGAAAAGTGTGAATGCTTCAA ATTATGGCTTATCACCTGATCGTCAATTTGCATATCTAGAAAGTGATTATTCAAAGCTTTGGAGATACTCTTACAC TGCAACATATCACATCTATAACCTCAATAATGGAGAGTTTATAAGAAGAAATGAGCTTCCTCGTCCAATTCAGTAT TTATGCTGGTCGCGCTGTTGGGAGTAAATTAGCATATGTCTATCAAAACAATATCTATTTGAAACAAAGACCCAGAAG ACCCACCTTTTCAAATAACATATAATGGAAGAGAAAAATAATTCATGGAATCCAGACTGGGTATATGAAGA GGAAATGCTTGCTACAAAACATGCTCTCTGGTGGTCTCCTAATGGAATTTTGGCATATGCAGAATTTAATGAT ACAGAGATACCAGTTATTGCCTATTCTATTATGGTGATGAACAATATCCTAGAACAATAATATTCCATACCCAA AGGCTGGAGCTAAGAACCCTGTTGTTGGGATCTTTATTATCGATACCACTTATCCTCAGCAGACAGGTCCCAGAGA AGTGCCAGTTCCAGCAATGATAGCATCAAGTGATTATTATTCAGTTGGCTCATATGGGTTACTGATGAACGAGTA TGTTTGCAGTGGCTAAAAAGAATCCAGAACGTTTCAGTTCTGTCCATATGTGATTTTCAGGGAAGGCTGGCAGACAT GGGATTGTCCAAAGGCCAGGAACATATAGAAGAAAGCAGAACTGGATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCAACACC AGTTTTTCAGCTATGATGCCATTTCTACTACAAAAATATTAGCGACAAGGATGGCTACAAACATATTCATATATC AAAGACACTGTGAAAAATGCTATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAATATATTCAGAGTAACACAGG ATTCAGTGTATTATCTAGCAATGAATTTGAAGACTACCCAGGAAGAAGAAATATCTATAGAATTAGCATTTGGAAG CTCTCCTCCAAGCAAAAAGTGCATTACTTGCATCTAAGGAAAGAAAGGTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGT GACTACGCCAAGTACTATGCACTTATCTGCTATGGCCAGGCCCTCCCATTTCCACCTTCATGACGGCCCACTG ATCAAGAAATTAATATCCTGGAAGAAAAACAAGAATTGGAAATGCTTTGAAAAATATCCAGCTGCCTAAAGAGGA AATTAAGAACTTGAAGTGGATGATATTACTTTATGGTACAAGATGATGCTTCCTCCCGGTTTGACAGATCAAAAG AAGTATCCCTTGCTAATTCAGTGTATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGCGTAAAGTCTGTATTTCAGTATTAATTGGA TTTCTTATCTTGAAGTAAGGAAGGGATAGTCATTGCCTTGGTGGATGGCCGAGGAACAGCTTACCAAGGTGACAA ACTCCTGTATGCAGTATATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGTTGAGGACCAGATCAGAGCGTCAGAAAATTCATA GAAATGGGTTTCATTGATGAAAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCTATGGAGGCTATGTTTCATCACTGGCCC TTGCTTCAGGAACCTGCTTTTCAAATGTGGGATAGCAGTGGCTCCTGTCTCCAGCTGGGAATATTACGCATCTAT CTACACAGAACGATTTCATGGGCTCCCAACAAGAACGATAATCTCGAGCACTACAAAAATTCAGTGTGATGGCA AGAGCAGAAATATTCAGAAATGTAGACTATCTTCTCATCCAGGAACAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAAACT CAGCACAGATTGCTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGATTTCCAGGCAATGTGGTACTCTGACCAGAACCATGG CATACCCGGCTGTCTCGAAGCACTTATATACCCGATGACCACTTCTAAAGCAGTGTTTTCTTTGTCCGAC TGA
17	4G5 HCDR1	GYTITSYSLH
18	4G5 HCDR2	EINPANGDHNFSKFEIKAT
19	4G5 HCDR3	TRLDDSRFWYFDV
20	4G5 LCDR2	LTSNLAS

[0125] **C. 핵산 및 발현 벡터**

[0126] 본 개시는, 인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 무린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드(예를 들면, 항체 또는 이의 단편, 예를 들면, scFv)를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 본 개시의 핵산은 본 명세서에 개시된 결합 폴리펩티드, scFv, 또는 항체 중 어느 하나를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0127] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원-결합 도메인을 포함하고, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)을 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFWYFDV(서열번호 3)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 또한 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함한다.

[0128] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 GYTITSYSLH(서열번호 1)을 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및/또는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLAS(서열번호 20)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원-결합 도메인을 포함한다.

[0129] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIKAT(서열번호 18)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 TRLDDSRFWYFDV(서열번호 19)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및/또는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1

은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원-결합 도메인을 포함한다.

[0130] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 중 임의의 것을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항원-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3개의 경쇄 상보성 결정 영역, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 중 임의의 것을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 본 명세서에 기재된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 임의의 조합을 포함한다. 당업자는, 본 명세서에 제공된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 고려하여, 아미노산 넘버링에 기초하여 관련 상보성 결정 영역을 용이하게 결정할 수 있을 것이다.

[0131] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다. 특정 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 단편이다.

[0132] 또한, 인간 및 개과의 에피토프 및/또는 뮤린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 제공되고, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열번호 8에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다.

[0133] 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 핵산에 의해 코딩된다.

[0134] 특정 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 특정 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 특정 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 핵산에 의해 코딩된다.

[0135] 또한, 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다.

[0136] 또한, 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 특정 실시형태에서, HCDR1은 아미노산 서열 GYTITSYSLH(서열번호 17)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 E1NPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)을 포함하고/하거나, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 20)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함한다.

[0137] 특정 실시형태에서, 핵산은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 일본쇄 가변 단편을 코딩하고, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 E1NPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하고, 여기서 LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함한다.

[0138] 특정 실시형태에서, 핵산은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 일본쇄 가변 단편을 포함하고, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 GYTITSYSLH(서열번호 17)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 E1NPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 20)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포

함한다.

- [0139] 특정 실시형태에서, 핵산은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 일본쇄 가변 단편을 포함하고, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 E1NPANGDHNFSKFEIKAT(서열번호 18)을 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 TRLDSSRFHWYFDV(서열번호 19)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 일본쇄 가변 단편은 또한 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함한다.
- [0140] 특정 실시형태에서, 일본쇄 가변 단편을 포함하는 핵산은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 중 임의의 것을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 일본쇄 가변 단편은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3개의 경쇄 상보성 결정 영역, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 중 임의의 것을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 일본쇄 가변 단편은 본 명세서에 기재된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 임의의 조합을 포함한다. 당업자는, 본 명세서에 제공된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 고려하여, 아미노산 넘버링에 기초하여 관련 상보성 결정 영역을 용이하게 결정할 수 있을 것이다.
- [0141] 또한, 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 영역을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있다. 특정 실시형태에서, 링커는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0142] 또한, 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 단리된 핵산이 제공되고, 여기서 핵산은 서열번호 12 또는 14에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또한, 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 단리된 핵산이 제공되고, 여기서 핵산은 서열번호 12 또는 14에 기재된 폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.
- [0143] 핵산 서열의 허용 가능한 변이는 당업자에게 공지될 것이다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 핵산은 서열번호 8, 10, 12 또는 14에 기재된 뉴클레오타이드 서열 중 임의의 것에 대해 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0144] 특정 실시형태에서, 본 개시의 핵산은 제1 폴리뉴클레오타이드 서열 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 서열은 본 개시의 FAP-표적화 결합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 FAP-표적화 결합 폴리펩티드는 기타 치료제, 예를 들면, 제한 없이, 면역-종양 항체 요법 및 체크포인트 차단 등의 면역요법, 또는 CAR-T 세포 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 이러한 실시형태에서, 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 항암 항체, 체크포인트 차단 분자, 또는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0145] 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 링커에 의해 분리될 수 있다. 예를 들면, 특정 실시형태에서 scFv의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있다. 특정 실시형태에서, 링커는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 본 개시에서 사용하기 위한 링커는 다수의 단백질이 동일한 핵산 서열(예를 들면, 멀티시스트론 또는 바이시스트론 서열)에 의해 코딩되는 것을 가능하게 하고, 이는 별개의 단백질 성분으로 해리되는 폴리단백질로서 번역된다. 특정 실시형태에서, 핵산은 5' 방향으로부터 3' 방향으로 제1 폴리뉴클레오타이드 서열, 링커 및 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 핵산은 5' 방향으로부터 3' 방향으로 제2 폴리뉴클레오타이드 서열, 링커 및 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0146] 일부 실시형태에서, 링커는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "내부 리보솜 진입 부위" 또는 "IRES"는 단백질 코딩 영역의 개시 코돈(예컨대, ATG)에 대한 직접 내부 리보솜 진입을 촉진하고, 이에 의해 유전자의 캡-독립적 번역을 유도하는 요소를 지칭한다. 다양한 내부 리보솜 진입 부위는 당업자에게 공지되어 있고, 제한 없이, 바이러스 또는 세포 mRNA 공급원, 예를 들면, 번역글로블린 중쇄 결합 단백질(BiP)로부터 수득되는 IRES; 혈관 내피 성장 인자(VEGF); 섬유아세포 성장 인자 2; 인슐린 유사 성장 인자; 번역 개시 인자 eIF4G; 효모 전사 인자 TFIID 및 HAP4; 및 예를 들면, 카디오바이러스, 리노바이러스, 아프토바이러스, HCV, 프렌드 뮌 백혈병 바이러스(FrMLV) 및 몰로니 뮌 백혈병 바이러스

(MoMLV)로부터 수득할 수 있는 IRES을 포함한다. 당업자는 본 발명에서 사용하기에 적절한 IRES를 선택할 수 있을 것이다.

[0147] 일부 실시형태에서, 링커는 자가-절단 펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "자가-절단 펩티드" 또는 "2A 펩티드"는 복수의 단백질이 폴리단백질로서 코딩되는 것을 가능하게 하는 올리고펩티드를 지칭하고, 이는 번역시 구성 단백질로 해리한다. 용어 "자가 절단"의 사용은 단백질 분해 절단 반응을 의미하는 것을 의도하는 것은 아니다. 다양한 자가-절단 또는 2A 펩티드는 당업자에게 공지되어 있으며, 제한 없이, 피코나비리다에 바이러스 과의 구성원에서 발견되는 것들, 예를 들면, 구제역 바이러스(FMDV), 말비염 A 바이러스(ERAV0, Tosea asigna 바이러스(TaV), 돼지 테스코 바이러스-1(PTV-1); 텔일로바이러스 및 뇌심근염 바이러스 등의 카리오바이러스를 포함한다. FMDV, ERAV, PTV-1 및 TaV로부터 유래하는 2A 펩티드는 본 명세서에서 각각 "F2A", "E2A", "P2A", 및 "T2A" 지칭된다. 당업자는 본 발명에 사용하기 위한 적절한 자가-절단 펩티드를 선택할 수 있을 것이다.

[0148] 일부 실시형태에서, 링커는 푸린 절단 부위를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 푸린은, 트랜스-골지에 존재하고 단백질 전구체를 분비 전에 처리하는 편재적으로 발현되는 프로테아제이다. 푸린은 컨센서스 인식 서열의 COOH 말단에서 절단한다. 다양한 푸린 컨센서스 인식 서열(또는 "푸린 절단 부위")는 당업자에게 공지되어 있고, 제한 없이, Arg-X1-Lys-Arg(서열번호 32) 또는 Arg-X1-Arg-Arg(서열번호 33), X2-Arg-X1-X3-Arg(서열번호 34) 및 Arg-X1-X1-Arg(서열번호 35), 예컨대, Arg-Gln-Lys-Arg(서열번호 36)을 포함하고, 여기서 X1은 임의의 천연에 존재하는 아미노산이고, X2는 Lys 또는 Arg이고, X3은 Lys 또는 Arg이다. 당업자는 본 발명에 사용하기 위한 적절한 푸린 절단 부위를 선택할 수 있을 것이다.

[0149] 일부 실시형태에서, 링커는 푸린 절단 부위 및 2A 펩티드의 조합을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 예에는, 제한 없이, 푸린 절단 부위 및 F2A를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 링커, 푸린 절단 부위 및 E2A를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 링커, 푸린 절단 부위 및 P2A를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 링커, 푸린 절단 부위 및 T2A를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 링커를 포함한다. 당업자는 본 발명에 사용하기 위한 적절한 조합을 선택할 수 있을 것이다. 이러한 실시형태에서, 링커는 푸린 절단 부위와 2A 펩티드 사이에 스페이서 서열을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 2A 펩티드에 대한 5' 방향에 푸린 절단 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 푸린 절단 부위에 대한 5' 방향에 2A 펩티드를 포함한다. 다양한 스페이서 서열은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 제한 없이, (GS)_n, (GSGGS)_n(서열번호 21) 및 (GGGS)_n(서열번호 22) 등의 글리신 세린(GS) 스페이서를 포함하고, 여기서 n은 적어도 1의 정수를 나타낸다. 예시적 스페이서 서열은 GGSG(서열번호 24), GSGSG(서열번호 25), GSGSG(서열번호 26), GSGGG(서열번호 27), GGGSG(서열번호 28), GSSSG(서열번호 29) 등을 포함하지만 이들로 한정되지 않는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 당업자는 본 발명에 사용하기 위한 적절한 스페이서 서열을 선택할 수 있을 것이다.

[0150] 본 발명의 또 다른 태양은 본 명세서에 개시된 단리된 핵산 중 임의의 하나를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시형태에서, 벡터는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터이다.

[0151] 또한, 본 명세서에 개시된 벡터 또는 핵산 중 임의의 것을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 숙주 세포는 진핵생물, 원핵생물, 포유동물 또는 세균 기원일 수 있다. FAP에 결합하는 결합 폴리펩티드 또는 scFv를 생산하는 방법이 또한 본 명세서에 제공되고, 여기서 상기 방법은 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0152] 일부 실시형태에서, 본 개시의 핵산은 전사 조절 요소, 예를 들면, 프로모터 및 인핸서 등에 작동가능하게 연결될 수 있다. 적합한 프로모터 및 인핸서 요소는 당업자에게 공지되어 있다.

[0153] 특정 실시형태에서, 핵산은 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있다. 특정 실시형태에서, 프로모터는 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터이다.

[0154] 세균 세포에서의 발현의 경우, 적합한 프로모터에는 lacI, lacZ, T3, T7, gpt, 람다 P 및 trc가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다. 진핵생물 세포에서의 발현의 경우, 적합한 프로모터에는 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 유전자 프로모터 및 인핸서 요소; 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터; 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 프로모터; 초기 및 후기 SV40 프로모터; 레트로바이러스의 긴 말단 반복부에 존재하는 프로모터; 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터; 및 당해 기술분야에 공지된 조직 특이적 프로모터를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 가역적 유도성 프로모터를 포함하는 적합한 가역적 프로모터는 당해 기술분야에 공지되어 있다.

이러한 가역적 프로모터는 진핵생물 및 원핵생물 등의 다수의 생물로부터 단리 및 유래될 수 있다. 제2 생물, 예를 들면, 제1 원핵생물 및 제2 진핵생물, 제1 진핵생물 및 제2 원핵생물 등에서 사용하기 위한 제1 생물로부터 유래하는 가역적 프로모터의 변형은 당해 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 가역적 프로모터, 및 이러한 가역적 프로모터를 기반으로 하지만 추가 조절 단백질을 포함하는 시스템에는 알코올 조절 프로모터(예: 알코올 데하이드로게나제 I(alcA) 유전자 프로모터, 알코올 트랜스활성화제 단백질(A1cR)에 반응성인 프로모터 등), 테트라사이클린 조절 프로모터(예: TetActivators, TetON, TetOFF 등을 포함하는 프로모터 시스템), 스테로이드 조절 프로모터(예: 랫트 글루코코르티코이드 수용체 프로모터 시스템, 인간 에스트로겐 수용체 프로모터 시스템, 레티노이드 프로모터 시스템, 갑상선 프로모터 시스템, 엑디손 프로모터 시스템, 미페프리스톤 프로모터 시스템 등), 금속 조절 프로모터(예: 메탈로티오네인 프로모터 시스템 등), 병원-관련 조절 프로모터(예: 살리실산 조절 프로모터, 에틸렌 조절 프로모터, 벤조티아디아졸 조절 프로모터 등), 온도 조절 프로모터(예: 열 충격 유도성 프로모터(예: HSP-70, HSP-90, 대두 열충격 프로모터 등)), 광 조절 프로모터, 합성 유도성 프로모터 등을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0155] 일부 실시형태에서, 프로모터는 CD8 세포-특이적 프로모터, CD4 세포-특이적 프로모터, 호중구-특이적 프로모터 또는 NK-특이적 프로모터이다. 예를 들면, CD4 유전자 프로모터가 사용될 수 있다[참조: 예를 들면, Salmon et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:7739; and Marodon et al. (2003) Blood 101:3416]. 다른 예로서, CD8 유전자 프로모터가 사용될 수 있다. NK 세포 특이적 발현은 Ncr1(p46) 프로모터를 사용하여 달성할 수 있다 [참조: 예를 들면, Eckelhart et al. Blood (2011) 117:1565].

[0156] 효모 세포에서의 발현의 경우, 적합한 프로모터는 ADH1 프로모터, PGK1 프로모터, ENO 프로모터, PYK1 프로모터 등의 구성적 프로모터; 또는 GAL1 프로모터, GAL10 프로모터, ADH2 프로모터, PHOS 프로모터, CUP1 프로모터, GALT 프로모터, MET25 프로모터, MET3 프로모터, CYC1 프로모터, HIS3 프로모터, ADH1 프로모터, PGK 프로모터, GAPDH 프로모터, ADC1 프로모터, TRP1 프로모터, URA3 프로모터, LEU2 프로모터, ENO 프로모터, TP1 프로모터 및 AOX1(예를 들면, 피키아(Pichia)에서 사용하기 위한) 등의 조절 가능한 프로모터이다. 적절한 벡터 및 프로모터의 선택은 당해 분야의 당업자의 수준의 범위 내이다. 원핵생물 숙주 세포에서 사용하기에 적합한 프로모터에는 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라제 프로모터; trp 프로모터; lac 오페론 프로모터; 하이브리드 프로모터, 예를 들면, lac/tac 하이브리드 프로모터, tac/trc 하이브리드 프로모터, trp/lac 프로모터, T7/lac 프로모터; trc 프로모터; tac 프로모터 등; araBAD 프로모터; 생체내 조절 프로모터, 예를 들면, ssaG 프로모터 또는 관련 프로모터(예를 들면, 미국 특허 공보 제20040131637호 참조), pagC 프로모터[참조: Pulkkinen and Miller, J. Bacteriol. (1991) 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89(21): 10079-83], nirB 프로모터[참조: Harborne et al. Mol. Micro. (1992) 6:2805-2813] 등[참조: Dunstan et al., Infect. Immun. (1999) 67:5133-5141; McKelvie et al., Vaccine (2004) 22:3243-3255; and Chatfield et al., Biotechnol. (1992) 10:888-892]; sigma70 프로모터, 예를 들면, 컨센서스 sigma70 프로모터(예를 들면, GenBank 수탁 번호 AX798980, AX798961, and AX798183); 정지상 프로모터, 예를 들면, dps 프로모터, spv 프로모터 등; 병원성 섬 SPI-2로부터 유래하는 프로모터(예를 들면, W096/17951 참조); actA 프로모터[참조: 예를 들면, Shetron-Rama et al., Infect. Immun. (2002) 70:1087-1096]; rpsM 프로모터[참조: 예를 들면, Valdivia and Falkow Mol. Microbiol. (1996). 22:367]; tet 프로모터[참조: 예를 들면, Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), Topics in Molecular and Structural Biology, Protein--Nucleic Acid Interaction. Macmillan, London, UK, Vol. 10, pp. 143-162]; SP6 프로모터 [참조: 예를 들면, Melton et al., Nucl. Acids Res. (1984) 12:7035] 등을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 등의 원핵생물에 사용하기에 적합한 강력한 프로모터는 Trc, Tac, T5, T7 및 PLambda를 포함하지만 이들로 한정되지 않는다. 세균 숙주 세포에 사용하기 위한 오퍼레이터의 비제한적 예는 락토스 프로모터 오퍼레이터(LacI 억제인자 단백질은 락토스와 접촉하면 형태를 변화시키고, 이에 의해 Lad 억제인자 단백질이 오퍼레이터에 결합하는 것을 방지함), 트립토판 프로모터 오퍼레이터(트립토판과 복합체를 형성하는 경우, TrpR 억제인자 단백질은 오퍼레이터에 결합하는 형태를 갖고, 트립토판의 부재하에, TrpR 억제인자 단백질은 오퍼레이터에 결합하지 않는 형태를 갖는다), 및 tac 프로모터 오퍼레이터[참조: 예를 들면, deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1983) 80:21-25]를 포함한다.

[0157] 적합한 프로모터의 기타 예는 즉시 초기 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 서열을 포함한다. 이 프로모터 서열은 이에 작동적으로 연결된 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열의 높은 수준의 발현을 유도할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 기타 구성적 프로모터 서열을 또한 사용할 수 있고, 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 또는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 즉시 초기 프로모터,

라우스(Rous) 육종 바이러스 프로모터, EF-1 알파 프로모터, 뿐만 아니라 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터 등의 인간 유전자 프로모터를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 또한, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 한정되어서는 안 된다. 유도성 프로모터도 또한 본 발명의 일부로 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 이러한 발현이 바람직할 때에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 턴-온(turn on)하거나, 발현이 바람직하지 않을 때에 발현을 턴-오프(turn off)할 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예에는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0158] 일부 실시형태에서, 적합한 프로모터를 함유하는 유전자와 또는 작제물 또는 도입유전자는 유도성 시스템의 유도에 의해 비가역적으로 전환된다. 비가역적 스위치의 유도에 적합한 시스템은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 비가역적 스위치의 유도는 Cre-lox-매개 재조합을 사용할 수 있다[참조: 예를 들면, Fuhrmann-Benzakein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 28:e99, 이의 개시는 참조에 의해 본 명세서에 도입됨]. 당해 기술분야에 공지되어 있는 리코비나제, 엔도뉴클레아제, 리가제, 재조합 부위 등의 임의의 적합한 조합을 사용하여, 비가역적으로 스위치 가능한 프로모터를 생성할 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에서 기재된 부위-특이적 재조합을 실시하기 위한 방법, 메커니즘 및 요건은 비가역적으로 스위칭된 프로모터를 생성할 때에 사용되고, 당해 기술분야에 공지되어 있고[참조: 예를 들면, Grindley et al. Annual Review of Biochemistry (2006) 567-605; and Tropp, Molecular Biology (2012) (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, Mass.), 이의 개시는 참조에 의해 본 명세서에 도입된다.

[0159] 본 개시의 핵산은 발현 벡터 및/또는 클로닝 벡터 내에 존재할 수 있다. 발현 벡터는 선택 가능한 마커, 복제 기점 및 벡터의 복제 및/또는 유지를 제공하는 기타 특징을 포함할 수 있다. 적합한 발현 벡터는, 예를 들면, 플라스미드, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 다수의 적합한 벡터 및 프로모터는 당업자에게 공지되어 있고; 대상체 재조합 작제물을 생성하기 위한 다수가 상업적으로 이용 가능하다. 하기 벡터는 예로서 제공되고, 제한으로서 해석되어서는 안 된다: 세균: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a(Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 및 pRIT5(Pharmacia, Uppsala, Sweden). 진핵생물: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG(Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL(Pharmacia).

[0160] 발현 벡터는 일반적으로 이중 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 삽입을 제공하기 위해 프로모터 서열의 근처에 위치하는 편리한 제한 부위를 갖는다. 발현 숙주에서 작용하는 선택 가능한 마커가 존재할 수 있다. 적합한 발현 벡터는 바이러스 벡터(예를 들면, 백시니아 바이러스에 기초한 바이러스 벡터; 폴리오바이러스; 아데노바이러스 [참조: 예를 들면, Li et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1994) 35: 2543-2549; Borrás et al., Gene Ther. (1999) 6: 515-524; Li and Davidson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 7700-7704; Sakamoto et al., H. Gene Ther. (1999) 5: 1088-1097; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 and WO 95/00655]; 아데노-관련 바이러스[참조: 예를 들면, Ali et al., Hum. Gene Ther. (1998) 9: 81-86, Flannery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 6916-6921; Bennett et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (1997) 38: 2857-2863; Jomary et al., Gene Ther. (1997) 4:683 690, Rolling et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10: 641-648; Ali et al., Hum. Mol. Genet. (1996) 5: 591-594; Srivastava in WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63: 3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166: 154-165; and Flotte et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 10613-10617]; SV40; 헤르페스 심플렉스 바이러스; 인간 면역결핍 바이러스[참조: 예를 들면, Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 10319-23; Takahashi et al., J. Virol. (1999) 73: 7812-7816]; 레트로바이러스 벡터[참조: 예를 들면, 뮌헨 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스, 및 레트로바이러스, 예를 들면, 라우스 육종 바이러스, 하비 육종 바이러스, 조류 백혈병 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 골수증식성 육종 바이러스 및 유선 종양 바이러스로부터 유래된 벡터] 등을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0161] 사용에 적합한 추가 발현 벡터는, 예를 들면, 제한 없이, 렌티바이러스 벡터, 감마 레트로바이러스 벡터, 포말 형 바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 조작된 바이러스 벡터, 하이브리드 바이러스 벡터, 트랜스포존 매개 벡터 등이다. 바이러스 벡터 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY] 및 기타 바이러스학 및 분자생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티바이러스를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

- [0162] 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 생물에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택가능한 마커를 함유한다(예를 들면, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 제6,326,193호).
- [0163] 일부 실시형태에서, 발현 벡터(예를 들면, 렌티바이러스 벡터)를 사용하여 핵산을 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 따라서, 본 발명의 발현 벡터(예를 들면, 렌티바이러스 벡터)는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 발현 벡터(예를 들면, 렌티바이러스 벡터)는 그 안에 코딩된 폴리펩티드의 기능적 발현을 보조하는 추가 요소를 포함할 것이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터는 포유동물 프로모터를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 벡터는 신장 인자-1-알파 프로모터(EF-1 α 프로모터)를 추가로 포함한다. EF-1 α 프로모터의 사용은 하류 도입유전자의 발현 효율을 증가시킬 수 있다. 생리학 적 프로모터(예: EF-1 α 프로모터)는 통합 매개된 유전자독성을 유도할 가능성이 낮고, 줄기 세포를 형질전환하는 레트로바이러스 벡터의 능력을 무효화할 수 있다. 벡터(예를 들면, 렌티바이러스 벡터)에 사용하기에 적합한 다른 생리학 적 프로모터는 당업자에게 공지되어 있고, 본 발명의 벡터에 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터(예를 들면, 렌티바이러스 벡터)는 역가 및 유전자 발현을 개선할 수 있는 비-필수 시스 작용 서열을 추가로 포함한다. 비-필수 시스 작용 서열의 비제한적 예의 하나는 효율적 역전사 및 핵 이행에 중요한 중앙 폴리퓨린 관 및 중앙 종결 서열(cPPT/CTS)이다. 다른 비-필수 시스 작용 서열은 당업자에게 공지되어 있고, 본 발명의 벡터(예를 들면, 렌티바이러스 벡터)에 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터는 전사후 조절 요소를 추가로 포함한다. 전사후 조절 요소는 RNA 번역을 개선하고, 도입유전자 발현을 개선하고, RNA 전사물을 안정화시킬 수 있다. 전사후 조절 요소의 일례는 우드척 간염 바이러스의 전사후 조절 요소(WPRE)이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명을 위한 벡터는 WPRE 서열을 추가로 포함한다. 다양한 전사후 조절인자 요소가 당업자에게 공지되어 있고, 본 발명의 벡터(예를 들면, 렌티바이러스 벡터)에 포함될 수 있다. 본 발명의 벡터는 RNA 수송을 위한 rev 반응 요소(RRE), 패키징 서열 및 5' 및 3' 긴 말단 반복(LTR) 등의 추가 요소를 추가로 포함할 수 있다. 용어 "긴 말단 반복" 또는 "LTR"은 U3, R 및 U5 영역을 포함하는 레트로바이러스 DNA의 말단에 위치한 염기쌍의 도메인을 지칭한다. LTR은 일반적으로 레트로바이러스 유전자의 발현(예: 유전자 전사물의 촉진, 개시 및 폴리아데닐화) 및 바이러스 복제에 필요한 기능을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명의 벡터(예를 들면, 렌티바이러스 벡터)는 3' U3 결실된 LTR을 포함한다. 따라서, 본 발명의 벡터(예를 들면, 렌티바이러스 벡터)는 도입유전자의 기능적 발현의 효율성을 향상시키기 위해 본 명세서에 기재된 요소의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 벡터(예: 렌티바이러스 벡터)는 CAR을 코딩하는 핵산 이외에 WPRE 서열, cPPT 서열, RRE 서열, 5' LTR, 3' U3 결실된 LTR'을 포함할 수 있다.
- [0164] 본 발명의 벡터는 자가-불활성화 벡터일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "자가-불활성화 벡터"는 3' LTR 인핸서 프로모터 영역(U3 영역)이 (예를 들면, 결실 또는 치환에 의해) 변형된 벡터를 지칭한다. 자가 불활성화 벡터는 바이러스 복제의 최초의 라운드를 초과하여 바이러스 전사를 방지할 수 있다. 결과적으로, 자가 불활성화 벡터는 감염시킬 수 있고, 이어서 숙주 게놈(예: 포유동물 게놈)에 1번만 통합할 수 있고, 추가로 전달할 수 없다. 따라서, 자가 불활성화 벡터는 복제 가능한 바이러스를 생성하는 위험을 대폭 감소시킬 수 있다.
- [0165] 일부 실시형태에서, 본 발명의 핵산은 RNA, 예를 들면, 시험관내 합성 RNA일 수 있다. RNA의 시험관내 합성 방법은 당업자에게 알려져 있고; 임의의 공지된 방법을 사용하여, 본 개시의 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 RNA를 합성할 수 있다. RNA를 숙주 세포에 도입하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Zhao et al. Cancer Res. (2010) 15: 9053]. 본 개시의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 RNA를 숙주 세포에 도입하는 것은 시험관내, 생체의 또는 생체내에서 수행될 수 있다. 예를 들면, 숙주 세포(예를 들면, NK 세포, 세포독성 T 림프구 등)는 본 개시의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 RNA를 사용하여 시험관내 또는 생체외에서 전기전공될 수 있다.
- [0166] 폴리펩티드 또는 이의 일부의 발현을 평가하기 위해, 세포에 도입되는 발현 벡터는 또한, 바이러스 벡터를 통해 형질감염 또는 감염되어야 하는 세포의 모집단으로부터의 발현 세포의 동정 및 선택을 용이하게 하기 위해, 선택가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자, 또는 둘 모두를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 선택가능 마커는 별개의 DNA 조각 상으로 운반될 수 있고, 공-형질감염 절차에 사용될 수 있다. 선택 가능한 마커 및 리포터 유전자는 모두는, 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 하는 적절한 조절 서열과 인접시킬 수 있다. 유용한 선택 가능한 마커에는 항생제 내성 유전자가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0167] 리포터 유전자는, 잠재적으로 형질감염된 세포를 동정하고 조절 서열의 기능을 평가하기 위해 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자의 생물 또는 조직에 존재하지 않거나, 또는 발현되지 않는 유전자이고, 이의 발

현은 효소 활성 등의 일부 용이하게 검출 가능한 특성에 의해 발현되는 폴리펩티드를 코딩한다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포에 도입된 후의 적절한 시기에 평가된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제, 분비형 알칼리성 포스파타제 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 코딩하는 유전자가 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다[참조: 예를 들면, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82].

[0168] 일부 실시형태에서, 본 개시의 핵산은, 예를 들면, 숙주 세포에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리펩티드의 생산을 위해 제공된다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 핵산은 폴리펩티드-코딩 핵산의 증폭을 제공한다.

[0169] **D. 사용 방법**

[0170] 본 명세서에 기재된 항-FAP 항체, 결합 폴리펩티드, 및 scFv는 또한 진단 및 영상화 용도에 사용될 수 있다.

[0171] 예를 들면, 본 명세서에 기재된 항-FAP 항체는, 효소 결합된 면역흡착 분석(ELISA), 면역침전, 웨스턴 블로팅 또는 면역조직화학과 같은 면역분석을 포함하는, 당업자에게 공지되어 있는 고전적 면역조직학적 방법을 사용하여, 생물학적 샘플에서 FAP 단백질 수준을 검정할 수 있다. 적합한 항체 검정 표지는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 글루코스 옥시다제, 알칼리성 포스파타제 및 서양고추냉이 퍼옥시다제 등의 효소 표지; 요오드(¹²⁵I, ¹²¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 삼중수소(³H), 인듐(¹²¹In) 및 테크네튬(^{99m}Tc) 등의 방사성 동위원소; 루미놀 등의 발광성 표지; 및 플루오레세인 및 로다민 등의 형광 표지, 및 비오틴을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 이러한 표지를 사용하여, 본 명세서에 기재된 결합 폴리펩티드, 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예: scFv)을 표지할 수 있다.

[0172] 또는, 본 명세서에 기재된 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 인식하는 제2 항체는 표지되고, 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 조합하여 사용되어 FAP 단백질 수준을 검출할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명은 시험관내 또는 생체내 대상체에서 FAP 단백질 수준을 검정 및/또는 검출하기 위한 본 발명의 항-FAP 항체의 용도에 관한 것이다.

[0173] FAP 단백질의 발현 수준에 대한 검정은 제1 생물학적 샘플 중의 FAP 단백질의 수준을 직접적으로(예를 들면, 절대 단백질 수준을 결정 또는 추정함으로써) 또는 상대적으로(예를 들면, 제2 생물학적 샘플에서 질환 관련 단백질 수준) 정성적 또는 정량적으로 측정 또는 추정하는 것을 목적으로 한다. 제1 생물학적 샘플에서 FAP 폴리펩티드 발현 수준을 측정 또는 추정할 수 있고, 표준 FAP 단백질 수준과 비교할 수 있다. 표준은 장애를 갖지 않는 개인으로부터 수득된 제2 생물학적 샘플에서 채취할 수 있거나, 또는 장애를 갖지 않는 개인 모집단의 수준을 평균함으로써 결정할 수 있다. 당해 기술분야에서 이해되는 바와 같이, "표준" FAP 폴리펩티드 수준이 공지되면, 이는 비교를 위한 표준으로서 반복적으로 사용될 수 있다.

[0174] 본 명세서에 기재된 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 당업자에게 공지되고 표준적인, 본 명세서에 기초하는 시험관내 및 생체내 용도를 포함하는, 예후, 진단, 모니터링 또는 스크리닝 용도에 사용될 수 있다.

[0175] 면역계 상태 및/또는 면역 반응의 시험관내 산정 및 평가를 위한 예후, 진단, 모니터링 및 스크리닝 검정 및 키트를 이용하여, 면역계 기능장애, 또는 질병 또는 병태, 또는 예상 또는 목적하는 면역계 반응과 관련하여, 질병 상태의 치료와 관련된 항원 반응 또는 백신 반응을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 것들을 포함하여 환자 샘플을 예측, 진단 및 평가할 수 있다. 면역계 상태 및/또는 면역 반응의 산정 및 평가는, 약물의 임상 시험, 또는 특정 화학요법제 또는 이들의 조합을 포함하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편 대 상이한 약제 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여에 대한 환자의 적합성을 결정하는 데 유용하다. 이러한 유형의 예후 및 진단의 모니터링 및 평가는 유방암에서 HER2 단백질에 대한 항체(HerceptTest™, Dako)를 활용하여 이미 실시되고 있고, 여기서 분석은 Herceptin®을 사용한 항체 요법에 대한 환자 평가에도 사용된다. 생체내 응용에는, 직접 세포 치료 및 면역계 조절 및 면역 반응의 방사선 영상화가 포함된다.

[0176] 일 태양에서, 본 발명은 진단제로서 사용하기 위한 본 발명의 항-FAP 항체 및/또는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0177] 일 태양에서, 본 발명은 면역계-기능장애 및/또는 암의 예측, 진단 및/또는 모니터링 방법에 사용하기 위한 본 발명의 항-FAP 항체 및/또는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0178] 일 실시형태에서, 본 발명은 시험관내 대상체의 생물학적 샘플에서 FAP 단백질 수준을 검정 및/또는 검출함으로써 대상체에서 면역계-기능장애 및/또는 암을 예측, 진단 및/또는 모니터링하기 위한 본 발명의 항-FAP 항체의

용도에 관한 것이다.

- [0179] 일 실시형태에서, 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 생검 샘플의 면역조직화학에 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여, FAP의 수준, 또는 이의 막 표면에 FAP를 함유하는 세포의 수준을 검출할 수 있고, 이어서 이 수준은 특정 질병 증상에 관련될 수 있다. 본 명세서에 기재된 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 검출 가능하거나 기능적 표지를 가질 수 있다. 형광 표지를 사용하는 경우, 현재 이용 가능한 현미경 및 형광 활성화 세포 선별 분석(FACS) 또는 당해 기술분야에 공지된 양 방법 절차의 조합을 이용하여 특이적 결합 구성원을 동정 및 정량할 수 있다.
- [0180] 본원에 기재된 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 형광 표지를 보유할 수 있다. 예시적 형광 표지는, 예를 들면, 반응성 및 접합된 프로브, 예를 들면, 아미노쿠마린(Aminocoumarin), 플루오레세인(Fluorescein) 및 텍사스 레드(Texas red), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 염료, Cy 염료 및 DyLight 염료를 포함한다. 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 동위원소 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{52}Co , ^{57}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{121\text{I}}$, ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac 및 ^{186}Re 등의 방사성 표지를 보유할 수 있다. 방사성 표지를 사용하는 경우, 당해 기술분야에 공지된 현재 이용 가능한 계수 절차를 이용하여, FAP에 대한 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 특이적 결합을 동정 및 정량할 수 있다. 표지가 효소인 경우, 검출은 당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 현재 이용 가능한 비색, 분광 광도, 형광 분광 광도, 엠파로메트릭 또는 가스메트릭 측정 기술 중 어느 것에 의해 달성될 수 있다. 이는 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 FAP 사이의 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건하에 샘플 또는 대조군 샘플을 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시킴으로써 달성할 수 있다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 FAP 사이에 형성된 임의의 복합체를 검출하고, 샘플 및 대조군에서 비교한다. FAP에 대한 본 명세서에 기재된 항체의 특이적 결합에 비추어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여, 세포 표면 상의 FAP 발현을 특이적으로 검출할 수 있다. 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 또한 면역-친화성 정제를 통해 FAP를 정제하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 예를 들면, FAP 또는 CTLA-4/FAP 리간드 복합체의 존재 정도의 정량적 분석을 위한 시험 키트의 형태로 제조될 수 있는 검정 시스템이 포함된다. 시스템 또는 시험 키트는 표지된 성분, 예를 들면, 표지된 항체, 및 하나 이상의 추가 면역화학 시약을 포함할 수 있다.
- [0181] 일 실시형태에서, 본 발명은, (1) 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 FAP 사이의 복합체 형성을 가능하게 하는 조건하에서, 샘플 및 임의로 대조군 샘플을 본 발명의 항-FAP 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계, 및 (2) 샘플 및 임의로 대조군에서 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플에서 FAP 단백질 수준을 검정 및/또는 검출하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0182] 특정 실시형태에서, FAP의 수준 및/또는 분포는 적절한 영상화 기술, 예를 들면, 양전자 방출 단층촬영(PET) 스캔을 사용하여 검출 가능하게 표지된 본 명세서에 개시된 항체를 검출함으로써 생체내에서 (예를 들면, 비침습적으로) 결정된다. 예를 들면, 표적 항체-PET 또는 면역-PET(예를 들면, 항-FAP PET)를 사용하여, 생체내에서 표적 FAP-발현 세포의 수준 및/또는 분포(예를 들면, 중앙 국제화)를 검출할 수 있다. 항체 영상화(예를 들면, 항체-PET 영상화)를 위한 기술은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: Lamberts, L. E. et al. (2015) J. Clin. Oncol. 33 (DOI: 10.1200/JCO.2014.57.8278); Tavaré, R. et al. (2014) PNAS 111(3):1108-1113; Pampaloni et al., J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr 3084); and Boerman and Oyen (2011) The Journal of Nuclear Medicine 52 (8):1171-72; 미국 특허 제5,192,525호, 미국 특허 제5,219,548호, 미국 특허 제5,399,338호]에 기재되어 있고, 이들 모두는 참조에 의해 본 명세서에 도입된다.
- [0183] 일 실시형태에서, FAP의 수준 및/또는 분포는, 예를 들면, PET 시약으로 검출 가능하게 표지된, 예를 들면, 문헌[참조: Tavaré, R. et al. (2014) PNAS 111(3):1108-1113]에 기재된 바와 같이, 예를 들면, ^{64}Cu 방사성 표지화를 위해 5-2-(4-이소티오시아네이트벤질)-1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산에 접합된 PET 시약으로 검출 가능하게 표지된 항-FAP 항체를 검출함으로써 생체내에서 결정된다. 또 다른 실시형태에서, FAP의 수준 및/또는 분포는, 예를 들면, PET 시약으로 검출 가능하게 표지된 항-FAP 항체, 예를 들면, 항체, 항체 단편 또는 FAP 표적화 폴리펩티드의 불소-18 표지를 검출함으로써 생체내에서 결정된다. 또 다른 실시형태에서, FAP의 수준 및/또는 분포는, 예를 들면, 미국 특허 제9,988,452호에 기재된 바와 같이, 예를 들면, PET 시약으로 검출 가능하게 표지된 항-FAP 항체를 검출함으로써 생체내에서 결정된다. 또 다른 실시형태에서, FAP 표적화 폴리펩티드는 적절한 방사성 동위원소에 대한 킬레이트화를 위해 테스페록사민에 공유 부착된다.
- [0184] 다른 실시형태에서, FAP의 수준은 대상체로부터 (예를 들면, 면역조직화학 기술을 사용하여) 취득된 샘플(예를

들면, 종양 생검)에서 결정된다.

- [0185] 또한, 본 발명의 범위 내에 검출 시약이 있다. 예를 들면, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항-FAP 항체 분자를 포함하는 면역-PET 시약이 제공된다. 예시적 표지 시약에는 아스타틴-211(^{211}At), 브롬-76(^{76}Br), 칼슘-47(^{47}Ca), 탄소-11(^{11}C), 탄소-14(^{14}C), 크롬-51(^{51}Cr), 코발트-57(^{57}Co), 코발트-58(^{58}Co), 구리-64(^{64}Cu), 에르븀-169(^{169}Er), 불소-18(^{18}F), 플루오로데옥시글루코스(^{18}F -FDG), 갈륨-67(^{67}Ga), 갈륨-68(^{68}Ga), 수소-3(^3H), 인듐-111(^{111}In), 요오드-123(^{123}I), 요오드-124(^{124}I), 요오드-125(^{125}I), 요오드-131(^{131}I), 철-59(^{59}Fe), 크립톤-81m($^{81\text{m}}\text{Kr}$), 루테튬-177(^{177}Lu), 질소-13(^{13}N), 산소-15(^{15}O), 인-32(^{32}P), 사마륨-153(^{153}Sm), 셀레늄-75(^{75}Se), 스트론튬-89(^{89}Sr), 탈륨-201(^{201}Tl), 나트륨-22(^{22}Na), 나트륨-24(^{24}Na), 테크네튬 99m($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 크세논-133(^{133}Xe), ytt-86(^{86}Y), 이트륨-88(^{88}Y), 이트륨-90(^{90}Y) 및 지르코늄-89(^{89}Zr)이 포함되지만, 이들로 한정되지 않는다. 추가의 예시적 표지 시약 및 면역-PET에서의 이들의 용도는, 예를 들면, 문헌[참조: Lamberts, L. E. et al. (2015) J. Clin. Oncol. 33(DOI: 10.1200/JCO.2014.57.8278) and Boerman and Oyen(2011) The Journal of Nuclear Medicine 52(8):1171-72]에 기재되어 있다.
- [0186] 일 태양에서, 본 발명은 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 대한 입양 세포 요법에 적합한 대상체를 확인하는 방법을 제공한다. 이 방법은 (a) 대상체로부터 병변 조직을 분리하는 단계, (b) 분리된 조직을 FAP에 특이적으로 결합하는 결합 폴리펩티드와 접촉시키는 단계, 및 (c) 분리된 조직 중의 FAP-발현 세포를 검출하고, 이에 의해 입양 세포 요법을 위한 적합한 대상체를 확인하는 단계를 포함한다.
- [0187] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 GYTITSYSLH(서열번호 17)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 20)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0188] 특정 실시형태에서, 분리된 결합 폴리펩티드는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0189] 특정 실시형태에서, 분리된 결합 폴리펩티드는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 GYTITSYSLH(서열번호 17)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 20)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0190] 특정 실시형태에서, 분리된 결합 폴리펩티드는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고/하거나, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIKAT(서열번호 18)을 포함하고/하거나, HCDR3은 아미노산 서열 TRLDDSRFHWYFDV(서열번호 19)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고/하거나, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고/하거나, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0191] 특정 실시형태에서, 분리된 결합 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 바와 같은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 중 임의의 것을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3개의 경쇄 상보성 결정 영역, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 중 임의의 것을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 본 명세서에 기재된 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 임의의 조합을 포함한다. 당업자는 본 명세서에 제공된 중쇄 및 경쇄 가변 영

역 서열을 고려하여, 아미노산 넘버링에 기초하여 관련 상보성 결정 영역을 용이하게 결정할 수 있을 것이다.

[0192] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv) 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다. 특정 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 치료용 분자 또는 진단용 분자에 접합된다. 특정 실시형태에서, 진단 분자는 검출 가능한 표지를 포함한다. 특정 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 방사성 표지, 형광단, 효소, 합텐, 비오틴 또는 발색단이다.

[0193] 특정 실시형태에서, 대상체가 적합한 대상체로 확인된 후, 대상체에게 입양 세포 요법이 실시된다. 특정 실시형태에서, 입양 세포 요법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함한다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 T 림프구이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 NK 세포이다. 특정 실시형태에서, CAR은 FAP에 특이적으로 결합한다.

[0194] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역으로 이루어진다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로 이루어진다.

[0195] **마. 치료 방법**

[0196] 본 명세서에 기재된 항체, 결합 폴리펩티드 및 scFv는 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 병태를 치료하기 위한 조성물에 포함될 수 있다. 상기 조성물은 약제학적 조성물을 포함할 수 있고, 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여할 수 있다.

[0197] 일 태양에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 뮤린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 본 명세서에서 고려되는 HCDR 또는 LCDR 중 임의의 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열번호 9와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0198] 특정 실시형태에서, 암은 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)-발현 세포와 연관된다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 세포는 암-연관 세포이다. 특정 실시형태에서, 암-연관 세포는 암-연관 섬유아세포(CAF)이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 FAP-발현 지방세포이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 종양-연관 마크로파지(TAM)이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 종양-연관 호중구(TAN)이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 골수-유래 억제 세포(MDSC)이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 암-개시 세포이다.

[0199] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv) 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다. 특정 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0200] 일부 실시형태에서, 본 개시의 FAP-표적화 결합 폴리펩티드는 기타 치료제, 예를 들면, 제한 없이, 면역종양학 항체 요법 및 체크포인트 차단 등의 면역요법, 또는 CAR-T 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 이러한 실시형태에서, 제2 폴리뉴클레오타이드 서열은 항암 항체, 체크포인트 차단 분자, 또는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0201] 본 발명의 또 다른 태양은 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 포함하고, 이는 (a) 대상체를 적

합한 대상체로 확인하는 단계로서, 상기 확인은 (i) 대상체로부터 병변 조직을 분리하고; (ii) 단리된 조직을 FAP에 특이적으로 결합하는 결합 폴리펩티드와 접촉시키고; (iii) 단리된 조직 중의 FAP-발현 세포를 검출하는 것을 포함하는, 단계; 및 (b) 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 T 세포를 포함하는 입양 세포 요법을 적합한 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0202] 본 발명의 또 다른 태양에서, 본 명세서에서 제공된 것은 섬유증을 치료하는 방법이다. 섬유증은 회복 또는 반응 과정의 기관 또는 조직에서 과도한 섬유질 결합 조직의 형성이다. 자극된 섬유아세포에 의한 결합 조직의 침착은 기본 기관 또는 조직의 정상적 구조 및 기능을 방해하거나, 또는 완전히 억제할 수 있다. 특정 실시형태에서, 치료될 수 있는 섬유증은 폐 섬유증, 심장 섬유증, 간 섬유증, 피부 섬유증(켈로이드 및 강피증 포함), 장 섬유증 및 신장 섬유증을 포함하지만 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시형태에서, 섬유증은 심장 섬유증이다.

[0203] 본 발명의 조성물은, 적절한 전임상 및 임상 실험 및 시험에서 결정되는 투여량 및 경로 및 시점에 투여될 수 있다. 조성물은 이러한 범위 내의 투여량으로 복수회 투여될 수 있다. 조성물의 투여는 당업자에 의해 결정된 바와 같이 목적하는 질환 또는 병태를 치료하는 데 유용한 기타 방법과 조합될 수 있다.

[0204] **F. 약제학적 조성물 및 제형**

[0205] 또한, 본 명세서에 개시된 결합 폴리펩티드, scFv, 항체 또는 항원-결합 단편 중 어느 하나를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 조성물 중에는 질환 또는 장애의 치료 등의 투여를 위한 약제학적 조성물 및 제형이 포함된다. 또한, 대상체, 예를 들면, 환자에게 약제학적 조성물을 투여하기 위한 치료 방법이 제공된다.

[0206] 약제학적 조성물 및 제형은 일반적으로 하나 이상의 임의의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 적어도 하나의 추가 치료제를 포함한다.

[0207] 용어 "약제학적 제형"은 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하도록 하는 형태이고 제형이 투여되는 대상체에게 허용할 수 없을 정도로 독성이 있는 추가 성분을 포함하지 않는 제제를 지칭한다. "약제학적으로 허용되는 담체"는, 대상체에 대해 무독성인, 활성 성분 이외의 약제학적 제형 중의 성분을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 담체에는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제가 포함되지만 이들로 한정되지 않는다. 일부 태양에서, 담체의 선택은 특정 조성물 및/또는 투여 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 다양한 적합한 제형이 존재한다. 예를 들면, 약제학적 조성물은 방부제를 함유할 수 있다. 적합한 방부제는, 예를 들면, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산나트륨 및 염화벤조알코올을 포함할 수 있다. 일부 태양에서, 2종 이상의 방부제의 혼합물이 사용된다. 방부제 또는 이의 혼합물은 전형적으로 전체 조성물의 약 0.0001중량% 내지 약 2중량%의 양으로 존재한다. 담체는, 예를 들면, 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 하기를 포함하지만 이들로 한정되지 않는다: 포스페이트, 시트르산 및 기타 유기산 등의 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예: 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤조알코올 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤 등의 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린 등의 단백질; 폴리비닐피롤리돈 등의 친수성 고분자; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신 등의 아미노산; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; EDTA 등의 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨 등의 당류; 나트륨 등의 염 형성 대이온; 금속 착물(예: Zn-단백질 착물); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등의 비이온성 계면활성제.

[0208] 일부 태양에서 완충제가 조성물에 포함된다. 적합한 완충제는, 예를 들면, 시트르산, 시트르산나트륨, 인산, 인산칼륨 및 다양한 기타 산 및 염을 포함한다. 일부 태양에서, 2종 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 이들의 혼합물은 전형적으로 총 조성물의 약 0.001중량% 내지 약 4중량%의 양으로 존재한다. 투여 가능한 약제학적 조성물을 제조하는 방법은 공지되어 있다. 예시적 방법은, 예를 들면, 문헌[참조: Remington: Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21ST ed. (May 1, 2005)]에 기재되어 있다.

[0209] 제형은 수용액을 포함할 수 있다. 제형 또는 조성물은 또한, 조성물로 치료되는 특정 적응증, 질환 또는 병태에 유용한 하나 이상의 활성 성분, 바람직하게는 각각의 활성이 서로 악영향을 미치지 않는 경우, 조성물에 상보적인 활성을 갖는 활성 성분을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 기타 약제학적 활성제 또는 약물, 예컨대, 화학요법제, 예를 들면, 아스파라기나제, 부술판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우

라실, 젤시타빈, 하이드록시우레아, 메토티렉세이트, 파클리탁셀, 빈블라스틴 및/또는 빈크리스틴을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서 약제학적 조성물은 치료 유효량 또는 예방 유효량 등의 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하는데 유효한 양의 조성물을 함유한다. 일부 실시형태에서 치료 또는 예방 효능은 치료 대상체의 정기적 평가에 의해 모니터링된다. 목적하는 투여량은 조성물의 단일 볼루스 투여, 조성물의 다중 볼루스 투여, 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0210] 제형은 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 협측, 설하 또는 좌제 투여용의 제형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 비경구적으로 투여된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "비경구"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서 조성물은 멸균 액체 조제물, 예를 들면, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로서 제공되고, 이는 일부 태양에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 조제물은 통상 젤, 기타 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조가 용이하다. 추가로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기에 다소 더 편리하다. 반면에, 점성 조성물은 특정 조직과 더 긴 접촉 기간을 제공하기 위해 적절한 점도 범위 내에서 제형화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은, 예를 들면, 물, 생리식염수, 인산염 완충 생리식염수, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.

[0211] 멸균 주사 용액은 적합한 담체, 희석제, 또는 멸균수, 생리식염수, 포도당, 텍스트로스 등의 부형제와의 혼합물 등의 용매에 조성물을 혼입함으로써 제조될 수 있다. 조성물은 투여 경로 및 목적하는 조제에 따라 습윤제, 분산제 또는 유화제(예: 메틸셀룰로오스), pH 완충제, 겔화 또는 점도 증강 첨가제, 방부제, 향미제 및/또는 착색제 등의 보조 물질을 함유할 수 있다. 일부 태양에서는 표준 텍스트를 참조하여 적절한 조제물을 제조할 수 있다.

[0212] 향미생물성 보존제, 항산화제, 킬레이트제 및 완충제를 포함하여 조성물의 안정성 및 무균성을 증강시키는 다양한 첨가제를 첨가할 수 있다. 미생물 작용의 방지는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 및 소르브산 등의 다양한 항균제 및 항진균제에 의해 보장될 수 있다. 주사 가능한 약제학적 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 약제, 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 야기될 수 있다.

[0213] 생체내 투여에 사용되는 제형은, 일반적으로 무균이다. 멸균은, 예를 들면, 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

[0214] 본 명세서에 언급 또는 인용된 기사, 특허 및 특허 출원의 내용과 기타 모든 문서 및 전자적으로 이용 가능한 정보는 각 개별 간행물이 구체적으로 및 개별적으로 도입되는 것이 표시되는 경우와 동일한 정도로 참조에 의해 그 전체가 도입된다. 출원인은 이러한 기사, 특허, 특허 출원 또는 이의 기타 물리적 및 전자 문서로부터의 모든 자료와 정보를 이 출원에 물리적으로 도입할 수 있는 권리를 보유한다.

[0215] **G. 본 개시의 실시형태**

[0216] 일 태양에서, 본 발명은, 인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 뮤린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는, 단리된 결합 폴리펩티드를 제공한다.

[0217] 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 E1NPANGDHNHFSEKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFHWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSVSYSYM(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0218] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 결합한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다. 특정 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0219] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역

로 이루어진다.

- [0220] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로 이루어진다.
- [0221] 또 다른 태양에서, 본 발명은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0222] 또 다른 태양에서, 본 발명은 인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 뮤린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 제공한다.
- [0223] scFv의 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있다.
- [0224] 또 다른 태양에서, 본 발명은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 제공하고, 상기 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있다.
- [0225] scFv의 특정 실시형태에서, 링커는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0226] 또 다른 태양에서, 본 발명은 서열번호 11 또는 13에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 제공한다. 또 다른 태양에서, 본 발명은 서열번호 11 또는 13에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 일본쇄 가변 단편(scFv)을 제공한다.
- [0227] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 명세서에서 고려되는 임의의 결합 폴리펩티드 또는 임의의 scFv를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0228] 또 다른 태양에서, 본 발명은 인간 및 개과의 에피토프, 및/또는 뮤린 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 항원-결합 도메인을 포함하는 결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0229] 핵산의 특정 실시형태에서, 항원-결합 도메인은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)를 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0230] 핵산의 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 핵산의 특정 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv) 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 핵산의 특정 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다. 핵산의 특정 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 단편이다.
- [0231] 핵산의 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 8에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 핵산의 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 핵산의 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 핵산에 의해 코딩된다.
- [0232] 핵산의 특정 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산

에 의해 코딩된다. 핵산의 특정 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산에 의해 코딩된다. 핵산의 특정 실시형태에서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 핵산에 의해 코딩된다.

- [0233] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 서열번호 8에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 10에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 결합 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0234] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)을 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0235] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 서열번호 8에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 10에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 단리된 핵산을 제공하고, 여기서 상기 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 링커에 의해 분리되어 있다. 특정 실시형태에서, 링커는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0236] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 서열번호 12 또는 14에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 또 다른 태양에서, 본 발명은, 서열번호 12 또는 14에 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 일본쇄 가변 단편(scFv)을 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0237] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 본 명세서에서 고려되는 임의의 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시형태에서, 벡터는 발현 벡터이다. 특정 실시형태에서, 벡터는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0238] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 본 명세서에서 고려되는 임의의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 진핵생물 또는 원핵생물 기원의 것이다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 포유동물 기원이다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 세균 기원이다.
- [0239] 또 다른 태양에서, 본 발명은, FAP에 결합하는 결합 폴리펩티드 또는 scFv를 생산하는 방법을 제공하고, 이 방법은 본 명세서에서 고려되는 임의의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.
- [0240] 또 다른 태양에서, 본 발명은 임의의 결합 폴리펩티드 또는 본 명세서에서 고려되는 임의의 scFv를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0241] 또 다른 태양에서, 본 발명은, 본 명세서에서 고려되는 임의의 항체 또는 임의의 항원-결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0242] 또 다른 태양에서, 본 발명은 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 대한 입양 세포 요법에 적합한 대상체를 확인하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 방법은 (a) 대상체로부터 병변 조직을 분리하는 단계; (b) 단리된 조직을 FAP에 특이적으로 결합하는 결합 폴리펩티드와 접촉시키는 단계; 및 (c) 단리된 조직 중의 FAP-발현 세포를 검출하고, 이에 의해 입양 세포 요법에 적합한 대상체를 확인하는 단계를 포함한다.
- [0243] 이 방법의 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)을 포함하는 중쇄 가변 영역으로서, HCDR1은 아미노산 서열 YTITSYSLH(서열번호 1)를 포함하고, HCDR2는 아미노산 서열 EINPANGDHNFSKFEIK(서열번호 2)를 포함하고, HCDR3은 아미노산 서열 LDDSRFWYFDV(서열번호 3)를 포함하는, 중쇄 가변 영역; 및 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)을 포함하는 경쇄 가변 영역으로서, LCDR1은 아미노산 서열 TASSSVSYMY(서열번호 4)를 포함하고, LCDR2는 아미노산 서열 LTSNLA(서열번호 5)를 포함하고, LCDR3은 아미노산 서열 QQWSGYPPIT(서열번호 6)을 포함하는, 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0244] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv) 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다. 특정 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항

원-결합 단편이다.

- [0245] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 치료용 분자 또는 진단용 분자에 접합된다. 특정 실시형태에서, 진단 분자는 검출 가능한 표지를 포함한다. 특정 실시형태에서, 검출 가능한 표지는 방사성 표지, 형광단, 효소, 합텐, 비오틴 또는 발색단이다.
- [0246] 특정 실시형태에서, 대상체가 적합한 대상체로 확인된 후, 대상체에게 입양 세포 요법이 실시된다. 특정 실시형태에서, 입양 세포 요법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 면역 세포를 포함한다.
- [0247] 특정 실시형태에서, 면역 세포는 T 림프구이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 NK 세포이다.
- [0248] 특정 실시형태에서, CAR은 FAP에 특이적으로 결합한다.
- [0249] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 영역으로 이루어진다.
- [0250] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역으로 이루어진다.
- [0251] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 서열번호 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 서열번호 9와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 결합 폴리펩티드를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0252] 특정 실시형태에서, 암은 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)-발현 세포와 연관된다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 세포는 암-연관 세포이다. 특정 실시형태에서, 암-연관 세포는 암-연관 섬유아세포(CAF)이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 FAP-발현 지방세포이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 종양-연관 마크로파지(TAM)이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 종양-연관 호중구(TAN)이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 골수-유래 억제 세포(MDSC)이다. 특정 실시형태에서, FAP-발현 암-연관 세포는 암-개시 세포이다.
- [0253] 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합한다. 특정 실시형태에서, 결합 폴리펩티드는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, 일본쇄 가변 단편(scFv), 또는 단일-도메인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 항체는 전장 항체이다. 특정 실시형태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0254] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체의 암을 치료하는 방법을 제공하고, 이는 (a) 대상체를 적합한 대상체로서 확인하는 단계로서, 여기서 확인은 (i) 대상체로부터 병변 조직을 단리하고; (ii) 단리된 조직을 FAP에 특이적으로 결합하는 결합 폴리펩티드와 접촉시키고; 및 (iii) 단리된 조직에서 FAP-발현 세포를 검출하는, 단계; 및 (b) 섬유아세포 활성화 단백질(FAP)에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 T 세포를 포함하는 입양 세포 요법을 적합한 대상체에게 실시하는 단계를 포함한다.
- [0255] 본 발명은 이의 특정 실시형태를 참조하여 설명되었지만, 본 발명의 진정한 정신 및 범위로부터 벗어나지 않으면서, 다양한 변경이 이루어질 수 있고 균등물이 치환될 수 있다는 것을 당업자는 이해해야 한다. 본 명세서에 개시된 실시형태의 범위로부터 벗어남이 없이, 본 명세서에 기재된 방법의 기타 적절한 수정 및 적합이 적합한 등가물을 사용하여 이루어질 수 있다는 것은 당업자에게 용이하게 명백할 것이다. 추가로, 특정 상황, 재료, 물질의 조성, 프로세스, 프로세스 단계 또는 단계들을 본 발명의 목적, 정신 및 범위에 적합시키기 위해 다수의 수정이 이루어질 수 있다. 이러한 모든 변경은 본 명세서에 첨부된 특허청구의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 이제 특정 실시형태를 상세히 설명하였지만, 하기 실시예를 참조함으로써, 이는 더욱 명확하게 이해될 것이고, 이들 실시예는 예시만을 목적으로 포함되고, 한정하는 것을 의도하는 것은 아니다.

[0256] 실험 실시예

[0257] 본 발명은 하기 실험예를 참조함으로써 추가로 상세하게 설명된다. 이러한 예는 설명만을 목적으로 제공되고, 달리 명시되지 않는 한, 한정하는 것을 의도하는 것은 아니다. 따라서, 본 발명은 하기 실시예로 한정되는 것으로 해석되어서는 안 되며, 오히려 본 명세서에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0258] 추가 설명 없이, 당업자는 전술한 설명 및 하기 예시적 실시예를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 이용하고, 특허청구된 방법을 실시할 수 있다고 믿어진다. 따라서, 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시형태를 구체적으로 지적하는 것이고, 본 개시의 나머지 부분을 어떤 방식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0259] 본 명세서에 개시된 실험의 실시예에 사용된 재료 및 방법이 이제 설명된다.

[0260] *개과 FAP 유전자 서열의 생물정보학적 추정*: PCR 프라이머는 개과 FAP에 대한 NCBI 예측 서열(XM_005640252.2)을 사용하여 설계되었다. 수득된 PCR 산물은 단백질 수준에서 예측된 서열과 100% 정합했다. 뉴클레오타이드 수준에서 T127 및 A603에서 2개의 보존적 염기쌍 치환이 있었다.

[0261] *개과 FAP cDNA PCR, 서브클로닝 및 발현*: 개과 SK 골육종 세포를 발현하는 내인성 FAP의 컨플루언트 10cm 접시를 1ml TRIzol(Life Technologies, #15596-026)로 처리하고, 제조업체의 프로토콜에 따라 총 RNA를 추출했다. SuperScript 제1 스트랜드 합성 키트(Life Technologies, #11904-018)를 사용하여, 5 µg의 총 RNA로부터 cDNA를 역전사했다. 이 cDNA는 하기 프라이머를 사용하여 터치다운 PCR의 주형으로 사용되었다: 정방향 5' ATGTAGACGTGGTTAAAAATTG(서열번호 37); 역방향 5' CGTCATCTTCAGTCGGACAA(서열번호 38). 2291bp 앰플리콘이 1% 아가로스 겔에서 검출되었다.

[0262] 생성된 PCR 산물을 정제하고, pGEM-T Easy(Promega)에 클로닝하고, 서열분석했다. 이 서열 벡터는 선형화되어 있고, 단일 "T" 오버행을 포함한다. 이에 의해, Taq 폴리머라제에 의해 PCR 산물에 부가된 3' "A" 오버행을 이용하여, PCR 산물의 단순한 부지향성 클로닝이 가능해진다. 이로부터, EcoRI 클로닝 부위를 사용하여, cDNA를 플라스미드 pcDNA3.1로 무지향성으로 클로닝했다.

[0263] 개과 FAP cDNA를, SpeI를 사용하여 cDNA를 절제하고, XbaI를 사용하여 pLenti6/v5-D-TOPO를 개방함으로써 pcDNA3.1로부터 렌티바이러스 플라스미드(pLenti6/v5-D-TOPO)로 서브클로닝했다. 이러한 제한 부위에는 호환 가능한 말단이 있다. 이에 의해, CanineFAP.pLenti6/v5-D-TOPO가 생성되었다.

[0264] CanineFAP.pLenti6/v5-D-TOPO는 패키징 플라스미드(pMD2.G, pCMVΔR8.2)와 함께 HEK 293 세포에 공-형질감염시켰다. 바이러스 함유 상청액을 48시간 후에 회수했다. 바이러스 역가는 p24 ELISA에 의해 결정되었고, Balb/C 3T3 섬유아세포는 0.5:1 내지 10:1 범위의 상이한 MOI에서 형질도입시켰다.

[0265] Balb/C 3T3.canine FAP 세포에서 도입유전자의 발현은 유세포 분석을 사용하여 확인되었다. 사용된 1차 항체는 R&D 시스템의 비오틴화된 양 항-huFAP 폴리클로날 항체(5 µg/ml)였다. 2차 항체는 바이올레전드(Biolegend)의 APC-스트렙트아비딘(1 µg/ml)이었다.

[0266] *면역화 및 하이브리도마 생성*: 전장 개과 FAP를 발현하는 Balb/C 3T3 세포를 사용하여, 14주령의 Balb/C.FAP^{-/-} 마우스를 면역화시켰다. 모든 주사는 복강 내로 수행되고, 0.5ml 멸균 PBS 중의 1×10^7 세포로 구성되었다. 초기 면역화 후, 14일차와 28일차에 부스팅이 수행되었다. 이어서, 42일차에 동물을 채혈하고, 56일차에 부스팅을 실시하고, 63일차에 채혈하고, 70일, 217일 및 238일차에 추가로 3회 부스팅을 실시했다. 2017년 241일차에, 비장을 채취하고, 단세포 현탁액을 제조하고, 비장세포를 UPENN 하이브리도마 코어 시설에 의해 sp2/0 세포와 융합시켰다. 하이브리도마 상청액을 1차 항체로서 및 AF488 염소 항-마우스 IgG를 2차 항체로서 사용하여, MC KOSA 양친(FAP null) 대 개과 FAP-도입유전자 발현 MC KOSA.K9FAP에 대해 먼저 하이브리도마 상청액을 FACS에 의해 스크리닝했다. 클론 4G5는 형질도입된 세포에는 반응성이 있지만, 양친 세포에는 반응성이 없는 것으로 동정되었고, 추가 세포에 대해 스크리닝하여, FAP 발현, 그러나 비 FAP-음성 세포: 인간 1차 섬유아세포, 뮤린 또는 인간 FAP 도입유전자를 발현하는 BALB/c 3T3, 개과 1차 섬유아세포, SK KOSA(FAP 발현) 및 BALB/c 3T3(FAP 음성) 세포와의 반응성을 확인했다. 이어서, (Thermo Fisher Rapid ELISA 마우스 mAb 동형분석 키트 #37503)를 사용하여 4G5가 IgG1k 동형 항체인 것으로 결정되었다.

[0267] 실시예 1: PCR 프라이머 설계에 사용된 개과 FAP 유전자 서열의 생물정보학적 추정

[0268] 제1 단계로서, 개과 FAP 유전자의 서열을 PCR을 통해 증폭했다. 개과 FAP에 특이적인 PCR 프라이머는 개과 FAP

의 NCBI 예측 서열(XM_005640252.2)을 사용하여 설계되었다. 수득된 PCR 산물은 단백질 수준에서 개과 FAP의 서열과 100% 정합했다(도 1). 후속 서열분석에 의해, 개과 FAP는 뉴클레오타이드 수준에서 T127 및 A603에서 2개의 보존적 염기쌍 치환을 보유하는 것으로 밝혀졌다.

[0269] 실시예 2: 개과 FAP cDNA PCR, 서브클로닝, 서열분석 및 발현

[0270] 항-개과 FAP 항체를 생성하기 위한 제1 단계로서, 재조합 개과 FAP 단백질을 생성할 수 있는 작제물을 생성했다. 개과 FAP cDNA를 제공하기 위해, 개과 SK 골육종 세포를 발현하는 내인성 FAP를 TRIzol 기반 RNA 추출에 제공하고, 이어서 단리된 RNA를 cDNA로 역전사시켰다. 이 cDNA를 터치다운 PCR의 주형으로서 사용하여 2291bp 앰플리콘을 생성했다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 산물을 정제하고, 서플 벡터로 클로닝하고, 이는 PCR 산물의 단순 무지향성 클로닝을 가능하게 했다. 이로부터, cDNA를 진핵생물 발현 플라스미드 내로 클로닝했다(도 2A). 이어서, 개과 FAP cDNA를 렌티바이러스 플라스미드로 서브클로닝하여, 포유동물 세포주로의 형질도입을 가능하게 했다(도 2B). 이어서, 수득된 개과 FAP-렌티바이러스 작제물을 패키징 플라스미드와 함께 HEK 293 세포에 공-형질감염시켰다. 이어서, 바이러스 함유 상청액을 48시간 후에 회수했다. 바이러스 역가는 p24 ELISA에 의해 결정되었고, BALB/c 유래 3T3 섬유아세포는 0.5:1 내지 10:1 범위의 다양한 MOI에서 형질도입되었다. 3T3-개과 FAP 세포에서 도입유전자의 발현은 유세포분석을 사용하여 확인했다(도 2C).

[0271] 실시예 3. 면역화, 융합 및 스크리닝

[0272] 이어서, 전장 개과 FAP를 발현하도록 형질도입된 BALB/c 3T3 섬유아세포를 사용하여, 14주령의 BALB/c FAP^{-/-} 마우스를 면역화시켰다. 모든 주사는 복강 내로 제공되었고, 0.5ml 멸균 PBS 중의 1×10^7 세포로 구성되었다. 초기 면역화 후, 후속 8개월 동안 정기적으로 6회의 부스터 면역화를 실시했다. 연구의 결론에서, 비장을 수확하고, 수득된 단일 세포 현탁액을 사용하여, sp2/0 세포와의 융합을 통해 하이브리도마를 생성했다. 이어서, 수득된 하이브리도마를 항-개과 FAP 항체를 생산하는 하이브리도마에 대해 스크리닝했다. 초기 스크리닝으로서, FAP null MC KOSA 양친 세포가 아닌 개과-FAP 도입유전자-발현 MC KOSA 세포를 염색할 수 있는 면역글로불린을 생산하는 세포를 유세포 분석으로 확인했다(도 3). 그 결과, 4G5 클론이 잠재적 후보로서 확인되었다. 추적 연구에 의해, 클론에 의해 생성된 면역글로불린이 FAP 발현 인간 1차 섬유아세포, 마우스 또는 인간 FAP 도입유전자를 발현하는 BALB/c 3T3 세포, 개과 1차 섬유아세포 및 FAP 발현 SK KOSA 세포를 염색할 수 있음이 추가로 밝혀졌다. 유사하게는, 4G5 면역글로불린은 FAP-음성 양친 BALB/c 3T3 세포를 염색할 수 없었고, 이는 이의 특이성을 추가로 나타낸다. 마지막으로, 시판의 ELISA 기반 항체 동형분석 키트를 사용하여 4G5에 의해 생성된 면역글로불린을 추가로 특성화했다. 이들 결과는 4G5가 마우스-IgG1-카파 동형 항체인 것을 입증했다(도 4A-4C). 4G5를 마우스 IgG1 동형 대조군과 비교하는 추적 단백질 겔은 유사한 패턴의 중쇄 및 경쇄 밴드를 생성하고, 이는 4G5의 동형 동일성을 추가로 입증했다(도 5).

[0273] 기타 실시형태

[0274] 본 명세서에서 변수의 정의에서 요소 목록의 인용은 임의의 단일 요소 또는 수록된 요소의 조합(또는 하위 조합)으로서 해당 변수의 정의를 포함한다. 본 명세서에서 실시형태의 인용은 그 실시형태를 임의의 단일 실시형태로서 또는 임의의 기타 실시형태 또는 이의 부분과 조합하여 포함한다.

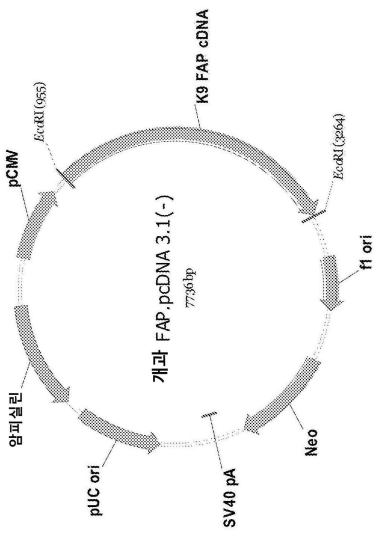
[0275] 본 명세서에 인용된 각각의 모든 특허, 특허 출원 및 간행물의 개시는 참조에 의해 그 전체가 본 명세서에 도입된다. 본 발명은 특정 실시형태를 참조하여 개시되었지만, 기타 실시예 5 및 본 발명의 변형은, 본 발명의 진정한 정신 및 범위를 벗어나지 않으면서, 당업자에 의해 고안될 수 있음이 명백하다. 첨부된 특허청구범위는 이러한 모든 실시형태 및 등가의 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

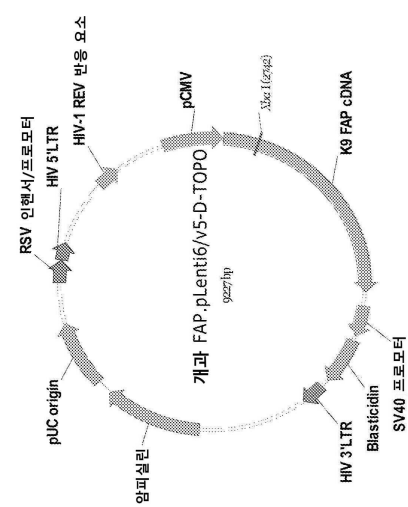
도면1

범위 1:1 내지 760 그레픽			
예측 범인		Previous Match	
스코어	1584 bits(4102)	0.0	조성 매트릭스 조절
		동정	견
		760/760(100%)	760/760(100%) 0/760(0%)
Query 1	NKTLLIVFGVATSAVALLVKCVLRPSRHDSGGTTRALTLEDILHGTFYTFPPN 60		
Query 1	NKTLLIVFGVATSAVALLVKCVLRPSRHDSGGTTRALTLEDILHGTFYTFPPN 60		
Query 1	NKTLLIVFGVATSAVALLVKCVLRPSRHDSGGTTRALTLEDILHGTFYTFPPN 60		
Query 61	WISQGVYHSHDIDDIYVNIETGESYTLISHATKSVASHWGLSPDQGFAYLESQYK 120		
Query 61	WISQGVYHSHDIDDIYVNIETGESYTLISHATKSVASHWGLSPDQGFAYLESQYK 120		
Query 61	WISQGVYHSHDIDDIYVNIETGESYTLISHATKSVASHWGLSPDQGFAYLESQYK 120		
Query 121	LURSVKATHTYHLNGEFTFRHIEPRPTQVLCUSPGSKLAVYQVNIYLGQREDPP 180		
Query 121	LURSVKATHTYHLNGEFTFRHIEPRPTQVLCUSPGSKLAVYQVNIYLGQREDPP 180		
Query 121	LURSVKATHTYHLNGEFTFRHIEPRPTQVLCUSPGSKLAVYQVNIYLGQREDPP 180		
Query 181	FQITYGRENKIFNGIPDAWVEEERLAKHALMSPNGKFLAVAEHDITEIPVIZSYNG 240		
Query 181	FQITYGRENKIFNGIPDAWVEEERLAKHALMSPNGKFLAVAEHDITEIPVIZSYNG 240		
Query 181	FQITYGRENKIFNGIPDAWVEEERLAKHALMSPNGKFLAVAEHDITEIPVIZSYNG 240		
Query 241	DEQPRITINPYPKAGAKIPWRIFIDITYPQQTGPREVPANIASDYFSKLTWT 300		
Query 241	DEQPRITINPYPKAGAKIPWRIFIDITYPQQTGPREVPANIASDYFSKLTWT 300		
Query 241	DEQPRITINPYPKAGAKIPWRIFIDITYPQQTGPREVPANIASDYFSKLTWT 300		
Query 301	DERVCLQVSTQWVSLSIDPREGQWQDCPKAQHEIESRTGAGGFFVSTVFSYO 360		
Query 301	DERVCLQVSTQWVSLSIDPREGQWQDCPKAQHEIESRTGAGGFFVSTVFSYO 360		
Query 301	DERVCLQVSTQWVSLSIDPREGQWQDCPKAQHEIESRTGAGGFFVSTVFSYO 360		
Query 361	AISYVIFSDQGVKXHWIYDITVEIAHQITSCXKIEINIFRVTDLSFYSSMEFEDVP 420		
Query 361	AISYVIFSDQGVKXHWIYDITVEIAHQITSCXKIEINIFRVTDLSFYSSMEFEDVP 420		
Query 361	AISYVIFSDQGVKXHWIYDITVEIAHQITSCXKIEINIFRVTDLSFYSSMEFEDVP 420		
Query 421	RRHYRISGSSPPSKCITCHLKERQWYATSFQVAYKALICYGPGLPSTLDGH 480		
Query 421	RRHYRISGSSPPSKCITCHLKERQWYATSFQVAYKALICYGPGLPSTLDGH 480		
Query 421	RRHYRISGSSPPSKCITCHLKERQWYATSFQVAYKALICYGPGLPSTLDGH 480		
Query 481	TQDEIKILFEINELFNALHNLQPKKEIKLENDQITLWYKMLPRFRDSKYPVLIQV 540		
Query 481	TQDEIKILFEINELFNALHNLQPKKEIKLENDQITLWYKMLPRFRDSKYPVLIQV 540		
Query 481	TQDEIKILFEINELFNALHNLQPKKEIKLENDQITLWYKMLPRFRDSKYPVLIQV 540		
Query 541	YGGPCQSVQSVFSTINISYLSASGEGTALVQGRGAYQSKLLVAYKRLQVVEEQ 600		
Query 541	YGGPCQSVQSVFSTINISYLSASGEGTALVQGRGAYQSKLLVAYKRLQVVEEQ 600		
Query 541	YGGPCQSVQSVFSTINISYLSASGEGTALVQGRGAYQSKLLVAYKRLQVVEEQ 600		
Query 601	TFRKFIENGFIDEKRIALNGISYGVWSSLASGTGLFKCGIAPVSSMEYASIIY 660		
Query 601	TFRKFIENGFIDEKRIALNGISYGVWSSLASGTGLFKCGIAPVSSMEYASIIY 660		
Query 601	TFRKFIENGFIDEKRIALNGISYGVWSSLASGTGLFKCGIAPVSSMEYASIIY 660		
Query 661	TERFGLPTMIONILEHYKISTVHARAEYFRVNDVLLHGTADDVNFQISAQALVIA 720		
Query 661	TERFGLPTMIONILEHYKISTVHARAEYFRVNDVLLHGTADDVNFQISAQALVIA 720		
Query 661	TERFGLPTMIONILEHYKISTVHARAEYFRVNDVLLHGTADDVNFQISAQALVIA 720		
Query 721	QUGFQANYSQDHQIGTGLSSKHLTYRTHFLKQCFSLD 760		
Query 721	QUGFQANYSQDHQIGTGLSSKHLTYRTHFLKQCFSLD 760		
Query 721	QUGFQANYSQDHQIGTGLSSKHLTYRTHFLKQCFSLD 760		

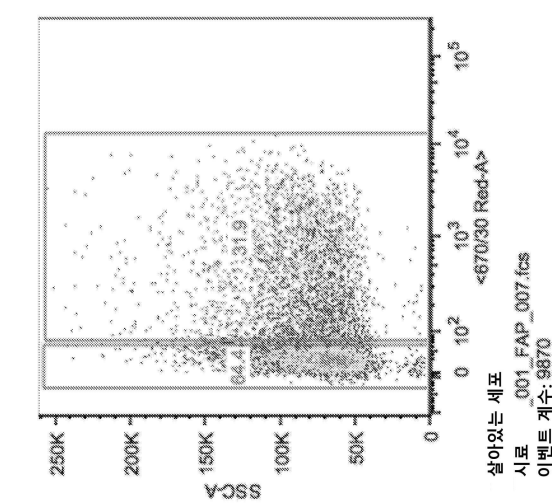
도면2a



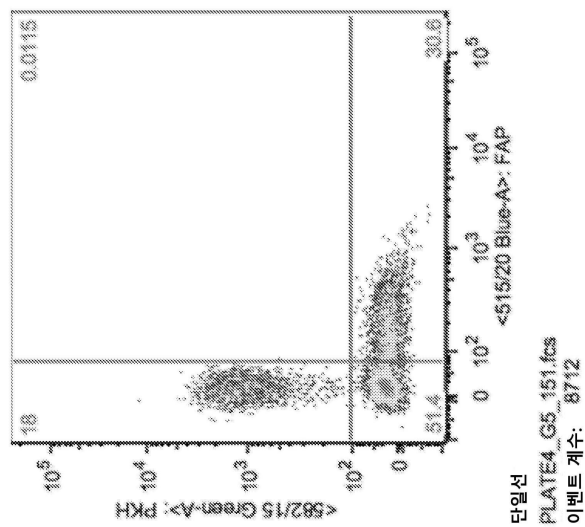
도면2b



도면2c



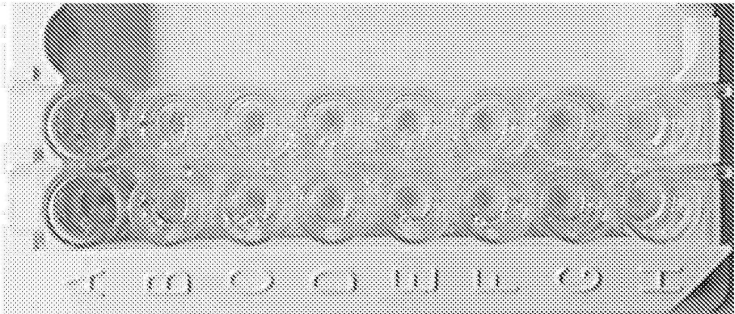
도면3



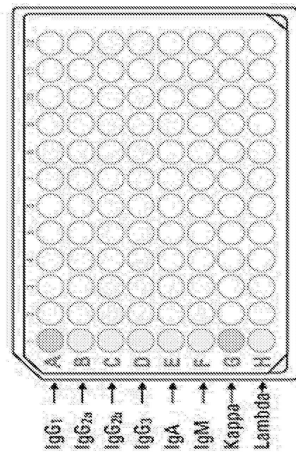
도면4a

동형분석(Thermo Fisher Rapid ELISA 마우스 mAb 동형분석 키트 #37503)		
	작동 정보	
A	2.30701	2.05944
B	0.128739	0.134897
C	0.061526	0.083605
D	0.053079	0.070057
E	0.054464	0.074575
F	0.048878	0.064709
G	0.280926	0.302431
H	0.05484	0.067141

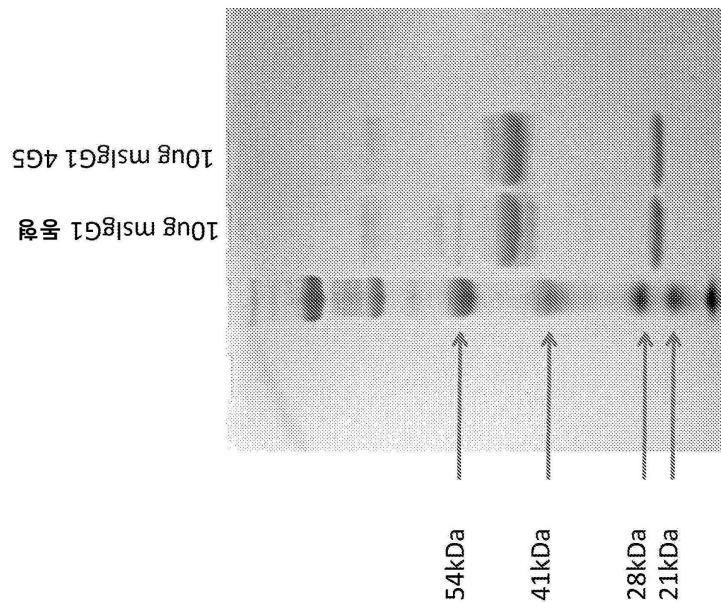
도면4b



도면4c



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees Of The University Of Pennsylvania

Pure, Ellen

Todd, Leslie

<120> MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CANINE FIBROBLAST ACTIVATION PROTEIN
THAT CROSS-REACTS WITH MOUSE AND HUMAN FIBROBLAST ACTIVATION
PROTEIN (FAP)

<130> 046483-7274W01(02348)

<150> 62/904,272

<151> 2019-09-23

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 HCDR1

<400> 1

Tyr Thr Ile Thr Ser Tyr Ser Leu His

1 5

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 HCDR2

<400> 2

Glu Ile Asn Pro Ala Asn Gly Asp His Asn Phe Ser Glu Lys Phe Glu

1 5 10 15

Ile Lys

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 HCDR3

<400> 3

Leu Asp Asp Ser Arg Phe His Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 LCDR1

<400> 4

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 LCDR2

<400> 5

Leu Thr Ser Asn Leu Ala

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 LCDR3

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Ile Thr

1 5 10

<210> 7

<211>

> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 VH

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ala Asn Gly Asp His Asn Phe Ser Glu Lys Phe

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

<210> 8

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 VH

<400> 8

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
 tcctgcaagg cgtctggcta caccatcacc agctactctc tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaatcctg ccaatggtga tcataacttc 180
 agtgagaagt tcgagatcaa ggccacactg actgtagaca gctcctccaa cacagcattc 240
 atgcaactca gcaggctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagattggac 300
 gatagtaggt tccactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 VL

<400> 9

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

20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
35 40 45

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

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 VL

<400> 10

caaattgttc tcaccagtc tccagcgctc atgtctgctt ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca ctgccagctc aagtgttagt tacatgtact ggtaccagca gaagccacga 120
tcctccccc aaccctggat tttctcacc tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
ttcagtggcc gtgggtctgg gacctctttc tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtgggtacc caccatcac attcggtcgc 300
gggacaaagt tggaataaa a 321

<210> 11

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 scFv VLVH

<400> 11

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

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

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

 115 120 125
 Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys
 130 135 140
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Tyr Ser Leu His Trp Val Lys
 145 150 155 160
 Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ala
 165 170 175
 Asn Gly Asp His Asn Phe Ser Glu Lys Phe Glu Ile Lys Ala Thr Leu

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

<210> 12

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 scFv VLVH

<400> 12

```

caaattgttc tcaccagtc tccagcgtc atgtctgctt ctccagggga gaaggtcacc      60
atgacctgca ctgccagtc aagtgttagt tacatgtact ggtaccagca gaagccacga      120
tcctccccc aaccctggat tttctcacc tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc      180
ttcagtggcc gtgggtctgg gacctctttc tctctcaca tcagcagcat ggaggctgaa      240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtgggtacc caccatcac attcggtcgc      300
gggacaaaagt tggaataaa aggtggaggt ggagcggag gaggtgggtc cggcgggtga      360

ggaagccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactgg taaagcctgg ggcttcagt      420
aagttgtcct gcaaggcgtc tggctacacc atcaccagct actctctgca ctgggtgaag      480
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt ggagagatta atcctgcaa tggatgatcat      540
aacttcagtg agaagttcga gatcaaggcc aactgactg tagacagtc ctccaacaca      600
gcattcatgc aactcagcag gctgacatct gaggactctg cggcttatta ctgtacaaga      660
ttggacgata gtaggttcca ctggtacttc gatgtctggg gcgcaggac cacggtcacc      720
gtctcctca                                     729

```

<210> 13

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 scFv VHVH

<400> 13

```

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

          50          55          60
Glu Ile Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Phe

```

65				70				75				80			
Met	Gln	Leu	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90				95			
Thr	Arg	Leu	Asp	Asp	Ser	Arg	Phe	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly
				100				105				110			
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
				115				120				125			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro
				130				135				140			
Ala	Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Thr
145				150				155				160			
Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Arg
				165				170				175			
Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Phe	Leu	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly
				180				185				190			
Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Phe	Ser	Leu
				195				200				205			
Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln
				210				215				220			
Gln	Trp	Ser	Gly	Tyr	Pro	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu
225				230				235				240			
Glu				Ile				Lys							

agtgagaagt tcgagatcaa ggccacactg actgtagaca gtcctcctcaa cacagcattc 240
 atgcaactca gcaggctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagattggac 300
 gatagtaggt tccactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360

 tcagggtggag gtggcagcgg aggaggtggg tccggcgggtg gaggaagcca aattgttctc 420
 acccagtctc cagcgtcat gtctgcttct ccaggggaga aggtcaccat gacctgcact 480
 gccagctcaa gtgttagtta catgtactgg taccagcaga agccacgac ccccccaaa 540
 ccctggattt ttctcacctc caacctggct tctggagtcc ctgctcgctt cagtggccgt 600
 gggctctggga cctctttctc tctcacaatc agcagcatgg aggtcgaaga tgctgccact 660
 tattactgcc agcagtggag tggttaccca cccatcacat tcggctcggg gacaaagttg 720
 gaaataaaa 729

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 16

<211> 2283

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full Length Canine FAP

<400> 16

atgaagacgt ggtaaaaaat tgtattttgga gttgccacct ctgctgtgct tgctttattg 60
 gtgatgtgca ttgtcttacg tccttcaaga gttcatgact ccgaaggagg tacaacaaga 120
 gcactcacac tggaggatat tttaaatggg acatttacct ataaaacatt ttttccaaac 180

tggatttcag gacaagaata tcttcatcag tctacagata atgatatagt atattacaat 240
 attgaaacag gagaatcata taccattttg agtaatgcc ccatgaaaag tgtgaatgct 300
 tcaaattatg gcttatcacc tgatcgtaaa tttgcatatc tagaaagtga ttattcaaag 360
 ctttggagat acitcttacac tgcaacatat cacatctata acctcaataa tggagagttt 420
 ataagaagaa atgagcttcc tcgtccaatt cagtatttat gctggtcgcc tgttgggagt 480

aaattagcat atgtctatca aaacaataatc tatttgaac aaagaccaga agaccacact 540
 tttcaataa catataatgg aagagaaaat aaaatatcca atggaatccc agactgggta 600

 tatgaagagg aaatgcttgc taaaaacat gctctctggt ggtctcctaa tggaaaattt 660
 ttggcatatg cagaatttaa tgatacagag ataccagtta ttgcctattc ctattatggt 720
 gatgaacaat atcctagaac aataaatatt ccatacccaa aggcctggagc taagaaccct 780
 gtgttcgga tctttattat cgataccact tatcctcagc agacaggctc cagagaagtg 840
 ccagttccag caatgatagc atcaagtgat tattatttca gttggctcac atgggttact 900
 gatgaacgag tatgtttgca gtggctaaaa agaattcaga acgtttcagt tctgtccata 960
 tgtgatttca gggaaggctg gcagacatgg gattgtccaa aggccaggga acatatagaa 1020

 gaaagcagaa ctggatgggc tggatggattc tttgtttcaa caccagtttt cagctatgat 1080
 gccatttcat actacaaaat atttagcgac aaggatggct acaaacatat tcaatatatc 1140
 aaagacactg tggaaaatgc tattcaaat acaagtggca agtgggaggc cataaatata 1200
 ttcagagtaa cacaggattc actgttttat tctagcaatg aatttgaaga ctaccaggga 1260
 agaagaaata tctatagaat tagcatigga agctctctc caagcaaaaa gtgcattact 1320
 tgccatctaa ggaaagaaag gtgccaatat tacacagcaa gtttcagtga ctacgccaag 1380
 tactatgcac ttatctgcta tggcccaggc ctccccattt ccacccttca tgacggccac 1440

 actgatcaag aaattaaaat cctggaagaa aacaaagaat tggaaaatgc tttgaaaat 1500
 atccagctgc ctaaagagga aattaagaaa ctggaagtgg atgatattac tttatggtac 1560
 aagatgatgc ttcttccccg gtttgacaga tcaaagaagt atcccttgct aattcaagtg 1620
 tatggtggtc ccigcagtca gagcgtaaag tctgtattca gtattaattg gatttcttat 1680
 cttgcaagta aggaagggat agtcattgcc ttggtggatg gccaggaac agcttaccaa 1740
 ggtgacaaac tctgtatgc agtatatcga aagctgggtg tttatgaagt tgaggaccag 1800
 atcacagccg tcagaaaatt catagaaatg ggtttcattg atgaaaaag aatagccata 1860

 tgggctggt cctatggagg ctatgtttca tcaactggccc ttgcttcagg aactggtctt 1920
 ttcaaatgtg ggatagcagt ggctcctgtc tccagctggg aatattacgc atctatctac 1980
 acagaacgat tcatgggcct ccaacaaag aacgataatc tcgagcacta caaaaattca 2040
 actgtgatgg caagagcaga atatttcaga aatgtagact atcttctcat ccacggaaca 2100
 gcagatgata atgtgcattt tcaaaactca gcacagattg ctaaagctct ggttaatgca 2160
 caagtggatt tccaggcaat gtggtactct gaccagaacc atggcatacc cggcctgtcc 2220

tcgaagcact tatatacccg catgacccac ttcctaaagc agtgtttttc ttgtccgac 2280

tga 2283

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 HCDR1

<400> 17

Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Tyr Ser Leu His

1 5 10

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 HCDR2

<400> 18

Glu Ile Asn Pro Ala Asn Gly Asp His Asn Phe Ser Glu Lys Phe Glu

1 5 10 15

Ile Lys Ala Thr

20

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 HCDR3

<400> 19

Thr Arg Leu Asp Asp Ser Arg Phe His Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4G5 LCDR2

<400> 20

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> repeat n times, where n represents an integer of at least 1

<400> 21

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(4)

<223> repeat n times, where n represents an integer of at least 1

<400> 22

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> repeat n times, where n represents an integer of at least 1

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 24

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 25

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 26

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 27

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5
 <210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker
 <400> 28

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5
 <210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker
 <400> 29

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5
 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker
 <400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5
 <210> 31
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker
 <400> 31

Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Cys Gly Gly

1 5 10 15

Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Gly Gly Gly

20 25 30

Thr Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Thr

35 40 45

<210> 32

<211

> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Furin cleavage site

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 32

Arg Xaa Lys Arg

1

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Furin cleavage site

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 33

Arg Xaa Arg Arg

1

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Furin cleavage site

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 34

Xaa Arg Xaa Xaa Arg

1 5

<210> 35

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Furin cleavage site

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 35

Arg Xaa Xaa Arg

1

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Furin cleavage site

<400> 36

Arg Gln Lys Arg

1

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 37

atgtagacgt ggtaaaaat tg

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 38

cgtcattctt agtcggacaa

20