



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0132604  
(43) 공개일자 2023년09월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 29/00 (2023.01) A61P 37/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2833 (2013.01)  
A61P 29/00 (2023.02)
- (21) 출원번호 10-2023-7029643(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2016년01월27일  
심사청구일자 2023년08월30일
- (62) 원출원 특허 10-2017-7024072  
원출원일자(국제) 2016년01월27일  
심사청구일자 2020년12월21일
- (85) 번역문제출일자 2023년08월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/NL2016/050064
- (87) 국제공개번호 WO 2016/122320  
국제공개일자 2016년08월04일
- (30) 우선권주장  
2014192 2015년01월27일 네덜란드(NL)

- (71) 출원인  
라바 테라퓨틱스 엔.브이.  
네덜란드, 3584 씨엠 위트레흐트, 예일란 60
- (72) 발명자  
반 데르 플릿, 요하네스 젤르  
네덜란드, 에이치브이 암스테르담 1081, 드 부레란, 스틱팅 브이유-브이유엠씨 1117  
드 그뤼질, 탄자 데니스  
네덜란드, 에이치브이 암스테르담 1081, 드 부레란, 스틱팅 브이유-브이유엠씨 1117  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
이원희

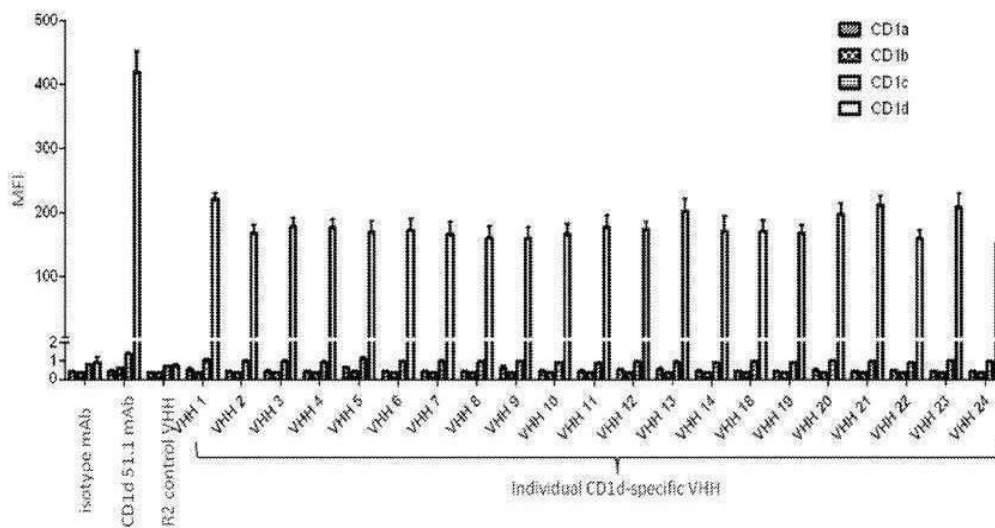
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 CD1d를 표적화하는 단일 도메인 항체

(57) 요약

본 발명은 비표준적인 MHC 단백질 CD1d에 특이적으로 결합하고 CD1d-매개 생물학적 기능을 조절하는 화합물, 특히, 폴리펩타이드에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하거나, 구성하는 화합물 및 폴리펩타이드에 관한 것이고, 상기 적어도 하나의 단일 도메인 항체는 CD1d에 특이적으로 결합한다. 또한 상기 화합물, 폴리펩타이드 및/또는 단일 도메인 항체를 사용하는 방법 및 용도를 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

**A61P 37/00** (2018.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
*C07K 2317/31* (2013.01)  
*C07K 2317/75* (2013.01)

(72) 발명자

**베르헬, 헨드릭 마리노스 빌렘**

네덜란드, 에이치브이 암스테르담 1081, 드  
부레란, 스틱팅 브이유-브이유엠씨 1117

**드 브루인, 르네 코넬리아 제랄다**

네덜란드, 에이치브이 암스테르담 1081, 드  
부레란, 스틱팅 브이유-브이유엠씨 1117

**라미리스, 룰란드**

네덜란드, 에이치브이 암스테르담 1081, 드  
부레란, 스틱팅 브이유-브이유엠씨 1117

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- a) 서열번호 24의 CDR(상보성 결정 영역)1, 서열번호 45의 CDR2, 서열번호 66의 CDR3;
- b) 서열번호 26의 CDR1, 서열번호 47의 CDR2, 서열번호 68의 CDR3;
- c) 서열번호 27의 CDR1, 서열번호 48의 CDR2, 서열번호 69의 CDR3;
- d) 서열번호 29의 CDR1, 서열번호 50의 CDR2, 서열번호 71의 CDR3; 또는
- e) 서열번호 37의 CDR1, 서열번호 58의 CDR2, 서열번호 79의 CDR3; 을 포함하는, CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,  
상기 단일 도메인 항체는 인간 CD1d와 결합하지만,  
인간 CD1a, 인간CD1b 또는 인간 CD1c와는 결합하지 않는 화합물

#### 청구항 3

제1항의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항의 화합물을 코딩하는 핵산 서열.

#### 청구항 5

제1항의 화합물을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 단리된 숙주 세포 또는 비인간 유기체.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 단일 도메인 항체를 추가로 포함하는 제1항의 화합물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 화합물은 이중특이적 또는 다중특이적 화합물인 화합물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 화합물은 항체에 연결된 화합물.

#### 청구항 9

서열번호 37의 CDR1;  
서열번호 58의 CDR2; 및  
서열번호 79의 CDR3;을 포함하는,  
CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 단일 도메인 항체를 추가로 포함하는 화합물.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 상기 화합물은 이중특이적 또는 다중특이적 화합물인 화합물.

**청구항 12**

제9항에 있어서, 상기 화합물은 항체에 연결된 화합물.

**청구항 13**

제9항의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 자가면역 질환 또는 염증성 질환의 치료용 약학적 조성물.

**청구항 14**

제9항의 화합물을 코딩하는 핵산 서열.

**청구항 15**

제9항의 화합물을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 숙주 세포 또는 비인간 유기체.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 일반적으로 면역학 분야, 더 특별하게는, 자연살생 T 세포(자연적 killer T, NKT)를 포함하는 CD1d-제한 T 세포(CD1d-restricted T cells)의 활성화 및 CD1d 발현 세포의 기능 조절과 같은 CD1d-매개 생물학적 기능을 조절하는 항체를 포함하는, 인간 CD1d에 결합한 단일 도메인 항체(single domain antibody) 분야에 관한 것이다. 예를 들어, CD1d에 결합하는 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물, 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하는 상기 화합물 및 상기 화합물을 포함하는 (약학)조성물의 용도를 제공한다.

**배경 기술**

[0002] CD1d는 항원 제시 세포(antigen presenting cells, APC)를 포함한 다양한 인간 세포의 표면에 발현되는 당단백질(CD1a, CD1b, CD1c, CD1d 및 CD1e를 포함)의 CD1(분화의 클러스터(cluster of differentiation) 1) 구성원이다. 인간에서 CD1d는 R3G1으로 알려진 CD1D에 의해 암호화된다. CD1d를 나타내는 APC는 랑게르한스 세포(Langerhans cells), (활성화된)B-세포, 수지상 세포(dendritic cells)(예, 림프절에서), 및 (활성화된)혈액 단핵구(monocytes)를 포함한다. CD1d는 또한, 예를 들어, 간, 췌장, 피부, 신장, 자궁, 결막(conjunctiva), 부고환, 흉선 및 편도에서 다양한 다른 세포 유형에 의해 발현된다(예를 들어, Canchis 등(1992) Immunology 80 : 561-565).

[0003] CD1d를 통해 활성화/촉진된 세포는 자연살생 T 세포(NKT cells)를 포함한다. NKT 세포는 T 세포와 자연살생 세포(natural killer cells)의 특성을 공유하는 T 세포의 이질적인(heterogeneous) 군이다. NKT 세포는 알파/베타 T-세포 수용체 (TCR)를 발현하는 T 세포의 부분집합(subset)이며 전형적으로 NKT 세포와 관련된 다양한 분자 마커이다.

[0004] 타입 1 또는 불변의(invariant) NKT 세포는 NKT 세포 중 가장 잘 알려진 군이며, 그들의 T-세포 수용체가 다양성 면에서 훨씬 제한적(invariant)이라는 점에서 종래의  $\alpha\beta$  T 세포와는 차이가 있다. 이들 불변 및 다른 CD1d-제한 T 세포(유형 2 NKT)를 포함하는 NKT 세포는 APC에 존재하는 CD1d 분자에 의해 제시되는 (자신 또는 외부의)지질 및 당지질을 인식한다. (지질 제시)CD1d 및 TCR 사이의 상호 작용은 인터페론-감마, 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor)-알파, 및 IL-4, IL-5 및 IL-13과 같은 인터루킨과 같은 Th1- 또는 Th2- 유사 사이토카인을 포함하는 사이토카인의 방출을 유발한다.

[0005] 서로 다른 지질은 미콜산(mycolic acids), 디아실글리세롤(diacylglycerols), 및 스펅고지질을 포함한 CD1d 분자에 결합하는 것으로 나타났다. 알파-갈락토실세라미드인 KRN7000은 시험관 내 및 생체 내 NKT 세포 활성화에서 지질-결합 CD1d의 가장 잘 연구된 리간드이다. 다른 리간드는 이소글로보트리헥소실세라미드(isoglobotrihexosylceramide), (미생물 유래)글루쿠노실세라미드(glycuronosylceramides), 알파-C-갈락토

실세라마이드, 트레itol세라마이드(threitol ceramide) 및, 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine) 및 리소스핑고미엘린(lysosphingomyelin)과 같은 다양한 (인간 및 비-인간)당지질을 포함한다(예를 들어, Fox 등 (2009) PLOS Biology 7 : 10 : e1000228).

[0006] NKT 세포의 중요한 역할은 자가 면역, 알레르기, 항균 및 항종양 면역 반응의 조절에서 입증되었다(van der Vliet 등(2004) Clinical Immunology 112 (1) : 8-23). 생리학적으로, NKT 세포는 다발성 골수종 세포에서 세포 사멸의 유도를 포함한, 상황에 따른 다양한 메커니즘을 통해 항종양, 자가 면역 및 항-병원균 반응을 포함한 면역 반응을 보강 또는 억제 할 수 있다(Yue 등. (2010) The Journal of Immunology 184 : 268-276). NKT 세포가 연관될 수 있는 조건은 중증 근무력증(myasthenia gravis), 건선(psoriasis), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 원발성 담즙성 간경변(primary biliary cirrhosis), 대장염, 자가 면역 간염, 죽상 동맥 경화증(atherosclerosis) 및 천식을 포함하는 자가 면역 또는 염증성 질환을 포함한다. 사이토카인의 방출 외에도, 퍼포린(perforin)의 방출 및 그랜자임(granzyme)의 방출 및 세포 사멸과 같은 세포 용해를 이끄는 NKT 세포 작동 인자(effector) 기능은 암과 같은 NKT 세포가 관여하는 조건에서도 관련될 수 있다. 따라서, CD1d-매개 효과의 조절은 잠재적인 치료의 유익이 있다.

[0007] 가능한 한 특이적으로 CD1d와 결합 및/또는 상호 작용할 수 있는, 즉, 시험관 내 및 생체 내에서 CD1-패밀리의 다른 구성원과 최소한으로 또는 결합하지 않는 화합물에 대한 지속적인 요구가 있어왔다. 특히, NKT 세포 활성화와 같은, 그러나 이에 국한되지 않는, CD1d를 수반하는 생물학적 기능을 결합 및/또는 조절(활성화 또는 억제) 할 수 있는 화합물이 필요하다. 상기 화합물은 예를 들어, CD1d-매개 기능이 역할을 담당하는 다양한 질병에서 유익함을 나타낼 수 있다.

[0008] 본 발명은 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물을 제공한다. 단일 도메인 항체는 인간 CD1d과 결합한다. 인간 CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체는 본 명세서에 교시된 바와 같은 아미노산 서열의 CDR1, CDR3 및 CDR3 영역 및 이의 보존적 서열 변형(conservative sequence variant)을 포함한다.

[0009] 바람직하게 단일 도메인 항체는 예를 들어, 표 1에 나타난 바와 같이, 본 명세서에 교시된 바와 같은 조합의 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 갖는다.

[0010] 좀 더 바람직하게, 단일 도메인 항체는 서열번호 1 내지 21의 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0011] 본 발명에 따른 화합물은 인간 CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체가 화합물에 포함되는 한, 임의의 종류의 화합물, 예를 들어, 복합체일 수 있다. 바람직하게 화합물은 폴리펩타이드이다. 특정 구체예에서, 화합물은 인간 CD1d와 결합한 단일 도메인 항체로만 구성될 수 있다. 다른 구체예에서, 화합물은 인간 CD1d 및 라벨과 결합한 단일 도메인 항체로 구성될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 화합물은 약학 활성제 및/또는 다른 항체와 연결된 인간 CD1d에 결합된 단일 도메인 항체를 포함 할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명에 따른 의학적 치료 및/또는 진단 물질로서의 화합물의 용도를 제공한다.

[0013] 또한, 본 명세서에 교시된 바와 같은 화합물을 포함하는 약학 조성물, 뉴클레오타이드 서열 및 본 발명에 따른 화합물을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1: 개별적으로 선택된 나노체(nanobodies)의 CD1d-특이성.

이소타입 대조군 mAb(IgG2b), 항-CD1d 51.1 mAb, R2 음성 대조군 VHH, 및 개별 CD1d-특이적 VHH와의 결합을 검출하기 위해 유세포 분석기가 사용되었다. 데이터는 CD1a, CD1b, CD1c 및 CD1d 형질 전환 종양 세포주에 대한 결합을 증명한다(n = 3).

도 2: CD1d-특이적 나노체에 의한 moDC 성숙 및 사이토카인 생산의 유도.

미성숙한 moDC를 CD1d-특이적 나노체와 함께 배양하였다. 24시간 후, 사이토카인 생산의 검출(ELISA)을 위해 상층액을 회수하였다. 72시간 후, 유세포 분석기를 사용하여 성숙 마커 CD83의 세포 표면 발현을 분석하였다. NC= 음성 대조군(negative control), PC= 양성 대조군(positive control), IgG2b= 이소타입 대조군 mAb, 51.1= 항-CD1d 51.1 mAb, LPS= 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide), LPS-PMB= 폴리믹신 B(polymyxin B)포함 리포폴리사카라이드. 데이터는 평균 + SEM, n= 3을 나타낸다.

도 3: α-GalCer 유도성 iNKT 세포 활성화의 억제.

CD1d-형질 전환 HeLa 세포를 비히클(vehicle) 대조군(veh) 또는  $\alpha$ -GalCer(모든 다른 조건)으로 밤새 자극화(pulsed)하였다. 세척 후, 비히클 또는  $\alpha$ -GalCer로 자극화된 HeLa-CD1d에 iNKT 세포를 추가하여 2시간 동안, IgG2b 이소타입 대조군 mAb, 항-CD1d 51.1 mAb, 음성 대조군 VHH R2, 또는 중화된 항-CD1d VHH(VHH 24(18-29c))과 함께 배양하였다. 24시간 후, 유세포 분석기를 사용하여 iNKT 세포 활성화(CD25 발현)를 측정하였다. 데이터는 3회 실험의 평균 + SEM을 나타낸다. 항-CD1d VHH에 의한 iNKT 세포 활성화의 우수한 증가.

도 4: iNKT 세포 활성화의 유도.

CD1d-형질 전환 C1R 세포를 교시된 바와 같이 비히클 대조군 또는  $\alpha$ -GalCer로 밤새 자극화하였다. 세척 후, 비히클 또는  $\alpha$ -GalCer로 자극화된 C1R-CD1d에 iNKT 세포를 첨가하여 2시간 동안, 특이적 항-CD1d VHH의 유/무 조건에서 함께 배양하였다. 24시간 후, 유세포 분석기를 사용하여 iNKT 세포 활성화(CD25 발현)를 측정하였다.  $\alpha$ -GalCer에 의한 iNKT 세포의 활성화, 항-CD1d VHH(VHH12 (18-14b))와 함께 배양한 후 더욱 현저해짐을 나타내는 유세포(flow cytometric) 점도표(dotplots). 데이터는 다수의 CD1d-발현 종양 세포주를 이용한 다수의 실험을 나타낸다.

도 5: 항-CD1d 나노체에 의한 아넥신(annexin) V 결합의 유도.

C1R 세포, CD1d-형질 전환 C1R 세포(좌측 패널) 및, MM.1s 세포 및 CD1d-형질 전환 MM.1s 세포(우측 패널)를 24시간 동안 IgG2b 이소타입 대조군 mAb, 항-CD1d 51.1 mAb, 음성 대조군 VHH R2, 또는 CD1d-특이적 VHH(VHH19(19-23G))와 함께 배양하였다. 초기 세포 사멸을 암시하는 아넥신 V에 결합하는 표적 세포의 백분율을 유세포 분석기로 측정하였다. 데이터는 3회 실험의 평균 + SEM을 나타낸다.

도 6: 플레이트 결합  $\beta$ 2m-인간 CD1d( $\pm$  비히클,  $\alpha$ -GalCer 및/또는 항-CD1d VHH)를 사용한 iNKT 세포 활성화의 유도.

96-웰 플레이트를  $\beta$ 2m-hCD1d(비히클 대조군 또는  $\alpha$ -GalCer가 포함)에 결합된 항-EGFR VHH으로 구성된 이중 특이적 구성체로 코팅하였다. 코팅된 플레이트를 항-CD1d VHH(VHH12)의 존재 또는 부재의 조건에서 iNKT 세포를 첨가하여 2시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 유세포 분석기를 사용하여 iNKT 세포 활성화(CD25 발현)를 측정하였다.  $\alpha$ -GalCer-포함  $\beta$ 2m-hCD1d에 의한 iNKT 세포의 미세한 활성화와  $\alpha$ -GalCer-포함  $\beta$ 2m-hCD1d를 항-CD1d VHH(VHH12(18-14b))과 함께 배양한 후 강해진 활성을 나타내는 유세포 점도표

도 7: CD1d- $\alpha$ -GalCer 매개 iNKT 세포 활성화의 용량 의존적 저해.

iNKT CD25 발현, IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$ 의 생산은 배지(비히클 및  $\alpha$ -GC(GalCer)), 항-CD1d mAb 51.1(10 $\mu$ g/ml), 대조군 VHH(500 nM) 또는 항-CD1d VHH(VHH24; 500 nM)와 함께 비히클 대조군 또는  $\alpha$ -GalCer(모든 다른 조건)으로 자극화된 CD1d-형질 전환 HeLa 세포를 iNKT와 24시간 동안 배양한 후 측정되었다. iNKT 세포에서 CD25 발현을 보여주는 그래픽 표현 (a). IFN- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  생산에 대한 항-CD1d VHH(● 기호) 및 대조군 비-저해성(non-inhibitory)이지만 CD1d-특이적인 VHH(▲ 기호)의 농도 의존적 효과. ◆는 대조군 조건 (b)가 포함된 비히클을 의미한다. 평균 + SD, n= 3, \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001. 실험에 사용된 VHH는 VHH24이다.

도 8: 항-CD1d VHH12에 의한 용량 의존적 iNKT 세포 활성화.

CCRF-CEM(T-ALL, CD1d 양성(positive); n= 4) 및 CD1d-형질 전환 MM.1s(다발성 골수종; n= 3)세포는 비히클 대조군 또는  $\alpha$ -GC으로 자극화되고, 항-CD1d VHH 및 대조군과 함께 배양되며, iNKT CD25 발현이 측정된 이후 24시간 동안 iNKT와 함께 배양되었다. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 (도 4와 비교하여)

도 9: iNKT 세포 탈과립의 유도(왼쪽) 및 CD1d+ 종양 세포주에 대한 세포독성(오른쪽).

CCRF-CEM 세포(CD1d 양성)는 비히클 대조군 또는  $\alpha$ -GC로 자극화되고, 항-CD1d VHH 및 대조군과 함께 배양되며, 6, 12 또는 18시간으로 표시된 시간 동안 iNKT(E:T 비율 1:2)와 함께 배양되었고, 유세포 분석기 사용을 위해 CD107a(t= 4시간) 또는 아넥신 V 및 7-AAD로 염색되었다. N= 5; \*p<0.05; \*\*\*p<0.001. 나타난 항-CD1d VHH는 VHH12이다.

도 10: CD1d+ 원발성(primary) 다발성 골수종 세포에 대한 iNKT 세포독성의 유도.

MM 환자의 해동한 원발성 골수 샘플을 비히클 대조군 또는  $\alpha$ -GC로 자극화하거나 항-CD1d VHH 및 대조군과 함께 배양한 다음, 살아남은 MM 세포의 백분율이 측정된 이후, 표시된 시간(8 및 16 시간) 동안 iNKT와 함께 배양되었다. 나타난 항-CD1d VHH는 VHH12이다.

도 11: 항-CD1d VHH12에 의한 iNKT 세포 사이토카인 생산의 유도.

사이토카인 생산의 검출을 위해, HeLa-CD1d 세포를 비히클 대조군, OCH(알파-갈락토실세라미드의 절단 유도체 스펅고신(sphingosine truncated analog of alpha-galactosylceramide(alpha-GC)); iNKT 세포에서 Th2- 사이토카인 생산을 유도하는 것으로 알려진 당지질) 또는  $\alpha$ -GC로 자극화하고, 항-CD1d VHH 및 대조군과 함께 배양하였으며, 상층액을 사이토메트릭 비즈 어세이(Cytometric Bead Assay; CBA)로 분석한 이후 24시간 동안 iNKT와 함께 배양하였다. N= 4; \*p<0.05; \*\*\*\*p<0.0001.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**정의**

[0015]

이하의 설명 및 실시예에서는 다수의 용어가 사용된다. 상기 용어에 있어주어진 범위를 포함하는 명세서 및 청구항에 대한 명확하고 일관된 이해를 돕기 위해, 다음의 정의가 제공된다. 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌의 교시는 그 전체가 본 명세서에 참고로서 포함된다.

[0016]

본 발명의 방법에 사용된 종래의 기술을 수행하는 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 분자 생물학, 생화학, 전산화학, 세포 배양, 재조합 DNA, 생물정보학, 유전체학, 서열 분석 및 이와 관련된 분야에서의 종래 기술의 실행은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 안내서(handbooks)에서도 논의된다.

[0017]

본 명세서 및 이의 청구항에서, "포함하다(to comprise)"라는 동사와 이의 활용은 비제한적 의미로 사용되어 그 단어 뒤에 나오는 항목들이 포함되는 것을 의미하나, 특이적으로 언급되지 않은 항목은 제외되지 않는다. 이는 동사, " ~로 구성된(consisting of)" 뿐만 아니라, "본질적으로 구성되는(consisting essentially of)" 을 포함한다.

[0018]

본 명세서에서 사용된 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 맥락상 다르게 언급되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 예를 들어, "a" 화합물(compound)을 사용하는 방법은 이 화합물의 복수를 사용하는 것을 포함한다(예, 10, 100, 1000, 1만, 10 만, 100 만, 또는 그 이상의 분자).

[0019]

용어 "정렬하는(aligning)" 및 "정렬(alignment)"은 동일하거나 유사한 아미노산의 짧거나 또는 긴 뻗기(stretches)의 존재에 근거한 2 또는 그 이상의 분자/화합물의 비교(comparison) 또는 아미노산 서열을 의미한다. 하기에 추가로 설명되는 바와 같이, 아미노산 서열 정렬의 여러 가지 방법이 당업계에 알려져 있다.

[0020]

"서열 동일성"은 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열의 동일성의 척도이다. 일반적으로, 서열은 정렬되어 가장 높은 순서의 일치율을 얻는다. "동일성" 그 자체는 예술 인식(art-recognized)의 의미를 가지며, 공개된 기술을 사용하여 계산할 수 있다. 두 서열 간의 동일성(identity) 또는 유사성(similarity)을 결정하기 위해 통상적으로 사용되는 방법은 GUIDE TO HUGE COMPUTERS, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J. Applied Math (1988) 48:1073에 교시된 바를 포함한다. 이에 제한되지는 않는다. 동일성과 유사성을 결정하는 방법은 컴퓨터 프로그램으로 성문화될 수 있다. 두 서열 간의 동일성 및 유사성을 결정하기 위한 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법은 GCS 프로그램 패키지 (Devereux, J. 등, Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. 등, J. Molec. Biol. (1990) 215:403)에 교시된 바를 포함한다. 이에 제한되지는 않는다. 본 명세서에 교시된 바와 같은 서열 동일성은 유사한 아미노산의 수의 백분율을 계산함으로써 결정되며(참조 서열 내 모든 아미노산의 수로 나눈 참조 서열과 유사한 아미노산의 수), 하기 단락에 본질적으로 교시되어 있다.

[0021]

예로서, 서열번호 1의 참조 아미노산 서열에 대해 예를 들어, 적어도 70%의 "서열 동일성" 아미노산 서열에 의하면, 폴리펩타이드 서열이 서열번호 1의 참조 아미노산의 10개 아미노산마다 3개까지의 아미노산 변형을 포함할 수 있다는 점을 제외하고는 아미노산 서열이 참조 서열과 동일함을 의미한다. 따라서, 참조 아미노산 서열에 대한 아미노산 서열의 동일성 백분율은 참조 아미노산 서열의 전체 길이(full length)에 걸쳐 계산된다. 달리 말하면, 참조 아미노산 서열과 적어도 70% 일치하는 아미노산 잔기를 얻기 위해, 참조서열 내 아미노산 서열의 30%까지가 결실되거나 다른 아미노산으로 치환되고 또는 참조서열의 총 아미노산 잔기의 30%까지의 다수의 아미노산이 참조서열에 삽입될 수 있다. 참조서열의 이러한 변경은 참조서열 내 잔기 중 또는 참조서열 내의 하나 또는 그 이상의 인접한 군 내에서 개별적으로 산재되어, 참조 아미노산 서열의 아미노 또는 카복시(carboxy) 말단 위치 또는 이의 말단 위치 사이의 어디에서든 발생할 수 있다.

[0022]

- [0023] 용어, "아미노산 서열" 또는 "단백질" 또는 "펩타이드"는 특이적 작용, 크기, 3차원 구조 또는 기원에 대한 언급없이 아미노산 사슬로 구성된 분자를 의미한다. 이의 "단편(fragment)" 또는 "부분(portion)"은 여전히 "아미노산 서열" 또는 "단백질" 또는 "펩타이드"를 의미한다. "분리된 아미노산 서열"은 특정 서열을 지닌 아미노산 사슬을 의미하는데 사용되고, 예를 들어, 시험 관 내 또는 재조합 세균 또는 인간 숙주세포 내에서 더이상 고유의 자연적 환경에 존재하지 않는다.
- [0024] 각각의 면역글로불린(immunoglobulin) 분자는 가변 도메인을 갖는다. 면역글로불린 분자의 가변 도메인은 초가변(hypervariable, HV) 및 골격(framework, FR) 영역으로 나뉜다. 초가변성(hypervariability) 지역은 상보성 결정 영역(complementarity determining regions, CDR)을 의미한다. 면역글로불린 분자는 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 갖는다. 훨씬 적은 가변 아미노산 서열을 갖는 4개의 골격 영역이 CDR 영역을 구분시킨다. CDR 영역은 CD1d와 같은 항원에 직접 결합할 수 있다.
- [0025] **설명**
- [0026] 본 발명은 일반적으로, 인간 CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물에 관한 것이다. 본 발명자들은 인간 CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체 및 이의 항원-결합 부분을 확인하였다.
- [0027] 첫 번째 측면에서, 인간 CD1d에 결합하는 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하고, 상기 단일 도메인 항체가 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하며, 상기 CDR1이 서열번호 22와 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 CDR2가 서열번호 43과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0028] 앞서 교시한 바와 같이, CD1d(Entrez Gene ID 912; NCBI 참조서열: NP\_001757; Balk 등. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:252-256)은 만성 림프성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia) 환자의 B 세포, 간세포, 수지상 세포 및 종양 세포를 포함한 다양한 세포에서 발현된다. 그리고 본 명세서에 교시된 바와 같은 단일 도메인 항체는 CD1d와의 결합에 사용될 수 있고, 예를 들어, 이들 세포 중 어느 하나에서의 CD1d에 대한 결합 또는 타 CD1d발현 세포에서의 CD1d와의 결합 또는, 세포와 결합되지 않은 CD1d 분자와의 결합, 및 어떤 것에도 결합되어 있지 않거나, 또는 예를 들어 담체, 폴리머 또는 다른 단백질과 연결 또는 연관된 CD1d 와의 결합에 사용될 수 있으나 여기에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 인간 CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물은 CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함하는 한, 임의의 종류의 화합물 또는 복합체일 수 있다. 본 발명에 따른 화합물은 바람직하게, 인간 CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체의 존재로 인해 인간 CD1d에 결합할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 화합물은 다른 기능 또는 비 기능성 군을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 단일 도메인 항체는 나노입자, 리포솜, 바이러스, 라벨, 다른 항체 또는 단백질 구조(예, 수용체)에 연결될 수 있거나 또는 항원, 펩타이드, 약물, 마커 또는 핵산에 결합될 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 CD1d 발현 세포의 분리를 허용하는 자성 비즈(magnetic bead)를 포함할 수도 있다.
- [0031] CD1d 단일 도메인 항체는 항체의 카복실 또는 아미노 말단을 통해 연결될 수 있거나, 카복실 또는 아미노 말단 이외의 위치에서 연결될 수 있다. CD1d 단일 도메인 항체에 대한 부착은 예를 들어, 중간 서열, 또는 링커 아미노산 서열, 링커 분자 또는 화학 결합을 통하지 않을 수 있다. 예를 들어, 결합(coupling)은 물리적 및/또는 화학적 유형일 수 있다.
- [0032] 하나의 구체예에서, 화합물은 이중 특이적(bi-specific) 항체 또는 다중 특이적(multi-specific) 항체이다. 하나의 구체예에서, 화합물은 2가(bivalent) 항체 또는 다가(multivalent) 항체이다. 2가성(Bivalency) 또는 다가성(multi-valency)은 항체가 큰 결합력(avidity)으로 다중 결합성(multimeric) 항원에 결합하는 것을 허용할 수 있다; 이중 특이성 또는 다중 특이성은 2개의 항원의 교차 결합을 허용한다.
- [0033] 인간 CD1d에 결합하는 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물은 상기 단일 도메인 항체가 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하며, 상기 CDR1이 서열번호 22와 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 CDR2가 서열번호 43과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0034] 단일 도메인 항체(sdAb, 개발자(developer)인 Ablynx는 나노체(Nanobody)라고도 지칭, 또는 VHH)는 당업자에게 잘 알려져 있다. 단일 도메인 항체는 상보성 결정 영역이 단일 도메인 폴리펩타이드의 일부인 항체이다. 단일 도메인 항체는 단일 상보성 결정 영역 1(CDR1), 단일 CDR2 및 단일 CDR3를 포함한다. 단일 도메인 항체의 예로

는 중쇄(heavy chain)만의 항체, 경쇄(light chains)를 자연적으로 포함하지 않는 항체, 종래의 항체로부터 유래된 단일 도메인 항체 및 조작된(engineered) 항체를 들 수 있다.

- [0035] 단일 도메인 항체는 마우스, 인간, 낙타, 라마, 염소, 토끼 및 소를 포함하는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 자연적으로 발생하는 VHH 분자는 예를 들어, 낙타, 단봉낙타(dromedary), 알파카 및 구아나코(guanaco) 등의 낙타 종에서 생성된 항체로부터 유래될 수 있다.
- [0036] 모든 항체와 마찬가지로, 단일 도메인 항체는 특이적 항원에 선택적으로 결합할 수 있다. 단일 도메인 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 및 골격 영역을 갖는 면역글로불린 사슬의 가변 도메인만을 포함할 수 있다. 오직 약 12 내지 15 kDa의 분자량으로, 나노체(nanobodies)는 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄로 구성된 일반적인 항체(150 내지 160 kDa)보다 훨씬 작다.
- [0037] CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 종 간에 서로 교환될 수 있다. 예를 들어, 라마 면역글로불린 분자로부터, CDR 서열로부터 유래된 특이성을 갖는 인간 면역글로불린 분자를 수득하기 위해, CDR 서열이 선택되고 인간 면역글로불린 분자 내 CDR 서열로 교환될 수 있다. 인간 서열은 고유의 라마 골격 서열과 비교하여 인간에 대한 면역성(immunogenic)이 적기 때문에 유리할 수 있다. 이러한 CDR 서열의 교환은 인간화(humanization)로서 알려져 있다.
- [0038] 따라서, 본 발명에 따른 면역글로불린 분자는 인간 유래의 면역글로불린 서열 또는 라마 유래의 면역글로불린 서열을 가질 수 있고, 인간 CD1d 결합을 제공하기 위해 본 발명에 따른 CDR 서열로 치환된 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 가질 수도 있다. 달리 말하면, 본 발명에 따른 화합물은 본 명세서에서 교시된 바와 같은 CDR들을 갖는 인간화된 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 단일 도메인 항체는 인간 골격(flamework) 서열 및 본 명세서에 교시된 바와 같은 CDR 영역을 가질 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 화합물 내에 포함된 단일 도메인 항체는 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하고, 상기 CDR1이 서열번호 22와 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 CDR2가 서열번호 43과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0040] 서열번호 22의 서열은 본 명세서의 표 1에 17-1E로 기재되는 단일 도메인 항체의 CDR1의 서열에 상응한다. 본 발명의 목적을 위해, 단일 도메인 항체 17-1E는 또한, VHH 번호 1로 지칭될 수 있다. 단일 도메인 항체 17-1E의 서열은 서열번호 1로 나타내며, 표 1에 나타낸 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열에 추가하여 골격 서열을 포함한다.
- [0041] 서열번호 43의 서열은 본원의 표 1의 17-1E로 기재되는 단일 도메인 항체의 CDR2 서열에 상응한다.
- [0042] 본 명세서에 교시된 모든 단일 도메인 항체 및, 예를 들어, 표 1에 기재된 바와 같이, CDR1 앞 영역은 골격영역(FW) 1로 지칭되고, CDR1과 CDR2 사이의 영역은 FW2로 지칭되고, CDR2와 CDR3 사이의 영역은 FW3으로 지칭되고, CDR3 이후의 영역은 FW4로 지칭될 수 있다. 각각의 개별 골격영역 FW1, FW2, FW3 또는 FW4는 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 전체 단일 도메인 항체의 서열에 기초하여 용이하게 확립될 수 있고, 하기에 교시되었다.
- [0043] 놀랍게도, 얻어진 다양한 단일 도메인 항체가, 다양한 단일 도메인 항체의 CDR1 및 CDR2와 관련하여, 높은 아미노산 서열 동일성을 공유함이 확인되었다. 확인된 단일 도메인 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 표 1에 기재하였다. 예를 들어, 표 1에 19-23G로 기재되는 단일 도메인 항체는 VHH 번호 19를 가지며, 서열번호 37에 상응하는 서열을 가진 CDR1, 서열번호 58에 상응하는 서열을 가진 CDR2 및 서열번호 79에 상응하는 서열을 가진 CDR3의 조합을 갖는다. 이 VHH의 골격영역을 포함하는 전체 서열은 서열번호 16이다.
- [0044] 그러나, 본 발명에 따르면, 단일 도메인 항체는 CDR1이 서열번호 22와 적어도 60%의 서열 동일성을 나타내고 CDR2가 서열번호 43과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 한, CDR1, CDR2 및 CDR3의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단일 도메인 항체가 첫 번째 VHH(예를 들어, VHH nr 10)의 표 1에 나타낸 바와 같은 CDR1 및 두 번째 VHH(예를 들어, VHH nr 20)의 표 1에 나타낸 바와 같은 CDR2를 포함하는 것 또한 고려되었다.
- [0045] 달리 말하면, 당업자가 본 명세서에 기초하여, 본 발명에 따른 인간 CD1d에 결합하는 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물로서, 상기 단일 도메인 항체의 CDR1이 서열번호 22와 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 단일 도메인 항체의 CDR2가 서열번호 43과 적어도 60%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 화합물을 어려움 없이 제공할 수 있음이 인식될 것이다. 예를 들어, 표 1에 기재된 다양한 CDR1 및 CDR2에 기초한다.

- [0046] 바람직한 구체예에서, 전체 길이에 걸친 CDR1은 서열번호 22와 적어도 60%의 서열 동일성을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 전체 길이에 걸친 CDR2는 서열번호 43과 적어도 60%의 서열 동일성을 나타낸다. 바람직하게, 전체 길이에 걸친 CDR1은 서열번호 22와 적어도 60%의 서열 동일성을 나타내고, 전체 길이에 걸친 CDR2는 서열번호 43과 적어도 60%의 서열 동일성을 나타낸다. 바람직하게, CDR1 및/또는 CDR2는 서열번호 22 및/또는 서열번호 43 각각에 대해 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%의 동일성을 나타낸다.
- [0047] 또한, 인간 CD1d에 결합하는 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물을 제공하고, 상기 단일 도메인 항체는 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR을 포함하며, 상기 CDR1은 서열번호 22와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 CDR2는 서열번호 43과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 상기 CDR3은 서열번호 64와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다; 또는 상기 CDR1은 서열번호 33 및 42로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, CDR2는 서열번호 54 및 63으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, CDR3은 서열번호 75 및 84로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0048] 본 발명에 따른 화합물 내에 포함될 수 있는, 제공된 단일 도메인 항체 내에서 CDR1에 대해 서열번호 22와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열, CDR2에 대해 서열번호 43과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 CDR3에 대해 서열번호 64와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 보이는 군이 존재함이 확인되었다. 이들 단일 도메인 항체는 각각의 상보성 결정 영역에 대해 높은 수준의 동일성을 공유한다. 바람직한 구체예에서, 전체 길이에 걸친 CDR1은 서열번호 22와 적어도 90%의 서열 동일성을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 전체 길이에 걸친 CDR2는 서열번호 43과 적어도 80%의 서열 동일성을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 전체 길이에 걸친 CDR3은 서열번호 64와 적어도 70%의 서열 동일성을 나타낸다. 바람직하게, 전체 길이에 걸친 CDR1은 서열번호 22와 적어도 90%의 서열 동일성을 나타내고, 전체 길이에 걸친 CDR2는 서열번호 43과 적어도 80%의 서열 동일성을 나타내고, 및 전체 길이에 걸친 CDR3은 서열번호 64와 적어도 70%의 서열 동일성을 나타낸다. 바람직하게, CDR1은 서열번호 22와 적어도 90%, 92%, 95%, 97%, 99%의 동일성을 나타내고, CDR2는 서열번호 43과 적어도 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99%의 동일성을 나타내고, 및 CDR3은 서열번호 64와 적어도 70%, 72%, 75%, 78%, 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 99%의 동일성을 나타낸다.
- [0049] 본 발명에 따르면, 바람직한 구체예에서, 단일 도메인 항체가 CDR1이 서열번호 22와 적어도 90%의 서열 동일성을 나타내고, CDR2가 서열번호 43과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 및 CDR3이 서열번호 64와 적어도 70%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 한, CDR1, CDR2 및 CDR3의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단일 도메인 항체가 첫 번째 VHH(예를 들어, VHH nr 10; 서열번호 31)의 표 1에 나타낸 바와 같은 CDR1, 두 번째 VHH(예를 들어, VHH nr 20; 서열번호 59)의 표 1에 나타낸 바와 같은 CDR2, 및 첫 번째 또는 두 번째 VHH 또는 세 번째 VHH(예를 들어, VHH nr 21; 서열번호 81)의 표 1에 나타낸 바와 같은 CDR3를 포함하는 것 또한 고려되었다.
- [0050] 달리 말하면, 당업자가 본 명세서에 기초하여, 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 인간 CD1d에, 다른 CDR1, CDR2 및 CDR3를 조합함으로써 결합하는 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물로서, 상기 단일 도메인 항체의 CDR1이 서열번호 22와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 단일 도메인 항체의 CDR2가 서열번호 43과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하며, 단일 도메인 항체의 CDR3이 서열번호 64와 적어도 70%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 화합물을 어려움 없이 제공할 수 있음이 인식될 것이다. 예를 들어, 표 1에 기재된 다양한 CDR1, CDR2 및 CDR3에 기초한다.
- [0051] 다른 바람직한 구체예에서, 인간 CD1d에 결합하는 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하고, 상기 단일 도메인 항체는 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하며, 상기 CDR1은 서열번호 33 및 42로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, CDR2는 서열번호 54 및 63으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, CDR3은 서열번호 75 및 84로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0052] 바람직하게, 본 명세서에 교시된 바와 같은 인간 CD1d에 결합하는 적어도 하나의 단일 도메인 항체를 포함하고, 상기 단일 도메인 항체는 표 1의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형(conservative sequence variants)에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 화합물을 제공한다.
- [0053] 비록, 제공된 다른 서열(다양한 골격서열 및 단일 도메인 항체의 전체길이 서열 포함)뿐만 아니라, 본원에서 교시된 바와 같은 다양한 CDR1, CDR2, CDR3에 기초한 다양한 단일 도메인 항체를 당업자가 준비할 수 있음이 인식될 것이나, 단일 도메인 항체는 바람직하게 표 1의 조합, 및 이의 보존적 서열 변형(conservative sequence variants)에 나타낸 CDR1, CDR2 및 CDR3를 갖는다. 달리 말하면, 본 발명에 따른 화합물은 단일 도메인 항체를

포함하며, 바람직하게, 상기 CDR1 및 CDR2 및 CDR3은 표 1에 나타낸 바와 동일한 하나의 VHH이다. 예를 들어, 단일 도메인 항체는 표 1에 예로 나타낸 VHH1, VHH2, VHH3 ... VHH14, VHH18, VHH19 ... VHH24과 같이 동일한 VHH의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 갖는다. 특히, 조합에서 나타낸 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3(즉, 동일한 VHH로부터의)은 유익한 CD1d 결합을 나타내는 것이 확인되었다. 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 표 1에 교시된 바와 같은 CDR1, CDR2 및 CDR3 조합의 보존적 서열 변이체 또한 포함되었다.

[0054] 실제로 두 개의 아미노산 서열 사이의 서열 동일성의 정도를 결정하거나 단일 도메인 항체에서 CDR1, CDR2 및 CDR3 조합을 확립하는데 있어서, 당업자는 소위 "보존적(conservative)" 아미노산 치환을 고려할 수 있으며, 이는 일반적으로 아미노산 잔기가 유사한 화학 구조의 다른 아미노산 잔기로 치환되고, 이는 폴리펩타이드의 기능, 활성 또는 다른 생물학적 특성에 거의 또는 본질적으로 영향을 주지 않는, 아미노산 치환으로 기재될 수 있다. 이러한 보존적 아미노산 치환은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 WO 04/037999, WO 00/46383, WO 01/09300 및 WO 04/037999로부터 유래한다. 보존적 치환은 바람직하게, 하기의 군 (a) 내지 (e) 내의 하나의 아미노산이 치환된 치환체이다: 아미노산 잔기는 동일한 군 (a) 내지 (e) 내의 또 다른 아미노산 잔기로 치환된다: (a) 작은 지방족, 비극성 또는 약한 극성인 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro 및 Gly; (b) 극성, 음으로 하전된 잔기 및 이들의 (비 대전(uncharged)) 아미드: Asp, Asn, Glu 및 Gln; (c) 극성, 양으로 하전된 잔기: His, Arg 및 Lys; (d) 큰 지방족, 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val 및 Cys; 및 (e) 방향족 잔기: Phe, Tyr 및 Trp.

[0055] 바람직한 보존적 치환의 예는 다음과 같다: Ala에서 Gly 또는 Ser; Arg에서 Lys; Asn에서 Gln 또는 His; Asp에서 Glu; Cys에서 Ser, Gln에서 Asn; Glu에서 Asp; Gly에서 Ala 또는 Pro; His에서 Asn 또는 Gln; Ile에서 Leu 또는 Val; Leu에서 Ile 또는 Val; Lys에서 Arg, Gln 또는 Glu; Met에서 Leu, Tyr 또는 Ile; Phe에서 Met, Leu 또는 Tyr, Ser에서 Thr; Thr에서 Ser, Trp에서 Tyr; Tyr 에서 Trp; 및/또는 Phe에서 Val, Ile 또는 Leu.

[0056] 바람직하게, 단일 도메인 항체는 이의 보존적 서열 변형을 포함하여 표 1의 조합에서 기재된 바와 같은 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 갖는다. 더욱 바람직하게, 단일 도메인 항체는 표 1의 조합에서 기재된 바와 같은 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 갖는다.

[0057] 또한, 본 명세서에 교시된 바와 같은 상기 화합물은 서열번호 1 내지 21, 또는 이의 보존적 서열 변형으로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하여 제공된다.

[0058] 달리 말하면, 바람직하게, 본 발명에 따른 화합물에 포함된 단일 도메인 항체는 서열번호 1 내지 21, 또는 상기 교시된 이의 보존적 서열 변형으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 구성할 수 있다. 이들 서열 1 내지 22는 골격 영역을 포함하여 표 1의 조합에서 나타낸 바와 같이 CDR1, CDR2 및 CDR3를 갖는 단일 도메인 항체를 나타낸다. 이러한 단일 도메인 항체 및 CD1d 결합 특성은 본 명세서에 교시된 바와 같이 실시예에 상세하게 기재되었다. 표 1에 나타낸 바와 같이, 서열번호 1은 VHH nr 1과 상응한다; 서열번호 2는 VHH nr 2와 상응한다; 서열번호 3은 VHH nr 3과 상응한다; 서열번호 4는 VHH nr 4와 상응한다; 서열번호 5는 VHH nr 5와 상응한다; 서열번호 6은 VHH nr 6과 상응한다; 서열번호 7은 VHH nr 7과 상응한다; 서열번호 8은 VHH nr 8과 상응한다; 서열번호 9는 VHH nr 9와 상응한다; 서열번호 10은 VHH nr 10과 상응한다; 서열번호 11은 VHH nr 11과 상응한다; 서열번호 12는 VHH nr 12와 상응한다; 서열번호 13은 VHH nr 13과 상응한다; 서열번호 14는 VHH nr 14와 상응한다; 서열번호 15는 VHH nr 18과 상응한다; 서열번호 16은 VHH nr 19와 상응한다; 서열번호 17은 VHH nr 20과 상응한다; 서열번호 18은 VHH nr 21과 상응한다; 서열번호 19는 VHH nr 22와 상응한다; 서열번호 20은 VHH nr 23과 상응한다; 및 서열번호 21은 VHH nr 24와 상응한다.

[0059] 또한, 본 발명에 따른 화합물에 포함된 단일 도메인 항체가 제공되고, 이는 전체 길이에 걸쳐 서열번호 1 내지 21로 구성된 군에서 선택되는 서열과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는다(그리고 본 명세서에 교시된 바와 같이 모든 서열에 적용이 가능함).

[0060] 본 발명에 따른 화합물이 CD1d에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함하는 임의의 종류의 화합물일 수 있지만, 바람직한 구체예에서, 화합물은 약학 활성제 또는 라벨 또는 마커가 결합된 폴리펩타이드이다. 예를 들어, CD1d 결합 단일 도메인 항체를 포함하는 폴리펩타이드는 바람직하게 CD1d 발현 세포에 전달되는 약학 활성제에 연결될 수 있다. 또 다른 예로는 CD1d 결합 단일 도메인 항체 및 항원을 포함하는 본 발명에 따른 화합물을 포함할 수 있다. 상기 화합물은 예를 들어, 수지상 세포 기반의 백신에 사용될 수 있다. 활성제는 본 발명에 따른 화합물과 연결될 수 있으며, 바람직하게, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 전달 부위에서 중개자(agent)의 방출을 허용한다. 또 다른 예는 본 발명에 따른 상기 화합물, 예를 들어, 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 라벨을 포함하는 것이다. 표지는 예를 들어 형광 또는 방사성 표지의 형태 일 수 있으며, 여기에 한정되는 것은 아니다. 본

발명에 따른 화합물의 존재 또는 위치를 검출 할 수 있는 임의의 종류의 라벨은 본 발명의 맥락 안에서 적합하게 사용될 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 화합물은 폴리펩타이드이다.

[0061] 그러나, 또한, 본 발명의 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 단일 도메인 항체를 추가로 포함하고, 상기 화합물이 라벨을 포함하며, 약학 활성제가 상기 화합물에 결합되고, 상기 단일 도메인 항체가 인간화되며, 상기 화합물이 이중 특이적 또는 다중 특이적 화합물이고(이중 특이성 또는 다중 특이성이 두 항원의 교차결합을 가능하게 한다), 상기 화합물이 2가(bivalent) 또는 다가(multivalent) 화합물이며(2가성 또는 다가성이 항체가 다중 결합성 항원에 좋은 결합력으로 결합하도록 한다), 상기 화합물이 항원, 펩타이드 또는 뉴클레오타이드 서열에 결합되고, 상기 화합물이 리포솜, 바이러스 및/또는 상기 화합물이 나노입자인 화합물을 제공한다.

[0062] 또한, 단일 도메인 항체가 인간 CD1d에는 결합하나, 인간 CD1a, 인간 CD1b 및 /또는 인간 CD1c에는 결합하지 않는, 본 명세서에 교시된 바와 같은 화합물이 제공된다. 달리 말하면, 특별히 의도된 용도에서, 본 발명에 따른 화합물은 특이적으로 인간 CD1d에 결합하고 인간 CD1a, CD1b 및/또는 CD1c에는 결합하지 않는 단일 도메인 항체를 포함한다. 본 발명에 따른 바람직한 화합물은 인간 CD1d에 결합하고 인간 CD1a, CD1b 및/또는 CD1c에는 결합하지 않는다. 서열번호 1 내지 21로 표현되는 단일 도메인 항체는 특이적으로 인간 CD1d와 결합하는 단일 도메인 항체의 예이다. 당업자는 실시예에 교시된 바와 같이, 단일 도메인 항체가 인간 CD1d에 특이적인지의 여부를 어려움 없이 결정하는 방법을 알고 있다.

[0063] 본 명세서에 교시된 바와 같이, 놀랍게도, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열에 있어 그들 사이에 높은 아미노산 동일성을 공유하는 CD1d 결합 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물이 제공될 수 있음이 확인되었다. 또한, 본 명세서에 교시된 바와 같이, 상이한 기능적 특성 및 특징을 갖는 실시예에 교시된 바와 같은 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물이 제공될 수 있음이 확인되었다. 따라서, 본 명세서에서 교시된 바와 같이, 수지상 세포(dendritic cells), 바람직하게는 단핵구 유래 수지상 세포의 성숙을 유도할 수 있고, 바람직하게는 상기 단일 도메인 항체가 표 1의 VHH2 또는 VHH5의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 가지며, 또한, 상기 단일 도메인 항체가 VHH2 또는 VHH5 또는 이의 보존적 서열 변형을 갖는 화합물을 제공한다; 및/또는 화합물은 불변의 자연살생 T 세포와 같은 CD1d-제한 T 세포의 활성이 유도된 당지질, 예를 들어, 알파-갈락토실세라마이드(alpha-galactosylceramide)를 억제할 수 있고, 바람직하게 상기 단일 도메인 항체는 표 1의 VHH5 또는 VHH24의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 가진다. 또한, 상기 단일 도메인 항체는 VHH5 또는 VHH24 또는 이의 보존적 서열 변형을 갖는다; 및/또는 화합물은 불변의 자연살생 T 세포와 같은 CD1d-제한 T 세포의 활성을 유도 및/또는 불변의 자연살생 T 세포와 같은 CD1d-제한 T 세포의 활성이 유도된 당지질(예, 알파-갈락토실세라마이드)을 촉진시킬 수 있다. 바람직하게 상기 단일 도메인 항체는 표 1의 VHH12의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 가지거나 상기 단일 도메인 항체는 VHH12 또는 이의 보존적 서열 변형을 갖는다; 및/또는 화합물은 아넥신(annexin)-V 결합(예를 들어, 아넥신 V가 상기 화합물과 접촉한 세포에 결합하는 것; 아넥신 V는 초기 세포사멸의 마커이다) 및/또는 CD1d-발현 세포, 바람직하게는 CD1d-발현 중앙에서의 세포사멸을 유도할 수 있고, 바람직하게는 상기 단일 도메인 항체는 표 1의 VHH 3, VHH 6, VHH 8, 또는 VHH19의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 가지며, 또한 상기 단일 도메인 항체는 VHH3 또는 VHH6 또는 VHH8 또는 VHH19 또는 이의 보존적 서열 변형을 갖는다.

[0064] 표 1에 나타난 바와 같은 CDR을 갖는 단일 도메인 항체 VHH2 및 VHH5는 수지상 세포, 바람직하게는 IL-12에 의해 예시되는 사이토카인 생산뿐만 아니라 단핵구 유래 수지상 세포(실시예 참조)의 성숙을 유도하는 활성을 나타냄이 확인되었다. **상기** 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물은 예를 들어, 암, 말라리아 및 HIV의 치료 및/또는, 항균제 또는 항바이러스제로서 생체 외 또는 생체 내에서 수지상 세포 성숙 및 예를 들어, IL-12 생산과 같은 사이토카인 생산을 유도하는데 유용하다. 또한, 하기에서 논의된 바와 같이, 수지상 세포에 대한 CD1d 유발(triggering)은 백신 연구에 있어서 유용하다(예를 들어, Yue 등. (2010) J Immunol. 184(1):268-76; Yue 등. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A. 102(33):11811-6; Teng 등.(2009) J Immunol. 182(6):3366-71; 또는 Teng 등. (2009) J Immunol. 183(3):1911-20)

[0065] 또한, 본 발명에 따른 화합물에 있어서, 불변의 자연살생 T 세포와 같은 CD1d-제한 T 세포의 활성이 유도된 당지질, 즉, 예를 들어, 알파-갈락토실세라마이드처럼 CD1d에 의해 결합/제시될 수 있는 모든 당지질을 억제할 수 있고, 바람직하게 상기 단일 도메인 항체는 표 1의 VHH5 또는 VHH24의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 가지는 화합물이 제공될 수 있음이 확인되었다(실시예 참조). 상기 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물은 예를 들어, 연구 및/또는 만성 과민반응(chronic overstimulation)에

서 iNKT(불변의 자연살생 T 세포)세포 또는 다른 CD1d-제한 T 세포의 부분집합을 회복시키기 위해, CD1d-제한 T 세포(불변의 자연살생 T 세포 포함)의 활성을 유도하는 당지질(예, 알파-갈락토실세라마이드)을 억제함에 있어서 유용하다(예를 들어, Terabe 등. (2014) *Cancer Immunol Immunother.* 63(3):199-213).

[0066] 또한, 본 발명에 따른 화합물에 있어서, 불변의 자연살생 T 세포를 포함하는 CD1d-제한 T 세포의 활성을 유도 및/또는 불변의 자연살생 T 세포를 포함하는 CD1d-제한 T 세포의 활성이 유도된 당지질(예, 알파-갈락토실세라마이드)을 촉진시킬 수 있는 화합물을 제공하고, 바람직하게는 상기 단일 도메인 항체는 표 1의 VHH12의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 가진다. 상기 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물은 예를 들어 암의 치료에서와 같이, 시험관 내 또는 생체 내에서, 외부에서 첨가되는 당지질의 부재(absence)시 불변의 자연살생 T 세포 활성을 유도 및/또는 불변의 자연살생 T 세포의 활성이 유도된 당지질(알파-갈락토실세라마이드 포함)을 촉진함에 있어서 유용하다. iNKT 세포는 (1) 종양 세포의 직접적인 용해 또는 (2) NK 세포, 세포독성 T 세포와 같이 항종양 효과를 위해 이차 면역 효과를 유발하는 IFN- $\gamma$ 와 같은 면역 조절 사이토카인(예, DC와 상호 작용 후)의 생산을 경유하여 종양 세포독성을 발휘할 수 있다. 이는 예를 들어, Schneiders 등. (2011) *Clin Immunol.* 140(2):130-41에 리뷰되어 있다.

[0067] 또한, 본 발명에 따른 화합물에 있어서, 종양 부위에서 iNKT 세포의 표적화(targeting) 및 표적화된 활성을 허용하는 CD1d 표적화 구성체에 결합할 수 있는 화합물을 제공하고, 바람직하게는 상기 단일 도메인 항체는 표 1의 VHH12의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 가지며, 바람직하게는 상기 단일 도메인 항체는 VHH12이다. 이는 유용하며, 다음을 토대로 하였다. Stirnemann K 등. *J Clin Invest.* 2008 Mar;118(3):994-1005.

[0068] 또한, 아넥신 V 결합의 증가를 유도할 수 있는 화합물을 제공하고, 이는 CD1d-발현 세포, 바람직하게는 CD1d-발현 종양에서 초기 세포사멸을 암시 및/또는 세포사멸을 유도하며, 바람직하게는 상기 단일 도메인 항체는 표 1의 VHH3, VHH6, VHH8, 또는 VHH19의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 가진다. 상기 단일 도메인 항체를 포함하는 화합물은 예를 들어 암의 치료에서와 같이, 시험관 내 또는 생체 내에서, 아넥신 V 결합의 증가 및/또는 CD1d-발현 세포의 세포사멸을 유도함에 있어서 유용하다. 이는 예를 들어, 다발성 골수종에서 나타날 수 있는 세포사멸을 유도하는 CD1d+ 악성 종양에 사용된다(*Blood.* 2009 Mar 12;113(11):2498-507).

[0069] 또한, 상기 교시된 바와 같이, 예를 들어, 상태(condition)의 치료에 있어서 상기 작용기가 유의한, 상이한 작용기를 갖는 단일 도메인 항체를 포함하는 상기 화합물의 용도를 제공한다.

[0070] 더욱 바람직한 구체예에서, 상기 교시된 바와 같이 상기 화합물이 단일 도메인 항체인 화합물을 제공하고, 바람직하게는 상기 화합물은 표 1의 조합, 또는 이의 보존적 서열 변형에 기재된 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 가지는 단일 도메인 항체이며, 또한 상기 단일 도메인 항체는 서열번호 1 내지 21 또는 이의 보존적 서열 변형으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는다.

[0071] 또한, 항체, 바람직하게는 인간 CD1d에 결합한 단일 도메인 항체로서, 상기 항체, 바람직하게는 단일 도메인 항체가 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하며, 상기 CDR1, CDR2 및 CDR3이 표 1에 나타난 VHH nr 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 각각의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 90%, 95% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 항체를 포함하는 화합물을 제공한다. 바람직하게는, 화합물이 포함하는 항체, 바람직하게는 단일 도메인 항체는 표 1 또는 이의 보존적 서열 변형에 나타난 VHH nr 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 90%, 95% 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 화합물에 대해서는 항체이고, 바람직하게는 단일 가닥 항체이다. 표 1에 나타난 각각의 특이적 항체 또는 그의 조합(즉, VHH 번호 당)으로 나타난 바와 같은 CDR1, CDR2, CDR3를 포함하는 항체는 실시 예 및 상세한 설명에 나타난 바와 같이, 놀라우면서 비 명료한(non-obvious) 특성을 갖는다. 또한, 본 명세서에 교시된 바와 같이, 본 발명에 따른 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3, 항체, 단일 도메인 항체 또는 화합물을 암호화하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0072] 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 본 명세서에 교시된 바와 같은 화합물은 예를 들어, 약물, 시험관 내 및 생체 내 모두, 2 또는 그 이상의 다른 수용체의 표적화, 분자(molecules) 및/또는 항원(예, 상기 화합물은 이중 특이적 또는 다중 특이적이다), 시험관 내 및 생체 내 모두, 및 기타 등과 같이, 연구 도구, 진단 도구, 표적 부위(발현 CD1d)로의 전달 수단을 포함하는 다양한 종류의 용도를 가졌다. 바람직하게, 본 명세서에 교시된 바와 같이 화합물은 의학적 치료 또는 진단 물질로서 생체 내 이용을 위한 용도를 갖는다. 본 명세서에 교시된 바

와 같은 화합물로부터 유익이 되는 상태는 암, HIV, 말라리아, 천식, 알레르기, 자가 면역 질환, 염증성 장 질환(inflammatory bowel diseases) 및 이식편대 숙주질환(graft-versus-host-disease, GVHD)이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 또 다른 구체예에서, 예를 들면 본 명세서에 교시된 바와 같은 단일 도메인 항체를 포함하는, 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 약학 조성물은 본 명세서에 교시된 바와 같은 화합물 이외에 다른 화합물, 예를 들어, 다른 약학 활성 성분 및/또는 부형제를 포함할 수 있다.

[0073] 또한, 본 명세서에 교시된 바와 같은 화합물의 용도에 있어서, 상기 화합물이 예를 들어, 환자로부터 얻은 샘플에서 CD1d 발현을 검출하기 위해, 및/또는 CD1d 발현 세포를 검출하기 위해 시험관 내(*in vitro*)에서 사용하거나 또는 상기 화합물을 시험관 내 진단 방법에 사용하는 방법을 제공한다.

[0074] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 명세서에 교시된 바와 같은 화합물을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 제공한다. 구체예에서, 본 발명에 따른 화합물은 폴리펩타이드이고, 예를 들어, 화합물은 예를 들면 서열번호 1 내지 21, 및 보존적 서열 변형으로 구성된 군에서 선택되는 서열을 가진 단일 도메인 항체이다.

[0075] 본 명세서에 교시된 바와 같은 서열은 아미노산 서열과 관련이 있다. 따라서, 당업자는 아미노산 서열을 뉴클레오타이드 서열로 전환시키기 위해 코돈표(codon table)를 사용할 필요가 있으므로, 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 제공할 수 있다.

[0076] 상기 뉴클레오타이드 서열은 항체가 발현될 수 있는 유전적 구성체를 제공하기 위해 프로모터 서열, 폴리 A 신호(polyA signals) 등과 작동 가능하도록 연결시키는데 사용될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 상기 유전적 구성체는 숙주 세포에 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 상기 숙주 세포 또는 비-인간 유기체 또한 제공된다.

[0077] 바람직한 구체예에서, 본 명세서에 교시된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 제공하고, 이는 서열번호 22 내지 42, 또는 이의 보존적 서열 변형으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및/또는 서열번호 43 내지 63, 또는 이의 보존적 서열 변형으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열 및/또는 서열번호 64 내지 84, 또는 이의 보존적 서열 변형으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 화합물을 암호화한다.

[0078] 또한, 본 명세서에 교시된 바와 같은 화합물을 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 화합물을 발현시키고; 및 화합물을 얻기 위해 숙주 세포가 본 발명에 따른 핵산을 포함하도록 허용하는 것을 포함한다. 발현 및 얻기 (obtaining)를 위한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0079] 마지막으로, 또한, CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 CDR3, 바람직하게 CDR1 및 CDR2, 더 바람직하게 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 항체로서, 상기 CDR1이 서열번호 22 내지 42, 또는 이의 보존적 서열 변형으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 갖고, 상기 CDR2가 서열번호 43 내지 63, 또는 이의 보존적 서열 변형으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 가지며, 및 CDR3이 서열번호 64 내지 84, 또는 이의 보존적 서열 변형으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 서열을 갖는 항체를 제공한다. 바람직하게 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3은 표 1에 나타난 VHH nr 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24에서의 CDR1, CDR2 및 CDR3 각각의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 90%, 95% 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0080] 항체는 단일 도메인 항체, 단일 사슬 항체, 인간화된 항체, 4-사슬 항체 또는 임의의 다른 면역글로불린 분자를 포함하는 임의의 유형의 항체일 수 있다. 항체는 다른 기능 또는 비 기능성 군과 연결될 수 있고, 예를 들어, 항체는 이중 특이적 또는 다중 특이적 항체, 및/또는 2가 또는 다가 항체일 수 있으며, 본 명세서에 교시된 바와 같이, 예를 들어 나노입자, 약물, 펩타이드, 핵산 및 기타 등과 결합된 라벨을 포함할 수 있다. 항체는 예를 들어 암의 치료와 같이 (인간)환자의 치료에 사용될 수 있거나, 인간 CD1d 및/또는 인간 CD1d 발현 세포의 결합 및 검출을 위해 사용될 수 있다.

[0081] 서열목록에서 제공된 서열번호 22 내지 84가 표 1에 나타난 서열과 다른 경우, 표 1에 나타난 서열이 우선한다.

### 표 1

[0082] 본 명세서에서 사용된 VHH 번호, VHH 참조 번호, 및 본 발명의 다양한 CD1d 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열.

VHH nr (서열번호)	VHH 참조번호	CDR1 (서열번호 22-42)	CDR2 (서열번호 43-63)	CDR3 (서열번호 64-84)
1 (1)	17-1E	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPPYADSVKG	RLVPPGPIPIERSLENMNYW
2 (2)	17-2B	GRSFSSYTMG	VIRWSGESPPYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMNYW
3 (3)	17-3D	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPIYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMRYW
4 (4)	17-4C	GRSFSSYTMG	AIRWSGESPPYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMKDW
5 (5)	17-7C	GSSFSSYTMG	GIRWSDESPIYADSVKG	RLVPPGPIPIPTSESMRYW
6 (6)	17-8B	GSSFSSYTMA	AIRWSGESPIYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMRYW
7 (7)	17-9C	VSSFSSYTMG	GIRWDDENPPYADSVKG	RLVPPGPIPFERTLENMRYW
8 (8)	17-10B	GSSFSSYTMG	AIRWDGESPIYAESVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMRYW
9 (9)	17-11B	GRSFSSYTMG	VIRWSGESPPYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMNYW
10 (10)	19-12G	GSSFSSYTMG	AIRWSDESPIYAGSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMRYW
11 (11)	17-13E	GSSFSSYTMG	AIRWSDESPPYSDSVKG	RLVPPGPIPIERTLENMRYW
12 (12)	18-14B	GSMFSDNVMG	TIRTTGGSTNYADSVKG	TIPVPSIPYDYW
13 (13)	19-15G	GRSFSSYTMG	AIRWSGESPPYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLENMNYW
14 (14)	19-22H	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPPYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMNYW
18 (15)	19-21F	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPIYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMKDW
19 (16)	19-23G	GSSFSSYTMT	GIRWSGESPPYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMRYW
20 (17)	19-24D	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPPYGDVKG	RLVPPGPIPIGRTLESMMNNW
21 (18)	19-25F	GSSFSSYTMG	AIRWSGESPPYADSVKG	RLVPPGPIPIERALENMNYW
22 (19)	19-26A	GSSFSSYTMG	AIRWSDESPIYADSVKG	RLVPPGPIPIERTLESMMRYW
23 (20)	19-27F	GRSFSSYTMG	AIRWSGESPPYADSVKG	RLVPPGPIPIERSLENMNYW
24 (21)	18-29C	GSIFSNAMG	VISSSGSTNYADSVKG	HVAGFDEYNYW

표 2

[0083]

17-1E와 비교한 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열 동일성

	CDR1	CDR2	CDR3
17-2B	90%	94%	89%
17-3D	100%	94%	84%
17-4C	90%	100%	79%
17-7C	100%	82%	73%
17-8B	90%	94%	84%
17-9C	90%	76%	84%
17-10B	100%	82%	84%
17-11B	90%	94%	89%
19-12G	100%	82%	84%
17-13E	100%	88%	84%
18-14B	60%	64%	21%
19-15G	90%	100%	95%
19-22H	100%	100%	89%
19-21F	100%	94%	79%
19-23G	90%	94%	84%
19-24D	100%	94%	79%
19-25F	100%	100%	95%
19-26A	100%	88%	84%
19-27F	90%	100%	100%
18-29C	60%	64%	15.70%

[0084]

실험예 면역화(immunization)

[0085]

하기 교시된 바와 같이, 두 마리의 개별적인 라마(Lama glama)를 면역화시켰다(Roovers RC 등. Cancer Immunol Immunother. 2007;56:303-17). 간략하게, 10<sup>8</sup>개의 안정적인 CD1d로 형질 도입된 C1R-세포가 0일, 14일, 28일 및 35일에 피하로 주입되었다. 파지 디스플레이 라이브러리(phage display library) 구성체를 위해, 43일째에 150 mL의 혈액을 수집하였다.

**[0086] CD1d 특이적 VHH의 선별**

**[0087]** 파지 디스플레이 라이브러리의 구성체를 위해, 수집된 150 ml의 혈액 샘플로부터 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocytes, PBL)를 분리하였다. 분리된 림프구로부터, cDNA가 중쇄 항체의 가변 도메인만을 암호화하는 유전자를 증폭하기 위한 주형으로 사용될 수 있도록 준비하였다. PCR 단편(fragments)을 pUR8100 파지 미드 벡터(phagemid vector)에 연결하고 대장균 세포로 형질 전환시켰다. 이러한 방식으로, 파지에서 발현되어 선택에 사용될 수 있는 2개의 VHH 라이브러리를 얻었다. 이를 위해 두 라이브러리의 파지를 4°C에서 2시간 동안 CD1d 형질 전환 HeLa 세포와 함께 배양하였다. 이어서 세포를 세척한 뒤, 4°C에서 7분 동안 100 mM의 HCl로 결합된 파지를 용출시켰다. 제거된 파지를 Tris-HCl로 중화시킨 후, 대장균에 감염시켰다. 결합되지 않은 파지를 CD1d 형질 전환 C1R-세포와 함께 1시간 동안 배양한 후, 선택된 파지를 야생형 C1R-세포를 사용하여 4°C에서 1시간 동안 두 번 대립선택(counterselcted)을 수행하였다. 결합된 파지를 용출시키고, 상기 교시한 바와 같이 대장균에 감염시켰다. 세균을 2%의 포도당/암피실린을 포함하는 한천 플레이트에 도말하여 VHH DNA를 암호화하는 단일 세균 콜로니를 생성하였다. 개별 클론으로부터의 VHH DNA를 Sfi1/BstEII 소화 효소로 절단하였고, Sfi1/BstEII 클로닝을 가능하게 하는 HC-V 카세트(cassette) 및 genIII 서열의 C-말단 myc- 및 6x HIS-태그 결실(tag deletion)을 추가하여, pHen1의 유도체(derivative)인 플라스미드 pMEK219에 클로닝하였다(Hoogenboom HR, 등. Nucleic Acids Res 1991;19:4133-4137). pMEK219-VHH를 대장균 TG1 세균으로 형질 전환시켰다.

**[0088]** 0.1%의 포도당 및 100 µg/ml의 암피실린을 포함하는 2xTY 배지를 접종하기 위해, 밤새 배양(overnight culture)하였다. OD600 값에 도달할 때, IPTG를 최종 농도 1 mM로 첨가하였다. 단백질 생산은 2 내지 5시간 동안 수행하였다. 모든 배양 성장은 37°C에서 200 내지 220 rpm으로 격렬하게 흔들면서 수행되었다. 단백질 생산은 4°C에서 15분 동안 배양액을 회전시켜 중단하였다. 세균 펠렛(pellet)을 PBS에 재현탁하여 -80°C에서 1시간 동안 동결시켰다. 세균 현탁액을 해동시켜 4°C에서 1시간 동안 약하게 흔들고, 다시 30분 동안 4,500 rpm으로 회전시켰다. 유세포 분석기(flow cytometry)를 사용하여 상층액에서의 CD1d 형질 전환 C1R-세포에 대한 결합을 확인하였다.

**[0089] 선택된 VHH의 CD1d 특이성**

**[0090]** CD1d 특이적 결합의 확인은 CD1a, CD1b, CD1c 또는 CD1d 발현 C1R 및 K562 세포를 사용하여 유세포 분석기로 평가하였다. 염색은 96-웰 플레이트에서 수행하였고, 모든 배양은 4°C에서 30분 동안 FACS 완충액에서 수행하였다. CD1d에 대한 결합의 초기 스크리닝을 위해, 세포를 항-CD1d VHH를 포함하는 25 µl 상층액과 함께 배양하였다. 이를 세척한 후, 세포를 항-myc 태그 항체 클론 A4A6(Merck Millipore, 미국)과 최종 희석 1:500의 비율로 함께 배양하고, 이를 세척한 후, 항-마우스 염소 항체 F(ab) 2 APC(Beckman Coulter, Fullerton, 미국)를 최종 희석 1:200의 비율로 함께 배양하였다. 최종 세척 단계 후, 세포에 대한 VHH 결합을 유세포 분석기(FACS Fortessa, BD Biosciences)로 평가하였고, 특이적 결합을 나타내는 VHH를 선택하였다. 양성 대조군으로서, 항-CD1d 51.1 mAb(eBiosciences Inc, 미국)를 사용하였고, 음성 대조군으로서 아조(azo)-염색 RR6 특이적 나노체(nanobody)가 사용되었다. 선택된 항-CD1d VHH의 CD1d에의 결합은 정제(하기 참조) 및 항-CD1d VHH의 시퀀싱 후에 확인되었다. 이러한 실험을 위해, 항-CD1d VHH 및 대조군을 5 µg/ml의 농도로 시험하였다. 대표적인 데이터를 도 1에 나타내었다.

**[0091] 지문 분석(Fingerprint analysis) 및 시퀀싱**

**[0092]** 구조적으로 다른 CD1d-특이적 VHH를 선택하기 위해, 선택된 VHH의 DNA를 콜로니(colony) PCR로 증폭시키고, Hinf1으로 절단한 후, 2%의 아가로즈 겔에서 전기영동하였다. 이때, 절단 패턴에 따라 다양한 군(families)을 선택할 수 있다. 개별 군은 고유의 클론을 확인하기 위해 시퀀싱된다(BaseClear B.V. Leiden, 네덜란드)

**[0093] VHH 생산 및 정제**

**[0094]** 고유의 항-CD1d VHH를 포함하는 상층액을 상기 교시한 바와 같이 제조하였다. 정제를 위해, 이들 상층액을 세척된 탈론(Talon) 수지(Clontech, Mountain View, 미국)와 함께 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 탈론 수지를 PBS로 3회 세척하고, 15 mM의 이미다졸/PBS(pH 7)로 1회 세척한 다음, 150 mM의 이미다졸/PBS(pH 7)로 용출시켰다. 용출된 분획을 PBS에 대해 24시간 동안 2회 투석(dialyzed)하였다. 정제된 VHH의 농도는 나노드롭(Nanodrop)(Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, 미국)을 사용하여 결정하였다. 순도는 쿠마시(coomassie) 염색된 단백질 겔에 의해 확인되었다.

**[0095] 항-CD1d 매개 moDC 성숙**

[0096] 미성숙 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)는 하기에 교시된 바와 같은 방법으로 생성되었다(Lameris R. 등, Methods Mol Biol, 2014; 1139: 155-65). moDC를 48-웰 플레이트에서 웰(well)당  $6 \times 10^4$  세포의 농도로 5 ng/ml의 rhIL-4, 500 U/ml의 rhGM-CSF, 1000 U/ml의 rhINF- $\gamma$ , 25  $\mu$ g/ml의 폴리믹신 B(polymyxin B) 및 500 nM의 항-CD1d VHH 또는 음성 대조군 VHH가 존재하는 완전 배지(HEPES, 10%의 FCS, 0.05 mM의  $\beta$ -머캅토에탄올(mercaptoethanol,  $\beta$ -ME), 100 IU/ml의 나트륨 페니실린, 100  $\mu$ g/ml의 황산 스트렙토마이신 및 2.0 mM의 1-글루타민을 함유하는 RPMI-1640)에서 배양하였다. LPS(200 ng/ml)이 양성 대조군으로 사용되었다. 24시간 후, IL-12 및 IL-10 생산(나타내지 않음)의 분석을 위해 상층액을 분리하였다(ELISA 사용). 72시간 후, 세포를 회수하고 유세포 분석기(FACS Fortessa, BD Biosciences)를 사용하여 moDC 성숙 마커(PE 라벨화된 항-CD86(나타내지 않음), APC 라벨화된 항-CD83, BD Biosciences)의 발현을 분석하였다. 대표적인 데이터를 도 2에 나타내었다.

[0097] **항-CD1d VHH에 의한  $\alpha$ -GalCer 유도성 iNKT 활성의 억제**

[0098] iNKT 세포는 하기에 교시된 바와 같은 방법으로 생성되었다(Lameris R. 등, Methods Mol Biol 2014; 1139: 155-65).  $5 \times 10^4$ 의 CD1d-형질 전환 HeLa 세포를 DMEM 내 10%의 FCS, 0.05 mM의  $\beta$ -ME, 100 IU/ml의 나트륨 페니실린, 100  $\mu$ g/ml의 황산 스트렙토마이신, 2.0 mM의 1-글루타민 및 400 ng/ml의  $\alpha$ -GalCer를 포함하는 96-웰 플레이트에서 밤새 37°C로 배양하였다. HeLa-CD1d 세포를 세척한 후,  $5 \times 10^4$ 의 휴면(resting)( $< 25\%$  CD25 발현)iNKT를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 500 nM의 항-CD1d VHH(또는 음성 대조군 VHH)와 함께 배양하였다. 24시간 후, IFN- $\gamma$  및 IL-4 (ELISA 사용)의 검출을 위해 상층액을 회수하였고, iNKT 세포를 회수하여 FACS 완충액에 재현탁 후, iNKT 세포 활성의 유도(또는 억제)를 검출하기 위해 유세포 분석기로 분석하였다(iNKT 세포 상의 활성 마커 CD25의 발현으로 평가됨, FACS Fortessa, BD Biosciences). VHH24를 사용한 대표적인 결과를 도 3 및 도 7에 나타내었다.

[0099] **항-CD1d VHH에 의한 iNKT 세포 활성의 유도**

[0100] iNKT 세포는 하기에 교시된 바와 같은 방법으로 생성되었다(Lameris R. 등, Methods Mol Biol 2014; 1139: 155-65).  $5 \times 10^4$ 의 CD1d-형질 전환 HeLa 세포, CD1d-형질 전환 C1R 세포 및 CD1d-형질 전환 MM.1s 세포를 DMEM 내 10%의 FCS, 0.05 mM의  $\beta$ -ME, 100 IU/ml의 나트륨 페니실린, 100  $\mu$ g/ml의 황산 스트렙토마이신, 2.0 mM의 1-글루타민을 포함하는 96-웰 플레이트에서 100 ng/ml의  $\alpha$ -GalCer 또는 비히클 대조군의 존재 또는 부재의 조건으로 밤새 37°C로 배양하였다.  $\alpha$ -GalCer 또는 비히클 대조군이 포함된 CD1d-형질 전환 세포를 세척한 후,  $5 \times 10^4$ 의 휴면(resting)( $< 25\%$  CD25 발현)iNKT를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 500 nM의 항-CD1d VHH(또는 음성 대조군 VHH)와 함께 배양하였다. 24시간 후, IFN- $\gamma$  및 IL-4 (ELISA 사용)의 검출을 위해 상층액을 회수하였고, iNKT 세포를 회수하여 FACS 완충액에 재현탁 후, iNKT 세포 활성의 유도를 평가하기 위해 유세포 분석기로 분석하였다(iNKT 세포 상의 활성 마커 CD25의 발현으로 평가됨, FACS Fortessa, BD Biosciences). 대표적인 결과(VHH12에 대한 데이터)를 도 4 및 도 8에 나타내었다.

[0101] **항-CD1d VHH에 의해 유도되는 아넥신 V 결합의 분석**

[0102] CD1d-C1R 및 CD1d-MM.1s(음성 대조군으로서 비 형질 전환 C1R 및 MM.1s 세포주 포함)을 웰(well)당  $1 \times 10^5$  세포의 농도로 48-웰 플레이트에서 37°C로 배양하였으며, 500 nM의 항-CD1d VHH, 음성 대조군 VHH, 또는 항-CD1d 51.1 mAb(양성 대조군으로서)를 포함시켰다. 24시간 후, 제조사 프로토콜(VPS Diagnostics, Hoeven, 네덜란드)에 따라 세포를 아넥신 V 및 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI)로 염색하고 유세포 분석기(FACS Fortessa, BD Biosciences)로 분석하였다. 실험 결과를 도 5에 나타내었다.

[0103] **플레이트 결합(platebound) CD1d 및 항-CD1d VHH에 의한 iNKT 세포 활성의 유도**

[0104] iNKT 세포는 하기에 교시된 바와 같은 방법으로 생성되었다(Lameris R. 등, Methods Mol Biol 2014; 1139: 155-65).  $\alpha$ -GalCer(1 mM) 또는 비히클 대조군(100% DMSO)을 80°C에서 2분간 가열하고, 5분 동안 초음파 처리한 후, 멸균된 따뜻한(37°C) 0.1%의 트리톤-X을 사용하여 100  $\mu$ M의 농도로 희석하였다. 다음으로,  $\beta$ 2m-인간 CD1d에 결합된 항-EGFR VHH로 구성된 6  $\mu$ M의 이중 특이적 구성체(construct)를 1:1의 비율로 첨가하였다.  $\alpha$ -GalCer 및  $\beta$ 2m-CD1d-항-EGFR 구성체의 최종 농도는 각각 50  $\mu$ M과 3  $\mu$ M이었다. 비히클 및  $\alpha$ -GalCer는 상온에서 흔들면서 밤새 배양되었다. 96-웰 플레이트는 항-플래그 mAb(시그마, 클론 M2; 1:1000)로 코팅되어, 4°C에서 밤새 배양되었다. 다음날, 항-플래그가 코팅된 플레이트를 PBS로 3회 세척하고, PBS에 희석된(구성체 농도

0.5  $\mu$ M)  $\alpha$ -GalCer 또는 비히클을 포함하는 구성체와 함께 2시간 동안 상온에서 흔들면서 배양하였다. PBS로 세척한 후,  $1 \times 10^5$ 의 휴면(< 25% CD25 발현)iNKT 세포를 첨가하여, 코팅된 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 250 nM의 항-CD1d VHH와 함께 배양하였다. 24시간 후, iNKT 세포를 회수하여 FACS 완충액에 재현탁 후, iNKT 세포 활성의 유도를 평가하기 위해 유세포 분석기로 분석하였다(iNKT 세포 상의 활성 마커 CD25의 발현으로 평가됨, FACS Fortessa, BD Biosciences). 실험 결과를 도 6에 나타내었다.

[0105] **VHH12**

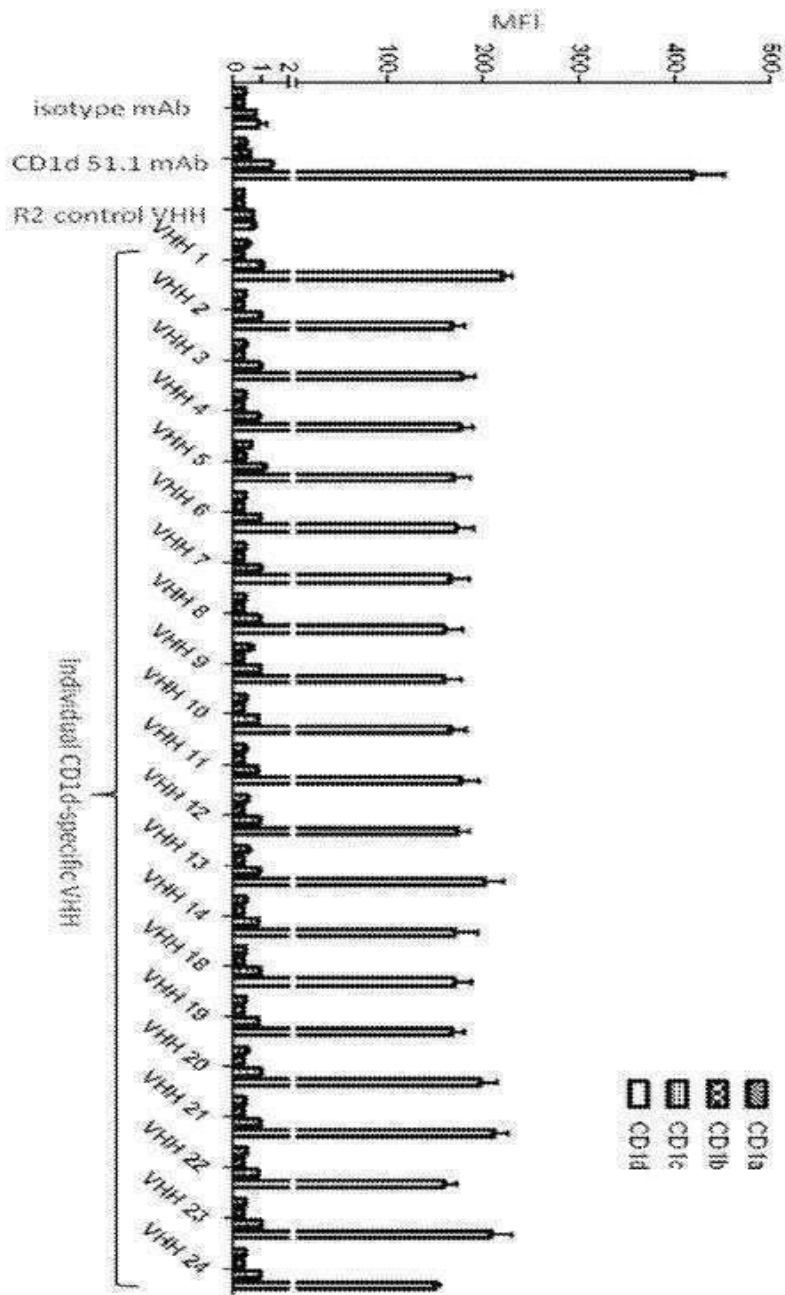
[0106] 상기 나타낸 데이터 외에, VHH12를 사용한 추가 실험이 수행되었다. 실험 결과는 도 9, 도 10 및 도 11에 나타내었다. 도 9는 iNKT 세포 탈과립(좌) 및 CD1d+ 중양 세포주(오른쪽)에 대한 세포독성의 유도를 나타낸다. 도 10은 CD1d+ 원발성(primary) 다발성 골수종 세포에 대한 iNKT 세포의 세포독성 유도를 나타낸다. 도 11은 항-CD1d VHH12에 의한 iNKT 세포 사이토카인 생산의 유도를 나타낸다. 사이토카인 생산의 검출을 위해 HeLa-CD1d 세포를 비히클 대조군, OCH(알파-갈락토실세라마이드의 절단 유도체 스펅고신(sphingosine truncated analog of alpha-galactosylceramide( $\alpha$ -GC)); iNKT 세포에서 Th2-사이토카인 생산을 유도하는 것으로 알려진 당지질) 또는  $\alpha$ -GC로 자극화(pulsed)하였고, 항-CD1d VHH 및 대조군과 함께 배양하였으며, 상층액이 분석된 이후(사이토메트릭 비즈 어세이(Cytometric Bead Assay; CBA)에 의해) 24시간 동안 iNKT와 함께 배양되었다. 나타낸 항-CD1d VHH는 VHH12이다. N= 4; \*p<0.05; \*\*\*\*p<0.0001.

[0107] **결과**

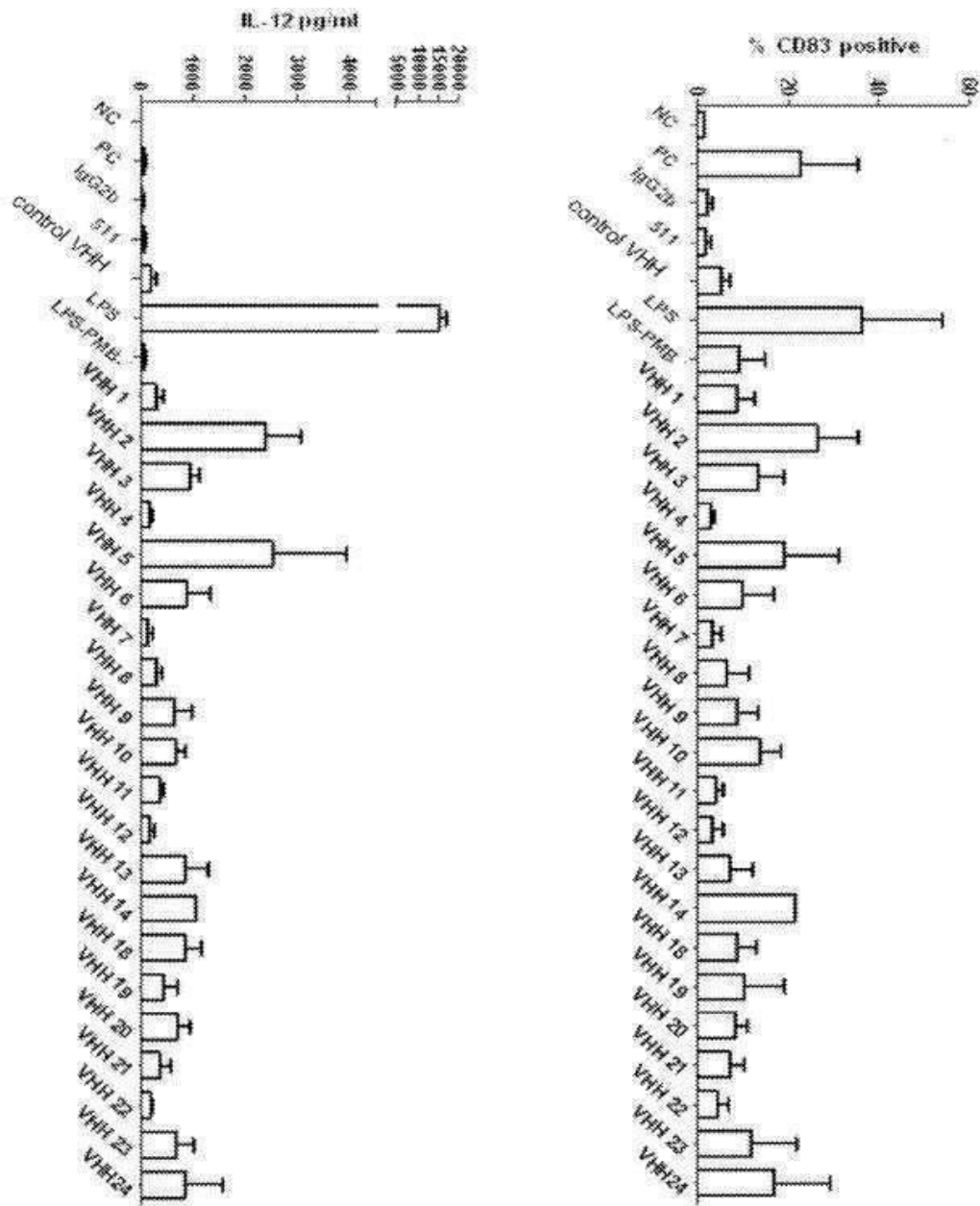
[0108] 다양한 실험들의 대표적인 결과는 도 및 첨부된 범례에 나타내었다. 추가적인 실험 데이터는 본 발명의 맥락에서 전술한 바와 같다.

도면

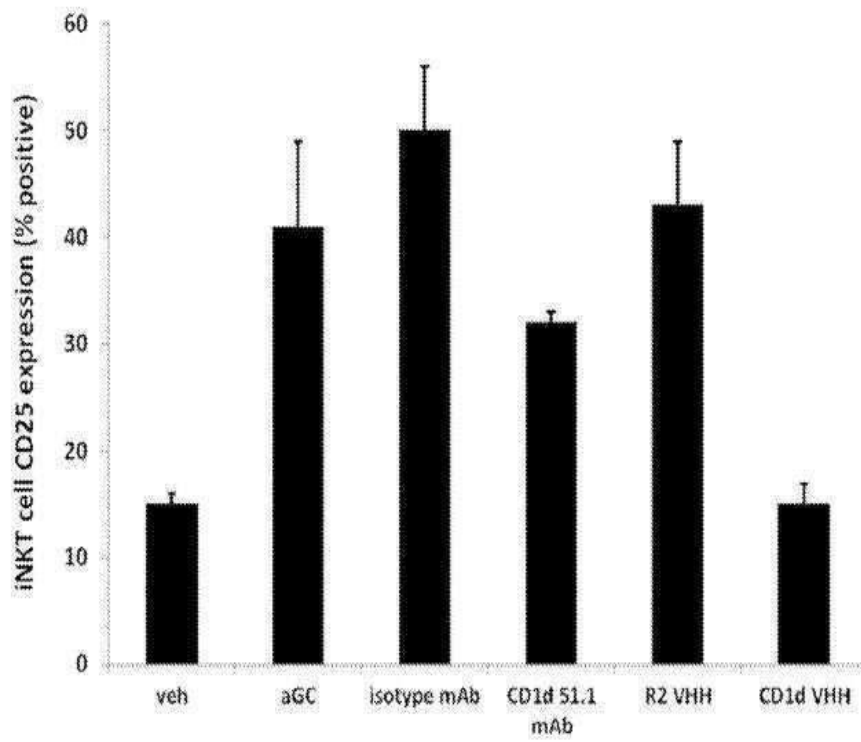
도면1



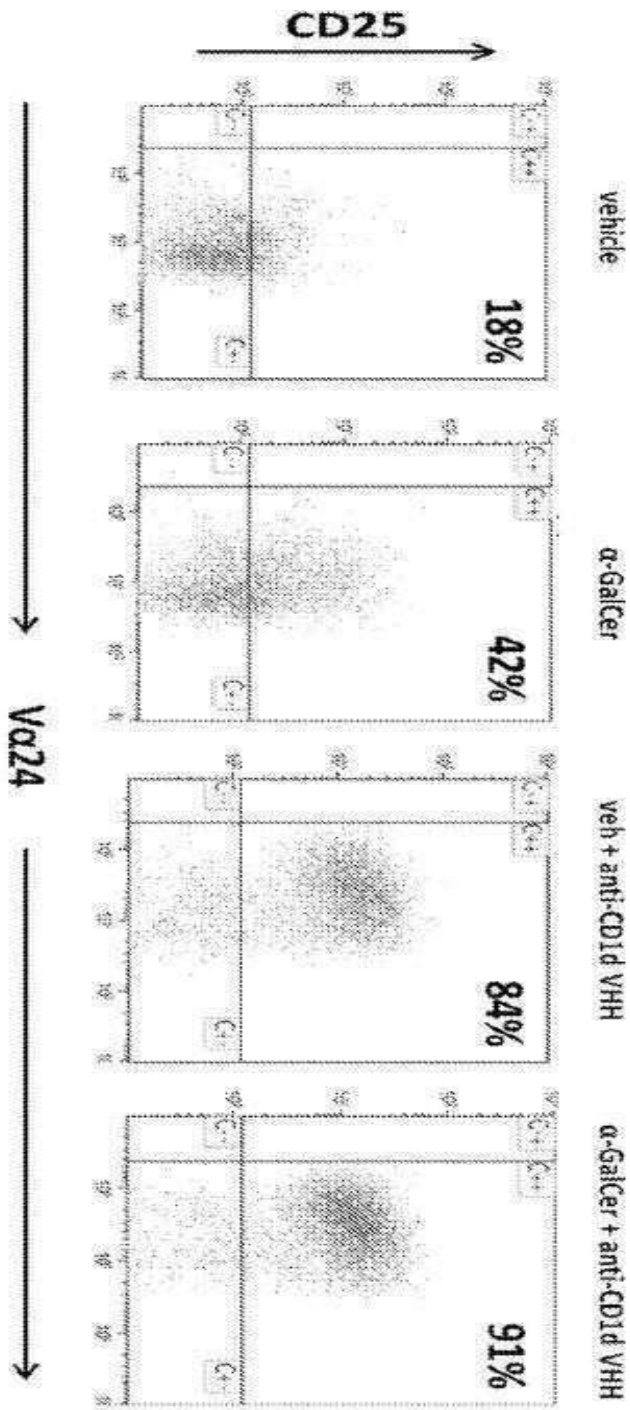
도면2



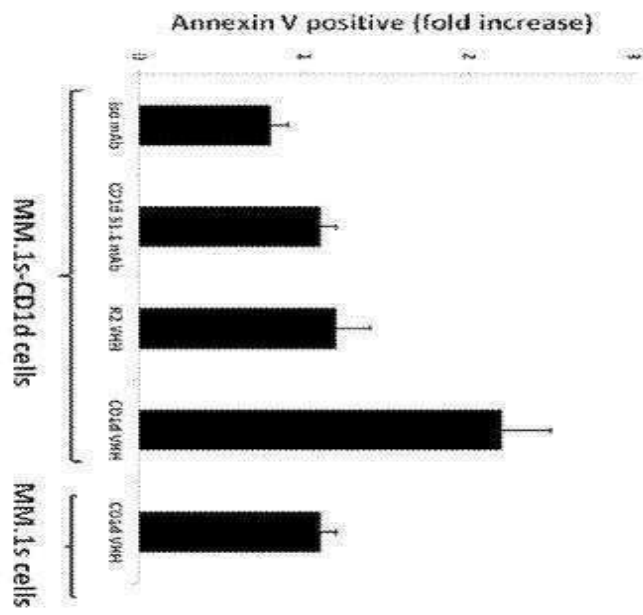
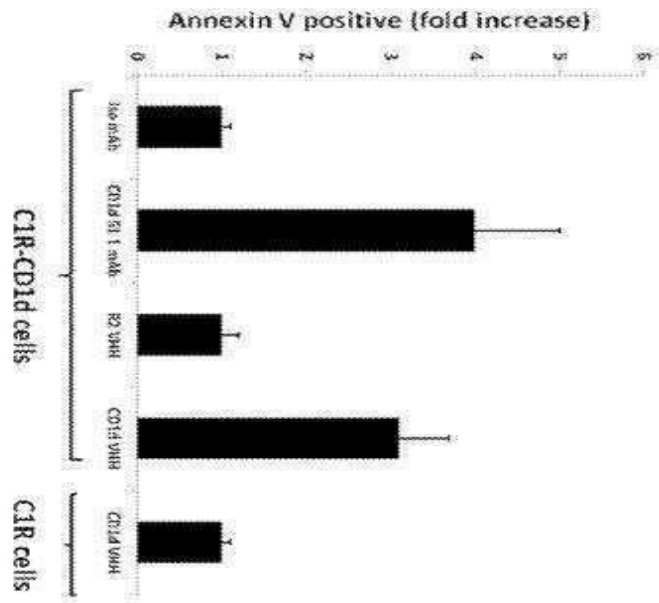
도면3



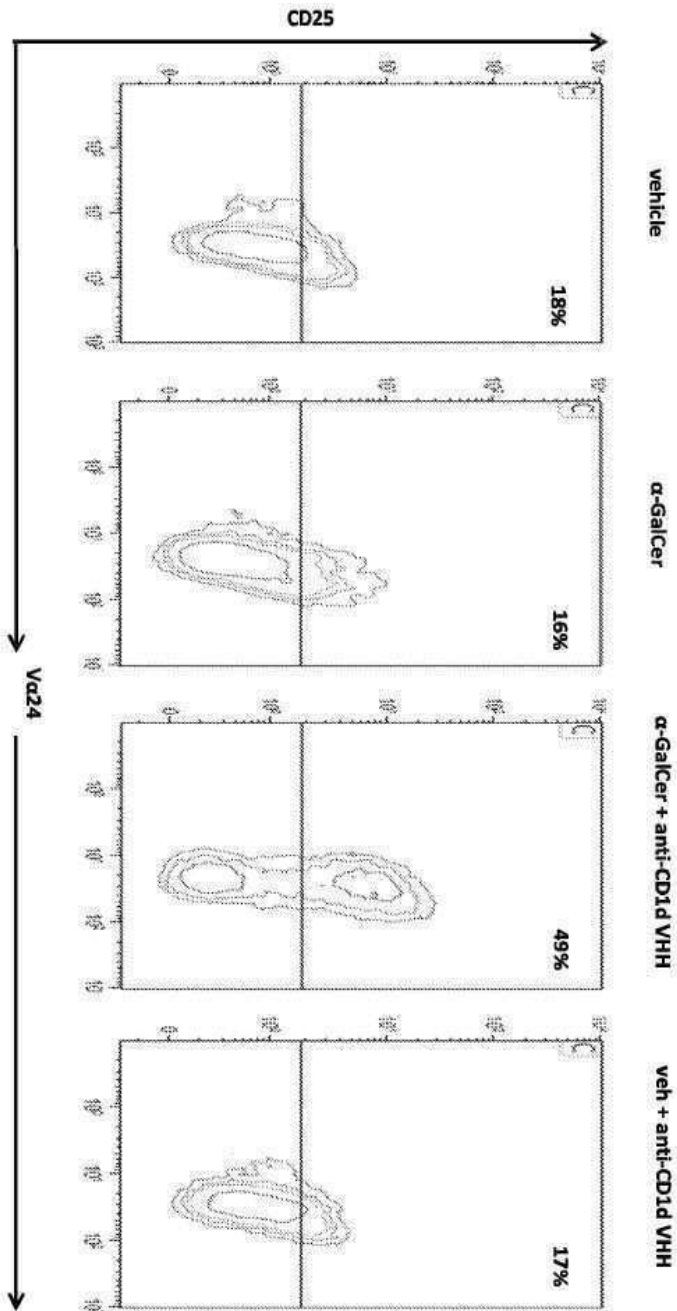
도면4



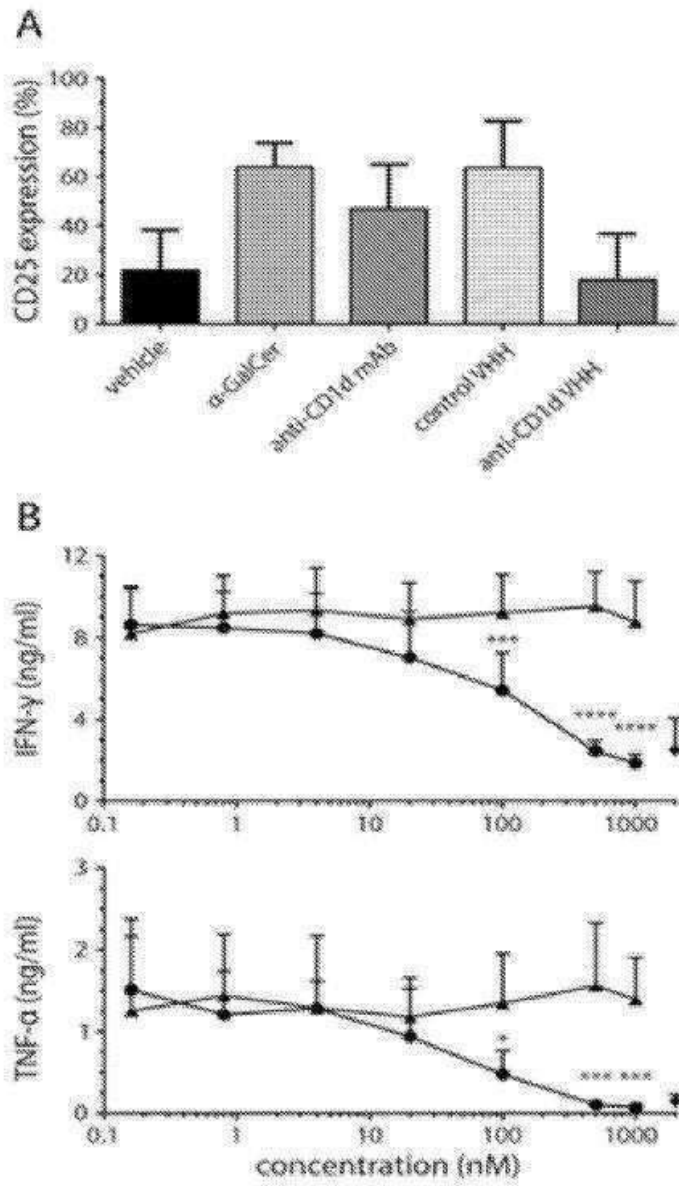
도면5



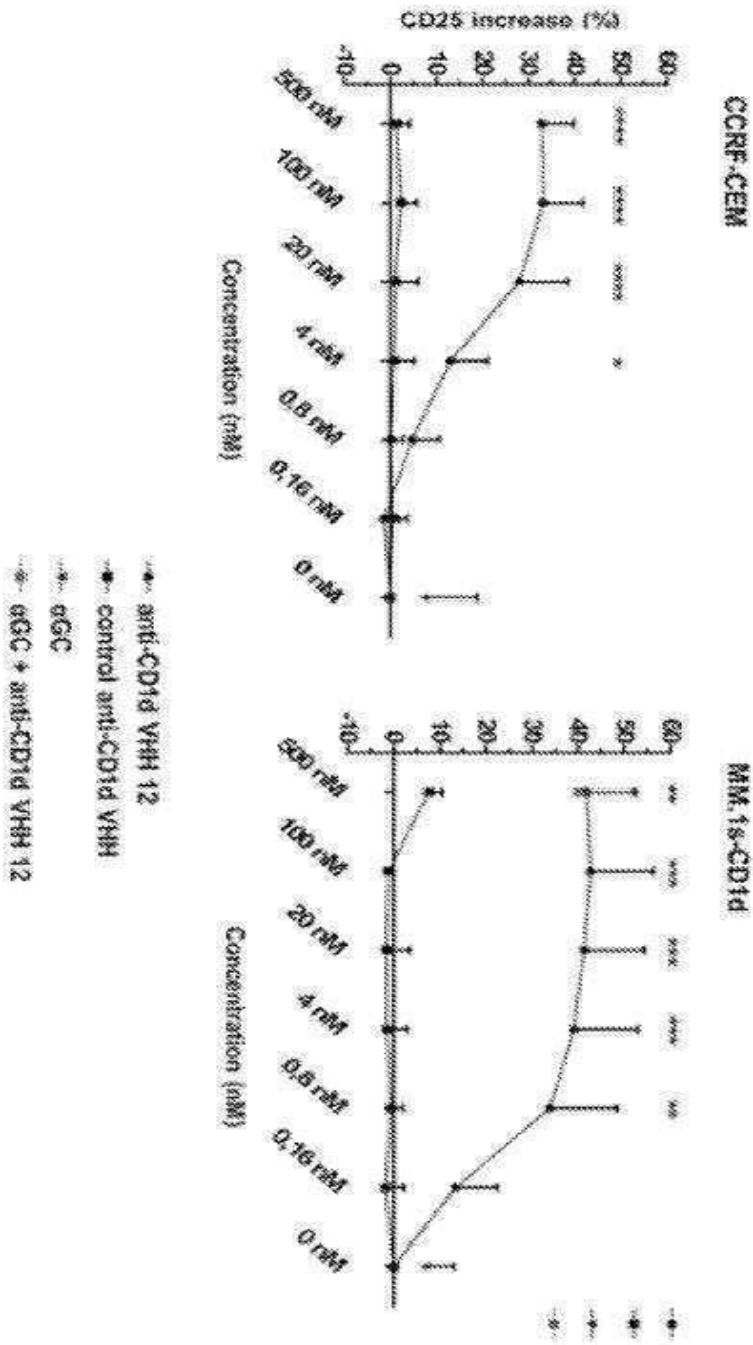
도면6



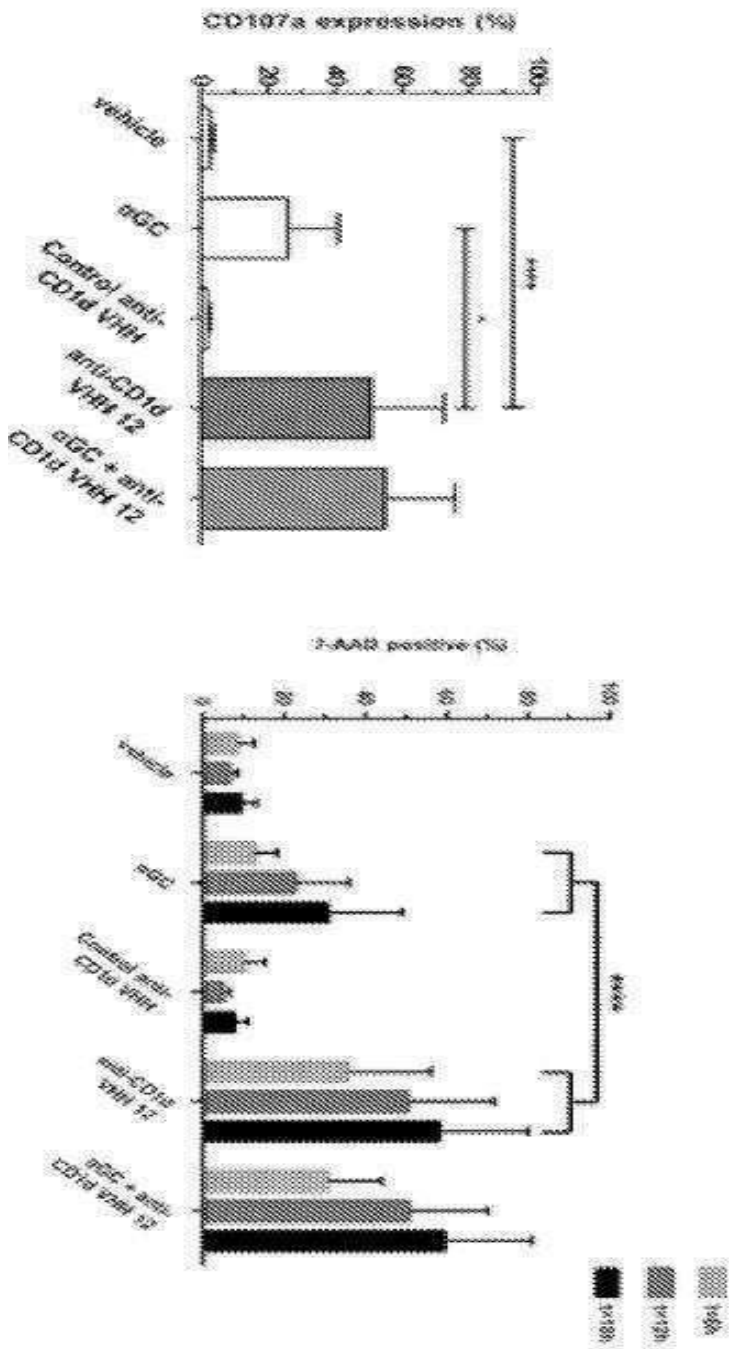
도면7



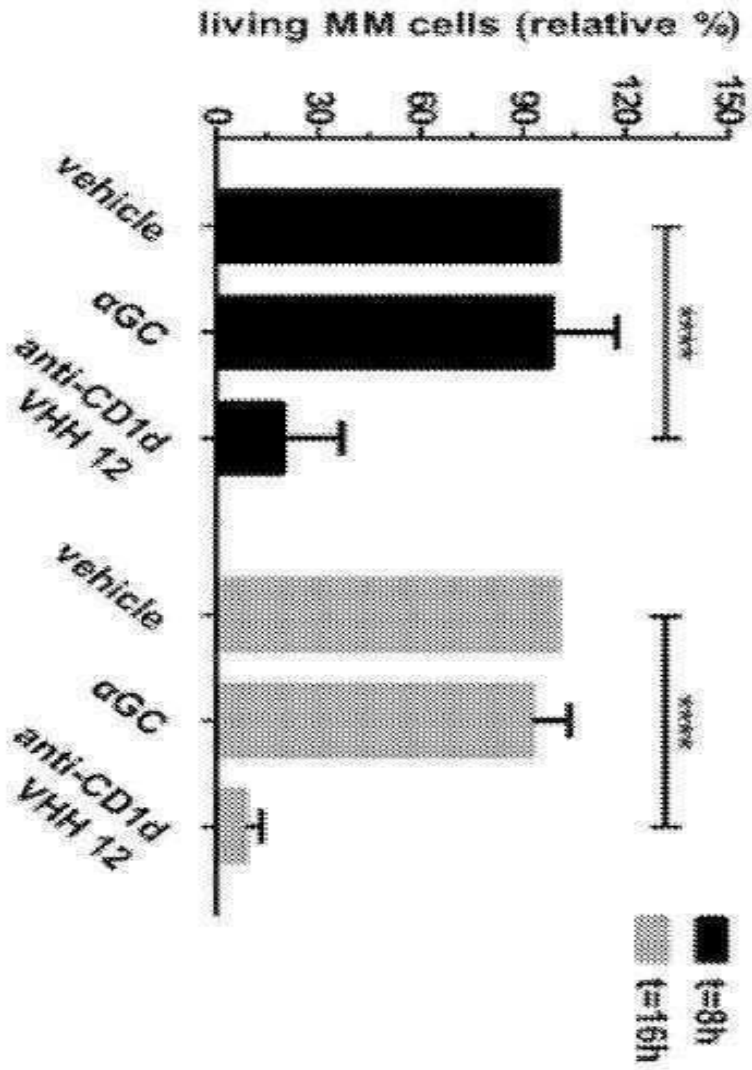
도면8



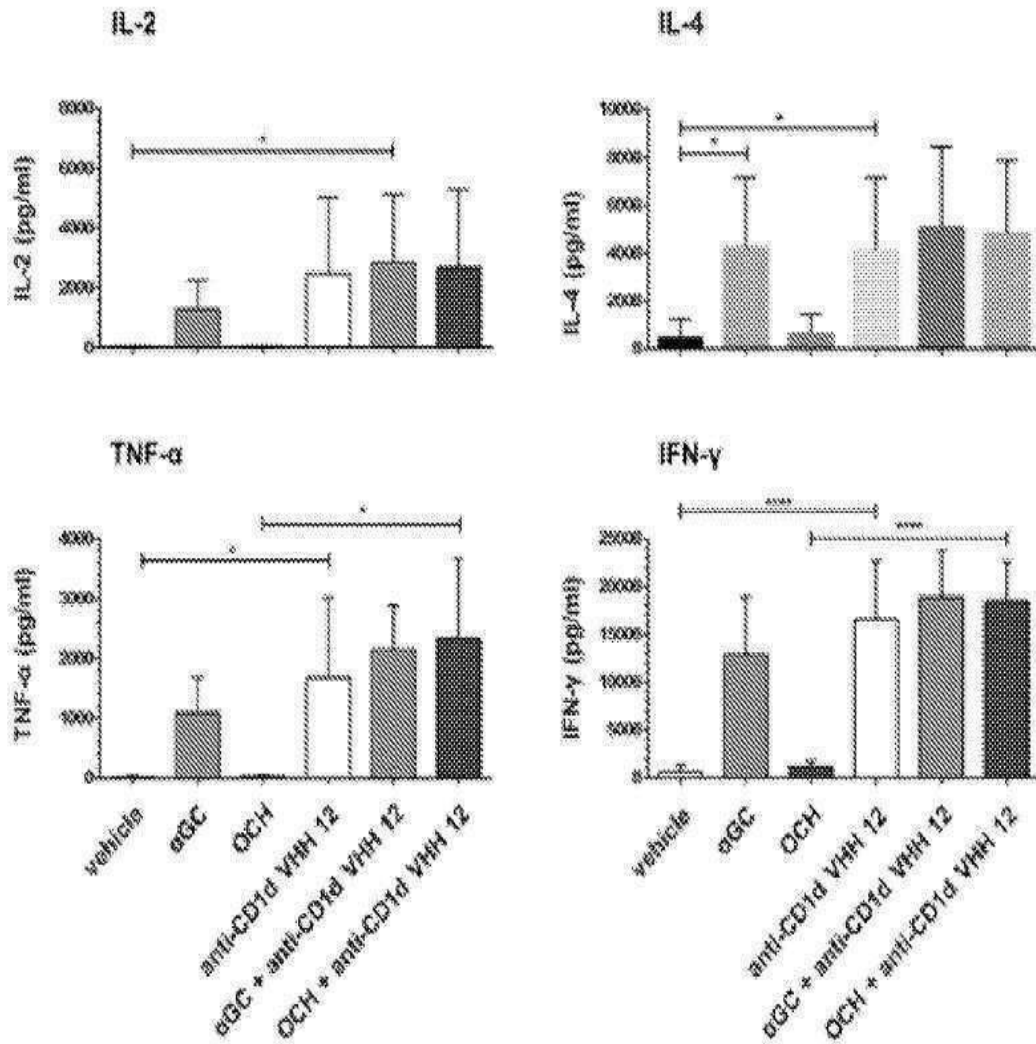
도면9



도면10



도면11



서열목록

<110> LAVA THERAPEUTICS B.V.

<120> Single Domain Antibodies Targeting CD1D

<130> 2017FPI-07-007

<160> 84

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly

1 5 10 15  
 Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro

20 25 30  
 Gly Ile Pro Ile Glu Arg Ser Leu Glu Asn Met Asn Tyr Trp

35 40 45

<210> 2

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 2

Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Val Ile Arg Trp Ser Gly

1 5 10 15

Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met Asn Tyr Trp

35 40 45

<210> 3

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 3

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met Arg Tyr Trp

35 40 45

<210> 4

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 4

Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly

1 5 10 15

Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met Lys Asp Trp

35 40 45

<210> 5

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> VHH nr

<400> 5

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Gly Ile Arg Trp Ser Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Pro Arg Thr Ser Glu Ser Met Arg Tyr Trp

35 40 45

<210> 6

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 6

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ala Ala Ile Arg Trp Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met Arg Tyr Trp

35 40 45

<210> 7  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> VHH nr  
 <400> 7  
 Val Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Gly Ile Arg Trp Asp Asp  
 1 5 10 15

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

<210> 8  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> VHH nr  
 <400> 8  
 Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Asp Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro

20 25 30  
 Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met Arg Tyr Trp  
 35 40 45

<210> 9  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> VHH nr  
 <400> 9  
 Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Val Ile Arg Trp Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met Asn Tyr Trp

35 40 45

<210> 10

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 10

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Asp

1 5 10 15

Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met Arg Tyr Trp

35 40 45

<210> 11

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 11

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Asp

1 5 10 15

Glu Ser Pro Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Asn Met Arg Tyr Ser

35 40 45

<210> 12

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 12  
 Gly Ser Met Phe Ser Asp Asn Val Met Gly Thr Ile Arg Thr Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Thr Ile Pro Val Pro Ser  
 20 25 30  
 Thr Pro Tyr Asp Tyr Trp  
 35

<210> 13

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<

400> 13  
 Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro  
 20 25 30  
 Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Asn Met Asn Tyr Trp  
 35 40 45

<210> 14

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 14

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

<210> 15

<211> 46

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> VHH nr  
 <400> 15  
 Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly  
 1 5 10 15

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

<210> 16

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 16

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

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met Arg Tyr Trp  
 35 40 45

<210> 17

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 17

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

Gly Ile Pro Ile Gly Arg Thr Leu Glu Ser Met Asn Asn Trp

35 40 45

<210> 18

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 18

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly

1 5 10 15

Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Ala Leu Glu Asn Met Asn Tyr Trp

35 40 45

<210> 19

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 19

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met Arg Tyr Trp

35 40 45

<210> 20

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 20

Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly

1 5 10 15  
 Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Leu Val Pro Pro  
 20 25 30  
 Gly Ile Pro Ile Glu Arg Ser Leu Glu Asn Met Asn Tyr Trp  
 35 40 45  
 <210> 21  
 <211> 37  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VHH nr

<400> 21

Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met Gly Val Ile Ser Ser Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly His Val Ala Gly Phe Asp  
 20 25 30

Glu Tyr Asn Tyr Trp

35

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 22

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 23

Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly

1 5 10

<210> 24  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1  
 <400> 24  
 Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 1 5 10

<210> 25  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1  
 <400> 25  
 Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 1 5 10

<210> 26  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1  
 <400> 26  
 Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1  
 <400> 27  
 Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ala  
 1 5 10

<210> 28  
 <211> 10

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 28

Val Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly

1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 29

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly

1 5 10

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 30

Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 31

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly

1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1  
 <400> 32  
 Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1  
 <400> 33  
 Gly Ser Met Phe Ser Asp Asn Val Met Gly  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1  
 <400> 34  
 Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1  
 <400> 35  
 Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 1 5 10

<210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 36

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly

1 5 10

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 37

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Thr

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 38

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 39

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 40  
 Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 1 5 10

<210> 41  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1

<400> 41  
 Gly Arg Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR1

<400> 42  
 Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn Ala Met Gly  
 1 5 10

<210> 43  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR2

<400> 43  
 Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 44  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 44

Val Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 45

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 46

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 47

Gly Ile Arg Trp Ser Asp Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 48

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 49

Gly Ile Arg Trp Asp Asp Glu Asn Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 50

Ala Ile Arg Trp Asp Gly Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Glu Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 51

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR2  
 <400> 51  
 Val Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 52  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR2  
 <400> 52  
 Ala Ile Arg Trp Ser Asp Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Gly Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210>  
 > 53  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR2  
 <400> 53  
 Ala Ile Arg Trp Ser Asp Glu Ser Pro Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 54  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR2

<400> 54  
 Thr Ile Arg Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 55

<211> 17

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 55

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 56

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 57

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 58  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 58

Gly Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 59  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 59

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 60  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 60

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 61  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 61

Ala Ile Arg Trp Ser Asp Glu Ser Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 62

Ala Ile Arg Trp Ser Gly Glu Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 63

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

1 5 10 15

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 64

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Ser Leu Glu Asn Met

1 5 10 15

Asn Tyr Trp

<210> 65  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR3  
<400> 65

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met  
1 5 10 15

Asn Tyr Trp

<210> 66  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR3  
<400> 66

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met  
1 5 10 15

Arg Tyr Trp

<210> 67  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> CDR3  
<400> 67

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met  
1 5 10 15

Lys Asp Trp

<210> 68  
<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 68

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Pro Arg Thr Ser Glu Ser Met

1 5 10 15

Arg Tyr Trp

<210> 69

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 69

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met

1 5 10 15

Arg Tyr Trp

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 70

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Phe Glu Arg Thr Leu Glu Asn Met

1 5 10 15

Arg Tyr Trp

<210> 71

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 71

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met  
1 5 10 15

Arg Tyr Trp

<210> 72

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 72

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met  
1 5 10 15

Asn Tyr Trp

<210> 73

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 73

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met  
1 5 10 15

Arg Tyr Trp

<210> 74

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 74

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Asn Met  
1 5 10 15

Arg Tyr Ser

<210> 75  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR3  
 <400> 75  
 Thr Ile Pro Val Pro Ser Thr Pro Tyr Asp Tyr Trp  
 1 5 10

<210> 76  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR3  
 <400> 76  
 Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Asn Met  
 1 5 10 15  
 Asn Tyr Trp

<210> 77  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> CDR3  
 <400> 77  
 Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met  
 1 5 10 15  
 Asn Tyr Trp

<210> 78  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3  
 <400> 78  
 Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Trp

<210> 79  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3  
 <400> 79  
 Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met  
 1 5 10 15  
 Arg Tyr Trp

<210> 80  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3  
 <400> 80  
 Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Gly Arg Thr Leu Glu Ser Met  
 1 5 10 15  
 Asn Asn Trp

<210> 81  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3  
 <400> 81  
 Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Ala Leu Glu Asn Met

1                    5                    10                    15

Asn Tyr Trp

<210>    82

<211>    19

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220><223>    CDR3

<400>    82

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Thr Leu Glu Ser Met

1                    5                    10                    15

Arg Tyr Trp

<210>    83

<211>    19

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220><223>    CDR3

<400>    83

Arg Leu Val Pro Pro Gly Ile Pro Ile Glu Arg Ser Leu Glu Asn Met

1                    5                    10                    15

Asn Tyr Trp

<210>    84

<211>    11

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220><223>    CDR3

<400>    84

His Val Ala Gly Phe Asp Glu Tyr Asn Tyr Trp

1                    5                    10