(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0076829
(43) 공개일자 2024년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2809 (2013.01)
A61K 39/0011 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2024-7015240(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년11월16일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7017196
원출원일자(국제) 2017년11월16일
심사청구일자 2020년11월02일
(85) 번역문제출일자 2024년05월07일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/079507
(87) 국제공개번호 WO 2018/091606
국제공개일자 2018년05월24일
(30) 우선권주장
62/422,770 2016년11월16일 미국(US)
62/557,208 2017년09월12일 미국(US)

(71) 출원인
아블린쓰 엔.브이.
벨기에 비-9052 쯔비나아르드 테크놀로지파크 21
(72) 발명자
반 후릭 다이앤
벨기에 9270 라아르네 와란데 118
루브럭 아넬리스
벨기에 9700 우데나아르데 노에넨달 25
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

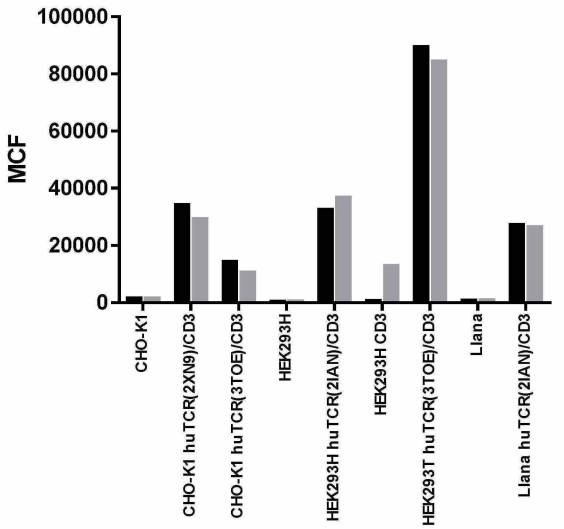
전체 청구항 수 : 총 98 항

(54) 발명의 명칭 **CD123 및 TCR 알파/베타에 결합할 수 있는 T 세포 동원 폴리펩티드**

(57) 요 약

T 세포 상의 TCR의 불변 도메인 및 표적 세포 상의 CD123에 결합하는 폴리펩티드를 제공한다. 폴리펩티드는 CD123 연관된 암 또는 염증성 병태의 치료를 위한 방법에서 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2866 (2013.01)
C07K 16/3061 (2013.01)
C07K 16/468 (2013.01)
A61K 2039/5158 (2023.05)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
(72) 발명자
스토르텔러스 카텔리네
벨기에 9000 겐트 네커스풋스트라아트 259
비이라 조아오
영국 오엑스11 6이이 디드콧 마일스 이스트 52

맥고완 에드워드
영국 에스쥐8 9에프엘 로이스톤 로즈콤 35

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD123 발현 세포의 사멸을 위해 T 세포를 재지정(redirect)하는 폴리펩티드로서, T 세포 수용체(TCR)에 특이적으로 결합하는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISV) 및 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함하고, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

i) CDR1은

a) 서열번호 181-191; 또는

b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

ii) CDR2는

c) 서열번호 192-217; 또는

d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

iii) CDR3은

e) 서열번호 218-225; 또는

f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

i) CDR1은

a) 서열번호 11-16; 또는

b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

ii) CDR2는

c) 서열번호 17-20; 또는

d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

iii) CDR3은

e) 서열번호 21-25; 또는

f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

i) CDR1은

a) 서열번호 181-191; 또는

b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

ii) CDR2는

c) 서열번호 192-217; 또는

d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

iii) CDR3은

e) 서열번호 218-225; 또는

f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

i) CDR1은

a) 서열번호 11-16; 또는

b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서

열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

ii) CDR2는

c) 서열번호 17-20; 또는

d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

iii) CDR3은

e) 서열번호 21-25; 또는

f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

i) CDR1은

a) 서열번호 181-191; 또는

b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 2, 4, 5, 6, 8 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 27, 29, 30, 31, 33 및/또는 35)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

ii) CDR2는

c) 서열번호 192-217; 또는

d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 1, 3, 5, 7, 8 및/또는 9(카밧 번호매김에 따른 위치 50, 52, 54, 56, 57 및/또는 58)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

iii) CDR3은

e) 서열번호 218-225; 또는

f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 1, 4, 5 및/또는 8(카밧 번호매김에 따른 위치 95, 98, 99 및/또는 101)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은

a) 서열번호 181; 또는

b) 서열번호 181의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 2에서 D는 A, S, E 또는 G로 변경되었고/되었거나;

- 위치 4에서 H는 Y로 변경되었고/되었거나;

- 위치 5에서 K는 L로 변경되었고/되었거나;

- 위치 6에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

- 위치 8에서 F는 I 또는 V로 변경되었고/되었거나;

- 위치 10에서 G는 S로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR2는

a) 서열번호 192; 또는

b) 서열번호 192의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 1에서 H는 T 또는 R로 변경되었고/되었거나;

- 위치 3에서 S는 T 또는 A로 변경되었고/되었거나;

- 위치 5에서 G는 S 또는 A로 변경되었고/되었거나;

- 위치 7에서 Q는 D, E, T, A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

- 위치 8에서 T는 A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

- 위치 9에서 D는 A, Q, N, V 또는 S로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR3은

a) 서열번호 218; 또는

b) 서열번호 218의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 1에서 F는 Y, L 또는 G로 변경되었고/되었거나;

- 위치 4에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

- 위치 5에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

- 위치 8에서 D는 N 또는 S로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 181이고, CDR2는 서열번호 192이고, CDR3은 서열번호 218인 폴리펩티드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 서열번호 42 및 78-180으로 이루어진 군으로부터, 또는 서열번호 42 및 78-180 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 폴리펩티드의 N-말단에 위치하는 것인 폴리펩티드.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

i) CDR1은

a) 서열번호 11-16; 또는

b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 3, 6, 7 및/또는 8(카밧 번호매김에 따른 위치 28, 31, 32 및/또는 33)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

ii) CDR2는

c) 서열번호 17-20; 또는

d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 3, 6 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 52, 54

및/또는 58)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

iii) CDR3은

e) 서열번호 21-25; 또는

f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 3, 4 및/또는 5(카밧 번호매김에 따른 위치 97, 98 및/또는 99)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은

a) 서열번호 11; 또는

b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

- 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

- 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

- 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR2은 서열번호 17인 폴리펩티드.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR3은

a) 서열번호 21; 또는

b) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 3에서 P는 A로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 1개의 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 1개의 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명

으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 11이고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21인 폴리펩티드.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터, 또는 서열번호 1-6 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 16인 폴리펩티드.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR2는

a) 서열번호 18; 또는

b) 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 3에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

- 위치 6에서 N은 S로 변경되었고/되었거나;

- 위치 10에서 Q는 E로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR3은

a) 서열번호 23; 또는

b) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

- 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18이고, CDR3은 서열번호 23인 폴리펩티드.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 서열번호 7-10으로 이루어진 군으로부터, 또는 서열번호 7-10 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV를 포함하는 폴리펩티드.

청구항 22

제21항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV는 제1 ISV 및 제2 ISV를 포함하는 이중 파라토프이고, 제1 ISV는 제2 ISV에 의해 결합되는 CD123 상의 에피토프와 상이한 CD123 상의 에피토프에 결합하는 것인 폴리펩티드.

청구항 23

제22항에 있어서, 제1 ISV는 제41항 내지 제48항 중 어느 한 항에 따른 ISV로부터 선택되고, 제2 ISV는 제49항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 ISV로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 24

제23항에 있어서, 제2 ISV는 제1 ISV의 N-말단에 위치하는 것인 폴리펩티드.

청구항 25

제23항에 있어서, 제2 ISV는 제1 ISV의 C-말단에 위치하는 것인 폴리펩티드.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV 및 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 단일 도메인 항체, dAb, 나노바디, VHH, 인간화 VHH, 낙타화 VH 또는 친화성 성숙에 의해 얻은 VHH로 실질적으로 이루어지는 것인 폴리펩티드.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 47, 49, 52, 53, 55, 56 및 58-61로 이루어진 군으로부터, 또는 서열번호 47, 49, 52, 53, 55, 56 및 58-61 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 폴리펩티드.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 47, 49, 52, 53, 55, 56 및 58-61로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포 활성화를 유도하는 폴리펩티드.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 T 세포 활성화는 MHC 인식에 독립적인 것인 폴리펩티드.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 T 세포 활성화는 표적 세포 상의 CD123에 결합된 상기 폴리펩티드를 T 세포에 제시하는 것에 의존하는 것인 폴리펩티드.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 활성화는 상기 T 세포에 의한 하나 이상의 세포 반응을 야기시키고, 상기 세포 반응은 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 이펙터 분자 방출, 세포독성 활성, 활성화 마커의 발현, 및 재지정된 표적 세포 용해로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 33

제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 활성화는 1 nM 내지 1 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 500 pM 이하, 예컨대 400, 300, 200 또는 100 pM 이하, 예컨대 90, 80, 70, 60, 50, 40 또는 30 pM 이하의 평균 EC50 값으로 CD123 발현 세포의 사멸을 야기시키고, 상기 EC50 값은 바람직하게 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포의 비율로 표적 세포로서 MOLM-13 세포 및 이펙터 세포로서 인간 T 세포를 사용하여 TOPRO3 판독에 의해 유세포측정 기반 어세이로 결정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 34

제29항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 활성화는 약 10% 초과, 예컨대 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20% 이상, 예컨대 25% 초과, 또는 30% 초과의 평균 용해율로 CD123 발현 세포의 용해를 야기시키고, 상기 용해율은 바람직하게 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포의 비율로 표적 세포로서 MOLM-13 세포 및 이펙터 세포로서 인간 T 세포를 사용하여 TOPRO3 판독에 의해 유세포측정 기반 어세이로 결정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 35

제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 활성화는 100 nM 내지 10 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 50 nM 이하, 예컨대 40, 30, 20, 10 또는 9 nM 이하, 예컨대 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 nM 이하, 예컨대 500 pM 이하, 예컨대 400, 300, 200 또는 100 pM 이하의 평균 EC50 값으로 IFN-γ 분비를 야기시키고, 상기 EC50 값은 바람직하게 ELISA 기반 어세이로 결정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 36

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 활성화는 상기 T 세포의 증식을 야기시키는 것인 폴리펩티드.

청구항 37

제29항 또는 제36항에 있어서, CD123 양성 세포의 부재 하에서의 T 세포 활성화는 최소인 폴리펩티드.

청구항 38

제29항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, CD123 음성 세포의 T 세포 활성화 유도된 용해는 약 10% 이하, 예컨대 9% 이하, 예컨대 8, 7, 또는 6% 이하이고, 상기 용해는 바람직하게 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포 비율로 표적 세포로서 CD123 음성 세포, 예컨대 U-937 또는 NCI-H929 세포 및 이펙터 세포로서 인간 T 세포를 사용하여 TOPRO3 판독에 의해 유세포측정 기반 어세이로 평균 용해율로서 결정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 39

CD123에 특이적으로 결합하고 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어지는 ISV인 폴리펩티드로서, 여기서

i) CDR1은

a) 서열번호 11-16; 또는

b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은

친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

ii) CDR2는

c) 서열번호 17-20; 또는

d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

iii) CDR3은

e) 서열번호 21-25; 또는

f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 40

제39항에 있어서, 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어지고, 여기서

i) CDR1은

a) 서열번호 11-16; 또는

b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 3, 6, 7 및/또는 8(카밧 번호매김에 따른 위치 28, 31, 32 및/또는 33)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

ii) CDR2는

c) 서열번호 17-20; 또는

d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 3, 6 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 52, 54 및/또는 58)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

iii) CDR3은

e) 서열번호 21-25; 또는

f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 3, 4 및/또는 5(카밧 번호매김에 따른 위치 97, 98 및/또는 99)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또

는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, CDR1은

a) 서열번호 11; 또는

b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

- 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

- 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

- 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, CDR2는 서열번호 17인 폴리펩티드.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, CDR3은

a) 서열번호 21; 또는

b) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 3에서 P는 A로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 1개의 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 1개의 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 44

제39항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, CDR1은 서열번호 11이고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21인 폴리펩티드.

청구항 45

제39항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터, 또는 서열번호 1-6 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 폴리펩티드.

청구항 46

제39항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드.

청구항 47

제41항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 바람직하게 유세포측정법으로 측정된, 10 nM 내지 100 pM의 평균

EC50 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 3, 2, 또는 1 nM 이하의 평균 EC50 값으로 MOLM-13 세포 상에 발현된 인간 CD123에 결합하는 폴리펩티드.

청구항 48

제41항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 10 nM 내지 100 pM의 평균 K_D 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 3 또는 2 nM 이하의 평균 K_D 값으로 인간 CD123에 결합하고, 상기 K_D 값은 바람직하게 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 49

제39항 또는 제40항에 있어서, CDR1은 서열번호 16인 폴리펩티드.

청구항 50

제39항, 제40항 또는 제49항 중 어느 한 항에 있어서, CDR2는

a) 서열번호 18; 또는

b) 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 3에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

- 위치 6에서 N은 S로 변경되었고/되었거나;

- 위치 10에서 Q는 E로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 51

제39항, 제40항, 제49항 또는 제50항 중 어느 한 항에 있어서, CDR3은

a) 서열번호 23; 또는

b) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

- 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

- 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되고;

단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 52

제39항, 제40항 또는 제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18이고, CDR3은 서열번호 23인 폴리펩티드.

청구항 53

제39항, 제40항 또는 제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7-10으로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 서열번호 7-10 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택되는 폴리펩티드.

청구항 54

제39항, 제40항 또는 제49항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7-10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드.

청구항 55

제49항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 바람직하게 유세포측정으로 측정된, 10 μM 내지 100 nM의 평균 EC50 값, 예컨대 5 μM 이하, 예컨대 4, 3, 2, 또는 1 μM 이하의 평균 EC50 값으로 MOLM-13 세포 상에 발현된 인간 CD123에 결합하는 폴리펩티드.

청구항 56

제49항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드는 1 μM 내지 10 nM의 평균 K_D 값, 예컨대 500 nM 이하, 예컨대 400, 300 또는 200 nM 이하의 평균 K_D 값으로 인간 CD123에 결합하고, 상기 K_D 값은 바람직하게 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 폴리펩티드.

청구항 57

CD123에 특이적으로 결합하고, 제39항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 및/또는 서열번호 1-10으로부터 선택되는 폴리펩티드 중 적어도 하나의 CD123과의 결합을 교차-차단하는 폴리펩티드.

청구항 58

CD123에 특이적으로 결합하고, 제39항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 및/또는 서열번호 1-10으로부터 선택되는 폴리펩티드 중 적어도 하나에 의해서 CD123과의 결합이 교차-차단되는 폴리펩티드.

청구항 59

제39항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 도메인 항체, dAb, 나노바디, VHH, 인간화 VHH, 낙타화 VH 또는 친화성 성숙에 의해 얻은 VHH로 실질적으로 이루어지는 폴리펩티드.

청구항 60

CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV를 포함하는 폴리펩티드로서, ISV는 제39항 내지 제59항 중 어느 한 항에 따른 ISV의 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 61

제60항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 2종의 ISV를 포함하고, ISV는 제39항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 ISV의 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 62

제60항 또는 제61항에 있어서, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV는 제1 ISV 및 제2 ISV를 포함하는 이중 파라토프이고, 제1 ISV는 제2 ISV에 의해 결합되는 CD123 상의 에피토프와 상이한 CD123 상의 에피토프에 결합하는 것인 폴리펩티드.

청구항 63

제62항에 있어서, 제1 ISV는 제41항 내지 제48항 중 어느 한 항에 따른 ISV로부터 선택되고, 제2 ISV는 제49항 내지 제56항 중 어느 한 항에 따른 ISV로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 64

제63항에 있어서, 제2 ISV는 제1 ISV의 N-말단에 위치하는 것인 폴리펩티드.

청구항 65

제63항에 있어서, 제2 ISV는 제1 ISV의 C-말단에 위치하는 것인 폴리펩티드.

청구항 66

제1항 내지 제38항 및 제60항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, ISV는 서로 직접 연결되거나 또는 링커를 통해서 서로 연결되는 것인 폴리펩티드.

청구항 67

제66항에 있어서, 링커는 서열번호 325 내지 336으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 포함하고, 경우에 따라 하나 이상의 펩티드 링커를 통해 연결되는, 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛을 더 포함하는 구성체.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 구성체에 증가된 반감기를 제공하는 것인 구성체.

청구항 70

제69항에 있어서, 구성체에 증가된 반감기를 제공하는 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 폴리에틸렌 글리콜 분자, 혈청 단백질 또는 이의 단편, 혈청 단백질에 결합할 수 있는 결합 유닛, Fc 부분 및 혈청 단백질에 결합할 수 있는 소형 단백질 또는 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 구성체.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서, 구성체에 증가된 반감기를 제공하는 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 혈청 알부민(예컨대, 인간 혈청 알부민) 또는 혈청 면역글로불린(예컨대, IgG)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 구성체.

청구항 72

제69항 또는 제70항에 있어서, 구성체에 증가된 반감기를 제공하는 상기 하나 이상의 다른 결합 유닛은 혈청 알부민(예컨대, 인간 혈청 알부민) 또는 혈청 면역글로불린(예컨대, IgG)에 결합할 수 있는 결합 유닛으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 구성체.

청구항 73

제70항에 있어서, 구성체에 증가된 반감기를 제공하는 상기 하나 이상의 다른 결합 유닛은 혈청 알부민에 결합하는 ISV인 구성체.

청구항 74

제73항에 있어서, 혈청 알부민에 결합하는 상기 ISV는 단일 도메인 항체, dAb, 나노바디, VHH, 인간화 VHH 또는 낙타화 VH로 실질적으로 이루어진 것인 구성체.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서, 혈청 알부민에 결합하는 상기 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, CDR1은 GFTFSSFGMS(서열번호 363) 또는 GFTFRSFGMS(서열번호 364)이고, CDR2는 SISGSGSDTL(서열번호 365)이고 CDR3은 GGSLSR(서열번호 366)인 구성체.

청구항 76

제75항에 있어서, 혈청 알부민에 결합하는 상기 ISV는 서열번호 43 및 351 내지 362로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 구성체.

청구항 77

제68항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구성체는 서열번호 63-67, 또는 서열번호 63-67 중 하나와

80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 구성체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 구성체.

청구항 78

제68항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 63-67로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 포함하는 구성체.

청구항 79

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제68항 내지 제78항 중 어느 한 항에 따른 구성체를 포함하고, C-말단 연장부 (X)n를 더 포함하고, 여기서 n은 1 내지 5, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5이고, X는 천연 발생 아미노산이고, 바람직하게 시스테인은 아닌 것인 구성체.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 구성체는 서열번호 338-342로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 구성체.

청구항 81

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 또는 이를 코딩하는 핵산의 발현으로 수득될 수 있도록 하는 제68항 내지 제80항 중 어느 한 항에 따른 구성체를 코딩하는 핵산.

청구항 82

제81항에 있어서, 유전자 구성체의 형태인 핵산.

청구항 83

제81항에 따른 핵산 및/또는 제82항에 따른 유전자 구성체를 포함하는 발현 벡터.

청구항 84

제81항에 따른 핵산, 제82항에 따른 유전자 구성체, 또는 제83항에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 또는 숙주 세포.

청구항 85

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 이를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 수득될 수 있도록 하는 제68항 내지 제80항 중 어느 한 항에 따른 구성체를 제조하는 방법으로서,

a) 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체 또는 다른 적합한 발현 시스템에서, 제81항에 따른 핵산을 발현시키는 단계; 경우에 따라, 후속하여,

b) 제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 또는 제68항 내지 제80항 중 어느 한 항에 따른 구성체를 단리 및/또는 정제하는 단계

를 적어도 포함하는 제조 방법.

청구항 86

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 폴리펩티드, 또는 제68항 내지 제80항 중 어느 한 항에 따른 구성체, 또는 제81항에 따른 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 87

제86항에 있어서, 약학 조성물인 조성물.

청구항 88

제87항에 있어서, 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제 및/또는 보강제를 더 포함하고, 경우에 따라 하나 이상의 추가의 약학적 활성 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함하는 조성물.

청구항 89

제1항 내지 제80항, 제87항 또는 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 폴리펩티드, 구성체, 또는 조성물.

청구항 90

제1항 내지 제80항, 제87항 또는 제88항 중 어느 한 항에 있어서, CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방, 치료 및/또는 경감에 사용하기 위한 폴리펩티드, 구성체, 또는 조성물.

청구항 91

제90항에 있어서, 상기 CD123 연관된 질환 또는 병태는 증식성 질환 또는 염증성 병태인 폴리펩티드, 구성체, 또는 조성물.

청구항 92

CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제68항 내지 제80항 중 어느 한 항에 따른 구성체, 또는 제87항 또는 제88항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 약학적 활성량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 CD123 연관된 질환 또는 병태는 증식성 질환 또는 염증성 병태인 방법.

청구항 94

제91항 또는 제93항에 있어서, 상기 증식성 질환은 암인 폴리펩티드 또는 조성물 또는 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 암은 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종 포함), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병 및 모발 세포 백혈병 포함), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드 또는 조성물 또는 방법.

청구항 96

제91항 또는 제93항에 있어서, 상기 염증성 병태는 자가면역성 루푸스(SLE), 알레르기, 천식 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 폴리펩티드 또는 조성물 또는 방법.

청구항 97

제89항 내지 96항 중 어느 한 항에 있어서, 치료는 조합 치료인 폴리펩티드 또는 조성물 또는 방법.

청구항 98

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드, 제68항 내지 제80항 중 어느 한 항에 따른 구성체, 제81항에 따른 핵산, 제83항에 따른 발현 벡터, 또는 제84항에 따른 숙주 또는 숙주 세포를 포함하는 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 T 세포 상의 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인에 특이적으로 결합하는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 표적 세포 상에서 발현되는 CD123에 결합하는 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 다중특이적 T 세포 동원 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명은 또한 이들 다중특이적 폴리펩티드에서 사용을 위한 1가 CD123 결합 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 비롯하여,

본 발명의 폴리펩티드의 제조를 위한 벡터, 숙주 및 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 사용하는 치료 방법 및 이를 제공하는 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] CD123(인터루킨 3 수용체의 α 서브유닛, IL-3Rα)은 N-글리코시다제로 분해 시 43 kDa이 되는, 75kDa 당단백질이다(Sato et al. 1993, Blood 82: 752-761). CD123은 3개의 세포외 도메인, 경막 도메인 및 짧은 세포내 영역으로 이루어진다. N-말단 세포외 도메인은 CD123과 IL-3의 상호작용에 상당히 기여하는 반면, 세포내 영역은 신호전달에 필수적이다(Barry et al. 1997, Blood 89: 842-852). CD123은 저친화성으로 IL-3에 특이적으로 결합한다. 그 자체로는 IL-3에 결합하지 않는 공통 β(βc) 서브유닛과 CD123의 이종이량체화는 그 결과로 IL-3에 대한 고-친화성 수용체인 IL-3R의 형성을 야기시킨다. βc 서브유닛은 신호 전달에서 중요한 역할을 수행하고 그리하여 다양한 생물학적 기능을 촉발시킨다(Hara et al, 1996 Stem cells 14: 605-618).

[0003] βc 서브유닛이 다양한 세포의 표면 상에서 발현되는데 반해서, CD123 발현은 IL-3 반응성 세포, 예컨대 조혈 줄기/전구체 세포, 단핵구, 거핵구, B-림프구 및 형질세포양 수지상 세포로 더 제한된다. IL-3의 결합은 조혈 세포의 증식 및 분화를 자극한다. 이들 세포의 성숙 동안, CD123 발현은 점차적으로 감소되어 성숙한 림프구 및 과립구에서는 검출할 수 없다.

[0004] CD123은 백혈병 줄기 세포(LSC) 상에서 고도로 발현되고, 많은 질환, 예컨대 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프아구성 백혈병(ALL) 및 모발 세포 백혈병(HCL)의 개시 및 발생과 연관된다고 보고된다. CD123 및 백혈병에서의 관련 임상적 용도에 관한 보다 상세한 설명은 Liu 등의 보고서(2015 Life Sciences 122: 59-64)를 참조한다. 정상 조혈 줄기 세포 및 LSC 상에서 CD123 발현의 차이를 고려하면, CD123은 혈액학적 암의 흥미로운 치료 표적이다.

[0005] AML은 CD123이 과발현된 LSC 세포의 소규모 개체군으로부터 유래된 클론성 악성 질병이다. AML은 골수 및 말초 혈액에서 골수성 전구체 세포의 증식을 특징으로 하고 정상 조혈작용의 파괴를 초래한다. AML 환자에 대한 치료 용법 및 지지 치료가 수년 동안 개선되어 왔지만, 지난 30여년 동안 표준 치료 옵션에 주요한 변화가 일어나지는 않았다. AML의 신규 접근법 및 치료 옵션의 개요는 Medinger 등(2016 Leukemia Research Reports 6: 39-49)을 참조한다. 최근에, 60세 이하의 환자 중 오직 35% 내지 40%만이 이 질환에서 치유되었다. 노령 환자(> 60세)의 경우, 전반적인 예후는 부정적인 채로 남아 있다. 최근에는 동종이계 조혈 줄기 세포 이식이 최고의 치유 기회를 제공한다. 그러한 이유로, AML을 치료하기 위한 신규한 치료법을 여전히 필요로 하고 있다.

[0006] AML의 예방 및 재발의 치료를 위한 가능한 전략은 빠르게 성장하고 있는 암 연구 영역인, 면역요법의 사용이다. 면역요법은 신체의 면역 감시 시스템, 특히 T 세포를 암 세포에게로 인도한다.

[0007] 세포독성 T 세포(CTL)는 암 세포, 감염(특히 바이러스 감염)된 세포, 또는 다른 방식으로 손상된 세포를 사멸시키는 T 림프구이다. T 림프구 (또는 T 세포)는 세포 표면 상에 T 세포 수용체 또는 TCR 분자 및 CD3 수용체를 발현한다. αβ TCR-CD3 복합체 (또는 "TCR 복합체")는 6종의 상이한 유형 I 단일-관통 경막 단백질로 구성된다: 리간드 인식을 담당하는 TCR 이종이량체를 형성하는 TCRα 및 TCRβ 사슬 및 수용체 활성화 시에 인산화되고 대량의 신호전달 성분을 동원시키는 세포질 서열 모티프를 보유하는 비공유적으로 회합된 CD3γ, CD3δ, CD3ε 및 ζ 사슬(Call et al. 2004, Molecular Immunology 40: 1295-1305).

[0008] T 세포 수용체의 α 및 β 사슬 둘 모두는 불변 도메인 및 가변 도메인으로 이루어진다. 생리학적으로, T 세포 수용체의 αβ 사슬은 펩티드 로딩된 MHC 복합체를 인식하고 CD3 사슬과 관여 시 커플링된다. 이들 CD3 사슬은 이후에 관여 신호를 세포내 환경으로 전달한다.

[0009] 세포 용해를 매개하는 천연 발생 세포독성 T 림프구(CTL)의 잠재성을 고려하면, 종양 세포 사멸을 매개하도록 면역 세포를 동원시키기 위해 다양한 전략들이 조사되고 있다. 그러나 특이적 T 세포 반응의 유발은 암 세포에 의한 MHC 분자의 발현 및 특이적 펩티드 항원의 존재, 생성, 수송 및 표시에 의존적이다. 보다 최근의 발달은 재조합 항체 기반 기술: "이중특이체(bispecifics)"을 통한 다클론 방식으로 환자의 모든 T 세포를 관여시킴으로써 항체 요법과 면역요법의 장점을 조합하는 대안적인 접근법을 시도하였다.

[0010] 이중특이적 항체는 하나의 팔대부에 종양 인식 부분(표적-결합 아암)을 갖는 한편 분자의 다른 팔대부는 T 세포 항원, 대개는 CD3에 대한 특이성을 갖도록 (이펙터-결합 팔대부) 조작되었다. 그들의 개별 항원과 2개 팔대부의 동시 결합을 통해서, T 림프구는 그들이 그들의 세포용해성 기능을 발휘할 수 있는 종양 세포로 인도되어 활성화된다.

[0011] 종양 세포에 대항하여 T 세포를 활성화시키는데 이중특이적 항체를 사용하는 개념은 20년이 넘는 이전에 기술되었지만, 제조상의 문제 및 임상적 실패로 인해 이 분야는 침체되었었다. 그들 가변 단편으로 항체의 축소에 의해서, 더 작은 포맷의 이중특이체가 개발되었을 때 추가의 진보가 일어났다.

[0012] 최초의 T 세포 관여 포맷인 블리나투모맙(CD19 및 CD3을 인식하는 BiTE 분자)이 FDA에 의해서 제2선 치료를 위해 2014년 12월에 승인되었지만, 많은 난관들을 극복해야만 했다. 블리나투모맙의 제1 임상 실험은 신경학적 부작용으로 인해, 한편으로는 사이토카인 방출 증후군 및 감염과 다른 한편으로는 객관적 임상 반응 또는 생물학적 활성의 확고한 징후의 부재로 인하여 조기에 중지되었다.

[0013] AML에 대한 치료 옵션으로서, MacroGenics는 최근에 MGD006, CD3 x CD123 이중특이적 DART(dual affinity retargeting molecule)를 개발하였다. Hussaini 등 (2016 Blood 127: 122-131)이 기술한 바와 같이, MGD006은 CD123 양성 백혈병 세포를 인식하고 T 세포 활성화를 유도할 수 있어서 그 결과로 시험관 내 및 생체 내에서 CD123 과발현 종양 세포의 사멸을 일으킬 수 있다. 그러나, DART는 또한 CD123 음성 세포주 $K562^{GFP}$ 와 항온반응시 T 세포 상의 T 세포 활성화 마커 CD25를 상향조절시킨다 (도 1D, Hussaini et al. 2016). 게다가, 표적 독립적 사멸이 2종의 CD123 음성 세포주에서 관찰되었다 (도 2B, Hussaini et al. 2016). 그러므로, 이 DART를 사용하는 경우에, 이러한 표적 독립적 T 세포 활성화로 인한 안전성 문제가 제기될 수 있다.

[0014] 부작용과 전신 부작용, 예컨대 사이토카인 폭풍의 위험성을 최소화하기 위해서, 종양 및 T 세포 항원 팔대부의 선택 시에 극도의 주의를 기울여야만 한다. 후자는 1가 방식으로 TCR 복합체의 불변 도메인에 결합해야만 하고 표적이 되는 암 세포의 부재 하에서 T 세포 신호전달을 촉발해서는 안된다. 그들 표적 (종양 및 T 세포 항원)에 대한 양쪽 팔대부의 오직 특이적 결합만이 세포용해성 시냅스의 형성 및 종양 세포의 후속 사멸을 촉발시킬 수 있다. 이의 항원에 대한 종양 인식 팔대부의 특이성은 불가피하게 표적-독립적 T 세포 활성화를 일으키게 되는 표적외 결합을 피하는데 필수적이다.

[0015] 효능외에는, MGD006을 비롯하여 블리나투모맙은 그 크기가 매우 작고 Fc 도메인이 결여되어 있다. 그러므로, 지속적인 정맥내 주입이 MGD006에 요구될 것이고, 이것은 환자 순응도에 도움이 되지 않을 것이다. 이제 MacroGenics는 Fc 도메인을 이의 차세대 DART 상에 융합시킴으로써 이 문제를 해결하고자 시도하였는데 (WO2015026892), 이러한 시도는 분자를 더 크게 만들뿐만 아니라, 또한 제조상 문제 및 다른 Fc 기능의 이입을 야기시킬 수 있다. Fc를 갖는 더 큰 포맷이 더 양호한 PK를 가질 것으로 기대되지만, 표적-외 활성의 위험성을 다시 도입시킨다.

[0016] 그러한 이유로, 반감기를 조율할 수 있는, 최소의 표적-독립적 T 세포 활성화를 갖는 대안적인 이중특이적 CD123 x T 세포 항원 결합 폴리펩티드에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0017] 본 발명은 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인에 특이적으로 결합하는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인 (ISV) 및 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함하는 다중특이적 폴리펩티드를 제공하여 이러한 문제를 해결한다. 특정한 양상에서, 폴리펩티드는 CD123 발현 세포로 T 세포를 재지정하여 (redirect) T 세포 매개 사멸을 유도시킨다.

[0018] T 세포 수용체 결합 ISV 및 CD123 결합 ISV의 조합은 표적-독립적 T 세포 활성화를 최소로 나타내면서, CD123 발현 세포 (의 부위)에서 효율적인 T 세포 활성화를 야기시키도록 특별히 선택되었다.

[0019] 따라서, 제1 양상에서 본 발명은 T 세포 수용체(TCR)에 특이적으로 결합하는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISV) 및 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함하는, CD123 발현 세포의 사멸을 위해 T 세포를 재지정시키는 폴리펩티드를 제공하고, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서,

[0020] i) CDR1은

[0021] a) 서열번호 181-191; 또는

[0022] b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0023] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0024] ii) CDR2는

[0025] c) 서열번호 192-217; 또는

[0026] d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0027] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0028] iii) CDR3은

[0029] e) 서열번호 218-225; 또는

[0030] f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 갖는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0031] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0032] CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서

[0033] i) CDR1은

[0034] a) 서열번호 11-16; 또는

[0035] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열과 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0036] 로 이루어진 군으로 이루어지고/지거나;

[0037] ii) CDR2는

[0038] c) 서열번호 17-20; 또는

[0039] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열과 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0040] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0041] iii) CDR3은

[0042] e) 서열번호 21-25; 또는

[0043] f) 서열번호 21-25 중 어느 하나의 아미노산 서열과 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여, 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0044] 추가 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서,

[0045] i) CDR1은

[0046] a) 서열번호 181-191; 또는

[0047] b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열과 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0048] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0049] ii) CDR2는

[0050] c) 서열번호 192-217; 또는

[0051] d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0052] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0053] iii) CDR3은

[0054] e) 서열번호 218-225; 또는

[0055] f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0056] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0057] 여기서 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서

[0058] i) CDR1은

[0059] a) 서열번호 11-16; 또는

[0060] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0061] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0062] ii) CDR2는

[0063] c) 서열번호 17-20; 또는

[0064] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0065] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0066] iii) CDR3은

[0067] e) 서열번호 21-25; 또는

[0068] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산

(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0069] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0070] 추가 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서

[0071] i) CDR1은

[0072] a) 서열번호 181-191; 또는

[0073] b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 2, 4, 5, 6, 8 및/또는 10(카밧 (Kabat) 번호매김에 따라서 위치 27, 29, 30, 31, 33 및/또는 35)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0074] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0075] ii) CDR2는

[0076] c) 서열번호 192-217; 또는

[0077] d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 1, 3, 5, 7, 8 및/또는 9(카밧 번호매김에 따라서 위치 50, 52, 54, 56, 57 및/또는 58)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0078] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0079] iii) CDR3은

[0080] e) 서열번호 218-225; 또는

[0081] f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 1, 4, 5 및/또는 8(카밧 번호매김에 따라서 위치 95, 98, 99 및/또는 101)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 서열

[0082] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0083] CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에서 더욱 설명된다.

[0084] 일 측면에서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR1은

[0085] a) 서열번호 181; 또는

[0086] b) 서열번호 181의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0087] - 위치 2에서 D는 A, S, E 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0088] - 위치 4에서 H는 Y로 변경되었고/되었거나;

[0089] - 위치 5에서 K는 L로 변경되었고/되었거나;

[0090] - 위치 6에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0091] - 위치 8에서 F는 I 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0092] - 위치 10에서 G는 S로 변경된 아미노산 서열

[0093] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0094] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된다.

[0095] 이것 이외에 또는 추가적으로, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR2는

[0096] a) 서열번호 192; 또는

[0097] b) 서열번호 192의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0098] - 위치 1에서 H는 T 또는 R로 변경되었고/되었거나;

[0099] - 위치 3에서 S는 T 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0100] - 위치 5에서 G는 S 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0101] - 위치 7에서 Q는 D, E, T, A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0102] - 위치 8에서 T는 A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0103] - 위치 9에서 D는 A, Q, N, V 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0104] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0105] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된다.

[0106] 이것 이외에 또는 추가적으로, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄된 CDR3은

[0107] a) 서열번호 218; 또는

[0108] b) 서열번호 218의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0109] - 위치 1에서 F는 Y, L 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0110] - 위치 4에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0111] - 위치 5에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0112] - 위치 8에서 D는 N 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0113] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0114] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된다.

[0115] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서

[0116] i) CDR1은

[0117] a) 서열번호 181; 또는

[0118] b) 서열번호 181의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0119] - 위치 2에서 D는 A, S, E 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0120] - 위치 4에서 H는 Y로 변경되었고/되었거나;

[0121] - 위치 5에서 K는 L로 변경되었고/되었거나;

[0122] - 위치 6에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0123] - 위치 8에서 F는 I 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0124] - 위치 10에서 G는 S로 변경된 아미노산 서열

[0125] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0126] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것이고;

[0127] ii) CDR2는

[0128] c) 서열번호 192; 또는

[0129] d) 서열번호 192의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0130] - 위치 1에서 H는 T 또는 R로 변경되었고/되었거나;

[0131] - 위치 3에서 S는 T 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0132] - 위치 5에서 G는 S 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0133] - 위치 7에서 Q는 D, E, T, A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0134] - 위치 8에서 T는 A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0135] - 위치 9에서 D는 A, Q, N, V 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0136] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0137] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[0138] iii) CDR3은

[0139] e) 서열번호 218; 또는

[0140] f) 서열번호 218의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0141] - 위치 1에서 F는 Y, L 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0142] - 위치 4에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0143] - 위치 5에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0144] - 위치 8에서 D는 N 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0145] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0146] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되고;

[0147] CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에서 더욱 기술된다.

[0148] 바람직한 측면에서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 181-191로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR2는 서열번호 192-217로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR3은 서열번호 218-225로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0149] 따라서, 본 발명은 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지는 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV를 포함하고, 본 명세서에서 더욱 설명하는

바와 같이 CD123에 특이적으로 결합하는 ISV를 포함하는 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CDR1은 서열번호 181-191로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR2는 서열번호 192-217로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR3은 서열번호 218-225로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0150] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 181이고, CDR2는 서열번호 192이고, CDR3은 서열번호 218이고 CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에서 더욱 기술되는 바와 같다.

[0151] 본 발명의 폴리펩티드에서 사용을 위하 바람직한 ISV는 서열번호 42 및 78-180으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있거나 또는 서열번호 42 및 78-180 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 서열번호 42 및 78-180으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 서열번호 42 및 78-180 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95%, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택될 수 있고, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 더욱 기술되는 바와 같다.

[0152] TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 발명의 폴리펩티드의 임의 위치에 존재해도 된다. 바람직하게, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 발명의 폴리펩티드의 N-말단에 존재한다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 폴리펩티드의 N-말단에 위치된다.

[0153] 본 발명의 폴리펩티드는 하나 이상의 ISV를 더 포괄한다. 본 발명의 폴리펩티드에서 사용을 위한 ISV는 특히 CD123 발현 표적 세포 상에 존재하는 CD123에 대한 그들의 높은 특이성에 대해 선택되었다.

[0154] 그러므로, 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같으며, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서

[0155] i) CDR1은

[0156] a) 서열번호 11-16; 또는

[0157] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 3, 6, 7 및/또는 8(카밧 번호매김에 따라서 위치 28, 31, 32 및/또는 33)에 위치되고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0158] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0159] ii) CDR2는

[0160] c) 서열번호 17-20; 또는

[0161] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 3, 6 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 52, 54 및/또는 58)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0162] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0163] iii) CDR3은

[0164] e) 서열번호 21-25; 또는

[0165] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열

로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 3, 4 및/또는 5(카밧 번호매김에 따른 위치 97, 98 및/또는 99)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0166] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0167] 본 발명은 선택된 항원 결합 부위 또는 파라토프를 갖는 CD123에 특이적으로 결합하는 ISV를 동정하였다. 일 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 ISV 56A10 (즉, 56A10와 동일한 패밀리에 속하는 ISV 또는 56A10과 관련된 ISV)이 결합하는 에피토프에 결합한다.

[0168] 일 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR1은

[0169] a) 서열번호 11; 또는

[0170] b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0171] - 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

[0172] - 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

[0173] - 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

[0174] - 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

[0175] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0176] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0177] 이것 이외에 또는 추가로, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄된 CDR2은 서열번호 17일 수 있다.

[0178] 이것 이외에 또는 추가로, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄된 CDR3은

[0179] a) 서열번호 21; 또는

[0180] b) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0181] - 위치 3에서 P는 A로 변경된 아미노산 서열

[0182] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0183] 단, 1개의 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 1개의 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0184] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서

[0185] i) CDR1은

[0186] a) 서열번호 11; 또는

[0187] b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0188] - 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

[0189] - 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

[0190] - 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

[0191] - 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

[0192] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0193] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[0194] ii) CDR2는 서열번호 17이고;

[0195] iii) CDR3은

[0196] c) 서열번호 21; 또는

[0197] d) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0198] - 위치 3에서 P는 A로 변경된 아미노산 서열

[0199] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0200] 단, 1개의 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 1개의 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0201] 바람직한 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 11-15로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21-22로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0202] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV를 포함하고, 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어진 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함하는 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CDR1은 서열번호 11-15로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21-22로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0203] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, CDR1은 서열번호 11이고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21이다.

[0204] 본 발명의 폴리펩티드에서 사용을 위해 바람직한 ISV는 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있거나 또는 서열번호 1-6 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 서열번호 1-6 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택될 수 있다.

[0205] 다른 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 나노바디 55F03 (즉, 55F03과 동일한 패밀리에 속하는 ISV 또는 55F03과 관련된 ISV)에 의해 결합되는 에피토프에 결합된다.

[0206] 일 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR1은 서열번호 16이다.

[0207] 이것 이외에 또는 추가로, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR2는

[0208] a) 서열번호 18; 또는

[0209] b) 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해서 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0210] - 위치 3에서 Y는 W로 변화되었고/되었거나;

[0211] - 위치 6에서 N은 S로 변화되었고/되었거나;

[0212] - 위치 10에서 Q는 E로 변화된 아미노산 서열

[0213] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0214] 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로

CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0215] 이것 이외에 또는 추가로, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR3은

[0216] a) 서열번호 23; 또는

[0217] b) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0218] - 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

[0219] - 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

[0220] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0221] 단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0222] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서

[0223] i) CDR1은 서열번호 16이고;

[0224] ii) CDR2는

[0225] a) 서열번호 18; 또는

[0226] b) 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해서 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0227] - 위치 3에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0228] - 위치 6에서 N은 S로 변경되었고/되었거나;

[0229] - 위치 10에서 Q는 E로 변경된 아미노산 서열

[0230] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0231] 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[0232] iii) CDR3은

[0233] c) 서열번호 23; 또는

[0234] d) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해서 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0235] - 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

[0236] - 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

[0237] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0238] 단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0239] 바람직한 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18-20으로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR3은 서열번호 23-25로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0240] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같이 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV를 포함하고, 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어진 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함하는 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CDR1은 서열번호 16

이고, CDR2는 서열번호 18-20로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR3은 서열번호 23-25로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0241] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어지고, CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18이고, CDR3은 서열번호 23이다.

[0242] 본 발명의 폴리펩티드에서 사용을 위해 바람직한 ISV는 서열번호 7-10으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있거나 또는 서열번호 7-10 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택될 수 있다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 서열번호 7-10로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 서열번호 7-10 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택된다.

[0243] 본 발명의 폴리펩티드는 CD123에 특이적으로 결합하는 하나의 ISV 또는 CD123에 특이적으로 결합하는 하나를 초과하는 ISV, 예컨대 예를 들어 2, 3 또는 심지어 그 이상의 ISV를 포괄할 수 있다. 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV를 포함하고, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV, 바람직하게 2종의 ISV를 포함하는, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공한다.

[0244] 본 발명의 폴리펩티드에 포괄되는 둘 이상, 바람직하게 2종의 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같은 CD123에 특이적으로 결합하는 임의의 ISV일 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 포괄되는 둘 이상, 바람직하게 2종의 ISV는 동일한 ISV (즉, 동일한 아미노산 서열을 가짐)일 수 있거나 또는 그들은 상이한 ISV (즉, 상이한 아미노산 서열을 가짐)일 수 있다. 일 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV는 제1 ISV 및 제2 ISV를 포함하는 이중 파라토프(biparatopic)이고, 여기서 제1 ISV는 제2 ISV에 의해 결합되는 CD123 상의 에피토프와 상이한 CD123 상의 에피토프에 결합된다.

[0245] 바람직하게, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상, 바람직하게 2종의 ISV는 56A10과 관련된 ISV 및 55F03과 관련된 ISV이다. 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 제1 ISV는 56A10과 관련된 ISV로부터 선택되고 제2 ISV는 55F03과 관련된 ISV로부터 선택된다.

[0246] CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상, 바람직하게 2종의 ISV는 본 발명의 폴리펩티드의 임의 위치에 존재할 수 있다. 일 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 제2 ISV는 제1 ISV의 N-말단에 위치된다. 다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 제2 ISV는 제1 ISV의 C-말단에 위치된다.

[0247] 본 발명의 폴리펩티드에 존재하는 ISV는 당분야에 공지되고 본 명세서에 더욱 기술된 바와 같은 임의의 ISV일 수 있다. 일 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드에 존재하는 ISV는 단일 도메인 항체, dAb, 나노바디, VHH, 인간화 VHH, 낙타화 VH 또는 친화성 성숙에 의해 얻은 VHH로부터 선택된다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV 및 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 단일 도메인 항체, dAb, 나노바디, VHH, 인간화 VHH, 낙타화 VH 또는 친화성 성숙에 의해 얻은 VHH로 (실질적으로) 이루어진다.

[0248] 본 발명의 바람직한 폴리펩티드는 서열번호 47, 49, 52, 53, 55, 56 및 58-61로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 서열번호 47, 49, 52, 53, 55, 56 및 58-61 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택된다.

[0249] 보다 바람직하게, 폴리펩티드는 서열번호 47, 49, 52, 53, 55, 56 및 58-61로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0250] 상기에 기술된 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드는 CD123 발현 세포의 사멸을 위해서 T 세포를 재지정시킨다. 일 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 상기 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도한다.

[0251] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 상기 T 세포 활성화는 MHC 인식에 독립적이다.

[0252] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 상기 T 세포 활성화는 T 세포

로 표적 세포 상의 CD123에 결합된 상기 폴리펩티드의 제시에 의존적이다.

[0253] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 상기 T 세포 활성화는 상기 T 세포에 의한 하나 이상의 세포 반응을 야기시키고, 상기 세포 반응은 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 이펙터 분자 방출, 세포독성 활성, 활성 마커의 발현 및 재지정된 표적 세포 용해로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0254] 특별한 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드에 의해 유도된 T 세포 활성화는 1 nM 내지 1 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 500 pM 이하, 예컨대 400, 300, 200 또는 100 pM 이하, 예컨대 90, 80, 70, 60, 50, 40 또는 30 pM 이하의 평균 EC50 값으로 CD123 발현 세포의 사멸을 야기시키고, 상기 EC50 값은 바람직하게 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포 비율에서 이펙터 세포로서 인간 T 세포 및 표적 세포로서 MOLM-13 세포를 사용하는 TOPRO3 판독에 의한 유세포측정 기반 어세이에서 결정된다.

[0255] 다른 특정한 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드에 의해 유도된 T 세포 활성화는 약 10% 초과, 예컨대 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20% 이상, 예컨대 25% 초과, 또는 심지어 30% 초과의 평균 용해 백분율로 CD123 발현 세포의 용해를 야기시키고, 상기 용해 백분율은 바람직하게 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포 비율로 이펙터 세포로서 인간 T 세포 및 표적 세포로서 MOLM-13 세포를 사용하는 TOPRO3 판독에 의한 유세포측정 기반 어세이로 결정된다.

[0256] 다른 특별한 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 본 발명의 폴리펩티드에 의해 유도되는 상기 T 세포 활성화는 100 nM 내지 10 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 50 nM 이하, 예컨대 40, 30, 20, 10 또는 9 nM 이하, 예컨대 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 nM 이하, 예컨대 500 pM 이하, 예컨대 400, 300, 200 또는 100 pM 이하로 IFN-γ 분비를 야기시키고, 상기 EC50 값은 바람직하게 ELISA 기반 어세이로 결정된다.

[0257] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 상기 T 세포 활성화는 상기 T 세포의 증식을 야기시킨다.

[0258] 상기에 기술된 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드는 표적-독립적 T 세포 활성화가 최소화되도록 선택된다. 그러므로, 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CD123 양성 세포의 부재하에서 T 세포 활성화는 최소이다.

[0259] 보다 특별히, 본 발명의 폴리펩티드에 의한 CD123 음성 세포의 T 세포 활성화 유도된 용해는 약 10% 이하, 예컨대 9% 이하, 예컨대 8, 7, 또는 6% 이하이고, 상기 용해는 바람직하게 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포 비율로 이펙터 세포로서 인간 T 세포 및 표적 세포로서 U-937 세포를 사용하는 TOPRO3 판독에 의한 유세포측정 기반 어세이에서 평균 용해 백분율로서 결정된다.

[0260] 본 발명은 또한 빌딩 블록, 즉 본 발명의 폴리펩티드를 구성하는 ISV에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 CD123에 특이적으로 결합하고, 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어지는 ISV인 폴리펩티드를 제공하고, 여기서

[0261] i) CDR1은

[0262] a) 서열번호 11-16; 또는

[0263] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해서 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0264] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0265] ii) CDR2는

[0266] c) 서열번호 17-20; 또는

[0267] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나

또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0268] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0269] iii) CDR3은

[0270] e) 서열번호 21-25; 또는

[0271] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0272] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0273] 보다 바람직하게, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV인 폴리펩티드는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어지고, 여기서

[0274] i) CDR1은

[0275] a) 서열번호 11-16; 또는

[0276] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0277] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0278] ii) CDR2는

[0279] c) 서열번호 17-20; 또는

[0280] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0281] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0282] iii) CDR3은

[0283] e) 서열번호 21-25; 또는

[0284] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0285] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0286] 추가 측면에서, 본 발명은 또한 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어지는, 상기 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서

[0287] i) CDR1은

[0288] a) 서열번호 11-16; 또는

[0289] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 3, 6, 7 및/또는 8(카밧 번호매김에 따른 위치 28, 31, 32 및/또는 33)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여

동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123으로 결합되고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0290] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0291] ii) CDR2는

[0292] c) 서열번호 17-20; 또는

[0293] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 3, 6 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 52, 54 및/또는 58)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0294] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0295] iii) CDR3은

[0296] e) 서열번호 21-25; 또는

[0297] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 3, 4 및/또는 5(카밧 번호매김에 따른 위치 97, 98 및/또는 99)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0298] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0299] 본 발명은 선택된 항원 결합 부위 또는 파라토프로 CD123에 특이적으로 결합하는 ISV를 동정하였다. 일 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 ISV 56A10 (즉, 56A10과 동일한 패밀리에 속하는 ISV 또는 56A10과 관련된 ISV)에 의해 결합되는 에피토프에 결합된다.

[0300] 따라서, 일 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR1은

[0301] a) 서열번호 11; 또는

[0302] b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0303] - 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

[0304] - 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

[0305] - 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

[0306] - 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

[0307] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0308] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합되고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0309] 이것 이외에 또는 추가로, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR2는 서열번호 17이다.

[0310] 이것 이외에 또는 추가로, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR3은

[0311] a) 서열번호 21; 또는

[0312] b) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0313] - 위치 3에서 P는 A로 변경된 아미노산 서열

[0314] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0315] 단, 1개의 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 1개의 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0316] 따라서, 본 발명은 또한 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어지는, 상기 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서

[0317] i) CDR1은

[0318] a) 서열번호 11; 또는

[0319] b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0320] - 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

[0321] - 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

[0322] - 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

[0323] - 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

[0324] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0325] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[0326] ii) CDR2는 서열번호 17이고;

[0327] iii) CDR3은

[0328] c) 서열번호 21; 또는

[0329] d) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0330] - 위치 3에서 P는 A로 변경된 아미노산 서열

[0331] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0332] 단, 2개의 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 1개의 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0333] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CDR1은 서열번호 11-15로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21-22로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게, CDR1은 서열번호 11이고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21이다.

[0334] 56A10과 관련된 본 발명의 바람직한 ISV는 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있거나 또는 서열번호 1-6 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택된다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 폴리펩티드는 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 서열번호 1-6 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택된다. 바람직하게, 폴리펩티드는 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0335] 이러 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게 유세포측정으로 측정된, 10 nM 내지 100 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 3, 2, 또는 1 nM 미만 또는 그 이하의 평균 EC50 값으로 MOLM-13 세포 상에서 발현되는 인간 CD123에 결합된다.

[0336] 다른 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 10 nM 내지 100 pM의 평균 KD 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 3 또는 2 nM 이하의 평균 KD 값으로 인간 CD123에 결합되고, 상기 KD 값은 바람직하게 표면 플라스몬 공명으로 측정된

다.

[0337] 또 다른 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 ISV 55F03 (즉, 55F03과 동일한 패밀리에 속하는 ISV 또는 55F03과 관련된 ISV)에 의해 결합되는 에피토프에 결합된다.

[0338] 따라서, 일 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR1은 서열번호 16이다.

[0339] 이것 이외에 또는 추가로, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR2는

[0340] a) 서열번호 18; 또는

[0341] b) 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0342] - 위치 3에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0343] - 위치 6에서 N은 S로 변경되었고/되었거나;

[0344] - 위치 10에서 Q는 E로 변경된 아미노산 서열

[0345] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0346] 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이에 대해 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0347] 이것 이외에 또는 추가로, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV에 포괄되는 CDR3은

[0348] a) 서열번호 23; 또는

[0349] b) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0350] - 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

[0351] - 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

[0352] 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고;

[0353] 단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0354] 따라서, 본 발명은 또한 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어진, 상기 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서

[0355] i) CDR1은 서열번호 16이고;

[0356] ii) CDR2는

[0357] a) 서열번호 18; 또는

[0358] b) 서열번호 18의 아미노산에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0359] - 위치 3에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0360] - 위치 6에서 N은 S로 변경되었고/되었거나;

[0361] - 위치 10에서 Q는 E로 변경된 아미노산 서열

[0362] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0363] 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[0364] iii) CDR3은

[0365] c) 서열번호 23; 또는

[0366] d) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0367] - 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

[0368] - 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

[0369] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0370] 단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 동일하거나, 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0371] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18-20으로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR3은 서열번호 23-25로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게, CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18이고, CDR3은 서열번호 23이다.

[0372] 56A10과 관련된 본 발명의 바람직한 ISV는 서열번호 7-10으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있거나 또는 서열번호 7-10 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택된다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 폴리펩티드는 서열번호 7-10으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 서열번호 7-10 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택된다. 바람직하게, 폴리펩티드는 서열번호 7-10으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0373] 일 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게 유세포측정법으로 측정된, 10 μM 내지 100 nM의 평균 EC50 값, 예컨대 5 μM 이하, 예컨대 4, 3, 2, 또는 1 μM 이하의 평균 EC50 값으로 MOLM-13 세포 상에서 발현되는 인간 CD123에 결합한다.

[0374] 다른 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 1 μM 내지 10 nM의 평균 KD 값, 예컨대 500 nM 이하, 예컨대 400, 300 또는 200 nM 이하의 평균 KD 값으로 CD123에 결합하고, 상기 KD 값은 바람직하게 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0375] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명에 기술된 바와 같은 폴리펩티드 중 적어도 하나의 CD123과의 결합을 교차-차단하거나 또는 서열번호 1-10을 갖는 폴리펩티드 중 하나의 CD123과의 결합을 교차-차단시키는 폴리펩티드를 제공한다.

[0376] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드 중 적어도 하나에 의해 CD123과의 결합이 교차-차단되거나 또는 서열번호 1-10을 갖는 폴리펩티드 중 하나에 의해 CD123과의 결합이 교차-차단되는 폴리펩티드를 제공한다.

[0377] 본 명세서에 기술된 바와 같이 CD123에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드는 바람직하게 단일 도메인 항체, dAb, 나노바디, VHH, 인간화 VHH, 낙타화 VH 또는 친화성 성숙에 의해 얻은 VHH로 (실질적으로) 이루어진다.

[0378] CD123에 특이적으로 결합하는 본 발명의 폴리펩티드는 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 함유할 수 있다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV, 바람직하게 2종을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 바람직한 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV, 바람직하게 2종의 ISV는 56A10과 관련된 ISV의 그룹 또는 55F03와 관련된 ISV의 그룹으로부터 선택된다.

[0379] 추가 측면에서, 본 발명은 CD123에 특이적으로 결합하는 2종의 ISV를 포함하는, CD123에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 ISV는 56A10과 관련된 ISV의 그룹 또는 55F03과 관련된 ISV의 그룹으로부터 선택된다.

[0380] CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV, 바람직하게 2종의 ISV를 포함하는 본 발명의 폴리펩티드는 바람직하게 제1 ISV 및 제2 ISV를 포함하는 이중 파라토프이고, 여기서 제1 ISV는 제2 ISV에 의해 결합되는 CD123 상의 에피토프와 상이한 CD123 상의 에피토프에 결합된다. 바람직한 측면에서, 제1 ISV는 56A10과 관련된 ISV의 군으로부터 선택되고 제2 ISV는 55F03와 관련된 ISV의 군으로부터 선택된다.

[0381] ISV는 CD123에 결합하는 본 발명의 이중 파라토프 폴리펩티드 내 임의 위치에 존재할 수 있다. 일 측면에서, 제2 ISV는 제1 ISV의 N-말단에 위치된다. 다른 측면에서, 제2 ISV는 제1 ISV의 C-말단에 위치된다.

[0382] 본 발명의 폴리펩티드에 존재하는 ISV는 서로 직접적으로 연결될 수 있거나, 또는 그들은 하나 이상의 링커, 바람직하게 펩티드 링커를 통해서 연결될 수 있다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 ISV는 서로 직접적으로 연결되거나 또는 링커를 통해서 서로 연결된다. 본 발명의 폴리펩티드에 사용을 위해 바람직한 링커는 표 B-3 (서열번호 325 내지 336)에 표시되어 있다. 이와 같이, 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 링커는 서열번호 325 내지 336로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0383] 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 포함하고, 경우에 따라 하나 이상의 펩티드 링커를 통해서 연결되는, 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛을 더 포함하는, 구성체 (본 명세서에서 또한 "본 발명의 구성체(들)"라고 함)를 더 포괄한다.

[0384] 추가 측면에서, 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛이 없는 상응하는 폴리펩티드와 비교하여 구성체에 증가된 반감기를 제공할 수 있다. 폴리펩티드에 증가된 반감기를 제공하는 상기 하나 이상의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 혈청 중에 폴리펩티드의 체류를 위해 제공되는 임의의 분자일 수 있다. 일 측면에서, 폴리펩티드에 증가된 반감기를 제공하는 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 폴리에틸렌 글리콜 분자, 혈청 단백질 또는 이의 단편, 혈청 단백질에 결합할 수 있는 결합 유닛, Fc 단백질 및 혈청 단백질에 결합할 수 있는 소형 단백질 또는 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0385] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체를 제공하고, 여기서 구성체에 증가된 반감기를 제공하는 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 혈청 알부민(예컨대, 인간 혈청 알부민) 또는 혈청 면역글로불린(예컨대, IgG)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0386] 다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체를 제공하고, 여기서 구성체에 증가된 반감기를 제공하는 상기 하나 이상의 다른 결합 유닛은 혈청 알부민(예컨대, 인간 혈청 알부민) 또는 혈청 면역글로불린(예컨대, IgG)에 결합할 수 있는 결합 유닛으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게, 폴리펩티드에 증가된 반감기를 제공하는 상기 하나 이상의 다른 결합 유닛은 혈청 알부민에 결합하는 ISV이다. 추가 측면에서, 혈청 알부민에 결합하는 상기 ISV는 단일 도메인 항체, dAb, 나노바디, VHH, 인간화 VHH 또는 낙타화 VH로 (실질적으로) 이루어질 수 있다.

[0387] 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체에 사용을 위해 바람직한 ISV는 혈청 알부민에 결합하고, 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 (실질적으로) 이루어진 ISV이고, 여기서 CDR1은 GFTFSSFGMS (서열번호 363) 또는 GFTFRSFGMS (서열번호 364)이고, CDR2는 SISGSGSDTL (서열번호 365)이고 CDR3은 GGSLSR (서열번호 366)이다. 혈청 알부민에 결합하는 바람직한 ISV는 서열번호 43 및 351 내지 362로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0388] 본 발명의 폴리펩티드 나머지 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛과 관련하여, 예컨대 ISV는 서로 직접적으로 연결될 수 있거나 또는 링커를 통해서 서로 연결될 수 있다. 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체를 제공하고, 여기서 링커는 서열번호 325 내지 336으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0389] 본 발명의 바람직한 구성체는 서열번호 63-67로 이루어진 군으로부터 선택되거나 또는 서열번호 63-67 중 하나, 바람직하게, 서열번호 63-67과 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 심지어 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 구성체일 수 있다.

[0390] 본 발명의 구성체는 예를 들어, 구성체를 보다 인간-유사하게 만들고/만들거나, 구성체의 발현을 개선시키고/시키거나, 저장 시 구성체의 안정성을 증가시키고/시키거나 구성체를 혈청에 이미 존재하는 항체에 의해 결합하는 경향이 덜하게 만들기 위해서, 서열 최적화될 수 있다. 일 측면에서, 본 발명은 C-말단 연장부 (X)n을 더 포함하는, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체를 제공하고, 여기서 n은 1 내지 5, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5이고, X는 천연 발생 아미노산이고, 바람직하게 시스테인은 아니다. 바람직한 구성체는 서열번호 338-342로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0391] 본 발명은 또한 본 명세서에서 정의된 바와 같은 폴리펩티드 및 구성체(이를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 얻을 수 있음)를 코딩하는 핵산을 제공한다. 일 측면에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 핵산은 유전자 구성체의 형태이다.

[0392] 본 발명은 또한 본 명세서에 정의된 바와 같은 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0393] 본 발명은 또한 본 명세서에 정의된 바와 같은 핵산, 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 발현 벡터를 포함하는 숙주 또는 숙주 세포를 제공한다.

[0394] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 정의된 바와 같은 폴리펩티드 또는 구성체(이를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 얻을 수 있음)를 제조하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 적어도

[0395] a) 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 또는 다른 적합한 발현 시스템에서, 본 명세서에 정의된 바와 같은 핵산을 발현시키는 단계; 경우에 따라 후속하여,

[0396] b) 본 명세서에 정의된 바와 같은 폴리펩티드 또는 구성체를 단리 및/또는 정제하는 단계

[0397] 를 포함한다.

[0398] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 폴리펩티드 또는 구성체 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다. 일 측면에서, 조성물은 약학 조성물이다. 일 측면에서, 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제 및/또는 보강제를 더 포함하고, 경우에 따라 하나 이상의 추가의 약학적 활성 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함한다.

[0399] 본 발명은 또한 의약으로서 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물을 제공한다. 추가 측면에서, 본 발명은 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 용도를 제공한다. 추가 측면에서, 본 발명은 CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방, 치료 및/또는 경감에서 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방, 치료 또는 및/또는 경감을 위한 방법을 제공하고, 이를 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 약학적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 CD123 연관 질환 또는 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 용도를 제공한다. 제한없이, CD123 연관된 질환 또는 병태는 증식성 질환 또는 염증성 병태일 수 있다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 증식성 질환 또는 염증성 병태의 예방, 치료 및/또는 경감에서 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 증식성 질환 또는 염증성 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 방법을 제공하고, 이를 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 약학적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 증식성 질환 또는 염증성 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 용도를 제공한다.

[0400] 제한없이, 증식성 질환은 암일 수 있다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 암의 예방, 치료 및/또는 경감에 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 암의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 방법을 제공하고, 이를 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 암의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 용도를 제공한다.

[0401] 본 발명의 방법으로 치료하려는 암은 CD123 표적화 세포 사멸을 통해 치료되는 것으로 알려진 임의의 암일 수 있다. 비정상적으로 증식되는 세포 상에 CD123 발현이 관여되는 것으로 알려진 암은 (제한없이) 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종 포함), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 모발 세포 백혈병 포함), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종을 포함한다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종 포함), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 모발 세포 백혈병 포함), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종으로부터 선택된 암의 예방, 치료 및/또는 경감에서 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 본 명세서에 기술된 바와 같

은 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종 포함), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 모발 세포 백혈병 포함), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종으로부터 선택되는 암의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 방법을 제공하고, 이를 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 약학적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종 포함), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 모발 세포 백혈병 포함), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 용도를 제공한다.

[0402] 본 발명의 방법에 의해 치료하려는 염증성 병태는 CD123 표적화 세포 사멸에 의해 치료되는 것으로 알려진 임의의 염증성 병태일 수 있다. 세포 상에 CD123 발현이 관여되는 것으로 알려진 염증성 병태는 (제한없이) 자가면역성 루푸스(SLE), 알레르기, 천식 및 류마티스성 관절염을 포함한다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 자가면역성 루푸스(SLE), 알레르기, 천식 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 병태의 예방, 치료 및/또는 경감에서 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물을 제공한다. 본 발명은 자가면역성 루푸스(SLE), 알레르기, 천식 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 방법을 제공하고, 이를 필요로 하는 대상체에게 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 약학적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 자가면역성 루푸스(SLE), 알레르기, 천식 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 용도를 제공한다.

[0403] 본 발명의 폴리펩티드, 구성체 및 조성물은 또한 다른 치료 약물과 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 조합 치료에서 사용을 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물을 제공한다.

[0404] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 방법을 제공하고, 여기서 치료는 조합 치료이다.

[0405] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 용도를 제공하고, 여기서 치료는 조합 치료이다.

[0406] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체, 본 명세서에 기술된 바와 같은 핵산, 본 명세서에 기술된 바와 같은 발현 벡터 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 숙주 또는 숙주 세포를 포함하는 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0407] *도 1:* 100 nM 항-인간 TCR a/b 항체 (클론 BW242/412) (검은색) 및 100 nM 항-인간 CD3 항체 (클론 OKT-3) (회색)를 사용한 형질감염된 CHO, HEK293 및 Llana 세포주 상에서 인간 TCR/CD3 및 인간 CD3의 발현의 평가. MCF 값 (평균 채널 형광도)을 각 세포주에 대해 그래프화하였다. X-축은 세포 유형 및 형질감염된 세포를 나타내고; CD3은 CD3 복합체 (엡실론, 델타, 감마 및 제타 사슬)에 의한 형질감염을 의미하고, huTCR은 TCR a/b 사슬에 의한 형질감염을 의미하며, 사용된 가변 도메인은 괄호 사이에 표시되어 있다.

도 2: 항-인간이외 영장류/래트 TCRa/b 항체 클론 R73; 항-인간 TCR a/b 항체 (실선 원형) 및 미관련 항-계란 리소자임 나노바디 (cAblys) (열린 원형)를 사용하는 가용성 재조합 사이노몰거스 TCR a/b 단백질의 품질 평가. OD 값은 나노바디의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 3: CHO-K1 세포 상에 발현된 인간 TCR/CD3 (도 3A) 및 초대 인간 T 세포 (도 3B)에 대한 1가 항-TCR 나노바디 T0170055A02의 용량 의존적 결합. CHO-K1 세포 상에 발현된 인간 TCR/CD3 (도 3C) 및 초대 인간 T 세포 (도 3D)에 대한 1가 항-TCR 나노바디 T0170056G05의 용량 의존적 결합. MCF 값 (평균 채널 형광도)은 나노바디의 농

도에 대해 그래프화되었다.

도 4: HEK293H 인간 TCR(2IAN)/CD3 (닫힌 원형), HEK293H 인간 CD3 (십자) 및 to HEK293H 기준 세포주 (열린 원형)에 대한 1가 항-TCR 나노바디 T0170055A02 (도 4A) 및 T0170056G05 (도 4B)의 용량 의존적 결합. MCF 값 (평균 채널 형광도)은 나노바디의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 5: 가용성 재조합 인간 TCR a/b(2XN9)-지퍼 단백질에 대한 1가 항-TCR 나노바디 T0170055A02 (도 4A, 닫힌 원형) 및 T0170056G05 (도 4B, 닫힌 원형) 및 미관련 나노바디 (도 4A 및 도 4B, 열린 원형)의 용량 의존적 결합. 450 nm에서의 DO는 나노바디의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 6: Octet RED384 장비 상의 생물층 (BioLayer) 간섭계를 통한 가용성 재조합 인간 TCR a/b (2XN9)-지퍼 단백질 상호작용에 대한 T01700055A02 (도 6A) 및 T01700056G05 (도 6B)의 동역학적 분석. 적용된 피분석물 농도는 1000, 333, 111, 37, 12.3, 4.1 및 1.4 nM이었다. 동역학 데이타에 대한 랑뮈르 피트는 검은색 선으로 표시되는 한편, 센서그램은 회색선으로 표시된다.

도 7: 가용성 재조합 사이노몰거스 TCR α/β-지퍼 단백질에 대한 1가 항-TCR 나노바디 T0170055A02 (도 7A, 닫힌 원형) 및 T0170056G05 (도 7B, 닫힌 원형) 및 미관련 나노바디 (도 7A 및 도 7B, 열린 원형)의 용량 의존적 결합. 450 nm에서 OD는 나노바디의 농도에 대해 그래프화하였다.

도 8: Octet RED384 장비 상의 BioLayer 간섭계를 통한 가용성 재조합 사이노몰거스 TCRa/b-지퍼 단백질 상호작용에 대한 T0170055A02 (도 8A) 및 T0170056G05 (도 8B)의 동역학적 분석. 적용된 피분석물 농도는 1000, 333, 111, 37, 12.3, 4.1 및 1.4 nM이었다. 동역학적 데이타에 대한 랑뮈르 피트는 검은색 선으로 표시된 한편, 센서그램은 회색 선으로 표시된다.

도 9: 비드 커플링된 1가 항-TCR 나노바디의 T 세포 활성화 데이타 (도 9A). 용액 중에 존재하는 1가 항-TCR 나노바디의 T 세포 활성화 데이타 (도 9B). 활성화는 초대 인간 T 세포 상에서 CD69 상향 조절을 모니터링하여 측정되었다. MCF 값 (평균 채널 형광도)은 각각의 나노바디에 대해 그래프화되었다.

도 10: 유세포측정에서 항-CD123 항체 (BD Biosciences, Cat. no. 554527) (검은색) 및 이소타입 대조군 (eBioscience, Cat. no. 16-4724-85)과 그 다음으로 PE-표지된 염소 항-마우스 (Jackson Immunoresearch lab. Inc., Cat. no. 115-116-071) (회색)를 사용하여 HEK293 Flp-In, HEK293 Flp-In 사이노 CD123, CHO Flp-In 및 CHO Flp-In 인간 CD123 상에서 인간 CD123 발현의 발현 평가. MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 각각의 세포주에 대해 그래프화되었다.

도 11: 유세포측정에서 APC-표지된 항-CD123 항체 (BD Biosciences, Cat. no. 560087) (검은색) 및 APC-표지된 이소타입 대조군 (Biolegend, Cat. no. 400220) (회색)을 사용한 U-937, MOLM-13, KG1a 및 NCI-H929 세포 상에서 인간 CD123 발현의 평가. MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 각각의 세포주에 대해서 그래프화되었다.

도 12: MOLM-13 세포 (도 12A) 및 KG1a 세포 (도 12C)에 대한 1가 항-CD123 나노바디 A0110056A10의 용량-의존적 결합. MOLM-13 세포 (도 12B) 및 KG1a 세포 (도 12D)에 대한 1가 항-CD123 나노바디 A0110055F03의 용량-의존적 결합. MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 13: Flp-In 부모 CHO 세포 (열린 기호) 및 인간 CD123 형질감염된 CHO 세포 (닫힌 기호)에 대한 Alexa647-표지된 A0110056A10의 용량-의존적 결합 (도 13A). Flp-In 부모 HEK 세포 (열린 기호) 및 사이노몰거스 CD123 형질감염된 HEK 세포 (닫힌 기호)에 대한 Alexa647-표지된 A0110056A10의 용량-의존적 결합 (도 13B). MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 14: Flp-In 부모 CHO 세포 (열린 기호) 및 인간 CD123 형질감염된 CHO 세포에 대한 A0110055F03의 용량-의존적 결합 (닫힌 기호) (도 14A). Flp-In 부모 HEK 세포 (열린 기호) 및 사이노몰거스 CD123 형질감염된 HEK 세포에 대한 A0110055F03의 용량-의존적 결합 (닫힌 기호) (도 14B). MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 15: MOLM-13 세포 (도 15A) 및 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 세포에 대한 1가 항-CD123 나노바디 A0110056A10-Alexa 647의 용량-의존적 결합 (도 15B). MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 16: MOLM-13 세포 (도 16A) 및 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 세포 (도 16B) 상의 인간 CD123과의 결합에 대한 Alexa 647-표지된 A0110056A10과 1가 나노바디 A0110056A10 (사각형) 및 A0110055F03 (원형)의 용량-

의존적 경쟁. MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 17: MOLM-13 세포 (도 17A) 및 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 세포 상의 인간 CD123에 대한 APC-표지된 마우스 항-인간 CD123 (클론 7G3) 항체의 용량-의존적 결합 (도 17B). MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 18: MOLM-13 세포 (도 18A) 또는 huCD123으로 형질감염된 CHO Flp-In 세포 (도 18B) 상에 발현된 CD123과의 결합에 대한 APC-표지된 마우스 항-인간 CD123 (클론 7G3) 항체와 1가 나노바디 A0110056A10 (사각형) 및 A0110055F03 (원형)의 용량-의존적 경쟁. MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 19: 인 하우스 바이오틴화된 CD123 재조합 단백질에 대한 마우스 항-인간 CD123 (클론 7G3) 항체 (R&D Systems, Cat. no. 301-R3/CF)의 용량-의존적 결합. 450 nm에서 OD는 농도에 대해 그래프화되었다.

도 20: ELISA로 CD123 단백질과의 결합에 대한 마우스 1가 항-CD123 항체 (클론 7G3) (BD Biosciences, Cat no. 554527)와 1가 항-CD123 나노바디 A0110056A10 (사각형) 및 A0110055F03 (닫힌 원형)의 용량-의존적 경쟁 (도 20A). 미관련 항-계란 리소자임 나노바디 cAbLys (열린 원형) 및 용액 중 마우스 1가 항-CD123 항체 (클론 7G3) (별표)는 각각 음성 및 양성 대조군으로 함께 사용하였다 (도 20B). 450 nm에서 OD는 농도에 대해 그래프화되었다.

도 21: MOLM-13 세포 (도 21A), 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 세포 (도 21B) 및 사이노 CD123 형질감염된 HEK Flp-In 세포 (도 21C)에 대한 1가 항-CD123 나노바디 A0110056A10-Alexa 647의 용량-의존적 결합. MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 22: MOLM-13 세포 상에 발현된 CD123 (도 22A) 및 CHO Flp-In 세포 상에 형질감염된 huCD123 (도 22C) 또는 HEK Flp-In 세포 상에 형질감염된 cyCD123 (도 22B)과의 결합에 대한 Alexa647-A0110056A10과 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 용량-의존적 경쟁. 미관련 다가 폴리펩티드 T017000129가 음성 대조군으로서 함께 사용되었다. MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 23: CHO-K1 세포 상에 발현된 인간 TCR/CD3과의 결합에 대한 바이오틴화된-T0170056G05와 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 용량-의존적 경쟁. MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 24: HSC-F 상에 발현된 CD3/TCR과의 결합에 대한 T017000099와 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 용량-의존적 경쟁. 1가 His 태그화된 T017000125는 양성 대조군으로서 함께 사용되었다. MFI 값 (중앙 채널 형광 강도)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 25: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 유세포측정 기반 어세이에서 인간 CD123 발현 MOLM-13 세포의 용량-의존적으로 재지정된 인간 이펙터 T 세포 사멸. A0110056A10, T017000132 및 T017000129는 음성 대조군으로서 함께 사용되었다. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 26: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 유세포측정 기반 어세이에서 인간 CD123 발현 KG1a 세포의 용량-의존적인 재지정 인간 이펙터 T 세포 사멸. A0110056A10, T017000129 및 T017000132는 음성 대조군으로서 함께 사용되었다. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 27: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 유세포측정 기반 어세이에서 인간 CD123 양성 MOLM-13 세포의 용량-의존적인 재지정 사이노몰거스 이펙터 T 세포 사멸. A0110056A10은 음성 대조군으로서 함께 사용되었다. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)는 구성체의 농도에 대해서 그래프화되었다.

도 28: 8의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 유세포측정 기반 어세이에서 인간 CD123 양성 KG1a 세포의 용량-의존적인 재지정 사이노몰거스 이펙터 T 세포 사멸. 몇몇 미관련 구성체는 음성 대조군으로서 함께 사용되었다. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 29: 72시간의 항온반응 시간 이후에 인간 CD123 양성 MOLM-13 세포의 재지정 사이노몰거스 이펙터 T 세포 사멸 동안 CD4/CD8+ 게이팅된 T 세포 상의 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 용량-의존적 T 세포 활성화 (CD25 상향조절). CD4/CD8+ 게이팅된 T 세포 내에서 MFI (Mean fluorescence intensity; 평균 형광 강도)는 구

성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 30: 15:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 T017000139 (채워진 다이아몬드)에 의한 xCELLigence 기반 어세이에서 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 세포의 용량-의존적인 재지정 인간 이펙터 T 세포 사멸. 1가 나노바디 A0110056A10, T0170056G05 및 미관련 구성체 T017000129는 음성 대조군으로서 함께 사용되었다. 50시간의 항온반응 시간 이후 세포 지수 (CI)는 다중특이적 폴리펩티드의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 31: 15:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 xCELLigence 기반 어세이에서 CD123 음성 CHO Flp-In 기준 세포주를 사용하는 재지정된 인간 이펙터 T 세포 사멸 어세이에서 1가 빌딩 블록 및 다중특이적 폴리펩티드. 50시간의 항온반응 시간 이후 CI는 다중특이적 폴리펩티드의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 32: T 세포의 부재 하에서 CD123 형질감염된 세포주 (도 32A) 및 기준 세포주 (도 32B)의 성장에 대한 1가 빌딩 블록 및 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드. 50시간의 항온반응 시간 이후 CI는 다중특이적 폴리펩티드의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 33: 15:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 T017000139 (채워진 다이아몬드)에 의한 xCELLigence 기반 어세이에서 사이노몰거스 CD123 형질감염된 HEK Flp-In 세포의 용량-의존적인 재지정된 사이노몰거스 이펙터 T 세포 사멸. 1가 나노바디, T0170056G05 및 미관련 구성체 T017000129는 음성 대조군으로서 함께 사용되었다. 80시간의 항온반응 시간 이후 CI는 다중특이적 폴리펩티드의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 34: CD123 음성 HEK Flp-In 기준 세포주를 사용한 재지정된 사이노몰거스 T 세포 사멸 어세이에서 1가 빌딩 블록 및 다중특이적 폴리펩티드. 80시간의 항온반응 시간 이후 CI는 다중특이적 폴리펩티드의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 35: T 세포의 부재 하에서 CD123 형질감염된 세포주 (도 35A) 및 기준 세포주 (도 35B)의 성장에 대한 1가 빌딩 블록 및 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드. 80시간의 항온반응 시간 이후 CI는 다중특이적 폴리펩티드의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 36: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 인간 CD123 발현 CHO Flp-In 표적 세포의 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드 의존적인 재지정된 T 세포 사멸 동안 인간 이펙터 T 세포 (도 36A) 또는 사이노 이펙터 T 세포 (도 36B)에 의한 용량-의존적 사이토카인 생성. INF-γ 생성은 72시간 이후에 측정되었다. OD 값은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 37: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용하는 인간 CD123 발현 CHO Flp-In 표적 세포의 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드 의존적인 재지정된 T 세포 사멸 동안 이펙터 T 세포에 의한 용량-의존적 사이토카인 생성. IL-6 생성은 72시간 이후에 측정되었다. pg/mL 값이 농도에 대해 그래프화되었다.

도 38: 5시간의 항온반응 시간 이후에 건강한 인간 (도 38A) 및 사이노몰거스 (도 38B) PBMC 샘플에서 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 CD123+ pDC 및 호염기구의 재지정된 자기유래 T 세포 매개 고갈. Lin-/CD123+ 세포 (pDC 및 호염기구)의 백분율은 구성체의 농도에 대해서 그래프화되었다.

도 39: 5시간 (도 39A) 및 24시간 (도 39B)의 항온반응 시간 이후에 건강한 PBMC 샘플에서 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 재지정된 자기유래 T 세포 단핵구 고갈. 단핵구 (CD14+ 세포)의 백분율은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 40: 24시간의 항온반응 시간 이후에 자기유래 CD123 양성 세포의 재지정된 T 세포 사멸 동안 CD3+ 게이팅된 T 세포 상의 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 용량-의존적 CD69 상향조절, 인간 T 세포 활성화. CD3+ 게이팅된 T 세포 내에서 MFI (Mean fluorescence intensity)는 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 41: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 유세포측정 기반 어세이에서 인간 CD123 KG1a 세포의 재지정된 인간 (도 41A) 또는 사이노몰거스 (도 41B) 이펙터 T 세포 사멸에 대한 1가 나노바디 및 미관련 다가 폴리펩티드 T017000129의 용량-의존적 특징규명. T017000139 (채워진 다이아몬드)는 양성 대조군으로서 함께 사용하였다. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 42: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용하는 유세포측정 분석 어세이에서 인간 CD123 MOLM-13 세포의재지정된 인간 (도 42A) 또는 사이노몰거스 (도 42B 및 도 42C) 이펙터 T 세포 사멸에 대한 1가 나노바디 및 미관련 다가 폴리펩티드 T017000129의 용량-의존적 특징규명. T017000139 (채워진 다이아몬드)는 양성 대조군으로서 함께 사용되었다. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 43: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용하는 MOLM-13 (도 43A 및 도 43C) 및 KG1a (도 43B) 표적 세포의 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드 의존적인 재지정된 T 세포 사멸 동안 인간 이펙터 T 세포에 의한 용량-의존적 사이토카인 생성. 인간 IL-6 (도 43C) 및 IFN-γ (도 43A 및 도 43B) 생성은 72시간 이후에 측정되었다. 사이토카인의 농도는 농도에 대해서 그래프화되었다.

도 44A 및 44B: CD123 음성 NCI-H929 세포주를 사용한 유세포측정에서 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 표적 독립적 재지정된 인간 이펙터 T 세포 사멸의 용량-의존적 특징규명. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 45: CD123 음성 U937 세포주를 사용한 유세포측정 기반 어세이에서 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 표적 독립적 재지정된 인간 (도 45A) 또는 사이노몰거스 (도 45B) 이펙터 T 세포 사멸의 용량-의존적 특징규명. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 46: 72시간의 항온반응 시간 이후에 CD123 음성 U-937 세포의 사이노몰거스 이펙터 T 세포 사멸 동안 (도 46A) 및 CD123 음성 NCI-H929 세포의 인간 이펙터 T 세포 사멸 동안 (도 46B) CD4/CD8+ 게이팅된 T 세포에 대한 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 용량-의존적 T 세포 활성화 판독. CD4/CD8+ 게이팅된 T 세포 내에서 MFI는 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 47: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 인간 이펙터 T 세포 및 NCI-H929 표적 세포를 사용한 사이토카인에 대한 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 영향. 인간 IL-6 (도 47B) 및 IFN-γ (도 47A) 생성을 측정하였다. 사이토카인의 양의 OD 값은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 48A 및 48B: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 재지정된 MOLM-13 표적 세포 사멸 설정에서 다중특이적 폴리펩티드에 의한 인간 이펙터 T 세포의 용량-의존적 T 세포 증식. CPM (count per minute)은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 49: 표적 세포의 부재 하에서 다중특이적 폴리펩티드에 의한 인간 이펙터 T 세포의 용량-의존적 T 세포 증식. CPM은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 50: 상이한 E:T 비율에서 T017000114 및 MOLM-13 세포의 존재 하에 비활성화 및 사전-활성화된 T 세포의 용해 잠재성. 세포 사멸율%은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 51: 상이한 E:T 비율에서 T017000139 및 KG1a 세포의 존재 하에 비활성화 및 사전-활성화된 T 세포의 용해 잠재성. 세포 사멸율%은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 52: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용하여, 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 유세포측정 기반 어세이에서 혈청 알부민의 부재 하에서 또는 존재 하에서 MOLM-13 세포의 용량-의존적 재지정된 인간 (도 52A 및 52B) 및 사이노몰거스 (도 52C 및 52D) T 세포 사멸. 미관련 다가 폴리펩티드 T017000129 및 1가 빌딩 블록 A0110056A10 및 T0170056G05는 음성 대조군으로서 함께 사용되었다. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)은 폴리펩티드의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 53: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 유세포측정 기반 어세이에서 혈청 알부민의 존재 하에서 또는 부재 하에서 KG1a 세포의 용량-의존적 재지정된 인간 (도 53A, 53B 및 53C) 및 사이노몰거스 (도 53D, 53E 및 53F) T 세포 사멸. 미관련 다가 폴리펩티드 A022600009 (SA의 존재 또는 부재 하에) 및 T017000129, 및 1가 빌딩 블록 A0110056A10 및 T0170056G05를 음성 대조군으로서 사용하였다. 세포 사멸율% (TOPRO 양성 세포의 %)은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 54: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 HLE 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 MOLM-13의 재지정된 T 세포 사멸 동안 인간 T 세포에 의한 용량-의존적 사이토카인 생성. 인간 IL-6 (도 54B) 및 IFN-γ (도 54A) 생성을 측정하였다. 사이토카인의 양은 농도에 대해 그래프화된다.

도 55: 10:1의 이펙터 대 표적 비율을 사용한 재지정된 MOLM-13 표적 세포 사멸에서 HLE 다중 특이적 폴리펩티드에 의한 인간 이펙터 T 세포의 용량-의존적 T 세포 증식. CPM은 농도에 대해 그래프화되었다.

도 56: 5시간의 항온반응 시간 이후에 건강한 인간 PBMC 샘플에서 다가 HLE CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 재지정된 자기유래 T 세포 재지정 CD123+ pDC 및 호염기구. Lin-/CD123+ 세포 (pDC 및 호염기구)의 백분율은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 57: 5시간의 항온반응 시간 이후에 시험관 내에 건강한 사이노몰거스 PBMC 샘플에서 다가 HLE CD123/TCR 결

합 폴리펩티드에 의한 재지정된 자기유리 T 세포 재지정된 CD123+ pDC 및 호염기구 고갈. Lin-/CD123+ 세포 (pDC 및 호염기구)의 백분율은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 58: 24시간의 항온반응 시간 이후에 건강한 인간 PBMC 샘플에서 다가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 재지정 자기유래 T 세포 재지정 단핵구 고갈. 단핵구 (CD14+ 세포)의 백분율은 구성체의 농도에 대해 그래프화되었다.

도 59: 시간 경과에 따른 처치된 사이노몰거스 원숭이의 말초 혈액 중 세포 계측치. μL 혈액 당 $CD4^+CD3^+$ T 세포 (도 59A) 및 $CD8^+CD3^+$ T 세포 (도 59B)의 절대수는 상이한 처치군에 대해 시간 경과에 따라 평균 ± SEM으로 표시된다: 양성 대조군 (열린 원형, n = 2), 미관련/TCR 폴리펩티드 (십자, n = 4), CD123/TCR 폴리펩티드 (검은색 삼각형, n = 4). 회색 막대는 연속 주입 처리 기간을 반영한다.

도 60: 시간 경과에 따라 처치된 사이노몰거스 원숭이의 말초 혈액 중 $CD123^+CD14^-$ 세포 계측. μL 혈액 당 $CD123^+CD14^-$ 세포의 절대수는 상이한 처리 군에 대해 평균 ± SEM으로 표시된다: 양성 대조군 (열린 원형, n = 2), 미관련/TCR 폴리펩티드 (십자, n = 4), CD123/TCR 폴리펩티드 (검은색 삼각형, n = 4). 회색 막대는 연속 주입 처리 기간을 반영한다.

도 61: 시간 경과에 따른 $CD4^+CD3^+$ 및 $CD8^+CD3^+$ T 세포 상에서의 PD-1 발현. 혈액 중 $CD4^+CD3^+$ T 세포 (도 61A) 및 $CD8^+CD3^+$ T 세포 (도 61B)의 빈도는 상이한 처치군에 대해 평균 ± SEM으로 표시된다: 양성 대조군 (열린 원형, n = 2), 미관련/TCR 폴리펩티드 (십자, n = 4), CD123/TCR 폴리펩티드 (검은색 삼각형, n = 4). 회색 막대는 연속 주입 처리 기간을 반영한다.

도 62: 시간 경과에 따른 처치된 사이노몰거스 원숭이에서 혈청 인터루킨-6. 혈청 중 IL-6의 농도는 상이한 처치군에 대해 평균 ± SEM (pg/mL)으로 표시된다: 양성 대조군 (열린 원형, n = 2), 미관련/TCR 폴리펩티드 (십자, n = 4), CD123/TCR 폴리펩티드 (검은색 삼각형, n = 4). 회색 막대는 연속 주입 처리 기간을 반영한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0408] **정의**

[0409] 달리 표시하거나 또는 정의하지 않으면, 사용된 모든 용어는 당업자에게 명확하게 되는, 당분야에서 그들의 일반적 의미를 갖는다. 예를 들어 표준 안내서, 예컨대 하기의 문헌을 비롯하여, 그에 인용된 일반 배경 지식을 참조한다: [Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^{nd} Ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press)], [F. Ausubel et al. (1987, Current protocols in molecular biology, Green Publishing and Wiley Interscience, New York)], [Lewin (1985, Genes II, John Wiley & Sons, New York, N.Y.)], [Old et al. (1981, Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (2nd Ed.) University of California Press, Berkeley, CA)], [Roitt et al. (2001, Immunology (6th Ed.) Mosby/Elsevier, Edinburgh)], [Roitt et al. (2001, Roitt's Essential Immunology (10th Ed.) Blackwell Publishing, UK)], 및 [Janeway et al. (2005, Immunobiology (6th Ed.) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York)].

[0410] 달리 표시하지 않으면, 상세한 내용에서 특별히 기술하지 않는 모든 방법, 단계, 기술 및 조작법은 당업자에게 분명하게 될 것이므로, 그 자체로 공지된 방식으로 수행되었고 수행될 수 있다. 예를 들어, 역시 표준 안내서 및 그에 언급된 일반 배경 지식 및 그에 인용된 추가의 참조문헌을 비롯하여, 예를 들어 단백질 조작법에 관한 기술, 예컨대 친화성 성숙 및 단백질 예컨대 면역글로불린의 특이성 및 다른 바람직한 특성을 개선시키기 위한 다른 기술을 기술하는 하기의 리뷰들을 참조한다; [Presta (2006, Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (5-6): 640-56)], [Levin and Weiss (2006, Mol. Biosyst. 2(1): 49-57)], [Irving et al. (2001, J. Immunol. Methods 248(1-2): 31-45)], [Schmitz et al. (2000, Placenta 21 Suppl. A: S106-12)], [Gonzales et al. (2005, Tumour Biol. 26(1): 31-43)].

[0411] 본 명세서에서 사용되는 용어 "서열" (예를 들어, "면역글로불린 서열", "항체 서열", "가변 도메인 서열", "V_{HH} 서열" 또는 "단백질 서열"과 같은 용어)은 일반적으로 문맥에서 보다 제한적인 해석을 요구하지 않으면, 관련 아미노산 서열을 비롯하여 그를 코딩하는 핵산 또는 뉴클레오티드 서열 둘 모두를 포함하는 것으로 이해해야 한

다.

[0412] 아미노산 서열은 문맥에 따라서 단일 아미노산 또는 둘 이상의 아미노산의 미분지된 서열을 의미하는 것으로 해석된다. 뉴클레오티드 서열은 셋 이상의 뉴클레오티드의 미분지 서열을 의미하는 것으로 해석된다.

[0413] 아미노산은 천연 발생 단백질에서 공통적으로 존재하는 L-아미노산이고 하기 표 B-1에 열거되어 있다. D-아미노산을 함유하는 아미노산 서열들은 이러한 정의에 포괄되는 것을 의도하지 않는다. 번역후 변형 아미노산을 함유하는 임의의 아미노산 서열은 변형된 위치, 예를 들어 히드록실화 또는 글리코실화를 갖는 하기 표에 표시된 기호를 사용하여 초기에 번역된 아미노산 서열로서 설명될 수 있지만, 이들 변형은 아미노산 서열에서 명확하게 표시되지 않을 수 있다. 서열 변형 연결부, 교차 연결 및 말단 캡, 비펩티드 결합 등으로 표시될 수 있는 임의의 펩티드 또는 단백질이 이 정의에 포괄된다.

[0414] 용어 "단백질, "펩티드", "단백질/펩티드" 및 "폴리펩티드"는 본 개시 전반에서 상호교환적으로 사용되고 각각은 이러한 개시의 목적을 위해 동일한 의미를 갖는다. 각각의 용어는 둘 이상의 아미노산의 선형 사슬로 만들어진 유기 화합물을 의미한다. 화합물은 10개 이상 아미노산; 25개 이상의 아미노산; 50개 이상의 아미노산; 100개 이상의 아미노산, 200개 이상의 아미노산, 및 300개 이상의 아미노산을 가질 수 있다. 당업자는 폴리펩티드 및 단백질을 구별하는 아미노산 개수의 컷오프 지점을 인식하고 있지 않더라도, 폴리펩티드가 일반적으로 단백질보다 소수의 아미노산을 포함하고, 폴리펩티드가 화학 합성 또는 재조합 방법으로 제조될 수 있고, 단백질이 일반적으로 당분야에 공지된 재조합 방법으로 시험관 내에서 또는 생체내에서 만들어진다는 것을 이해하게 될 것이다.

[0415] 아미노산 잔기는 표준 3-글자 또는 1-글자 아미노산 코드에 따라서 표시될 것이다. WO 08/020079의 페이지 48의 표 A-2를 참조한다.

표 B-1: 공통 아미노산

1-글자 코드	3- 글자 코드	명칭
A	Ala	알라닌
B	Asx	아스파르트산 또는 아스파라긴
C	Cys	시스테인
D	Asp	아스파르트산
E	Glu	글루탐산
F	Phe	페닐알라닌
G	Gly	글리신
H	His	히스티딘
I	Ile	이소류신
J	Xle	이소류신 또는 류신
K	Lys	리신
L	Leu	류신
M	Met	메티오닌
N	Asn	아스파라긴
O	Pyl	파이롤리신
P	Pro	프롤린
Q	Gln	글루타민
R	Arg	아르기닌
S	Ser	세린
T	Thr	트레오닌
U	Scy	셀레노시스테인
V	Val	발린
W	Trp	트립토판
X	Xxx	드물거나 또는 불특정
Y	Tyr	티로신
Z	Glx	글루탐산 또는 글루타민

[0416]

[0417] 핵산 또는 아미노산은 - 예를 들어, 이들이 수득된 반응 배지 또는 배양 배지와 비교하여 - 일반적으로 상기 공급원 또는 배지와 회합된 적어도 하나의 다른 성분, 예컨대 다른 핵산, 다른 단백질/폴리펩티드, 다른 생물학적 성분 또는 거대분자 또는 적어도 하나의 오염물, 불순물 또는 소수의 성분으로부터 분리될 때, "(실질적으로) 단리된 (형태)(인 것으로)" 간주된다. 특히, 핵산 또는 아미노산은 적어도 2배, 특히 적어도 10배, 보다 특히

적어도 100배, 및 최대 1000배 이상으로 정제되었을 때 "(실질적으로) 단리된" 것으로 간주된다. "(실질적으로) 단리된 형태"인 핵산 또는 아미노산은 바람직하게 적합한 기술, 예컨대 적합한 크로마토그래피 기술, 예컨대 폴리아크릴아미드-겔 전기영동을 사용해 결정시 실질적으로 균질하다.

[0418] 설명 및 청구항 전반에서 달리 명확하게 문맥에서 요구하지 않으면, 단어 "포함하다", "포함하는" 등은 독점적이거나 또는 철저한 의미와 반대로서 내포하는 의미로 해석되어야 하고; 즉, "제한없이, 포함하는"의 의미이다.

[0419] 예를 들어, 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드가 개별적으로 다른 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드를 "포함한다"고 하거나, 또는 다른 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드로 "실질적으로 이루어진다"라고 말할 때, 이것은 후자의 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드가 개별적으로 처음에 언급된 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드에 도입되었다는 것을 의미하지만, 보다 일반적으로 이것은 처음에 언급된 뉴클레오티드 서열, 아미노산 서열 또는 폴리펩티드는 처음에 언급된 서열이 실제로 어떻게 생성되었는지 또는 어떻게 수득되었는지 (예를 들어, 본 명세서에 기술된 바와 같은 임의의 적합한 방법일 수 있음) 무관하게, 개별적으로 후자의 서열과 동일한 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열을 갖는, 개별적으로 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 스트렛치를 이의 서열에 포함한다. 비제한적인 예로서, 본 발명의 폴리펩티드가 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함한다고 말할 때, 이것은 상기 면역글로불린 단일 가변 도메인 서열이 본 발명의 폴리펩티드의 서열에 도입되었다는 것을 의미할 수 있지만, 보다 일반적으로 이것은 본 발명의 폴리펩티드가 상기 본 발명의 폴리펩티드가 어떻게 생성되었는지 또는 수득되었는지와 무관하게 면역글로불린 단일 가변 도메인의 서열을 이의 서열 내에 함유한다는 것을 의미한다. 또한, 핵산 또는 뉴클레오티드 서열이 다른 뉴클레오티드 서열을 포함한다고 말할 때, 처음에 언급된 핵산 또는 뉴클레오티드 서열은 바람직하게 발현 생성물 (예를 들어, 폴리펩티드)로 발현될 때, 후자의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열이 상기 발현 생성물의 일부를 형성하도록 한다 (달리 말해서, 후자의 뉴클레오티드 서열이 처음에 언급된, 더 큰 핵산 또는 뉴클레오티드 서열과 동일한 리딩 프레임임).

[0420] "실질적으로 이루어지다"란 본 발명의 방법에서 사용되는 면역글로불린 단일 가변 도메인이 본 발명의 폴리펩티드와 정확하게 동일하거나, 또는 제한된 개수의 아미노산 잔기, 예컨대 1-20개 아미노산 잔기, 예를 들어 1-10개 아미노산 잔기 및 바람직하게 1-6개 아미노산 잔기, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 아미노산 잔기가 면역글로불린 단일 가변 도메인의 아미노 말단부, 카복시 말단부, 또는 아미노 말단부 및 카복시 말단부 둘 모두에 첨가된 본 발명의 폴리펩티드에 상응하는 것을 의미한다.

[0421] "이루어지다"란 본 발명의 방법에서 사용된 면역글로불린 단일 가변 도메인은 본 발명의 폴리펩티드와 정확하게 동일하다.

[0422] 둘 이상의 뉴클레오티드 서열을 비교하려는 목적을 위해서, 제1 뉴클레오티드 서열과 제2 뉴클레오티드 서열 간 "서열 동일성"의 백분율은 [제2 뉴클레오티드 서열 내 상응하는 위치의 뉴클레오티드와 동일한 제1 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드의 개수]를 [제1 뉴클레오티드 서열의 총 뉴클레오티드 개수]로 나누고 [100%]을 곱하여 계산될 수 있고, 여기서 제1 뉴클레오티드 서열과 비교되는, 제2 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드의 각각의 결실, 삽입, 치환 또는 첨가는 단일 뉴클레오티드 (위치)에서 상이한 것으로 간주된다. 대안적으로, 둘 이상의 뉴클레오티드 서열 간 서열 동일성의 정도는 표준 설정을 사용하는 서열 정렬을 위한 공지된 컴퓨터 알고리즘 예컨대 NCBI Blast v2.0을 사용해 계산될 수 있다. 서열 동일성의 정도를 결정하기 위한 일부 다른 기술, 컴퓨터 알고리즘 및 설정은 예를 들어 WO 04/037999, EP 0967284, EP 1085089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 및 GB 2357768에 기술되어 있다. 일반적으로, 상기 본 명세서에서 요약한 계산 방법에 따른 2개 뉴클레오티드 서열 간 "서열 동일성"의 백분율을 결정하려는 목적을 위해서, 최대 개수의 뉴클레오티드를 갖는 뉴클레오티드 서열은 "제1" 뉴클레오티드 서열로서 간주될 것이고, 나머지 뉴클레오티드 서열이 "제2" 뉴클레오티드 서열로 간주될 것이다.

[0423] 둘 이상의 아미노산 서열을 비교하려는 목적을 위해서, 제1 아미노산 서열 및 제2 아미노산 서열 간 "서열 동일성"의 백분율 (또한 본 명세서에서 "아미노산 동일성"이라고 함)은 [제2 아미노산 서열 내 상응하는 위치의 아미노산 잔기와 동일한 제1 아미노산 서열 내 아미노산 잔기의 개수]를 [제1 아미노산 서열 내 총 아미노산 잔기의 개수]로 나누고 [100%]을 곱해서 계산할 수 있고, 여기서 제1 아미노산 서열과 비교되는 제2 아미노산 서열 내 아미노산 잔기의 각각의 결실, 삽입, 치환 또는 첨가는 단일 아미노산 잔기 (위치)에서 상이한 것으로 간주되고, 즉 본 명세서에서 정의된 바와 같이 "아미노산 차이"로서 간주된다. 대안적으로, 2개 아미노산 서열 간 서열 동일성의 정도는 기지의 컴퓨터 알고리즘, 예컨대 역시 표준 설정을 사용하여, 뉴클레오티드 서열에 대해 서열 동일성의 정도를 결정하기 위한 상기에 언급된 것들을 사용해 계산될 수 있다. 일반적으로, 상기 본 명세

서에서 요약한 계산 방법에 따라서 2개 아미노산 서열 간 "서열 동일성"의 백분율을 결정하려는 목적을 위해서, 최대 개수의 아미노산 잔기를 갖는 아미노산 서열이 "제1" 아미노산 서열로 간주될 것이고, 나머지 아미노산 서열이 "제2" 아미노산 서열로 간주될 것이다.

[0424] 또한, 2개 아미노산 서열 간 서열 동일성의 정도를 결정시에, 당업자는 일반적으로 아미노산 잔기가 유사한 화학적 구조의 다른 아미노산 잔기로 치환되고 폴리펩티드의 기능, 활성 또는 다른 생물학적 속성에 거의 또는 실질적으로 전혀 영향이 없는 아미노산 치환으로서 설명할 수 있는, 소위 "보존성" 아미노산 치환을 고려할 수 있다. 이러한 보존성 아미노산 치환은 당분야, 예를 들어 WO 04/037999, GB 335768, WO 98/49185, WO 00/46383 및 WO 01/09300에 공지되어 있고; 이러한 치환의 (바람직한) 유형 및/또는 조합은 WO 04/037999를 비롯하여 WO 98/49185 및 본 명세서에 인용된 추가 참조 문헌으로부터의 적절한 교시를 기반으로 선택될 수 있다.

[0425] 이러한 보존성 치환은 바람직하게 하기 그룹 (a) - (e) 내의 한 아미노산이 동일 그룹 내 다른 아미노산 잔기로 치환되는 치환이다: (a) 소형 지방족, 비극성 또는 약극성 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro 및 Gly; (b) 극성, 음으로 하전된 잔기 및 그들 (비하전) 아미드: Asp, Asn, Glu 및 Gln; (c) 극성, 양으로 하전된 잔기: His, Arg 및 Lys; (d) 대형 지방족, 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val 및 Cys; 및 (e) 방향족 잔기: Phe, Tyr 및 Trp. 특히 바람직한 보존성 치환은 다음과 같다: Ala이 Gly 또는 Ser으로 치환; Arg이 Lys으로 치환; Asn이 Gln 또는 His로의 치환; Asp가 Glu으로의 치환; Cys이 Ser으로의 치환; Gln이 Asn으로 치환; Glu이 Asp로 치환; Gly이 Ala 또는 Pro으로 치환; His이 Asn 또는 Gln로 치환; Ile이 Leu 또는 Val으로 치환; Leu이 Ile 또는 Val으로 치환; Lys이 Arg, Gln 또는 Glu으로 치환; Met이 Leu, Tyr 또는 Ile으로 치환; Phe이 Met, Leu 또는 Tyr으로 치환; Ser이 Thr으로 치환; Thr이 Ser으로 치환; Trp이 Tyr으로 치환; Tyr이 Trp으로 치환; 및/또는 Phe이 Val, Ile 또는 Leu으로 치환.

[0426] 본 명세서에 기술된 폴리펩티드에 적용되는 임의의 아미노산 치환은 또한 Schulz 등 (1978, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)이 개발한 상이한 종의 상동성 단백질 간 아미노산 변이의 빈도 분석, Chou 및 Fasman (1974, Biochemistry 13: 211; 1978, Adv. Enzymol., 47: 45-149)이 개발한 구조 형성 잠재성의 분석, 및 Eisenberg 등 (1984, Proc. Natl. Acad Sci. USA 81: 140-144), Kyte 및 Doolittle (1981, J. Molec. Biol. 157: 105-132), 및 Goldman 등 (1986, Ann. Rev. Biophys. Chem. 15: 321-353)이 개발한 단백질에서 소수성 패턴의 분석을 기반으로 할 수 있고, 이들 전부를 참조로 그 전문을 본 명세서에 편입시킨다. 나노바디의 1차, 2차 및 3차 구조에 관한 정보는 상기에 언급된 일반적인 배경 지식 및 본 명세서의 설명에서 제공한다. 또한, 이러한 목적을 위해서, 라마 유래의 VHH 도메인의 결정 구조는 예를 들어 Desmyter 등 (1996, Nature Structural Biology, 3: 803), Spinelli 등 (1996, Natural Structural Biology, 3: 752-757) 및 Decanniere 등 (1999, Structure, 7 (4): 361)이 제공한다. 통상의 V_H 도메인에서, 이들 위치 상의 잠재적인 낙타화 치환 및 V_H/V_L 계면을 형성하는 아미노산 잔기의 일부에 관한 추가 정보는 상기 언급된 종래 기술에서 확인할 수 있다.

[0427] 아미노산 서열 및 핵산 서열은 그들 전체 길이 상에서 그들이 100% 서열 동일성 (본 명세서에 정의된 바와 같음)을 갖는다면 "정확하게 동일하다"라고 한다.

[0428] 2개 아미노산 서열을 비교할 때, 용어 "아미노산 차이"는 제2 서열과 비교되는 제1 서열의 그 위치 상의 단일 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 의미하고; 2개 아미노산 서열이 하나, 둘 또는 그 이상의 이러한 아미노산 차이를 함유할 수 있다는 것을 이해해야 한다. 보다 특히, 본 발명의 아미노산 서열 및/또는 폴리펩티드에서, 용어 "아미노산 차이"는 개별적으로 a), c) 또는 e)의 CDR 서열 비교되는, b), d) 또는 f)에 명시된 CDR 서열의 위치 상의 단일 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 의미하고; b), d) 및 f)의 CDR 서열은 개별적으로 a), c) 또는 e)의 CDR 서열과 비교하여 하나, 둘 또는 최대 3개의 이러한 아미노산 차이를 함유할 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0429] "아미노산 차이"는 본 발명의 폴리펩티드의 속성을 개선시키거나 또는 적어도 본 발명의 폴리펩티드의 바람직한 속성 또는 바람직한 속성의 균형 또는 조합을 적어도 너무 많이 손상시키지 않는, 임의의 하나, 둘, 셋 또는 최대 4개의 치환, 결실 또는 삽입, 또는 이의 임의 조합일 수 있다. 이러한 점에서, 본 발명의 최종 폴리펩티드는 하나, 둘, 셋 또는 최대 4개의 치환, 결실 또는 삽입이 없는 하나 이상의 CDR 서열을 포함하는 폴리펩티드와 비교하여, 동일하거나, 대략 동일하거나, 또는 더 높은 친화성으로 적어도 CD123 또는 T 세포 수용체에 결합해야 하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0430] 이러한 점에서, b), d) 및/또는 f)에 따른 아미노산 서열은 그 자체로 공지된 친화성 성숙의 하나 이상의 기술

을 사용하는 친화성 성숙에 의한 개별적으로 a), c) 및/또는 e)에 따른 아미노산 서열로부터 유래된 아미노산 서열일 수 있다.

[0431] 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는데 사용되는 숙주 유기체에 따라서, 이러한 결실 및/또는 치환은 당업자의 능력 내에 속할 것이므로, 번역후 변형 (예컨대 하나 이상의 글리코실화 부위)을 위한 하나 이상의 부위가 제거되도록 디자인될 수 있다.

[0432] "친화성"은 분자 상호작용의 강도 또는 안정성을 의미한다. 친화성은 통상적으로 K_D, 또는 해리 상수로서 제공되고, 이것의 단위는 mol/리터 (또는 M)이다. 친화성은 또한 $1/K_D$ 과 동일하고 단위가 $(\text{mol/리터})^{-1}$ (또는 M^{-1})인 결합 상수, K_A 로서 표현될 수 있다. 본 명세서에서, 2개 분자 간 상호작용의 안정성은 주로 그들 상호작용의 K_D 값으로 표시될 것이고; 이의 K_D 값에 의해 분자 상호작용의 강도를 명시하는, 관계식 $K_A = 1/K_D$ 은 K_A 값을 계산하는데 사용될 수 있다는 것은 당업자에게 분명하다. K_D-값은 충분히 공지된 관계식 $DG=RT.\ln(K_D)$ (균등하게 $DG=-RT.\ln(K_A)$)에 의해 결합의 자유 에너지 (DG)의 변화와 관련되므로 열역학적 의미에서 역시 분자 상호작용의 강도를 특징으로 하고, 상기 식에서 R은 기체 상수와 같고, T 는 절대 온도와 같으며 ln은 자연 로그를 의미한다.

[0433] 의미있다 (예를 들어, 특이적)고 간주되는 생물학적 상호작용에 대한 K_D 는 전형적으로 10^{-12} M (0.001 nM) 내지 10^{-5} M (10000 nM)의 범위이다. 상호작용이 강할수록, 이의 K_D 는 낮아진다.

[0434] K_D 는 또한 k_{off} 로 표시되는 복합체의 해리 속도 상수 대 k_{on} 으로 표시되는 이의 결합 속도 상수의 속도의 비율 (그리하여 $K_D = k_{off}/k_{on}$ 및 $K_A = k_{on}/k_{off}$)로서 표시될 수 있다. 오프-속도 k_{off} 는 단위가 s^{-1} (여기서 s는 초의 SI 단위 표기법임)이다. 온-속도 k_{on} 는 단위가 $M^{-1}s^{-1}$ 이다. 온-속도는 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ 내지 약 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ 로 다양하며, 이중분자 상호작용에 대한 확산-제한 결합 속도 상수에 도달한다. 오프-속도는 관계식 $t_{1/2}=\ln(2)/k_{off}$ 에 의해 소정 분자 상호작용의 반감기와 관련된다. 오프 속도는 10^{-6} s^{-1} ($t_{1/2}$ 이 복수의 날인 거의 비가역적인 복합체) 내지 1 s^{-1} ($t_{1/2}$=0.69 s)로 다양할 수 있다.

[0435] 항원 또는 항원성 결정부에 대한 항원-결합 단백질, 예컨대 ISV의 특이적 결합은 예를 들어, 스캐차드 분석 및/또는 경쟁적 결합 어세이, 예컨대 방사성-면역어세이 (RIA), 효소 면역어세이 (EIA) 및 샌드위치 경쟁 어세이, 및 당분야에서 그 자체로 공지된 이의 다양한 별법을 비롯하여 본 명세서에 언급된 다른 기술을 포함하여, 그 자체로 공지된 임의의 적합한 방식으로 결정될 수 있다.

[0436] 2개 분자 간 분자 상호작용의 친화성은 그 자체로 공지된 상이한 기술들, 예컨대 충분히 공지된 표면 플라스몬 공명 (SPR) 바이오센서 기술 (예를 들어, [Ober et al. 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559] 참조)을 통해서 측정될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "표면 플라스몬 공명"은 한 분자가 바이오센서 칩 상에 고정되고 나머지 분자는 흐름 조건 하에서 고정 분자 위를 통과하는, 바이오센서 매트릭스 내에서 단백질 농도의 변경의 검출에 의해 k_{on}, k_{off} 측정치 및 그리하여 K_D (또는 K_A) 값이 산출되는, 실시간 생물특이적 상호작용의 분석을 가능하게 하는 광학 현상을 의미한다. 이것은 예를 들어 충분히 공지된 BIAcore® 시스템 (BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)을 사용해 수행될 수 있다. 추가 설명을 위해서, 다음의 문헌들을 참조한다: [Jonsson et al. (1993, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26)], [Jonsson et al. (1991 Biotechniques 11: 620-627)], [Johnsson et al. (1995, J. Mol. Recognit. 8: 125-131)], 및 [Johnnson et al. (1991, Anal. Biochem. 198: 268-277)].

[0437] 생물분자 상호작용의 친화성을 결정하기 위한 다른 충분히 공지된 바이오센서 기술은 생물-층 간섭계 (BLI) (예를 들어 [Abdiche et al. 2008, Anal. Biochem. 377: 209-217] 참조)이다. 본 명세서에서 사용시, 용어 "생물-층 간섭계" 또는 "BLI"는 바이오센서 칩 상의 고정 단백질층 (신호 빔) 및 내부 기준층 (기준 빔)인, 2개 표면으로부터 반사된 빛의 간섭 패턴을 분석하는 표지-무함유 광학 기술을 의미한다. 바이오센서의 칩에 결합된 분자 개수의 변화가 간섭 패턴의 이동을 야기시켜서, 파장 이동 (nm)으로서 기록되고, 이의 규모는 바이오센서 팁 표면에 결합된 분자 개수의 직접 측정이다. 상호작용이 실시간으로 측정될 수 있으므로, 결합 및 해리 속도 및 친화성을 결정할 수 있다. BLI는 예를 들어 충분히 공지된 Octet® 시스템 (ForteBio, a division of Pall

Life Sciences, Menlo Park, USA)을 사용해 수행될 수 있다.

[0438] 대안적으로, 친화성은 KinExA® 플랫폼 (Sapidyne Instruments Inc, Boise, USA)을 사용하는 KinExA (Kinetic Exclusion Assay) (예를 들어 [Drake et al. 2004, Anal. Biochem., 328: 35-43] 참조)로 측정할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "KinExA"는 미변형된 분자의 진정한 평형 결합 친화성 및 동역학을 측정하는 용액-기반 방법을 의미한다. 항체/항원 복합체의 평형화된 용액을 항원 (또는 항체)이 사전 코팅된 비드를 갖는 컬럼 상에 통과시켜서, 자유 항체 (또는 항원)이 코팅된 분자에 결합될 수 있게 한다. 이렇게 포획된 항체 (또는 항원)의 검출은 항체 (또는 항원)에 결합된 형광 표지된 단백질에 의해 수행된다.

[0439] GYROLAB® 면역어세이 시스템은 자동화 생물분석 및 신속한 샘플 턴어라운드를 위한 플랫폼을 제공한다 (Fraley et al. 2013, Bioanalysis 5: 1765-74).

[0440] 예를 들어 한 분자의 바이오센서 상의 코팅과 관련된 아티팩트에 의해서, 측정 과정이 어느 정도 적용된 분자의 고유한 결합 친화성에 영향을 미친다면 측정된 K_D 가 겉보기 K_D 에 상응할 수 있다는 것이 당업자에게 역시 분명하다. 또한 겉보기 K_D 는 한 분자가 나머지 분자에 대한 하나 초과의 인식 부위를 함유한다면 측정될 수 있다. 이러한 상황에서 측정된 친화성은 2개 분자에 의한 상호작용의 화합력에 의해 영향받을 수 있다. 당업자에게 명확하고, WO 08/020079의 페이지 53-56에 기술된 바와 같이, 해리 상수는 실제 또는 겉보기 해리 상수일 수도 있다. 해리 상수를 결정하는 방법은 당업자에게 분명할 것이고, 예를 들어 WO 08/020079의 페이지 53-56에 언급된 기술을 포함한다.

[0441] 상호교환적으로 사용될 수 있는 용어 "에피토프" 및 항원성 결정부"는 항원-결합 분자, 예컨대 면역글로불린, 통상의 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 본 발명의 폴리펩티드, 및 보다 특히 상기 분자의 항원-결합 부위에 의해 인식되는 폴리펩티드 또는 단백질과 같은 거대분자의 일부를 의미한다. 에피토프는 면역글로불린에 대한 최소 결합 부위를 정의하고, 따라서 면역글로불린의 특이성의 표적을 의미한다.

[0442] 에피토프를 인식하는 항원-결합 분자 (예컨대 면역글로불린, 통상의 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 본 발명의 폴리펩티드)의 일부는 "파라토프"라고 한다.

[0443] 일정한 에피토프, 항원 또는 단백질 (또는 적어도 하나의 이의 일부분, 단편 또는 에피토프)에 "대해 특이성을 갖"고/갖거나 "친화성을 갖"고, "(그에) 결합"할 수 있거나 또는 "(그에) 특이적으로 결합"할 수 있는, 폴리펩티드 (예컨대 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 본 발명의 폴리펩티드, 또는 일반적으로 항원 결합 분자 또는 이의 단편)는 상기 에피토프, 항원 또는 단백질에 "대한"것이거나 또는 "대해 유도된"것이라고 하거나 또는 이러한 에피토프, 항원 또는 단백질에 대한 "결합" 분자이거나, 또는 "항"-에피토프, "항"-항원 또는 "항"-단백질 (예를 들어, "항"-CD123 또는 "항"-TCR)이라고 한다.

[0444] 용어 "특이성"은 WO 08/020079의 페이지 53-56의 단락 n)에 제공된 의미를 갖고; 그에 언급된 바와 같이 특정한 항원-결합 분자 또는 항원-결합 단편 (예컨대 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 본 발명의 폴리펩티드)이 결합할 수 있는 상이한 유형의 항원 또는 항원성 결정부의 개수를 의미한다. 항원-결합 단편의 특이성은 WO 08/020079 (본 명세서에 참조로 편입됨)의 페이지 53-56에 기술된 바와 같은 친화성 및/또는 화합력을 기반으로 결정될 수 있고, 이 문헌은 또한 항원-결합 분자 (예컨대 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 본 발명의 폴리펩티드) 및 관련 항원 간 결합을 측정하기 위한 일부 바람직한 기술을 설명한다. 전형적으로, 항원-결합 단백질 (예컨대 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 본 발명의 폴리펩티드)은 10^{-5} 내지 10^{-12} mole/리터 이하, 및 바람직하게 10^{-7} 내지 10^{-12} mole/리터 이하 및 보다 바람직하게 10^{-8} 내지 10^{-12} mole/리터의 해리 상수 (K_D) (즉, 10^{5} 내지 10^{12} 리터/mole 이상, 및 바람직하게 10^{7} 내지 10^{12} 리터/mole 이상, 및 보다 바람직하게 10^{8} 내지 10^{12} 리터/mole의 결합 상수 (K_A))로 그들 항원에 결합하게 된다. 10^{4} mole/리터를 초과하는 임의의 K_D 값 (또는 10^{4} M^{-1} 미만의 임의의 K_A 값)은 일반적으로 비특이적 결합을 의미하는 것으로 간주된다. 바람직하게, 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 500 nM 미만, 바람직하게 200 nM 미만, 보다 바람직하게 10 nM 미만, 예컨대 예를 들어 10 내지 5 nM, 예컨대 10 nM 미만, 5 nM 미만, 3 nM 미만, 2 nM 미만, 예컨대 10 nM~1 nM, 5 nM~1 nM 또는 그 이하의 친화성으로 바람직한 항원에 결합하게 될 것이다. 항원 또는 항원성 결합부에 대한 항원-결합 단백질의 특이적 결합은 예를 들어, 스캐차드 분석 및/또는 경쟁적 결합 어세이, 예컨대 방사성면역어세이 (RIA), 효소 면역어세이 (EIA) 및 샌드위치 경쟁 어세이, 및 당분야에 그 자체로 공지된 이의 상이한 별법을 비롯하여, 본 명세서에 언급된 다른 기술을 포함하여, 그 자체로 공지된 임의의 적합한 방식으로 결정될 수 있다. 당업자

에게 분명하게 되는 바와 같이, 그리고 WO 08/020079의 페이지 53-56에 기술된 바와 같이, 해리 상수는 실제 또는 겉보기 해리 상수일 수 있다. 해리 상수를 결정하기 위한 방법은 당업자에게 분명해 질 것이며, 예를 들어 WO 08/020079의 페이지 53-56에 언급된 기술을 포함한다.

[0445] 친화성을 평가하는데 사용될 수 있는 한 접근법은 Friguet 등 (1985, J. Immunol. Methods 77: 305-19)의 2-단계 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 절차이다. 이 방법은 용액상 결합 평형 측정을 확립하고 지지체 예컨대 플라스틱 상의 한 분자의 흡착과 관련된 가능한 아티팩트를 피한다.

[0446] 그러나, K_D 의 정확한 측정은 상당히 노동 집약적일 수 있고, 그 결과로, 종종 겉보기 K_D 값은 2개 분자의 결합 강도를 평가하는데 결정된다. 모든 측정이 일관적인 방식 (예를 들어, 어세이 조건을 변화되지 않고 유지)으로 이루어지는 한, 겉보기 K_D 측정은 진정한 K_D 의 근사치로서 사용될 수 있고 그리하여 본 문헌의 K_D 및 겉보기 K_D 는 동일한 중요성 또는 관련성으로 처리되어야 한다는 것을 주의해야 한다.

[0447] 마지막으로, 많은 상황에서 숙련된 과학자는 일부 기준 분자에 대해 결합 친화성을 결정하는데 이것이 편리하다는 것을 판단할 수 있다는 것을 주의해야 한다. 예를 들어, 분자 A 및 B 간 결합 강도를 평가하기 위해서, 예를 들어 B에 결합하는 것으로 알려져 있고 형광단 또는 발색단 기 또는 다른 화학적 모이어티, 예컨대 ELISA 또는 FACS (Fluorescent activated cell sorting)에서 용이한 검출을 위한 바이오틴 또는 다른 포맷 (형광 검출용 형광단, 광흡광 검출용 발색단, 스트렙타비딘-매개 ELISA 검출용 바이오틴)으로 적합하게 표지된 기준 분자 C를 사용할 수 있다. 전형적으로, 기준 분자 C는 고정 농도로 유지되고 A의 농도는 B의 소정 농도 또는 양에 대해 다양하다. 그 결과 IC_{50} 값은 A의 부재 하에서 C에 대해 측정된 신호가 절반인 A의 농도에 상응하는 것이 수득된다. 제공되는 $K_{D\ ref}$, 기준 분자의 K_D 는 공지되어 있을 뿐만 아니라, 기준 분자의 총 농도 c_{ref}, 상호작용 A-B에 대한 겉보기 K_D 는 다음의 식으로 수득될 수 있다: $K_D = IC_{50}/(1+c_{ref}/K_{Dref})$. $c_{ref} \ll K_{D\ ref}$ 라면, $K_D \approx IC_{50}$ 이라는 것을 주의한다. IC_{50} 의 측정이 비교되는 결합제에 대해 일관적인 방식 (예를 들어, c_{ref} 를 고정하여 유지)으로 수행된다면, 분자 상호작용의 강도 또는 안정성은 IC_{50} 에 의해 평가될 수 있고 이러한 측정은 본 텍스트 전반에서 K_D 또는 겉보기 K_D 와 동등한 것으로 판단된다.

[0448] 최대 억제성 농도의 절반 (IC_{50})은 생물학적 또는 생화학적 기능, 예를 들어 약리학적 효과를 억제하는 화합물의 유효성의 척도이다. 이러한 정량적 측정은 얼마나 많은 ISV (예를 들어, 나노바디) (억제제)가 절반만큼 소정 생물학적 과정 (또는 과정의 성분, 즉 효소, 세포, 세포 수용체, 화학주성, 역형성, 전이, 침윤 등)을 억제하는데 필요한지를 의미한다. 달리 말해서, 이것은 물질의 최대 억제성 농도 (IC)의 절반 (50%) (50% IC, 또는 IC_{50})이다. 약물의 IC_{50} 은 용량-반응 곡선을 구축하고, 효현제 활성의 역전에 대한 상이한 농도의 길항제 예컨대 본 발명의 ISVD (예를 들어, 나노바디)의 효과를 조사하여 결정할 수 있다. IC_{50} 값은 효현제의 최대 생물학적 반응의 절반을 억제하는데 요구되는 농도를 결정하여 소정 길항제 예컨대 본 발명의 ISVD (예를 들어, 나노바디)에 대해 계산될 수 있다.

[0449] 용어 최대 유효 농도의 절반 (EC_{50})은 명시된 노출 시간 이후의 최대치와 기준치 간 반응 중간치를 유도하는 화합물의 농도를 의미한다. 본 문맥에서, 폴리펩티드, ISV (예를 들어, 나노바디)의 역가의 척도로서 사용된다. 등급화된 용량 반응 곡선의 EC_{50} 는 이의 최대 효과의 50%가 관찰되는 화합물의 농도를 의미한다. 농도는 바람직하게 molar 단위로 표시된다.

[0450] 생물학적 시스템에서, 리간드 농도의 작은 변화는 전형적으로 시그모이드 함수를 따르는 신속한 반응의 변화를 일으킨다. 리간드 농도 증가에 따른 반응의 증가가 느려지기 시작하는 변곡점이 EC_{50} 이다. 이것은 최적선의 유도에 의해 수학적으로 결정될 수 있다. 추산을 위해 그래프에 의존하는 것이 대부분의 경우에서 편리하다. EC_{50} 가 실시예 부문에서 제공되는 경우에, 실험은 가능한 정확하게 K_D 를 반영하도록 디자인되었다. 달리 말하면, EC_{50} 값은 K_D 값으로서 간주될 수 있다.

[0451] 또한 화합물의 억제의 척도인 IC_{50} (50% 억제)과 관련된다. 경쟁 결합 어세이 및 기능적 길항제 어세이의 경우 IC_{50} 은 용량-반응 곡선의 가장 일반적인 약식 척도이다. 효현제/자극제 어세이의 경우 가장 일반적인 약식 척도는 EC_{50} 이다.

[0452] 억제제 상수, Ki는 억제제가 얼마나 강력한지의 지표이고; 최대 억제의 절반을 생성하는데 요구되는 농도이다. 절대 억제 상수 K_i 는 쳉-프루소프 (Cheng-Prusoff) 방정식을 사용해 계산될 수 있다:

[0453] $$K_i = \frac{IC50}{\frac{[L]}{K_D} + 1}$$

[0454] 상기 식에서 [L]은 리간드의 고정 농도이다.

[0455] 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 폴리펩티드는 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 폴리펩티드가 제2 표적 또는 항원에 결합하는 친화성보다 적어도 10배, 예컨대 적어도 100배, 및 바람직하게 적어도 1000배, 및 최대 10000배 이상의 친화성 (상기 기술된 바와 같고, K_D 값, K_A 값, k_{off} 속도 및/또는 k_{on} 속도로서 적합하게 표시됨)으로 제1 항원에 결합할 때 제2 표적 또는 항원과 비교하여 제1 표적 또는 항원에 "특이적"이라고 한다. 예를 들어, 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 폴리펩티드는 상기 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 폴리펩티드가 제2 표적 또는 항원에 결합하는 K_D 보다, 적어도 10배 미만, 예컨대 적어도 100배 미만, 및 바람직하게 적어도 1000배 미만, 예컨대 10000배 미만 또는 그 미만의 K_D 값으로 제1 표적 또는 항원에 결합할 수 있다. 바람직하게, 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 폴리펩티드가 제2 표적 또는 항원과 비교하여 제1 표적 또는 항원에 "특이적"일 때, (본 명세서에 정의된 바와 같이) 상기 제1 표적 또는 항원에 대해 유도되지만, 상기 제2 표적 또는 항원에 대해 유도되지 않는다.

[0456] 아미노산 서열, 예컨대 예를 들어 본 발명에 따른 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드는 상이한 항원 또는 항원성 결정부 둘 모두에 대해 (본 명세서에 정의된 바와 같이) 특이적이라면 2종의 상이한 항원 또는 항원성 결정부 (예컨대, 2종의 상이한 포유동물 종 유래의 혈청 알부민, 예컨대 예를 들어 인간 혈청 알부민 및 사이노 혈청 알부민, 예컨대 예를 들어, 상이한 포유동물 종 유래의 CD123, 예컨대 예를 들어, 인간 CD123 및 사이노 CD123, 예컨대 예를 들어, 상이한 포유동물 종 유래의 TCR, 예컨대 예를 들어 인간 TCR 및 사이노 TCR)에 대해 "교차-반응성"이라고 한다.

[0457] 용어 "(교차)-차단하다", "(교차)-차단된", "(교차)-차단하는", "경쟁적 결합", "(교차)-경쟁하다", "(교차)-경쟁하는" 및 "(교차)-경쟁"은 소정 표적에 대한 다른 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 결합제의 결합을 방해하는 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제의 능력을 의미하고자 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 표적에 대한 다른 것의 결합을 방해할 수 있는 정도, 및 그리하여 본 발명에 따라서 교차-방해할 수 있는지 여부는 경쟁 결합 어세이를 사용해 결정할 수 있다. 특별히 적합한 정량적 교차-차단 어세이는 실시예에 기술되어 있고, 예를 들어 세포 상에 발현된 CD123에 의한 형광-활성화된 세포 분류법 (FACS)을 포함한다. (교차)-차단의 정도는 (감소된) 채널 형광도에 의해 측정될 수 있다. 다른 적합한 정량적 교차-차단 어세이는 표면 플라스몬 공명 기술을 사용하여 상호작용의 정도를 측정할 수 있는 Biacore 장비를 사용한다. 다른 적합한 정량적 교차-차단 어세이는 표적에 대한 그들 결합 관점에서 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제 간 경쟁을 측정하는 ELISA-기반 접근법을 사용한다.

[0458] 다음은 일반적으로 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 본 발명에 따라서 교차-차단하거나 또는 교차-차단할 수 있는지 여부를 결정하기 위한 적합한 FACS를 기술한다. 어세이는 임의의 본 명세서에 기술된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제를 사용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. FACS 장비 (예를 들어, FACSArray; Becton Dickinson)는 제조사의 추천에 따라서 가동시킨다.

[0459] CD123과의 결합에 대한 2종 결합제 (예컨대, 예를 들어, 2종의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 나노바디) 간 "(교차)-차단" 또는 "(교차)-경쟁"을 평가하기 위해서, FACS 경쟁 실험은 세포 (예컨대 예를 들어, 내생적으로 CD123을 발현하는 세포주 MOLM-13 또는 인간 CD123을 과발현하는 Flp-In™-CHO 세포)를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 각각 상이하게 표지되는, 단일클론 ANTI-FLAG® M2 항체 (Sigma-Aldrich, cat# F1804), 단일클론 항-C-myc 항체 (Sigma-Aldrich, cat# WH0004609M2), 단일클론 ANTI-HIS TAG 항체 (Sigma-Aldrich, cat# SAB1305538)를 포함한, 상이한 검출 시약을 사용할 수 있다. 유세포측정에서 표지로서 광범위한 형광단 (예컨대 예를 들어, PE (R-파이코에리쓰린), 7-아미노악티노마이신 D (7-AAD), 아크리딘 오렌지, 다양한 형태의 Alexa Fluor (예컨대 예를 들어, Alexa647), 알로파이코시아닌 (APC), AmCyan, 아미노쿠마린, APC Cy5, APC

Cy7, APC-H7, APC/Alexa Fluor 750, AsRed2, 아자미-그린, 아주라이트, B ODIPY FL C5-세라미드, BCECF-AM, 비스-옥소놀 DiBAC2(3), BODIPY-FL, 칼세인, 칼세인 AM, 카록시-H2DCFDA, 캐스캐이드 블루, 캐스ㅋ캐이드 옐로우, 셀 트랙커 그린, 세룰레안, CFSE, 크로모마이신 A3, CM-H2DCFDA, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy3B, Cy5, Cy5.5, Cy7, CyPet, DAF-FM DAF-FM 디아세테이트, DAPI, DCFH (2'7'디코로디히드로플루오레세인), DHR, 디히드로칼세인, AM, 디히드로로다민, 디히드로티듐, DiLC1(5), DiOC6(3), DiOC7(3), dKeima-Red, DRAQ5, 드론파-그린, 다양한 형태의 DsRed dTomato, 다양한 형태의 DyLight, 이. 콜라이 (*E.coli*) 생물입자 AF488, E2-크림손, E2-오렌지, EBFP2, ECFP, 다양한 형태의 eFluor, EGFP, EGFP*, 에메랄드, eqFP650, eqFP670, ER-트랙커 블루-화이트 DPX, 데티듐 브로마이드, Express2, EYFP, Fc OxyBurst 그린, Fc OxyBurst 그린 123, FITC, Fluo-3, Fluo-4, 플루오레세인, Fura-2, Fura-Red, GFPuv, H2DCFDA, HcRed1, 홱스트 블루 (33258), 홱스트 레드 (33342), 히드록시쿠마린, HyPer, Indo-1, Indo-1 블루 (Low Ca2+), Indo-1 바이올렛 (High Ca2+), iRFP, J-Red, JC-1, JC-9, 카투쉬카 (TurboFP635), 카투쉬카2 쿠사비라-오렌지, LDS 751, 리사민 로다민 B, 다양한 형태의 생존/사멸, 루시퍼 옐로우, 루시퍼 옐로우 CH, 리소 트랙커 블루, 리소 트랙커 그린, 리소 트랙커 레드, mAmertrine, 마리나 블루, mBanana, mCFP, mCherry, mCitrine, 메톡시쿠마린, mHoneyDew, 미도리이시-시안, 미트라마이신, 미토 트랙커 딥 레드, 미토 트랙커 그린, 미토 트랙커 오렌지, 미토 트랙커 레드, 미토플루오르 그린, mKate (TagFP635), mKate2, mKeima, mKeima-Red, mKO, mKOk, mNeptune, 모노클로로비만, mOrange, mOrange2, mRaspberry, mPlum, mRFP1, mStrawberry, mTangerine, mTarquoise, mTFP1, mTFP1 (Teal), NBD, 옥시버스트 그린 H2DCFDA, 옥시버스트 그린 H2HFF BSA, 퍼시픽 블루, PE (R-파이코에리쓰린), PE Cy5, PE Cy5.5, PE Cy7, PE 텍사스 레드, PE-Cy5 접합체, PE-Cy7 접합체, PerCP (페리디닌 클로르필 단백질), PerCP Cy5.5, PhiYFP, PhiYFP-m, 프로피듐 아이오다이드 (PI), 다양한 형태의 Qdot, 레드 613, RFP 토마토, Rhod-2, S65A, S65C, S65L, S65T, 단일항 산소 센서 그린, 시리우스, SNARF, 수퍼폴더 GFP, SYTOX 블루, SYTOX 그린, SYTOX 오렌지, T-사파이어, TagBFP, TagCFP, TagGFP, TagRFP, TagRFP657, TagYFP, tdTomato, 텍사스 레드, 티아졸 오렌지, TMRE, TMRM, 토파즈, TOTO-1, TO-PRO-1, TRITC, TRITC TruRed, TurboFP602, TurboFP635, TurboGFP, TurboRFP, TurboYFP, 비너스, Vybrant CycleDye 바이올렛t, 야생형 GFP, X-로다민, Y66F, Y66H, Y66W, YOYO-1, YPet, ZsGreen1, ZsYellow1, 자이모산 A 생물입자 AF488 (http://www.thefcn.org/flow-fluorochromes를 더욱 참조함)이 사용될 수 있다. 형광단, 또는 단순히 "fluor"는 전형적으로 검출 시약으로서 사용되는 항체 또는 CD123을 인식하는 항체 (예를 들어, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 예컨대 나노바디)에 부착된다. 다양한 접합된 항체, 예컨대 (제한없이) 예를 들어 Alexa Fluor®, DyLight®, 로다민, PE, FITC, 및 Cy3에 접합된 항체가 이용가능하다. 각각의 형광단은 특징적인 피크 여기 및 발광 파장을 갖는다. 사용될 수 있는 표지의 조합은 이용가능한 검출기 및 형광단을 여기시키는데 사용되는 램프(들) 또는 레이저(들)의 파장에 의존적일 것이다.

[0460] CD123과의 결합에 대한 2종의 시험 결합제 (A 및 B*라고 함) 간 경쟁을 평가하기 위해서, 콜드 (임의의 표지 없음) 결합제 A의 연속 희석물이 표지된 결합제 B*와 함께 (예를 들어, 100 000) 세포에 첨가된다. 시험 믹스 중 B*의 농도는 세포 상에 발현된 CD123 상의 결합 부위를 쉽게 포화시키는데 충분하도록 높아야 한다. 세포 상에 발현된 CD123 상의 결합제에 대한 결합 부위를 포화시키는 결합제 B*의 농도는 CD123 발현 세포 상에서 B*의 적정 시리즈 및 결합에 대한 EC50 값의 결정으로 결정될 수 있다. 포화 농도에서 작업하기 위해서, 결합제 B*는 100× EC_{50} 농도로 사용될 수 있다.

[0461] A 및 B*의 혼합물과 세포의 항온반응 및 세포의 세척 후에, FACS 상에서 판독을 수행할 수 있다. 먼저 게이트는 산란 프로파일로부터 결정되는 온전한 세포 상에서 설정된다.

[0462] 결합제 B*의 개별 용액을 또한 제조한다. 이 용액 중 결합제는 시험 믹스 (결합제 A 및 B* 존재) 중에서와 동일한 농도 및 동일한 완충액이어야 한다. 이러한 개별 용액이 또한 세포에 첨가된다. 항온반응 및 세포 세척 이후에, FACS 상에서 판독을 수행할 수 있다. 먼저 게이트는 산란 프로파일로부터 결정되는 온전한 세포 상에서 설정되고 채널 형광도의 총량이 기록된다.

[0463] B*의 개별 용액와 항온반응시킨 세포에 대한 형광도와 비교하여 A 및 B*의 혼합물과 항온반응시킨 세포에 대한 형광도의 감소는 결합제 A가 세포 상에 발현된 CD123과의 결합에 대한 결합제 B*에 의한 결합을 (교차)-차단한다는 것을 의미한다.

[0464] 본 발명에 따른 교차-차단 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 작용제는 어세이 동안 및 제2 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제의 존재 하에서 기록된 형광도가 최대 형광도 (별개의 표지된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제에 대해 측정)의 80% 내지 0.1% (예를 들어, 80% 내지 4%) , 특히 최대 형

광도의 75% 내지 0.1% (예를 들어, 75% 내지 4%), 및 보다 특히 최대 형광도 (바로 위에 정의된 바와 같음)의 70% 내지 0.1% (예를 들어, 70% 내지 4%)가 되도록 상기 FACS 교차-차단 어세이에서 CD123에 결합하게 되는 것이다 .

[0465] CD123과의 결합에 대한 2종의 시험 결합제 (A* 및 B*라고 함) 간 경쟁은 또한 CD123 발현 세포에, 각각 상이한 형광단이 표지된, 양쪽 결합제를 첨가하여 평가될 수 있다. 항온반응 및 세포 세척 후, FACS 상에서 판독을 수행할 수 있다. 게이트가 각 형광단에 대해 설정되고 채널 형광도의 총량이 기록된다. 형광단 중 하나의 형광도의 감소 및/또는 부재는 세포 상에 발현된 CD123과의 결합에 대한 결합제의 (교차)-차단을 의미한다.

[0466] 일반적으로 하기에 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 본 발명에 따라서 교차-차단하거나 또는 교차-차단할 수 있는지 여부를 결정하기 위한 적합한 Biacore 어세이를 기술한다. 어세이는 임의의 본 명세서에 기술된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제를 사용할 수 있다는 것을 이해하게 될 것이다. Biacore 장비 (예를 들어 Biacore 3000)는 제조사의 추전에 따라서 가동시킨다. 따라서 하나의 교차-차단 어세이에서, 표적 단백질 (예를 들어, CD123)은 표준 아민 커플링 화학을 사용해 CM5 Biacore 칩에 커플링되어 표적이 코팅된 표면이 생성된다. 전형적으로 표적의 200-800 공명 유닛 (resonance unit) (쉽게 결합의 측정가능한 수준을 제공하지만 사용되는 시험 시약의 농도에 의해 쉽게 포화가능한 양)이 칩에 커플링된다. 서로를 교차-차단하는 그들 능력에 대해 평가하려는 2종의 시험 결합제 (A* 및 B*라고 함)는 시험 혼합물을 생성하도록 적합한 완충액 중에 결합 부위의 1 대 1 몰 비율로 혼합된다. 결합 부위 기반으로 농도를 계산할 때 결합제의 분자량은 그 결합제 상의 표적 결합 부위의 수로 나눈 결합제의 총 분자량으로 가정된다. 시험 믹스 중 각 결합제의 농도는 Biacore 칩 상에 포획된 표적 분자 상의 그 결합제에 대한 결합 부위를 쉽게 포화시키기에 충분하도록 높아야 한다. 혼합물 중 결합제는 동일한 몰 농도 (결합 기준)이고 농도는 전형적으로 1.00 내지 1.5 마이크로몰 (결합 부위 기반)이다. A* 단독 및 B* 단독을 함유하는 개별 용액이 또한 제조된다. 이들 용액 중 A* 및 B*는 시험 믹스와 동일한 농도 및 동일한 완충액이어야 한다. 시험 혼합물은 표적-코팅된 Biacore 칩 위를 통과하고 결합 총량이 기록된다. 그 이후에 칩은 칩-결합 표적을 손상시키지 않고 결합된 결합제를 제거하도록 처리된다. 전형적으로, 이것은 60초 동안 30 mM HCl로 칩을 처리하여 수행된다. 다음으로 A* 단독 용액이 표적-코팅된 표면 상을 통과하고 결합량이 기록된다. 다시 칩은 칩-결합 표적을 손상시키지 않고 모든 결합된 결합제를 제거하도록 처리된다. 다음으로 B* 단독 용액을 표적-코팅된 표면 상을 통과하고 결합량이 기록된다. 그 다음으로 A* 및 B*의 혼합물의 최대 이론적 결합을 계산하고 단독으로 표적 표면을 통과했을 때 각 결합제의 결합의 합이다. 혼합물의 실제 기록된 결합이 이론적 최대값 미만이면 2종의 결합제는 서로 교차-차단한다고 한다. 따라서, 일반적으로, 본 발명에 따른 교차-차단 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제는 어세이 동안 및 제2 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제의 존재 하에서, 기록된 결합이 최대 이론적 결합의 80% 내지 0.1% (예를 들어, 80% 내지 4%), 특히 최대 이론적 결합의 75% 내지 0.1% (예를 들어, 75% 내지 4%), 및 보다 특히 조합된 2종의 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 결합제의 최대 이론적 결합 (바로 위에 정의된 바와 같음)의 70% 내지 0.1% (예를 들어, 70% 내지 4%)이도록 상기 Biacore 교차-차단 어세이에서 표적에 결합하게 되는 것이다. 상기 기술된 Biacore 어세이는 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 본 발명에 따라 서로 교차-차단하는지 여부를 결정하는데 사용되는 1차 어세이이다. 드문 경우에, 특정한 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제는 CM5 Biacore 칩에 아민 화학을 통해 커플링된 표적에 결합하지 않을 수도 있다 (이것은 일반적으로 표적 상의 관련 결합 부위가 칩에 커플링되어 파괴되거나 또는 차폐될 때 일어남). 이러한 경우에 교차-차단은 표적의 태그화된 형태, 예를 들어, N-말단 His-태그화 형태를 사용해 결정될 수 있다. 이러한 특정한 포맷에서, 항-His 항체는 Biacore 칩에 커플링되고 나서 His-태그화 표적이 칩의 표면 상을 통과하게 되고 항-His 항체에 의해 포획된다. 교차 차단 분석은 각각의 칩 재생 사이클 이후에, 새로운 His-태그화 표적이 항-His 항체 코팅된 표면 상에 다시 로딩된다는 것을 제외하고, 실질적으로 상기와 같이 수행된다. N-말단 His-태그화 표적을 사용하여 제공되는 예 이외에도, C-말단 His-태그화 표적이 대안적으로 사용될 수 있다. 게다가, 당분야에 공지된 다양한 다른 태그 및 태그 결합 단백질 조합이 이러한 교차-차단 분석에 사용될 수 있다 (예를 들어, HA 태그와 항-HA 항체; FLAG 태그와 항-FLAG 항체; 바이오틴 태그와 스트렙타비딘).

[0467] 일반적으로 다음은 표적 (예를 들어, CD123)에 대한 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 본 명세서에 정의된 바와 같이 교차-차단하거나 또는 교차-차단할 수 있는지 여부를 결정하기 위한 ELISA 어세이를 기술한다. 본 명세서에 기술된 임의의 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 어세이에서 사용될 수 있다는 것을 이해하게 될 것이다. 어세이의

일반 원리는 표적에 대한 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 결합제를 ELISA 플레이트의 웰 상에 코팅되게 하는 것이다. 과량의 제2의 잠재적인 교차-차단성, 항-표적 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 용액에 첨가된다 (즉, ELISA 플레이트에 결합되지 않음). 이어서, 제한된 양의 표적이 웰에 첨가된다. 용액 중 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제 및 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제는 제한된 수의 표적 분자의 결합에 대해 경쟁한다. 플레이트를 세척하여 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제에 의해 결합되지 않은 과량의 표적을 제거하고 또한 제2의, 용액상 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제를 비롯하여, 제2의, 용액상 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제와 표적 간에 형성된 임의의 복합체를 제거한다. 그리고 나서 결합된 표적의 양은 표적을 검출하는 데 적합한 시약을 사용해 측정된다. 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제를 교차-차단할 수 있는 용액 중 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제는 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 제2의, 용액상, 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제의 부재 하에서 결합할 수 있는 표적 분자의 수에 비해서, 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 결합할 수 있는 표적 분자 수의 감소를 야기할 수 있을 것이다. 제1 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제, 예를 들어, Ab-X가 고정된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제로 선택되는 예에서, 이것은 ELISA 플레이트의 웰 상에 코팅되고, 이후에 플레이트는 후속으로 첨가되는 시약의 비특이적 결합을 최소화하기 위해서 적합한 차단 용액으로 차단된다. 다음으로 과량의 제2 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제, 즉 Ab-Y가, 웰 당 Ab-Y 표적 결합 부위의 몰수가 ELISA 플레이트의 코팅 동안, 웰 당 사용된, Ab-X 표적 결합 부위의 몰수보다 적어도 10배 더 높도록 ELISA 플레이트에 첨가된다. 이어서, 표적은 웰 당 첨가되는 표적의 몰수가 각 웰을 코팅하는데 사용된 Ab-X 표적 결합 부위의 몰수보다 적어도 25배 낮도록 첨가된다. 적합한 항온반응 기간 이후에 ELISA 플레이트를 세척하고 표적을 검출하기 위한 시약을 첨가하여 코팅된 항-표적 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제 (Ab-X)에 의해 특이적으로 결합된 표적의 양을 측정한다. 어세이에 대한 배경 신호는 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제 (이 경우에 Ab-X), 제2 용액상 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제 (이 경우에 Ab-Y), 표적 완충액 단독 (즉, 표적 없음) 및 표적 검출 시약이 있는 웰에서 수득된 신호로서 정의된다. 어세이에 대한 양성 대조군 신호는 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제 (이 경우에 Ab-X), 제2 용액상 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제 완충액 단독 (즉, 제2 용액상 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 없음), 표적 및 표적 검출 시약이 있는 웰에서 수득된 신호로서 정의된다. ELISA 어세이는 양성 대조군 신호가 배경 신호의 적어도 6배가 되게 하는 방식으로 진행될 수 있다. 어떠한 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제를 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제로서 그리고 제2 (경쟁인자) 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제로서 사용하는가의 선택에 의한 임의의 아티팩트 (예를 들어, 표적에 대한 Ab-X 및 Ab-Y 간 유의하게 상이한 친화성)를 피하기 위해서, 교차-차단 어세이는 2개 포맷으로 진행될 수 있을 것이다: 1) 포맷 1은 Ab-X가 ELISA 플레이트 상에 코팅되는 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제이고 Ab-Y가 용액 중의 경쟁인자 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제인 경우이고, 및 2) 포맷 2는 Ab-Y가 ELISA 플레이트 상에 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제이고 Ab-X가 용액 중 경쟁인자 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제인 경우이다. Ab-X 및 Ab-Y는 포맷 1 또는 포맷 2에서, 용액상 항-표적 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 용액상 항-표적 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제 (즉, 양성 대조군 웰)의 부재 하에서 수득된 표적 검출 신호와 비교하여 표적 검출 신호 (즉, 코팅된 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제에 의해 결합된 표적의 양)의 60% 내지 100%, 특히 70% 내지 100%, 및 보다 특히 80% 내지 100%의 감소를 야기할 수 있다면, 교차-차단으로서 정의된다.

[0468] 표적에 대한 면역글로불린, 항체, 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 다른 결합제가 본 명세서에 정의된 바와 같이 (교차)-차단하거나, (교차)-차단할 수 있거나, 경쟁적으로 결합할 수 있거나 또는 (교차)-경

쟁적인지 여부를 결정하기 위한 다른 방법은 예를 들어, [Xiao-Chi Jia et al. (2004, Journal of Immunological Methods 288: 91-98)], [Miller et al. (2011, Journal of Immunological Methods 365: 118-125)] 및/또는 본 명세서 (예를 들어, 실시예 16)에 기술된 방법에 기술되어 있다.

[0469] 본 명세서에서 사용되는 용어 "CD123"은 인터루킨 3 수용체의 α 서브유닛 (IL-3Rα)을 의미한다.

[0470] 본 명세서에서 사용되는 용어 "TCR"은 TCRα 및 TCRβ 사슬로 이루어진, T 세포 수용체를 의미한다. TCR의 α 및 β 사슬 둘 모두는 불변 도메인 및 가변 도메인으로 이루어진다. 본 발명의 폴리펩티드 및 면역글로불린 단일 가변 도메인은 TCR의 불변 도메인에 결합된다.

[0471] 본 발명의 폴리펩티드의 "반감기"는 일반적으로 WO 08/020079의 페이지 57의 단락 o)에 기술된 바와 같이 정의될 수 있고 여기에서 언급된 바와 같이 예를 들어 자연 기전에 의한 폴리펩티드의 청소 또는 격리 및/또는 폴리펩티드의 분해로 인해, 생체 내에서 폴리펩티드의 혈청 농도가 50%까지 감소되는데 걸리는 시간을 의미한다. 본 발명의 폴리펩티드의 생체내 반감기는 그 자체로 공지된 임의의 방식으로, 예컨대 약동학적 분석을 통해서 결정될 수 있다. 적합한 기술은 당업자에게 분명할 것이고, 예를 들어 일반적으로 WO 08/020079의 페이지 57의 단락 o)에 기술된 바와 같다. 역시 WO 08/020079의 페이지 57의 단락 o)에 언급된 바와 같이, 반감기는 매개변수 예컨대 t1/2-알파, t1/2-베타 및 곡선하 면적 (AUC)을 사용해 표시될 수 있다. 예를 들어 표준 안내서, 예컨대 [Kenneth et al (1986, Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, John Wiley & Sons Inc)] 및 [M Gibaldi and D Perron (1982, Pharmacokinetics, Marcel Dekker, 2nd Rev. Ed., 1982)]를 참조한다. 용어 "반감기의 증가" 또는 "증가된 반감기"는 또한 WO 08/020079의 페이지 57의 단락 o)에 정의된 바와 같고 특히 t1/2-알파 및/또는 AUC 또는 둘 모두의 증가와 함께 또는 없이, t1/2-베타의 증가를 의미한다.

[0472] 달리 표시하지 않으면, 용어 "면역글로불린" 및 "면역글로불린 서열"은 - 본 명세서에서 중쇄 항체를 언급하거나 또는 통상의 4-사슬 항체를 언급하기 위해 사용되건 간에 - 전체 크기 항체, 이의 개별 사슬을 비롯하여, 이의 모든 부분, 도메인 또는 단편 (제한없이 항원-결합 도메인 또는 단편 예컨대 각각 V_{HH} 도메인 또는 V_H/V_L 도메인을 포함)을 모두 포함하는 일반 용어로서 사용된다.

[0473] 본 명세서에서 사용되는 용어 (폴리펩티드 또는 단백질의) "도메인"은 단백질의 나머지와 독립적으로 이의 3차 구조를 유지하는 능력을 갖는 폴딩된 단백질 구조를 의미한다. 일반적으로, 도메인은 단백질의 별개의 기능적 속성을 담당하고, 많은 경우에서, 도메인 및/또는 단백질의 나머지의 기능 상실없이 다른 단백질에 첨가될 수 있거나, 제거될 수 있거나 또는 전달될 수 있다.

[0474] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역글로불린 도메인"은 항체 사슬 (예컨대, 예를 들어 통상의 4-사슬 항체 또는 중쇄 항체의 사슬)의 구형 영역을 의미하거나, 또는 이러한 구형 영역으로 실질적으로 이루어진 폴리펩티드를 의미한다. 면역글로불린 도메인은 그들이, 경우에 따라 보존된 디술파이드 결합에 의해 안정화된, 2개 베타-시트로 배열되는 대략 7개의 역평행 베타-가닥의 2층 샌드위치로 이루어진, 항체 분자의 특징적인 면역글로불린 폴드를 보유하는 것을 특징으로 한다.

[0475] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역글로불린 가변 도메인"은 개별적으로 "프레임워크 영역 1" 또는 "FR1"; "프레임워크 영역 2" 또는 "FR2"; "프레임워크 영역 3" 또는 "FR3"; 및 "프레임워크 영역 4" 또는 "FR4"으로서 당분야 및 하기 본 명세서에서 언급하는 4개의 "프레임워크 영역"으로 실질적으로 이루어진 면역글로불린 도메인을 의미하고; 이러한 프레임워크 영역은 개별적으로 "상보성 결정 영역 1" 또는 "CDR1"; "상보성 결정 영역 2" 또는 "CDR2"; 및 "상보성 결정 영역 3" 또는 "CDR3"으로서 당분야 및 하기 본 명세서에서 언급하는 3개의 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"이 개재된다. 따라서, 면역글로불린 가변 도메인의 일반 구조 또는 서열은 다음과 같이 표시될 수 있다: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. 항원-결합 부위를 보유함으로써 항원에 대해 항체에게 특이성을 부여하는 것이 면역글로불린 가변 도메인(들)이다.

[0476] "단일 가변 도메인"과 상호교환적으로 사용되는 용어 "면역글로불린 단일 가변 도메인" 또는 "ISV"는 항원 결합 부위가 단일 면역글로불린 도메인 상에 존재하고, 그에 의해 형성되는 분자로 정의된다. 이것은 "통상의" 면역글로불린 또는 그들 단편이외에 면역글로불린 단일 가변 도메인을 결정하고, 여기서 2개 면역글로불린 도메인, 특히 2개 가변 도메인은 상호작용하여 항원 결합 부위를 형성한다. 전형적으로, 통상의 면역글로불린에서, 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 경쇄 가변 도메인 (VL)은 상호작용하여 항원 결합 부위를 형성한다. 이러한 경우에서, VH 및 VL 둘 모두의 상보성 결정 영역(CDR)은 항원 결합 부위에 기여하게 될 것이며, 즉 총 6개의 CDR이 항원 결합 부위 형성에 관여될 것이다.

[0477] 상기 정의를 고려하면, 통상의 4-사슬 항체 (예컨대 당분야에 공지된 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 분자) 또는

Fab 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편 예컨대 디술파이드 연결된 Fv 또는 scFv 단편, 또는 이러한 통상의 4-사슬 항체로부터 유래된 디아바디 (모두 당분야에 공지됨)의 항원-결합 도메인은 이들 경우에서, 항원의 개별 에피토프의 결합이 정상적으로 하나 (단일)의 면역글로불린 도메인에 의한 것이 아니라, 개별 항원의 에피토프에 함께 결합되는, 면역글로불린 도메인의 (회합된) 쌍 예컨대 경쇄 및 중쇄 가변 도메인, 즉, 면역글로불린 도메인의 VH-VL 쌍에 의해 일어나므로, 정상적으로는 면역글로불린 단일 가변 도메인으로서 간주되지 않는다.

[0478] 대조적으로, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 추가의 면역글로불린 가변 도메인과 쌍형성없이 항원의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 면역글로불린 단일 가변 도메인의 결합 부위는 단일 VH/VHH 또는 VL 도메인에 의해 형성된다. 그리하여, 면역글로불린 단일 가변 도메인의 항원 결합 부위는 3개 이하의 CDR에 의해 형성된다.

[0479] 이와 같이, 단일 가변 도메인은 단일 항원 결합 유닛 (즉, 단일 항원 결합 도메인이 기능성 항원 결합 유닛을 형성하도록 다른 가변 도메인과 상호작용할 필요가 없도록, 단일 가변 도메인으로 실질적으로 이루어진 기능성 항원 결합 유닛)을 형성할 수 있는 한, 경쇄 가변 도메인 서열 (예를 들어, VL-서열) 또는 적합한 이의 단편; 또는 중쇄 가변 도메인 서열 (예를 들어, VH-서열 또는 VHH 서열) 또는 적합한 이의 단편일 수 있다.

[0480] 본 발명의 일 측면에서, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 중쇄 가변 도메인 서열 (예를 들어, VH-서열)이고; 보다 특히, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 통상의 4-사슬 항체로부터 유래된 중쇄 가변 도메인 서열 또는 중쇄 항체로부터 유래된 중쇄 가변 도메인 서열일 수 있다.

[0481] 예를 들어, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 (단일) 도메인 항체 (또는 (단일) 도메인 항체으로서 사용에 적합한 아미노산), "dAb" 또는 dAb (또는 dAb로서 사용에 적합한 아미노산), 나노바디 (본 명세서에 정의된 바와 같고, 제한없이 VHH 포함), 다른 단일 가변 도메인, 또는 이의 임의의 하나 중 임의의 적합한 단편일 수 있다.

[0482] 특히, 면역글로불린 단일 가변 도메인은 나노바디 (본 명세서에서 정의된 바와 같음) 또는 적합한 이의 단편일 수 있다. [주: 나노바디 (Nanobody), 나노바디들 (Nanobodies) 및 나노클론 (Nanoclone)은 Ablynx N.V.의 등록상표임] 나노바디의 일반 설명은, 하기의 추가 설명을 비롯하여, 본 명세서에 인용된 종래 기술, 예컨대 WO 08/020079 (페이지 16)에 기술된 것들을 참조한다.

[0483] VHH, V_HH 도메인, VHH 항체 단편, 및 VHH 항체로도 알려진 "VHH 도메인"은 본래 "중쇄 항체" (즉, "경쇄가 없는 항체"; Hamers-Casterman et al. Nature 363: 446-448, 1993)의 항원 결합 면역글로불린 (가변) 도메인으로서 설명되었다. 용어 "VHH 도메인"은 이들 가변 도메인을 통상의 4-사슬 항체에 존재하는 중쇄 가변 도메인 ("V_H 도메인" 또는 "VH 도메인"으로서 본 명세서에서 언급) 및 통상의 4-사슬 항체에 존재하는 경쇄 가변 도메인 ("V_L 도메인" 또는 "VL 도메인"으로서 본 명세서에서 언급됨)과 구별하기 위해 선택되었다. VHH 및 나노바디의 추가 설명은 Muyldermans (2001, Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302)에 의한 리뷰 논문을 비롯하여, 일반 배경 기술로서 언급되는, 하기의 특허 출원을 참조한다: Vrije Universiteit Brussel의 WO 94/04678, WO 95/04079 및 WO 96/34103; Unilever의 WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134231 및 WO 02/48193; Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB)의 WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 및 WO 03/055527; Algonomics N.V. 및 Ablynx N.V.의 WO 03/050531; National Research Council of Canada의 WO 01/90190; Institute of Antibodies의 WO 03/025020 (= EP 1433793)를 비롯하여; Ablynx N.V.의 WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 및 WO 06/122825, 및 Ablynx N.V.의 추가의 공개 특허 출원. 또한 이들 출원에서 언급된 추가의 종래 기술, 및 특히 국제 공개 특허 출원 WO 06/040153의 페이지 41-43에 언급된 참조문헌 목록을 또한 참조하고, 이러한 목록 및 참조 문헌을 참조로 본 명세서에 편입시킨다. 이들 참조 문헌에 기술된 바와 같이, 나노바디 (특히 VHH 서열 및 부분 인간화 나노바디)는 프레임워크 서열 중 하나 이상에 하나 이상의 "특징 잔기"의 존재를 특징으로 할 수 있다. 나노바디의 인간화 및/또는 낙타화를 비롯하여, 다른 변형, 부분 또는 단편, 유도체 또는 "나노바디 융합체", 다가 구성체 (링커 서열의 일부 비제한적인 예를 포함) 및 나노바디의 반감기를 증가시키기 위한 상이한 변형 및 그들의 제조를 포함한, 나노바디의 추가 설명은 예를 들어, WO 08/101985 및 WO 08/142164에서 확인할 수 있다. 나노바디의 추가적인 일반 설명을 위해, 본 명세서에 언급된 종래 기술, 예컨대 예를 들어, WO 08/020079 (페이지 16)에 기술된 것을 참조한다.

[0484] "Dab", Domain Antibodies" 및 "dAb"라고도 알려진 도메인 항체 (Domain antibodies) (용어 "도메인 항체 (Domain Antibodies)" 및 "dAbs"는 GlaxoSmithKline group of companies의 상표로서 사용됨)는 예를 들어, EP

0368684, [Ward et al. (1989, Nature 341: 544-546)], [Holt et al. (2003, Trends in Biotechnology 21: 484-490)] 및 WO 03/002609를 비롯하여, 예를 들어 WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 및 Domantis Ltd의 다른 공개 특허 출원에 기술되어 있다. 도메인 항체는 실질적으로 낙타이외의 포유동물, 특히 인간 4-사슬 항체의 VH 또는 VL 도메인에 상응한다. 단일 항원 결합 도메인으로서, 즉 각각 VL 또는 VH 도메인과의 쌍형성없이, 에피토프에 결합하기 위해서, 이러한 항원 결합 속성을 위한 특이적 선택은 예를 들어 인간 단일 VH 또는 VL 도메인 서열의 라이브러리를 사용하는 것이 요구된다. 도메인 항체는 VHH 처럼, 대략 13 kDa 내지 대략 16 kDa의 분자량을 갖고, 완전한 인간 서열로부터 유래된다면, 예를 들어, 인간에서 치료적 용도를 위해 인간화가 요구되지 않는다.

[0485] 또한 그들이 포유동물 기원이 아니기 때문에, 본 발명의 문맥에서 덜 바람직하지만, 단일 가변 도메인은 일정한 상어 종으로부터 유래될 수 있다는 것을 주의한다 (예를 들어, 소위 "IgNAR 도메인", 예를 들어 WO 05/18629 참조).

[0486] 따라서, 본 발명의 의미에서, 용어 "면역글로불린 단일 가변 도메인" 또는 "단일 가변 도메인"은 인간이외의 공급원, 바람직하게 낙타화, 바람직하게 낙타과 중쇄 항체로부터 유래된 폴리펩티드를 포함한다. 그들은 이전에 기술된 바와 같이 인간화될 수도 있다. 게다가, 이 용어는 예를 들어, [Davies and Riechmann (1994, FEBS 339: 285-290; 1995, Biotechnol. 13: 475-479; 1996, Prot. Eng. 9: 531-537)] 및 [Riechmann and Muyldermans (1999, J. Immunol. Methods 231: 25-38)]에 기술된 바와 같이, "낙타화"된, 낙타과 이외의 공급원, 예를 들어 마우스 또는 인간으로부터 유래된 폴리펩티드를 포함한다.

[0487] VHH 도메인의 아미노산 잔기는 예를 들어 문헌 [Riechmann and Muyldermans (1999, J. Immunol. Methods 231: 25-38)의 도 2에 도시된 바와 같이, 낙타과 유래의 VHH 도메인에 적용되는 바와 같은, 문헌 [Kabat et al. ("Sequence of Protein of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)]에 의해 제공되는 V_H 도메인에 대한 일반 번호매김에 따라 번호매겨진다. 그 방법이 VHH 도메인과 유사한 방식으로 적용될 수 있는, V_H 도메인의 아미노산 잔기를 번호매김하는 대안적인 방법이 당분야에 공지되어 있다. 그러나, 본 설명, 청구항 및 도면에서, 달리 표시하지 않으면, 상기 기술된 바와 같이 VHH 도메인에 적용된 카밧에 따른 번호매김을 따르게 될 것이다.

[0488] - V_H 도메인 및 VHH 도메인에 대해 당분야에 충분히 공지된 바와 같이 - CDR 각각에서 아미노산 잔기의 총 개수는 다양할 수 있고 카밧 번호매김에 의해 표시되는 아미노산 잔기의 총 개수에 상응하지 않을 수 있다는 것을 주의해야 한다 (즉, 카밧 번호매김에 따른 하나 이상의 위치는 실제 서열에서 점유되지 않을 수 있거나, 또는 실제 서열은 카밧 번호매김에 의해 허용되는 개수보다 더 많은 아미노산 잔기를 함유할 수 있음). 이것은 일반적으로 카밧에 따른 번호매김이 실제 서열 내 아미노산 잔기의 실제 번호매김에 상응할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다는 것을 의미한다. VH 도메인 및 VHH 도메인에서 아미노산 잔기의 총 개수는 일반적으로 110개 내지 120개, 종종 112개 내지 115개 범위일 것이다. 그러나 더 짧고 더 긴 서열이 또한 본 명세서에 기술된 목적에 적합할 수도 있다는 것을 주의해야 한다.

[0489] CDR 영역의 결정은 또한 상이한 방법에 따라 수행될 수 있다. 카밧에 따른 CDR 결정에서, VHH의 FR1은 위치 1-30에 아미노산 잔기를 포함하고, VHH의 CDR1은 위치 31-35에 아미노산 잔기를 포함하고, VHH의 FR2는 위치 36-49에 아미노산을 포함하고, VHH의 CDR2는 위치 50-65에 아미노산 잔기를 포함하고, VHH의 FR3은 위치 66-94에 아미노산 잔기를 포함하고, VHH의 CDR3은 위치 95-102에 아미노산 잔기를 포함하고, VHH의 FR4는 위치 103-113에 아미노산 잔기를 포함한다.

[0490] 그러나, 본 출원에서, CDR 서열은 문헌 [Kontermann and Dubel (2010, Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33-51)]에 따라서 결정되었다. 이 방법에 따라서, FR1은 위치 1-25에 아미노산 잔기를 포함하고, CDR1은 위치 26-35에 아미노산 잔기를 포함하고, FR2는 위치 36-49에 아미노산을 포함하고, CDR2는 위치 50-58에 아미노산 잔기를 포함하고, FR3은 위치 59-94에 아미노산 잔기를 포함하고, CDR3은 위치 95-102에 아미노산 잔기를 포함하고, FR4는 위치 103-113에 아미노산 잔기를 포함한다 (카밧 번호매김에 따름).

[0491] 면역글로불린 단일 가변 도메인 예컨대 도메인 항체 및 나노바디 (VHH 도메인 포함)는 인간화가 수행될 수 있다. 특히, 인간화된 면역글로불린 단일 가변 도메인, 예컨대 나노바디 (VHH 도메인 포함)는 이전 단락에서 일반적으로 정의된 바와 같지만, 인간화 치환 (본 명세서에 정의된 바와 같음)이고/이거나 그에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 (특히 프레임워크 잔기 중 적어도 하나에) 존재하는 면역글로불린 단일 가변 도메인일

수 있다. 잠재적으로 유용한 인간화 치환은 천연 발생 V_{HH} 서열의 프레임워크 영역의 서열을 하나 이상의 밀접하게 관련된 인간 V_H 서열의 상응하는 프레임워크 서열과 비교하여 확인할 수 있고, 그 이후에 이렇게 결정된 잠재적으로 유용한 인간화 치환 (또는 이의 조합)의 하나 이상이 (본 명세서에 더욱 기술하는 바와 같이, 그 자체로 공지된 임의의 방식으로) 상기 V_{HH} 서열에 도입될 수 있고 최종 인간화 V_{HH} 서열은 표적에 대한 친화성, 안정성, 용이함 및 발현도 및/또는 다른 바람직한 속성에 대해 시험될 수 있다. 이러한 방식으로, 제한된 정도의 시행착오를 통해서, 다른 적합한 인간화 치환 (또는 이의 적합한 조합)은 본 명세서의 개시 내용을 기반으로 당업자가 결정할 수 있다. 또한, 전술한 내용을 기반으로, 면역글로불린 단일 가변 도메인 (의 프레임워크 영역), 예컨대 나노바디 (VHH 도메인 포함)는 부분적으로 인간화될 수 있거나 또는 완전하게 인간화될 수 있다.

[0492] 면역글로불린 단일 가변 도메인 예컨대 도메인 항체 및 나노바디 (VHH 도메인 및 인간화 VHH 도메인 포함)는 또한 개별 부모 분자와 비교하여, 변경이 이의 개별 항원에 대한 최종 면역글로불린 단일 가변 도메인의 개선된 친화성을 야기하는, 하나 이상의 CDR의 아미노산 서열에 하나 이상의 변경을 도입시킴으로써 친화성 성숙이 수행될 수 있다. 본 발명의 친화성-성숙된 면역글로불린 단일 가변 도메인 분자는 예를 들어 [Marks et al. (1992, Biotechnology 10: 779-783)], [Barbas, et al. (1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813)], [Shier et al. (1995, Gene 169: 147-155)], [Yelton et al. (Immunol. 155: 1994-2004,)], [Jackson et al. (J. Immunol. 154: 3310-9, 1995)], [Hawkins et al. (1995, J. MoI. Biol. 226: 889-896)], [Johnson and Hawkins (1996, Affinity maturation of antibodies using phage display, Oxford University Press)]에 의해 기술된 바와 같이, 당분야에 공지된 방법으로 제조될 수 있다.

[0493] 면역글로불린 단일 가변 도메인 예컨대 도메인 항체 또는 나노바디로부터 출발하여, 폴리펩티드를 디자인/선택 및/또는 제조하는 방법은 또한 본 명세서에서 상기 면역글로불린 단일 가변 도메인을 "포맷팅"한다고도 하고; 폴리펩티드의 일부를 만드는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 상기 폴리펩티드의 "포맷"이라고 하거나 또는 "포맷된" 것이라고도 한다. 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포맷시킬 수 있는 방법의 예 및 이러한 포맷의 예는 본 명세서의 개시 내용을 기반으로 당업자에게 분명해 질 것이고, 이러한 포맷된 면역글로불린 단일 가변 도메인은 본 발명의 추가 측면을 형성한다.

[0494] 예를 들어, 제한없이, 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 결합 유닛 (즉, CD123 상의 동일하거나 또는 다른 에피토프 및/또는 CD123 이외의 하나 이상의 다른 항원, 단백질 또는 표적, 예컨대 예를 들어, TCR에 대한 것임)으로서 제공될 수 있는 하나 이상의 추가적인 면역글로불린 단일 가변 도메인을 경우에 따라 함유할 수도 있는, 폴리펩티드의 제조를 위한 "결합 유닛", "결합 도메인" 또는 "빌딩 블록" (이들 용어는 상호교환적으로 사용됨)으로서 사용될 수 있다.

[0495] 1가 폴리펩티드는 오직 하나의 결합 유닛 (예컨대 예를 들어, 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인)을 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어진다. 둘 이상의 결합 유닛 (예컨대, 예를 들어 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인)을 포함하는 폴리펩티드는 또한 본 명세서에서 "다가" 폴리펩티드라고 언급할 것이고, 이러한 폴리펩티드에 존재하는 결합 유닛/면역글로불린 단일 가변 도메인은 또한 본 명세서에서 "다가 포맷"이라고 하게 될 것이다. 예를 들어 "2가" 폴리펩티드는 경우에 따라 링커 서열을 통해서 연결된 2종의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함할 수 있는데 반해, "3가" 폴리펩티드는 경우에 따라 2개의 링커 서열을 통해 연결된 3종의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함할 수 있는 한편, "4가" 폴리펩티드는 경우에 따라 3개 링커 서열을 통해 연결되는 4종의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0496] 다가 폴리펩티드에서, 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 동일할 수 있거나 또는 상이할 수 있고, 동일한 항원 또는 항원성 결정부 (예를 들어, 동일한 부분(들) 또는 에피토프(들) 또는 상이한 부분 또는 에피토프)에 대해 유도될 수 있거나 또는 대안적으로 상이한 항원 또는 항원 결정부; 또는 이의 임의의 적합한 조합에 대해 유도될 수 있다. 적어도 하나의 결합 유닛은 제1 항원 (즉, CD123)에 대해 유도되고 적어도 하나의 결합 유닛은 제2 항원 (즉, CD123과 상이함)에 대해 유도된 것인 적어도 2종의 결합 유닛 (예컨대 예를 들어, 적어도 둘의 면역글로불린 단일 가변 도메인)을 함유하는 폴리펩티드는 또한 "다중특이적" 폴리펩티드라고 하게 될 것이고, 이러한 폴리펩티드에 존재하는 결합 유닛 (예컨대 예를 들어, 면역글로불린 단일 가변 도메인)은 또한 본 명세서에서 "다중특이적 포맷"이라고 하게 될 것이다. 따라서, 예를 들어, 본 발명의 "이중특이적" 폴리펩티드는 제1 항원 (즉, CD123)에 대해 유도된 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 제2 항원 (즉, CD123과 상이, 예컨대 예를 들어 TCR)에 대해 유도된 하나의 추가 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드인 반면, 본 발명의 "삼중특이적" 폴리펩티드는 제1 항원 (즉, CD123)에 대해 유도된 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 제2 항원 (즉, CD123과 상이, 예컨대 예를 들어, TCR)에 대해 유도된 하나의 추가 면

역글로불린 단일 가변 도메인 및 제3 항원 (즉, CD123 및 제2 항원 둘 모두와 상이)에 대해 유도된 적어도 하나의 추가 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드 등이다.

[0497] 하나의 항원에 대해 유도된 폴리펩티드는 또한 "단일특이적" 폴리펩티드라고 할 것이다. 이러한 "단일특이적" 폴리펩티드는 하나의 항원 (예를 들어, TCR 또는 CD123)에 대해 유도된 오직 하나의 결합 유닛 (예컨대 예를 들어, 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인)만을 함유하는, 1가 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 "단일특이적" 폴리펩티드는 동일한 항원에 대해 유도된 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 함유하는, 다가 폴리펩티드일 수도 있다. 이러한 "단일특이적" 다가 폴리펩티드는 동일한 항원의 동일 부분(들) 또는 에피토프(들)에 대해서 또는 동일한 항원 (예를 들어, CD123)의 상이한 부분 또는 에피토프에 대해서 유도될 수 있다.

[0498] 동일한 항원 상의 상이한 부분 또는 에피토프에 대해 유도된 둘 이상의 결합 유닛을 포함하는 폴리펩티드는 또한 "다중파라토프" 폴리펩티드라고 한다. 이와 같이, "다중파라토프" 폴리펩티드, 예컨대 예를 들어, "이중 파라토프" 폴리펩티드 또는 "삼중파라토프" 폴리펩티드는 각각이 상이한 파라토프를 갖는 둘 이상의 결합 유닛을 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어진다 (본 명세서에 더욱 기술되는 바와 같을 것이고, 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드에 대한 장을 참조함).

[0499] **본 발명의 폴리펩티드**

[0500] 본 발명은 CD123 발현 세포의 사멸을 위해 T 세포를 재지정하는 폴리펩티드를 제공한다. 이러한 기능을 발휘하는 이들 폴리펩티드의 능력은 그들의 다중특이적 형태로부터 발생된다. 본 발명에 의해 제공되는 다중특이적 폴리펩티드 ("본 발명의 다중특이적 폴리펩티드(들)"라고 함)는 T 세포 수용체(TCR)에 특이적으로 결합하는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISV) 및 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함한다.

[0501] 본 발명은 또한 본 발명의 이러한 다중특이적 폴리펩티드에서 결합 유닛 또는 빌딩 블록으로서 사용될 수 있는 1가 폴리펩티드에 관한 것이다. 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV를 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은 CD123에 특이적으로 결합하는 ISV를 제공한다. 이들 1가 폴리펩티드는 오직 하나의 항원에만 결합하며 그러므로 "본 발명의 단일특이적 폴리펩티드(들)"라고 하게 될 것이다.

[0502] CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 역시 본 발명에 포괄되는 다가 폴리펩티드를 형성하도록 더욱 구성될 수 있다. 이러한 다가 폴리펩티드는 CD123에 특이적으로 결합하는 2종 이상의 ISV를 포함한다. 이들 다가 폴리펩티드는 오직 하나의 항원 (즉, CD123)에 결합하며 그러므로 또한 "본 발명의 단일특이적 폴리펩티드(들)"라고 할 것이다.

[0503] 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드(들) 및 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드(들)는 본 명세서에서 더욱 기술하며 일반적으로 "본 발명의 폴리펩티드(들)"라고 한다.

[0504] **1. 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드**

[0505] *1.1 TCR에 결합하는 단일특이적 폴리펩티드*

[0506] 본 발명은 TCR에 특이적으로 결합하는 단일특이적 폴리펩티드에 관한 것이다. 바람직하게, 본 발명의 이러한 단일특이적 폴리펩티드는 1가이다. 바람직한 측면에서, 단일특이적 폴리펩티드는 본 발명의 "면역글로불린 단일 가변 도메인(들)" 또는 "본 발명의 ISV(들)"로서 본 명세서에서 언급하게 되는 면역글로불린 단일 가변 도메인이다.

[0507] T 세포 수용체 (또한 본 명세서에서 TCR이라고 함)는 TCRα 및 TCRβ 사슬로 이루어진 이종이량체이다. TCR의 α 및 β 사슬 둘 모두는 불변 도메인 및 가변 도메인으로 이루어진다. 본 발명의 폴리펩티드는 TCR의 불변 도메인에 특이적으로 결합된다.

[0508] T 세포 수용체는 TCR 복합체의 일부를 형성한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "TCR 복합체" 또는 "TCRαβ-CD3 복합체"는 T 세포의 표면 상에 제시된 T 세포 수용체를 의미한다 (Kuhns et al. 2006, Immunity 24: 133-139). TCR 복합체는 6종의 상이한 I형 단일-관통 경막 단백질로 구성된다: 리간드 인식을 담당하는 TCR 이종이량체를 형성하는 TCRα 및 TCRβ 사슬, 및 수용체 활성화 시에 인산화되고 다수의 신호전달 성분을 동원하는 세포질 서열 모티프를 보유하는 비공유적으로 회합된 CD3γ, CD3δ, CD3ε 및 ζ 사슬. 인간 CD3 및 인간 TCR α/β 불변 도메인에 대한 서열은 표 A-8에 제공된다 (서열번호 70-75; UniProt 식별자 참조: CD3 델타: P04234, CD3 감마: P09693, CD3 엡실론: P07766, CD3 제타: P20963, TCR 알파: P01848 및 TCR 베타: P01850과 관련).

[0509] 일 측면에서, 본 발명은 T 세포 수용체 α (TCRα)의 불변 도메인 (서열번호 74) 및/또는 T 세포 수용체 β (TCRβ)의 불변 도메인 (서열번호 75), 또는 이의 다형성 변이체 또는 이소폼에 결합하는, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0510] 이소폼은 그 모두가 당분야에 공지된, 생물학적 사건 예컨대 선택적 프로모터 용법, 선택적 스플라이싱, 선택적 개시 및 리보솜 프레임쉬프팅 중 하나에 의해서 또는 그 조합에 의해서 동일한 유전자로부터 생성될 수 있는 선택적 단백질 서열이다.

[0511] 오직 엄격한 면역화, 스크리닝 및 선택 방법 이후에, 본 발명자는 TCR의 불변 도메인에 결합하는 ISV를 동정할 수 있었다. CDR1, CDR2 및 CDR3에 유사성 및 차이가 있는 104개 클론을 포함하는, 서열의 클러스터가 동정되었다 (표 A-5 참조). 상응하는 서열 정렬이 제공된다 (표 A-1).

[0512] 따라서, 본 발명은 서열번호 42 및 78-180 (표 A-5 참조)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 ISV인 폴리펩티드에 관한 것이다. 추가 측면에서, 폴리펩티드는 서열번호 42 및 78-180으로 이루어진 군으로부터 또는 서열번호 42 및 78-180 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택된다.

[0513] 따라서, 본 발명은 또한 TCR에 결합하고 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어지는 폴리펩티드에 관한 것으로서, 여기서 CDR1은 아미노산 서열 $GX_1VX_2X_3X_4NX_5LX_6$ 을 갖고, 이때 X_1 는 D, A, S, E 또는 G이고, X_2 는 H 또는 Y이고, X_3 은 K 또는 L이고, X_4 는 I 또는 L이고, X_5 는 F, I 또는 V이고, X_6 는 G 또는 S이다.

[0514] 추가 측면에서, 본 발명은 TCR에 결합하고 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어지는 폴리펩티드에 관한 것으로서, 여기서 CDR2는 아미노산 서열 $X_1IX_2IX_3DX_4X_5X_6$ 을 갖고 이때 X_1 은 H, T 또는 R이고, X_2 는 S, T 또는 A이고, X_3 은 G, S 또는 A이고, X_4 는 Q, D, E, T, A 또는 V이고, X_5 는 T, A 또는 V이고 X_6 은 D, A, Q, N, V 또는 S이다.

[0515] 추가 측면에서, 본 발명은 TCR에 결합하고 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어지는 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 CDR3은 아미노산 서열 $X_1SR\ X_2X_3PYX_4Y$ 을 갖고, 이때 X_1 은 F, Y, G, L 또는 K이고, X_2 는 I 또는 L이고, X_3 은 Y 또는 W이고, X_4 는 D, N 또는 S이다.

[0516] 본 발명의 폴리펩티드에서 사용을 위해 바람직한 CDR 서열을 비롯하여, CDR 서열의 바람직한 조합은 표 A-5에 표시되어 있다.

[0517] 따라서, 본 발명은 TCR에 특이적으로 결합하고 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어지는 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서

[0518] i) CDR1은

[0519] a) 서열번호 181-191; 또는

[0520] b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0521] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0522] 및/또는

[0523] ii) CDR2는

[0524] c) 서열번호 192-217; 또는

[0525] d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미

노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0526] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0527] 및/또는

[0528] iii) CDR3은

[0529] e) 서열번호 218-225; 또는

[0530] f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0531] 로 이루어진다.

[0532] 추가 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것으로서, 여기서

[0533] i) CDR1은

[0534] a) 서열번호 181-191; 또는

[0535] b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0536] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0537] ii) CDR2는

[0538] c) 서열번호 192-217; 또는

[0539] d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0540] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0541] iii) CDR3은

[0542] e) 서열번호 218-225; 또는

[0543] f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0544] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0545] 특히, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서

[0546] i) CDR1은

[0547] a) 서열번호 181-191; 또는

[0548] b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 2, 4, 5, 6, 8 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 27, 29, 30, 31, 33 및/또는 35)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명

으로 측정되는 것인 서열

[0549] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0550] ii) CDR2는

[0551] c) 서열번호 192-217; 또는

[0552] d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 1, 3, 5, 7, 8 및/또는 9(카밧 번호매김에 따른 위치 50, 52, 54, 56, 57 및/또는 58)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0553] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0554] iii) CDR3은

[0555] e) 서열번호 218-225; 또는

[0556] f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 1, 4, 5 및/또는 8(카밧 번호매김에 따른 위치 95, 98, 99 및/또는 101)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0557] 다른 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, CDR1은

[0558] a) 서열번호 181; 또는

[0559] b) 서열번호 181의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 서열로서,

[0560] - 위치 2에서 D는 A, S, E 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0561] - 위치 4에서 H는 Y로 변경되었고/되었거나;

[0562] - 위치 5에서 K는 L로 변경되었고/되었거나;

[0563] - 위치 6에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0564] - 위치 8에서 F는 I 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0565] - 위치 10에서 G는 S로 변경된 아미노산 서열

[0566] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0567] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0568] 다른 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR2은

[0569] a) 서열번호 192; 또는

[0570] b) 서열번호 192의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0571] - 위치 1에서 H는 T 또는 R로 변경되었고/되었거나;

[0572] - 위치 3에서 S는 T 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0573] - 위치 5에서 G는 S 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0574] - 위치 7에서 Q는 D, E, T, A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0575] - 위치 8에서 T는 A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0576] - 위치 9에서 D는 A, Q, N, V 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0577] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0578] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0579] 다른 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR3은

[0580] a) 서열번호 218; 또는

[0581] b) 서열번호 218의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0582] - 위치 1에서 F는 Y, L 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0583] - 위치 4에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0584] - 위치 5에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0585] - 위치 8에서 D는 N 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0586] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0587] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0588] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서

[0589] i) CDR1은

[0590] a) 서열번호 181; 또는

[0591] b) 서열번호 181의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0592] - 위치 2에서 D는 A, S, E 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0593] - 위치 4에서 H는 Y로 변경되었고/되었거나;

[0594] - 위치 5에서 K는 L로 변경되었고/되었거나;

[0595] - 위치 6에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0596] - 위치 8에서 F는 I 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0597] - 위치 10에서 G는 S로 변경된 아미노산 서열

[0598] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0599] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[0600] ii) CDR2는

[0601] c) 서열번호 192; 또는

[0602] d) 서열번호 192의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0603] - 위치 1에서 H는 T 또는 R로 변경되었고/되었거나;

[0604] - 위치 3에서 S는 T 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0605] - 위치 5에서 G는 S 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0606] - 위치 7에서 Q는 D, E, T, A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0607] - 위치 8에서 T는 A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0608] - 위치 9에서 D는 A, Q, N, V 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0609] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0610] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[0611] iii) CDR3은

[0612] e) 서열번호 218; 또는

[0613] f) 서열번호 218의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0614] - 위치 1에서 F는 Y, L 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0615] - 위치 4에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0616] - 위치 5에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0617] - 위치 8에서 D는 N 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0618] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0619] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0620] 다른 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR1은 서열번호 181-191로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR2는 서열번호 192-217로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR3은 서열번호 218-225로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0621] 따라서, 바람직한 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR1은 서열번호 181이고, CDR2는 서열번호 192이고, CDR3은 서열번호 218이다.

[0622] 일반적으로, 표 A-5에 열거된 CDR의 조합 (즉, 표 A-5의 동일한 줄에 언급된 것들)이 바람직하다. 따라서, ISV의 CDR이 표 A-5에 언급된 CDR 서열이거나 또는 표 A-5에 열거된 CDR 서열에 대해 4, 3, 2 또는 오직 1개의 아미노산 차이(들)를 갖는 CDR 서열로 이루어진 군으로부터 적합하게 선택될 때, 나머지 CDR의 적어도 하나 및 바람직하게 둘 모두는 표 A-5의 동일한 조합에 속하는 CDR 서열 (즉, 표 A-5의 동일한 줄에 언급)로부터 적합하게 선택되거나 또는 동일한 조합에 속하는 CDR 서열(들)에 대해 4, 3, 2 또는 오직 1개의 아미노산 차이(들)를 갖는 CDR 서열로 이루어진 군으로부터 적합하게 선택되는 것이 일반적으로 바람직하다.

[0623] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드 중 적어도 하나의 TCR과의 결합을 차단하고/하거나 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드 중 적어도 하나에 의해 TCR과의 결합이 차단되는 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이다.

[0624] 본 발명의 폴리펩티드는 이펙터 세포, 예컨대 T 세포의 표면 상의 TCR에 특이적으로 결합한다. "1가" 포맷에서, TCR에 결합하는 본 발명의 1가 폴리펩티드는 최소의 T 세포 활성화를 야기하거나 또는 전혀 야기하지 않는다.

[0625] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이펙터 세포"는 TCR 복합체를 포함하는 세포, 바람직하게 면역 세포, 예컨대 T 세포, 바람직하게 $CD4^+$ T-헬퍼 세포 (CD4 세포, T-헬퍼 세포 또는 T4 세포라고도 알려짐), 보다 바람직하게 세포독성 T 세포 (T_C 세포, CTL 또는 $CD8^+$ T 세포라고도 알려짐) 또는 자연 살해 T 세포 (NKT 세포)이다. 일부 측면에서, 세포는 생체 내에 존재한다. 일부 측면에서, 세포는 시험관 내에 존재한다. 본 발명의 이펙터 세포는 특히 포유동물 세포, 바람직하게 영장류 세포, 및 보다 더 바람직하게 인간 세포에 관한 것이다.

[0626] 본 명세서에서 사용되는 "T 세포 활성화"는 예컨대 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 이펙터 분자 방출, 세포독성 활성, 활성화 마커의 발현, 및 재지정된 표적 세포 용해로부터 선택되는, T 세포, 예를 들어 세포독성

T 세포의 하나 이상의 세포 반응(들)을 의미한다.

[0627] 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 T 세포 수용체(TCR)의 불변 도메인과 100 nM 내지 10 pM의 평균 K_D 값, 예컨대 90 nM 이하의 평균 K_D 값, 보다 더 바람직하게 80 nM 이하, 예컨대 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 nM 이하, 예컨대 4, 3, 2, 또는 1 nM 이하, 예컨대 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 pM 이하, 예컨대 10 pM 이하의 평균 K_D 값으로 결합된다. 바람직하게, K_D 는 Kinexa, BLI 또는 SPR에 의해 결정되고, 예를 들어 Proteon에 의해 결정된다. 예를 들어, 상기 K_D 는 실시예 부문에 기술된 바와 같이 결정된다.

[0628] 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 TCR과 100 nM 내지 1 pM의 EC50 값, 예컨대 100 nM 이하의 평균 EC50 값, 보다 더 바람직하게 90 nM 이하, 예컨대 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 nM 이하, 예컨대 4, 3, 2, 또는 1 nM 이하, 예컨대 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 pM 이하, 예컨대 4 pM 이하의 평균 EC50 값으로 결합된다. 상기 평균 EC50은 바람직하게 FACS, Biacore 또는 ELISA에 의해 결정되고, 예를 들어 상기 EC50은 실시예 부문에 기재된 바와 같이 결정된다.

[0629] K_D 는 EC50과 충분히 상호관련된다는 것이 실시예에서 확인되었다.

[0630] 추가 측면에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 단일특이적 폴리펩티드는 바람직하게 표면 플라스몬 공명으로 측정되거나 또는 실시예 부문에서 수행된 바와 같은, 적어도 약 10^2 $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^3 $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^4 $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^5 $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, 10^7 $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^8 $M^{-1}s^{-1}$, 적어도 약 10^9 $M^{-1}s^{-1}$, 및 적어도 약 10^{10} $M^{-1}s^{-1}$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 TCR에 대한 (또는 결합을 위한) 속도 상수 (k_{on})를 갖는다.

[0631] 추가 측면에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 단일특이적 폴리펩티드는 바람직하게 표면 플라스몬 공명으로 측정되거나 또는 실시예 부문에서 수행된 바와 같은, 최대로 약 $10^{-3}s^{-1}$, 최대로 약 $10^{-4}s^{-1}$, 최대로 약 $10^{-5}s^{-1}$, 최대로 약 $10^{-6}s^{-1}$, 최대로 약 $10^{-7}s^{-1}$, 최대로 약 $10^{-8}s^{-1}$, 최대로 약 $10^{-9}s^{-1}$, 및 최대로 약 $10^{-10}s^{-1}$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 TCR에 대한 (또는 결합을 위한) 오프 속도 상수 (k_{off})를 갖는다.

[0632] TCR에 결합하는 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 면역글로불린 프레임워크 서열으로부터 유래된 (예를 들어, 서열 최적화 예컨대 인간화 또는 낙타화에 의함) 프레임워크 서열 (의 적합한 조합)인 프레임워크 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 프레임워크 서열은 면역글로불린 단일 가변 도메인 예컨대 경쇄 가변 도메인 (예를 들어, V_L-서열) 및/또는 중쇄 가변 도메인 (예를 들어, V_H-서열)으로부터 유래된 프레임워크 서열일 수 있다. 특히 바람직한 일 측면에서, 프레임워크 서열은 VHH-서열 (상기 프레임워크 서열은 경우에 따라 부분적으로 또는 완전하게 인간화될 수 있음)로부터 유래된 프레임워크 서열이거나 또는 낙타화된 통상의 V_H 서열이다.

[0633] 프레임워크 서열은 단일특이적 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인이 도메인 항체 (또는 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산 서열); 단일 도메인 항체 (또는 단일 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산); "dAb" (또는 dAb로서 사용에 적합한 아미노산); 나노바디; VHH; 인간화 VHH; 낙타화 VH; 또는 친화성 성숙에 의해 얻은 VHH인 것이 바람직할 것이다. 다시, 적합한 프레임워크 서열은 예를 들어, 표준 안내서 및 본 명세서에 언급된 추가 개시 내용 및 종래 기술을 기반으로 당업자에게 분명해 질 것이다.

[0634] 특히, 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드에 존재하는 프레임워크 서열은 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드가 나노바디이도록, 하나 이상의 특징 잔기 (WO 08/020079 (표 A-3 내지 A-8)에 정의된 바와 같음)를 함유할 수 있다. 일부 바람직하지만, 비제한적인 이러한 프레임워크 서열 (의 적합한 조합의)의 예는 본 명세서의 추가 개시 내용 (예를 들어, 표 A-5 참조)으로부터 더욱 분명해질 것이다. 일반적으로, 나노바디 (특히, V_{HH}s, 부분적으로 또는 완전하게 인간화된 V_{HH}s 및 낙타화 V_Hs)는 하나 이상의 프레임어크 서열 내 하나 이상의 "*특징 잔기*"의 존재를 특징으로 할 수 있다 (예를 들어, WO 08/020079, 페이지 61, 24줄 내지 페이지 98, 3줄에 더욱 기술됨).

[0635] 보다 특히, 본 발명은 하기 (일반) 구조를 갖는 아미노산 서열인 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어진 폴리펩티드를 제공한다:

[0636] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0637] 여기서 FR1 내지 FR4는 개별적으로 프레임워크 영역 1 내지 4를 의미하고, CDR1 내지 CDR3은 각각 상보성 결정 영역 1 내지 3을 의미하고, 여기서

[0638] i) 서열번호 42 및 78-180 (표 A-5 참조)의 아미노산 서열 중 적어도 하나와 적어도 80%, 보다 바람직하게 90%, 보다 더 바람직하게 95%의 아미노산 동일성을 갖고, 아미노산 동일성의 정도를 결정하려는 목적을 위해서, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시한다. 이와 관련하여, 또한 서열번호 42 및 78-180 (표 A-5 참조)의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 프레임워크 1 서열 (서열번호 226-250), 프레임워크 2 서열 (서열번호 251-276), 프레임워크 3 서열 (서열번호 277-319) 및 프레임워크 4 서열 (서열번호 320-324)을 열거한 표 A-5를 참조하거나; 또는

[0639] ii) 바람직하게 카밧 번호매김에 따른 위치 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 및 108의 아미노산 잔기 중 하나 이상은 WO 08/020079의 표 A-3 내지 표 A-8에 언급된 특징 잔기로부터 선택된다 .

[0640] 본 발명은 또한 다수의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 제공한다.

[0641] 특히, 본 발명의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 이전 단락에서 면역글로불린 단일 가변 도메인에 대해 일반적으로 정의된 바와 같지만, 인간화 치환 (본 명세서에 정의된 바와 같음)이고/이거나 그에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 (프레임워크 잔기의 적어도 하나에) 존재하는 아미노산 서열일 수 있다. 일부 바람직하지만, 비제한적인 인간화 치환 (및 이의 적합한 조합)은 본 명세서의 개시 내용을 기반으로 당업자에게 자명하게 될 것이다. 추가로, 또는 대안적으로, 다른 잠재적으로 유용한 인간화 치환은 천연 발생 VHH 서열의 프레임워크 영역의 서열을 하나 이상의 밀접하게 관련된 인간 VH 서열의 상응하는 프레임워크 서열과 비교하여 확인할 수 있고, 그 이후에 이렇게 결정된 하나 이상의 잠재적으로 유용한 인간화 치환 (또는 이의 조합)은 상기 VHH 서열 (본 명세서에 더욱 기술된 바와 같이, 그 자체로 공지된 임의 방식으로)에 도입되고 최종 인간화 VHH 서열은 표적에 대한 친화성, 안정화, 용이함 및 발현도, 및/또는 다른 바람직한 특성에 대해 시험될 수 있다. 이러한 방식으로, 제한된 정도의 시행착오를 통해서, 다른 적합한 인간화 치환 (또는 이의 적합한 조합)은 본 명세서의 개시 내용을 기반으로 당업자가 결정할 수 있다. 또한, 전술한 내용을 기반으로, 면역글로불린 단일 가변 도메인 (의 프레임워크 영역)은 부분적으로 인간화될 수 있거나 또는 완전하게 인간화될 수 있다.

[0642] 본 발명은 도한 안정화 연구 동안 저장 시 개선된 발현 및/또는 증가된 안정성을 보일 수 있는 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인에 관한 것이다. 본 발명의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 ISV는 N-말단의 감소된 파이로글루타메이트 번역후 변형을 보일 수 있고 그리하여 증가된 생성물 안정성을 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 ISV는 다른 개선된 속성, 예컨대 예를 들어, 적은 면역원성, TCR에 대한 개선된 결합 특징 (본 명세서에 더욱 기술된 바와 같이 K_D-값 (실제 또는 겉보기), K_A-값 (실제 또는 겉보기), k_{on}-속도 및/또는 k_{off}-속도, 또는 대안적으로 EC50 값으로서 적합하게 측정 및/또는 표시), TCR에 대한 개선된 친화성 및/또는 개선된 화합력을 보일 수 있다.

[0643] 본 발명의 일부 특히 바람직한 서열 최적화된 면역글로불린 단일 가변 도메인은 서열번호 42 및 78-180의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 서열 최적화된 변이체이다.

[0644] 따라서, 본 발명의 일부 다른 바람직한 면역글로불린 단일 가변 도메인은 (본 명세서에 기술된 바와 같이) TCR에 결합할 수 있는 나노바디로서,

[0645] i) 서열번호 42 및 78-180의 면역글로불린 단일 가변 도메인 중 하나의 서열 최적화된 변이체이고/이거나;

[0646] ii) 서열번호 42 및 78-180 (표 A-5 참조)의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 적어도 하나와 적어도 80% 아미노산 동일성을 갖고, 아미노산 동일성 정도를 결정하려는 목적을 위해서, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시되고; 이와 관련하여 또한 서열번호 42 및 78-180 (표 A-5 참조)의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 프레임워크 1 서열 (서열번호 226-250), 프레임워크 2 서열 (서열번호 251-276), 프레임워크 3 서열 (서열번호 277-319) 및 프레임워크 4 서열 (서열번호 320-324)을 열거하는 표 A-5를 참조하고;

[0647] iii) 바람직하게 카밧 번호매김에 따른 위치 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 및 108의 아미노산 잔기 중 하나 이상은 WO 08/020079의 표 A-3 내지 표 A-8에 언급된 특징 잔기로부터 선택된다.

[0648] 본 발명의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 또한 하기의 공계류 중인 US 가출원에 기술된 특이적 돌연변이/아미노산 잔기를 함유할 수 있고, 그 전부는 발명의 명칭이 "개선된 면역글로불

린 가변 도메인"이다: 2014년 5월 16일에 출원된 US 61/994552; 2014년 6월 18일에 출원된 US 61/014,015; 2014년 8월 21일에 출원된 US 62/040,167; 및 2014년 9월 8일 출원된 US 62/047,560 (모두 Ablynx N.V.에 양도)을 비롯하여 이들 가출원을 기초로 하고 2015년 11월 19일에 공개된 국제 공개 특허 출원 WO 2015/173325.

[0649] 특히, 본 발명의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 적합하게 (i) 위치 112의 K 또는 Q; 또는 (ii) 위치 11의 V와 조합한 위치 110의 K 또는 Q; 또는 (iii) 위치 89의 T; 또는 (iv) 위치 110의 K 또는 Q와 위치 89의 L; 또는 (v) 위치 11의 V 및 위치 89의 L; 또는 (i) 내지 (v)의 임의의 적합한 조합을 함유할 수 있다.

[0650] 또한 상기 공계류중인 US 가출원에 기술된 바와 같이 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 상기 (i) 내지 (v) 중 하나에 따른 돌연변이 (또는 이의 적합한 조합)를 함유한다:

[0651] - 위치 11의 아미노산 잔기는 바람직하게 L, V 또는 K로부터 선택되고 (가장 바람직하게는 V임);

[0652] - 위치 14의 아미노산 잔기는 바람직하게 A 또는 P로부터 적합하게 선택되고;

[0653] - 위치 41의 아미노산 잔기는 바람직하게 A 또는 P로부터 적합하게 선택되고;

[0654] - 위치 89의 아미노산 잔기는 바람직하게 T, V 또는 L로부터 적합하게 선택되고;

[0655] - 위치 108의 아미노산 잔기는 바람직하게 Q 또는 L로부터 적합하게 선택되고;

[0656] - 위치 110의 아미노산 잔기는 바람직하게 T, K 또는 Q로부터 적합하게 선택되고;

[0657] - 위치 112의 아미노산 잔기는 바람직하게 S, K 또는 Q로부터 적합하게 선택된다.

[0658] 상기 공계류중인 US 가출원에 언급된 바와 같이 상기 돌연변이는 본 발명의 폴리펩티드, 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 구성체에 대한 소위 "사전-존재하는 항체"의 결합을 방지하거나 또는 감소시키는데 유효하다. 이러한 목적을 위해서, 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인는 또한 C-말단 연장부 (X)n (여기서 n은 1 내지 10, 바람직하게 1 내지 5, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5 (및 바람직하게 1 또는 2, 예컨대 1)이고; 각각의 X는 독립적으로 선택되고, 바람직하게 알라닌 (A), 글리신 (G), 발린 (V), 류신 (L) 또는 이소류신 (I)으로부터 독립적으로 선택되는 (바람직하게 천연 발생) 아미노산 잔기임) (경우에 따라 상기 돌연변이와 조합)를 함유할 수 있고, 역시 상기 US 가출원들을 비롯하여 WO 12/175741을 참조한다. 특히, 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 단백질, 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 다른 구성체의 C-말단부를 형성할 때 이러한 C-말단 연장부를 함유할 수 있다 (역시, 본 명세서에 기술된 바와 같이, 상기 US 가출원들을 비롯하여 WO 12/175741 참조).

[0659] 따라서, 본 발명은 C-말단 연장부 (X)n를 더 포함하는 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 n은 1 내지 5, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5이고, X는 천연 발생 아미노산이고, 바람직하게는 시스테인이 아니다.

[0660] 본 발명의 이들 폴리펩티드, 및 특히 본 발명의 CDR 서열을 포함하는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 다중특이적 폴리펩티드, 예컨대 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드의 제조를 위한 빌딩 블록 또는 결합 유닛으로서 사용하는데 특히 적합하다.

[0661] 따라서, TCR에 결합하는 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 (본 명세서에 정의된 바와 같이) 실질적으로 단리된 형태일 수 있거나, 또는 그들은 TCR에 결합하는 하나의 ISV를 포함할 수 있거나 또는 그로 실질적으로 이루어질 수 있고, 경우에 따라 하나 이상의 추가 아미노산 서열을 더 포함할 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드의 일부를 형성할 수 있다 (모두 경우에 따라 하나 이상의 적합한 링커를 통해 연결됨).

[0662] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 하나의 단일특이적 폴리펩티드 (또는 이의 적합한 단편)를 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어진 단백질 또는 폴리펩티드에 관한 것이다. 추가 측면에서, TCR에 결합하는 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 TCR에 결합하는 하나의 ISV를 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어지고, 경우에 따라 다른 표적, 예컨대 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 추가 ISV를 더 포함하고, 경우에 따라 하나 이상의 추가 아미노산 서열을 더 포함할 수 있는, 다중특이적 폴리펩티드의 일부를 형성할 수 있다 (모두 경우에 따라 하나 이상의 적합한 링커를 통해서 연결됨).

[0663] 따라서 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 본 명세서에 기술된 바와 같이, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드를 제공하기 위해서, 이러한 단백질 또는 폴리펩티드에서 결합 유닛 또는 빌딩 블록으로서 사용된다 (하나 이상의

VHH 도메인을 함유하는 다중특이적 폴리펩티드 및 그들의 제조를 위해 또한, 문헌 [Conrath et al. (2001, J. Biol. Chem. 276: 7346-7350)]을 비롯하여, 예를 들어 WO 96/34103, WO 99/23221 및 WO 2010/115998을 참조함). 따라서 본 발명은 또한 TCR에 결합하는 하나의 1가 폴리펩티드를 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어진 1가 구성체인 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0664] *1.2 CD123 결합 폴리펩티드*

[0665] 본 발명은 CD123, 바람직하게 인간 및/또는 사이노 CD123에 특이적으로 결합하는 단일특이적 폴리펩티드에 관한 것이다. 바람직한 측면에서, 단일특이적 폴리펩티드는 "본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인(들)" 또는 "본 발명의 ISV(들)"라고도 하는 면역글로불린 단일 가변 도메인이다.

[0666] CD123은 인터루킨 3 용체의 α 서브유닛 (IL-3Rα)이라고도 알려져 있다. 인간 CD123 및 사이노 CD123의 서열은 표 A-8 (서열번호 68-69; 인간 CD123: NCBI RefSeq NP_002174 및 사이노 CD123: NCBI genbank no. EHH61867.1 참조)에 제공된다.

[0667] 일 측면에서, 본 발명은 인간 CD123 (서열번호 68)에 결합하는 본 명세서에 기술된 바와 같은 단일특이적 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0668] CD123에 결합하는 단일특이적 폴리펩티드는 CD123에 대한 그들 특이성에 대해 신중하게 선택되었다. 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 다중특이적 포맷으로 포맷팅시 CD123에 대해 고도의 특이적 결합을 나타낸다 (즉, TCR에 결합하는 하나의 ISV 및 CD123에 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함하는 포맷). 이와 같이, 본 명세서에 더욱 예시된 바와 같이 표적외 결합을 피하고 표적-독립적 T 세포 활성화가 최소화된다.

[0669] 본 발명자는 CD123에 대한 고도의 특이적 결합을 나타내는, 나노바디의 2개 클러스터 (실시예 12)를 동정하였다. 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드로 대표적인 클러스터의 포맷팅 시 (본 명세서에 더욱 긱술된 바와 같음), 오직 최소의 표적-독립적 T 세포 활성화가 관찰되어 클러스터 대표의 높은 특이성을 의미한다. 상응하는 정렬을 제공한다 (예를 들어, Nanobody 56A10 (의 패밀리)과 관련된 나노바디 (즉, Nanobody 56A10과 동일한 패밀리에 속하는 나노바디)의 경우에 표 A-2 및 Nanobody 55F03 (의 패밀리 구성원)과 관련된 나노바디의 경우 표 A-3 (즉, Nanobody 55F03과 동일한 패밀리에 속하는 나노바디)).

[0670] 본 명세서에서 사용되는 "나노바디 패밀리", "V_{HH} 패밀리" 또는 "패밀리"는 동일한 길이 (즉, 그들 서열 내에 동일한 개수의 아미노산을 가짐)를 갖고 위치 8 내지 위치 106 (카밧 번호매김에 따름)의 아미노산 서열은 89% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 V_{HH} 서열 및/또는 나노바디의 그룹을 의미한다.

[0671] 따라서, 본 발명은 서열번호 1-10 (표 A-4 참조)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이다. 추가 측면에서, 폴리펩티드는 서열번호 1-10으로 이루어진 군으로부터 또는 서열번호 1-10 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택된다.

[0672] 따라서, 본 발명은 CD123에 특이적으로 결합하고 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어지는 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서

[0673] i) CDR1은

[0674] a) 서열번호 11-16; 또는

[0675] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0676] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0677] ii) CDR2는

[0678] c) 서열번호 17-20; 또는

[0679] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의

아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0680] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0681] iii) CDR3은

[0682] e) 서열번호 21-25; 또는

[0683] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0684] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0685] 추가 측면에서, 본 발명은 CD123에 특이적으로 결합하고, 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어진 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서

[0686] i) CDR1은

[0687] a) 서열번호 11-16; 또는

[0688] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0689] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0690] ii) CDR2는

[0691] c) 서열번호 17-20; 또는

[0692] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0693] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0694] iii) CDR3은

[0695] e) 서열번호 21-25; 또는

[0696] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0697] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0698] 추가 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어지고, 여기서

[0699] i) CDR1은

[0700] a) 서열번호 11-16; 또는

[0701] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 3, 6, 7 및/또는 8(카밧 번호매김에 따른 위치 28, 31, 32 및/또는 33)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여

대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0702] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0703] ii) CDR2는

[0704] c) 서열번호 17-20; 또는

[0705] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 3, 6 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 52, 54 및/또는 58)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0706] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0707] iii) CDR3은

[0708] e) 서열번호 21-25; 또는

[0709] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 3, 4 및/또는 5(카밧 번호매김에 따른 위치 97, 98 및/또는 99)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0710] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0711] 추가 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)을 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어지고, 여기서

[0712] i) CDR1은

[0713] a) 서열번호 11-16; 또는

[0714] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 3, 6, 7 및/또는 8(카밧 번호매김에 따른 위치 28, 31, 32 및/또는 33)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0715] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0716] ii) CDR2는

[0717] c) 서열번호 17-20; 또는

[0718] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 3, 6 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 52, 54 및/또는 58)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0719] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0720] iii) CDR3은

[0721] e) 서열번호 21-25; 또는

[0722] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 3, 4 및/또는 5(카밧 번호매김에 따른 위치 97, 98 및

/또는 99)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0723] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0724] 일 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 서열번호 1-6 (표 A-4 참조) 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 가질 수 있다. 이들 폴리펩티드는 본 명세서에서 "56A10과 관련된 폴리펩티드(들)" 또는 "56A10과 관련된 ISV(들)"라고 한다.

[0725] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR1은

[0726] a) 서열번호 11; 또는

[0727] b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0728] - 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

[0729] - 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

[0730] - 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

[0731] - 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

[0732] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0733] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0734] 추가 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR2는 서열번호 17이다.

[0735] 추가 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR3은

[0736] a) 서열번호 21; 또는

[0737] b) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0738] - 위치 3에서 P는 A로 변경된 아미노산 서열

[0739] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0740] 단, 1개의 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 1개의 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0741] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서

[0742] i) CDR1은

[0743] a) 서열번호 11; 또는

[0744] b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0745] - 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

[0746] - 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

[0747] - 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

[0748] - 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

[0749] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0750] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[0751] ii) CDR2는 서열번호 17이고;

[0752] iii) CDR3은

[0753] c) 서열번호 21; 또는

[0754] d) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0755] - 위치 3에서 P는 A로 변경된 아미노산 서열

[0756] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0757] 단, 1개의 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 1개의 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0758] 다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은, 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것으로서, CDR1은 서열번호 11-15로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21-22로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0759] 따라서, 바람직한 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은, 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것으로서, CDR1은 서열번호 11이고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21이다.

[0760] 따라서, 본 발명은 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 ISV인 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0761] 56A10과 관련된 폴리펩티드 또는 ISV는 CD123에 대한 그들의 정확한 특이성에 대해 선택되었다. 본 발명의 폴리펩티드의 결합은 제한없이 유세포측정 어세이를 포함하는 적합한 결합 어세이에서 측정될 수 있다. 이러한 유세포측정 어세이에서, 세포는 CD123을 내생적으로 발현하는 것 (예컨대 예를 들어 MOLM-13 또는 KG1a 세포)이 사용될 수 있다. 대안적으로, 세포는 CD123을 과발현시키도록 형질감염된 것 (예컨대 예를 들어, CHO-K1 huCD123 또는 HEK293 사이노 CD123)이 사용될 수 있다. 적합한 세포주는 본 명세서의 실시예로부터 명확해 질 것이다.

[0762] 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 10 nM 내지 100 pM의 평균 EC50 값으로 CD123 발현 세포 또는 세포 상에 발현된 CD123에 결합할 수 있다.

[0763] 보다 특히, 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 바람직하게 유세포측정으로 측정되는, 10 nM 내지 100 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 3, 2, 또는 1 nM 이하의 평균 EC50 값으로 MOLM-13 세포 상에 발현된 인간 CD123에 결합된다.

[0764] 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 바람직하게 유세포측정으로 측정되는, 10 nM 내지 100 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 3, 2, 또는 1 nM 이하의 평균 EC50 값으로 CHO-K1 세포 상에 발현된 인간 CD123에 결합된다.

[0765] 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 바람직하게 유세포측정으로 측정되는, 10 nM 내지 100 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 또는 3 nM 이하의 평균 EC50 값으로 HEK293 세포 상에 발현된 사이노 CD123에 결합된다.

[0766] 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV의 결합은 또한 SPR로 측정될 수 있다.

[0767] 이와 같이, 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 10 nM 내지 100 pM의 평균 K_D 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 3 또는 2 nM 이하의 평균 K_D 값으로 인간 CD123에 결합될 수 있고, 상기 K_D 값은 바람직하게 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0768] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드 또는 ISV에 관한 것이고, 상기 평균 K_D 또는 EC50은 유세포측정 또는 SPR에 의해 결정되고, 예를 들어 상기 K_D 또는 EC50은 실시예 부문에 기재된 바와 같이 결정된다.

[0769] SPR로 측정된 K_D 는 유세포측정으로 측정된 EC50과 충분히 상호관련된다는 것을 실시예에서 확인하였다.

[0770] 다른 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 서열번호 7-10 (표 A-4 참조) 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 가질 수 있다. 이들 폴리펩티드는 본 명세서에서 "55F03과 관

련된 폴리펩티드(들)" 또는 "55F03과 관련된 ISV(들)"라고 한다.

[0771] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR1은 서열번호 16이다.

[0772] 추가 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR2는

[0773] a) 서열번호 18; 또는

[0774] b) 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0775] - 위치 3에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0776] - 위치 6에서 N은 S로 변경되었고/되었거나;

[0777] - 위치 10에서 Q는 E로 변경된 아미노산 서열

[0778] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0779] 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0780] 추가 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서 CDR3은

[0781] a) 서열번호 23; 또는

[0782] b) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 2개 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0783] - 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

[0784] - 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

[0785] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0786] 단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0787] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, 여기서

[0788] i) CDR1은 서열번호 16이고;

[0789] ii) CDR2는

[0790] a) 서열번호 18; 또는

[0791] b) 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0792] - 위치 3에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0793] - 위치 6에서 N은 S로 변경되었고/되었거나;

[0794] - 위치 10에서 Q는 E로 변경된 아미노산 서열

[0795] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0796] 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[0797] iii) CDR3은

[0798] c) 서열번호 23; 또는

[0799] d) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0800] - 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

[0801] - 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

[0802] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0803] 단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0804] 다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것으로서, CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18-20으로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR3은 서열번호 23-25로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0805] 따라서, 바람직한 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이고, CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18이고, CDR3은 서열번호 23이다.

[0806] 바람직한 폴리펩티드 및/또는 ISV는 서열번호 7-10으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0807] 55F03과 관련된 폴리펩티드 또는 ISV는 CD123에 대한 그들의 정확한 특이성에 대해 선택되었다. 본 발명의 폴리펩티드의 결합은 제한없이, 본 명세서에 기술된 바와 같은 유세포측정 어세이 및 SPR을 포함하는, 적합한 결합 어세이로 측정될 수 있다.

[0808] 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 10 μM 내지 100 nM의 평균 EC50 값으로 CD123 발현 세포 또는 세포 상에 발현된 CD123에 결합할 수 있다.

[0809] 보다 특히, 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 바람직하게 유세포측정으로 측정된, 10 μM 내지 100 nM의 평균 EC50 값, 예컨대 5 μM 이하, 예컨대 4, 3, 2, 또는 1 μM 이하의 평균 EC50 값으로 MOLM-13 세포 상에 발현된 인간 CD123에 결합한다.

[0810] 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 바람직하게 유세포측정으로 측정되된, 100 nM 내지 1 nM의 평균 EC50 값, 예컨대 50 nM 이하, 예컨대 40, 30, 20, 또는 10 nM 이하, 예컨대 9, 8 또는 7nM 이하의 평균 EC50 값으로 CHO-K1 세포 상에 발현된 인간 CD123에 결합한다.

[0811] 본 발명의 폴리펩티드, 바람직하게 ISV는 바람직하게 유세포측정으로 측정된, 10 nM 내지 100 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 또는 3 nM 이하의 평균 EC50 값으로 HEK293 세포 상에 발현되니 사이노 CD123에 결합된다.

[0812] 추가 측면에서, 본 발명은 1 μM 내지 10 nM의 평균 K_D 값, 예컨대 500 nM 이하, 예컨대 400, 300 또는 200 nM 이하의 평균 K_D 값으로 CD123에 결합하는 폴리펩티드 ISV에 관한 것이고, 상기 K_D 값은 바람직하게 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0813] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드 또는 ISV에 관한 것이고, 여기서 상기 평균 K_D 또는 EC50은 유세포측정 또는 SPR에 의해 결정되고, 예를 들어 상기 K_D 또는 EC50은 실시예 부문에 기재된 바와 같이 결정된다.

[0814] SPR로 측정되는 K_D 는 MOLM-13 세포를 사용한 유세포측정 기반 어세이에서 결정된 EC50과 충분히 상호관련된다는 것을 실시예에서 확인하였다.

[0815] 일반적으로, 표 A-4에 열거된 CDR의 조합 (즉, 표 A-4의 동일한 줄에 언급된 것들)이 바람직하다. 따라서, ISV의 CDR은 표 A-4에 언급된 CDR 서열이거나 또는 표 A-4에 열거된 CDR 서열에 대해 4, 3, 2 또는 오직 1개의 아미노산 차이(들)를 갖는 CDR 서열로 이루어진 군으로부터 적합하게 선택될 때, CDR 중 적어도 하나 및 바람직하게 둘 모두는 표 A-4의 동일한 조합 (즉, 표 A-4의 동일한 줄 상에 언급됨)에 속하는 CDR 서열로부터 적합하게 선택되거나 또는 동일한 조합에 속하는 CDR 서열(들)에 대해 4, 3, 2 또는 오직 1개의 아미노산 차이(들)를 갖는 CDR 서열로 이루어진 군으로부터 적합하게 선택되는 것이 일반적으로 바람직하다. 상기 기술된 CDR을 갖는 본 발명의 대표적인 폴리펩티드는 표 A-4에 표시되어 있다.

[0816] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드의 적어도 하나의 CD123과의 결합을 교차-차단하고/하거나 서열번호 1-10으로부터 선택되고/되거나 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드 중 적어도 하나에 의해 CD123과의 결합이 교차-차단되고/되거나 서열번호 1-10으로부터 선택되는 CD123에 특이적으로 결합하는 폴리펩

티드, 바람직하게 ISV에 관한 것이다.

[0817] 본 발명은 또한 CD123에 결합하는 둘 이상의 ISV를 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어지는 단일특이적 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 명세서에서 "본 발명의 다가 폴리펩티드(들)"라고도 하는, 이러한 다가 (단일특이적) 폴리펩티드에서, CD123에 결합하는 둘 이상의 ISV는 본 명세서에서 더욱 기술하는 바와 같이, 경우에 따라 하나 이상의 펩티드 링커를 통해서 연결될 수 있다.

[0818] 따라서, 본 발명은 CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV를 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이고, ISV는 56A10과 관련된 ISV의 군으로부터 또는 55F03과 관련된 ISV의 군으로부터 선택된다.

[0819] 보다 특정한 측면에서, 본 발명은 CD123에 특이적으로 결합하는 2종의 ISV를 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 ISV는 56A10과 관련된 ISV의 군으로부터 또는 55F03과 관련된 ISV의 군으로부터 선택된다.

[0820] 본 발명의 이러한 다가 단일특이적 폴리펩티드에서, 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 동일할 수 있거나 또는 상이할 수 있고, CD123의 동일한 항원성 결정부 (예를 들어 CD123의 동일한 부분(들) 또는 에피토프(들))에 대해 유도될 수 있거나 또는 대안적으로 CD123의 상이한 항원성 결정부 또는 CD123의 상이한 부분 또는 에피토프; 또는 이의 임의의 적합한 조합에 대해 유도될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 2가 폴리펩티드는 (a) 2종의 동일한 면역글로불린 단일 가변 도메인; (b) CD123의 제1 항원성 결정부에 대해 유도된 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인과 상이한 CD1223의 동일한 항원성 결정부에 대해 유도된 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인; 또는 (c) CD123의 제1 항원성 결정부에 대해 유도된 제1 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 CD123의 다른 항원성 결정부에 대해 유도된 제2 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함할 수 있다.

[0821] 본 발명의 3가 폴리펩티드는 (a) 동일한 면역글로불린 단일 가변 도메인; (b) CD123의 동일한 항원성 결정부에 대해 유도된 상이한 면역글로불린 단일 가변 도메인; 또는 (c) CD123의 다른 항원성 결정부에 대해 유도된 상이한 면역글로불린 단일 가변 도메인을 더 포함하는, 상기 중 어느 하나일 수 있다.

[0822] 이와 같이, 일 측면에서, 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 다중파라토프 폴리펩티드, 예컨대 예를 들어 이중 파라토프 폴리펩티드일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "이중 파라토프" (항원-) 결합 분자 또는 "이중 파라토프" 폴리펩티드는 적어도 둘 (즉, 둘 이상)의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 의미하고, 여기서 "제1" 면역글로불린 단일 가변 도메인은 CD12에 대해 유도되고 "제2" 면역글로불린 단일 가변 도메인은 CD123에 대해 유도되고, 이들 "제1" 및 "제2" 면역글로불린 단일 가변 도메인은 상이한 파라토프를 갖는다. 따라서, 이중 파라토프 폴리펩티드는 CD123에 대해 유도된 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하거나 또는 그로 이루어지고, 적어도 하나의 제1" 면역글로불린 단일 가변 도메인은 CD123 상의 제1 에피토프에 대해 유도되고 적어도 하나의 "제2" 면역글로불린 단일 가변 도메인은 CD123 상의 제1 에피토프와 상이한 CD123 상의 제2 에피토프에 대해 유도된다.

[0823] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드에 관한 것이고, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV는 제1 ISV 및 제2 ISV를 포함하는 이중 파라토프이고, 여기서 제1 ISV는 제2 ISV에 의해 결합되는 CD123 상의 에피토프와 상이한 CD123 상의 에피토프에 결합한다. 이러한 폴리펩티드(들)는 또한 본 명세서에서 "본 발명의 이중 파라토프 폴리펩티드(들)"라고 한다.

[0824] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 (이중 파라토프) 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 제1 ISV는 56A10과 관련된 ISV의 군으로부터 선택되고 제2 ISV는 55F03과 관련된 ISV의 군으로부터 선택된다.

[0825] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 제2 ISV는 제1 ISV의 N-말단에 위치된다. 이러한 폴리펩티드는 56A10과 관련된 ISV의 N-말단에 55F03과 관련된 ISV를 포함한다.

[0826] 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 제2 ISV는 제1 ISV의 C-말단에 위치된다. 이러한 폴리펩티드는 56A10와 관련된 ISV의 C-말단에 55F03과 관련된 ISV를 포함한다.

[0827] 본 발명의 이중 파라토프 폴리펩티드는 "화합력"이라고도 하는 화합성 결합으로 인해, 상응하는 1가 폴리펩티드와 비교하여 CD123과의 결합에 대해 개선된 친화성을 가질 수 있다.

[0828] 화합력은 폴리펩티드의 친화성이고, 즉 리간드는 다중 상호작용이 "겉보기" 친화성을 증강시키도록 상승작용하는 둘 (또는 그 이상)의 약물특이작용단 (ISV)를 통해 결합할 수 있다. 화합력은 본 발명의 폴리펩티드 및 관련 항원 또는 항원성 결정부 간 결합 강도의 척도이다. 본 발명의 폴리펩티드는 이의 둘 (또는 그 이상)의 빌딩블록, 예컨대 ISV를 통해서 적어도 둘의 표적 또는 항원성 결정부에 결합할 수 있고, 여기서 다중 상호작용, 예를

들어 제1 표적 또는 제1 항원성 결정부에 대한 제1 빌딩 블록 또는 ISV 결합 및 제2 표적 또는 제2 항원성 결정부에 대한 제1 빌딩 블록 또는 ISV 결합이 상승작용하여 "겉보기" 친화성을 증강시킨다. 화합력은 항원성 결합부 및 항원-결합 부분 상의 이의 항원 결합 부분 및 항원-결합 분자 상에 존재하는 관련 결합 부위의 개수 간 친화성 둘 모두와 관련된다. 예를 들어, 제한없이, 세포 상의 상이한 표적 또는 상이한 항원성 결정부에 대해 유도된 둘 이상의 빌딩 블록, 예컨대 ISV를 함유하는 폴리펩티드는 각각의 개별 단량체 또는 개별 빌딩 블록, 예컨대, 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드에 포함되는 1가 ISV보다 더 높은 화합력으로 결합할 수 있다 (그리고 일반적으로 그러할 것이다).

[0829] 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어진다. 이들 IVS이 프레임워크 서열은 바람직하게 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 (예를 들어 서열 최적화 예컨대 인간화 또는 낙타화에 의해) 면역글로불린 프레임워크 서열로부터 유래된 프레임워크 서열 (의 적합한 조합)이다. 예를 들어, 프레임워크 서열은 면역글로불린 단일 가변 도메인 예컨대 경쇄 가변 도메인 (예를 들어, V_L-서열) 및/또는 중쇄 가변 도메인 (예를 들어, V_H-서열)으로부터 유래된 프레임워크 서열일 수 있다. 특히 바람직한 일 측면에서, 프레임워크 서열은 VHH-서열로부터 유래된 프레임워크 서열 (상기 프레임워크 서열은 경우에 따라 부분적으로 또는 완전하게 인간화됨) 또는 낙타화된 통상의 V_H 서열이다.

[0830] 프레임워크 서열은 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드에 포괄되는 ISV는 도메인 항체 (또는 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산 서열); 단일 도메인 항체 (또는 단일 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산); "dAb" (또는 dAb로서 사용에 적합한 아미노산); 나노바디; VHH; 인간화 VHH; 낙타화 VH; 또는 친화성 성숙에 의해 얻은 VHH가 되는 것이 바람직할 수 있다. 다시, 적합한 프레임워크 서열은 예를 들어 본 명세서에 언급된 종래 기술 및 추가 개시 내용 및 표준 안내서를 기초로 당업자에게 분명해 질 것이다.

[0831] 특히, 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드에 존재하는 프레임워크 서열은 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 나노바디이도록 하나 이상의 특징 잔기 (WO 08/020079 (표 A-3 내지 A-8)에 정의된 바와 같음)를 함유할 수 있다. 이러한 프레임워크 서열 (의 적합한 조합)의 일부 바람직하지만, 비제한적인 예는 본 명세서의 추가 개시 내용으로부터 분명해 질 것이다 (예를 들어, 표 A-4 참조). 일반적으로, 나노바디 (특히, V_{HH}s, 부분적으로 또는 완전하게 인간화된 V_{HH}s 및 낙타화된 V_Hs)는 하나 이상의 프레임워크 서열 내에 하나 이상의 "*특징 잔기*"의 존재를 특징으로 할 수 있다 (예를 들어, WO 08/020079, 페이지 61, 24줄 내지 페이지 98, 3줄에 더욱 기술됨).

[0832] 보다 특히, 본 발명은 다음의 (일반) 구조를 갖는 아미노산 서열인 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다:

[0833] FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4

[0834] 여기서 FR1 내지 FR4는 개별적으로 프레임워크 영역 1 내지 4를 의미하고, CDR1 내지 CDR3은 개별적으로 상보성 결정 영역 1 내지 3을 의미하고, 여기서

[0835] i) 서열번호 1-10 (표 A-4 참조)의 아미노산 서열 중 적어도 하나와 적어도 80%, 보다 바람직하게 90%, 보다 더 바람직하게 95%의 아미노산 동일성을 갖고, 아미노산 동일성 정도를 결정하려는 목적을 위해서, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시한다. 이와 관련하여, 또한 서열번호 1-10 (표 A-4 참조)의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 프레임워크 1 서열 (서열번호 26-29), 프레임워크 2 서열 (서열번호 30-33), 프레임워크 3 서열 (서열번호 34-39) 및 프레임워크 4 서열 (서열번호 40-41)을 열거하는 표 A-4를 참조하거나; 또는

[0836] ii) 바람직하게 카밧 번호매김에 따른 위치 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 및 108의 아미노산 잔기 중 하나 이상이 WO 08/020079의 표 A-3 내지 표 A-8에 언급된 특징 잔기로부터 선택된다.

[0837] 본 발명은 또한 다수의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 제공한다.

[0838] 특히, 본 발명의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 이전 단락에서 면역글로불린 단일 가변 도메인에 대해 일반적으로 정의된 바와 같지만, 인간화 치환 (본 명세서에 정의된 바와 같음)이고/이거나 그에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 (특히, 프레임워크 잔기 중 적어도 하나에) 존재하는, 아미노산 서열일 수 있다. 일부 바람직하지만, 비제한적인 인간화 치환 (및 이의 적합한 조합)은 본 명세서의 개시 내용을 기반으로 당업자에게 분명할 것이다. 추가로, 또는 대안적으로, 다른 잠재적으로 유용한 인간화 치환은 천연 발생 VHH 서열의 프레임워크 영역의 서열을 하나 이상의 밀접하게 관련된 인간 VH 서열의 상응하는 프레임워크 서열과 비교하여 확인할 수 있고, 그 이후에 이렇게 결정된 하나 이상의 잠재적으로 유용한 인간화 치환 (또는 이의 조합)은 상기 VHH 서열 (본 명세서에 더욱 기술된 바와 같이, 그 자체로 공지된 임의

방식으로)에 도입될 수 있고 최종 인간화 VHH 서열은 표적에 대한 친화성, 안정화, 용이함 및 발현도, 및/또는 다른 바람직한 속성에 대해 시험될 수 있다. 이러한 방식으로, 제한된 정도의 시행 착오에 의해, 다른 적합한 인간화 치환 (또는 이의 적합한 조합)은 본 명세서의 개시 내용을 기초로 당업자가 결정할 수 있다. 또한, 전술한 것을 기반으로, 면역글로불린 단일 가변 도메인 (의 프레임워크 영역)은 부분적으로 인간화될 수 있거나 또는 완전하게 인간화될 수 있다.

[0839] 본 발명은 또한 안정화 실험 동안 저장 시 개선된 발현 및/또는 증가된 안정성을 보일 수 있는 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인에 관한 것이다. 본 발명의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 ISV는 감소된 N-말단의 파이로글루타메이트 번역후 변형을 보일 수 있고 그리하여 증가된 생성물 안정성을 갖는다. 또한, 본 발명의 서열 최적화된 폴리펩티드 및/또는 ISV는 다른 개선된 속성 예컨대 예를 들어 적은 면역원성, CD123에 대한 개선된 결합 특징 (본 명세서에서 더욱 기술된 바와 같이, K_D-값 (실제 또는 겉보기), K_A-값 (실제 또는 겉보기), k_{on}-속도 및/또는 k_{off}-속도, 또는 대안적으로 EC50 값으로 적합하게 측정 및/또는 표시됨), CD123에 대한 개선된 친화성 및/또는 개선된 화합력을 보일 수 있다.

[0840] 본 발명의 일부 특히 바람직한 서열 최적화된 면역글로불린 단일 가변 도메인은 서열번호 1-10의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 서열 최적화된 변이체이다.

[0841] 따라서, 본 발명의 일부 다른 바람직한 면역글로불린 단일 가변 도메인은 (본 명세서에 정의된 바와 같이) CD123에 결합할 수 있고,

[0842] i) 서열번호 1-10의 면역글로불린 단일 가변 도메인 중 하나이 서열 최적화된 변이체이고/이거나;

[0843] ii) 서열번호 1-10 (표 A-4 참조)의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 적어도 하나와 적어도 80% 아미노산 동일성을 갖고, 여기서 아미노산 동일성의 정도를 결정하려는 목적을 위해서, CDR 서열을 형성하는 아미노산 잔기는 무시되고; 이와 관련하여 또한 서열번호 1-10 (표 A-4 참조)의 면역글로불린 단일 가변 도메인의 프레임워크 1 서열 (서열번호 26-29), 프레임워크 2 서열 (서열번호 30-33), 프레임워크 3 서열 (서열번호 34-39) 및 프레임워크 4 서열 (서열번호 40-41)이 열거된 표 A-4를 참조하고;

[0844] iii) 바람직하게 카밧 번호매김에 따른 위치 11, 37, 44, 45, 47, 83, 84, 103, 104 및 108의 아미산 잔기 중 하나 이상은 WO 08/020079의 표 A-3 내지 표 A-8에 언급된 특징 잔기로부터 선택되는 것인 나노바디이다.

[0845] 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 하기의 공계류중인, 발명의 명칭이 모두 "개선된 면역글로불린 가변 도메인"인 US 가출원에 기술된 특별한 돌연변이/아미노산 잔기를 함유할 수 있다: 2014년 5월 16일 출원된 US 61/994552; 2014년 6월 18일 출원된 US 61/014,015; 2014년 8월 21일 출원된 US 62/040,167; 및 2014년 9월 8일 출원된 US 62/047,560 (모두 Ablynx N.V.에 양도)을 비롯하여, 이들 가출원을 기초로 하고 2015년 11월 19일 공개된 국제 공개 특허 출원 WO 2015/173325.

[0846] 특히, 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 (i) 위치 112에 K 또는 Q; 또는 (ii) 위치 11의 V와 조합하여 위치 110에 K 또는 Q; 또는 (iii) 위치 89에 T; 또는 (iv) 위치 89에 L과 위치 110에 K 또는 Q; 또는 (v) 위치 11에 V 및 위치 89에 L; 또는 (i) 내지 (v)의 임의의 적합한 조합을 적합하게 함유할 수 있다.

[0847] 상기 공계류중인 US 가출원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인이 상기 (i) 내지 (v) 중 하나 (또는 이의 적합한 조합)에 따른 돌연변이를 함유할 때,

[0848] - 위치 11의 아미노산 잔기는 바람직하게 L, V 또는 K로부터 선택되고 (가장 바람직하게 V임);

[0849] - 위치 14의 아미노산 잔기는 바람직하게 A 또는 P로부터 적합하게 선택되고;

[0850] - 위치 41의 아미노산 잔기는 바람직하게 A 또는 P로부터 적합하게 선택되고;

[0851] - 위치 89의 아미노산 잔기는 바람직하게 T, V 또는 L로부터 적합하게 선택되고;

[0852] - 위치 108의 아미노산 잔기는 바람직하게 Q 또는 L로부터 적합하게 선택되고;

[0853] - 위치 110의 아미노산 잔기는 바람직하게 T, K 또는 Q로부터 적합하게 선택되고;

[0854] - 위치 112의 아미노산 잔기는 바람직하게 S, K 또는 Q로부터 적합하게 선택된다.

[0855] 상기 공계류 중인 US 가출원에 언급된 바와 같이, 상기 돌연변이는 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린

단일 가변 도메인, 및/또는 구성체에 대한 소위 "사전-존재하는 항체"의 결합을 방지하거나 또는 감소시키는데 유효하다. 이러한 목적을 위해서, 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 또한 (경우에 따라 상기 돌연변이와 조합하여) C-말단 연장부 (X)n (여기서 n은1 내지 10, 바람직하게 1 내지 5, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5 (및 바람직하게 1 또는 2, 예컨대 1)이고; 각각의 X는 독립적으로 선택되고, 바람직하게 알라닌 (A), 글리신 (G), 발린 (V), 류신 (L) 또는 이소류신 (I)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 (바람직하게 천연 발생) 아미노산 잔기임)를 함유할 수 있고, 역시 상기 US 가출원을 비롯하여 WO 12/175741을 참조한다. 특히, 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 이것이 단백질, 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 다른 구성체의 C-말단부를 형성할 때 이러한 C-말단 연장부를 함유할 수 있다 (역시, 상기 US 가출원을 비롯하여 WO 12/175741에 더욱 기술된 바와 같음).

[0856] 따라서, 본 발명은 C-말단 연장부 (X)n을 더 포함하는 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 n은 1 내지 5, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5이고, X는 천연 발생 아미노산이고, 바람직하게 시스테인이 아니다.

[0857] 본 발명의 폴리펩티드, 및 특히 본 발명의 CDR 서열을 포함하는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 다가 또는 다중특이적 폴리펩티드의 제조를 위한 빌딩 블록 또는 결합 유닛으로서 사용에 특히 적합하다.

[0858] 따라서, CD123에 결합하는 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 실질적으로 단리된 형태 (본 명세서에 정의된 바와 같음)일 수 있거나, 또는 그들은 CD123에 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함할 수 있거나 또는 그로 실질적으로 이루어질 수 있고 경우에 따라 하나 이상의 추가 아미노산 서열을 더 포 함할 수 있는, 단백질 또는 폴리펩티드의 일부를 형성할 수 있다 (모두 경우에 따라 하나 이상의 적합한 링커를 통해 연결됨).

[0859] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 하나 이상의 단일특이적 폴리펩티드 (또는 이의 적합한 단편)를 포함하거나 또는 그로 실질적으로 이루어지는 단백질 또는 폴리펩티드에 관한 것이다. 추가 측면에서, CD123에 결합하는 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 CD123에 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함할 수 있거나 또는 그로 실질적으로 이루어질 수 있고 경우에 따라 다른 표적, 예컨대 예를 들어 TCR에 특이적으로 결합하는 하나의 ISV를 더 포함할 수 있고, 경우에 따라 하나 이상의 추가의 아미노산 서열을 더 포함할 수 있는, 다중특이적 폴리펩티드의 일부분을 형성할 수 있다 (모두 경우에 따라 하나 이상의 적합한 링커를 통해 연결됨).

[0860] 따라서 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드는 본 명세서에 기술된 바와 같은, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드를 제공하기 위해서 이러한 단백질 또는 폴리펩티드에서 결합 유닛 또는 빌딩 블록으로서 사용된다 (하나 이상의 VHH 도메인을 함유하는 다중특이적 폴리펩티드 및 그들 제조의 경우, 또한 문헌 [Conrath et al. (2001, J. Biol. Chem. 276: 7346-7350)]을 비롯하여, 예를 들어 WO 96/34103, WO 99/23221 및 WO 2010/115998을 참조함).

[0861] **2. 다중특이적 폴리펩티드**

[0862] 본 발명은 둘 이상의 빌딩 블록 (예컨대 본 발명의 적어도 2종의 단일특이적 폴리펩티드 또는 ISV)를 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어진 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 적어도 하나의 빌딩 블록은 제1 항원 (즉, CD123)에 대해 유도되고 적어도 하나의 빌딩 블록은 제2 항원 (즉, TCR)에 대해 유도된다. 이들 다중특이적 폴리펩티드는 본 명세서에서 또한 "본 발명의 다중특이적 폴리펩티드(들)"라고 한다. 본 발명의 이들 다중특이적 폴리펩티드에서 사용을 위한 바람직한 면역글로불린 단일 가변 도메인은 (앞서 기술된 바와 같은) 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드이다.

[0863] 본 명세서에 더욱 기술된 바와 같이 상이한 항원 특이성을 갖는 (즉, CD123 및 TCR과 상이함) 추가의 결합 유닛, 예컨대 면역글로불린 단일 가변 도메인은 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드에 연결될 수 있다. 셋 이상의 특이성, 삼중특이적, 사중특이적 등의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 조합하여, 구성체를 형성할 수 있다. 이들 다중특이적 폴리펩티드는 또한 본 명세서에서 "본 발명의 (다중특이적) 폴리펩티드(들)" 또는 "본 발명의 구성체(들)"라고도 한다.

[0864] 따라서, 예를 들어, "본 발명의 이중특이적 폴리펩티드"는 제1 항원 (즉, CD123)에 대한 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 제2 항원 (즉, TCR)에 대한 적어도 하나의 추가 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어진 폴리펩티드인 한편, "본 발명의 삼중특이적 폴리펩티드"는 제1 항원 (즉, CD123)에 대한 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 제2 항원 (즉, TCR)에 대한 적어도 하나의 추가 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 제3 항원 (즉, CD123 및 TCR과 상이함)에 대한 적어도 하나의 추가 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어진 폴리펩티드이다. 면역글로불린

단일 가변 도메인은 본 명세서에서 더욱 기술하는 바와 같이, 경우에 따라 하나 이상의 펩티드 링커를 통해 연결될 수 있다.

[0865] 따라서, 본 발명은 TCR에 특이적으로 결합하는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어진 폴리펩티드에 관한 것이다. 추가 측면에서, 본 발명은 또한 TCR에 특이적으로 결합하는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV를 포함하거나 또는 그로 (실질적으로) 이루어진 폴리펩티드를 제공한다. 이러한 다중특이적 폴리펩티드 또는 이의 구성체의 일부 비제한적인 예는 본 명세서의 추가 설명을 통해서 분명해질 것이다 .

[0866] TCR에 특이적으로 결합하는 ISV 및 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 본 발명의 폴리펩티드에서 임의 순서로 위치될 수 있다는 것을 이해해야 한다 (또한 실시예 부문에서 입증된 바와 같음). 보다 특히, 일 측면에서, TCR에 결합하는 ISV는 N-말단에 위치되고 CD123에 결합하는 하나 이상의 ISV는 C-말단에 위치된다. 다른 측면에서, CD123에 결합하는 하나 이상의 ISV는 N-말단에 위치되고 TCR에 결합하는 ISV는 C 말단에 위치된다. 다른 측면에서, CD123에 결합하는 하나 이상의 ISV는 N-말단에 위치되고, TCR에 결합하는 ISV는 중심에 위치되고 CD123에 결합하는 하나 이상의 추가 ISV는 C-말단에 위치된다. 바람직한 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 폴리펩티드의 N-말단에 위치된다.

[0867] 일부 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV를 포함한다. 일 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV는 CD123 상의 동일한 에피토프에 결합한다. 일 측면에서, 본 발명의 이러한 다중특이적 폴리펩티드는 56A10과 관련된 둘 이상의 ISV를 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 본 발명의 이러한 폴리펩티드는 55F03과 관련된 둘 이상의 ISV를 포함한다.

[0868] 보다 바람직한 양상에서, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV는 상이한 에피토프에 결합한다. 따라서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, CD123에 특이적으로 결합하는 둘 이상의 ISV는 제1 ISV 및 제2 ISV를 포함하는 이중 파라토프이고, 여기서 제1 ISV는 제2 ISV에 의해 결합된 CD123 상의 에피토프와 상이한 CD123 상의 에피토프에 결합한다.

[0869] 보다 특히, 본 발명은 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, CD123에 결합하는 제1 ISV는 56A10과 관련된 ISV로부터 선택되고 CD123에 결합하는 제2 ISV는 55F03과 관련된 ISV로부터 선택된다. 앞서 기술된 바와 같이, 본 발명의 이들 이중 파라토프 폴리펩티드는 화합력이라고도 하는, 화합성 결합에 기인하여, 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드와 비교하여 CD123과의 결합에 대해 개선된 친화성을 갖는다.

[0870] CD123에 결합하는 ISV는 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드에서 임의 순서로 위치될 수 있다는 것을 이해해야 한다 (또한 실시예 부문에서 입증된 바와 같음). 보다 특히, 일 측면에서, 제2 ISV (즉, 55F03과 관련된 ISV)는 제1 ISV (즉, 56A10과 관련된 ISV)의 N-말단에 위치된다. 다른 측면에서, 제2 ISV (즉, 55F03과 관련된 ISV)는 제1 ISV (즉, 56A10과 관련된 ISV)의 C-말단에 위치된다. 이러한 다중특이적 구성체의 일부 비제한적인 예는 본 명세서의 추가 설명으로부터 분명해질 것이다.

[0871] 전형적으로, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 표적 세포 상의 고친화성 및 고특이성 항원과 T 세포 활성화를 조합하여, 그 결과로 T 세포의 천연 특이성과 독립적인 활성화를 일으킨다.

[0872] 본 명세서에서 언급되는 "표적 세포"는 이의 표면 상에 특정한 항원 (즉, CD123)이 존재하는 세포이다. 일 측면에서, "표적 세포"는 CD123의 과발현을 특징으로 하는 세포이다. 바람직한 측면에서, 이러한 표적 세포는 CD123 연관 질환과 관련된다. 보다 더 바람직한 측면에서, 표적 세포는 CD123을 (과)발현하는 암 세포이다. 용어 "암"은 전형적으로 이상조절된 세포 증식 또는 생존을 특징으로 하는 포유동물의 병리학적 상태를 의미한다.

[0873] 본 명세서에서 사용되는 "T 세포 활성화"는 예컨대 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 이펙터 분자 방출, 세포독성 활성, 활성화 마커의 발현, 및 재지정된 표적 세포 용해로부터 선택되는, T 세포, 예를 들어 세포독성 T 세포의 하나 이상의 세포 반응(들)을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "세포 반응(들)"은 TCR 복합체의 조립 시 세포내 신호전달의 결과로서 세포의 반응을 의미한다.

[0874] 표적 세포 상의 세포 표면 분자 (예컨대, 예를 들어 CD123) 및 T 세포 TCR 둘 모두에 결합하는 폴리펩티드의 작용 방식은 통상적으로 공지되어 있다. T 세포를 표적 세포 (예를 들어, CD123 발현 세포)에 가깝게 근접시켜서, 즉 상기 T 세포를 관여시키고 TCR 복합체를 클러스터링시켜서, 그 결과 T 세포 활성화가 야기되고 후속하여 T 세포에 의한 표적 세포의 사멸이 야기된다. 본 발명에서, 이러한 방법은 CD123 연관된 질환, 예컨대 증식성 질환 또는 염증성 병태에 대한 전투를 탐구한다. 일반적으로, T 세포는 퍼포린이라고 하는 포어-형성 단백질, 및 그랜자임이라고 하는 세포 사멸-유도 프로테아제의 극도의 조합을 함유하는 과립이 장착된다. 바람직하게, 이들

단백질은 T 세포가 사멸시키고자 목적하는 표적 세포에 가깝게 근접하면 형성되는 세포용해성 시냅스를 통해서 표적 세포 (예컨대, 예를 들어 CD123 발현 세포)로 전달된다. 정상적으로, T 세포와 표적 세포 간 가까운 근접성은 이의 일치되는 T 세포 수용체를 사용하여 MHC/펩티드 복합체에 결합하는 T 세포에 의해 획득된다. 본 발명의 폴리펩티드는 T 세포가 T 세포 수용체/MHC 상호작용의 부재 하에서 표적 세포에 이렇게 가깝게 근접되게 한다.

[0875] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, 상기 폴리펩티드는 T 세포를 표적 세포로 지정되게 한다. 본 발명의 폴리펩티드(들)는 "CD123 발현 세포의 사멸을 위해 T 세포를 재지정시키고", 이것은 본 발명의 폴리펩티드(들)가 T 세포를 사멸시키려는 CD123 발현 세포에 이렇게 가깝게 근접하게 한다는 의미이다.

[0876] 하나의 팔대부 (TCR에 결합하는 ISV)에 의해서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 T 세포 상의 T 세포 수용체의 신호-전달 복합체의 단백질 성분이, TCR 서브유닛의 불변 도메인에 결합된다. 다른 팔대부 (CD123에 결합하는 하나 이상의 ISV)를 통해서, 다중특이적 폴리펩티드는 표적 세포 상의 CD123에 결합한다. 바람직하게, T 세포 활성화는 다중특이적 폴리펩티드가 CD123 발현 세포 (의 부위)에서 T 세포에게 제시될 때에만 확인된다. 활성화를 위한 표적 세포 (즉, CD123 발현 세포)에 대한 항원 의존성은 호의적인 안전성 프로파일을 생성시킨다. 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 CD123과의 고도의 특이적 결합을 나타낸다. 이와 같이, 본 명세서에 예시된 바와 같이, 표적외 결합을 피하고 표적 독립적 T 세포 활성화가 최소화된다. 일 측면에서, 다중특이적 폴리펩티드는 T 세포 및 표적 세포를 일시적으로 속박시킨다. 바람직하게, 다중특이적 폴리펩티드는 표적 세포 (즉, CD123 발현 세포)의 고도의 강력한 재지정된 용해를 위해서, 휴지기 다클론 T 세포, 예컨대 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포를 활성화로 유도시킬 수 있다. 바람직하게, T 세포는 제1 표적 세포의 용해 이후에 다음 표적 세포로 지정된다.

[0877] 일 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, 상기 다중특이적 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도한다.

[0878] 추가 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, 상기 T 세포 활성화는 MHC 인식에 독립적이다.

[0879] 본 명세서에서 사용되는 "MHC 인식에 독립적인 T 세포 활성화"는 T 세포 상에서 이의 일치되는 T 세포 수용체에 대한 표적 세포 상의 MHC/펩티드 복합체의 결합과 독립적인 T 세포 활성화를 의미한다. T 세포를 표적 세포에 가깝게 근접시킴으로써, 표적 세포가 사멸되게 될 것이다. 정상적으로, T 세포와 표적 세포 간 가까운 근접성은 이의 일치되는 T 세포 수용체를 사용하여 MHC/펩티드 복합체와 T 세포 결합에 의해 획득된다. 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 T 세포 수용체/MHC 상호작용의 부재 하에서 표적 세포로 이렇게 가깝게 근접하게 T 세포가 오게 한다. 다중특이적 폴리펩티드는 표적 세포 상의 CD123에 결합하고 T 세포에 제시되고 결합되면, 그 결과로 T 세포 활성화 및 표적 세포의 사멸을 야기시킨다.

[0880] 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, 상기 T 세포 활성화는 T 세포에게 표적 세포 상의 CD123에 결합된 상기 폴리펩티드의 제시에 의존적이다.

[0881] 추가 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, 상기 T 세포 활성화는 상기 T 세포에 의해 하나 이상의 세포 반응을 야기시키고, 상기 세포 반응은 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 이펙터 분자 방출, 세포독성 활성, 활성화 마커의 발현 및 재지정된 표적 세포 용해로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0882] T 세포 활성화를 측정하기 위해 적합한 어세이는 예를 들어 WO 99/54440 또는 문헌 [Schlereth et al. (2005, Cancer Immunol. Immunother. 20: 1-12)]에 기술된 바와 같이, 또는 실시예 또는 하기에 예시된 바와 같이 당분야에 공지되어 있다.

[0883] 제한없이, 본 발명의 폴리펩티드에 의한 T 세포 활성화는 CD69, CD25 및 다양한 세포 부착 분자의 상향조절, 사이토카인 (예를 들어, IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-2, IL-4 및 IL-10)의 신생 발현 및/또는 방출, 그랜자임 및 퍼포린 발현의 상향조절, 및/또는 세포 증식, 막 기포화, 프로캐스파제 3 및/또는 7의 활성화, 핵 DNA의 단편화 및/또는 캐스파제 기질 폴리 (ADP리보스) 중합효소의 절단을 모니터링하여 측정될 수 있다. 바람직하게, 다중특이적 폴리펩티드에 의한 표적 세포의 재지정된 용해는 T 세포 수용체 특이성, MHC 클래스 I 및/또는 β2 마이크로글로불린의 존재, 및/또는 임의의 공자극성 자극의 존재에 독립적이다.

[0884] 본 발명의 폴리펩티드는 본 명세서에 더욱 예시된 바와 같이, 이전에 미자극된 (즉, 비활성화된) 말초 다클론

$CD8^+$-양성 및 $CD4^+$-양성 T 세포로 시험관내에서 재지정된 용해를 보여준다. 본 발명의 폴리펩티드에 의한 T 세포의 동원을 통한 표적 세포의 재지정된 용해는 세포용해 시냅스 형성 및 퍼포린 및 그랜자임의 전달을 포함한다. T 세포에 의한 세포 용해는 예를 들어, Atkinson 및 Bleackley (1995, Crit. Rev. Immunol 15(3-4): 359-384)가 설명하였다. 바람직하게, 본 발명의 폴리펩티드는 세포독성 T 세포 과립의 프로-아폽토시스 성분을 전달하고 포어 형성에서 T 세포를 자극시킴으로써, 표적 세포, 예를 들어 암 세포의 사멸을 매개한다. 바람직하게, 관여된 T 세포는 일련의 표적 세포 용해를 할 수 있다. 시험관 내에서, 본 발명의 폴리펩티드에 의해서, 재지정된 용해는 저 피코몰 농도에서 확인되어서, 매우 낮은 수의 본 발명의 폴리펩티드가 T 세포를 촉발시키기 위해 표적 세포에 결합하는데 필요하다는 것을 시사한다. 실시예에서 입증된 바와 같이, 낮은 이펙터 대 표적 세포 비율은 일련의 표적 세포 용해를 의미할 수 있고 본 발명의 폴리펩티드의 고역가를 입증하였다.

[0885] 본 명세서에서 사용되는 용어 "역가"는 작용제, 예컨대 단일특이적 또는 다중특이적 폴리펩티드, ISV 또는 나노바디의 생물학적 활성의 척도이다. 역가는 이의 특이적 효과가 발생되는데 요구되는 본 발명의 폴리펩티드의 양의 함수이다. 폴리펩티드에 대한 IC_{50} 의 역수로서 간단히 측정된다. 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드의 경우에, 이것은 T 세포 활성화를 유도하기 위한 본 발명의 상기 폴리펩티드의 능력을 의미한다. 작용제의 역가는 예컨대 예를 들어 실험 부문에서 기술된 바와 같이, 당분야에 공지된 임의의 적합한 방법으로 결정될 수 있다. 세포 배양 기반 역가 어세이는 종종 생물학적 활성을 결정하기 위한 바람직한 포맷인데 그들이 작용제에 의해 유발된 생리학적 반응을 측정하여 상대적으로 짧은 기간 내에 결과를 생성시킬 수 있기 때문이다. 생성물의 작용 기전을 기반으로, 다양한 세포 유형 기반 어세이는 제한없이 모두 당분야에 충분히 공지된, 증식 어세이, 세포독성 어세이, 세포 사멸 어세이, 리포터 유전자 어세이, 세포 표면 수용체 결합 어세이, 및 기능적 필수 단백질 또는 다른 신호 분자 (예컨대, 인산화된 단백질, 효소, 사이토카인 cAMP 등)의 유도/억제를 측정하기 위한 어세이, T 세포 매개 종양 세포 사멸 어세이 (예를 들어, 실시예 부문에 기재된 바와 같음)를 포함한 것을 사용할 수 있다. 세포 기반 역가 어세이에 의한 결과는 1가 ISV, 예를 들어, 오직 하나의 ISV 또는 하나의 나노바디를 포함하고, 경우에 따라 미관련 나노바디를 더 포함하는 폴리펩티드에 대해 수득된 반응에 대해 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드의 비교에 의해 결정되는 "상대적 역가"로서 표시될 수 있다 (실험 부문 참조).

[0886] (본 발명의 폴리펩티드의) "효능"은 포화되는 폴리펩티드 농도에서, 효과 자체의 최대 강도를 측정한다. 효능은 본 발명의 폴리펩티드에 의해 획득될 수 있는 최대 반응을 의미한다. 바람직한 (치료적) 효과를 생성시키는 폴리펩티드의 능력을 의미한다.

[0887] 일 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 T 세포를 활성화시켜서, 그 결과로 유세포측정 기반 어세이로 결정된, 10 pM 내지 1 pM의 평균 EC50 값으로 CD123 발현 세포 (예컨대 MOLM-13 또는 KG1a 세포)의 사멸을 야기시킨다 (실시예 25 참조).

[0888] 보다 특히, 본 발명의 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도하고, 상기 T 세포 활성화는 1 nM 내지 1 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 500 pM 이하의 평균 EC50 값, 예컨대 400, 300, 200 또는 100 pM 이하, 예컨대 90, 80, 70, 60, 50, 40 또는 30 pM 이하의 평균 EC50 값으로 CD123 발현 세포 (예컨대 MOLM-13 세포)의 사멸을 야기시키고, 상기 EC50 값은 예를 들어 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포 비율에서 표적 세포로서 MOLM-13 세포 및 이펙터 세포로서 인간 T 세포를 사용하여 TOPRO3 판독에 의해 유세포측정 기반 어세이로 결정된다.

[0889] 보다 특히, 본 발명의 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도하고, 상기 T 세포 활성화는 약 10% 초과, 예컨대 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20% 이상, 예컨대 25% 초과, 또는 30% 초과의 평균 용해율로 CD123 발현 세포 (예컨대 MOLM-13 세포)의 용해를 야기하고, 상기 용해율은 예를 들어 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포 비율에서 표적 세포로서 MOLM-13 세포 및 이펙터 세포로서 인간 T 세포를 사용하여 TOPRO3 판독에 의해 유세포측정 기반 어세이로 결정된다.

[0890] 보다 특히, 본 발명의 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도한다, 상기 T 세포 활성화는 10 nM 내지 10 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 5 nM 이하, 예컨대 4, 3, 2 또는 1 nM 이하, 예컨대 90, 80, 70 또는 60 pM 이하의 평균 EC50 값으로 CD123 발현 세포 (예컨대 KG1a 세포)의 사멸을 야기시키고, 상기 EC50 값은 예를 들어 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포 비율에서 표적 세포로서 KG1a 세포 및 이펙터 세포로서 인간 T 세포를 사용하여 TOPRO3 판독에 의해 유세포측정 기반 어세이로 결정된다.

[0891] 보다 특히, 본 발명의 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도하고, 상기 T 세포 활성화는 약 10% 초과, 예컨대 15%, 16%, 17% 또는 18% 이상, 예컨대 24% 초과의 평균 용해율로 CD123 발현 세포 (예컨대 KG1a 세포)의 용해를 야기하고, 상기 용해율은 예를 들어 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포 비율에서 표적 세포로서 KG1a 세포 및

이펙터 세포로서 인간 T 세포를 사용하여 TOPRO3 판독에 의해 유세포측정 기반 어세이로 결정된다.

[0892] 다른 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 T 세포를 활성화시키고 그리하여 사이토카인 분비를 유도할 수 있다. 따라서, 폴리펩티드는 100 nM 내지 10 pM의 평균 EC50 값으로 IFN-γ 또는 IL-6 분비를 야기한다 (실시예 30 참조).

[0893] 보다 특히, 본 발명의 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도하고, 상기 T 세포 활성화는 100 nM 내지 10 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 50 nM 이하, 예컨대 40, 30, 20, 10 또는 9 nM 이하, 예컨대 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 nM 이하, 예컨대 500 pM 이하, 예컨대 400, 300, 200 또는 100 pM 이하의 평균 EC50 값으로 IFN-γ 분비를 야기시키고, 상기 EC50 값은 예를 들어 실시예 30에서 더욱 예시하는 바와 같은, 예를 들어 ELISA 기반 어세이에서 결정된다.

[0894] 보다 특히, 본 발명의 폴리펩티드는 T 세포 활성화를 유도하고, 상기 T 세포 활성화는 100 nM 내지 10 pM의 평균 EC50 값, 예컨대 50 nM 이하, 예컨대 40, 30, 20 또는 10 nM 이하, 예컨대 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 nM 이하, 예컨대 500 pM 이하, 예컨대 400, 300, 200 또는 100 pM 이하의 평균 EC50 값으로 IL-6 분비를 야기하고, 상기 EC50 값은 예를 들어 실시예 30에서 더욱 예시하는 바와 같이, 예를 들어 ELISA 기반 어세이로 결정된다.

[0895] 다른 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 형질세포양 세포 (pDC) 및 호염기구의 고갈을 야기한다 (실시예 31 참조).

[0896] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드에 관한 것으로서, 상기 T 세포 활성화는 형질세포양 세포 (pDC) 및 호염기구의 고갈을 야기한다.

[0897] 다른 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 T 세포 증식을 더욱 야기할 수 있다 (실시예 39 참조).

[0898] 따라서, 본 발명은 폴리펩티드에 관한 것으로서, 상기 T 세포 활성화는 상기 T 세포의 증식을 야기한다.

[0899] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 그들 특이성에 대해 신중하게 선택된, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함한다. 이와 같이, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 그들이 CD123 발현 표적 세포를 사멸시킬 수 있는, CD123에 대한 고도의 특이적 결합을 나타낸다. 대조적으로, 오직 소수의 사멸만이 CD123 발현 세포의 부재 하에서 관찰되었고, 이것은 본 발명의 폴리펩티드의 안전성을 강조한다.

[0900] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 폴리펩티드에 관한 것이고, CD123 양성 세포의 부재 하에서 T 세포 활성화는 최소이다 (실시예 36 내지 38 참조).

[0901] 보다 특히, 본 발명은 폴리펩티드에 관한 것으로서, CD123 음성 세포의 T 세포 활성화 유도된 용해는 약 10% 이하, 예컨대 9% 이하, 예컨대 8, 7, 또는 6% 이하이고, 상기 용해는 예를 들어 10 대 1의 이펙터 대 표적 세포 비율로 표적 세포로서, CD123 음성 세포, 예컨대 U-937 또는 NCI-H929 세포, 및 이펙터 세포로서 인간 T 세포를 사용하여 TOPRO3 판독에 의해 유세포측정 기반 어세이로 평균 용해율로서 결정된다.

[0902] 보다 특히, 본 발명은 CD123 음성 세포의 존재 하에서 IFN-γ 및 IL-6의 분비를 유도하지 않는, 폴리펩티드에 관한 것이고, 상기 분비는 예를 들어 ELISA 기반 어세이에서 결정된다.

[0903] 본 발명자는 본 발명의 TCR 결합 ISV 및 본 발명의 하나 이상의 CD123 결합 ISV를 포함하는, 본 발명의 일정한 다중특이적 폴리펩티드가 CD123 발현 세포의 사멸을 위해 T 세포를 재지정하는데 특히 적합하였다는 것을 관찰하였다. 본 발명의 이들 다중특이적 폴리펩티드에 의해서, T 세포의 활성화는 CD123 발현 세포의 부재 하에서 최소였다.

[0904] 따라서, 본 발명은 T 세포 수용체(TCR)에 특이적으로 결합하는 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인(ISV) 및 CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV를 포함하는, CD123 발현 세포의 사멸을 위해 T 세포를 재지정하는 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고,

[0905] i) CDR1은

[0906] a) 서열번호 181-191; 또는

[0907] b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미

노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0908] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0909] ii) CDR2는

[0910] c) 서열번호 192-217; 또는

[0911] d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0912] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0913] iii) CDR3은

[0914] e) 서열번호 218-225; 또는

[0915] f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0916] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0917] CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

[0918] i) CDR1은

[0919] a) 서열번호 11-16; 또는

[0920] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0921] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0922] ii) CDR2는

[0923] c) 서열번호 17-20; 또는

[0924] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0925] 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나;

[0926] iii) CDR3은

[0927] e) 서열번호 21-25; 또는

[0928] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0929] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0930] 추가 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프

레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

[0931] i) CDR1은

[0932] a) 서열번호 181-191; 또는

[0933] b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0934] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0935] ii) CDR2는

[0936] c) 서열번호 192-217; 또는

[0937] d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0938] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0939] iii) CDR3은

[0940] e) 서열번호 218-225; 또는

[0941] f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0942] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0943] CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

[0944] i) CDR1은

[0945] a) 서열번호 11-16; 또는

[0946] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0947] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0948] ii) CDR2는

[0949] c) 서열번호 17-20; 또는

[0950] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0951] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0952] iii) CDR3은

[0953] e) 서열번호 21-25; 또는

[0954] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0955] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0956] 특정한 양상에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고,

[0957] i) CDR1은

[0958] a) 서열번호 181-191; 또는

[0959] b) 서열번호 181-191 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 2, 4, 5, 6, 8 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 27, 29, 30, 31, 33 및/또는 35)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0960] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0961] ii) CDR2는

[0962] c) 서열번호 192-217; 또는

[0963] d) 서열번호 192-217 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2이 위치 1, 3, 5, 7, 8 및/또는 9(카밧 번호매김에 따른 위치 50, 52, 54, 56, 57 및/또는 58)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0964] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0965] iii) CDR3은

[0966] e) 서열번호 218-225; 또는

[0967] f) 서열번호 218-225 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 1, 4, 5 및/또는 8(카밧 번호매김에 따른 위치 95, 98, 99 및/또는 101)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[0968] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0969] CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 더욱 기술되는 바와 같다.

[0970] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은

[0971] a) 서열번호 181; 또는

[0972] b) 서열번호 181의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0973] - 위치 2에서 D는 A, S, E 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0974] - 위치 4에서 H는 Y로 변경되었고/되었거나;

[0975] - 위치 5에서 K는 L로 변경되었고/되었거나;

[0976] - 위치 6에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0977] - 위치 8에서 F는 I 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0978] - 위치 10에서 G는 S로 변경된 아미노산 서열

[0979] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0980] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0981] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR2는

[0982] a) 서열번호 192; 또는

[0983] b) 서열번호 192의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0984] - 위치 1에서 H는 T 또는 R로 변경되었고/되었거나;

[0985] - 위치 3에서 S는 T 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0986] - 위치 5에서 G는 S 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[0987] - 위치 7 Q는 D, E, T, A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0988] - 위치 8 T는 A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[0989] - 위치 9 D는 A, Q, N, V 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0990] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0991] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[0992] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR3은

[0993] a) 서열번호 218; 또는

[0994] b) 서열번호 218의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[0995] - 위치 1에서 F는 Y, L 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[0996] - 위치 4에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[0997] - 위치 5에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[0998] - 위치 8에서 D는 N 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[0999] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1000] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[1001] 따라서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

[1002] i) CDR1은

[1003] a) 서열번호 181; 또는

[1004] b) 서열번호 181의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1005] - 위치 2에서 D는 A, S, E 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[1006] - 위치 4에서 H는 Y로 변경되었고/되었거나;

[1007] - 위치 5에서 K는 L로 변경되었고/되었거나;

[1008] - 위치 6에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[1009] - 위치 8에서 F는 I 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[1010] - 위치 10에서 G는 S로 변경된 아미노산 서열

[1011] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1012] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[1013] ii) CDR2는

[1014] c) 서열번호 192; 또는

[1015] d) 서열번호 192의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1016] - 위치 1에서 H는 T 또는 R로 변경되었고/되었거나;

[1017] - 위치 3에서 S는 T 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[1018] - 위치 5에서 G는 S 또는 A로 변경되었고/되었거나;

[1019] - 위치 7에서 Q는 D, E, T, A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[1020] - 위치 8에서 T는 A 또는 V로 변경되었고/되었거나;

[1021] - 위치 9에서 D는 A, Q, N, V 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[1022] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1023] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[1024] iii) CDR3은

[1025] e) 서열번호 218; 또는

[1026] f) 서열번호 218의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1027] - 위치 1에서 F는 Y, L 또는 G로 변경되었고/되었거나;

[1028] - 위치 4에서 I는 L로 변경되었고/되었거나;

[1029] - 위치 5에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[1030] - 위치 8에서 D는 N 또는 S로 변경된 아미노산 서열

[1031] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1032] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 TCR에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[1033] CD123에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에서 더욱 기술되는 바와 같다.

[1034] 다른 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 181-191로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR2는 서열번호 192-217로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR3은 서열번호 218-225로 이루어진 군으로부터 선택되며, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV 본 명세서에 더욱 기술되는 바와 같다.

[1035] 따라서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 181이고, CDR2는 서열번호 192이고, CDR3은 서열번호 218이고, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV 본 명세서에 더욱 기술되는 바와 같다.

[1036] 바람직한 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 서열번호 42 및 78-180으로 이루어진 군으로부터 또는 서열번호 42 및 78-180 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택되고, CD123에 특이적으로 결합하는 ISV 본 명세서에 더욱 기술되는 바와 같다.

[1037] 상기 기술된 바와 같은 TCR 결합 ISV이외에도, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드에서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 56A10 및/또는 55F03과 관련된다.

[1038] 따라서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

[1039] i) CDR1은

[1040] a) 서열번호 11-16; 또는

[1041] b) 서열번호 11-16 중 하나의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR1의 위치 3, 6, 7 및/또는 8(카밧 번호매김에 따른 위치 28, 31, 32 및/또는 33)에 존재하고; 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[1042] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1043] ii) CDR2는

[1044] c) 서열번호 17-20; 또는

[1045] d) 서열번호 17-20 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR2의 위치 3, 6 및/또는 10(카밧 번호매김에 따른 위치 52, 54 및/또는 58)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[1046] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1047] iii) CDR3은

[1048] e) 서열번호 21-25; 또는

[1049] f) 서열번호 21-25 중 하나의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이는 CDR3의 위치 3, 4 및/또는 5(카밧 번호매김에 따른 위치 97, 98 및/또는 99)에 존재하고; 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되는 것인 서열

[1050] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1051] 일 측면에서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 56A10와 관련된 ISV일 수 있다.

[1052] 따라서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드와 관련된 것으로서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은

[1053] a) 서열번호 11; 또는

[1054] b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1055] - 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

[1056] - 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

[1057] - 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

[1058] - 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

[1059] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1060] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 ISV는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[1061] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR2는 서열번호 17이다.

[1062] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR3은

[1063] a) 서열번호 21; 또는

[1064] b) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1065] - 위치 3에서 P가 A로 변경된 아미노산 서열

[1066] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1067] 단, 1개의 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 1개의 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[1068] 따라서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

[1069] i) CDR1은

[1070] a) 서열번호 11; 또는

[1071] b) 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1072] - 위치 3에서 T는 S 또는 P로 변경되었고/되었거나;

[1073] - 위치 6에서 I는 S로 변경되었고/되었거나;

[1074] - 위치 7에서 N은 D로 변경되었고/되었거나;

[1075] - 위치 8에서 D는 V 또는 A로 변경된 아미노산 서열

[1076] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1077] 단, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드는 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR1을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으

로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[1078] ii) CDR2는 서열번호 17이고;

[1079] iii) CDR3은

[1080] c) 서열번호 21; 또는

[1081] d) 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1082] - 위치 3에서 P는 A로 변경된 아미노산 서열

[1083] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1084] 단, 1개 아미노산 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 1개 아미노산 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[1085] 다른 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 11-15로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21-22로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1086] 따라서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 11이고, CDR2는 서열번호 17이고, CDR3은 서열번호 21이다.

[1087] 바람직한 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 서열번호 1-6으로 이루어진 군으로부터 또는 서열번호 1-6 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택된다.

[1088] 상기 이외에도, 또는 추가로, CD123에 특이적으로 결합하는 CD123은 55F03과 관련된 ISV일 수 있다.

[1089] 따라서, 본 발명은 또한 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 16이다.

[1090] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR2는

[1091] a) 서열번호 18; 또는

[1092] b) 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1093] - 위치 3에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[1094] - 위치 6에서 N은 S로 변경되었고/되었거나; 및/또는

[1095] - 위치 10에서 Q는 E로 변경된 아미노산 서열

[1096] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1097] 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 ISV는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[1098] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것이고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR3은

[1099] a) 서열번호 23; 또는

[1100] b) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1101] - 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

[1102] - 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

[1103] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1104] 단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 ISV는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 ISV에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[1105] 따라서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서

[1106] i) CDR1은 서열번호 16이고;

[1107] ii) CDR2는

[1108] a) 서열번호 18; 또는

[1109] b) 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해 3, 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1110] - 위치 3에서 Y는 W로 변경되었고/되었거나;

[1111] - 위치 6에서 N은 S로 변경되었고/되었거나;

[1112] - 위치 10에서 Q는 E로 변경된 아미노산 서열

[1113] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1114] 단, 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드는 3, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR2를 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정되고;

[1115] iii) CDR3은

[1116] c) 서열번호 23; 또는

[1117] d) 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 2 또는 1개의 아미노산 차이를 갖는 아미노산 서열로서,

[1118] - 위치 4에서 E는 R로 변경되었고/되었거나;

[1119] - 위치 5에서 T는 D 또는 Y로 변경된 아미노산 서열

[1120] 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[1121] 단, 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이를 갖는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드는 2 또는 1개의 아미노산(들) 차이가 없는 CDR3을 포함하는 폴리펩티드에 의한 결합과 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화성으로 CD123에 결합하고, 상기 친화성은 표면 플라스몬 공명으로 측정된다.

[1122] 다른 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18-20으로 이루어진 군으로부터 선택되고, CDR3은 서열번호 23-25로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1123] 따라서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 서열번호 16이고, CDR2는 서열번호 18이고, CDR3은 서열번호 23이다.

[1124] 바람직한 측면에서, 본 발명은 다중특이적 폴리펩티드에 관한 것으로서, TCR에 특이적으로 결합하는 ISV는 본 명세서에 기술된 바와 같고, CD123에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 ISV는 서열번호 7-10으로 이루어진 군으로부터 또는 서열번호 7-10 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 ISV로부터 선택된다.

[1125] 단일특이적 폴리펩티드에 대해 광범위하게 기술한 바와 같이, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드에 존재하는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 경쇄 가변 도메인 서열 (예를 들어, V_L-서열) 또는 중쇄 가변 도메인 서열 (예를 들어, V_H-서열)로 이루어질 수 있고; 그들은 통상의 4-사슬 항체로부터 유래된 중쇄 가변 도메인 서열 또는 중쇄 항체로부터 유래된 중쇄 가변 도메인 서열로 이루어질 수 있다. 바람직한 측면에서, 그들은 도메인 항체 (또는 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산), 단일 도메인 항체 (또는 단일 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산), "dAb" (또는 dAb로서 사용에 적합한 아미노산), 나노바디 (제한없이 VHH 포함), 인간화 VHH, 낙타화 VH, 또는 친화성 성숙에 의해 얻은 VHH 서열로 이루어진다. 면역글로불린 단일 가변 도메인은 부분적으로 또는 완전하게 인간화된 나노바디 또는 부분적으로 또는 완전하게 인간화된 VHH로 이루어질 수 있다. 면역글로불린 단일 가변 도메인은 또한 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 구성체에 대한 소위 "사전-존재하는 항체"의 결합을 방지하거나 또는 감소시키는데 유효한 돌연변이 (본 명세서에 기술된 바와 같음)를 함유할 수도 있다. 본 발명의 바람직한 측면에서, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드에 포괄되는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 본 명세서에 정의된 바와 같이 본 발명의 하나 이상의 단일특이적 폴리펩티드이다.

[1126] 본 발명의 바람직한 폴리펩티드는 서열번호 47, 49, 52, 53, 55, 56 및 58-61 (표 A-7 참조)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 추가 측면에서, 폴리펩티드는 서열번호 47, 49, 52, 53, 55, 56 및 58-61로 이루어진 군으로부터 또는 서열번호 47, 49, 52, 53, 55, 56 및 58-61 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로부터 선택된다.

[1127] 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 본 명세서에서 더욱 기술하는 바와 같이, "본 발명의 폴리펩티드(들)" 또는 "본 발명의 구성체(들)"를 형성하도록, 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 결합 유닛은 폴리펩티드의 반감기를 증가시키는 (또한 본 명세서에서 "반감기 연장" 및 "반감기 연장된 구성체"라고 함) 아미노산 서열일 수 있다. 본 발명의 특별하지만, 비제한적인 측면에 따라서, 그러므로, 본 발명의 폴리펩티드는 CD123에 대한 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인, TCR에 대한 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인 이외에도, 혈청 알부민 (예컨대 인간 혈청 알부민)에 대한 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 함유할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체에 관한 것으로서, 반감기가 증가된 폴리펩티드를 제공하는 상기 결합 유닛은 혈청 알부민에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인이다. 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체에 관한 것으로서, 혈청 알부민에 결합하는 상기 ISV는 단일 도메인 항체, dAb, 나노바디, VHH, 인간화 VHH 또는 낙타화 VH로 실질적으로 이루어진다.

[1128] 바람직한 측면에서, 혈청 알부민에 결합하는 ISV는 서열번호 43 또는 351 내지 362로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1129] 바람직한 측면에서, ISV는 서로 직접 연결되거나 또는 링커를 통해 서로 연결된다.

[1130] 바람직한 본 발명의 구성체는 서열번호 63-67로 이루어진 구성체 또는 서열번호 63-67 중 하나와 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 99% 초과의 서열 동일성을 갖는 구성체의 군으로부터 선택될 수 있다.

[1131] 바람직한 측면에서, 구성체는 서열번호 63-67로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1132] 그들 투여 시에, 반감기 연장된 본 발명의 구성체는 신장 청소에 의해 즉각적으로 제거되지 않을 것이다. 그리하여 반감기 연장은 호의적인 PK 프로파일에 기여하게 될 것이다. 따라서, 연속 정맥내 주입이 필요없을 것이고, 그리하여 환자 순응도가 개선될 것이다. 특별한 측면에서, 본 발명의 구성체는 연속 주입을 요구하지 않는다.

[1133] 역시 단일특이적 폴리펩티드에 대해 광범위하게 기술된 바와 같이, 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 또는 본 발명의 구성체는 본 발명의 폴리펩티드 및 구성체에 대해 소위 "사전-존재하는 항체"의 결합을 방지하거나 또는 감소시키는데 유효한 돌연변이를 더 포함할 수 있다. 이러한 목적을 위해서, 본 발명의 폴리펩티드 및 구성체는 본 명세서에 기술된 바와 같이 C-말단 연장부 (X)n (여기서 n은 1 내지 10, 바람직하게 1 내지 5, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5 (및 바람직하게 1 또는 2, 예컨대 1)이고; 각각의 X는 독립적으로 선택되고, 바람직하게 알라닌

(A), 글리신 (G), 발린 (V), 류신 (L) 또는 이소류신 (I)으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 (바람직하게 천연 발생) 아미노산 잔기임)를 함유할 수 있다.

[1134] 따라서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체에 관한 것으로서, C-말단 연장부 (X)n를 더 포함하는, 본 발병의 폴리펩티드 또는 구성체에 관한 것으로서, 여기서 n은 1 내지 5, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5이고, X는 천연 발생 아미노산이고, 바람직하게 시스테인이 아니다.

[1135] 보다 특히, 본 발명은 폴리펩티드 또는 구성체에 관한 것으로서, 상기 폴리펩티드 또는 구성체는 서열번호 338-342로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1136] 다가 또는 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드를 제조하기 위한 방법은 적어도 본 발명의 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 1가 폴리펩티드 및/또는 단일특이적 폴리펩티드 및 예를 들어 하나 이상의 링커를 적합한 방식으로 함께 연결시키는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 1가 폴리펩티드 및/또는 단일특이적 폴리펩티드 (및 링커)는 당분야에 공지되고 본 명세서에 더욱 기술된 바와 같은 임의 방법으로 커플링될 수 있다. 바람직한 기술은 다가 또는 다중 특이적 폴리펩티드를 발현하는 유전자 구성체를 제조하기 위해서 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 1가 폴리펩티드 및/또는 단일특이적 폴리펩티드 (및 링커)를 코딩하는 핵산 서열을 연결하는 것을 포함한다. 아미노산 또는 핵산을 연결하기 위한 기술은 당업자에게 분명할 것이고, 역시 하기 실시예를 비롯하여, 상기 언급된 표준 안내서 예컨대 [Sambrook et al.] 및 [Ausubel et al.]를 참조한다.

[1137] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 다가 폴리펩티드 또는 다중특이적 폴리펩티드를 제조하는데서 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 1가 폴리펩티드 및/또는 단일특이적 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다. 다가 또는 다중특이적 폴리펩티드를 제조하기 위한 방법은 경우에 따라 하나 이상의 링커를 통해서, 본 발명의 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 폴리펩티드를 적어도 하나의 본 발명의 추가 면역글로불린 단일 가변 도메인, 1가 폴리펩티드 및/또는 단일특이적 폴리펩티드에 연결시키는 단계를 포함하게 된다. 이후에 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 1가 폴리펩티드 및/또는 단일특이적 폴리펩티드는 둘 (예를 들어, 2가 폴리펩티드), 셋 (예를 들어, 3가 폴리펩티드) 또는 그 이상 (예를 들어, 다가 폴리펩티드)의 결합 유닛을 포함하는 다가 또는 다중특이적 폴리펩티드를 제공 및/또는 제조하는데서 결합 도메인 또는 결합 유닛으로서 사용된다. 이와 관련하여, 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 1가 폴리펩티드 및/또는 단일특이적 폴리펩티드는 둘, 셋 또는 그 이상의 결합 유닛을 포함하는 다가 또는 다중특이적, 예컨대 이중특이적 또는 삼중특이적 폴리펩티드를 제공 및/또는 제조하는데서 결합 도메인 또는 결합 유닛으로서 사용될 수 있다.

[1138] 따라서, 본 발명은 또한 다가 또는 다중특이적 폴리펩티드의 제조에서 면역글로불린 단일 가변 도메인 및/또는 특히 본 발명의 1가 또는 단일특이적 폴리펩티드 (본 명세서에 기술된 바와 같음)의 용도에 관한 것이다. 다가 또는 다중특이적 폴리펩티드를 제조하기 위한 방법은 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 1가 폴리펩티드 및/또는 단일특이적 폴리펩티드를 본 발명의 적어도 하나의 추가 면역글로불린 단일 가변 도메인, 1가 폴리펩티드 및/또는 단일특이적 폴리펩티드에, 경우에 따라 하나 이상의 링커 (본 명세서에 더욱 기술되는 바와 같음)를 통해서 연결시키는 단계를 포함하게 될 것이다.

[1139] **본 발명의 구성체**

[1140] 본 발명의 단일특이적 폴리펩티드 및 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드는 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛을 더 포함할 수 있거나 또는 포함하지 않을 수 있다 (이들 1가 폴리펩티드를 비롯하여 다가 폴리펩티드 (추가의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛이 존재 또는 부재)는 모두 "본 발명의 구성체(들)"라고 함). 존재하면, 이러한 추가의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 면역글로불린 단일 가변 도메인 (및/또는 존재하는 폴리펩티드)에 추가 작용성을 제공할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있고 면역글로불린 단일 가변 도메인의 속성을 변형시킬 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다.

[1141] 예를 들어, 이러한 추가의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 폴리펩티드가 (융합) 단백질 또는 (융합) 폴리펩티드이도록 하나 이상의 추가 아미노산일 수 있다. 바람직하지만 비제한적인 측면에서, 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 면역글로불린이다. 보다 더 바람직하게, 상기 하나 이상의 다른 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 도메인 항체, 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산, 단일 도메인 항체, 단일 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산, "dAb", dAb로서 사용에 적합한 아미노산, 또는 나노바디 (예컨대, 예를 들어, VHH, 인간화 VHH 또는 낙타화 VH)로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역글로불린 단일 가변 도메인이다.

[1142] 상기 기술된 바와 같이, 추가의 결합 유닛, 예컨대 상이한 항원 특이성을 갖는 면역글로불린 단일 가변 도메인이 연결되어 다중특이적 구성체를 형성할 수 있다. 둘 이상의 특이성의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 조합하여, 이중특이적, 삼중특이적 등의 구성체를 형성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 폴리펩티드는 본 발명의 단일특이적 또는 다중특이적 폴리펩티드 및 다른 표적 (즉, CD123 또는 TCR과 상이)에 대한 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인(들)을 포함할 수 있다. 당업자게 쉽게 계획할 수 있는, 이러한 구성체 및 이의 변형은 모두 본 명세서에서 사용되는 "본 발명의 구성체" 용어에 포괄된다.

[1143] 상기 기술된 구성체에서, 하나, 둘 또는 그 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 하나 이상의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 서로 직접적으로 및/또는 하나 이상의 적합한 링커 또는 스페이서를 통해 서로 연결될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛이 아미노산 서열일 때, 링커는 최종 구성체가 융합체 (단백질) 또는 융합체 (폴리펩티드)이도록, 아미노산 서열일 수 있다.

[1144] 하나 이상의 추가의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 임의의 적합하고/하거나 바람직한 아미노산 서열일 수 있다. 추가의 아미노산 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 (생물학적) 속성을 변화, 변경 또는 아니면 영향미칠 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있고, 본 발명의 폴리펩티드에 추가 기능성을 첨가할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다. 바람직하게, 추가 아미노산 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 하나 이상의 바람직한 속성 또는 기능성을 부여하도록 추가 아미노산 서열일 수 있다.

[1145] 이러한 아미노산 서열의 예는 당업자에게 분명해 질 것이고, 일반적으로 통상의 항체 및 이의 단편 (제한없이 scFv 및 단일 도메인 항체)을 기반으로 하는 펩티드 융합체에서 사용되는 모든 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어 Holliger 및 Hudson의 리뷰 (2005, Nature Biotechnology 23: 1126-1136)를 참조한다.

[1146] 예를 들어, 이러한 아미노산 서열은 본 발명의 폴리펩티드 그 자체와 비교하여 반감기, 가용성 또는 흡착성을 증가시키고/시키거나, 면역원성 또는 독성을 감소시키고/시키거나, 비바람직한 부작용을 제거 또는 약독화시키고/시키거나, 다른 유리한 속성을 부여하고/하거나 본 발명의 구성체의 비비람직한 속성을 감소시키는 아미노산 서열일 수 있다. 이러한 아미노산 서열의 일부 비제한적인 예는 혈청 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민 (예를 들어 WO 00/27435 참조) 또는 합텐 분자 (예를 들어 순환성 항체에 의해 인식되는 합텐, 예를 들어 WO 98/22141)이다.

[1147] 본 명세서에서 더욱 기술하게 되는, 본 발명의 특별하지만, 비제한적인 측면에서, 본 발명의 구성체는 그들이 유래된 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드와 비교하여 혈청 내 증가된 반감기를 가질 수 있다 (본 명세서에서 더욱 기술함). 예를 들어, 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 본 발명의 폴리펩티드는 반감기가 증가된 본 발명의 폴리펩티드의 유도체를 제공하기 위해서, 반감기가 연장되는 하나 이상의 기 또는 모이어티 (예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 분자 (PEG))에 (화학적으로 또는 다르게) 연결될 수 있다.

[1148] 본 발명의 특정한 일 측면에서, 구성체는 상응하는 본 발명의 폴리펩티드와 비교하여, 증가된 반감기를 갖도록 제조된다. 이러한 반감기 연장 모이어티를 포함하는 본 발명의 구성체의 예는 예를 들어, 제한없이, 면역글로불린 단일 가변 도메인이 하나 이상의 혈청 단백질 또는 이의 단편 (예컨대 (인간) 혈청 알부민 또는 적합한 이의 단편) 또는 혈청 단백질 (예컨대 혈청 알부민 (예컨대 인간 혈청 알부민)), 혈청 면역글로불린 (예컨대 IgG), 트랜스페린 또는 WO 04/003019에 열거된 다른 혈청 단백질 중 하나에 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 유닛 (예컨대, 예를 들어, 도메인 항체, 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산, 단일 도메인 항체, 단일 도메인 항체로서 사용에 적합한 아미노산, "dAb", dAb로서 사용에 적합한 아미노산, 나노바디, VHH, 인간화 VHH 또는 낙타화)에 적합하게 연결된 구성체; 면역글로불린 단일 가변 도메인이 Fc 부분 (예컨대 인간 Fc) 또는 이의 적합한 일부분 또는 단편에 연결된 폴리펩티드; 또는 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인이 혈청 단백질에 결합할 수 있는 하나 이상의 소형 단백질 또는 펩티드 (예컨대, 제한없이, WO 91/01743, WO 01/45746 또는 WO 02/076489에 기술된 단백질 및 펩티드)에 적합하게 연결된 구성체를 포함한다. 또한 WO 03/002609 및 WO 04/003019에 기술된 dAb 및 [Harmsen et al. (2005, Vaccine 23: 4926-4942)]; EP 0368684를 비롯하여, Ablynx N.V.의 WO 08/028977, WO 08/043821, WO 08/043822, WO 08/068280, WO 09/127691 및 WO 11/095545를 참조한다.

[1149] 본 발명의 특별하지만, 비제한적인 측면에 따라서, 본 발명의 구성체는 CD123에 대한 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 및/또는 TCR에 대한 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인 이외에도, 혈청 알부민 (예컨대, 인간 혈청 알부민)에 결합하는 적어도 하나의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 함유할 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체에 관한 것으로서, 증가된 반감기를 갖는 구성체를 제공하는 상기 결합 유닛은 혈청 알부민에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인이다. 추가 측면에서, 본 발명은 본 명세서에

기술된 바와 같은 구성체에 관한 것으로서, 혈청 알부민에 결합하는 상기 ISV는 단일 도메인 항체, dAb, 나노바디, VHH, 인간화 VHH 또는 낙타화 VH로 실질적으로 이루어진다.

[1150] 혈청 알부민에 결합하는 ISV는 당분야에 기술된 바와 같은 임의의 ISV일 수 있다.

[1151] 일 측면에서, 인간 혈청 알부민에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인은 일반적으로, 상기 인용된 Ablynx N.V.의 출원 (예를 들어 WO 04/062551 참조)에 기술되어 있을 것이다. 증가된 반감기를 제공하고 본 발명의 구성체에서 사용할 수 있는 일부 바람직한 나노바디는 WO 06/122787 (표 II 내지 III 참조)에 개시된 나노바디 ALB-1 내지 ALB-10을 비롯하여, WO 2012/175400 또는 WO 2015/173325 (예를 들어, WO 2012/175400의 서열번호 1-11, WO 2015/173325의 서열번호 19)에 개시된 나노바디 및 가출원 US 62/256,841, US 62/335,746, US 62/349,294 및 이들 3개 US 가출원의 우선권을 적용하는 "개선된 혈청 알부민 결합제"의 명칭의 양수인의 상응하는 국제 특허 출원 WO 2017/085172의 나노바디를 포함한다.

[1152] 일 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드에 관한 것으로서, 혈청 알부민에 결합하는 상기 ISV는 4개의 프레임워크 영역(각각, FR1 내지 FR4) 및 3개의 상보성 결정 영역(각각, CDR1 내지 CDR3)으로 실질적으로 이루어지고, 여기서 CDR1은 GFTFSSFGMS (서열번호 363) 또는 GFTFRSFGMS (서열번호 364)이고, CDR2는 SISGSGSDTL (서열번호 365)이고 CDR3은 GGSLSR (서열번호 366)이다.

[1153] 증가된 반감기를 제공하고 본 발명의 구성체에서 사용할 수 있는 일부 특히 바람직한 나노바디는 Alb8, Alb23, Alb129, Alb132, Alb11, Alb11 (S112K)-A, Alb82, Alb82-A, Alb82-AA, Alb82-AAA, Alb82-G, Alb82-GG, Alb82-GGG (표 B-2)라고도 하는 면역글로불린 단일 가변 도메인을 포함한다.

[1154] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 구성체에 관한 것으로서, 혈청 알부민에 결합하는 상기 ISV는 서열번호 43 또는 351 내지 362로 이루어진 군으로부터 선택된다.

표 B-2: 본 발명의 구성체에서 사용을 위한 HAS 에 결합하는 면역글로불린 단일 가변 도메인

ISV	서열 번호	서열
Alb8	43	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb23	351	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb129	352	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb132	353	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS A
Alb11	354	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb11 (S112K)-A	355	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVKVSSA
Alb82	356	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
Alb82-A	357	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
Alb82-AA	358	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA A
Alb82-AAA	359	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA AA
Alb82-G	360	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG
Alb82-GG	361	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG G
Alb82-GGG	362	EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG GG

[1155]

[1156] 일반적으로, 반감기가 증가된 본 발명의 구성체는 바람직하게 상응하는 그 자체로 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드의 반감기 보다 적어도 1.5배, 바람직하게 적어도 2배, 예컨대 적어도 5배, 예를 들어 적어도 10배 또는 20배 초과로 큰 반감기를 갖는다.

[1157] 일반적으로, 반감기가 증가된 본 발명의 구성체는 바람직하게 그 자체로 상응하는 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 폴리펩티드의 반감기와 비교하여 1시간 초과, 바람직하게 2시간 초과, 보다 바람직하게 6시간

초과, 예컨대 12시간 초과, 또는 24, 48 또는 72시간 초과로 증가된 반감기를 갖는다.

[1158] 다른 바람직하지만, 비제한적인 측면에서, 이러한 본 발명의 구성체는 적어도 약 12시간, 바람직하게 적어도 24시간, 보다 바람직하게 적어도 48시간, 보다 더 바람직하게 적어도 72시간 또는 그 이상의 인간에서의 혈청 반감기를 나타낸다. 예를 들어, 본 발명의 구성체는 적어도 5일 (예컨대 약 5 내지 10일), 바람직하게 적어도 9일 (예컨대 약 9 내지 14일), 보다 바람직하게 적어도 약 10일 (예컨대 약 10 내지 15일), 또는 적어도 약 11일 (예컨대 약 11 내지 16일), 보다 바람직하게 적어도 약 12일 (예컨대 약 12 내지 18일 또는 그 이상), 또는 14일 초과 (예컨대 약 14 내지 19일)의 반감기를 가질 수 있다.

[1159] 본 발명에서, 이와 같은 구성체에서 알부민 표적화 결합 유닛은 수득된 역가 또는 효능에 대해 필수적인 영향을 갖지 않는다는 것이 입증되었다. 약간의 효능/역가 손실이 HSA의 존재 하에서 관찰되었지만, 반감기 연장된 TCR 결합 다중특이적 폴리펩티드는 여전히 CD123 발현 세포의 사멸에서 강력하였다. 알부민-기반 약물 전달은 대체로 에너지 및 아미노산의 공급원으로서 종양 세포에 의한 알부민에 대한 증가된 수요 및 증강된 투과성 및 체류 효과를 통한 종양에 대한 이의 수동 표적으로 인해, 개선된 암 요법을 획득하는데 유용한 것으로 입증되었다.

[1160] 특별한 일 측면에 따라서, 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드는 (경우에 따라 적합한 링커 또는 힌지 영역을 통해서) 하나 이상의 불변 도메인 (예를 들어, Fc 부분을 형성하기 위해/이의 일부로서 사용될 수 있는 2 또는 3개 불변 도메인), Fc 부분 및/또는 본 발명의 폴리펩티드에 하나 이상의 이펙터 기능을 부여하는 하나 이상의 항체 부분, 단편 또는 도메인에 연결될 수 있고/있거나 하나 이상의 Fc 수용체에 결합하는 능력을 부여할 수 있다. 예를 들어, 이러한 목적을 위해서, 이에 제한없이, 하나 이상의 추가 아미노산 서열은 항체, 예컨대 중쇄 항체 (본 명세서에 기술된 바와 같음) 및 보다 바람직하게 통상의 인간 4-사슬 항체의 하나 이상의 C_H2 및/또는 C_H3 도메인을 포함할 수 있고/있거나; 예를 들어 IgG (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), IgE 또는 다른 인간 Ig 예컨대 IgA, IgD 또는 IgM 유래의 Fc 영역(의 일부)을 형성할 수 있다. 예를 들어, WO 94/04678은 낙타과 V_{HH} 도메인 또는 이의 인간화 유도체 (즉, 나노바디)를 포함하는 중쇄 항체를 기술하고, 여기서 낙타과 C_H2 및/또는 C_H3 도메인은 면역글로불린은 C_H2 및 C_H3 도메인에 의해 제공되는 이펙터 기능을 갖고 면역글로불린은 임의의 경쇄의 존재없이 기능할 수 있는, 각각 나노바디 및 인간 C_H2 및 C_H3 도메인 (그러나 C_H1 도메인은 아님)을 포함하는 2개 중쇄로 이루어진 면역글로불린을 제공하기 위해서, C_H2 및 C_H3 도메인으로 치환되었다. 이펙터 기능을 제공하기 위해서 본 발명의 폴리펩티드에 적합하게 연결될 수 있는 다른 아미노산 서열은 당업자에게 분명할 것이고, 바람직한 이펙터 기능(들)을 기초로 하여 선택될 수 있다. 예를 들어, WO 04/058820, WO 99/42077, WO 02/056910 및 WO 05/017148을 비롯하여, Holliger 및 Hudson의 리뷰 (상동), 및 WO 09/068628을 참조한다. Fc 부분에 본 발명의 폴리펩티드의 커플링은 상응하는 본 발명의 폴리펩티드와 비교하여, 증가된 반감기를 야기시킬 수 있다. 일부 적용분야에서, 임의의 생물학적으로 유의한 이펙터 기능없이 증가된 반감기를 부여하는 Fc 부분 및/또는 불변 도메인 (즉, C_H2 및/또는 C_H3 도메인)의 사용이 또한 적합할 수 있거나 또는 바람직할 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 및 생체내에서 증가된 반감기를 갖는 하나 이상의 불변 도메인을 포함하는 다른 적합한 구성체가 당업자에게 분명해 질 것이며, 예를 들어 경우에 따라 링커 서열을 통해서, C_H3 도메인에 연결된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일반적으로, 반감기가 증가된 임의의 융합 단백질 또는 유도체는 바람직하게 신장 흡수를 위한 컷-오프 값인, 50 kDa을 초과하는 분자량을 가지게 될 것이다.

[1161] 다른 특별하지만, 비제한적인 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 (즉, 통상의 4-사슬 항체에서 자연적으로 발생되는 불변 도메인과 비교하여) 이량체로 자기-회합되는 경향이 감소된 (또는 실질적으로 없는) 천연 발생, 합성 또는 반합성 불변 도메인 (또는 이의 유사체, 변이체, 돌연변이체, 일부분 또는 단편)에 (경우에 따라 적합한 링커 또는 힌지 영역을 통해) 연결될 수 있다. 이러한 단량체 (즉, 자기-회합되지 않은) Fc 사슬 변이체, 또는 이의 단편은 당업자에게 분명해질 것이다. 예를 들어, Helm 등 (J. Biol. Chem. 271: 7494, 1996)은 본 발명의 폴리펩티드 사슬에 사용할 수 있는 단량체 Fc 사슬 변이체를 기술한다.

[1162] 또한, 이러한 단량체 Fc 사슬 변이체는 그들이 (그들이 유래되는 Fc 부분에 의존적으로) 여전히 성분 또는 관련 Fc 수용체(들)에 결합할 수 있고/있거나, 그들이 여전히 그들이 유도된 Fc 부분의 이펙터 기능의 일부 또는 전부를 갖도록 (또는 여전히 의도하는 용도에 적합한 감소된 수준으로) 하는 것이 바람직하다. 대안적으로, 본 발명의 이러한 폴리펩티드 사슬에서, 단량체 Fc 사슬은 폴리펩티드 사슬 상에 증가된 반감기를 부여하도록 사용될 수 있고, 이러한 경우에 단량체 Fc 사슬은 이펙터 기능이 전혀 또는 실질적으로 전혀 없을 수 있다.

[1163] 추가 아미노산 잔기는 본 발명의 폴리펩티드의 다른 (생물학적) 속성을 변화, 변경 또는 아니면 영향을 미칠 수

있거나 또는 그렇지 않을 수 있고, 본 발명의 폴리펩티드의 추가 기능성을 첨가할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다. 예를 들어, 이러한 아미노산 잔기는

[1164] a) 예를 들어 이종성 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 발현의 결과로서, N-말단 Met 잔기를 포함할 수 있다.

[1165] b) 합성 시 숙주 세포로부터 폴리펩티드의 분비를 유도하는 신호 서열 또는 리더 서열을 형성할 수 있다 (예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는데 사용되는 숙주 세포에 따라서, 본 발명의 폴리펩티드의 프리-, 프로- 또는 프리프로- 형태를 제공하기 위함). 적합한 분비 리더 펩티드는 당업자에게 분명해 질 것이고, 본 명세서에 더욱 기술되는 바와 같을 것이다. 일반적으로 이러한 리더 서열은 폴리펩티드의 N-말단에 연결될 수 있지만, 이의 가장 넓은 의미로 본 발명은 이에 제한되지 않는다.

[1166] c) 예를 들어 상기 서열 또는 잔기에 대한 친화성 기술을 사용하여 폴리펩티드의 정제를 가능하게 하거나 또는 용이하게 하는 "태그", 예를 들어 아미노산 서열 또는 잔기를 형성할 수 있다. 이후에, 상기 서열 또는 잔기는 폴리펩티드를 제공하도록 (예를 들어, 화학적 또는 효소적 절단에 의해) 제거될 수 있다 (이러한 목적으로 위해서, 태그는 경우에 따라 절단성 링커 서열을 통해 아미노산 서열 또는 폴리펩티드 서열에 연결될 수 있거나 또는 절단성 모티프를 함유할 수 있음). 이러한 잔기의 일부 바람직하지만, 비제한적인 예는 복수 히스티딘 잔기, 글루타티온 잔기 및 myc-태그 예컨대 AAAEQKLISEEDLNGAA (서열번호 367)이다.

[1167] d) 작용화되었고/되었거나 작용기의 부착을 위한 부위로서 제공될 수 있는 하나 이상의 아미노산 잔기일 수 있다. 적합한 아미노산 잔기 및 작용기는 당업자에게 분명할 것이고, 제한없이, 본 발명의 폴리펩티드의 유도체에 대해 본 명세서에 언급된 아미노산 잔기 및 작용기를 포함한다.

[1168] 본 발명의 구성체에서, 둘 이상의 빌딩 블록, ISV 또는 나노바디 및 경우에 따라 하나 이상의 폴리펩티드, 하나 이상의 다른 기, 약물, 작용제, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 서로 직접 연결될 수 있고/있거나 (예를 들어, WO 99/23221에 기술된 바와 같음), 하나 이상의 적합한 스페이서 또는 링커, 또는 이의 임의 조합을 통해 서로 연결될 수 있다.

[1169] 본 발명의 구성체에서 사용을 위해 적합한 스페이서 또는 링커는 당업자에게 분명해 질 것이고, 일반적으로 아미노산 서열, 및/또는 다른 기, 약물, 작용제, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛을 연결하기 위해서 당분야에서 사용하는 임의의 링커 또는 스페이서일 수 있다. 바람직하게, 상기 링커 또는 스페이서는 약학 용도로 의도되는 폴리펩티드 및/또는 구성체를 제작하는데 사용하기 적합하다.

[1170] 일부 특히 바람직한 스페이서는 항체 단편 또는 항체 도메인을 연결하기 위해 당분야에서 사용되는 스페이서 및 링커를 포함한다. 이들은 상기 인용된 일반 배경 기술에서 언급된 링커를 비롯하여, 예를 들어 디아바디 또는 ScFv 단편을 구축하기 위해 당분야에서 사용되는 링커를 포함한다 (그러나, 이와 관련하여, 디아바디 및 ScFv 단편에서, 사용되는 링커 서열이 완전한 항원-결합 부위를 형성하도록 관련 V_H 및 V_L 도메인이 함께 오게 할 수 있는 길이, 탄성도 및 다른 속성을 가져야 하지만, 각각의 면역글로불린 단일 가변 도메인은 그 자체가 완전한 항원-결합 부위를 형성하므로, 본 발명의 폴리펩티드에서 사용되는 길이 또는 탄성에 특별한 제한은 존재하지 않는다는 것을 주의해야 함).

[1171] 예를 들어, 링커는 적합한 아미노산 서열, 특히 1 내지 50개, 바람직하게 1 내지 30개, 예컨대 1 내지 10개의 아미노산 잔기의 아미노산 서열일 수 있다. 이러한 아미노산 서열의 일부 바람직한 예는 gly-ser 링커, 예를 들어 WO 99/42077에 기술된 바와 같은 유형 $(gly_xser_y)_z$, 예컨대 (예를 들어 $(gly_4ser)_3$ 또는 $(gly_3ser_2)_3$, 본 명세서에서 언급된 Ablynx의 출원 (예를 들어 WO 06/040153 및 WO 06/122825 참조)에 기술된 GS30, GS15, GS9 및 GS7 링커를 비롯하여, 천연 발생 중쇄 항체 또는 유사 서열의 힌지-유사 영역 예컨대 힌지 영역(예컨대 WO 94/04678에 기술됨)을 포함한다.

[1172] 일부 다른 특히 바람직한 링커가 표 B-3에 언급되어 있고, 이중에서 35GS (서열번호 334)가 특히 바람직하다.

[1173] 따라서, 본 발명은 ISV가 서열번호 325 내지 336로 이루어진 군으로부터 선택되는 링커를 통해 서로 연결된 폴리펩티드에 관한 것이다.

표 B-3: 링커

링커	서열번호	서열
5GS	325	GGGGS
7GS	326	SGGSGGS
9GS	327	GGGGSGGGS
10GS	328	GGGGSGGGGS
15GS	329	GGGGSGGGGSGGGGS
18GS	330	GGGGSGGGGSGGGGGGGS
20GS	331	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
25GS	332	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30GS	333	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
35GS	334	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
40GS	335	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
폴리-A	336	AAA

[1174]

[1175] 다른 적합한 링커는 일반적으로, 유기 화합물 또는 중합체, 특히 약학 용도의 단백질에 사용하기 적합한 것들이 포함된다. 예를 들어, 폴리(에틸렌글리콜) 모이어티는 항체 도메인을 연결시키는데 사용되고 있다. 예를 들어 WO 04/081026을 참조한다.

[1176] 사용되는 링커의 길이, 탄성도 및/또는 다른 속성 (결정적이지는 않지만, ScFv 단편에 사용되는 경우에 일반적이므로)은 제한없이 CD123 및/또는 TCR, 또는 하나 이상의 다른 항원에 대한 친화성, 특이성 또는 화합력을 포함하여, 본 발명의 최종 폴리펩티드의 속성에 일부 영향을 가질 수 있다는 것이 본 발명의 범주에 포괄된다. 본 명세서에 개시된 내용을 기반으로, 당업자는 경우에 따라 일부 제한적인 통상의 실험 이후에, 본 발명의 특이적 폴리펩티드에서 사용을 위한 최적 링커(들)를 결정할 수 있을 것이다.

[1177] 예를 들어, 제1 및 제2 표적에 대해 유도된 빌딩 블록, ISV 또는 나노바디를 포함하는 본 발명의 다가 또는 다중특이적 폴리펩티드에서, 링커의 길이 및 탄성은 폴리펩티드에 존재하는 각각의 빌딩 블록, ISV 또는 나노바디가 이의 동족 표적, 예를 들어 표적 각각의 항원성 결정부에 결합할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 다시, 본 명세서에 개시된 내용을 기반으로, 당업자는 경우에 따라 일부 제한적인 통상의 실험 이후에, 본 발명의 특이적 폴리펩티드에서 사용을 위해 최적인 링커(들)를 결정할 수 있다.

[1178] 사용된 링커(들)가 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체에게 하나 이상의 다른 호의적인 속성 또는 작용성을 부여하고/하거나, 유도체의 형성 및/또는 작용기의 부착을 위한 하나 이상의 부위를 제공 (예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 유도체에 대해 본 명세서에 기술된 바와 같음)하는 것도 역시 본 발명의 범주 내이다. 예를 들어, 하나 이상의 하전된 아미노산 잔기를 함유하는 링커는 개선된 친수성 속성을 제공할 수 있는 한편, 소형 에피토프 또는 태그를 형성하거나 또는 함유하는 링커는 검출, 동정 및/또는 정제의 목적을 위해 사용될 수 있다. 다시, 본 명세서의 개시 내용을 기반으로, 당업자가 경우에 따라 일부 제한적인 통상의 실험 이후에, 본 발명의 특이적 폴리펩티드 또는 구성체에서 사용을 위한 최적 링커를 결정할 수 있게 될 것이다.

[1179] 마지막으로, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체에서 둘 이상의 링커가 사용될 때, 이들 링커는 동일할 수 있거나 또는 상이할 수 있다. 다시, 본 명세서의 개시 내용을 기반으로, 당업자는 일부 제한적인 통상의 실험 이후에, 본 발명의 특이적 폴리펩티드 또는 구성체에 사용을 위해 최적인 링커를 결정할 수 있게 될 것이다.

[1180] 일반적으로, 발현 및 제조의 용이함을 위해서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 선형 폴리펩티드이게 될 것이다. 그러나, 가장 넓은 의미에서 본 발명은 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드가 셋 이상의 아민산 서열, ISV 또는 나노바디를 포함할 때, 셋 이상의 "팔대부"를 갖는 링커의 사용을 통해 그들을 연결시키는 것이 가능하고, 이러한 각각의 "팔대부"는 "성상-형태 구성체를 제공하기 위해서, 아미노산 서열, ISV 또는 나노바디에 연결된다. 또한, 일반적으로 덜 바람직하더라도, 원형 구성체를 사용하는 것도 가능하다.

[1181] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩티드에 관한 것으로서, 상기 제1 ISV 및 상기 제2 ISV 및 가능하게 상기 제3 ISV 및/또는 상기 ISV 결합 혈청 알부민은 서로 직접 연결되거나 또는 링커를 통해서 연결된다.

[1182] 본 발명은 또한 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 본 발명의 폴리펩티드를 포함하고, 태그 또는 다른 기능성 모이어티, 예를 들어 독소, 표지, 방사성화학물 등을 더 포함하는 구성체를 포괄한다.

[1183] 대안적으로, 추가의 기, 잔기, 모이어티 또는 결합 유닛은 예를 들어 그 자체로 생물학적으로 및/또는 약학적으로 활성일 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있는 화학기, 잔기, 모이어티일 수 있다. 예를 들어, 제한없이, 이러한 기는 본 발명의 폴리펩티드의 "유도체"를 제공하기 위해서 둘 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 1

가 폴리펩티드에 연결될 수 있다.

[1184] 따라서, 본 발명은 이의 가장 넓은 의미에서, 또한 본 발명의 폴리펩티드의 유도체를 포함한다. 이러한 유도체는 일반적으로 본 발명의 폴리펩티드, 및/또는 본 발명의 폴리펩티드를 형성하는 하나 이상의 아미노산 잔기의 변형, 특히 화학적 및/또는 생물학적 (예를 들어, 효소적) 변형에 의해 수득될 수 있다.

[1185] 이러한 변형의 예를 비롯하여, 이러한 방식으로 변형될 수 있는 폴리펩티드 서열 내 아미노산 잔기 (단백질 골격이지만 바람직하게 측쇄), 이러한 변형을 도입시키는데 사용될 수 있는 방법 및 기술 및 이러한 변형의 잠재적인 용도 및 장점의 예는 당업자에게 분명해질 것이다 (또한 [Zangi et al. 2013, Nat. biotechnol . 31: 898-907] 참조).

[1186] 예를 들어, 이러한 변형은 본 발명의 폴리펩티드, 및 특히 본 발명의 폴리펩티드에 하나 이상의 바람직한 속성 또는 작용성을 부여하는 하나 이상의 작용기, 잔기 또는 모이어티의 도입 (예를 들어, 공유 연결 또는 임의의 다른 적합한 방식으로)을 포함할 수 있다. 이러한 작용기의 예는 당업자에게 분명할 것이다.

[1187] 예를 들어, 예컨대 변형은 본 발명의 폴리펩티드의 반감기, 가용성 및/또는 흡수를 증가시키거나, 본 발명의 폴리펩티드의 면역원성 및/또는 독성을 감소시키거나, 본 발명의 폴리펩티드의 임의의 비바람직한 부작용을 제거 또는 약독화시키거나, 본 발명의 폴리펩티드에 다른 유리한 속성을 부여하고/하거나 비바람직한 속성을 감소시키거나; 또는 이들 중 둘 이상의 임의 조합인 하나 이상의 작용기의 도입 (예를 들어, 공유 결합 또는 임의의 다른 적합한 방식에 의함)을 포함할 수 있다. 이러한 작용기 및 그들을 도입시키기 위한 기술의 예는 당업자에게 분명해질 것이고, 일반적으로 상기 본 명세서에 인용된 일반 배경 기술에서 언급되는 모든 작용기 및 기술을 비롯하여, 약학 단백질의 변형, 및 특히 항체 또는 항체 단편 (ScFv 및 단일 도메인 항체 포함)의 변형을 위한 그 자체로 공지된 작용기 및 기술을 포함할 수 있고, 예를 들어 문헌 [Remington (1980, Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1980)]을 참조한다. 이러한 작용기는 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드에 직접적으로 (예를 들어, 공유적으로) 연결될 수 있거나, 또는 경우에 따라 당업자에게 역시 분명해질 것인, 적합한 링커 또는 스페이서를 통해 연결될 수 있다.

[1188] 특정한 일례는 본 발명의 폴리펩티드의 유도체이고, 본 발명의 폴리펩티드는 이의 반감기를 증가시키도록 화학적으로 변형시켰다 (예를 들어, PEG화에 의함). 이것은 약학 단백질의 면역원성 감소 및/또는 반감기 증가를 위한 가장 광범위하게 사용되는 기술 중 하나이고, 적합한 약학적으로 허용되는 중합체, 예컨대 폴리(에틸렌글리콜) (PEG) 또는 이의 유도체 (예컨대 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 또는 mPEG)의 부착을 포함한다. 일반적으로, PEG화의 임의의 적합한 형태, 예컨대 항체 및 항체 단편 (제한없이 (단일) 도메인 항체 및 ScFv 포함)에 대해 당분야에서 사용되는 PEG화가 사용될 수 있고; 예를 들어, [Chapman (2002, Nat. Biotechnol. 54: 531-545)], [Veronese and Harris (2003, Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 453-456)], [Harris and Chess (2003, Nat. Rev. Drug. Discov. 2: 214-221)] 및 WO 04/060965를 참조한다. 단백질의 PEG와를 위한 다양한 시약이 또한 예를 들어 Nektar Therapeutics, USA에서 상업적으로 입수가능하다.

[1189] 바람직하게, 특히 시스테인-잔기를 통해서 부위-지정 PEG가 사용된다 (예를 들어 [Yang et al. (2003, Protein Engineering 16: 761-770)] 참조). 예를 들어, 이러한 목적을 위해, PEG는 본 발명의 폴리펩티드에서 천연적으로 발생된 시스테인 잔기에 부착될 수 있고, 본 발명의 폴리펩티드는 PEG의 부착을 위해 하나 이상의 시스테인 잔기를 적합하게 도입시키기 위해 변형될 수 있거나, 또는 PEG의 부착을 위해 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 아미노산 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 N-말단 및/또는 C-말단에 융합될 수 있으며, 모든 사용되는 단백질 조작 기술은 그 자체로 당업자에게 공지되어 있다.

[1190] 바람직하게, 본 발명의 폴리펩티드의 경우에, PEG는 5000 초과, 예컨대 10,000 초과 및 200,000 미만, 예컨대 100,000 미만; 예를 들어 20,000-80,000 범위의 분자량으로 사용된다.

[1191] 다른, 일반적으로 덜 바람직한 변형은 본 발명의 폴리펩티드를 발현하기 위해 사용되는 숙주 세포에 따라서, 일반적으로 번역 동시 및/또는 번역 후 변형의 일부로서, N-연결 또는 O-연결 글리코실화를 포함한다.

[1192] 역시 다른 변형은 표지된 본 발명의 폴리펩티드의 의도하는 용도에 따라서, 하나 이상의 검출가능한 표지 또는 다른 신호-발생 기 또는 모이어티의 도입을 포함할 수 있다. 그들을 부착하고, 사용하고 검출하기 위한 적합한 표지 및 기술은 당업자에게 분명해질 것이고, 예를 들어 제한없이, 형광성 표지 (예컨대, 플루오레세인, 이소티오시아네이트, 로다민, 파이코에리쓰린, 파이코시아닌, 알로파이코시아닌, o-프탈알데히드, 및 플루오레스아민 및 형광 금속 예컨대 ^{152}Eu 또는 란탄 계열의 다른 금속), 인광성 표지, 화학발광 표지 또는 생물발광 표지 (예컨대 루미날, 이소루미놀, 써로마틱 (theromatic) 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 염, 옥살레이트

에스테르, 디옥세탄 또는 GFP 및 이의 유사체), 방사성 동위원소 (예컨대 ^{3}H, ^{125}I, ^{32}P, ^{35}S, ^{14}C, ^{51}Cr, ^{36}Cl, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, 및 ^{75}Se), 금속, 금속 킬레이트 또는 금속성 양이온 (예를 들어 금속성 양이온 예컨대 ^{99m}Tc, ^{123}I, ^{111}In, ^{131}I, ^{97}Ru, ^{67}Cu, ^{67}Ga, 및 ^{68}Ga 또는 생체 내, 시험관 내 또는 제자리 진단 및 이미지화에서 사용에 특히 적합한 다른 금속 또는 금속성 양이온 (^{157}Gd, ^{55}Mn, ^{162}Dy, ^{52}Cr, 및 ^{56}Fe))을 비롯하여, 발색단 및 효소 (예컨대 말레이트 디히드로게나제, 스타필로코커스 뉴클레아제, 델타-V-스테로이드 이소머라제, 효모 알콜 디히드로게나제, 알파-글리세로포스페이트 디히드로게나제, 트리오스 포스페이트 이소머라제, 바이오티나비딘 퍼옥시다제, 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, 아스파라기나제, 글루코스 옥시다제, β-갈락토시다제, 리보뉴클레아제, 우레아제, 카탈라제, 글루코스-VI-포스페이트 디히드로게나제, 글루코아밀라제 및 아세틸콜린 에스터라제)를 포함한다. 다른 적합한 표지는 당업자에게 분명해질 것이고, 예를 들어 NMR 또는 ESR 분광계를 사용해 검출할 수 있는 모이어티를 포함한다.

[1193] 본 발명의 이러한 표지된 폴리펩티드는 특별한 표지의 선택에 따라서, 예를 들어 시험관 내, 생체 내 또는 제자리 어세이 (그 자체로 공지된 면역어세이 예컨대 ELISA, RIA, EIA 및 다른 "샌드위치 어세이" 등 포함)를 비롯하여, 생체 내 진단 및 이미지화 목적을 위해 사용될 수 있다.

[1194] 당업자에게 분명하게 되는 바와 같이, 다른 변형은 예를 들어 상기 언급된 금속 또는 금속성 양이온 중 하나를 킬레이트하기 위해서, 킬레이트화 기의 도입을 포함할 수 있다. 적합한 킬레이트화 기는 예를 들어 제한없이 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)을 포함한다.

[1195] 또 다른 변형은 특별한 결합쌍, 예컨대 바이오틴-(스트렙트)아비딘 결합쌍의 일부분인 작용기의 도입을 포함할 수 있다. 이러한 작용기는 결합쌍의 나머지 절반에 결합하는, 즉 결합쌍의 형성을 통해서 다른 단백질, 폴리펩티드 또는 화학적 화합물에 본 발명의 폴리펩티드를 연결시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드는 바이오틴에 접합될 수 있고, 아비딘 또는 스트렙타비딘에 접합된 다른 단백질, 폴리펩티드, 화합물 또는 담체에 연결될 수 있다. 예를 들어, 이러한 접합된 본 발명의 폴리펩티드는 예를 들어 검출가능한 신호-생성 작용제가 아비딘 또는 스트렙타비딘에 접합된 진단 시스템에서 리포터로서 사용될 수 있다. 이러한 결합쌍은 예를 들어 또한 약학 목적에 적합한 담체를 포함하는, 담체에 본 발명의 폴리펩티드를 결합시키는데 사용될 수 있다. 비제한적인 일례는 Cao 및 Suresh (2000, Journal of Drug Targeting 8: 257)가 기술한 리포솜 형성이다. 이러한 결합쌍은 또한 본 발명의 폴리펩티드에 치료적 활성제를 연결시키는데 사용될 수도 있다.

[1196] 다른 가능한 화학적 및 효소적 변형은 당업자에게 자명할 것이다. 이러한 변형은 또한 연구 목적 (예를 들어, 기능-활성 관련성의 연구)을 위해 도입될 수도 있다. 예를 들어, [Lundblad and Bradshaw (1997, Biotechnol. Appl. Biochem. 26: 143-151)]를 참조한다.

[1197] 바람직하게, 유도체는 그들이 본 명세서에 정의된 바와 같은 (즉, 본 발명의 폴리펩티드에 대해 정의된 바와 같은) 친화성 (본 명세서에서 더욱 기술하는 바와 같이, K_D-값 (실제 또는 겉보기), K_A-값 (실제 또는 겉보기), k_{on}-속도 및/또는 k_{off}-속도, 또는 대안적으로 IC_{50} 값으로 적합하게 측정 및/또는 표시)으로 CD123 및/또는 TCR에 결합하도록 한다.

[1198] 본 발명의 이러한 폴리펩티드 및 이의 유도체는 또한 실질적으로 단리된 형태로서 존재할 수도 있다 (본 명세서에 정의된 바와 같음).

[1199] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 폴리펩티드, 핵산, 숙주 세포 및 조성물을 제조하기 위한 방법에 관한 것이다.

[1200] 본 발명의 폴리펩티드 및 구성체는 본 명세서의 추가 설명으로부터 당업자에게 분명해지는 바와 같이, 그 자체로 공지된 방식으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 및 구성체는 항체의 제조, 특히 항체 단편 (제한없이 (단일) 도메인 항체 및 ScFv 단편 포함)의 제조를 위해 그 자체로 공지된 임의의 방식으로 제조될 수 있다. 폴리펩티드, 구성체 및 핵산을 제조하기 위한 일부 바람직하지만, 비제한적인 방법은 본 명세서에 기술된 방법 및 기술을 포함한다.

[1201] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체(이를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 얻을 수 있음)를 제조하기 위한 방법은 하기 단계들을 포함할 수 있다:

[1202] - 적합한 유기 세포 또는 숙주 유기체 (본 명세서에서 또한 "*본 발명의 숙주*"라고도 함")에서 또는 다른 적합한 발현 시스템에서 본 발명의 상기 폴리펩티드 또는 구성체 (본 명세서에서 또한 "*본 발명의 핵산*"이라고도 함)를

발현시키는 단계,

[1203] 경우에 따라 후속하여,

[1204] - 이렇게 수득된 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체를 단리 및/또는 정제하는 단계.

[1205] 특히, 이러한 방법은

[1206] - 본 발명의 상기 숙주가 본 발명의 적어도 하나의 폴리펩티드 또는 구성체(이를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 얻을 수 있음)를 발현 및/또는 생성시키도록 하는 조건 하에서 본 발명의 숙주를 배양 및/또는 유지시키는 단계;

[1207] 경우에 따라 후속하여,

[1208] - 이렇게 수득된 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체를 단리 및/또는 정제하는 단계

[1209] 를 포함할 수도 있다.

[1210] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체(이를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 얻을 수 있음)를 코딩하는 핵산 또는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다 (본 명세서에서 또한 "*본 발명의 핵산*"이라고 함). 본 발명의 핵산은 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA의 형태일 수 있고, 바람직하게 이중 가닥 DNA의 형태이다. 예를 들어, 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 게놈 DNA, cDNA 또는 합성 DNA (예컨대 의도하는 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 발현을 위해 특별히 적합화된 코돈 용법에 의한 DNA)일 수 있다.

[1211] 본 발명의 일 측면에 따라서, 본 발명의 핵산은 본 명세서에 정의된 바와 같이, 실질적으로 단리된 형태이다. 본 발명의 핵산은 또한 역시 실질적으로 단리된 형태일 수 있는, 벡터, 예컨대 플라스미드, 코스미드 또는 YAC의 형태일 수 있고/있거나, 그것으로 존재할 수 있고/있거나 그의 일부일 수도 있다.

[1212] 본 발명의 핵산은 본 명세서에 제공되는 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체(이를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 얻을 수 있음)에 대한 정보를 기반으로, 그 자체로 공지된 방식으로 제조 또는 수득될 수 있고/있거나 적합한 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 또한, 당업자에게 자명한 바와 같이, 본 발명의 핵산을 제조하기 위해서, 역시 몇몇 뉴클레오티드 서열, 예컨대 본 발명의 면역글로불린 단일 가변 도메인을 코딩하는 적어도 하나의 뉴클레오티드 서열 및 예를 들어 하나 이상의 링커를 코딩하는 핵산은 적합한 방식으로 함께 연결될 수 있다.

[1213] 본 발명의 핵산을 생성시키기 위한 기술은 당업자에게 분명해 질 것이고 예를 들어 제한없이 자동화 DNA 합성; 부위-지정 돌연변이유발법; 둘 이상의 천연 발생 및/또는 합성 서열 (또는 이의 둘 이상의 일부분)의 조합, 절두형 발현 생성물이 생성되는 돌연변이의 도입; 하나 이상의 제한 효소 부위의 도입 (예를 들어, 적합한 제한 효소를 사용해 쉽게 분해 및/또는 결찰할 수 있는 카세트 및/또는 영역의 생성을 위함), 및/또는 하나 이상의 "미스매치" 프라이머를 사용하는 PCR 방법에 의한 돌연변이의 도입을 포함한다. 이들 및 다른 기술은 당업자에게 분명해 질 것이고, 역시 상기 언급된 표준 안내서, 예컨대 [Sambrook et al.] 및 [Ausubel et al.]를 비롯하여, 하기 실시예를 참조한다.

[1214] 본 발명의 핵산은 또한 당업자에게 분명해지는 바와 같이, 유전자 구성체의 형태일 수 있고/있거나, 그로 존재할 수 있고/있거나, 그의 일부일 수 있다. 이러한 유전자 구성체는 일반적으로 그 자체로 공지된 유전자 구성체의 하나 이상의 엘리먼트, 예컨대 예를 들어 하나 이상의 적합한 조절 엘리먼트 (예컨대, 적합한 프로모터(들), 인핸서(들), 종결인자(들) 등) 및 본 명세서에 언급된 유전자 구성체의 추가 엘리먼트에 연결되는 본 발명의 적어도 하나의 핵산을 포함한다. 본 발명의 적어도 하나의 핵산을 포함하는 이러한 유전자 구성체는 또한 본 명세서에서 "*본 발명의 유전자 구성체*"라고 하게 될 것이다.

[1215] 본 발명의 유전자 구성체는 DNA 또는 RNA일 수 있고, 바람직하게 이중-가닥 DNA이다. 본 발명의 유전자 구성체는 또한 의도하는 숙주 세포의 게놈 DNA로 통합에 적합한 형태, 또는 의도하는 숙주 유기체의 독립적인 복제, 유지 및/또는 유전에 적합한 형태로, 의도하는 숙주 세포 또는 숙주 유기체의 형질전환에 적합한 형태일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 유전자 구성체는 벡터, 예컨대 예를 들어 플라스미드, 코스미드, YAC, 바이러스 벡터 또는 트랜스포존의 형태일 수 있다. 특히, 벡터는 발현 벡터, 즉 시험관 내 및/또는 생체 내 (예를 들어, 적합한 숙주 세포, 숙주 유기체 및/또는 발현 시스템)에서 발현을 위해 제공될 수 있는 벡터일 수 있다.

[1216] 바람직하지만 비제한적인 측면에서, 본 발명의 유전자 구성체는

[1217] a) 하기 b)에 작동적으로 연결된, 본 발명의 적어도 하나의 핵산;

[1218] b) 하나 이상의 조절 엘리먼트, 예컨대 프로모터 및 경우에 따라 적합한 종결인자;

[1219] 및 경우에 따라 또한

[1220] c) 그 자체로 공지된 유전자 구성체의 하나 이상의 추가 엘리먼트

[1221] 를 포함하고,

[1222] 여기서 용어 "조절 엘리먼트", "프로모터", "종결인자" 및 "작동적으로 연결된"은 당분야 (본 명세서에서 더욱기 술된 바와 같음)에서 그들의 일반적인 의미를 가지며; 상기 유전자 구성체에 존재하는 "추가 엘리먼트"는 예를 들어 3'-UTR 또는 5'-UTR 서열, 리더 서열, 선별 마커, 발현 마커/리포터 유전자, 및/또는 형질전환 또는 통합 (의 효율)을 증가 또는 촉진시킬 수 있는 엘리먼트일 수 있다. 이러한 유전자 구성체를 위한 이들 및 다른 적합한 엘리먼트는 당업자에게 분명해 질 것이고, 예를 들어 사용되는 구성체의 유형; 의도하는 숙주 세포 또는 숙주 유기체; 본 발명의 관심 뉴클레오티드 서열이 발현되는 방식 (예를 들어, 항상성, 일시적 또는 유도성 발현을 통함); 및/또는 사용하려는 형질전환 기술에 따라 좌우될 수 있다. 예를 들어, 항체 및 항체 단편 (제한없이 (단일) 도메인 항체 및 ScFv 단편)의 발현 및 제조를 위해 그 자체로 공지된 조절 서열, 프로모터 및 종결인자는 실질적으로 유사한 방식으로 사용될 수 있다.

[1223] 바람직하게, 본 발명의 유전자 구성체에서, 본 발명의 상기 적어도 하나의 핵산 및 상기 조절 엘리먼트, 및 경우에 따라 상기 하나 이상의 추가 엘리먼트는 서로 "작동적으로 연결"되고, 이것은 일반적으로 그들이 서로 기능적 관련성으로 존재한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터는 상기 프로모터가 코딩 서열의 전사 및/또는 발현을 개시할 수 있거나 또는 아니면 제어/조절할 수 있으면 코딩 서열에 "작동적으로 연결"된 것으로 간주된다 (여기서 상기 코딩 서열은 상기 프로모터"의 제어 하"에 있어야 함). 일반적으로, 2개 뉴클레오티드 서열이 작동적으로 연결되면, 그들은 동일한 배향이게 될 것이고, 일반적으로 또한 동일한 리딩 프레임일 것이다. 그들은 일반적으로 또한 역시 필수적이지는 않지만, 실질적으로 인접하게 될 것이다.

[1224] 바람직하게, 본 발명의 유전자 구성체의 조절 및 추가 엘리먼트는 그들이 의도하는 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 그들의 의도하는 생물학적 기능을 제공할 수 있도록 한다.

[1225] 예를 들어, 프로모터, 인핸서 또는 종결인자는 의도하는 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 "작동가능"해야 하고, 이것은 (예를 들어) 상기 프로모터가 (본 명세서에 정의된 바와 같이) 작동적으로 연결된 뉴클레오티드 서열 -예를 들어, 코딩 서열 -의 전사 및/또는 발현을 개시할 수 있어야 하거나 또는 아니면 제어/조절할 수 있어야 한다는 의미이다.

[1226] 일부 특히 바람직한 프로모터는 제한없이, 본 명세서에서 언급된 숙주 세포에서 발현을 위해 그 자체로 공지된 프로모터; 및 특히 본 명세서에 언급된 것 및/또는 실시예에서 사용된 것과 같은, 박테리아 또는 효모 세포에서 발현을 위한 프로모터를 포함한다.

[1227] 선별 마커는 - 즉, 적절한 선별 조건 하에서 - 본 발명의 뉴클레오티드 서열에 의해 (성공적으로) 형질전환된 숙주 세포 및/또는 숙주 유기체를 (성공적으로) 형질전환되지 않은 숙주 세포/유기체와 구별할 수 있게 해야 한다. 이러한 마커의 일부 바람직하지만, 비제한적인 예는 항생제 (예컨대 카나마이신 또는 암피실린)에 대한 내성을 제공하는 유전자, 온도 내성을 제공하는 유전자, 또는 비형질전환 세포 또는 유기체의 생존에 필수적인 배지 내 일정 인자, 화합물 및/또는 (먹이) 성분의 부재 하에서 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 유지시킬 수 있는 유전자이다.

[1228] 리더 서열은 - 의도하는 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 - 바람직한 번역 후 변형을 가능하게 해야 하고/하거나 전사된 mRNA가 세포의 바람직한 부분 또는 세포내 소기관으로 지정되게 해야 한다. 리더 서열은 또한 상기 세포로부터 발현 생성물의 분비를 가능하게 할 수도 있다. 그리하여, 리더 서열은 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 작동가능한 임의의 프로-, 프리- 또는 프리프로-서열일 수 있다. 리더 서열은 박테리아 세포에서의 발현에는 요구되지 않을 수 있다. 예를 들어, 항체 및 항체 단편 (제한없이, 단일 도메인 항체 및 ScFv 단편 포함)의 발현 및 생성을 위해 그 자체로 공지된 리더 서열은 실질적으로 유사한 방식으로 사용될 수 있다.

[1229] 발현 마커 또는 리포터 유전자는 - 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 - 유전자 구성체 (이에 존재하는 유전자 또는 뉴클레오티드 서열)의 발현의 검출을 가능하게 해야 한다. 발현 마커는 경우에 따라 또한 예를 들어, 세포의 특별한 부분 또는 세포내 소기관 및/또는 다세포 유기체의 (하나의) 특별한 세포(들), 조직(들), 장기(들) 또는 부분(들)에, 발현된 생성물의 국재화를 가능하게 할 수 있다. 이러한 리포트 유전자는 또한 본 발명의 ISV, 폴리펩티드 또는 구성체와의 단백질 융합체로서 발현될 수도 있다. 일부 바람직하지만, 비제한적인 예는 형광 단

백질 예컨대 GFP를 포함한다.

[1230] 적합한 프로모터, 종결인자 및 추가의 엘리먼트의 일부 바람직하지만, 비제한적인 예는 본 명세서에 언급된 숙주 세포에서 발현을 위해 사용될 수 있는 것; 및 특히 박테리아 또는 효모 세포에서 발현에 적합한 것, 예컨대 본 명세서에 언급된 것 및/또는 하기 실시예에서 사용된 것을 포함한다. 본 발명의 유전자 구성체에서 존재/사용할 수 있는 프로모터, 선별 마커, 리더 서열, 발현 마커 및 추가 엘리먼트 - 예컨대 종결인자, 전사 및/또는 번역 인핸서 및/또는 통합 인자 - 의 일부 (추가)의 비제한적인 예는 일반 안내서 예컨대 상기 언급된 [Sambrook et al.] 및 [Ausubel et al.]를 비롯하여, WO 95/07463, WO 96/23810, WO 95/07463, WO 95/21191, WO 97/11094, WO 97/42320, WO 98/06737, WO 98/21355, US 7,207,410, US 5,693,492 및 EP 1085089에 제공되는 실시예를 참조한다. 다른 예는 당업자에게 분명해질 것이다. 또한 상기 언급된 일반 배경 기술 및 본 명세서에 인용된 추가 참조 문헌을 참조한다.

[1231] 본 발명의 유전자 구성체는 일반적으로 예를 들어 일반 안내서, 예컨대 상기 언급된 [Sambrook et al.] 및 [Ausubel et al.]에 기술된 기술을 사용하여, 상기 기술된 하나 이상의 추가 엘리먼트에 본 발명의 뉴클레오티드 서열(들)을 적합하게 연결시켜 제공될 수 있다.

[1232] 종종, 본 발명의 유전자 구성체는 그 자체로 공지된 적합한 (발현) 벡터에 본 발명의 뉴클레오티드 서열을 삽입시켜 수득될 것이다. 적합한 발현 벡터의 일부 바람직하지만, 비제한적인 예는 하기 실시예에 사용된 것을 비롯하여, 본 명세서에 언급된 것들이다.

[1233] 본 발명의 핵산 및/또는 본 발명의 유전자 구성체는 즉, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체(이를 코딩하는 핵산의 발현에 의해 얻을 수 있음)의 발현 및/또는 생성을 위해서, 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 형질전환시키는데 사용될 수 있다. 숙주는 바람직하게 인간이외의 숙주이다. 적합한 숙주 또는 숙주 세포는 당업자에게 분명해질 것이고, 예를 들어 임의의 적합한 진균, 원핵생물 또는 진핵생물 세포 또는 세포주 또는 임의의 적합한 진균, 원핵생물 또는 (인간이외의) 진핵생물 유기체일 수 있고, 예를 들어, 다음과 같다:

[1234] - 제한없이 그람-음성 균주 예컨대 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*), 프로테우스 (*Proteus*), 예를 들어 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*); 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 예를 들어 슈도모나스 플루오레센스 (*Pseudomonas fluorescens*)의 균주; 및 그람-양성 균주 예컨대 바실러스 (*Bacillus*), 예를 들어 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 브레비스 (*Bacillus brevis*)의 균주; 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 예를 들어 스트렙토마이세스 리비단스 (*Streptomyces lividans*)의 균주; 스타필로코커스 (*Staphylococcus*), 예를 들어 스타필로코커스 카르노서스 (*Staphylococcus carnosus*)의 균주; 및 락토코커스 (*Lactococcus*), 예를 들어 락토코커스 락티스 (*Lactococcus lactis*)의 균주를 포함하는 박테리아 균주;

[1235] - 트리코더마 (*Trichoderma*) 종, 예를 들어 트리코더마 레에세이 (*Trichoderma reesei*); 뉴로스포라 (*Neurospora*) 종, 예를 들어 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*); 솔다리아 (*Sordaria*) 종, 예를 들어 솔다리아 마크로스포라 (*Sordaria macrospora*); 아스퍼질러스 (*Aspergillus*) 종, 예를 들어 아스퍼질러스 니거 (*Aspergillus niger*) 또는 아스퍼질러스 소자에 (*Aspergillus sojae*); 또는 다른 사상성 진균 유래의 세포를 포함하는 진균 세포;

[1236] - 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 종, 예를 들어 사카로마이세스 세레비지아 (*Saccharomyces cerevisiae*); 스키조사카로마이세스 (*Schizosaccharomyces*) 종, 예를 들어 스키조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*); 피키아 (*Pichia*) 종, 예를 들어 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) 또는 피키아 메타놀리카 (*Pichia methanolica*); 한세눌라 (*Hansenula*) 종, 예를 들어 한세눌라 폴리모파 (*Hansenula polymorpha*); 글루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) 종, 예를 들어 글루이베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*); 아르술라 (*Arxula*) 종, 예를 들어 아르술라 아데닌니보란스 (*Arxula adeninivorans*); 야로위아 (*Yarrowia*) 종, 예를 들어 야로위아 리포리티카 (*Yarrowia lipolytica*) 유래 세포를 포함하는 효모 세포;

[1237] - 양서류 세포 또는 세포주, 예컨대 제노푸스 우사이테스 (*Xenopus oocytes*);

[1238] - 곤충-유래 세포 또는 세포주, 예컨대 제한없이 스포돕테라 (*Spodoptera*) SF9 및 Sf21 세포 또는 드로소필라 (*Drosophila*) 유래 세포/세포주, 예컨대 Schneider 및 Kc 세포를 포함하는, 인시류 유래 세포/세포주;

[1239] - 식물 또는 식물 세포, 예를 들어 담배 식물의 것; 및/또는

[1240] - 포유동물 세포 또는 세포주, 예를 들어 인간 유래 세포 또는 세포주, 제한없이 CHO-세포, BHK-세포 (예를 들어 BHK-21 세포) 및 인간 세포 또는 세포주 예컨대 HeLa, COS (예를 들어 COS-7) 및 PER.C6 세포를 포함하는

포유동물 유래 세포 또는 세포주를 비롯하여,

[1241] 당업자에게 분명해지게 되는, 항체 및 항체 단편 (제한없이 (단일) 도메인 항체 및 ScFv 단편 포함)의 발현 및 생성을 위해 그 자체로 공지된 모든 다른 숙주 세포 또는 (인간이외의) 숙주. 또한 상기 인용된 일반 배경 기술을 비롯하여, 예를 들어 WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; [Frenken et al. (1998, Res Immunol. 149: 589-599)]; [Riechmann and Muyldermans (1999), 상동]; [van der Linden (2000, J. Biotechnol. 80: 261-270)]; [Joosten et al. (2003, Microb. Cell Fact. 2: 1)]; [Joosten et al. 2005, (Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 384-392)]; 및 본 명세서에 인용된 추가 참조 문헌을 참조한다.

[1242] 폴리펩티드s 또는 본 발명의 구성체는 또한 예를 들어 WO 94/02610, WO 95/22618 및 US 7,004,940; WO 03/014960; [Cattaneo and Biocca (1997, Intracellular Antibodies: Development and Applications" Landes and Springer-Verlag)]; 및 [Kontermann (2004, Methods 34: 163-170)]에 기술된 바와 같은, 소위 "인트라바디"로서 발현될 수도 있다.

[1243] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 예를 들어, 또한 유전자이식 포유동물의 유액에서, 예를 들어, 토끼, 소, 염소 또는 양의 유액에서 (예를 들어, 포유동물에 이식유전자를 도입하기 위한 일반 기술의 경우 US 6,741,957, US 6,304,489 및 US 6,849,992 참조), 제한없이 그들 잎, 꽃, 열매, 종자, 뿌리 또는 괴경 (예를 들어, 담배, 옥수수, 대두 또는 알팔파)을 포함하는 식물 또는 식물의 일부에서 또는 예를 들어 누에 봄빅스 모리 (*Bombix mori*)의 번데기에서 생성될 수 있다.

[1244] 뿐만 아니라, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 또한 세포-무함유 발현 시스템에서 발현 및/또는 생성시킬 수 있고, 이러한 시스템의 적합한 예는 당업자에게 분명해질 것이다. 일부 바람직하지만, 비제한적인 예는 맥아 시스템; 토끼 망상적혈구 용해물; 또는 이. 콜라이 Zubay 시스템에서의 발현을 포함한다.

[1245] 바람직하게, 본 발명에서, (생체 내 또는 시험관 내) 발현 시스템, 예컨대 박테리아 발현 시스템은 약학 용도에 적합한 형태로 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체를 제공하는 것이 사용되고, 이러한 발현 시스템은 역시 당업자에게 분명하게 될 것이다. 또한 당업자에게 분명하게 되는 바와 같이, 약학 용도에 적합한 폴리펩티드 또는 본 발명의 구성체는 펩티드 합성을 위한 기술을 사용해 제조될 수 있다.

[1246] 산업적 규모로 생산을 위해서, 면역글로불린 단일 가변 도메인 또는 면역글로불린 단일 가변 도메인-함유 폴리펩티드 치료제의 (산업적) 생산을 위해 바람직한 이종성 숙주는 대규모 발현/생산/발효, 및 특히 대규모 약학 발현/생산/발효를 위해 적합한 이. 콜라이, 피키아 파스토리스, 에스. 세레비지아의 균주를 포함한다. 이러한 균주의 적합한 예는 당업자에게 분명해질 것이다. 이러한 균주 및 생산/발현 시스템은 또한 Biovitrum (Uppsala, Sweden)와 같은 회사를 통해 이용가능하다.

[1247] 대안적으로, 포유동물 세포주, 특히 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포가 대규모 발현/생산/발효, 및 특히 대규모 약학 발현/생산/발효에 사용될 수 있다. 역시, 이러한 발현/생산 시스템이 또한 상기 언급된 일부 회사에 의해 이용가능하다.

[1248] 특별한 발현 시스템의 선택은 일부 번역후 변형, 보다 특히 글리코실화에 대한 요건에 부분적으로 의존적일 수 있다. 글리코실화가 바람직하거나 또는 요구되는 면역글로불린 단일 가변 도메인-함유 재조합 단백질의 생산은 발현된 단백질을 글리코실화시키는 능력을 갖는 포유동물 발현 숙주의 사용을 필요로 하게 된다. 이와 관련하여, 수득된 글리코실화 패턴 (즉, 부착된 잔기의 종류, 개수 및 위치)은 발현에 사용되는 세포 또는 세포주에 의존적이게 될 것이라는 것은 당업자에게 자명하게 될 것이다. 바람직하게, 인간 세포 또는 세포주가 사용되거나 (즉, 실질적으로 인간 글리코실화 패턴을 갖는 단백질을 야기) 또는 실질적으로 및/또는 기능적으로 인간 글리코실화와 동일하거나 또는 인간 글리코실화를 적어도 모방하는 글리코실화 패턴을 제공할 수 있는 다른 포유동물 세포주가 사용된다. 일반적으로, 원핵생물 숙주 예컨대 이. 콜라이는 단백질을 글리코실화시키는 능력을 갖지 않으며, 저급 진핵생물 예컨대 효모의 사용은 일반적으로 인간 글리코실화와 상이한 글리코실화 패턴을 초래한다. 그럼에도 불구하고, 모든 전술한 숙주 세포 및 발현 시스템은 수득하려는 바람직한 폴리펩티드 또는 구성체에 의존적으로, 본 발명에서 사용될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[1249] 따라서, 본 발명의 비제한적인 일 측면에 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 글리코실화된다. 본 발명의 다른 비제한적인 측면에 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 비글리코실화된다.

[1250] 본 발명의 바람직하지만, 비제한적인 일 측면에 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 박테리아 세포, 특히 대규모 약학 생산에 적합한 박테리아 세포, 예컨대 상기 언급된 균주의 세포에서 생산된다.

[1251] 본 발명의 다른 바람직하지만, 비제한적인 측면에 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 효모 세포, 특히 대규모 약학 생산에 적합한 효모 세포, 예컨대 상기 언급된 종의 세포에서 생산된다.

[1252] 본 발명의 역시 다른 바람직하지만, 비제한적인 측면에 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 포유동물 세포, 특히 인간 세포 또는 인간 세포주의 세포, 보다 특히 대규모 약학 생산에 적합한 인간 세포 또는 인간 세포주, 예컨대 상기 본 명세서에 언급된 세포주의 세포에서 생산될 수 있다.

[1253] 숙주 세포에서 발현이 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체를 생산하는데 사용될 때, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 세포내 (예를 들어, 시토졸, 주변세포질 또는 봉입체)에서 생산된 후에 숙주 세포로부터 단리될 수 있고 경우에 따라 더욱 정제될 수 있거나; 또는 세포외 (예를 들어, 숙주 세포가 배양된 배지)에서 생산되어서 배양 배지로부터 단리되고 경우에 따라 더욱 정제될 수 있다. 진핵생물 숙주 세포가 사용될 때, 세포외 생산이 일반적으로 바람직한데 이것이 상당히 추가의 단리 및 수득된 폴리펩티드 또는 구성체의 후속 프로세싱을 용이하게 하기 때문이다. 상기 언급된 박테리아 세포 예컨대 이. 콜라이 균주는 소수의 단백질 부류 예컨대 독소 및 헤몰리신을 제외하고는, 정상적으로는 세포외로 단백질을 분비하지 않으며, 이. 콜라이의 분비 생산은 내막을 통해서 주변세포질 공간으로 단백질의 전좌를 의미한다. 주변세포질 생산은 시토졸 생산보다 몇몇 장점을 제공한다. 예를 들어, 분비된 생성물의 N-말단 아미노산 서열은 특별한 신호 펩티다제에 의한 분비 신호 서열의 절단 이후 천연 유전자 생성물과 동일할 수 있다. 또한, 세포질보다 주변세포질에서 프로테아제 활성을 훨씬 적게 보인다. 또한, 단백질 정제가 주변세포질 내 소수 오염 단백질에 기인하여 보다 단순하다. 다른 장점은 주변세포질이 세포질보다 더 산화성인 환경을 제공하기 때문에 올바른 디술파이드 결합이 형성될 수 있다는 것이다. 이. 콜라이에서 과발현되는 단백질은 종종 소위 봉입체라고 하는, 불용성 응집체로 존재한다. 이들 봉입체는 시토졸 또는 주변세포질에 위치될 수 있고; 이들 봉입체로부터 생물학적 활성 단백질의 회수는 변성/리폴딩 프로세스를 요구한다. 치료적 단백질을 포함하는 많은 재조합 단백질이 봉입체로부터 회수된다. 대안적으로, 당업자에게 분명해지는 바와 같이, 바람직한 단백질, 및 특히 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체를 분비하기 위해서 유전자 변형된 박테리아의 재조합 균주가 사용될 수 있다.

[1254] 따라서, 본 발명의 비제한적인 일 측면에 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 세포내에서 생산되고 숙주 세포, 및 특히 박테리아 세포 또는 박테리아 세포 내 봉입체로부터 단리된 폴리펩티드 또는 구성체이다. 본 발명의 다른 비제한적인 측면에 따라서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 세포외로 생산되고, 숙주 세포가 배양된 배지로부터 단리된 폴리펩티드 또는 구성체이다.

[1255] 이들 숙주 세포와 사용을 위한 일부 바람직하지만, 비제한적인 프로모터는 다음을 포함한다:

[1256] - 이. 콜라이에서 발현을 위한 경우: lac 프로모터 (및 이의 유도체 예컨대 lacUV5 프로모터); 아라비노스 프로모터; 파지 람다의 좌향 (PL) 및 우향 (PR) 프로모터; trp 오페론의 프로모터; 하이브리드 lac/trp 프로모터 (tac 및 trc); T7-프로모터 (보다 특히 T7-파지 유전자 10의 프로모터) 및 다른 T-파지 프로모터; Tn10 테트라사이클린 내성 유전자의 프로모터; 외래 조절 오퍼레이터 서열의 하나 이상의 카피를 포함하는 상기 프로모터의 조작 변이체;

[1257] - 에스. 세레비지아에서 발현을 위한 경우: ADH1 (알콜 디히드로게나제 1), ENO (에놀라제), CYC1 (사이토크롬 c iso-1), GAPDH (글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나제), PGK1 (포스포글리세레이트 키나제), PYK1 (피루베이트 키나제); 조절성: GAL1,10,7 (갈락토스 물질대사 효소), ADH2 (알콜 디히드로게나제 2), PHO5 (산 포스파타제), CUP1 (구리 메탈로티오네인); 이종성: CaMV (콜리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터);

[1258] - 피키아 파스토리스에서 발현을 위한 경우: AOX1 프로모터 (알콜 옥시다제 I);

[1259] - 포유동물 세포에서 발현을 위한 경우: 인간 사이토메갈로바이러스 (hCMV) 급초기 인핸서/프로모터; 프로모터가 Tet 리프레서에 의해 조절될 수 있도록 2개의 테트라사이클린 오퍼레이터 서열을 함유하는 인간 사이토메갈로바이러스 (hCMV) 급초기 프로모터 변이체; 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (TK) 프로모터; 라우스 육종 바이러스 긴 말단 반복부 (RSV LTR) 인핸서/프로모터; 인간, 침팬지, 마우스 또는 래트 유래의 연장 인자 1α (hEF-1α) 프로모터; SV40 초기 프로모터; HIV-1 긴 말단 반복부 프로모터; β-액틴 프로모터.

[1260] 이들 숙주 세포와 사용을 위한 일부 바람직하지만, 비제한적인 벡터는 다음을 포함한다:

[1261] - 포유동물 세포에서 발현을 위한 벡터: pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo (342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC37199), pRSVneo (ATCC37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460) 및 1ZD35

(ATCC 37565)를 비롯하여, 바이러스-기반 발현 시스템, 예컨대 아데노바이러스 기반의 것;

[1262] - 박테리아 세포에서 발현을 위한 벡터: pET 벡터 (Novagen) 및 pQE 벡터 (Qiagen);

[1263] - 효모 또는 다른 진균 세포에서 발현을 위한 벡터: pYES2 (Invitrogen) 및 피키아 발현 벡터 (Invitrogen);

[1264] - 곤충 세포에서 발현을 위한 벡터: pBlueBacII (Invitrogen) 및 다른 배큘로바이러스 벡터;

[1265] - 식물 또는 식물 세포에서 발현을 위한 벡터: 예를 들어 콜리플라워 모자이크 바이러스 또는 담배 모자이크 바이러스, 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)의 적합한 균주 기반의 벡터, 또는 Ti-플라스미드 기반 벡터.

[1266] 이들 숙주 세포와 사용을 위한 일부 바람직하지만, 비제한적인 분비 서열은 다음을 포함한다:

[1267] - 박테리아 세포 예컨대 이. 콜라이에서 사용을 위한 경우: PelB, Bla, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, StII, PhoA, PhoE, MalE, Lpp, LamB 등; TAT 신호 펩티드, 헤몰리신 C-말단 분비 신호;

[1268] - 효모에서 사용을 위한 경우: α-메이팅 인자 프리프로-서열, 포스파타제 (pho1), 인버타제 (Suc) 등;

[1269] - 포유동물 세포에서 사용을 위한 경우: 표적 단백질이 진핵생물 기원인 경우에 자생 신호; 쥣과동물 Ig κ-사슬 V-J2-C 신호 펩티드 등.

[1270] 본 발명의 숙주 또는 숙주 세포를 형질전환시키기 위한 적합한 기술은 당업자에게 자명해질 것이고 사용하려는 유전자 구성체 및 의도되는 숙주 세포/숙주 유기체에 의존적일 수 있다. 역시 상기 언급된 안내서 및 특허 출원을 참조한다.

[1271] 형질전환 이후에, 본 발명의 유전자 구성체/뉴클레오티드 서열로 성공적으로 형질전환된 숙주 세포 또는 숙주 유기체를 검출하고 선별하는 단계가 수행될 수 있다. 이것은 예를 들어 본 발명의 유전자 구성체에 존재하는 선별가능한 마커를 반으로 하는 선별 단계일 수 있거나 또는 예를 들어 특이적 항체를 사용하는, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체의 검출을 포함하는 단계일 수 있다.

[1272] 형질전환된 숙주 세포 (안정한 세포주 형태일 수 있음) 또는 숙주 유기체 (안정한 돌연변이체 종류 또는 품종의 형태일 수 있음)가 본 발명의 추가 측면을 형성한다.

[1273] 바람직하게, 이들 숙주 또는 숙주 유기체는 그들이 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체를 (예를 들어, 적합한 조건 하에서) (숙주 유기체의 경우: 이의 적어도 하나의 세포, 부분, 조직 또는 장기에서) 발현하거나 또는 (적어도) 발현할 수 있게 한다. 또한 본 발명은 예를 들어 세포 분열 또는 유성 또는 무성 복제에 의해 수득될 수 있는, 본 발명의 숙주 세포 또는 숙주 유기체의 후속 세대, 자손 및/또는 자식을 포함한다.

[1274] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체를 발현 (또는 적합한 상황 하에서 발현가능)하고/하거나, 이를 코딩하는 핵산을 함유하는 숙주 또는 숙주 세포에 관한 것이다. 일부 바람직하지만 비제한적인 이러한 숙주 또는 숙주 세포의 예는 일반적으로 WO 04/041867, WO 04/041865 또는 WO 09/068627에 기술되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 효모 균주, 예컨대 피키아 파스토리스의 균주에서 발현, 생산 또는 제조될 수 있다. 또한 면역글로불린 단일 가변 도메인 및 그를 포함하는 폴리펩티드의 피키아 및 다른 숙주/숙주 세포에서의 발현/생산을 역시 기술하는 WO 04/25591, WO 10/125187, WO 11/003622, 및 WO 12/056000을 참조한다.

[1275] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체의 발현을 수득/생산하기 위해서, 형질전환된 숙주 세포 또는 형질전환된 숙주 유기체는 일반적으로 본 발명의 (바람직한) 폴리펩티드 또는 구성체가 발현/생산되게 하는 조건 하에서 지속, 유지 및/또는 배양될 수 있다. 적합한 조건은 당업자에게 분명해 질 것이고, 일반적으로 사용되는 숙주 세포/숙주 유기체를 비롯하여 본 발명의 (관련) 뉴클레오티드 서열의 발현을 제어하는 조절 엘리먼트에 의존적이게 될 것이다. 역시, 본 발명의 유전자 구성체에 대한 단락에서 상기에 언급된 안내서 및 특허 출원을 참조한다.

[1276] 일반적으로, 적합한 조건은 적합한 배지의 사용, 적합한 먹이 공급원 및/또는 적합한 영양분의 존재, 적합한 온도의 사용, 및 경우에 따라 적합한 유도 인자 또는 화합물의 존재 (예를 들어, 본 발명의 뉴클레오티드 서열이 유도성 프로모터의 제어 하일 경우)를 포함할 수 있고; 이들 모두는 당업자가 선택할 수 있다. 역시, 이러한 조건 하에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 항상적 방식으로, 일시적 방식으로, 또는 오직 적합하게 유도될 때만 발현될 수 있다.

[1277] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 (먼저) (상기 언급된 바와 같이) 미성숙한 형태로 생성될 수 있고, 그 이

후에 사용된 숙주 세포/세포 유기체에 따라서, 번역후 변형이 가해질 수 있다는 것은 당업자에게 역시 분명해질 것이다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 역시 사용되는 숙주 세포/숙주 유기체에 의존하여, 글리코실화될 수 있다.

[1278] 다음으로, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 그 자체로 공지된 단백질 단리 및/또는 정제 기술, 예컨대 (분취용) 크로마토그래피 및/또는 전기영동 기술, 차등 침강 기술, 친화성 기술 (예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체와 융합된 특이적, 절단가능한 아미노산 서열을 사용) 및/또는 분취용 면역학적 기술 (즉, 단리되는 폴리펩티드 또는 구성체에 대한 항체 사용)을 사용하여 숙주 세포/숙주 유기체 및/또는 상기 숙주 세포 또는 숙주 유기체가 배양된 배지로부터 단리될 수 있다.

[1279] **본 발명의 조성물**

[1280] 본 발명은 또한 본 발명의 적어도 하나의 폴리펩티드 또는 구성체, 및/또는 본 발명의 적어도 하나의 핵산, 및 경우에 따라 그 자체로, 즉 조성물의 의도하는 용도에 따라서, 공지된 이러한 조성물의 하나 이상의 추가 성분을 함유하거나 또는 포함하는 생성물 또는 조성물에 관한 것이다.

[1281] 일반적으로, 약학 용도의 경우, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 본 발명의 적어도 하나의 폴리펩티드 또는 구성체 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제 및/또는 보강제, 및 경우에 따라 하나 이상의 추가의 약학적 활성 폴리펩티드 및/또는 화합물을 포함하는 약학 조제물 또는 조성물로서 제제화될 수 있다. 비제한적인 예로서, 이러한 제제는 경구 투여, 비경구 투여 (예를 들어, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 관내, 동맥내 또는 척추강내 투여), 국소 투여, 흡입에 의한 투여, 피부 팻치, 임플란트, 좌제 등을 위한 적합한 형태로 존재할 수 있고, 여기서는 비경구 투여가 바람직하다. - 투여 방식에 따라서, 고형, 반고형 또는 액상일 수 있는 - 이러한 적합한 투여 형태를 비롯하여, 이의 제조에 사용을 위한 방법 및 담체는 당업자에게 분명해 질 것이고, 본 명세서에서 더욱 설명된다. 이러한 약학 조제물 또는 조성물은 일반적으로 본 명세서에서 "약학 조성물"이라고 하게 될 것이다. 인간이외의 유기체에서 사용을 위한 약학 조제물 또는 조성물은 일반적으로 "수의학적 조성물"이라고 본 명세서에서 하게 될 것이다. 이러한 조성물의 일부 바람직하지만 비제한적인 예는 본 명세서의 추가 설명으로부터 분명해질 것이다.

[1282] 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 폴리펩티드 또는 구성체 및 적어도 하나의 적합한 담체, 희석제 또는 부형제 (즉, 약학 용도에 적합), 및 경우에 따라 하나 이상의 추가 활성 물질을 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 특정한 양상에서, 본 발명은 서열번호 1-10, 47, 49, 52, 53, 55, 56, 58-61, 63-67, 및 338-342 중 어느 하나로부터 선택되는 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체 및 적어도 하나의 적합한 담체, 희석제 또는 부형제 (즉, 약학 용도에 적합), 및 경우에 따라 하나 이상의 추가 활성 물질을 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[1283] 어구 "약학적으로 허용되는"은 건전한 의학적 판단 범주 내에서, 타당한 이득/위험 비율에 비례하여, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증없이, 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하는데 적합한, 화합물, 재료, 조성물 및/또는 제형을 의미하고자 본 명세서에서 적용된다.

[1284] 본 명세서에서 사용되는 어구 "약학적으로-허용되는 담체"는 신체의 한 장기, 또는 일부분에서, 신체의 다른 장기 또는 일부분으로 대상 화합물을 운반하거나 또는 수송하는데 관여되는, 약학적으로-허용되는 재료, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액상 또는 고형 충전제, 희석제, 부형제 또는 용매 캡슐화 재료를 의미한다. 각각의 담체는 제제의 다른 성분과 상용성이고 환자에게 유해하지 않다는 의미에서 "허용가능"해야만 한다.

[1285] 일반적으로, 본 발명의 폴리펩티드 및 구성체는 그 자체로 공지된 임의의 방식으로 제제화될 수 있고 투여될 수 있다 예를 들어 상기 인용된 일반 배경 기술 (및 특히 WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 및 WO 08/020079)을 비롯하여, 표준 안내서, 예컨대 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, USA (1990)], [Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott Williams and Wilkins (2005)]; 또는 [Handbook of Therapeutic Antibodies (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007] (예를 들어 페이지 252-255 참조)를 참조한다.

[1286] 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 통상의 항체 및 항체 단편 (ScFv 및 디아바디 포함) 및 다른 약학적 활성 단백질에 대해 그 자체로 공지된 임의 방식으로 제제화될 수 있고 투여될 수 있다. 이러한 제제 및 이의 제조 방법은 당업자에게 분명해질 것이고, 예를 들어 비경구 투여 (예를 들어, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 관내, 동맥내 또는 척추강내 투여)에 적합한 조제물을 포함한다.

[1287] 비경구 투여를 위한 조제물은 예를 들어 주입 또는 주사에 적합한 멸균 용액, 현탁액, 분산액 또는 에멀션일 수 있다. 이러한 조제물에 적합한 담체 또는 희석제는 예를 들어 제한없이, WO 08/020079의 페이지 143에 언급된 것들을 포함한다. 일반적으로, 수성 용액 또는 현탁액이 바람직할 것이다.

[1288] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체는 주입 또는 주사에 의해서 정맥내로 또는 복강내로 투여될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체의 용액은 물에 제조될 수 있고, 경우에 따라 무독성 계면활성제와 혼합될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액상 폴리에틸렌 글리콜, 트리아세틴 및 이의 혼합물 및 오일에 제조될 수 있다. 저장 및 사용의 통상의 조건 하에서, 이들 조제물은 미생물의 성장을 방지하도록 보존제를 함유한다.

[1289] 비경구 투여에 적합한 약학 조성물은 당류, 알콜류, 항산화제, 완충제, 정균제, 제제가 의도하는 수령체의 혈액과 등장성이게 하는 용질 또는 현탁제 또는 증점제를 함유할 수 있는, 하나 이상의 약학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀션, 또는 사용 직전에 멸균 주사 용액 또는 분산액에 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합하여, 하나 이상의 면역글로불린 단일 가변 도메인, 폴리펩티드 또는 구성체를 포함한다.

[1290] 약학 조성물에 적용할 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물, 식물성유, 예컨대 올리브유, 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸렌 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅재, 예컨대 레시틴의 사용에 의해서, 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해서, 그리고 계면활성제의 사용에 의해서 유지될 수 있다.

[1291] 이들 조성물은 또한 보강제 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수도 있다. 대상 화합물에 대한 미생물 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 솔브산, 티머로살 등의 내포에 의해 보장될 수 있다. 등장화제, 예컨대 당류, 염화나트륨 등을 조성물에 포함시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 또한, 주사용 약학 형태의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 도입에 의해 이루어질 수 있다.

[1292] 일부 경우에서, 약물의 효과를 연장시키기 위해서, 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 완화시키는 것이 바람직하다. 이것은 불충분한 수용성을 갖는 결정질 또는 비정질 재료의 액상 현탁액의 사용에 의해 수행될 수 있다. 약물의 흡수 속도는 이의 용해 속도에 의존적이고, 이것은 차례로 결정 크기 및 결정질 형태에 의존적일 것이다. 대안적으로, 비경구 투여된 약물 형태의 지연 흡수는 오일 비히클에 약물을 용해 또는 현탁시켜 수행된다.

[1293] 주사용 데포 형태는 생분해성 중합체 예컨대 폴리락티드-폴리글리콜리드에 대상 화합물의 미세캡슐 매트릭스를 형성시켜 제조된다. 약물 대 중합체의 비율, 및 적용되는 특정 중합체의 성질에 의존하여, 약물 방출 속도를 제어할 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르소에스테르) 및 폴리-(언히드리드)를 포함한다. 데포 주사용 제제는 또한 신체 조직과 상용성인, 리포솜 또는 미세에멀션에 약물을 포집하여 제조된다.

[1294] 주사 또는 주입에 적합한 약학 제형은 멸균 주사용 또는 주입용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위해 적합화되고, 경우에 따라 리포솜에 캡슐화되는, 활성 성분을 포함하는 멸균 수성 용액 또는 분산액 또는 멸균 분말을 포함할 수 있다. 모든 경우에서, 최종 제형은 멸균되어야 하고, 유동성이어야 하며, 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 한다.

[1295] 멸균 주사용 용액은 필요에 따라, 상기 열거된 몇몇 다른 성분과 함께 적절한 용액 중에 필요량으로 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체를 도입시키고 나서, 필터 멸균하여 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 이전에 멸균-여과된 용액에 존재한 임의의 추가의 바람직한 성분과 함께 활성 성분의 분말을 생성시키는, 진공 건조 및 동결 건조 기술이다.

[1296] 치료에 사용을 위해 필요한 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체의 양은 선택되는 특정한 폴리펩티드 또는 구성체 뿐만 아니라 투여 경로, 치료하려는 병태의 성질 및 환자의 연령 및 병태에 따라 다양할 것이고 궁극적으로 참여 의사 또는 임상의의 판단에 의할 것이다. 또한 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체의 용량은 다양할 것이다.

[1297] 바람직한 용량은 편리하게 단일 용량으로 존재할 수 있거나 또는 적절한 간격, 예를 들어 1일 당 2회, 3회, 4회 또는 그 이상의 하위-용량으로 투여되는 분배된 용량으로서 존재할 수 있다. 하위-용량 그 자체는 예를 들어 다수의 개별적인 느슨하게 간격을 둔 투여로, 더욱 분배될 수 있다.

[1298] 투여 계획은 장기간, 1일 치료를 포함할 수 있다. "장기간"이란, 적어도 2주 및 바람직하게, 수 주, 수 개월,

또는 수 년의 지속 기간을 의미한다. 이러한 용량 범위의 필요한 변형은 본 명세서의 교시에서 제공하는 단지 통상적인 실험을 사용해 당업자가 결정할 수 있다. 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA.]을 참조한다. 용량은 또한 임의의 합병증의 경우에 개별 의사가 조정할 수 있다.

[1299] 다른 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 본 발명의 핵산, 본 발명의 발현 벡터, 또는 본 발명의 숙주 또는 숙주 세포를 포함하는 키트가 제공된다. 키트는 또한 폴리펩티드 또는 구성체를 함유하는 하나 이상의 바이알 및 사용 지시서를 포함할 수 있다. 키트는 또한 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체를 투여하기 위한 수단 예컨대 시린지, 주입기 등을 함유할 수도 있다.

[1300] **본 발명의 폴리펩티드, 구성체 또는 조성물의 용도**

[1301] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 폴리펩티드, 구성체, 핵산 숙주 세포 및 조성물의 적용 및 용도를 비롯하여, CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방 및/또는 치료를 위한 방법에 관한 것이다. 일부 바람직하지만 비제한적인 적용 및 용도는 본 명세서의 추가 설명으로부터 분명해질 것이다.

[1302] 본 발명의 폴리펩티드, 구성체 및 조성물은 일반적으로 CD123 발현 세포 (의 부위)에서 T 세포를 활성화시키고; 예컨대 CD123 발현 세포를 용해시키는데 사용될 수 있다. 종양 세포 상의 CD123 및 T 세포 상의 TCR에 본 발명의 폴리펩티드 및 구성체의 자발적인 결합은 세포의 활성화 및 CD123 발현 세포의 후속 용해 (사멸)을 유도한다. CD123 발현 세포에 결합하지 않은 경우, 본 발명의 폴리펩티드 및 구성체는 임의의 T 세포 활성화를 거의 보이지 않는다. 그리하여, 본 발명의 폴리펩티드 및 구성체에 의한 표적-독립적 용해 (CD123 발현없는 세포의 용해)가 최소이다.

[1303] 따라서, 일 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드, 구성체 및 조성물은 예를 들어 본 명세서에 기술된 어세이 중 하나 (예컨대, 실시예 부문에 기술된 바와 같은, 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸 유세포측정 기반 어세이)를 사용하여, 그 자체로 공지된 임의의 적합한 방식으로 측정시에, 동일한 조건이지만 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체가 존재하지 않는 조건 하의 CD123 발현 세포의 수와 비교해, 적어도 10%, 바람직하게 적어도 15%, 예컨대 적어도 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20% 또는 그 이상, 예컨대 30% 이상의 평균 용해율로, CD123 발현 세포의 용해를 야기시킨다.

[1304] 이외에도 또는 동시에, 본 발명의 폴리펩티드, 구성체 및 조성물에 의한 CD123 음성 세포의 T 세포 활성화 유도된 용해는 예를 들어 본 명세서에 기술된 어세이 중 하나 (예컨대, 실시예 부문에 기술된 바와 같이, 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸 유세포측정 기반 어세이)를 사용하여, 그 자체로 공지된 임의의 적합한 방식으로 측정시에, 동일 조건이지만 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체의 존재가 없는 조건 하의 CD123 음성 세포의 수의 약 10% 이하, 예컨대 9% 이하, 예컨대 8, 7 또는 6% 이하이다.

[1305] CD123 발현 세포의 이러한 사멸은 이러한 CD123 발현 세포의 존재가 풍부하고/하거나 바람직하지 않은 질환 또는 병태에서 유리할 수 있다.

[1306] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용을 위한 폴리펩티드, 구성체 또는 조성물을 제공한다.

[1307] 추가 측면에서, 본 발명은 CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방, 치료 및/또는 경감에 사용을 위한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체 또는 이를 포함하는 조성물을 제공한다.

[1308] 보다 특히, 본 발명은 CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방, 치료 및/또는 경감에서 사용을 위한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체 또는 이를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 CD123 연관된 질환 또는 병태는 증식성 질환 또는 염증성 병태이다.

[1309] 본 발명은 또한 CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 및/또는 이를 포함하는 조성물의 약학적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다.

[1310] 특히, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 방법에 관한 것으로서, CD123 연관된 질환 또는 병태는 증식성 질환 또는 염증성 병태이다.

[1311] 염증성 병태는 CD123 발현 세포의 사멸에 의해서 예방, 치료 및/또는 경감되는 임의의 염증성 병태일 수 있다.

[1312] 일 측면에서, 염증성 병태는 자가면역성 루푸스(SLE), 알레르기, 천식 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1313] 따라서, 본 발명은 염증성 병태의 예방, 치료 및/또는 경감에서 사용을 위한 폴리펩티드, 구성체 또는 조성물에 관한 것으로서, 상기 염증성 병태는 자가면역성 루푸스(SLE), 알레르기, 천식 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1314] 따라서, 본 발명은 또한 염증성 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 염증성 병태는 자가면역성 루푸스(SLE), 알레르기, 천식 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게, 본 발명의 적어도 하나의 폴리펩티드 또는 구성체 또는 본 발명의 조성물의 약학적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다.

[1315] 증식성 질환은 CD123 발현 세포의 사멸에 의해 예방, 치료 및/또는 경감되는 임의의 증식성 질환일 수 있다.

[1316] 일 측면에서, 상기 증식성 질환은 암이다. CD123 과발현과 연관된 암의 예는 본 명세서의 개시 내용을 기반으로 당업자에게 분명해질 것이고, 예를 들어 (제한없이) 하기 암들을 포함한다: 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종 포함), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 모발 세포 백혈병 포함), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종.

[1317] 따라서, 본 발명은 암의 예방, 치료 및/또는 경감에서 사용을 위한 폴리펩티드, 구성체 또는 조성물에 관한 것으로서, 상기 암은 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 모발 세포 백혈병), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1318] 따라서, 본 발명은 또한 암의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 암은 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 모발 세포 백혈병), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 적어도 하나이 폴리펩티드 또는 구성체 또는 본 발명의 조성물의 약학적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다.

[1319] 본 발명은 또한 의약의 제조를 위한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 또는 본 발명의 조성물의 용도에 관한 것이다.

[1320] 추가 측면에서, 본 발명은 CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[1321] 보다 특히, 본 발명은 CD123 연관된 질환 또는 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이고, 여기서 CD123 연관된 질환 또는 병태는 증식성 질환 또는 염증성 병태이다.

[1322] 일 측면에서, 본 발명은 염증성 병태의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이고, 상기 염증성 병태는 자가면역성 루푸스(SLE), 알레르기, 천식 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1323] 다른 측면에서, 본 발명은 증식성 질환의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이고, 상기 증식성 질환은 암이다. CD123 과발현과 연관된 암의 예는 본 개시 내용을 기반으로 당업자에게 분명해질 것이고, 예를 들어 (제한없이) 하기 암을 포함한다: 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종 포함), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 모발 세포 백혈병 포함), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종.

[1324] 따라서, 본 발명은 또한, 암의 예방, 치료 및/또는 경감을 위한 의약의 제조를 위한, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 또는 이를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이고, 상기 암은 림프종(버킷 림프종, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종 포함), 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 B 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 및 모발 세포 백혈병 포함), 골수이형성 증후군, 아구 형질세포양 수지상 세포 종양, 전신 비만세포증 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[1325] 본 발명의 문맥에서, "예방, 치료 및/또는 경감"은 질환을 예방, 치료 및/또는 경감시키는 것을 포함할 뿐만 아니라, 일반적으로 질환의 개시의 예방, 질환 진행의 완화 또는 반전, 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 개시의

예방 또는 완화, 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 감소 및/또는 경감, 질환 및/또는 그와 연관된 임의의 증상의 중증도 및/또는 지속기간의 감소 및/또는 질환 및/또는 그와 연관된 임의 증상의 중증도의 추가 증가의 예방, 질환에 의해 야기된 임의의 생리학적 손상의 예방, 감소 또는 반전, 및 일반적으로 치료하려는 환자에 유익한 임의의 약리학적 작용을 포함한다.

[1326] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "약학적 유효량" 또는 "약학적 활성량"은 CD123 발현 세포의 존재하에서 T 세포를 활성화시키는데 충분한 양을 의미한다. CD123 연관 질환의 경우에, 이것은 CD123 연관 질환의 예방, 치료 및/또는 경감에서 치료적 이득을 제공하는, 폴리펩티드, 구성체 또는 약학 조성물 단독 또는 다른 요법과의 조합에 의한 양을 의미한다. 본 발명의 다중특이적 폴리펩티드 또는 구성체의 양과 함께 사용되는 경우에, 이 용어는 전체 요법을 개선하거나, 원치않는 효과를 감소 또는 제거하거나, 또는 다른 요법과의 상승효과 또는 치료적 효능을 증강시키는 양을 포괄할 수 있다.

[1327] 본 명세서에서 사용되는 용어 "요법"은 CD123 연관된 질환, 예를 들어, 염증성 병태 또는 증식성 질환의 치료, 예방 및/또는 관리에서 사용할 수 있는 임의의 프로토콜, 방법 및/또는 작용제를 의미한다. 일정한 실시형태에서, 용어 "요법제" 및 "요법"은 당분야 예컨대 의료인에게 공지된 CD123 연관된 질환, 예를 들어, 염증성 병태 또는 증식성 질환, 또는 이의 하나 이상의 증상의 치료, 예방 및/또는 관리에서 유용한 생물학적 요법, 지지 요법 및/또는 다른 요법을 의미한다.

[1328] 다른 측면에서, 본 발명은 면역요법, 및 특히 수동 면역요법을 위한 방법에 관한 것이고, 이러한 방법은 CD123 연관된 질환을 앓고 있거나 또는 이의 위험성이 있는 대상체에게, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 및/또는 이를 포함하는 약학 조성물의 약학적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다.

[1329] 치료하려는 대상체는 임의의 온혈 동물일 수 있지만, 특히 포유동물, 보다 특히 인간이다. 당업자에게 분명하게 되는 바와 같이, 치료하려는 대상체는 특히 본 명세서에 언급된 질환 및 병태의 위험성이 있거나, 또는 그를 앓고 있는 사람일 것이다.

[1330] 일반적으로, 본 발명에 따른 폴리펩티드 또는 구성체 및/또는 이를 포함하는 대상체는 임의의 적합한 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들어 (제한없이) 본 발명에 따른 폴리펩티드 및 이를 포함하는 조성물은 역시 사용하려는 특별한 약학 제제 또는 조성물에 따라서, 경구로, 비경구로 (예를 들어, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 강내, 동맥내, 척수강내 또는 위장관을 피하는 임의의 다른 투여 경로), 비내, 경피, 국소, 좌제에 의해, 흡입에 의해 투여될 수 있다. 임상의는 예방 또는 치료하려는 질환 또는 장애 및 임상의에게 충분히 공지된 다른 인자들에 따라서, 이러한 투여에 사용하려는 적합한 약학 제제 또는 조성물 및 적합한 투여 경로를 선택할 수 있을 것이다.

[1331] 바람직한 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체 또는 이를 포함하는 조성물은 정맥내로 (예를 들어, (제한없이) 주입 또는 볼러스에 의함) 또는 피하로 투여된다.

[1332] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체 및/또는 이를 포함하는 조성물은 CD123 연관 질환을 예방, 치료 및/또는 경감시키는데 적합한 치료 계획에 따라서 투여된다. 임상의는 일반적으로 인자들 예컨대 치료하려는 질환 유형, 질환의 병기, 질환의 중증도 및/또는 이의 증상의 중증도, 사용하려는 본 발명의 특별한 폴리펩티드 또는 구성체, 사용하려는 특별한 투여 경로 및 약학 제제 또는 조성물, 환자의 연령, 성별, 체중, 식이, 전신 상태, 및 임상의에게 충분히 공지된 유사한 인자들에 따라서, 적합한 치료 계획을 결정할 수 있을 것이다.

[1333] 일반적으로, 치료 계획은 하나 이상의 약학적 유효량 또는 용량으로, 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 또는 구성체, 또는 이를 포함하는 하나 이상의 조성물의 투여를 포함하게 된다. 투여되는 특별한 양(들) 또는 용량은 역시 상기 열거된 인자들을 기반으로 임상의가 결정할 수 있다.

[1334] 일반적으로, CD123 연관된 질환의 예방, 치료 및/또는 경감을 위해서 치료하려는 CD123 연관 질환 (예를 들어, 증식성 장애 (암 포함) 또는 염증성 병태)의 유형, 치료하려는 질환의 병기, 사용하려는 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체의 역가, 사용되는 특별한 투여 경로 및 특별한 약학 제제 또는 조성물에 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 일반적으로 1일 당 체중 kg 당 1 그램 내지 1 마이크로그램의 양으로 투여될 것이다. 임상의는 일반적으로 본 명세서에 언급된 인자들에 따라서, 적합한 1일 용량을 결정할 수 있을 것이다. 또한 특별한 사례에서, 임상의는 예를 들어 상기 언급된 인자들 및 그의 전문적 판단을 기초로 하여, 이들 양을 벗어나게 선택할 수 있다는 것이 분명할 것이다. 일반적으로, 투여하려는 양에 관한 일부 지침은 실질적으로 동일한 경로를 통해서 동일한 표적에 대한 유사한 통상의 항체 또는 항체 단편에 대해서 일반적으로 투여되는 양으로부터 얻을 수 있지만, 친화성/화합력, 효능, 생체분포, 반감기 및 당업자에게 충분히 공지된 유사한 인자들의 차이를 고려한다.

[1335] 일반적으로, 상기 방법에서, 본 발명의 단일 폴리펩티드 또는 구성체가 사용될 것이다. 그러나 조합하여 본 발명의 둘 이상의 폴리펩티드 또는 구성체를 사용하는 것이 본 발명의 범주 내에 속한다.

[1336] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 또는 이를 포함하는 조성물은 또한 하나 이상의 추가의 약학적 활성 화합물 또는 성분과 조합하여, 즉 상승 효과를 야기할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있는, 조합된 치료 계획으로 사용될 수 있다. 역시, 임상의는 상기 언급된 인자들 및 그의 전문적 판단을 기반으로 이러한 추가 화합물 또는 성분을 비롯하여, 적합한 조합 치료 계획을 선택할 수 있을 것이다.

[1337] 특히, 본 발명의 폴리펩티드, 구성체 및 조성물은 CD123 연관된 질환 (예를 들어, 증식성 장애 (암 포함) 또는 염증성 병태)의 예방, 치료 및/또는 경감에 사용되거나 또는 사용될 수 있는 다른 약학적 활성 화합물 또는 성분과 조합하여 사용될 수 있고, 그 결과로서 상승적 효과가 수득될 수 있거나 또는 그렇지 않을 수도 있다. 이러한 화합물 및 성분을 비롯하여, 그들을 투여하기 위한 경로, 방법 및 약학 제제 또는 조성물의 예는 임상의에게 분명해 질 것이다.

[1338] 이러한 화합물 및 성분을 비롯하여, 그들을 투여하기 위한 경로, 방법 및 약학 제제 또는 조성물의 예는 임상의에게 분명해질 것이고 (제한없이) 안트라사이클린 (다우누루비신, 독소루비신, 이다루비신, 미톡산트론, 루비다존), 시타라빈 (AML), 조혈 성장 인자, 탈메틸화제 (예컨대, 데시타빈 또는 아자시티딘), 전-트랜스 레티노산, 아르센산 트리옥시드, DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제, 멜팔란, 프레드니손, 레날리도미드, 시클로포스파미드, 탈리도미드, 덱사메타손, 볼테조밉, 플루다라빈, 코르티코스테로이드, 빈크리스틴, 라스루비카제, L-아스파라기나제, PEG화 아스파라기나제, 클라드리빈, 펜토스타틴, 아드리아마이신, 블레오마이신, 빈블라스틴, 다카르바진; 또는 이의 임의 조합을 포함한다.

[1339] 둘 이상의 물질 또는 성분을 조합 치료 계회의 일부로서 사용하려는 경우에, 그들은 실질적으로 동시에 또는 다른 시간에 (예를 들어, 실질적으로 동시에, 연속적으로, 또는 교대 계획에 따라), 동일한 투여 경로 또는 상이한 투여 경로를 통해서 투여될 수 있다. 물질 또는 성분을 동일한 투여 경로를 통해서 동시에 투여하려는 경우에, 그들은 당업자에게 분명해 지는 바와 같이, 상이한 약학 제제 또는 조성물로서 또는 조합된 약학 제제 또는 조성물의 일부로서 투여될 수 있다.

[1340] 또한, 둘 이상의 활성 물질 또는 성분을 조합된 치료 계획의 일부로서 사용하려는 경우에, 각각의 물질 또는 성분은 동일한 양으로, 그리고 그 화합물 또는 성분이 그 자체로 사용될 때 사용되는 바와 동일한 계획에 따라서 투여될 수 있고, 그러한 조합 사용은 상승 효과를 야기시킬 수도 있거나 또는 그렇지 않을 수도 있다. 그러나, 둘 이상의 활성 물질 또는 성분의 조합 사용이 상승 효과를 야기시키는 경우에, 바람직한 치료적 작용을 여전히 획득하면서, 투여하려는 물질 또는 성분 중 하나, 그 이상 또는 전부의 양을 감소시키는 것이 또한 가능할 수 있다. 이것은 예를 들어, 여전히 바람직한 약학적 또는 치료적 효과를 수득하면서, 그들이 그들의 일반적인 양으로 사용될 때, 하나 이상의 물질 또는 성분의 사용과 연관된 임의의 원치않는 부작용을 피하거나, 제한하거나 또는 감소시키는데 유용할 수 있다.

[1341] 본 발명에 따라 사용되는 치료 계획의 유효성은 임상의에게 분명해지는 바와 같이, 관여되는 질환 또는 장애에 대해서 그 자체로 공지된 임의의 방식으로 결정될 수 있고/있거나 그를 따를 수 있다. 임상의는 또한 적절하게 사례마다, 바람직한 치료적 효과를 획득하고/하거나, 원치않는 부작용을 피하거나, 제한하거나 또는 감소시키고/시키거나, 한편으로는 바람직한 효과의 획득과 다른 한편으로는 원치않는 부작용의 회피, 제한 또는 감소 사이에서 적절한 균형을 획득하기 위해, 특정한 치료 계획을 변형시키거나 또는 변형시킬 수 있을 것이다.

[1342] 일반적으로, 치료 계획은 바람직한 치료 효과가 획득될 때까지 및/또는 바람직한 치료 효과가 유지되는 한 후속될 것이다. 다시, 이것은 임상의가 결정할 수 있다.

[1343] 본 발명의 폴리펩티드 또는 구성체, 핵산, 유전자 구성체 및 숙주 및 숙주 세포의 추가 용도는 본 명세서의 개시 내용을 기반으로 당업자에게 분명할 것이다.

[1344] 본 명세서에서 예시하고 논의된 측면들은 본 발명을 만들고 사용하기 위해 본 발명자에게 알려진 최선의 방식으로 당업자에게 교시하려는 의도일 뿐이다. 본 발명의 상기 기술된 측면의 변형 및 변동이 상기 교시를 통해서 당업자에게 자명해지는 바와 같이, 본 발명을 벗어나지 않고, 가능하다. 그러므로 청구항 및 그들 균등물의 범주 내에서, 본 발명은 특별히 설명된 것 이외에 달리 실시될 수 있다는 것을 이해한다.

[1345] 본 발명은 하기의 비제한적인 바람직한 측면, 실시예 및 도면을 통해서 이제 더욱 설명할 것이다.

[1346] 본 출원 전반에서 인용된 모든 참조 문헌 (문헌 참조, 특허 공보, 공개 특허 출원, 및 공계류 특허 출원 포함)

의 전체 내용은 특히 상기 본 명세서에서 참조하는 교시에 대해서 참조로 명확하게 본 명세서에 편입된다.

[1347] **실시예**

[1348] **실시예 1: TCR과 관련된 재료 및 방법**

[1349] ***1.1 TCR αβ /CD3 형질감염된 세포주***

[1350] 전체 인간 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 모든 6개 사슬의 재조합 과발현의 일시적이고 안정한 CHO-K1 (ATCC: CCL-61), HEK293H (Life technologies, 11631-017), Llana (라마 탯줄 세포 유래 섬유아세포) 세포주를 생성시켰다. 이를 위해서, TCR 알파 (α) 및 TCR 베타 (β) 사슬의 코딩 서열을 CMV 프로모터의 하류에, pcDNA3.1-유래 벡터에 클로닝시켰고, 2A-유사 바이러스 펩티드 서열을 양쪽 사슬 사이에 삽입시켜서 폴리단백질의 번역 동안 리보솜 스킵핑을 유도시켰다. 동일 벡터에서, CD3 복합체의 엡실론, 델타, 감마 및 제타 사슬의 코딩 서열은 역시 개별 사슬 간에 2A-유사 바이러스 펩티드 서열을 사용하여, 추가의 CMV 프로모터의 하류에 클로닝시켰다. 또한, 인간 CD3의 4개 사슬의 재조합 과발현의 안정한 HEK293H 클론을 단일 유전자 벡터를 사용해 상기 기술된 대로 생성시켰다.

[1351] 인간 CD3 및 인간 TCR α/β 불변 도메인에 대해 사용된 서열은 UniProtKB (CD3 델타: P04234, CD3 감마: P09693, CD3 엡실론: P07766, CD3 제타: P20963, TCR α P01848 및 TCR β P01850; 개별적으로 서열번호 70 내지 75)로부터 유래되었다. 인간 TCR α/β 가변 도메인에 대한 서열은 결정 구조 서열 (PDB 코드: 2IAN, 2XN9 및 3TOE) (개별적으로 서열번호 343, 76 및 345를 갖는 2IAN, 2XN9 및 3TOE로부터 유래된 인간 TCR α 가변 도메인; 개별적으로 서열번호 344, 77 및 346을 갖는 2IAN, 2XN9 및 3TOE로부터 유래된 인간 TCR β 가변 도메인)로부터 유래되었다.

[1352] 인간 T 세포 수용체 복합체의 세포 표면 발현은 기능성 마우스 IgG2b 항-인간 TCR α/β 항체, 클론 BW242/412 (Miltenyi, 130-098-219) 및 기능성 마우스 IgG2a 항-CD3 PE 표지된 항체, 클론 OKT-3 (eBioscience, 12-0037)을 사용하는 유세포측정으로 확인하였다 (도 1).

[1353] ***1.2 가용성 재조합 TCR α/β 단백질***

[1354] 가용성 인간 및 사이노몰거스/레서스 원숭이 TCR α/β 단백질은 인 하우스에서 생성시켰다. 인간 TCR α/β 불변 도메인의 세포외 부분에 대한 서열은 UniProtKB (TCR α: P01848 및 TCR β: P01850; 개별적으로 서열번호 74 및 75)로부터 유래되었다. 인간 TCR α/β 가변 도메인은 결정 구조 서열로부터 유래되었다 (PDB 코드: 2XN9; 개별적으로 α 및 β 사슬에 대해 서열번호 76 및 77).

[1355] 사이노몰거스/레서스 원숭이 TCR α/β 불변 도메인의 세포외 부분에 대한 서열은 개별적으로 GenBank 파일 EHH63463 및 AEA41868 (서열번호 347 및 348)로부터 유래되었다. 사이노몰거스/레서스 원숭이 TCR α/β 가변 도메인에 대한 서열은 AEA41865 및 AEA41866 (α 및 β 사슬에 대해 개별적으로 서열번호 349 및 350)으로부터 유래되었다.

[1356] 인간 TCR α/β(2XN9) 또는 사이노몰거스/레서스 원숭이 TCR α/β의 세포외 도메인은 Lonza's GS Gene Expression System™ 을 사용하여 CHOK1SV 세포 (Lonza)에 의해 생성된 지퍼 단백질 코딩 서열 (O'Shea et al. 1993 Curr. Biol. 3(10): 658-667)에 융합시켰고 그 이후에 정제되었다.

[1357] TCR α/β 지퍼 단백질의 품질은 ELISA 결합 어세이에서 평가되었다. Maxisorp 96-웰 ELISA 플레이트 (Nunc)는 2 μg/mL 가용성 재조합 인간 TCR α/β(2XN9)-지퍼 단백질 또는 가용성 재조합 사이노몰거스 TCR α/β-지퍼 단백질로 코팅되었다. 밤새 항온반응 이후에, 플레이트를 세척하였고 PBS + 1% 카세인으로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 다음으로, 플레이트를 기능성 flag 태그화된 나노바디 또는 기능성 마우스 IgG 항-인간이외의 영장류/래트 TCR α/β 항체, 클론 R73 (eBioscience, 16-5960)의 연속 희석물과 교반하면서 실온에서 1시간 동안 항온반응시켰고, 역시 세척하고 단일클론 ANTI-FLAG M2-퍼옥시다제 (HRP) (Sigma, A8592), 개별적으로 퍼옥시다제-접합된 토끼 항-마우스 면역글로불린 (Dako, P0260)과 항온반응시켰다. 1시간 후, TMB One Solution (Promega, G7431)을 첨가하였다. 반응은 2M H_2SO_4 을 사용해 중단시켰고 용량 의존적 결합은 Tecan sunrise 4를 사용해 450 nm에서 OD를 측정하여 결정하였다 (도 2).

[1358] **실시예 2: TCR/CD3에 의한 라마의 면역화, 중쇄-단독 항체 단편 레파토리의 클로닝 및 파지의 제조**

[1359] ***2.1 면역화***

[1360] T 세포 수용체(TCR) α 및/또는 β 불변 사슬에 대해 낙타과 (예를 들어, 라마 및 알파카)에서 중쇄 단독 항체

를 생성시키는 것을 기재하였다. 천연 T 세포 수용체 복합체가 CD3 (감마, 델타, 엡실론 및 제타) 사슬을 비롯하여, TCR α 및 β 사슬로 이루어지지만, CD3 사슬의 부재는 TCR의 불변 도메인에 대한 접근을 용이하게 한다고 가정하였다. 특히 CD3 사슬이 측면에서 둘러싸므로, TCR α 및 β 사슬의 불변 도메인으로의 접근을 제한한다. 다른 표적에 의한 우리의 경험과 대조적으로, TCR α 및 β 사슬에 대한 면역 반응의 수득은 예상대로 간단하지 않았다.

[1361] 최종 접근법에서, 윤리 위원회의 승인 (CRIA, LA1400575, Belgium- EC2012#1) 이후에, 발명자는 T 세포 복합체를 코딩하는 DNA를 사용하는 복합체 면역화 프로토콜을 시도하였다. 간략하게, 3마리의 추가 라마는 표준 프로토콜에 따라서 pVAX1-인간 TCR(2IAN)/CD3 (실시예 1.1에 기술됨) 플라스미드 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 pVAX1-인간 TCR α/β(2XN9)/CD3 (실시예 1.1에 기술됨) 플라스미드 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 면역화시켰다. 2마리 라마는 초대 인간 T 세포의 추가적인 1회 피하 주사를 투여받았다. 인간 T 세포는 RosetteSep (StemCell Technologies, 15061)를 사용하여 건강한 지원자 (혈액 은행 Gent) 유래의 버피 코트 혈액으로부터 채혈하였고 제조사의 지시서에 따라서 Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, 17-1440-03) 상에서 농축시켰고 액체 질소에 저장하였다. 해동 후에, 세포를 세척하였고, Gibco의 D-PBS에 재현탁하였고 주사 이전에 얼음에 유지시켰다.

[1362] ***2.2 중쇄-단독 항체 단편 레파토리의 클로닝 및 파지의 제조***

[1363] 동물 당, 혈액 샘플을 한 유형의 면역화 항체의 주사 이후에 채혈하였다. 이들 혈액 샘플로부터, PBMC는 제조사의 지시서에 따라서 Ficoll-Hypaque를 사용해 준비하였다 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). 각각의 면역화된 라마의 경우에, 라이브러리는 면역화 스케줄의 일정 서브세트로부터 기원되는, 즉 한 유형의 면역화 항원 이후에, 샘플로부터 단리된 총 RNA를 풀링하여 구축되었다.

[1364] 간략하게, PCR-증폭된 VHH 레파토리는 VHH 라이브러리의 파지 디스플레이를 용이하게 하도록 디자인된 벡터로 특별한 제한효소 부위를 통해 클로닝되었다. 벡터는 pUC119로부터 유래되었다. VHH 코딩 서열과 인 프레임으로, 벡터는 C-말단 3xFLAG 및 His6 태그를 코딩한다. 파지는 표준 프로토콜에 따라 제조되었다 (예를 들어, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858 및 본 명세서에 인용된 Ablynx N.V.가 출원한 출원 및 다른 종래 기술).

[1365] **실시예 3: 파지 디스플레이를 통한 TCR/CD3 특이적 VHH의 선택**

[1366] 대부분의 선택된 VHH는 TCR α 또는 TCR β 사슬의 가변 영역에 대해 유도되었다. 그러므로 발명자는 상이한 선택 및 대응-선택 전략을 고안하였다.

[1367] 간략하게, 모든 라마로부터 수득되고 파지 라이브러리로서 클로닝된 VHH 레파토리는 선택 조건의 다중성을 적용하여, 상이한 선택 전략으로 사용되었다. 면역화 동안 사용된 것과 동일한 가변 도메인을 갖는 인간 TCR/CD3 형질감염된 세포주를 사용한 선택은 오직 가변 도메인 결합제만을 생성시켰다. 그러므로, 상이한 가변 TCR α/β 도메인 (형질감염된 세포 (실시예 1.1에 기술됨), 가용성 단백질 (실시예 1.2에 기술됨), 또는 인간 초대 T 세포 (실시예 2.1에 기술된 대로 단리))을 함유하는 도구가 선택동안 사용되었고 불변 도메인 결합제의 동정에서 핵심적인 것으로 입증되었다. 선택 동안 추가의 변수가 항원 제시 방법 (단백질일 때 플레이트 상에 코팅되거나 또는 세포 사용시 용액 중), 항원 농도, 사용된 오르쏘로그 (인간 또는 사이노몰거스 재조합 TCR α/β 단백질), 및 선택 회차의 수에 포함되었다. 모든 코팅된 고체 상 선택은 Maxisorp 96-웰 플레이트 (Nunc, Wiesbaden, Germany)에서 수행되었다.

[1368] 선택은 다음과 같이 수행되었다: 고체 및 용액상 선택 포맷을 위한 TCR α/β CD3 항원 조제물은 다수의 농도에서 상기 기술된 대로 제시되었다. 파지 라이브러리와 2시간 항온반응 이후에, 대규모 세척을 후속하고, 결합된 파지는 트립신 (1 mg/mL)으로 15분 동안 용리되었다. 트립신 프로테아제 활성은 0.8 mM 프로테아제 억제제 ABSF에 의해 즉시 중화되었다. 대조군으로서, 항원이 없는 선택을 동시에 수행하였다.

[1369] 파지 산출량을 사용하여 개별 VHH 클론의 분석을 위해 이. 콜라이를 감염시켰다. 주변세포질 추출물을 표준 프로토콜에 따라 제조하였다 (예를 들어 WO 03/035694, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551 및 다른 종래 기술 및 본 명세서에 언급된 Ablynx N.V.가 출원한 출원 참조).

[1370] **실시예 4: 스크리닝, 서열 분석 및 정제**

[1371] ***4.1 유세포측정 분석에서 TCR/CD3 결합 나노바디에 대한 스크리닝***

[1372] 주변세포질 추출물은 혼합된 세포주 셋업으로 인간 TCR/CD3 형질감염된 CHO-K1 또는 HEK293H 세포 및 개별 CHO-

K1 또는 HEK293H 기준 세포주를 사용하여 세포 발현된 TCR/CD3 결합에 대해 스크리닝되었다. 이러한 목적을 위해서, 기준 세포주의 대량 뱃치는 8 μM PKH26으로 표지하였고 냉동시켰다. 5×10^4 PKH 표지된 기준 세포는 5×10^4 표준 세포와 혼합하였고 주변세포질 추출물과 30분 동안 4℃에서 항온반응시켰고, 3회 세척하였다. 다음으로, 세포는 1 ㎍/mL의 단일클론 ANTI-FLAG® M2 항체 (Sigma-Aldrich, F1804)와 30분 동안 4℃에서 항온반응시켰고, 다시 세척하였으며, 30분 동안 4℃에서 5 ㎍/mL의 알로파이코시아닌 (APC) AffiniPure 염소 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch, 115-135-164)와 항온반응시켰다. 샘플을 세척하였고, FACS 완충액 (Gibco의 D-PBS로서, Simga의 10% FBS 및 Merch의 0.05% 아지드화나트륨 포함)에 재현탁시킨 후 BD FACSArray를 통해서 분석하였다. 먼저 전체 세포 개체군의 80% 초과를 의미하는 P1 개체군을 FSC-SSC 분포를 기반으로 선택하였다. 이 게이트에서, 20,000개 세포가 획득 동안 계측되었다. PKH26-SSC 분포를 기반으로, PKH 표지된 부모 개체군 및 인간 TCR/CD3 미표지된 표적 개체군을 선택하였다. 이들 2개 개체군의 경우 평균 APC 값을 계산하였다.

[1373] ***4.2 인간 T 세포 활성화어세이에서 TCR/CD3 결합 나노바디에 대한 스크리닝***

[1374] 수 회의 시도 이후에, 표준 프로토콜에 따라서, 즉 96웰 플레이트 상에 코팅된 항체 또는 나노바디에 의한 정제된 인간 T 세포의 활성화는 충분히 감응성이지 않은 것으로 확인되었다 (데이타 도시되지 않음).

[1375] 활성을 평가하기 위해서, 비드 커플링된 T 세포 활성화를 기반으로, 상이한 어세이가 개발되었다. 간략하게, Dynabeads® 염소 항-마우스 IgG (ThermoFisher Scientific, 11033)는 단일클론 마우스 ANTI-FLAG®M2 항체 (Sigma-Aldrich, F1804) (15 ㎍/1E7비드)로 코팅되었다. 4℃에서 2시간의 항온반응 기간 이후에, Dynabeads®를 세척하였고 진탕하면서 80 ㎕의 주변세포질 추출물과 20분 동안 4℃에서 항온반응시켰다. 비커플링된 나노바디는 정제된 초대 인간 T 세포에 가용성 마우스 항-CD28 항체 (Pelicluster CD28 - Sanquin, M1650) (실시예 2.1에서 기술된 바와 같이 단리됨)와 함께 비드 복합체를 첨가하기 전에 세척해 버렸다. 대조군 조건으로서, 비자극된 인간 T 세포를 사용하였다. 간략하게, 단일클론 마우스 ANTI-FLAG®M2 항체에 커플링된 Dynabeads® 염소 항-마우스 IgG (ThermoFisher Scientific, 11033)는 미관련 나노바디를 함유하는 80 ㎕의 주변세포질 추출물에서 항온반응시켰다. 세척 단계 동안 비커플링된 나노바디의 제거 이후, 미관련 나노바디-비드 복합체를 정제된 초대 인간 T 세포에 첨가하였다. 37℃ 및 5% CO_2 에서 24시간의 항온반응 이후에, 인간 T 세포의 활성화 상태는 단일클론 마우스 항-인간 CD69PE (BD Biosciences, 557050)를 사용하는 유세포측정으로 CD69 발현도를 측정하여 결정하였다.

[1376] ***4.3 수득된 나노바디의 서열 분석***

[1377] 유세포측정 결합 스크린 및 T 세포 활성화 어세이에서 양성으로 채점된 나노바디를 서열분석하였다.

[1378] 서열 분석 결과로 나노바디 T0170056G05 및 이의 상이한 패밀리 구성원이 동정되었는데, 총 104개의 상이한 클론 (서열번호 42 및 78 내지 180)으로 표시된다. 상응하는 정렬을 제공한다 (표 A-1).

[1379] T0170056G05에 대한 패밀리 구성원의 CDR의 서열 가변성은 하기 표에 표시되어 있다.

표 B-4

56G05	CDR1									
카밧 번호매김	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
절대 번호매김	1	2	3	4	5*	6	7	8	9	10
56G05 서열	G	D	V	H	K	I	N	F	L	G
변이		A		Y	L	L		I		S
변이		S						V		
변이		E								
변이		G								

[1380] * 위치 5 가 L 인 경우라면, 위치 6 도 역시 L 임

표 B-5

56G05	CDR2								
카밧 번호매김	50	51	52	53	54	55	56	57	58
절대 번호매김	1	2	3	4	5	6	7	8	9
56G05 서열	H	I	S	I	G	D	Q	T	D
변이	T		T		S		D	V	A
변이	R		A		A		E	A	Q
변이							T		N
변이							A		V
변이							V		S

[1381]

표 B-6

56G05	CDR3								
카밧 번호매김	95	96	97	98	99	100	100a	101	102
절대 번호매김	1	2	3	4	5	6	7	8	9
56G05 서열	F	S	R	I	Y	P	Y	D	Y
변이	Y			L	W			N	
변이	G							S	
변이	L								

[1382]

[1383] *4.4 1가 나노바디의 정제*

[1384] 동정된 패밀리의 2개 대표 나노바디를 선택하여 삼중 Flag, His6-태그화 단백질로서 이. 콜라이 TG1에서 발현시켰다. 발현은 1 mM IPTG의 첨가에 의해 유도시켰고 37℃에서 4시간 동안 계속되도록 하였다. 세포 배양물을 침강시킨 후에, 주변세포질 추출물은 펠렛을 냉동-해동시켜 제조하였다. 이들 추출물을 출발 재료로서 사용하였고 나노바디는 IMAC 및 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 통해 정제하였다.

[1385] 나노바디는 SDS-PAGE를 통해 평가하여 95% 순도로 정제되었다 (데이타는 도시하지 않음).

[1386] **실시예 5: CHO-K1 세포 상에 발현된 인간 TCR/CD3 및 정제된 초대 인간 T 세포에 대한 항-TCR 나노바디의 결합**

[1387] CHO-K1 세포 상에 발현된 인간 TCR α/β(2XN9)/CD3 및 정제된 초대 인간 T 세포에 대한 정제된 1가 항-TCR 나노바디의 용량-의존적 결합은 유세포측정으로 평가하였다. 간략하게, 세포를 회수하였고 V-바닥 96-웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)로 옮겼으며 나노바디의 연속 희석물 (1 μM로부터 출발)을 FACS 완충액 중에 4℃에서 30분 동안 회합되도록 하였다. 세포를 원심분리를 통해 3회 세척하였고 1 μg/mL 단일클론 마우스 ANTI-FLAG® M2 항체 (Sigma-Aldrich, F1804)로 30분 동안 4℃에서 프로빙시키고, 다시 세척하였으며, 30분 동안 4℃에서 5 μg/mL R-파이코에리쓰린 AffiniPure F(ab')$_2$ 단편 염소 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch 115-116-071)와 항온반응시켰다. 항온반응 이후에, 세포를 FACS 완충액으로 3회 세척하였다. 후속하여, 세포를 게이팅 절차 동안 제거되는 죽은 세포와 생존 세포를 구별하기 위해서 5 nM TOPRO3 (Molecular Probes, T3605)이 보충된 FACS 완충액에 재현탁시켰다. 세포를 FACS 어레이 유세포측정계 (BD Biosciences) 및 Flowing 소프트웨어를 사용해 분석하였다. 먼저 총 세포 개체군의 80% 초과를 나타내는 P1 개체군을 FSC-SSC 분포를 기반으로 선택하였다. 이러한 게이트에서, 획득 동안 10000개 세포가 계측되었다. 이 개체군으로부터 TOPRO+ 세포 (죽은 세포)는 배제시켰고 중앙치 PE 값을 계산하였다.

[1388] 결과는 도 3에 도시되어 있다. 용량 반응 곡선에서 수득된 EC50 값은 표 C-1에 표시되어 있다.

표 C-1: CHO-K1 인간 TCRα/β(2XN9)-/CD3 세포와의 결합 및 정제된 초대 T 세포와의 결합에 대한 유세포측정으로 결정된 항-TCR 1 가 나노바디의 EC50(M).

	CHO-K1 TCRα/β(2XN9)/CD3			초대 인간 T 세포		
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T0170055A02	8.4E-09	7.2E-09	9.7E-09	9.1E-08	8.1E-08	1.0E-07
T0170056G05	8.9E-09	8.3E-09	9.4E-09	9.1E-08	8.3E-08	9.9E-08

[1389]

[1390] 인간 TCR/CD3에 분명하게 결합된 나노바디가 CHO-K1 세포 상에서 발현되었다. CHO-K1 인간 TCR α/β(2XN9)/CD3 세포와 비교하여 약간 낮은 역가였지만, 정제된 초대 인간 T 세포에도 나노바디가 결합하였다. .

[1391] **실시예 6: 결합 에피토프에 대한 결정**

[1392] 실시예 5에 요약된 바와 같이, 유세포측정으로, HEK293H 세포 상에 발현된 인간 TCR α/β(2IAN)/CD3에 대한 정제된 1가 항-TCR 나노바디의 결합을 평가하고 인간 CD3으로 형질전환된 HEK293H 세포와의 결합과 비교하였다. 1 μM로부터 출발하여 T0170055A02 및 T0170056G05의 연속 희석물을 세포에 적용하였다. 부모 HEK293H 세포주가 TCR/CD3 음성 세포주로서 포함되었다.

[1393] 결과는 도 4에 도시되어 있다. 용량 반응 곡선으로부터 수득된 EC_{50} 값은 표 C-2에 표시되어 있다.

표 C-2: HEK293H 세포 상에서 발현된 인간 TCRα/β(2IAN)/CD3 또는 인간 CD3 과의 결합에 대한, 유세포측정법으로 결정된 항-TCR 1 가 나노바디의 EC50 (M).

	HEK293H wt		HEK293H CD3		HEK293H TCR/CD3	
샘플 ID	EC50	1μM 시 MCF	EC50	1μM 시 MCF	EC50	1μM 시 MCF
T0170055A02	비적합	246	비적합	1194	5.5E-08	91229
T0170056G05	비적합	299	비적합	352	8.4E-08	86510

[1394]

[1395] 나노바디는 HEK293H 상에 발현된 인간 TCR(2IAN)/CD3에 분명하게 결합되었지만 인간 CD3 단독 형질감염된 HEK293H 세포, 또는 HEK293H 부모 세포주에는 결합하지 않았다. 결론적으로 2개 클론은 인간 TCR α/β와의 결합에 대해 특이적이었다. 인간 CD3에 대한 결합은 관찰되지 않았다.

[1396] **실시예 7: 가용성 재조합 인간 TCR α/β 단백질에 대한 항-TCR 나노바디의 결합**

[1397] ***7.1 ELISA에서 인간 T 세포 수용체 단백질에 대한 항-TCR 나노바디의 결합***

[1398] 가용성 재조합 인간 TCR α/β 단백질에 대한 정제된 1가 TCR 나노바디의 결합은 2 ㎍/mL의 직접 코팅된 가용성 재조합 인간 TCR α/β 단백질을 사용하는 ELISA (실시예 1.2에 기술된 바와 같음)에서 평가하였다.

[1399] 결과는 도 5에 도시되어 있다. 용량 반응 곡선으로부터 수득된 EC_{50} 값은 표 C-3에 표시되어 있다.

표 C-3: 가용성 재조합 인간 TCRα/β(2XN9) 단백질과의 결합에 대한, ELISA 로 결정된 항-TCR 1 가 나노바디의 EC50 (M)

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T0170055A02	1.9E-09	1.7E-09	2.2E-09
T0170056G05	4.0E-09	3.5E-09	4.6E-09

[1400]

[1401] 항-TCR 나노바디는 가용성 재조합 인간 TCR α/β 단백질에 결합하였다.

[1402] ***7.2 BLI에서 인간 T 세포 수용체 단백질에 대한 항-TCR 나노바디의 결합***

[1403] 결합 친화성은 Octet RED384 장비 (Pall ForteBio Corp.) 상의 생물-층 간섭계 (BLI)를 사용해 측정되었다. 재조합 인간 가용성 TCR α/β(2XN9)-지퍼 단백질은 NHS/EDC 커플링 화학을 통해서 아민-반응성 센서 (ForteBio) 상에 공유적으로 고정되었다. 동역학 분석을 위해서, 센서는 먼저 기준 설정을 결정하기 위해서 러닝 완충액 (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.05% p20, pH 7.4, GE Healthcare Life Sciences)에 침지시켰다. 후속하여, 센서를 회합 단계 (180s) 동안 상이한 농도의 정제된 나노바디 (1.4 nM 내지 1 mM 범위)를 함유하는 웰에 침지시켰고 해리 단계 (15분) 동안 러닝 완충액을 함유하는 웰에 전달하였다. 친화성 상수 (KD)는 ForteBio 데이타 분석

소프트웨어를 사용하여 1:1 상호작용 모델을 적용해 계산하였다.

[1404] 결과는 도 6에 도시되어 있다. 결합 특징은 표 C-4에 열거되어 있다.

표 C-4: 가용성 재조합 인간 TCRα/β(2XN9) 단백질과의 결합에 대한 항-TCR 1 가 나노바디의 Octet RED384 장비로 결정된 동역학적 분석.

	인간 가용성 TCRα/β(2XN9)-지퍼 단백질		
샘플 ID	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD (M)
T0170055A02	4.9E+04	8.4E-04	1.7E-08
T0170056G05	5.0E+04	1.2E-03	2.4E-08

[1405]

[1406] 인간 가용성 TCR α/β(2XN9)-지퍼 단백질 상에서 BLI를 사용해 결정된 결합 친화성은 유세포 측정에서 CHO-K1 인간 TCR α/β(2XN9)/CD3 세포 상에서 결정된 친화성과 상관성을 보였다 (실시예 5 참조).

[1407] **실시예 8: 재조합 사이노몰거스 가용성 TCR α/β 단백질에 대한 항-TCR 나노바디의 결합**

[1408] ***8.1 ELISA에서 사이노몰거스 T 세포 수용체 단백질에 대한 항-TCR 나노바디의 결합***

[1409] 재조합 사이노몰거스 가용성 TCR α/β 단백질에 대한 1가 항-TCR 나노바디의 결합은 2 μg/mL의 직접 코팅된 재조합 사이노몰거스 가용성 TCR α/β지퍼 단백질을 사용하여 ELISA (실시예 1.2에 기술된 바와 같음)에서 평가하였다.

[1410] 용량 반응 곡선으로부터 수득된 EC_{50} 값은 표 C-5에 표시되어 있다. 예시적인 결과는 도 7에 도시되어 있다.

표 C-5: 재조합 사이노몰거스 가용성 TCRα/β-지퍼 단백질과의 결합에 대한 항-TCR 1 가 나노바디의 ELISA 로 결정된 EC50(M).

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T0170055A02	1.6E-07	1.5E-07	1.7E-07
T0170056G05	7.7E-08	6.6E-08	9.1E-08

[1411]

[1412] 결과는 항-TCR 나노바디가 재조합 사이노몰거스 가용성 TCR α/β-지퍼 단백질에 결합한다는 것을 의미하였다.

[1413] ***8.2 BLI에서 사이노몰거스 T 세포 수용체 단백질에 대한 항-TCR 나노바디의 결합***

[1414] 1가 항-TCR 나노바디의 결합 친화성은 재조합 사이노몰거스 가용성 TCR α/β 단백질을 사용하여 실질적으로 실시예 7.2에 기술된 바와 같이 Octet RED384 장비 (Pall ForteBio Corp.) 상의 생물-층 간섭계 (BLI)를 사용해 측정되었다.

[1415] 결과는 도 8에 도시되어 있다. 항-TCR 나노바디의 결합 특징은 표 C-6에 열거되어 있다.

표 C-6: 재조합 사이노몰거스 가용성 TCRα/β-지퍼 단백질과의 결합에 대한 항-TCR 1 가 나노바디의 Octet RED384 장비로 결정된 동역학적 분석.

샘플 ID	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD (M)
T0170055A02	1.1E+05	2.4E-02	2.1E-07
T0170056G05	1.1E+05	1.6E-02	1.5E-07

[1416]

[1417] 나노바디는 재조합 인간 가용성 TCR α/β(2XN9)-지퍼 단백질과 비교하여 10배 더 낮은 친화성으로 재조합 사이노몰거스 가용성 TCR α/β 단백질에 결합한다.

[1418] **실시예 9: 정제된 초대 인간 T 세포 활성화 능력의 결정**

[1419] 정제된 1가 항-TCR 나노바디의 기능성은 인간 T 세포 활성화 어세이로 평가되었다. Dynabeads® 염소 항-마우스 IgG (ThermoFisher Scientific, 11033)는 단일클론 마우스 ANTI-FLAG®M2 항체 (Sigma-Aldrich, F1804, 15μg /1E7 비드)로 코팅되었다. 4℃에서 2시간의 항온반응 기간 이후에, Dynabeads®를 세척하고 고정 (1 μg)량의 정제된 Flag 태그화된 나노바디와 20분 동안 4℃에서 진탕하면서 항온반응시켰다. 미커플링된 나노바디는 별개의 건강한 도너로부터 단리된 정제된 초대 인간 T 세포 (실시예 2.1에 기술된 바와 같이 단리됨)에 가용성 마우스 항-CD28 항체 (Pelicluster CD28 - Sanquin, M1650)와 함께 비드 복합체를 첨가하기 전에 세척해 버렸다. 또한, 나노바디에 의한 1가 TCR 결합의 효과는 항-CD28 항체의 존재 하에서, 항-마우스 IgG Dynabeads® 상에서 사전 포획없이 정제된 초대 인간 T 세포와 나노바디의 항온반응에 의해 평가하였다. 정제된 초대 인간 T 세포의

활성화 상태는 37℃ 및 5% CO_2 에서 24시간의 항온반응이후 단일클론 마우스 항-인간 CD69PE (BD Biosciences, 557050)를 사용하는 유세포측정에서 CD69 발현을 측정하여 모니터링되었다

[1420] 결론적으로, 항-TCR 나노바디는 항-마우스 IgG dynabeads 상에 포획 후 분명한 CD69 상향조절을 보였다. 미관련 나노바디는 임의의 CD69 상향조절을 보이지 않았다 (도 9A). 또한, 용액 중에 존재하는 나노바디는 어떠한 것도 CD69의 증가된 발현으로 측정시 정제된 초대 인간 T 세포를 활성화시키지 않았다 (도 9B).

[1421] **실시예 10: CD123에 의한 라마의 면역화, 중쇄-단독 항체 단편 레파토리의 클로닝 및 파지의 제조**

[1422] ***10.1 면역화***

[1423] 이들 라마는 보강제로서 Stimune (Cedi Diagnostics, Lelystad, The Netherlands)을 사용하여 목의 근육내 주사를 통해서 인간 CD123의 재조합 His-태그화 세포외 도메인 (R&D Systems, 301-R3/CF)으로, 표준 프로토콜에 따라서, 면역화되었다.

[1424] 35일에 채취된 면역 혈청 샘플은 흡착된 hCD123에 대한 ELISA에 의해서 항원-특이적 결합에 대해 분석되었다. 모든 라마는 우수한 IgG1 매개 혈청 반응, 및 hCD123에 대해 양호 내지 중간 정도의 중쇄 매개 반응을 보인다.

[1425] ***10.2 중쇄-단독 항체 단편 레파토리의 클로닝 및 파지의 제조***

[1426] 동물 당, 100 mL 혈액 샘플을 면역화 항체의 마지막 주입 후 4일 및 8일에 채혈하였다. 이들 혈액 샘플로부터, 제조사의 지시서 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)에 따라서 Ficoll-Hypaque를 사용해 PBMC를 준비하였다. 각각의 면역화된 라마에 대해서, 상이한 혈액 샘플로부터 단리된 총 RNA를 풀링하여 라이브러리를 구축하였다.

[1427] 간략하게, PCR-증폭된 VHH 레파토리는 VHH 라이브러리의 파지 디스플레이를 용이하게 하도록 디자인된 파지미드 벡터로 특별한 제한효소 부위를 통해 클로닝되었다. 벡터는 pUC119로부터 유래되었다. VHH 코딩 서열과 인 프레임으로, 벡터는 C-말단 3xFLAG 및 HIS6 태그를 코딩한다. 파지는 표준 프로토콜 (예를 들어 WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858 및 다른 종래 기술 및 본 명세서에 언급된 Ablynx N.V.가 출원한 출원 참조)에 따라 제조되었다.

[1428] **실시예 11: 파지 디스플레이를 통한 CD123 특이적 VHH의 선택**

[1429] 모든 라마로부터 수득되어 파지미드 라이브러리로서 클로닝된 VHH 레파토리가 다수의 선택 조건을 적용하는 상이한 선택 전략에서 사용되었다. 변수는 i) CD123 항원의 공급원 (인간 세포에서 생성된 재조합 단백질 또는 세포 상에 과발현된 전체 길이 단백질), ii) 항원 제시 (바이오틴화된 재조합 엑토도메인을 사용시에 용액 중, 비바이오틴화된 Fc-융합된 엑토도메인의 경우 플레이트 상에 직접 코팅), 및 iii) 항온 농도를 포함하였다.

[1430] 간략하게, CD123을 과발현하는 HEK293T 세포 (인 하우스에서 생성), 바이오틴화된 인간 CD123 (R&D Systems, 301-R3/CF, 인 하우스에서 바이오틴화시킴) 및 플레이트-코팅된 인간 CD123-Fc (Sino Biologicals, 10518-H08H)는 1시간 내지 2시간 동안 상이한 라이브러리의 2 x E^{11} 파지 입자와 항온반응시킨 후에, 광범위한 세척을 하였고; 결합된 파지는 15분 동안 트립신 (1 mg/mL)으로 용리시킨 후에 프로테아제 활성을 0.8 mM 프로테아제 억제제 ABSF를 적용하여 즉시 중화시켰다. 대조군으로서, 부모 세포주가 있거나 또는 항원이 없는 선택을 동시에 수행하였다.

[1431] 파지 산출량을 사용하여 개별 VHH 클론의 분석을 위해 이. 콜라이를 감염시켰다. 주변세포질 추출물은 표준 프로토콜 (예를 들어 WO 03/035694, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551 및 다른 종래 기술 및 본 명세서에 언급된 Ablynx N.V.가 출원한 출원 참조)에 따라 준비되었다.

[1432] **실시예 12: CD123 결합 나노바디에 대한 스크리닝**

[1433] ***12.1 결합 ELISA에서 스크리닝***

[1434] 주변세포질 추출물은 인간 CD123 (R&D Systems, 301-R3)에 대해 결합 ELISA에서 스크리닝되었다. 이러한 목적을 위해서, 마이크로타이터 플레이트를 인간 CD123 (1 ㎍/ml)로 코팅하였고 밤새 4℃에서 항온반응시켰다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 PBMS 중 4% Marvel로 차단하였다. 플레이트를 PBS-Tween으로 세척하였다. 주변세포질 추출물 (2% Marvel이 있는 PBS 중에 1/10 희석)을 적어도 1시간 동안 RT에서 항온반응시켰다. 플레이트는 PBS-Tween으로 세척하였고, 그 이후에 VHH의 결합은 1% Marvel 포함 PBS 중 단일클론 ANTI-FLAG M2-퍼옥시다제 (HRP), (Sigma, A8592, 1/5000)로 검출하였다. 염색은 기질 esTMB (Nalgene)를 사용해 수행하였고 신호는 450

nm에서 15분 이후에 측정되었다.

[1435] *12.2 유세포측정으로 스크리닝*

[1436] 주변세포질 추출물은 96-웰 포맷으로 일시적 형질감염된 HEK293T-hCD123 세포 상에서 유세포측정 어세이로 스크리닝되었다. 또한, 결합은 이종이량체 수용체 복합체에 IL-3Rα 파트너의 존재 하에서 IL-3Rα와의 결합을 확인하기 위해서, 내생적으로 IL-3R 발현 MOLM-13 세포에 대해 평가되었다. 이러한 목적을 위해서, 세포 (1×10^5 세포/웰/ 0.1 mL)를 FACS 완충액 (Invitrogen의 D-PBS, sigma의 10% FBS 및 Merck의 0.05% 아지드화나트륨 포함) 중 주변세포질 추출물 (1:10 희석)과 30분 동안 4℃에서 항온반응시켰다. 세포를 3회 세척하였고, 1 μg/mL 단일클론 ANTI-FLAG® M2 항체 (Sigma-Aldrich, F1804)와 30분 동안 4℃에서 항온반응시켰고, 다시 세척하였고, 30분간 4℃에서 염소 항-마우스 RPE 표지된 항체 (Jackson Immunoresearch, 115-116-071, 1:100)와 항온반응시켰다. 샘플을 세척하였고, TOPRO3와 항온반응시켜서 FACS 완충액 중 죽은 세포에 대해 염색시키고 형광도를 FACSArray 장치 (BD) 상에서 평가하였다.

[1437] *12.3 나노바디의 서열분석*

[1438] 결합 ELISA 및 유세포측정 어세이에서 양성으로 채점된 나노바디를 서열분석하였다. 서열 분석 결과로 나노바디 A0110056A10 및 A0110055F03 및 이의 상이한 패밀리 구성원이 동정되었다. 상응하는 정렬은 개별적으로 표 A-2 및 표 A-3에 제공된다.

[1439] A0110056A10에 대한 패밀리 구성원의 CDR의 서열 가변성은 하기 표에 표시되어 있다.

표 B-7

56A10	**CDR1**									
카밧 번호매김	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
절대 번호매김	1	2	3*	4	5	6**	7	8	9	10
56A10 서열	G	I	T	S	K	I	N	D	M	G
변이			S			S	D	V		
변이			P					A		

* 위치 3 이 S 인 경우라면, 위치 7 은 D 임.

[1440] ** 위치 6 이 I 인 경우라면, 위치 8 은 D 임.

표 B-8

56A10	**CDR2**								
카밧 번호매김	50	51	52	53	54	55	56	57	58
절대 번호매김	1	2	3	4	5	6	7	8	9
56A10 서열	S	I	T	A	T	G	T	T	N
변이									

[1441]

표 B-9

56A10	**CDR3**						
카밧 번호매김	95	96	97	98	99	100	101
절대 번호매김	1	2	3	4	5	6	7
56A10 서열	F	P	P	I	S	N	F
변이			A				

[1442]

[1443] A011005F03에 대한 패밀리 구성원의 CDR의 서열 가변성은 하기 표에 표시되어 있다.

표 B-10

55F03	CDR1									
카밧 번호매김	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
절대 번호매김	1	2	3*	4	5	6**	7	8	9	10
55F03 서열 변이	G	R	T	F	S	S	Y	V	M	G

[1444]

표 B-11

55F03	CDR2									
카밧 번호매김	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
절대 번호매김	1	2	3	4	5	6*	7	8	9	10
55F03 서열 변이	A	I	Y W	W	S	N S	G	K	T	Q E

[1445] * 위치 6 이 S 인 경우라면, 위치 10 은 E 임.

표 B-12

55F03	CDR3															
카밧 번호매김	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	101	102
절대 번호매김	1	2	3	4*	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
55F03 서열 변이 변이	D	K	D	E R	T D Y	G	F	R	T	L	P	I	A	Y	D	Y

[1446] * 위치 4 가 R 인 경우라면, 위치 5 는 D 또는 Y 임.

[1447] *12.4 1가 나노바디의 정제*

[1448] 각 패밀리의 대표적인 나노바디를 선택하여 삼중 Flag, His6-태그화 단백질로서 이. 콜라이 TG1에서 발현시켰다. 발현은 1 mM IPTG의 첨가로 유도시켜서 4시간 동안 37℃에서 계속되게 하였다. 세포 배양을 침강시킨 후, 주변세포질 추출물은 펠렛을 냉동-해동시켜 제조하였다. 이들 추출물을 출발 재료로서 사용하였고 나노바디는 IMAC 및 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 통해 정제되었다. 나노바디는 SDS-PAGE를 통해 평가하여 95% 순도로 정제되었다 (데이타는 도시되지 않음).

[1449] **실시예 13: 특징규명을 위한 추가 세포주**

[1450] *13.1 CD123 형질감염된 세포주*

[1451] CD123의 재조합 과발현의 안정한 HEK293 Flp-In (Invitrogen, R750-07) 및 CHO Flp-In (Invitrogen, R758-07) 세포주는 Flp-In™ 부위-지정 재조합 기술 (Flp-In™ System For Generating Stable Mammalian Expression Cell Lines by Flp Recombinase-Mediated Integration (Invitrogen, K601001, K601002))을 사용하여 생성되었다. 여기서, DNA 통합은 사카로마이세스 세레비지아로부터 유래되는 Flp 리콤비나제 (pOG44)에 의해서 FRT (Flp Recombination Target)의 특이적 게놈 위치에서 일어난다. Flp-In™ 숙주 세포주 및 발현 플라스미드 (pcDNA5) 둘 모두는 이러한 FRT 부위를 함유하여서, 단일 상동성 DNA 재조합을 가능케 한다. 인간 CD123의 서열은 NCBI RefSeq NP_002174로부터 유래되었고, 사이노몰거스 CD123의 서열은 NCBI genbank no. EHH61867.1 (개별적으로 서열번호 68 및 69)로부터 유래되었다. 인간 및 사이노몰거스 CD123의 세포 표면 발현은 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (BD Biosciences, 554527) 및 마우스 IgG2a 이소타입 대조군 (BD Bioscience, 16-4724-85)을 사용하는 유세포측정으로 확인되었다. 간략하게, 세포 (1×10^5 세포/웰)를 회수하고 V-바닥 96-웰 플레이트 (Greiner Bio-one, 651 180)에 전달하고 4℃에서 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (0.25 μg/mL) 및 마우스

IgG2a 이소타입 대조군 (0.25 ㎍/mL)으로 염색하였다. 30분의 항온반응 이후에, 세포를 원심분리를 통해 펠렛화하였고 FACS 완충액 (10% FBS (Sigma, F7524) 및 0.05% 아지드화나트륨 (Acros organics, 190380050)이 포함된 Gibco의 D-PBS)으로 3회 세척하였다. 다음으로, 세포를 5 ㎍/mL R-파이코에리쓰린 AffiniPure F(ab')$_2$ 단편 염소 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch, 115-116-071)와 30분간 4℃에서 항온반응시켰다. 항온반응 후에, 세포를 FACS 완충액으로 3회 세척하였다. 후속하여, 세포는 죽은 세포와 생존 세포를 구별하기 위해서 5 nM TOPRO3 (Molecular Probes, T3605)이 보충된 FACS 완충액에 재현탁되었다. 세포를 FACS 어레이 유세포측정계 (BD Biosciences) 및 Flowing 소프트웨어를 사용해 분석하였다. 먼저 총 세포 개체군의 80% 초과를 나타내는 P1 개체군을 FSC-SSC 분포를 기반으로 선택하였다. 이 게이트에서, 10000개 세포가 획득 동안 계측되었다. 이 개체군으로부터 TOPRO+ 세포 (죽은 세포)는 배제하였고 중앙치 PE 값을 계산하였다. 데이타는 도 10에 도시되어 있다.

[1452] ***13.2 U937, MOLM-13, KG1a 및 NCI-H929 세포주***

[1453] MOLM-13 (DSMZ, ACC-554), U-937 (ATCC®, CRL-1593.2™), KG1a (ATCC®, CCL246.1™) 및 NCI-H929 (DSMZ, ACC-163) 상에서 인간 CD123의 발현도는 유세포측정에서 APC-표지된 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (BD Biosciences, 560087) 및 APC-표지된 이소타입 대조군 (Biolegend, 400220)을 사용하여 결정하였다. 간략하게, 세포를 회수하였고 25 ㎍ 인간 Fc 블록 (BD Biosciences, 564220)을 포함한 FACS 완충액 중 1×10^7 세포/mL의 밀도로 현탁시켰고 10분간 RT에서 항온반응시켰다. 다음으로, 세포를 1×10^6 세포/mL의 세포 농도로 희석하였고 V-바닥 96-웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)에 전달하였다. 세포를 4℃에서 APC-표지된 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (10배 희석) 및 APC-표지된 이소타입 대조군 (10배 희석)으로 염색하였다. 30분의 항온반응 이후에, 세포를 1 ㎍/mL의 프로피듐 아이오딘 (PI) (Sigma, P4170)이 보충된 FACS 완충액 중에 30분간 4℃에서 재현탁시키고 BD FACSCanto 및 Flowing 소프트웨어를 통해 분석하였다. 먼저, 총 세포 개체군의 80% 초과를 나타내는 P1을 FSC-SSC 분포를 기반으로 선택하였다. 10000개 세포가 P1 내에서 계측되었다. 이 개체군으로부터 PI+ 세포 (죽은 세포)는 배제하였고 중앙치 APC 값을 계산하였다. 데이타는 도 11에 도시되어 있다.

[1454] 또한, 세포 당 수용체의 수는 제조사의 지시서에 따라서 QIFIKIT (Dako, K0078)를 사용해 결정하였다. 데이타는 표 C-7에 표시되어 있다.

표 C-7: 세포 당 CD123 분자의 개수.

	MOLM-13	KG1a
CD123 분자 /세포	6543	3353

[1455]

[1456] **실시예 14: 내생적으로 CD123을 발현하는 세포주에 대한 1가 항-CD123의 결합**

[1457] 내생적 CD123 발현 세포주 MOLM-13 및 KG1a에 대한 정제된 1가 항-CD123 나노바디에 대한 용량-의존적 결합은 유세포측정으로 평가하였다. 간략하게, 세포를 회수하고 V-바닥 96-웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)로 전달하였고 나노바디의 연속 희석물 (1 μM에서 출발)이 30분 동안 4℃에 FACS 완충액 중에서 회합되게 하였다. 세포를 원심분리를 통해 3회 세척하였고 단일클론 마우스 ANTI-FLAG®M2 항체 (Sigma-Aldrich, F1804)로 30분 동안 4℃에서 프로빙하였고, 역시 세척하였고, 30분 동안 4℃에서 5 ㎍/mL R-파이코에리쓰린 AffiniPure F(ab')$_2$ 단편 염소 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch, 115-116-071)와 항온반응시켰다. 항온반응 후, 세포를 5 nM TOPRO3 (Molecular Probes, T3605)가 보충된 FACS 완충액에 재현탁시켜서 게이팅 절차 동안 제거되는, 죽은 세포로부터 생존 세포를 구별하였다. 세포는 FACS 어레이 유세포측정계 (BD Biosciences) 및 Flowing 소프트웨어를 사용해 분석하였다. 먼저 총 세포 개체군의 80% 초과를 의미하는 P1 개체군을 FSC-SSC 분포 기반으로 선택하였다. 이 게이트에서, 10000개 세포가 획득 동안 계측되었다. 이 개체군으로부터 TOPRO+ 세포 (죽은 세포)는 배제하였고 중앙치 PE 값을 계산하였다.

[1458] MOLM-13 및 KG1a에 대한 나노바디의 결합은 도 12에 제시된다. 용량 반응 곡선으로부터 얻은 EC_{50} 값은 표 C-8에 표시되어 있다.

표 C-8: MOLM-13 및 KG1a 와의 결합에 대한 1 가 항-CD123 나노바디의 유세포측정법으로 결정된 EC50(M).

	MOLM-13			KG1a		
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A0110056A10	6.3E-10	3.8E-10	8.8E-10	5.0E-10	2.4E-10	7.6E-10
A0110055F03	>1E-07			>1E-07		

[1459]

[1460] CD123을 내생적으로 발현하는 세포에 대한 양쪽 나노바디의 결합이 존재하였다 (MOLM-13, KG1a).

[1461] **실시예 15: 형질감염된 세포 상의 CD123에 대한 1가 항-CD123 나노바디의 결합**

[1462] 인간 CD123 과발현 CHO-K1 및 사이노몰거스 CD123 과발현 HEK293 세포에 대한 정제된 1가 항-CD123 항체의 용량-의존적 결합은 유세포측정으로 평가하였다.

[1463] A0110055F03의 결합을 검출하기 위해서, 세포를 회수하였고 V-바닥 96-웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)에 전달하였다. A0110055F03의 연속 희석물 (100 nM로부터 출발)을 30분 동안 4℃에서 FACS 완충액 중에 희합될 수 있게 하였다. 세포를 원심분리를 통해 FACS 완충액으로 3회 세척하였고, 1 ㎍/ml 단일클론 마우스 ANTI-FLAG®M2 항체 (Sigma-Aldrich, F1804)로 30분간 4℃에서 프로빙하여 결합된 나노바디를 검출하였다. 검출은 0.5 ㎍/mL R-파이코에리쓰린 AffiniPure F(ab')$_2$ 단편 염소 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch, 115-116-071)를 사용해 30분 동안 4℃에서 수행하였다. 세포를 세척하였고 이후에 게이팅 절차 동안 제거되는 죽은 세포에 대해 염색하기 위해서 TOPRO3과 항온반응시켰다. 다음으로 세포는 BD FACSArray로 분석하였다. 먼저 총 세포 개체군의 80% 초과를 나타내는 P1 개체군은 FSC-SSC 분포를 기반으로 선택하였다. 이 게이트에서, 10000개 세포가 획득 동안 계측되었다. 이 개체곤으로부터 TOPRO+ 세포 (죽은 세포)는 배제하였고 중앙치 PE 값을 계산하였다.

[1464] A0110056A10의 결합을 검출하기 위해서, 세포를 회수하였고 V-바닥 96-웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)로 옮겼다. Alexa647-labelled A0110056A10의 연속 희석물 (100 nM에서 출발)을 30분 동안 4℃에 FACS 완충액 중에서 회합되게 하였다. 30분의 항온반응 이후에 세포를 원심분리를 통해 펠렛화하였고 FACS 완충액으로 3회 세척하였다. 후속하여, 세포를 1 ㎍/ml 프로피듐 아이오딘이 보충된 FACS 완충액 중에 재현탁하여 생존 세포를 죽은 세포와 구별하였다. 세포를 FACS 어레이 유세포측정계 (BD Biosciences) 및 Flowing 소프트웨어를 사용해 분석하였다. 먼저 총 세포 개체군의 80% 초과를 나타내는 P1 개체군을 FSC-SSC 분포를 기반으로 선택하였다. 이 게이트에서, 10000개 세포가 획득 동안 계측되었다. 이 개체군으로부터 PI+ 세포 (죽은 세포)는 배제하였고 중앙치 APC-값을 계산하였다.

[1465] CD123 형질감염 세포주 및 기준 세포주에 대한 나노바디의 결합은 개별적으로 나노바디 A0110056A10 및 A0110055F03에 대해 도 13 및 14에 표시된다. 용량 반응 곡선으로부터 수득된 EC50 값은 표 C-9에 표시되어 있다.

표 C-9: huCD123 및 cyCD123 형질감염된 세포와의 결합에 대한 1 가 항-CD123 나노바디의 유세포측정법으로 결정된 EC50(M).

	HEK Flp-In cyCD123 형질감염된 세포			CHO Flp-In huCD123 형질감염된 세포		
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A0110056A10	2.48E-09	1.90E-09	3.20E-09	9.74E-10	8.50E-10	1.11E-09
A0110055F03	2.53E-09	2.04E-09	3.14E-09	5.94E-09	1.00E-09	3.52E-08

[1466]

[1467] CD123 형질감염된 세포주에 대한 양쪽 나노바디의 결합이 존재하였다. 양쪽 나노바디는 인간 - 사이노몰거스 CD123 교차-반응성이었다.

[1468] **실시예 16: 유세포측정으로 세포 상에 발현된 CD123과의 결합에 대한 나노바디 경쟁**

[1469] CD123 나노바디가 서로 경쟁하는지 여부를 조사하기 위해서, 나노바디 경쟁 어세이를 설정하였다. 이러한 목적을 위해서, A0110056A10의 대량 뱃치를 Alexa647 로 표지하였고 냉동시켰다. 다음으로, 세포를 회수하였고 V-바닥 96-웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)로 옮겼고 나노바디의 연속 희석물 및 고정 농도의 A0110056A10-Alexa647 (MOLM-13의 경우 0.7 nM, CHO Flp-In 인간 CD123의 경우 0.5 nM)와 혼합하였다. 어세이에서 사용된 A0110056A10-Alexa647 농도는 개별 세포에 대한A0110056A10-Alexa647의 결합에 대한 EC_{50} 값 이하였다 (결합 곡선은 도 15에 도시됨). 4℃에서 90분의 항온반응 기간 이후에, A0110056A10-Alexa647의 결합은 유세포측정에서 결정하였다. 그것에, 세포를 3회 세척하였고 1 ㎍/mL 프로피디움 아이오딘이 보충된 FACS 완충액에 재현탁시켰고, 30분간 4℃에서 항온반응시킨 후에 BD FACSArray를 통해 분석하였다. 먼저 총 세포 개체군의 80% 초과를 나

타내는 P1 개체군을 FSC-SSC 분포를 기반으로 선택하였다. 10000개 세포를 P1 내에서 계측하였다. 이 개체군으로부터 PI+ 세포 (죽은 세포)는 배제하였고 중앙치 APC 값을 계산하였다.

[1470] 결과는 도 16에 도시되어 있다. 용량 반응 곡선으로부터 수득된 IC_{50} 값은 표 C-10에 표시되어 있다.

표 C-10: A0110056A10 나노바디 경쟁 어세이에서 1 가 항-CD123 나노바디의 IC50(M).

[1471]

	MOLM-13			CHO Flp-In 인간 CD123		
샘플 ID	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A0110056A10	1.4E-09	1.1E-09	1.8E-09	6.7E-09	5.3E-09	8.5E-09
A0110055F03	>1E-07			/	/	/

[1472] 예상대로, 비표지된 A0110056A10은 MOLM-13 세포 상의 CD123 및 형질감염된 CHO Flp-In 세포 상에 발현된 인간 CD123과의 결합에 대해 A0110056A10-Alexa647과 경쟁하였다. 나노바디 A0110055F03은 A0110056A10-Alexa647과 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 세포 상의 CD123과의 결합에 대해 경쟁하지 않았다. MOLM-13 세포주 상에서, A0110055F03은 시험되 최고 농도에서만 A0110056A10-Alexa647과 경쟁하였다.

[1473] **실시예 17: 유세포측정에서 세포 상에 발현된 CD123과의 결합에 대해 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)와 경쟁**

[1474] 세포 상의 인간 CD123과의 결합에 대해서 항-CD123 나노바디가 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)와 경쟁하는지 여부를 조사하기 위해서, 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3) 경쟁 어세이는 실시예 16에 기술된 바와 같은 유세포측정 기반 방법론을 사용해 수행되었다. 이러한 목적을 위해서, 나노바디의 연속 희석물 및 APC-표지된 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3) (BD Biosciences, 560087)의 EC_{30} 농도를 90분 동안 세포와 항온반응시켰고 그 이후에 항체 결합을 유세포측정에서 결정하였다. MOLM-13 및 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 세포에 대한 APC-표지된 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)의 결합 곡선은 도 17에 도시되어 있다.

[1475] 경쟁 실험의 결과는 도 18에 제시되어 있다. 용량 반응 곡선으로부터 수득된 IC_{50} 값은 표 C-11에 표시되어 있다.

표 C-11: 마우스 1 가 항-CD123 항체 (클론 7G3) 경쟁 어세이에서 1 가 항-CD123 나노바디의 IC50(M).

[1476]

	MOLM-13			CHO Flp-In 인간 CD123		
샘플 ID	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A0110056A10	1.1E-09	1.1E-09	1.2E-09	6.5E-09	6.1E-09	6.9E-09
A0110055F03	4.8E-07	1.8E-07	1.2E-06			

[1477] 나노바디 A0110056A10은 MOLM-13 및 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 세포 상에서 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)와의 경쟁을 보여주었고; 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3) 및 나노바디 A0110056A10의 에피토프는 적어도 부분적으로 중복된다. A0110055F03은 MOLM-13 세포 상의 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)와 경쟁하였다. 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 세포주 상의 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)와의 경쟁 부재는 인간 CD123에 대한 나노바디 A0110055F03의 보다 낮은 친화성의 결과인 듯하다.

[1478] **실시예 18: ELISA에서 재조합 인간 CD123과의 결합에 대한 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)와의 경쟁**

[1479] 항-CD123 나노바디가 재조합 인간 CD123 단백질과의 결합에 대해 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)와 경쟁하는지 여부를 조사하기 위해서, ELISA 기반 방법론을 사용해 경쟁 어세이를 수행하였다. 간략하게, 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3) (BD Biosciences, 554527)는 PBS 중 1 ㎍/mL로 코팅하였다. 4℃에서 밤새 항온반응 후, 플레이트를 실온에서 카세인 (PBS 중 1%)으로 차단하였다. 다음으로, 1가 항-CD123 나노바디의 연속 희석물 및 4 nM의 인 하우스 바이오틴화된-CD123 재조합 단백질 (R&D Systems, 301-R3/CF)을 첨가하였고 PBS + 0.1% 카세인 + 0.05% Tween 중에 실온에서 1시간 동안 항온반응시켰다. 인 하우스 바이오틴화된-CD123 재조합 단백질의 농도는 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)에 대한 인 하우스 바이오틴화된-CD123 재조합 단백질의 결합으로 수득된 EC30 값을 기반으로 하였다 (결합 곡선은 도 19에 도시됨). 비코팅된 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)는 양성 대조군으로서 함께 사용하였고, 미관련 항-계란 리소자임 나노바디 cAbLys는 음성 대조군으로서 함께 사용하였다. 플레이트는 PBS + 0.05% Tween로 Tecan Hydrospeed 세척기를 사용해 세척하였고 7G3 회합된 바이오틴화된-CD123은 PBS + 0.1% 카세인 + 0.05 % Tween 중 1 ㎍/mL의 엑스트라비딘 퍼옥시디스 (Sigma, E2886)를 통해 검출한 후, esTMB 기질로 발색시켰다. 반응은 1M HCl로 중단시켰고 OD 450nm

의 흡광도를 Tecan Infinite M1000을 사용해 측정하였다.

[1480] 결과는 도 20에 제시되어 있다. 용량 반응 곡선으로 수득된 IC_{50} 값은 표 C-12에 표시되어 있다.

표 C-12: 7G3 경쟁 ELISA 에서 1 가 나노바디 A010056A10 의 IC50(M).

[1481]

샘플 ID	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
A0110056A10	3.1E-09	1.5E-09	6.5E-09

[1482] 재조합 인간 CD123 단백질과의 결합에 대해 A0110056A10 및 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3) 간에 경쟁이 관찰되었다. A0110055F03은 재조합 인간 CD123 단백질과의 결합에 대해 마우스 단일클론 항-CD123 항체 (클론 7G3)와 경쟁하지 않았다.

[1483] **실시예 19: 인간 CD123 단백질과 1가 항-CD123 나노바디의 결합 (SPR)**

[1484] 인간 CD123에 대한 정제된 CD123 특이적 나노바디의 결합 친화성은 ProteOn XPR36 장비 상의 SPR 기반 어세이 수단으로 평가하였다. 이것에, 재조합 CD123 (R&D Systems, 301-R3-025/CF)은 EDC 및 NHS 화학을 사용하여, 아민 커플링을 통해 CM5 칩 상에 고정되었다. 정제된 나노바디는 원-샷 동역학 접근법을 통한 동역학 분석을 위해 2분 동안 상이한 농도 (4.2 nM 내지 1000 nM)로 주입되었다. 유속은 45 ㎕/분이었고 ProteOn 러닝 완충액 (PBS, pH 7.4, 0.005% Tween 20)을 러닝 완충액으로서 사용하였다. 1000 nM 샘플의 해리 시간은 15분이었다. 결합/해리 데이타의 평가는 1:1 상호작용 모델 (랑뮈르 결합 모델)을 적합화하여 수행되었다..

표 C-13: 직접 코팅된 인간 CD123 단백질을 사용한 Proteon 으로 결정된 1 가 항-CD123 나노바디의 결합 특징.

[1485]

샘플 ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
A0110056A10	5.3E+05	7.9E-04	1.5E-09
A0110055F03	2.5E+04	3.9E-03	1.6E-07

[1486] 인간 CD123과의 결합에 대한 1가 항-CD123 나노바디의 KD 값은 세포에 대한 결합 데이타와 상관성이 있었다. A0110056A10은 A0110055F03과 비교하여 더 양호한 친화성을 갖는다.

[1487] **실시예 20: CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 및 대조군 폴리펩티드의 구축**

[1488] T 세포를 관여시킬 수 있는 폴리펩티드를 수득하기 위해서, CD123 나노바디는 항-TCR (T 세포 수용체) 나노바디 T0170056G05 (서열번호 42)와 연결시켰다. 후자는 TCR α/β 불변 도메인에 특이적으로 결합하는 나노바디이다. (Ablynx N.V. 가 2016년 5월 13일에 출원한 "TCR 알파/베타 반응성 기반 T 세포 동원 폴리펩티드"라는 명칭의 WO 2016/180969 참조)

[1489] T 세포 관여 폴리펩티드의 치료적 활성은 종양 연관 항원 상의 다수 에피토프의 동시 표적화에 의해 개선될 수 있다. 요법 내에서 표적화 항원의 하향 조절에 의해서 뿐만 아니라 (점-) 돌연변이의 도입에 의해 탈출 기전을 종양 세포가 생성시킬 수 있다. 항원 상의 다수 에피토프의 동시 표적화가 아마도 종양 탈출 변이체를 생성시키는 확률을 감소시킬 듯 하다. 게다가, 단일 항원 상의 다수 에피토프의 표적화는 결합의 친화성 (화합력 효과)을 증가시킬 수 있다. 이러한 다가 종양 한원 표적화 개념의 경우, CD123 항원에 대해 반응성인 2개 나노바디는 TCR/CD3 복합체에 대한 나노바디 T0170056G05와 연결된다.

[1490] 개별 나노바디의 특별한 순서는 포맷 내에서 다양하였다. 이펙터 및 종양 나노바디는 유전자적으로 35GS 링커와 연결시켰고 이후에 표준 프로토콜 (다중특이적 폴리펩티드)에 따라서 효모 피키아에서 발현시켰다. 동시에, 미관련 폴리펩티드는 종양 반응성 나노바디 중 하나 또는 둘 모두를 미관련 항-계란 리소자임 나노바디 cAbLys 또는 항-RSV 나노바디 RSV007B02(Q108L)로 치환시켜 생성되었다.

[1491] 생성된 폴리펩티드는 표 C-14에 열거한다.

표 C-14: 다중특이적 폴리펩티드의 샘플 ID 및 설명.

샘플 ID	서열번호*	설명
T017000113	46	A0110055F03-35GS-cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000114	47	A0110055F03-35GS-A0110056A10-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000115	48	A0110056A10-35GS-cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000116	49	A0110056A10-35GS-A0110055F03-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000120	50	cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-A0110055F03-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000121	51	cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-A0110056A10-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000125	42	T0170056G05-HIS6
T017000126	52	A0110055F03(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-T0170056G05-A
T017000128	53	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-A
T017000129	54	T0170056G05(E1D)-35GS-RSV007B02(Q108L)-A
T017000130	55	A0110056A10(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-T0170056G05-A
T017000131	56	A0110056A10(E1D)-35GS-T0170056G05-A
T017000132	57	RSV007B02(E1D,Q108L)-35GS-T0170056G05-A
T017000134	58	A0110056A10(E1D)-35GS-T0170056G05-35GS-A0110055F03-A
T017000135	59	A0110055F03(E1D)-35GS-T0170056G05-35GS-A0110056A10-A
T017000138	60	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-A0110055F03-A
T017000139	61	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-A0110056A10-A

[1492] * 서열번호는 C-말단 태그 또는 Ala-연장부가 없는 다중특이적 폴리펩티드의 서열에 상응함

[1493] **실시예 21: 유세포측정으로 세포 상에 발현된 CD123과의 결합에 대한 A0110056A10 및 다중특이적 CD123/TCR 폴리펩티드 간 경쟁**

[1494] 인간 또는 사이노몰거스 CD123에 대한 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 결합은 실시예 16에 기술된 바와 같이 A0110056A10 경쟁 어세이에서 평가되었다. MOLM-13 및 CHO Flp-In huCD123 세포와의 결합 다음으로, 사이노 CD123 형질감염된 HEK Flp-In 세포에 대한 결합을 평가하였다.

[1495] 이러한 목적을 위해서, A0110056A10의 뱃치는 Alexa647로 표지시켰고 냉동시켰다. 다음으로, 세포를 회수하였고 V-바닥 96-웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)로 옮겼으며, 다중특이적 결합 폴리펩티드의 연속 희석물 (1 μM로부터 출발) 및 고정 농도의 A0110056A10-Alexa647과 혼합하였다. 어세이에 사용된 농도 (MOLM-13의 경우 0.4 nM, CHO Flp-In 인간 CD123 및 HEK Flp-In 사이노몰거스 CD123의 경우 0.9 nM)는 개별 세포에 대한 A0110056A10-Alexa647의 결합에 대한 EC_{50} 값 이하였다 (결합 곡선은 도 21에 도시됨). 4℃에서 90분의 항온반응 기간 이후에, A0110056A10-Alexa647의 결합은 실시예 16에 기술된 바와 같이 유세포측정으로 결정하였다. A0110056A10 및 T017000129는 개별적으로 양성 및 음성 대조군으로서 함께 사용하였다.

[1496] 결과는 도 22에 제시되어 있다. 용량 반응 곡선으로부터 수득된 IC_{50} 값은 표 C-15 및 표 C-16에 표시되어 있다.

표 C-15: MOLM-13 세포 상의 A0110056A10 나노바디 경쟁 어세이에서 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 및 대조군의 IC50 (M).

	MOLM-13		
샘플 ID	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000121	2.6E-08	2.2E-08	3.1E-08
T017000128	3.1E-09	2.6E-09	3.6E-09
T017000138	3.5E-09	3.0E-09	4.1E-09
T017000139	3.7E-09	3.1E-09	4.4E-09
T017000116	1.8E-09	1.5E-09	2.2E-09
A0110056A10	1.1E-09	8.7E-10	1.3E-09

[1497]

표 C-16: CD123 형질 감염된 세포 상의 A0110056A10 나노바디 경쟁 어세이에서 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 및 대조군의 IC50 (M).

	HEK Flp-In cyCD123 형질감염된 세포			CHO Flp-In huCD123 형질감염된 세포		
샘플 ID	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000121	1.1E-07	9.6E-08	1.3E-07	2.3E-08	1.9E-08	2.7E-08
T017000128	3.1E-08	2.6E-08	3.6E-08	5.8E-09	5.4E-09	6.2E-09
T017000138	1.2E-08	1.0E-08	1.4E-08	3.6E-09	2.8E-09	4.6E-09
T017000139	1.1E-08	9.6E-09	1.3E-08	3.3E-09	2.7E-09	4.1E-09
T017000116	5.6E-09	4.8E-09	6.4E-09	1.6E-09	1.4E-09	1.9E-09
A0110056A10	7.0E-09	6.1E-09	8.1E-09	1.9E-09	1.7E-09	2.3E-09

[1498]

[1499] 모든 시험된 다중특이적 폴리펩티드는 인간 및 사이노몰거스 CD123 발현 세포와의 결합을 보여서 인간 사이노몰거스 CD123 교차반응성을 입증하였다. 친화성의 약간의 저하가 A0110056A10이 N-말단 위치에 존재하지 않는 경우의 폴리펩티드에 대해 관찰되었다.

[1500] **실시예 22: 유세포측정으로 세포 상에 발현된 인간 TCR/CD3과의 결합에 대한 T0170056G05 및 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 간 경쟁**

[1501] 인간 TCR/CD3에 대한 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 결합은 유세포측정으로 T0170056G05 경쟁 어세이에서 평가하였다. 이러한 목적을 위해서, T0170056G05의 대량 뱃치를 바이오틴으로 표지하고 냉동시켰다. 다음으로, CHO-K1 인간 TCR/CD3 발현 세포를 회수하고 V-바닥 96-웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)로 옮기고 FACS 완충액 중 다중특이적 결합 폴리펩티드의 연속 희석물 (1 μM로부터 출발) 및 고정 농도의 바이오틴화된 T0170056G05를 혼합하였다. 어세이에서 사용된 바이오틴화된 T0170056G05의 농도 (30 nM)는 세포와의 결합에 대한 EC_{50} 값 이하였다 (데이타는 도시되지 않음). 4℃에서 90분의 항온반응 기간 이후에, 바이오틴화된 T01700056G05 나노바디의 결합은 유세포측정으로 결정하였다. 이를 위해, 세포를 3회 세척하였고 FACS 완충액 중 스트렙타비딘-PE (ebioscience, 12-4317-87, 1000배 희석)에 재현탁시켰으며 4℃에서 30분 동안 항온반응시켰다. 이후에, 세포를 3회 세척하였고 4℃에서 30분 동안 FACS 완충액 + 1 μg/mL TOPRO (Molecular Probes, T3605)에 재현탁시킨 후 BD FACSCanto를 통해 분석하였다. 먼저 총 세포 개체군의 80% 초과를 의미하는 P1 개체군을 FSC-SSC 분포를 기반으로 선택하였다. 10000개 세포가 P1 내에서 계측되었다. 이 개체군으로부터 TOPRO+ 세포 (죽은 세포)는 배제하였고 중앙치 PE 값을 계산하였다. T0170056G05는 양성 대조군으로서 함께 사용하였다.

[1502] 결과는 도 23에 표시되어 있다. 용량 반응 곡선으로부터 수득된 IC_{50} 값은 표 C-17에 표시되어 있다.

표 C-17: T0170056G05 경쟁 어세이에서 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 및 대조군 나노바디의 IC50 (M).

	CHO-K1 huTCR/CD3		
샘플 ID	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000138	5.9E-08	5.5E-08	6.4E-08
T017000139	4.9E-08	4.5E-08	5.2E-08
T017000129	1.8E-07	1.7E-07	1.9E-07
T017000128	5.7E-08	5.3E-08	6.1E-08
T017000116	>1E-07		
T0170056G05	5.5E-08	5.2E-08	5.9E-08

[1503]

[1504] 세포 상에 발현된 인간 TCR/CD3과 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 결합이 확인되었다. 1가 TCR 나노바디 대비 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 T017000116의 친화성 저하가 TCR 나노바디의 C-말단 위치에 기인하여 관찰되었다.

[1505] **실시예 23: 유세포측정으로 세포 상에 발현된 사이노몰거스 TCR/CD3과의 결합에 대한 T017000099 및 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 간 결합**

[1506] 사이노 TCR/CD3과 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 결합은 유세포측정으로 T01700099 (2가 T0170056G01, 서열번호 337) 경쟁 어세이에서 평가하였다. 이러한 목적을 위해서, HSC-F (JCRB, JCRB1164) 사이노몰거스 TCR/CD3 발현 세포를 회수하고 V-바닥 96-웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)로 옮겼고 FACS 완충액 중 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 연속 희석물 (1 μM로부터 출발) 및 500 nM의 T01700099를 혼합하였다. 4℃에서 90분의 항온반응 기간 이후에, 세포를 원심분리에 의해 FACS 완충액으로 3회 세척하였고 1 μg/mL의 단일클론 마우스 ANTI-FLAG®M2 항체 (Sigma-Aldrich, F1804)로 30분 동안 4℃에서 프로빙하여 결합된 T01700099를 검출하였다. 검출은 5 μg/mL 알로파이코시아닌 (APC) AffiniPure 염소 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch, 115-135-

164)를 사용해 30분 동안 4℃에서 수행하였다. 세포를 세척하고 프로피디움 아이오딘과 항온반응하여 이후 게이팅 절차 동안 제거되는 죽은 세포를 염색하였다. 세포를 BD FACSArray를 통해 분석하였. 먼저 총 세포 개체군의 80% 초과를 나타내는 P1 개체군을 FSC-SSC 분포를 기반으로 선택하였다. 이 게이트에서, 10000개 세포가 획득 동안 계측되었다. 이 개체군으로부터 PI+ 세포 (죽은 세포)는 배제하였고 중앙치 APC 값을 계산하였다. T017000125는 양성 대조군으로서 함께 사용하였다.

[1507] 결과는 도 24에 표시되어 있다. 용량 반응 곡선으로부터 수득된 IC_{50} 값은 표 C-18에 표시되어 있다.

표 C-18: T017000099 경쟁 어세이에서 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 및 대조군 나노바디의 IC50 (M).

[1508]

	HSC-F		
샘플 ID	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000125	3.7E-07	2.5E-07	5.3E-07
T017000128	6.3E-07	4.4E-07	8.8E-07
T017000129	5.2E-07	3.7E-07	7.2E-07
T017000138	4.4E-07	3.2E-07	6.2E-07
T017000139	6.4E-07	4.5E-07	9.2E-07

[1509] N-말단에 TCR 결합 나노바디를 갖는 모든 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 경우에, 사이노몰거스 TCR/CD3과의 결합이 관찰되었다.

[1510] **실시예 24: 인간 CD123 단백질과 1가 나노바디 및 다중특이적 폴리펩티드의 결합 (SPR)**

[1511] CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드에 대한 결합 친화성은 ProteOn XPR36 장비 상에서 SPR 기반 친화성 결정을 통해 평가하였다. 이것을 위해, 재조합 CD123 (R&D Systems, 301-R3-025/CF)은 EDC 및 NHS 화학을 사용하여, 아민 커플링을 통해 CD5 칩 상에 고정시켰다. 정제된 나노바디는 동역학 분석을 위해 원-샷 동역학을 통해서 상이한 농도 (4.2 nM 내지 1000 nM)로 2분 동안 주입되었다. 1000 nM 샘플의 15분이었다. 유속은 45 ㎕/분이었고 ProteOn 러닝 완충액 (PBS, pH 7.4, 0.005% Tween 20)이 러닝 완충액으로서 사용되었다. 결합/해리 데이타의 평가는 1:1 상호작용 모델 (랑뮈르 결합 모델)을 적합화하여 수행되었다. 결합 특징을 표 C-19에 표시하였다.

표 C-19: 직접 코팅된 인간 CD123 단백질을 사용한 Proteon 으로 결정된 다중특이적 폴리펩티드의 결합 특징

[1512]

샘플 ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
T017000120	*1.5E+04*	*2.5E-03*	*1.7E-07*	이전 폴리펩티드의 불완전 재생으로 인한 값만 표시 (T017000116)
T017000121	4.0E+04	8.6E-04	2.2E-08	-
T017000113	2.0E+04	3.2E-03	1.6E-07	
T017000115	*3.3E+05*	*5.1E-04*	*1.5E-09*	이전 폴리펩티드의 불완전 재생으로 인한 값만 표시 (T017000114)
T017000114	8.4E+04	1.9E-04	2.3E-09	
T017000116	2.4E+05	2.1E-04	8.8E-10	

[1513] 인간 IL-3Rα에 대한 1가 나노바디 및 다중특이적 폴리펩티드의 KD는 세포 상의 결합 데이타와 상관성이 있었다. 2개 IL-3Rα 빌딩 블록을 함유하는 폴리펩티드 T017000116이 최고의 KD를 가졌다.

[1514] **실시예 25: 유세포측정 기반 어세이에서 CD123/TCr 다중특이적 폴리펩티드에 의한 CD123 표적 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸**

[1515] CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드가 종양 세포를 사멸시킬 수 있는지 여부를 평가하기 위해서, 세포독성 어세이를 단리된 이펙터 세포로서 인간 T 세포로 수행하였다.

[1516] 이를 위해, 인간 T 세포를 RosetteSep (StemCell Technologies, 15061)을 사용해 건강한 지원자 (혈액 은행 Gent) 유래 버피 코트 혈액으로부터 채혈된 후에 제조사의 지시서에 따라 Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, 17-1440-03) 상에서 농축하였다. 정제된 인간 T 세포의 품질 및 순도는 유세포측정 어세이에서 항-CD3 (eBioscience, 12-0037-73), 항-CD8 (BDBiosciences, 555367), 항-CD4 (BD Biosciences, 345771), 항-CD45RO (BD Biosciences, 555493), 항-CD45RA (BDBiosciences, 550855), 항-CD19 (BDBiosciences, 555413), 항-CD25 (BDBiosciences, 557138) 및 항-CD69 (BDBiosciences, 557050) 형광 표지된 항체를 사용해 점검하였다. 세포를 액체 질소에 냉동시켰다.

[1517] 인간 CD123 발현 MOLM-13 및 KG1a 세포를 제조사의 지시서에 따라서 PKH26 적색 형광 세포 링커 키트 (Sigma,

PKH26GL-1KT)를 사용하여 8 μM PKH-26 막 염료로 표지하였고 표적 세포로서 사용하였다. 2.5×10^5 이펙터 (즉, 인간 초대 T 세포) 및 2.5×10^4 표적 세포 (즉, PKH-표지된 MOLM-13 또는 KG1a 세포)를 96-웰 V-바닥 플레이트 (이펙터 대 표적 비율은 10:1)에서 공동-항온반응시켰다. 농도-의존적 세포 용해의 측정을 위해서, CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 연속 희석물을 세포에 첨가하였고 5% CO2 분위기 중에 37℃에서 18시간 동안 항온반응시켰다. 나노바디 A0110056A10 및 폴리펩티드 T017000129 및 T017000132는 음성 대조군으로서 사용하였다. 항온반응 이후에, 세포를 원심분리를 통해 펠렛화하였고 FACS 완충액으로 세척하였다. 이후에, 세포를 죽은 세포와 생존 세포를 구별하기 위해서 5 nM TOPRO3 (Molecular Probes, T3605)이 보충된 FACS 완충액에 재현탁시켰다 세포를 FACS 어레이 유세포측정계 (BD Biosciences)를 사용해 분석하였다. 샘플 당, 80 ㎕의 총 샘플 부피가 획득되었다. 게이팅은 PKH26 양성 세포에 대해 설정되었고, 이 개체군 내에서 TOPRO3 양성 세포를 결정하였다. T017000129, T017000132 및 A0110056A10이 음성 대조군으로서 함께 사용되었다.

[1518] 예시적인 결과는 개별적으로 MOLM-13 및 KG1a 세포에 대해 도 25 및 도 26에 도시되어 있다. EC_{50} 값은 개별적으로 MOLM-13 및 KG1a 세포에 대해 표 C-20 및 표 C-21에 표시되어 있다.

[1519]

표 C-20: 유세포측정 기반 어세이에서 MOLM-13 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸에 대한 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 EC50 (M) 및 용해율 %.

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율%
T017000116	2.2E-10	1.1E-10	4.5E-10	17
T017000128	1.5E-10	9.4E-11	2.5E-10	20
T017000135	1.1E-11	8.1E-12	1.5E-11	33
T017000138	2.3E-11	1.5E-11	3.7E-11	22
T017000139	2E-11	1.4E-11	2.9E-11	29
T017000134	3E-10	1E-10	9.2E-10	9

[1520]

표 C-21: 유세포측정 기반 어세이에서 KG1a 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸에 대한 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 EC50 (M) 및 용해율%.

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율%
T017000114	2.4E-10	1.5E-10	3.6E-10	7
T017000116	4.2E-10	2.4E-10	7.3E-10	5
T017000128	8.7E-10	7.0E-10	1.1E-09	28
T017000135	5.1E-11	4.1E-11	6.5E-11	18
T017000138	2.8E-10	2.2E-10	3.4E-10	24
T017000139	1.1E-10	8.5E-11	1.3E-10	27

[1521] CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드는 CD123 양성 세포의 인간 T 세포 매개 사멸을 유도하였다. 다중특이적 폴리펩티드에서 TCR 나노바디의 위치에 대한 분명한 선호가 존재하였다. 일반적으로, N-말단 위치에 항-TCR 나노바디를 갖는 폴리펩티드가 최고의 사멸 잠재성을 보였다. 2개 CD123 반응성 나노바디를 갖는 폴리펩티드 T017000135, T017000138 및 T013700139는 오직 하나의 CD123 만을 갖는 폴리펩티드 T017000128과 비교하여 개선된 역가를 보였다. 이들 결과는 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드가 종양 표적 양성 세포주의 T 세포 매개 사멸을 유도할 수 있고 단일 항원 상의 다수 에피토프 표적화가 기능성 (화합력 효과)을 개선시킨다는 것을 입증한다.

[1522] 또한, N 말단 위치에 TCR 반응성 나노바디를 갖는 3가 폴리펩티드인 폴리펩티드 T017000138 및 T017000139의 비교는 역가 및 효능에 대해 CD123 나노바디의 배향의 영향이 존재한다는 것을 보여주었다.

[1523] 1가 CD123 빌딩 블록 및 TCR 빌딩 블록 함유 미관련 폴리펩티드는 임의의 표적 세포 사멸을 유도하지 않아서 사멸을 유도하기 위해서 T 세포 및 표적 세포와 다중특이적 CD123/TCR 폴리펩티드를 교차-연결시켜야하는 요건이 확인되었다.

[1524] 결과는 상이한 도너로부터 정제된 T 세포를 사용해 확인하였다 (데이타는 도시되지 않음).

[1525] **실시예 26: 유세포측정 기반 어세이에서 다중특이적 CD123/TCR 폴리펩티드에 의한 CD123 표적 세포의 재지정된 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸**

[1526] CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티의 인간-사이노 TCR 교차-반응성을 확인하기 위해서, 폴리펩티드는 사이노몰거스 T 세포 매개 CD123 양성 종양 세포 사멸 어세이에서 평가하였다. 간략하게, 다중특이적 폴리펩티드는 실시예 25에 기술된 바와 같이 10 대 1의 이펙터 세포 대 표적 세포 비율 (E:T 비율)에 상응하는, 2.5×10^5 이펙터 세포

(즉, 사이노몰거스 초대 T 세포)의 존재 하에 2.5×10^4 PKH 표지된 표적 세포 (즉, MOLM-13 또는 KG1a 세포)와 항온반응시켰다. T 세포는 범 T 세포 단리 키트 (MACS, 130-091-993)를 사용하여 LPT 실험실 (Pharmacology and Toxicology GmbH & Co. KG)이 단리하였다. 나노바디 A0110056A10 및 폴리펩티드 T017000129 및 T017000132는 음성 대조군으로서 함께 사용하였다.

[1527] 예시적인 결과는 개별적으로 MOLM-13 및 KG1a 세포에 대해 도 27 및 도 28에 도시되어 있다. EC_{50} 값은 개별적으로 MOLM-13 및 KG1a 세포에 대해 표 C-22 및 표 C-23에 표시되어 있다.

표 C-22: 유세포측정 기반 어세이에서 MOLM-13 세포의 재지정된 사이노 T 세포 매개 사멸에 대한 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 EC50 (M) 및 용해율%.

[1528]

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율 %
T017000116	3.9E-10	2.4E-10	6.2E-10	15
T017000128	1.8E-10	1.5E-10	2.3E-10	50
T017000138	1.7E-11	1.3E-11	2.2E-11	47
T017000139	1.1E-11	8.9E-12	1.4E-11	55

표 C-23: 유세포측정 기반 어세이에서 KG1a 세포의 재지정된 사이노 T 세포 매개 사멸에 대한 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 EC50 (M) 및 용해율%.

[1529]

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율%
T017000114	1.9E-10	1.3E-10	2.8E-10	7
T017000116	3.7E-10	2.9E-10	4.7E-10	14
T017000128	3.2E-10	2.7E-10	3.7E-10	38
T017000135	2.4E-11	2.0E-11	2.9E-11	22
T017000138	8.8E-11	7.6E-11	1.0E-10	38
T017000139	2.6E-11	2.3E-11	3.0E-11	42

[1530] T017000134를 제외하고, 모든 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드는 CD123 양성 MOLM-13 또는 KG1a 세포주의 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸을 유도하였다. N 말단 위치에서 TCR 반응성 나노바디를 갖는 폴리펩티드가 가장 강력하고 효율적이었다. 폴리펩티드 T017000138 및 T017000139는 둘 모두가 2개의 CD123 반응성 나노바디를 갖는 3가 폴리펩티드로서, 오직 하나의 CD123 반응성 나노바디를 함유하는 폴리펩티드 T017000128과 비교하여 개선된 역가를 보였다. TCR 빌딩 블록을 함유하는 1가 항-CD123 나노바디 및 미관련 폴리펩티드는 임의의 표적 세포 사멸을 유도하지 않아서, 사멸을 유도하기 위한 T 세포 및 표적 세포와 다중특이적 CD123/TCR 폴리펩티드를 교차 연결해야 하는 요건을 확인하였다.

[1531] 결과는 상이한 사이노몰거스 원숭이로부터 정제된 T 세포를 사용해 확인하였다 (데이타는 도시되지 않음).

[1532] **실시예 27: CD123 표적 세포의 재지정된 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸 동안 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드에 의한 사이노몰거스 T 세포 활성화**

[1533] 다중특이적 CD123/TCR 폴리펩티드로 사이노몰거스 T 세포 및 CD123 양성 MOLM-13 세포의 처리 후 T 세포 활성화를 모니터링하기 위해서, 폴리펩티드는 실시예 26에 기술된 바와 같이 2.5×10^5 초대 T 세포 (E:T=10:1)의 존재 하에서 2.5×10^4 표적 세포와 72시간 동안 37℃에서 항온반응시켰다. 사이노몰거스 T 세포 활성화는 유세포측정으로 CD4/CD8 T 세포 개체군에 대한 CD25 상향조절을 모니터링하여 측정하였다.

[1534] 이를 위해, 72시간의 항온반응 후, 이펙터 및 표적 세포를 원심분리를 통해 수집하였고 25 ㎍/mL 인간 Fc 블록 (BD Bioscience, 564220)이 포함된 FACS 완충액에 현탁시켰고 10분간 실온 (RT)에서 항온반응시켰다. 다음으로, 세포는 FACS 완충액 중에 4℃에서 30분 동안, 단일클론 마우스 항-CD4-APC (Biolegend, 300505) (200배 희석), 단일클론 마우스 항-CD8 APC (BDBiosciences, 555366) (50배 희석) 및 단일클론 항-CD25 PE (BD Biosciences, 557138) (50배 희석) 항체로 염색하였다. 항온반응 이후에, 세포를 원심분리로 펠렛화하고 FACS 완충액으로 세척하였다. 이후에 세포를 FACS 완충액에 재현탁시켰고 FACS Canto 유세포측정계 (BD Biosciences)로 분석하였다. 샘플 당, 30 ㎕의 총 샘플 부피를 획득하였다. T 세포는 SSC-APC 그래프를 기반으로 게이팅하였다. 이 개체군으로부터 평균 PE 값을 계산하였다.

[1535] 데이타는 도 29에 도시되어 있다. T017000139에 대해 수득된 EC50 값은 표 C-24에 표시되어 있다.

표 C-24: 유세포측정 기반 어세이에서 MOLM-13 세포의 재지정된 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸 동안 T017000139 에 의한 사이노몰거스 T 세포 상의 CD25 상향조절의 EC50 (M).

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	6.0E-11	5.1E-11	7.1E-11

[1536]

[1537] CD123 양성 MOLM-13 표적 세포 및 1가 TCR 또는 CD123 결합 빌딩 블록 T0170056G05, A0110055F03 또는 A0110056A10 또는 미관련 다가 폴리펩티드 T017000129와 항온반응시켰을 때 CD25 상향조절이 관찰되지 않았다. 데이타는 CD123 양성 MOLM-13 표적 세포 및 T017000139 다중특이적 폴리펩티드와 항온반응 이후에 사이노몰거스 초대 T 세포 상에서 CD25 상향조절을 보였다.

[1538] MOLM-13 세포는 용량-의존적 방식으로 사멸되어서 (도 25, 표 C-22), 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드가 재지정 사멸 과정에서 T 세포 활성화를 유도시켰다는 것을 의미한다.

[1539] 유사하게, 표적 세포 및 1가 빌딩 블록 및 미관련 다중특이적 폴리펩티드와 함께 항온반응시 T 세포가 활성화되지 않아서, CD25 상향조절을 유도시키기 위해, T 세포 및 표적 세포와 TCR/CD123 다중특이적 폴리펩티드를 교차-연결해야 하는 요건을 시사한다.

[1540] **실시예 28: xCELLigence 기반 어세이에서 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 CD123 형질감염된 부착성 표적 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸**

[1541] TCR/CD123 결합 폴리펩티드는 xCELLigence 기반 어세이에서 인간 CD123 형질감염된 부착성 표적 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸에 대해 특징규명되었다. 이러한 어세이에서, 전극의 표면에 대한 표적 세포의 부착으로 유도된 임피던스의 변동이 측정된다. T 세포는 비부착성이므로 임피던스 측정에 영향을 미치지 않는다. xCELLigence 장비 (Roche)는 전기 임피던스의 변화를 정량하여서, 그들을 세포에 의해 덮혀진 조직-배양 웰의 총 면적에 정비례하는 세포-지수라고 하는 무차원 매개변수로서 표시한다. 간략하게, xCELLigence 스테이션을 5% CO_2 인 37℃ 항온반응기에 위치시켰다. 50 ㎕의 어세이 배지를 E-플레이트 96 (ACEA Biosciences; 05 232 368 001)의 각 웰에 첨가하였고, xCELLigence 시스템 상에서 블랭크 판독을 수행하여 세포 부재 하에서 배경 임피던스를 측정하였다. 후속하여, 2×10^4 인간 CD123 형질감염된 CHO Flp-In 또는 CHO Flp-In 기준 세포를 E-플레이트 96 상에 파종하였고, 50 ㎕의 연속 희석된 다중특이적 폴리펩티드를 첨가하였다. RT에서 30분 이후에, 50 ㎕의 인간 T 세포 (3×10^5)를 각 웰에 첨가하여 이펙터 대 표적 비율이 15:1이 되게 하였다. 플레이트를 xCELLigence 스테이션 상에 위치시켰고 임피던스를 15분 마다 3일 동안 측정하였다. 데이타는 결과에 표시된 고정 시점을 사용해 분석하였다.

[1542] 이 어세이에서 수득된 IC_{50} 값은 표 C-25에 열거되었다. 결과를 도 30, 도 31 및 도 32에 도시한다.

표 C-25: 파종 후 50h 에 분석된, 15 대 1 의 이펙터 대 표적 비율을 사용한, xCELLigence 기반 어세이에서 인간 CD123 형질감염된 부착성 표적 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸에 대한 T013700139 의 IC50 (M).

샘플 ID	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	2.4E-10	2.0E-10	2.8E-10

[1543]

[1544] 수득된 데이타는 유세포측정 기반 사멸 어세이에서 수득된 결과를 확인해 주었고, 즉 CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드는 CD123 양성 세포주의 인간 T 세포 매개 사멸을 유도할 수 있었고 (도 30), T 세포 부재 하에서 어떠한 사멸 활성도 관찰되지 않는다 (도 32). 또한, CD123 종양 표적 항원이 존재했을 경우만 T 세포 매개 사멸이 관찰되어서 (기준 세포주에 의한 사멸 부재의 경우 도 31 참조) 다중특이적 폴리펩티드가 세포독성의 유도를 위해 그들 표적에 결정적으로 의존한다는 것을 시사한다.

[1545] 1가 나노바디 A0110056A10 및 T0170056G05 및 미관련 폴리펩티드 T017000129는 표적 세포 사멸을 유도하지 않아서, 사멸을 유도하기 위해 T 세포 및 표적 세포와 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드를 교차-연결해야 하는 요건을 확인하였다.

[1546] 결과는 상이한 도너 유래 정제된 T 세포를 사용해 확인하였다 (데이타는 도시되지 않음).

[1547] **실시예 29: xCELLigence 기반 어세이에서 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 CD123 형질감염된 부착**

성 표적 세포의 재지정된 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸

[1548] 다중특이적 폴리펩티드의 교차-반응성을 확인하기 위해서, 폴리펩티드는 실시예 28에 기술된 바와 같이 xCELLigence 기반 어세이에서 사이노몰거스 CD123 형질감염된 부착성 표적 세포의 재지정된 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸에서 평가되었다.

[1549] 이 어세이에서 수득된 IC_{50} 값은 표 C-26에 열거되었다. 결과는 도 33, 도 34 및 도 35에 도시되어 있다.

표 C-26: 파종 후 80h 에 분석된, 15 대 1 의 이펙터 대 표적 비율을 사용한, xCELLigence 기반 분석에서 사이노몰거스 CD123 형질감염된 부착성 표적 세포의 재지정된 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸에 대한 T013700139 의 IC50 (M).

[1550]

샘플 ID	IC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	1.1E-11	2.7E-12	4.8E-11

[1551] CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 T017000139는 CD123 양성 세포주의 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸을 유도할 수 있었고 (도 33) T 세포 부재 하에서 어떠한 사멸 활성도 관찰되지 않았다 (도 35). 또한, 오직 사이노몰거스 CD123 종양 표적 항원이 존재할 때만, T 세포 매개 사멸이 관찰되어서 (도 34), 다중특이적 폴리펩티드가 세포 독성의 유도를 위해 그들 표적에 결정적으로 의존적이라는 것을 의미한다.

[1552] 1가 나노바디 A0110056A10 및 T0170056G05 및 미관련 폴리펩티드 T017000129는 표적 세포 사멸을 유도시키지 않아서, 사멸을 유도하기 위해서 T 세포 및 표적 세포와 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드를 교차-연결하는 요건을 확인하였다.

[1553] 다중특이적 폴리펩티드 T017000139의 인간-사이노몰거스 CD123 및 TCR 교차-반응성은 xCELLigence 기반 사멸 어세이에서 확인되었다.

[1554] 결과는 상이한 도너로부터 정제된 T 세포를 사용해 확인하였다 (데이타는 도시되지 않음).

[1555] **실시예 30: 재지정된 사멸 동안 사이토카인 생성에 대한 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 영향**

[1556] 사이토카인 방출의 유도는 xCELLigence 어세이를 기반으로 인간 및 사이노 T 세포 매개 CD123 사멸 동안 모니터링되었다. 사이토카인 IFN-γ 및 IL-6의 방출은 ELISA로 측정하였다. 간략하게, 인간 CD123 형질감염된 CHO-K1 세포 (2×10^4 세포/웰)는 실시예 28에 기술된 바와 같이, 다중특이적 TCR/CD123 결합 폴리펩티드의 연속 희석물 (125 nM에서 출발) 또는 고정 농도 (125 nM)의 미관련 폴리펩티드와 정제된 인간 또는 사이노몰거스 초대 T 세포 ($3\times10E^5$ 세포/웰)가 존재하는 E-플레이트 96에 파종하였다. 플레이트에 인간 또는 사이노 초대 T 세포/폴리펩티드의 첨가 후 72시간에, 인간 초대 T 세포에 의한 인간 IFN-γ 및 인간 IL-6 생성 및 사이노몰거스 초대 T 세포에 의한 사이노몰거스 IFN-γ를 상등액 중에서 측정하였다.

[1557] 인간 IL-6의 방출은 제조사의 지시서에 따라서 인간 IL-6 Quantikine ELISA 키트 (R&D systems, D6050)를 사용하여 ELISA에서 측정되었다. IFN-γ의 방출은 다음과 같이 결정되었다: Maxisorp 96-웰 ELISA 플레이트 (Nunc)는 항-인간 IFN-γ 항체 (BDBiosciences, 551221)와 개별적으로 항-사이노몰거스 IFN-γ 항체 (Biolegend, 507502)를 코팅하였다. 밤새 항온반응 이후에, 플레이트를 세척하고 1시간 동안 실온에서 PBS + 2% BSA로 차단하였다. 다음으로, 플레이트는 100 ㎕의 상등액 (2배 희석) 및 1 ㎍/mL의 바이오틴화된 항-IFN-γ 항체 (BD Biosciences, 554550)와 2시간 30분 동안 진탕하면서 항온반응시켰고, 다시 세척하였고 스트렙타비딘-HRP (Dakocytomation, P0397)과 항온반응시켰다. 30분 이후에, TMB 원 용액 (Promega, G7431)을 첨가하였다. 반응은 2M H_2SO_4 로 중단시켰고 IFN-γ의 폴리펩티드 용량 의존적 생성은 Tecan sunrise 4를 사용하여 405 nm의 OD에서 측정하여 결정되었다.

[1558] IFN-γ에 대한 결과는 도 36에 도시되어 있다. IL-6에 대한 결과는 도 37에 도시되어 있다. 이들 어세이에서 수득된 EC50 값은 표 C-27 및 표 C-28에 열거되어 있다.

표 C-27: xCELLigence 기반 어세이에서 CD123 형질감염된 부착성 표적 세포의 재지정된 T 세포 매개 사멸 동안 IFN-γ 분비에 대한 TCR/CD123 결합 폴리펩티드의 EC50 (M).

	인간 T 세포			사이노몰거스 T 세포		
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000128	8.6E-11	6.6E-11	1.1E-10	1.0E-10	3.7E-11	2.9E-10
T017000135	2.0E-09	1.3E-09	3.1E-09	/	/	/
T017000138	4.0E-10	2.3E-10	7.0E-10	8.7E-10	2.1E-10	3.6E-09
T017000139	1.0E-09	5.9E-10	1.9E-09	2.3E-09	7.8E-10	6.6E-09
T017000116	8.1E-09	4.6E-09	1.4E-08	/	/	/

[1559]

표 C-28: xCELLignce 기반 어세이에서 CD123 형질감염된 부착성 표적 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸 동안 인간 IL-6 분비에 대한 TCR/CD123 결합 폴리펩티드의 EC50 (M).

	인간 T 세포		
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000128	6.9E-11	3.8E-11	1.3E-10
T017000135	5.9E-10	3.0E-10	1.2E-09
T017000138	3.8E-11	1.8E-11	8.1E-11
T017000139	4.8E-10	2.6E-10	9.0E-10
T017000116	9.6E-09	5.6E-09	1.6E-08

[1560]

[1561] 사이토카인은 CD123 과발현 CHO Flp-In 세포 및 초대 T 세포는 CD123/TCR 결합 폴리펩티드와 항온반응시켰을 때 관찰되었다. 미관련 폴리펩티드 T017000129 및 T017000132는 사이토카인 생성을 유도시키지 않았다.

[1562] **실시예 31: 건강한 PBMC에서 다중특이적 CD123/TCR 폴리펩티드에 의한 재지정된 자기유래 T 세포 형질세포양 수지상 세포 (pDC) 및 호염기구 고갈**

[1563] 저온보관된 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)를 해동시키고 어세이 배지 (RMPI 1640 + 10% FBS)로 세척하였다. 2×10^5 PBMC를 96-웰 V-바닥 플레이트의 200 ㎕ 어세이 배지 중 다중특이적 폴리펩티드의 연속 희석물과 항온반응시켰고 5% CO_2 중 37℃의 항온반응기에서 항온반응시켰다. 표시된 시점에서, 세포를 4℃에서 단일클론 마우스 항-CD14-APC (Biolegend, 301808), 항-CD16-APC (Biolegend, 302012), 항-CD19-APC (Biolegend, 302212), 항-CD20-APC (Biolegend, 302312), 항-CD56-APC (Biolegend, 318310), 항-CD123-PE (Biolegend, 306006) 및 항-HLA-DR-FITC (Biolegend, 307603) 항체로 염색하였다. 간략하게, 세포를 회수하고 FACS 완충액 (Gibco의 D-PBS로서, sigma의 10% FBS 및 Merck의 0.05% 아지드화나트륨 포함)으로 1회 세척하고, 25 ㎕의 인간 BD Fc 블록, 0.5 ㎍/mL (BD Biosciences, 564220, 1000x 희석)에 10분 동안 RT에서 재현탁시켰다. 다음으로, 25 ㎕의 항체를 첨가하고 제조사의 지시서에 따라서 30분 동안 4℃에서 항온반응시켰다. PBMC를 함유하는 개별 웰을 죽은 세포 개체군을 생존 세포와 구별하기 위해서 5 nM TOPRO3 (Molecular Probes, T3605)이 보충된 FACS 완충액에 재현탁시켰다. 샘플을 3회 세척하였고, FACS 완충액 (Gibco의 D-PBS로서, sigma의 10% FBS 및 Merck의 0.05% 아지드화나트륨 포함)에 재현탁시키고 FACS Diva 소프트웨어가 구비된 FACS Canto (BD) 세포계에서 분석하였다. 샘플 당 75 ㎕의 총 샘플 부피가 획득되었다. 데이타는 FACS Diva 및 Flowing 소프트웨어를 사용해 수행하였다.

[1564] TOPRO 염색을 함유하는 웰을 기반으로, 게이팅은 죽은 세포를 배제하도록 설정되었다. 인간 및 사이노몰거스 pDC 및 호염기구는 계통 마커 (CD16, CD20, CD19, CD56) 음성/CD123 양성 개체군으로서 동정되었다.

[1565] 결과를 도 38에 도시하였다.

[1566] CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드에 의한 인간과 개별적으로 사이노몰거스 CD123 양성 개체군의 고갈은 5시간의 항온반응 이후에 관찰되었다. 표적화 나노바디가 미관련 나노바디로 교체되었을 때, CD123 양성 개체군의 고갈이 관찰되지 않아서, 고갈을 유도하기 위해 T 세포 및 표적 세포와 TCR/CD123 다중특이적 폴리펩티드의 교차-연결 요건을 시사한다.

[1567] 3명의 상이한 인간 도너 유래 PBMC 및 2마리의 상이한 사이노몰거스 원숭이 유래 PBMC를 사용해 어세이를 반복하여, TCR/CD123 다중특이적 폴리펩티드의 기능성을 확인하였다.

[1568] **실시예 32: 건강한 인간 PBMC 샘플에서 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 재지정된 자기유래 인간 T 세포 단핵구 고갈**

[1569] 단핵구의 고갈을 평가하기 위해서, 해동시키고 어세이 배지 (RMPI 1640 + 10%FBS)로 세척하고, 5시간 또는 24시간 동안 다중특이적 폴리펩티드의 연속 희석물과 항온반응시킨 저온보존된 인간 PBMC를 사용하여, 상기 기술된

바와 같이 어세이를 수행하였다. 세포의 염색은 상기 기술된 대로 수행하였다. 단핵구는 CD14+ 개체군으로서 동정되었다.

[1570] 결과는 도 39에 도시되어 있다.

[1571] 5시간의 항온반응 후, 단핵구 고갈은 TCR/CD123 다중특이적 폴리펩티드 및 미관련 나노바디에 대해 관찰되지 않았다. 24시간 후에, 단핵구 고갈이 TCR/CD123 다중특이적 폴리펩티드에 대해 관찰되었지만 미관련 폴리펩티드에서는 관찰되지 않았다. 어세이는 3명의 상이한 도너 유래 PBMC를 사용해 반복하여, TCR/CD123 다중특이적 폴리펩티드의 기능성을 확인하였다.

[1572] **실시예 33: 건강한 인간 PBC 샘플에서 자기유래 CD123 양성 세포의 재지정된 T 세포 사멸 동안 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 인간 T 세포 활성화**

[1573] TCR/CD123 다중특이적 폴리펩티드 매개 고갈 과정 동안 T 세포 활성화를 특징규명하기 위해서, 자기유래 PBMC 어세이를 상기 기술된 대로 수행하였고 인간 T 세포의 활성화 상태는 24시간 항온반응 이후에 CD69의 상향조절의 측정으로 모니터링하였다. 간략하게, 24시간의 항온반응 시간 이후에, 세포는 인간 T 세포를 동정하기 위해서 단일클론 마우스 항-CD3-FITC 항체 (BD Biosciences, 555332) 및 T 세포 활성화를 평가하기 위해서 단일클론 마우스 항-인간 CD69-PE 항체 (BD Biosciences, 557050)로 30분 동안 4℃에서 염색하였다. 세포를 3회 세척하였고 FACS 완충액 (Gibco의 D-PBS로서, sigma의 10% FBS 및 Merck의 0.05% 아지드화나트륨 포함)에 재현탁시킨 후 FACS Diva 소프트웨어가 장착된 FACS Canto (BD) 세포계를 통해 분석하였다. 샘플 당, 75 ㎕의 총 샘플 부피가 획득되었다. 데이타 분석은 FACS Diva 및 Flowing 소프트웨어를 사용해 분석되었다.

[1574] 예시적인 결과는 도 40에 도시되어 있다.

[1575] 데이타는 PBMC를 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드와 항온반응시켰을 때 인간 CD3+ T 세포 상의 CD69의 용량 의존적 상향조절을 보여주었다. 1가 나노바디 또는 미관련 폴리펩티드와의 항온반응은 CD69 상향조절을 일으키지 않았다.

[1576] **실시예 34: 유세포측정 기반 어세이에서 CD123 표적 세포의 재지정된 T 세포 매개 사멸에 대한 미관련 폴리펩티드의 특징규명**

[1577] TCR 나노바디 T0170056G05의 안전성을 평가하기 위해서, 미관련 폴리펩티드 (1가 나노바디 및 다가 폴리펩티드 T017000129)의 심층 분석을 실시예 25 및 26에 기술된 바와 같이 10:1의 E:T 비율을 사용하여 재지정된 T 세포 매개 표적 사멸 어세이에서 수행하였다. 폴리펩티드 T017000139는 양성 대조군으로서 함께 사용되었다.

[1578] 도 41에 도시되어 있고, MOLM-13을 사용한 결과는 도 42에 도시되어 있다. 수득된 EC50 값은 표 C-29 및 표 C-30에 열거되어 있다.

표 C-29: 유세포측정 기반 어세이에서 CD123 양성 KG1a 세포의 재지정된 T 세포 매개 사멸에 대한 T017000139 의 EC50 (M).

[1579]

	인간 T 세포			사이노몰거스 T 세포		
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	8.1E-11	7.4E-11	8.9E-11	1.7E-11	9.7E-12	3.1E-11

표 C-30: 유세포측정 기반 어세이에서 CD123 양성 MOLM-13 세포의 재지정된 T 세포 매개 사멸에 대한 T017000139 의 EC50 (M).

실험 1

	사이노몰거스 T 세포		
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	6E-11	5.1E-11	7.1E-11

실험 2

[1580]

	인간 T 세포			사이노몰거스 T 세포		
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	3.0E-11	1.9E-11	4.7E-11	3.1E-11	1.9E-11	5.1E-11

[1581] 양성 대조군 T017000139은 인간 및 사이노몰거스 T 세포를 사용했을 때 예상대로 거동하였다. 1가 빌딩 블록 또는 미관련 폴리펩티드 T017000129 (CD123 빌딩 블록이 미관련 빌딩 블록으로 교체됨)는 어떠한 것도 CD123 양성

세포의 사멸을 유도시키지 않아서, TCR/CD123 다중특이적 폴리펩티드의 특이성이 확인되었다.

[1582] **실시예 35: 인간 재지정된 사멸 동안 사이토카인 생성에 대한 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 영향**

[1583] 사이토카인 방출의 유도는 FACS 기반 판독을 기초로 인간 T 세포 매개 CD123 사멸 어세이 동안 모니터링되었다. 인간 사이토카인 IFN-γ 및 IL-6의 방출은 ELISA에 의해 측정되었다. 간략하게, MOLM-13 또는 KG1a는 실시예 25에 기술된 바와 같이, 다중특이적 TCR/CD123 결합 폴리펩티드 미관련 폴리펩티드의 연속 희석물과 정제된 인간 초대 T 세포 (3×10^5 세포/웰)의 존재 하에서 V-바닥 96-웰 플레이트 (2×10^4 세포/웰)에 파종되었다. 플레이트에 인간 초대 T 세포/폴리펩티드를 첨가한 후 72시간에, 상등액 중 인간 초대 T 세포에 의한 인간 IFN-γ 및 IL-6 생성을 실시예 30에 기술된 대로 측정하였다.

[1584] 결과는 도 43A, 43B 및 43C에 도시되어 있다. 이 어세이에서 수득된 EC_{50} 값은 표 C-31 및 표 C-32에 열거되어 있다.

표 C-31: 유세포측정 기반 어세이에서 CD123 양성 MOLM-13 또는 KG1a 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸 동안 인간 IFN-γ 분비에 대한 TCR/CD123 결합 폴리펩티드의 EC50 (M).

[1585]

	MOLM-13			KG1a		
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	3.4E-10	2.5E-10	4.6E-10	3.2E-11	1.9E-11	5.4E-11

표 C-32: 유세포측정 기반 어세이에서 CD123 양성 MOLM-13 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸 동안 인간 IL-6 분비에 대한 TCR/CD123 결합 폴리펩티드의 EC50 (M).

[1586]

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	2.3E-11	1.5E-11	3.5E-11

[1587] 사이토카인 생성은 MOLM-13 또는 KG1a 세포 및 인간 초대 T 세포가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드와 항온반응되었을 때 관찰되었다. 미관련 폴리펩티드 T017000129는 사이토카인 생성을 유도하지 않았다.

[1588] **실시예 36: CD123 음성 세포주를 사용한 유세포측정 기반 어세이에서 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 대한 표적 독립적 재지정된 인간 또는 사이노몰거스 이펙터 T 세포 사멸의 특징규명**

[1589] 다중특이적 폴리펩티드의 CD123 독립적 재지정된 사멸을 평가하기 위해서, CD123 음성 U-937 및 NCI-H929 세포주를 유세포측정 기반 사멸 어세이에서 평가하였다. U-937 및 NCI-H929 세포는 제조사 지시서에 따라서 8 μM PKH-25 막 염료로 PKH-26 적색 형광 세포 링커 키트 (Sigma, PKH26GL-1KT)를 사용해 표지화하고 표적 세포로서 사용하였다. 어세이는 초대 인간 또는 사이노몰거스 T 세포 (E:T=10:1)를 사용하여 실시예 25 및 26에 기술된 대로 수행하였다.

[1590] 예시적인 결과는 개별적으로 NCI-H929 및 U-937 세포에 대해 도 44 및 도 45에 도시되어 있다.

[1591] TCR/CD123 다중특이적 폴리펩티드 및 미관련 폴리펩티드는 오직 최소의 T 세포 재지정된 U-937 사멸 활성 (6% 미만)을 보여주어서, CD123과의 결합에 대해 양호한 특이성을 가짐을 시사한다.

[1592] **실시예 37: CD123 음성 세포주를 사용하는 재지정된 이펙터 T 세포 사멸 동안 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 대한 T 세포 활성화의 특징규명**

[1593] 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드로 T 세포 및 CD123 음성 세포의 처리 이후에 T 세포 활성화를 모니터링하기 위해서, 폴리펩티드는 실시예 25 및 26에 기술된 바와 같이, 2.5×10^5 초대 T 세포 (E:T=10:1)의 존재 하에서 2.5×10^4 U-937와 개별적으로 NCI-H929 표적 세포와 25시간 동안 37℃에서 항온반응시켰다. T 세포 활성화는 CD4/CD8 T 세포 개체군 상에서 72시간의 항온반응 이후에 CD25 상향조절을 단일클론 마우스 항-CD4-APC (Biolegend, 300505), 단일클론 마우스 항-CD8 APC (BD Biosciences, 555366) 및 단일클론 항-CD25 (BD Biosciences, 557138) 항체를 사용하여, 실시예27에 기술된 대로 유세포측정으로 측정하여 모니터링함으로써 이전에 기술된 대로 평가하였다.

[1594] 예시적인 결과는 도 46에 도시되어 있다.

[1595] 다중특이적 폴리펩티드 및 U-937 또는 NCI-929 CD123 음성 세포주와 항온반응 이후에 T 세포 활성화의 평가는 임의의 다중특이적 폴리펩티드에 대한 CD25의 오직 최소의 상향조절을 보여주었다. 그리하여, CD123 음성 표적

세포 존재 하에서 T 세포에 의한 오직 최소의 T 세포 활성화 또는 사멸만이 존재하였다.

[1596] **실시예 38: 인간 재지정된 사멸 동안 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 대한 사이토카인 생성의 특징규명**

[1597] FACS 기반 판독을 기반으로 하는 인간 T 세포 매개 사멸 어세이 동안 사이토카인의 특이적 방출 유도를 모니터링하였다. 사이토카인 IFN-γ 및 IL-6의 방출은 ELISA로 측정하였다. 간략하게, 실시예 25에 기술된 바와 같이, NCI-H929는 다중특이적 TCR/CD123 결합 폴리펩티드 또는 미관련 폴리펩티드의 연속 희석물과 정제된 인간 초대 T 세포 ($3\times10E^5$ 세포/웰)의 존재 하에서 V-바닥 96-웰 플레이트 (2×10^4 세포/웰)에 파종하였다. 플레이트에 인간 초대 T 세포/폴리펩티드의 첨가 이후 72시간에, 인간 초대 T 세포에 의한 IFN-γ 및 IL-6 생성은 실시예 30에 기술된 바와 같이 상등액에서 측정되었다. 결과는 도 47에 도시되어 있다.

[1598] 사이토카인 생성은 CD123 음성 NCI-H929 세포주 및 인간 초대 T 세포가 CD123/TCR 결합 폴리펩티드와 항온반응되었을 때 관찰되지 않았다.

[1599] **실시예 39: 재지정된 사멸 동안 T 세포 증식에 대한 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 영향**

[1600] 인간 T 세포의 증식에 대한 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 효과를 조사하기 위해서, 감마-조사 (100 Gy) MOLM-13 세포를 다중특이적 폴리펩티드 및 인간 초대 T 세포 (2×10^5 세포/웰)와 함께 96-웰 편평 바닥 마이크로타이터 플레이트 (Greiner bio-one, 655 180, 2×10^4 세포/웰)에 파종하였고 공기 중 5× CO_2의 가습 분위기에 37℃에서 72시간 동안 항온반응시켰다. 다음으로, 세포는 대략 18시간 동안 3H-티미딘 (3H-Tdr, New England Nuclear, Boston, MA, 20 Ci/mM 비활성)으로 펄싱하였고, 유리 섬유 필터 스트립 상에 회수한 후, 액상 섬광 계측으로 계측하였다.

[1601] 예시적인 결과는 도 48에 도시되어 있다.

[1602] CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드는 용량-의존적 방식으로 T 세포 증식을 유도하였다. T 세포 증식은 미관련 폴리펩티드 T017000129의 경우 관찰되지 않았다.

[1603] 동시에, 표적 세포의 부재 하에서 인간 T 세포의 증식에 대한 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 효과를 평가하였다. 이를 위해서, 다중특이적 폴리펩티드 및 인간 초대 T 세포 (2×10^5 세포/웰)를 공기 중 5× CO_2의 가습 분위기에 37℃에서 72시간 동안 항온반응시켰다. 증식은 상기 기술된 대로 측정하였다. 데이타는 도 49에 도시되어 있다.

[1604] **실시예 40: 사전-활성화된 T 세포 대 비활성화된 T 세포의 용해 성능**

[1605] 자극 조건 하에서 다수일-항온반응 기간에 대응하는 T 세포의 용해 성능을 시험하기 위해서, 초대 인간 T 세포 (실시예 25에 기술된 대로 단리)를 해동시키고 2:1의 T 세포 대 비드 비율을 사용하여 Dynabeads®Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco - Technologies, 11132D)를 사용해 사전 활성화시켰다. 3일 후에, 비드를 추가 3일 동안 신선한 비드로 교체하였다. 다음으로, 비드를 제거하였고 사전-활성화 및 비활성화 T 세포를 MOLM-13 표적 사멸 어세이에서 평가하였다. 간략하게, 동일한 도너 유래의 비활성화 또는 CD3/CD28 사전 활성화 초대 T 세포는 상이한 E:T 비율 (8:1, 2:1, 1:2, 1:4)로 PKH 표지된 MOLM-13 세포 및 T017000114의 연속 희석물과 또는 상이한 E:T 비율 (2:1, 1:2, 1:4, 1:8)로 PKH 표지된 KG1a 세포 및 T017000139의 연속 희석물과 혼합되었다. 항온반응 24시간 이후에 세포독성 판독을 실시예 25에 기술된 대로 수행하였다.

[1606] 결과는 개별적으로 MOLM-13 및 KG1a에 대해 도 50 및 도 51에 도시되어 있다. 이 어세이에서 수득된 EC_{50} 값은 개별적으로 MOLM-13 및 KG1a 세포에 대해서 표 C-33 및 표 C-34에 열거되어 있다.

표 C-33: 사전-활성화 및 비-활성화 T 세포를 사용한, 유세포측정 기반 어세이에서 MOLM-13 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸에 대한 T017000114 의 EC50 (M) 및 용해율%.

	비활성화 T 세포				사전-활성화 T 세포			
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율%	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율%
T017000114 E:T 비율 8:1	1.4E-09	2.4E-10	7.8E-09	12	2.4E-10	1.9E-10	3.2E-10	43
T017000114 E:T 비율 2:1	1.9E-09	6.2E-12	6.0E-07	10	6.8E-10	4.7E-10	9.9E-10	31
T017000114 E:T 비율 1:2					1.0E-09	4.0E-10	2.6E-09	18

[1607]

표 C-34: 사전-활성화 및 비활성화 T 세포를 사용한, 유세포측정 기반 어세이에서 KG1a 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸에 대한 T017000139 의 EC50 (M) 및 용해율 %.

	비활성화 T 세포				사전-활성화 T 세포			
샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율%	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율%
T017000139 E:T 비율 2:1	1.4E-10	8.1E-11	2.5E-10	19	4.5E-11	2.2E-11	9.1E-11	43
T017000139 E:T 비율 1:2	7.7E-11	3.0E-12	2.0E-09	8	4.9E-11	2.2E-11	1.1E-10	20
T017000139 E:T 비율 1:4	9.2E-11	2.8E-12	3.0E-09	4	5.8E-11	3.1E-11	1.1E-10	13
T017000139 E:T 비율 1:8	3.4E-11	1.9E-13	6.1E-09	3	5.6E-11	2.3E-11	1.4E-10	8

[1608]

[1609] 사전 활성화된 T 세포는 모든 시험된 E:T 비율에서 비활성화된 T 세포보다 더욱 강력하게 표적 세포를 용해시켰다. 항-CD3/항-CD28에 의한 이펙터 세포의 사전 자극은 더 높은 용해 비율을 야기시켰다.

[1610] **실시예 41: 반감기 연장된 (HLE) 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드 대조군 폴리펩티드의 구축**

[1611] 인간 혈청 알부민 (HSA)에 결합하는 나노바디인 ALB11 (서열번호 43)을 CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 연결시켜 포맷팅된 분자 (WO 06/122787)의 생체 내 반감기를 증가시켰다. N 말단에 TCR α/β 동원 나노바디를 갖고, 35GS 링커를 사용해 C-말단에 CD123 종양 표적화 나노바디 또는 알부민 표적화 나노바디를 갖는 다수 포맷을 행성시키고 상기 표시된 대로 발현시켰다. 미관련 폴리펩티드는 미관련 항-RSV 나노바디로 종양 항원 결합 나노바디를 교체하여 생성되었다. 조사된 포맷의 개요는 표 C-35에 표시되어 있다.

표 C-35: HLE 구성체의 샘플 ID 및 설명.

샘플 ID	서열번호*	설명
A022600009	62	T0170056G05-35GS-RSV007B02(Q108L)-35GS-ALB11
T017000142	63	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-ALB11-A
T017000143	64	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-A0110055F03-35GS-ALB11-A
T017000144	65	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-ALB11-35GS-A0110055F03-A
T017000145	66	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-A0110056A10-35GS-ALB11-A
T017000146	67	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-ALB11-35GS-A0110056A10-A

[1612] * 서열번호는 C-말단 태그 또는 Ala-연장부가 없는 다중특이적 폴리펩티드의 서열에 상응함.

[1613] **실시예 42: 다중특이적 동원 폴리펩티드에서 ALB11의 알부민 결합 속성**

[1614] 인간, 개별적으로 사이노몰거스 혈청 알부민 (SA)에 대한 반감기 연장된 다중특이적 폴리펩티드의 결합 친화성은 Biacore T100 장비 상에서 SPR 기반 친화성 결정을 통해 측정되었다. 이를 위해 인간 (Sigma, A3782), 개별적으로 사이노몰거스 SA (인 하우스 생성)는 EDC 및 NHS 화학을 사용하여 아민 커플링을 통해 CM5 칩 상에 고정시켰다. TCR/CD123 결합 폴리펩티드는 상이한 농도 (6.2 내지 500 nM)에서 2분 동안 주입되었고 15분 동안 45 ㎕/분의 유속으로 해리되게 하였다. 샘플 주입 사이에, 표면을 10 mM 글리신-HCl pH 1.5으로 재생시켰다. HBS-EP+는 러닝 완충액으로서 사용되었다. 동역학 상수는 단일 사이클 동역학 1:1 결합 모델을 사용하는 알고리즘으로 BIAEvaluation 소프트웨어를 사용해 센서그램으로부터 계산하였다. 친화성 상수 KD는 최종적인 결합 및 해리 속도 상수 ka 및 kd로부터 계산하여, 표 C-36에 표시하였다.

표 C-36: HLE 다중특이적 폴리펩티드의 ALB11 의 알부민 결합 속성.

	인간 SA			사이노몰거스 SA		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
T017000142	1.1E+05	7.2E-03	6.9E-08	9.0E+04	7.3E-03	8.1E-08
T017000143	1.6E+05	9.5E-03	5.9E-08	1.2E+05	9.4E-03	7.6E-08
T017000144	9.1E+04	7.8E-03	8.5E-08	7.4E+04	8.1E-03	1.1E-07
T017000145	1.1E+05	8.5E-03	7.6E-08	1.0E+05	9.9E-03	9.8E-08
T017000146	8.4E+04	8.5E-03	1.0E-07	6.8E+04	8.8E-03	1.3E-07
A022600009	1.1E+05	8.0E-03	7.5E-08	8.5E+04	8.0E-03	9.4E-08
ALB11	5.3E+05	1.6E-03	3.0E-09	5.1E+05	1.6E-03	3.2E-09

[1615]

[1616] 다중특이적 동원 폴리펩티드로 ALB11 빌딩 블록의 포맷팅은 그 결과로 인간 및 사이노몰거스 혈청 알부민과의 결합에 대한 친화성의 허용가능한 저하를 야기시켰다.

[1617] **실시예 43: 유세포측정 기반 어세이로 HLE CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 MOLM-13 표적 세포의 재지정된 T 세포 매개 사멸**

[1618] ALB11 나노바디의 첨가, 및 혈청 알부민 (SA)과의 결합이 폴리펩티드의 역가에 영향을 줄 수 있으므로, HLE CD123/TCR 결합 폴리펩티드는 30 μM SA의 부재 또는 존재 하에서 실시예 25 및 26에 기술된 바와 같이 유세포측정 어세이를 기반으로 하는 CD123 양성 MOLM-13 표적 세포의 재지정된 인간 및 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸에 대해 평가되었다.

[1619] 이러한 어세이에서 수득된 EC50 값은 표 C-37에 열거되었다. 그 결과는 도 52에 도시되어 있다.

표 C-37: 10:1 의 E:T 비율을 사용한 유세포측정 기반 어세이에서 MOLM-13 세포의 재지정된 T 세포 매개 사멸에 대한 HLE CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 EC50 (M) 및 용해율%.

	인간 T 세포				사이노몰거스 T 세포			
샘플 ID	용해율 %	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율 %	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000138	21	1.1E-10	8.8E-11	1.3E-10	54	1.5E-10	1.1E-10	2.1E-10
T017000144	23	2.7E-11	2.0E-11	3.6E-11	56	2.3E-11	1.7E-11	3.0E-11
T017000144+SA	24	2.6E-10	1.9E-10	3.5E-10	52	1.1E-10	9.3E-11	1.2E-10
T017000139	20	2.0E-11	9.3E-12	4.4E-11	56	2.9E-11	2.3E-11	3.5E-11
T017000146	21	2.5E-11			57	2.9E-11	2.3E-11	3.7E-11
T017000146 + SA	25	2.3E-10	1.7E-10	2.9E-10	44	1.6E-10	1.3E-10	1.9E-10

[1620]

[1621] 모든 HLE 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드는 인간 및 사이노몰거스 T 세포 둘 모두에 의한 MOLM-13 세포의 용량 의존적 사멸을 보였다. 폴리펩티드에 ALB11의 내포는 역가를 감소시키지 않았다. HSA 또는 CSA의 첨가 시에, 효능에 영향을 받지 않으면서 약간의 역가 저하가 관찰되었다.

[1622] **실시예 44: 유세포측정 기반 어세이에서 HLE CD123/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 KG1a 표적 세포의 재지정된 T 세포 매개 사멸**

[1623] 반감기 연장된 TCR/CD123 결합 폴리펩티드는 30 μM 혈청 알부민의 존재 또는 부재 하에서, 실시예 24 및 25에 기술된 바와 같이 유세포측정 어세이를 기반으로 CD123 KG1a 표적 세포의 재지정된 인간 및 사이노몰거스 T 세포 매개 사멸에 대해 평가되었다.

[1624] 이러한 어세이에서 수득된 EC50 값은 표 C-38에 열거되어 있다. 결과는 도 53에 도시되어 있다.

표 C-38: 10:1 의 E:T 비율을 사용한 유세포측정 기반 어세이에서 KG1a 세포의 재지정된 T 세포 매개 사멸에 대한 HLE CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 EC50 (M) 및 용해율%.

	인간 T 세포				사이노몰거스 T 세포			
샘플 ID	용해율 %	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	용해율 %	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000138	64	1.6E-10	1.3E-10	2.0E-10	21	2.8E-11	2.3E-11	3.4E-11
T017000143	62	1.9E-10	1.6E-10	2.3E-10	25	4.7E-11	2.9E-11	7.5E-11
T017000144	67	4.1E-11	3.4E-11	5.0E-11	28	6.3E-12	9.3E-13	4.3E-11
T017000143+SA	60	1.4E-09	1.0E-09	1.9E-09	25	8.6E-10	7.1E-10	1.0E-09
T017000144+SA	58	2.9E-10	2.4E-10	3.6E-10	29	6.6E-11	3.4E-11	1.3E-10
T017000139	67	8.1E-11	7.4E-11	8.9E-11	34	1.7E-11	9.7E-12	3.1E-11
T017000145	65	7.4E-11	6.4E-11	8.6E-11	35	1.6E-11	1.1E-11	2.4E-11
T017000146	64	6.6E-11	5.9E-11	7.4E-11	34	1.5E-11	7.2E-12	3.0E-11
T017000145+SA	51	5.9E-10	4.9E-10	7.2E-10	32	1.2E-10	7.4E-11	1.9E-10
T017000146+SA	60	6.8E-10	5.8E-10	8.0E-10	36	2.0E-10	1.1E-10	3.5E-10
T017000128	55	3.1E-10	3.0E-10	3.3E-10	32	2.8E-10	1.3E-10	6.1E-10
T017000142	59	6.8E-10	6.2E-10	7.5E-10	29	2.2E-10	1.4E-10	3.6E-10
T017000142+SA	48	3.1E-09	3.0E-09	3.3E-09	20	3.2E-10	2.9E-10	3.5E-10

[1625]

[1626] 모든 HLE 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드는 인간 및 사이노몰거스 T 세포 둘 모두에 의해 KG1a 세포의 용량 의존적 사멸을 보였다. 폴리펩티드에 ALB11의 내포는 역가를 감소시켰다. HSA 또는 CSA의 첨가 시에, 효능이 영향받지 않으면서 역가의 약간의 저하가 관찰되었다.

[1627] **실시예 45: 재지정된 사멸 동안 사이토카인 생성에 대한 HLE 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드 T017000144의 영향**

[1628] 사이토카인 방출의 유도는 FACS 기반 판독을 기초로 인간 T 세포 매개 사멸 어세이 동안 모니터링되었다. IFN-γ 및 IL-6의 방출은 ELISA로 측정되었다. 간략하게, MOLM-13 (2×10^4 세포/웰)은 실시예 35에 기술된 바와 같이, 정제된 인간 초대 T 세포 (3×10^5 세포/웰)와 다중특이적 TCR/CD123 결합 폴리펩티드 또는 미관련 폴리펩티드의 연속 희석물의 존재 하에서 V-바닥 96-웰 플레이트에 파종되었다. 플레이트에 인간 초대 T 세포/폴리펩티드의 첨가 후 72시간에, 상등액 중 인간 초대 T 세포에 의한 IFN-γ 및 IL-6 생성은 실시예 30에 기술된 바와 같이 측정되었다.

[1629] 이러한 어세이에서 수득된 EC_{50} 값은 표 C-39 및 표 C-40에 열거되었다. 결과는 도 54에 도시되어 있다.

표 C-39: 유세포측정 기반 어세이에서 CD123 양성 MOLM-13 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸 동안 인간 IFN-γ 분비에 대한 TCR/CD123 결합 폴리펩티드의 EC50 (M).

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	3.4E-10	2.5E-10	4.6E-10
T017000144	1.9E-10	1.3E-10	2.9E-10

[1630]

표 C-40: 유세포측정 기반 어세이에서 CD123 양성 MOLM-13 세포의 재지정된 인간 T 세포 매개 사멸 동안 인간 IL-6 분비에 대한 TCR/CD123 결합 폴리펩티드의 EC50 (M).

샘플 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	2.3E-11	1.5E-11	3.5E-11
T017000144	1.6E-11	9.9E-12	2.7E-11

[1631]

[1632] 사이토카인 생성은 MOLM-13 세포 및 인간 초대 T 세포가 HLE CD123/TCR 결합 폴리펩티드 T017000144와 항온반응되었을 때 관찰되었다. 미관련 폴리펩티드 T017000129는 사이토카인 생성을 유도시키지 않았다.

[1633] **실시예 46: 재지정된 사멸 동안 T 세포 증식에 대한 HLE 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 영향**

[1634] 인간 T 세포의 증식에 대한 HLE 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드의 효과를 조사하기 위해서, 감마-조사(100 Gy) MOLM-13 세포는 HLE 다중특이적 폴리펩티드 T017000144 및 인간 초대 T 세포 (2×10^5 세포/웰)와 함께 96-웰 편평 바닥 마이크로타이터 플레이트 (2×10^4 세포/웰)에 파종되었고, SA의 부재 하에서 공기 중 5× CO_2의 가습 분위기에 37℃에서 72시간 동안 항온반응시켰다. T017000129는 음성 대조군으로서 함께 사용되었다. 다음

으로, 세포는 3H-티미딘 (3H-Tdr, New England Nuclear, Boston, MA, 20 Ci/mM 비활성)으로 대략 18 시간 동안 펄싱하였고, 유리 섬유 필터 스트립 상에 회수한 후에, 액상 섬광 계측으로 계측하였다.

[1635] 예시적인 결과는 도 55에 도시되어 있다.

[1636] HLE CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드 TO17000144는 용량-의존적 방식으로 T 세포 증식을 유도하였다. 미관련 폴리펩티드 TO17000129의 경우 T 세포 증식은 관찰되지 않았다.

[1637] **실시예 47: 건강한 인간 PBMC 샘플 및 건강한 사이노몰거스 PBMC에서 HLE CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드에 의한 재지정된 자기유래 T 세포 형질세포양 수지상 세포 (pDC) 및 호염기구 고갈**

[1638] HLE 구성체는 실시예 31에 기술된 바와 같이, SA의 부재 하에 인간 및 사이노몰거스 자기유래 PBMC 어세이로 더욱 평가하였다. 다중특이적 폴리펩티드에 의한 CD123 양성 세포 (pDC: 계통 음성, CD123 양성, HLA-DR 양성 및 호염기구: 계통 음성, CD123 양성, HLA-DR 음성)의 고갈은 5시간의 항온반응 이후에 평가되었다. 결과는 개별적으로 인간 및 사이노몰거스 PBMC에 대해, 도 56 및 도 57에 도시되어 있다.

[1639] HLE CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드는 재지정된 T 세포에 의해 인간 및 사이노몰거스 PBMC에서 CD123+ pDC 및 호염기구를 고갈시킬 수 있었다. TO17000144는 가장 강력한 폴리펩티드였다. TCR 빌딩 블록, ALB11 및 오직 하나의 CD123 빌딩 블록으로 구성된 폴리펩티드 TO17000142는 5시간 후에 PBMC 어세이에서 기능성을 보였다. HLE CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드의 인간 사이노몰거스 교차-반응성이 자기유래 설정에서 확인되었다.

[1640] **실시예 48: 건강한 인간 PBMC 샘플에서 HLE CD123/TCR 다중특이적 폴리펩티드에 의한 재지정된 자기유래 T 세포 단핵구 고갈**

[1641] 자기유래 인간 PBMC 설정에서 HLE 다중특이적 폴리펩티드에 의한 단핵구 (CD14+ 세포)의 고갈은 SA의 부재 하에서 24시간의 항온반응 이후에 평가되었다. 어세이는 실시예 32에 기술된 대로 수행되었다.

[1642] 도 58에 도시되어 있다.

[1643] HLE 다중특이적 폴리펩티드는 재지정된 T 세포에 의해 인간 PBMC 내에서 CD123+ 단핵구를 고갈시킬 수 있었다. TO17000144는 가장 강력한 폴리펩티드였다. TCR 빌딩 블록, ALB11 및 오직 하나의 CD123 빌딩 블록으로 구성된 폴리펩티드 TO17000142는 24시간 이후에 자기유래 단핵구 고갈 어세이에서 기능성을 보였다.

[1644] **실시예 49: 인간이외 영장류 모델에서 생체 내 효능 및 안전성**

[1645] 비-HLE 및 HLE 다중특이적 CD123/TCR결합 나노바디의 생체 내 효능 및 안전성을 인간이외의 영장류 모델에서 평가하였다.

[1646] 기준 화합물을 처리한 동물은 양성 대조군으로서 포함된다. 비-HLE IRR/TCR 결합 폴리펩티드에 의한 처리는 다중 특이적 폴리펩티드의 CD123-표적화 모이어티에 대한 특이성 대조군으로서 사용하였다. 기준 화합물 및 비--HLE 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드는 사이노몰거스 원숭이의 7-일 NaCl 주입 '전처리" 이후에 연속 i.v. 주입을 통해 투여되었다. 비-HLE 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드는 표 C-41에 따라서 매주 용량 상승 계획으로 기준 화합물에 대한 등몰량 용량으로 4-일 투약/3-일 휴약 주입으로서 4주 동안 투여된다. HLE 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드는 표 C-41에 따라서 매주 용량 상승 계획을 1일, 2일, 3일, 8일 15일 및 22일에 볼러스 i.v. 주사를 통해서 사이노몰거스 원숭이에게 투여된다.

표 C-41: 치료 계획.

그룹	화합물	용량 수준 (ng/kg/일)				투여 경로
		시험 주간 1	시험 주간 2	시험 주간 3	시험 주간 4	
1	기준	D1-5: 100	D8-12: 300	D15-19: 600	D22-26: 1000	연속 24h 주입
2	미관련/TCR 폴리펩티드	D1-5: 49.5	D8-12: 148.4	D15-19: 296.8	D22-26: 494.6	연속 24h 주입
3	비-HLE CD123/TCR 폴리펩티드	D1-5: 74.0	D8-12: 222.1	D15-19: 444.3	D22-26: 740.4	연속 24h 주입
4	HLE CD123/TCR 폴리펩티드	D1: 0.6 D2: 0.4 D3: 0.34	D8: 2.21	D15: 4.42	D22: 7.13	i.v. 볼러스 주입

[1647]

[1648] 혈액 유래 T 세포 재분포는 시험일 -7, d-4, d1 (투약전 + 투약후 4시간), d4, d8 (투약전 + 투약후 4시간), d11, d15 (투약전 + 투약후 4시간), d18, d22 (투약전 + 투약후 4시간), d25, d29, d32, 및 d36에 차등 혈액 계측 및 유세포측정을 사용해, 표 C-42에 기술된 바와 같이, T 세포 서브세트를 측정하여 모니터링된다.

[1649] 생체 내 효능은 시험일 -7, d-4, d1 (투약전 + 투약후 4시간), d4, d8 (투약전 + 투약후 4시간), d11, d15 (투약전 + 투약후 4시간), d18, d22 (투약전 + 투약후 4시간), d25, d29, d32, 및 d36에 차등 혈액 계측 및 유세포측정을 사용해 표 C-43에 상술한 바와 같이, PBMC 중 CD123+ 세포의 백분율 및 개수의 평가를 통해 평가된다.

[1650] 안전성은 시험일 -7, d-4, d1 (투약후 4시간), d4, d8 (투약후 4시간), d11, d15 (투약후 4시간), d18, d22 (투약후 4시간), d25, d29, d32, 및 d36에 혈청에서 사이토카인 (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), TNF-α, TNF-β, IFN-γ)의 평가에 의해 평가된다.

표 C-42: 혈액 T 세포 표현형에 대한 마커 조합.

마커	세포	단위
CD3+CD4+	T-헬퍼 세포 (Th)	PBMC 의 % 및 세포/μL
CD3+CD8+	세포독성 T-세포 (Tc)	PBMC 의 % 및 세포/μL
CD25+CD3+CD4+	활성화 Th	CD3+CD4+ 의 % 및 세포/μL
CD25+CD3+CD8+	활성화 Tc	CD3+CD8+ 의 % 및 세포/μL
PD1+CD3+CD4+	Th 상의 PD (프로그램된 세포 사멸 단백질) 상향조절	CD3+CD4+ 의 % 및 세포/μL
PD1+CD3+CD8+	Tc 상의 PD 상향조절	CD3+CD8+ 의 % 및 세포/μL
CD25+PD1+CD3+CD4+	활성화 Th 상의 PD 상향조절	CD3+CD4+CD25+ 의 % 및 세포 /μL
CD25+PD1+CD3+CD8+	활성화 Tc 상의 PD 상향조절	CD3+CD8+CD25+의 % 및 세포/μL

[1651]

표 C-43: CD123+ 세포의 고갈 평가를 위한 마커 조합.

마커	세포	단위
CD14-^{low}CD123+	CD123 마커 기반 pDC (형질세포양 수지상 세포) 및 호염기구 및 mDC (골수성 수지상 세포)	PBMC 의 % 및 세포/μL
CD14-^{low}CD303+	CD303 마커 기반 pDC	PBMC 의 % 및 세포/μL
CD14-^{low}CD123+CD303+	CD123 및 CD303 간 중복	PBMC 의 % 및 세포/μL
CD14+	단핵구	PBMC 의 % 및 세포/μL
CD14+CD123+	CD123+ 단핵구	CD14+의 % 및 세포/μL
CD123+	CD123 기반 표적 세포의 절대수	PBMC 의 % 및 세포/μL
CD303+	CD303 세포의 절대수	PBMC 의 % 및 세포/μL

[1652]

[1653] PK 분석에 대한 혈청 샘플은 -7일, d-4, d1 (투약전 + 투약후 4시간), d4, d8 (투약전 + 투약후 4시간), d11, d15 (투약전 + 투약후 4시간), d18, d22 (투약전 + 투약후 4시간), d25, d29, d32, 및 d36에 수집한다.

[1654] ADA 분석에 대한 혈청 샘플은 -7일, d1 (투약전), d8 (투약전), d15 (투약전), d22 (투약전), d29, 및 d36에 수집된다.

[1655] 4일 및 25일에, 혈액 T 세포는 실시예 25에 기술된 바와 같이 모든 동물로부터 단리되어서 소진 시험에서 시험된다.

[1656] 29일에, 검시가 2개 동물군에서 수행된다. 36일에, 검시가 모든 나머지 동물에서 수행된다.

[1657] **실시예 50: 인간이외 영장류 모델에서 생체 내 효능 및 안전성 - 다중특이적 CD123/TCR 결합 나노바디, 실험 결과**

[1658] 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드 T017000139의 생체 내 효능 및 안전성은 인간이외 영장류 모델에서 평가되었다.

[1659] 기준 화합물 (MGD006, Macrogenics)을 처리한 동물은 양성 대조군으로서 포함시켰다. 미관련/TCR 결합 폴리펩티드 T017000129의 처리는 다중특이적 폴리펩티드의 CD123-표적화 모이어티에 대한 특이성 대조군으로서 사용되었다. 기준 화합물, 미관련/TCR 결합 폴리펩티드 및 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드는 사이노몰거스 원숭이의 7일 NaCl 주입 '전처리' 후 연속 i.v. 주입을 통해 투여되었다. 미관련/TCR 결합 폴리펩티드 및 다중특이적 CD123/TCR 결합 폴리펩티드는 표 C-44에 따라서 매주 용량 상승 계획으로 기준 화합물에 대한 등몰 용량으로 4일 투약/3일 휴약 주입으로 4주 동안 투여되었다.

표 C-44: 치료 계획.

그룹	화합물	용량 수준 (ng/kg/일)				투여 경로
		시험 주간 1 (D1-5)	시험 주간 2 (D8-12)	시험 주간 3 (D15-19)	시험 주간 4 (D22-26)	
1	기준 화합물 (MGD006)	100	300	600	1000	연속 24h 주입
2	미관련 /TCR 폴리펩티드 (T017000129)	49.5	148.4	296.8	494.6	연속 24h 주입
3	CD123/TCR 폴리펩티드 (T017000139)	74.0	222.1	444.3	740.4	연속 24h 주입

[1660]

[1661] 혈액 유래 T 세포 재분포는 시험일 -7, d-4, d1 (투약전 + 투약후 4시간), d4, d8 (투약전 + 투약후 4시간), d11, d15 (투약전 + 투약후 4시간), d18, d22 (투약전 + 투약후 4시간), d25, d29, d32, 및 d36에 유세포측정

을 사용해 T 세포 서브세트를 측정하여 모니터링되었다.

[1662] 도 59에 도시된 바와 같이, 기준 화합물로 처리된 양성 대조군 그룹에서, 순환성 $CD4^+CD3^+$ 및 $CD8^+CD3^+$ T 세포의 수가 상이한 투약 사이클 동안 변동되어서, 고갈 보다는 수송 및/또는 변연화를 시사한다. 대조적으로, CD123/TCR 폴리펩티드 또는 미관련/TCR 폴리펩티드의 처리는 $CD4^+CD3^+$ 또는 $CD8^+CD3^+$ T 세포 개수의 강력한 변동을 야기시키지 않았다.

[1663] 순환성 $CD123^+CD14^-$ 세포수는 시험일 -7, d-4, d1 (투약전 + 투약후 4시간), d4, d8 (투약전 + 투약후 4시간), d11, d15 (투약전 + 투약후 4시간), d18, d22 (투약전 + 투약후 4시간), d25, d29, d32, 및 d36에 혈액에서 유세포측정을 사용해 PBMC 중 $CD123^+CD14^-$ 세포의 개수를 측정하여 생체 내 효능을 평가하기 위한 약력학적 종결점으로서 조사하였다.

[1664] 결과는 도 60에 도시되어 있다. $CD123^+CD14^-$ 세포는 기준 화합물 MGD006 (양성 대조군)으로 처리된 동물에서 고갈되었지만, 4차 투약 주기에서 효능 손실이 관찰되었다. CD123/TCR 폴리펩티드의 처리는 1차 투약 사이클부터 이미 혈액 중 $CD123^+CD14^-$ 세포의 고갈을 야기하여, 4차 및 최종 투약 사이클까지 지속되었다. 미관련/TCR 폴리펩티드를 처리한 동물에서, $CD123^+CD14^-$ 세포의 유의한 고갈이 관찰되지 않았다.

[1665] 다음으로, 순환성 CD4+CD3+ T 세포 및 CD8+CD3+ T 세포 상에서 PD-1의 발현을 생체 내 T 세포 소진을 평가하기 위한 대리 마커로서 조사하였다. 이를 위해서, PD-1 발현은 시험일 -7, d-4, d1 (투약전 + 투약후 4시간), d4, d8 (투약전 + 투약후 4시간), d11, d15 (투약전 + 투약후 4시간), d18, d22 (투약전 + 투약후 4시간), d25, d29, d32, 및 d36에 혈액 중 유세포측정을 사용해 PBMC에서 측정하였다.

[1666] 결과는 도 61에 도시되어 있다. PD-1 발현은 기준 화합물 MGD006 (양성 대조군)로 처리된 동물에서 대부분의 CD4+CD3+ T 세포 및 CD8+CD3+ T 세포 상에서 강력하게 증가되었고 투약 종료 후 CD4+CD3+ T 세포 및 CD8+CD3+ T 세포의 대략 절반 상에 남아있었다. 대조적으로, PD-1 발현은 투약 사이클 전반에서 CD123/TCR 폴리펩티드 또는 미관련/TCR 폴리펩티드의 처리 시 기준치로 남아있었다.

[1667] 안전성은 시험일 -7, d-4, d1 (투약후 4시간), d4, d8 (투약후 4시간), d11, d15 (투약후 4시간), d18, d22 (투약후 4시간), 및 d25에 혈청 중 사이토카인 (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12(p70), TNF-α, TNF-β, IFN-γ)의 평가에 의해 평가되었다.

[1668] 하기 사이토카인의 수준은 어세이의 검출 한계치 이하로 남아있었다: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12(p70), TNF-α, TNF-β 및 IFN-γ. 인터루킨-6은 1차 투약 사이클의 시작 시에 양성 대조군 그룹에서 낮은 농도로 검출되었다. 이러한 증가는 일시적이었고 오직 1마리 동물에서만 있었다. CD123/TCR 폴리펩티드가 처리된 그룹에서, 1마리 동물이 투약 전에 검출가능한 IL-6 농도를 보였고 1마리 동물은 2차 투약 사이클의 시작 시에 일시적인 약간의 증가를 보여서, 조작 스트레스를 시사한다. 미관련/TCR 폴리펩티드를 처리한 그룹에서, 1마리 동물이 3차 투약 사이클에서 IL-6의 일시적인 약간의 증가를 보여서, 역시 조작 스트레스를 시사하였다. IL-6 측정에 의한 결과는 도 62에 도시되어 있다.

표 A-1: TCR 클러스터 A 결합제의 서열 정렬 – 파트 1

```
서열번호   42  T0170PMP056G05 ::  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMV
서열번호   85  T0170PMP053D01 :: ..............K...A...A.....................T.E....M..T.T....DV.....................A...
서열번호  136  T0170PMP067D01 :: ..............K...A...A.....................T.E....M..T.T....EV.....................A...
서열번호  124  T0170PMP056F01 :: ..............K.P.A...A.....................T.E....M..T.T....EV.....................A...
서열번호  152  T0170PMP069A06 :: ..............K...A...A.....................T.E....M..T.T....EV..E..................A...
서열번호  141  T0170PMP067F02 :: ..............K...A...A.....................T.E....M..T.T....EV..H..................A...
서열번호  142  T0170PMP068C03 :: ..............K...A...A.....................T.E....M..T.T....EVA....................A...
서열번호  103  T0170PMP055E05 :: ..............K...A...A.....................E....M..T.T....EV.....................A...
서열번호   96  T0170PMP055C02 :: ..............K...A...A.....................T.E....M..T.T....EV.....................A...
서열번호  137  T0170PMP067D06 :: ..............K...A...A.....................E....M..T.T....EV.....................AT..
서열번호  105  T0170PMP055F03 :: ..............................................I.....................S.....E.....................
서열번호  130  T0170PMP061A02 :: ..............................................I.....................A.S.....E.....................
서열번호  122  T0170PMP056D11 :: ..............................................I.....................R....S.....E.....................
서열번호  153  T0170PMP069B02 :: ..............R...............................I.....................S.....E.....................
서열번호  172  T0170PMP070G02 :: ..............................................I.....................S.....E.....................
서열번호   79  T0170PMP028B01 :: ..............A...S.....................GL..T.T....T.....Y.....................AR...
서열번호   81  T0170PMP028G06 :: ..............A...S.....................L..T.T....T.....Y.....................AR...
서열번호  106  T0170PMP055F06 :: ..............A...S.....................L..T.T....A.....Y.....................AR...
서열번호   78  T0170PMP027A05 :: ..............A...S.....................L..T.T....T.....................A....
서열번호   83  T0170PMP040C01 :: ..............A...S.....................L..T.T....T.....................A....
서열번호   80  T0170PMP028F10 :: ..............R....P.A...S.....................M..T.T....A.....................A....
서열번호   82  T0170PMP029F08 :: ..............A...S.....................M..T.T....A.....................A....
서열번호   90  T0170PMP055A08 :: ..............S.....A...S.....................M..T.T....A.....................A....
서열번호  109  T0170PMP055G09 :: ..............S.....A...S.....................V..T.T....A.....................A....
서열번호  145  T0170PMP068D05 :: ..............S.....P.A...S.....................M..T.T....A.....................A....
서열번호  151  T0170PMP068F08 :: ..............S.....A...S.....................GM..T.T....A.....................A....
서열번호  171  T0170PMP070F11 :: ..............S.....A...S.....................M..T.T....A.....................A....
서열번호  163  T0170PMP069E11 :: ..............A...E....I.....C.....DM..T.T....A.....................A....
서열번호  175  T0170PMP084B07 :: ..............A...E....I.....C.....DM..T.T..E.Q...................A....
서열번호   87  T0170PMP055A01 :: ..............A.....A...I.....A...M....T...A.....................A....
서열번호   88  T0170PMP055A02 :: ..............A.....A...I.....A...M....T...A.....................A....
서열번호   99  T0170PMP055D03 :: ..............A.....A...I.....A...M....T...A.N...................A....
서열번호  101  T0170PMP055D10 :: ..............A.....A...I.....A...M....T...A....G................A....
서열번호  147  T0170PMP068E01 :: ..............A.....A...I.....A...M....T...A.....................A....
서열번호  177  T0170PMP084E03 :: ..............A.....A...I.....A...M....T...A.....................A....
```

[1669]

표 A-1:TCR 클러스터 A 결합제의 서열 정렬 - 파트 1 계속

```
                                                  79        90        100       110
                                                  |  abc    |         |a        |
서열번호  42    카봇 #                        :  YLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
서열번호  85    T0170PMP056G05                :  ....T..........V..G.L...N..............
서열번호 136    T0170PMP053D01                :  ....T..........V..G.L...N..............
서열번호 124    T0170PMP067D01                :  ....T..........V..G.L...N..............
서열번호 152    T0170PMP056F01                :  ....T..........V..G.L...N..............
서열번호 141    T0170PMP069A06                :  ....TG.........V..G.L...N..............
서열번호 142    T0170PMP067F02                :  ....T..........V..G.L...N.....Q.....
서열번호 103    T0170PMP068C03                :  ....T..........V..G.L...N.....Q.....
서열번호 105    T0170PMP055E05                :  ....T.....T..V..G.L...N.....Q.....
서열번호  96    T0170PMP055C02                :  ....T..T.......V..G.L...N.....Q.....
서열번호 137    T0170PMP067D06                :  ....T..........V..G.....N.....Q.....
서열번호 105    T0170PMP055F03                :  ..................L.....................
서열번호 130    T0170PMP061A02                :  ..................L.....................
서열번호 122    T0170PMP056D11                :  ..................L.....................
서열번호 153    T0170PMP069B02                :  ..................L.....................Q.....
서열번호 172    T0170PMP070G02                :  ..................A..L.....................Q.....
서열번호  79    T0170PMP028B01                :  ..........................G..L...N.....Q.....
서열번호  81    T0170PMP028G06                :  ..........................G..L...N.....Q.....
서열번호 106    T0170PMP055F06                :  ..........................G..L...N.....Q.....
서열번호  78    T0170PMP027A05                :  ..................H...G..L...N.....Q.....
서열번호  83    T0170PMP040C01                :  ..........................G..L...N.....Q.....
서열번호  80    T0170PMP028F10                :  ..........................G..L...N.....Q.....
서열번호  82    T0170PMP029F08                :  ..........................G..L...N.....Q.....
서열번호  90    T0170PMP055A08                :  .........S................G..L...N.....Q.....
서열번호 109    T0170PMP055G09                :  .........S................G..L...N.....Q.....
서열번호 145    T0170PMP068D05                :  .........S................G..L...N.....Q.....
서열번호 151    T0170PMP068F08                :  .........S................G..L...N.....Q.....
서열번호 171    T0170PMP070F11                :  .........S................G..L...N.....Q.....
서열번호 163    T0170PMP069E11                :  .........S..................L..L...N.....Q.....
서열번호 175    T0170PMP084B07                :  ..........................L..L...N.....Q.....
서열번호  87    T0170PMP055A01                :  ..........................Y.....N.....Q.....
서열번호  88    T0170PMP055A02                :  ..........................Y.....N.....Q.....
서열번호  99    T0170PMP055D03                :  ..........................Y.....N.....Q.....
서열번호 101    T0170PMP055D10                :  ..........................Y.....N.....Q.....
서열번호 147    T0170PMP068E01                :  ..........................Y.....N.....Q.....
서열번호 177    T0170PMP084E03                :  ..........G...............Y.....N.....Q.....
```

[1670]

표 A-1: TCR 클러스터 A 결합제의 서열 정렬 - 파트 2

서열번호	카보 #	1 10 20 30 40 50 60 70 78
서열번호 42	TO170PMP056G05	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMV
서열번호 178	TO170PMP084E05	.....I...H....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 107	TO170PMP055F08	.....I.....A.....M.....T...A.....A.....A...
서열번호 114	TO170PMP056C01	.....I.....A...G.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 126	TO170PMP056G02	.....A.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 133	TO170PMP067A03	.....A.....I.....A..H.M.....T...A.....A...
서열번호 135	TO170PMP067C09	.....A.....I.....A.....M.....T...A.....AE...
서열번호 150	TO170PMP068F06	.....A.....I.....A.....M.....T...A.....A..V.
서열번호 158	TO170PMP069D02	.....M.....A.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 169	TO170PMP070D07	.....A.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 176	TO170PMP084C02	.....A.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 131	TO170PMP061B04	.....A.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 159	TO170PMP069D07	.....A.....I.....V.A.....M.....T...A.....A...
서열번호 113	TO170PMP056B11	.....A...T..A.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 180	TO170PMP084F10	.....W..A.....A.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 116	TO170PMP056C03	.....A.....I.....A.....M.....T...T.....A...
서열번호 156	TO170PMP069C04	.....A.....I.....A.G..M.....T...A.....A...
서열번호 121	TO170PMP056D02	.....A.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 132	TO170PMP067A01	.....A.....I.....A..GM.....T...A.....A...
서열번호 134	TO170PMP067B06	.....A.....I.....AR....M.....T...A.....A...
서열번호 164	TO170PMP069F05	.....A.....I.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 179	TO170PMP084F04	.....A.....I..H....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 98	TO170PMP055C10	.....A.....V.....A.....M.....T...A.....A...
서열번호 86	TO170PMP053E10	.....R.....I.....A.....M.....T...A.....E.....A...
서열번호 92	TO170PMP055B01	.....R.....I.....A.....M.....T...A.V..E.....A...
서열번호 155	TO170PMP069C01	.....R.....I.....A.....MI....T...A...E.....A...
서열번호 138	TO170PMP067D09	.....A.....I.....A.....M.....T...A.S..G.....A...
서열번호 139	TO170PMP067E03	.....A.....I.....A.....M.....T...A.S..G.....A...
서열번호 120	TO170PMP056D01	.....D.....A.....M.....T.A.A...EF.....P...
서열번호 140	TO170PMP067E06	.....A.....M.....T.A.A...EF.....P...
서열번호 162	TO170PMP069E09	.....A.....M.....T.A.A...EF.....P...
서열번호 157	TO170PMP069C05	.....D.....A.....M.....T.A.A...EF.....P...
서열번호 166	TO170PMP070B08	.....D.....A.....M.....T.A.A...EF.....P...
서열번호 89	TO170PMP055A03	.....A.....T...A.....A...
서열번호 118	TO170PMP056C07	.....T...A.....A...

[1671]

표 A-1: TCR 클러스터 A 결합제의 서열 정렬 – 파트 2 계속

```
                                                                79                  90                  100                 110
                                                                 |                   |                   |                   |
                                                                 |    abc            |                   |a                  |
서열번호   42  카봇 #  T0170PMP056G05 : YLQMNSLKPEDTAVYFCRAESRIYPYDYWGQGTLVTVSS
서열번호  178          T0170PMP084E05 : ..........................Y.....N..............
서열번호  107          T0170PMP055F08 : ..........................Y.....N..............
서열번호  114          T0170PMP056C01 : ..........................Y.....N..............
서열번호  126          T0170PMP056G02 : ..........................Y.....N..............
서열번호  133          T0170PMP067A03 : ..........................Y.....N..............
서열번호  135          T0170PMP067C09 : ..........................Y.....N..............
서열번호  150          T0170PMP068F06 : ..........................Y.....N..............
서열번호  158          T0170PMP069D02 : ..........................Y.....N..............
서열번호  169          T0170PMP070D07 : ..........A...............Y.....N..............
서열번호  176          T0170PMP084C02 : ....D.....................Y.....N..............
서열번호  131          T0170PMP061B04 : ..........................A.....Y.....N........
서열번호  159          T0170PMP069D07 : ..........................A.....Y.....N........
서열번호  113          T0170PMP056B11 : ..........................Y.....N..............
서열번호  180          T0170PMP084F10 : ..........................Y.....N..............
서열번호  116          T0170PMP056C03 : ..........................Y.....N.....Q........
서열번호  156          T0170PMP069C04 : ..........................Y.....N.....Q........
서열번호  121          T0170PMP056D02 : ..........................Y.....N...R.Q........
서열번호  132          T0170PMP067A01 : ..........................Y.....N.....Q........
서열번호  134          T0170PMP067B06 : ..........................Y.....N.....Q........
서열번호  164          T0170PMP069F05 : ..........................L..Y.....N.....Q........
서열번호  179          T0170PMP084F04 : ..........A...............Y.....N.....Q........
서열번호   98          T0170PMP055C10 : H.........................Y.....N.....Q........
서열번호   86          T0170PMP053E10 : ..........................Y.....N.....Q........
서열번호   92          T0170PMP055B01 : ..........................Y.....N.....Q........
서열번호  155          T0170PMP069C01 : ..........................Y.....N.....Q........
서열번호  138          T0170PMP067D09 : ...L.N....................Y.....N..............
서열번호  139          T0170PMP067E03 : ...L.N....................Y.....N..............
서열번호  120          T0170PMP056D01 : H.........................L..G.....N.....Q........
서열번호  140          T0170PMP067E06 : ..........................L..G.....N.....Q........
서열번호  162          T0170PMP069E09 : ..........................L..G.....N.....Q........
서열번호  157          T0170PMP069C05 : ..........................L..G.....S.....Q........
서열번호  166          T0170PMP070B08 : ..........V.....L..G.....N.....Q.....
서열번호   89          T0170PMP055A03 : ..........................G.....Q.....
서열번호  118          T0170PMP056C07 : ..........................G.....R.....
```

[1672]

표 A-1: TCR 클러스터 A 결합체의 서열 정렬 – 파트 3

```
                                                
```

표 A-1: TCR 클러스터 A 결합제의 서열 정렬 - 파트 3 계속

```
                                                                79          90        100       110
                                                                 |          |         |a        |
서열번호  42    카보 #                                  : |   abc        |         |         |
서열번호 168    T0170PMP056G05                          : YLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPDYWGQGTLVTVSS
서열번호 174    T0170PMP070C09                          : ..........................G...........
서열번호 110    T0170PMP082B04                          : ..........................G...........
서열번호 108    T0170PMP056A02                          : ..........................G..W.....Q.....
서열번호 154    T0170PMP055G05                          : ..........................G...........Q.....
서열번호  97    T0170PMP069B08                          : ..........................G...........Q.....
서열번호 100    T0170PMP055C06                          : .....N....................G...........Q.....
서열번호 102    T0170PMP055D06                          : F....N....................G...........Q.....
서열번호 104    T0170PMP055E01                          : ..........................G..W........Q.....
서열번호 115    T0170PMP055F02                          : ..........................G..W........Q.....
서열번호 173    T0170PMP056C02                          : ..........................G..W........Q.....
서열번호 165    T0170PMP070G06                          : ..........................G...W.......Q.....
서열번호 170    T0170PMP069G08                          : ..........................G..W........Q.....
서열번호 146    T0170PMP070E07                          : ..........................G..W.....................
서열번호 127    T0170PMP068D07                          : ..........................G..W.....................
서열번호 143    T0170PMP056G11                          : ..........................G..W........Q.....
서열번호 160    T0170PMP068C07                          : ..........................G..W........Q.....
서열번호 144    T0170PMP069E02                          : ..........................G..W.....................
서열번호 148    T0170PMP068C11                          : .....................R....G..W........Q.....
서열번호 123    T0170PMP068E08                          : .....................R....G..W........Q.....
서열번호 112    T0170PMP056E02                          : .....................R....G...W.....Q.....
서열번호 119    T0170PMP056A10                          : .....................R....G...........Q.....
서열번호  93    T0170PMP056C10                          : .....................R....G...........Q.....
서열번호 111    T0170PMP055B02                          : .....................R....G.....................
서열번호 117    T0170PMP056A08                          : .....................R....G.....................
서열번호 129    T0170PMP056C04                          : .....................R....G.....H.....Q.....
서열번호  84    T0170PMP057D06                          : .....................R....G...........Q.....
서열번호 161    T0170PMP053A03                          : .....................R....G...........Q.....
서열번호  95    T0170PMP069E07                          : .....G.R.....................G.....................
서열번호 125    T0170PMP055B11                          : .....................R....G.....................
서열번호 167    T0170PMP056F08                          : .....................R....G.....................
서열번호 149    T0170PMP070B09                          : .....N.R.....................G.....Q.....
서열번호  91    T0170PMP068F04                          : .....................R....G.....Q.....
서열번호  94    T0170PMP055A10                          : .....................R....G.....R.Q.....
서열번호 128    T0170PMP055B03                          : .....................R....G...........Q.....
                T0170PMP057B02                          : .....................L..H.G..L..N.....Q.....
```

[1674]

표 A-2: CD123 결합 나노바디 A0110056A10 및 이의 패밀리 구성원의 서열 정렬.

```
                                                
```

표 A-3: CD123 결합 나노바디 A0110055F03 및 이의 패밀리 구성원의 서열 정렬.

```
                                                
```

표 A-4: 식 I, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 로 제공되는 바람직한 조합에 더해지는 CD123 결합 빌딩 블록의 CDR 및 프레임워크 서열. "SEQ" 주어진 서열번호를 의미한다. 제 1 컬럼은 완전한 ISV, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 의 서열번호를 의미한다. CDR1, CDR2 및 CDR3 은 [Kontermann, 2010]에 따라 결정되었다.

SEQ	나노바디	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
1	A0110PMP 056A10	26	EVQLVKSGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	11	GITSKIN DMG	30	WYRQTPGNY REWVA	17	SITATG TTN	34	YRDSVKGRFTISRDNAKSTV YLQMNSLKPEDTTVYYCNT	21	FPPISNF	40	WGQGTL VTVSS
2	A0110PMP 055A10 / A0110PMP 057D11	27	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAN	12	GISSKSD AMG	31	WYRQTPGKY REWVA	17	SITATG TTN	35	YRDSVKGRFTISRDNAKNTV YLQMNSLKPEDTTVYYCNT	22	FPAISNF	41	WGQGTQ VTVSS
3	A0110PMP 055B11 / A0110PMP 055B12	27	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAN	13	GITSKSN AMG	31	WYRQTPGKY REWVA	17	SITATG TTN	35	YRDSVKGRFTISRDNAKNTV YLQMNSLKPEDTTVYYCNT	22	FPAISNF	41	WGQGTQ VTVSS
4	A0110PMP 056D09	28	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	14	GIPSKIN DMG	32	WFRQTPGNY REWVA	17	SITATG TTN	35	YRDSVKGRFTISRDNAKNTV YLQMNSLKPEDTTVYYCNT	21	FPPISNF	40	WGQGTL VTVSS
5	A0110PMP 056G10	28	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	11	GITSKIN DMG	30	WYRQTPGNY REWVA	17	SITATG TTN	34	YRDSVKGRFTISRDNAKSTV YLQMNSLKPEDTTVYYCNT	21	FPPISNF	40	WGQGTL VTVSS
6	A0110PMP 057B09	28	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	15	GITSKSN VMG	31	WYRQTPGKY REWVA	17	SITATG TTN	35	YRDSVKGRFTISRDNAKNTV YLQMNSLKPEDTTVYYCNT	22	FPAISNF	41	WGQGTQ VTVSS
7	A0110PMP 055F03	29	EVQLVESGGGLVQ AGGPLRLSCAAS	16	GRTFSSY VMG	33	WFRQAPGKE REFVA	18	AIYWSN GKTQ	36	YTDSVKGRFTISGDNAKNTV YLQMNSLNPEDTAVYYCVA	23	DKDETGFRTL PIAYDY	41	WGQGTQ VTVSS
8	A0110PMP 055A04	28	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	16	GRTFSSY VMG	33	WFRQAPGKE REFVA	19	AIYWSS GKTE	37	YTDSVKGRFTLSGDNAKNTV YLQMNSLNPEDTAVYYCVA	24	DKDRDGFRTL PIAYDY	41	WGQGTQ VTVSS
9	A0110PMP 056C03	28	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	16	GRTFSSY VMG	33	WFRQAPGKE REFVA	19	AIYWSS GKTE	38	YTDSVKGRFTLSGDNAKNTV YLQMNSLNPEDTAVYYCVA	25	DKDRYGFRTL PIAYDY	41	WGQGTQ VTVSS
10	A0110PMP 056G01	28	EVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	16	GRTFSSY VMG	33	WFRQAPGKE REFVA	20	AIWWSS GKTE	39	YTDSVKGRFTLSGDNAKTV YLQMNNLNPEDTAVYYCVA	24	DKDRDGFRTL PIAYDY	41	WGQGTQ VTVSS

[1677]

표 A-5 - 파트 1: 식 I, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 로 제공되는 바람직한 조합에 더해지는, TCR 결합 빌딩 블록의 CDR 및 프레임워크 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미한다. 제 1 컬럼은 완전한 ISV, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 의 서열번호를 의미한다. CDR1, CDR2 및 CDR3 은 [Kontermann, 2010]에 따라 결정되었다.

SEQ	나노바디	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
42	T0170PMP226 056G05	226	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVAS	181	GDVHKIN FLG	251	WYRQAPGKE REKVA	192	HISIGD QTD	277	YADSAKGRFTISRDESKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	218	FSRIYPYDY	320	WGQGTL VTVSS
78	T0170PMP227 027A05	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	182	GSVHKIN FLG	252	WYRQAPGKE RELVA	193	TITIGD TTD	278	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVHFCRA	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ VTVSS
79	T0170PMP227 028B01	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	182	GSVHKIN FLG	253	WYRQAPGKE RGLVA	193	TITIGD TTD	279	YADYAKGRFTISRDEARNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ VTVSS
80	T0170PMP228 028F10	228	EVQLVESGGGLVQP GRSLRLPCAAS	182	GSVHKIN FLG	254	WYRQAPGKE REMVA	194	TITIGD ATD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ VTVSS
81	T0170PMP227 028G06	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	182	GSVHKIN FLG	252	WYRQAPGKE RELVA	193	TITIGD TTD	279	YADYAKGRFTISRDEARNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	219	GSRLYPYNY	320	WGQGTL VTVSS
82	T0170PMP227 029F08	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	182	GSVHKIN FLG	254	WYRQAPGKE REMVA	194	TITIGD ATD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	219	GSRLYPYNY	320	WGQGTL VTVSS
83	T0170PMP227 040C01	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	182	GSVHKIN FLG	252	WYRQAPGKE RELVA	193	TITIGD TTD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ VTVSS
84	T0170PMP229 053A03	229	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAVS	183	GSVHLLN FLG	254	WYRQAPGKE REMVA	195	HITIAD ATD	281	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLRPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL VTVSS
85	T0170PMP230 053D01	230	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAAS	184	GAVHKIN FLG	255	WYRQTPEKE REMVA	196	PITIGD DVD	282	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMTSLKPEDTAVYVCRA	219	GSRLYPYNY	320	WGQGTL VTVSS
86	T0170PMP231 053E10	231	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCRAS	185	GDVHKIN ILG	256	WYRQAPAKE REMVA	197	HITIGD ATD	283	YAESAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ VTVSS
87	T0170PMP232 055A01	232	EVQLVESGGGLVRP GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	256	WYRQAPAKE REMVA	197	HITIGD ATD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL VTVSS
88	T0170PMP227 055A02	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	256	WYRQAPAKE REMVA	197	HITIGD ATD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL VTVSS
89	T0170PMP226 055A03	226	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVAS	181	GDVHKIN FLG	251	WYRQAPGKE REKVA	198	HITIGD QAD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ VTVSS
90	T0170PMP233 055A08	233	EVQLVESGGSVQP GGSLRLSCAAS	182	GSVHKIN FLG	254	WYRQAPGKE REMVA	194	TITIGD ATD	284	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLSPEDTAVYFCRA	219	GSRLYPYNY	320	WGQGTL VTVSS
91	T0170PMP227 055A10	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	183	GSVHLLN FLG	254	WYRQAPGKE REMVA	199	HISIAD ATD	285	YAHEAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLRPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	322	WGRGTQ VTVSS
92	T0170PMP231 055B01	231	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCRAS	185	GDVHKIN ILG	256	WYRQAPAKE REMVA	200	HITIGD ATV	283	YAESAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ VTVSS

[1678]

표 A-5 – 파트 2: 식 I, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 로 제공되는 바람직한 조합에 더해지는 TCR 결합 빌딩 블록의 CDR 및 프레임워크 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미한다. 제 1 컬럼은 완전한 ISV, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 의 서열번호를 의미한다. CDR1, CDR2 및 CDR3 은 [Kontermann, 2010]에 따라 결정되었다.

SEQ	나노바디	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
93	T0170PMP227 055B02	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	183	GSVHLLN FLG	257	WYRQCPGKE RFMVA	195	HITIAD ATD	281	YSHFAKGRFTISRDEARNMV YLQMNSLRPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL VTVSS
94	T0170PMP234 055B03	234	EVQLVESGGGLVQP GGSLRPSCAAS	183	GSVHLLN FLG	254	WYRQAPGKE RFMVA	195	HITIAD ATD	285	YAHFAKGRFTISRDEARNMV YLQMNSLRPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ VTVSS
95	T0170PMP227 055B11	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	183	GSVHLLN FLG	254	WYRQAPGKE RFMVA	195	HITIAD ATD	285	YAHFAKGRFTISRDEARNMV YLQMNSLRPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL VTVSS
96	T0170PMP230 055C02	230	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAAS	184	GAVHKIN FLG	255	WYRQTPEKE RFMVA	201	HITIGD EVD	286	YADSAKGRFTISRDEARNMV YLQMTSLTPEDTAVYVCRA	219	GSRLYPNY	321	WGQGTQ VTVSS
97	T0170PMP235 055C06	235	EVQLVESGGGLVHP GGSLRLSCAAS	181	GDVHKIN FLG	258	WHRQPPGKE RDKVA	202	HITIGD VTD	287	YADSAKGRFTISRDEARNMV YLQMNNLKPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ VTVSS
98	T0170PMP227 055C10	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	186	GDVHKIN VLG	256	WYRQAPAKE RFMVA	197	HITIGD ATD	288	YADSAKGRFTISRDEARNMV HLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ VTVSS
99	T0170PMP227 055D03	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	256	WYRQAPAKE RFMVA	203	HITIGD ATN	280	YADSAKGRFTISRDEARNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL VTVSS
100	T0170PMP227 055D06	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	181	GDVHKIN FLG	259	WHRQAPGKE RDKVA	202	HITIGD VTD	289	YADSAKGRFTISRDEARNMV FLQMNNLKPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ VTVSS
101	T0170PMP227 055D10	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	256	WYRQAPAKE RFMVA	197	HITIGD ATD	290	YAGSAKGRFTISRDEKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL VTVSS
102	T0170PMP227 055E01	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	187	GEVYKIN FLG	251	WYRQAPGKE RDKVA	204	HITIAD VAD	291	YADFAKGRFTISRDEARNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	222	GSRIWPYDY	321	WGQGTQ VTVSS
103	T0170PMP230 055E05	230	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAAS	184	GAVHKIN FLG	260	WYRQAPEKE RDMVA	205	HITIGD EVD	292	YADSAKGRFTISRDEAKNMV YLQMTSLKPEDTTVYVCRA	219	GSRLYPNY	321	WGQGTQ VTVSS
104	T0170PMP227 055F02	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	187	GEVYKIN FLG	251	WYRQAPGKE RDKVA	204	HITIAD VAD	291	YADFAKGRFTISRDEAKNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	222	GSRIWPYDY	320	WGQGTL VTVSS
105	T0170PMP226 055F03	226	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCVAS	185	GDVHKIN ILG	251	WYRQAPGKE RDKVA	206	HISISD QTD	293	YAESAKGRFTISRDESKNMV YLQMNSLKPEDTAVYLCRA	218	FSRIYPYDY	320	WGQGTL VTVSS
106	T0170PMP227 055F06	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	182	GSVHKIN FLG	252	WYRQAPGKE RELVA	194	TITIGD ATD	279	YADTAKGRFTISRDEARNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	219	GSRLYPNY	320	WGQGTL VTVSS
107	T0170PMP227 055F08	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	185	GDVHKIN ILG	256	WYRQAPAKE RFMVA	197	HITIGD ATD	294	YADSAKGRFAISRDEARNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL VTVSS
108	T0170PMP227 055G05	227	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAAS	181	GDVHKIN FLG	259	WHRQAPGKE RFKVA	197	HITIGD ATD	280	YADSAKGRFTISRDEARNMV YLQMNSLKPEDTAVYFCRA	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ VTVSS

[1679]

표 A-5 - 파트 3: 식 I,즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 로 제공되는 바람직한 조합에 더해지는, TCR 결합 빌딩 블록의 CDR 및 프레임워크 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미한다. 제 1 컬럼은 완전한 ISV, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 의 서열번호를 의미한다. CDR1, CDR2 및 CDR3 은 [Kontermann, 2010]에 따라 결정되었다.

SEQ	나노바디	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
109	T0170PMP233	EVQLVESGGSVQP	182	GSVHKIN	261	WYRQAPGKE	194	TITGD	284	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ
	055G09	GGSLRLSCAAS		FLG		REVVA		ATD		YLQMNSLSPEDTAVYFCRA				VTVSS
110	T0170PMP236	EVQLVESGGGLVQP	181	GDVHKIN	251	WYRQAPGKE	207	HITGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	222	GSRIWPYDY	321	WGQGTQ
	056A02	GGSARLSCVAS		FLG		REKVA		QTD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
111	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQP	183	GSVHLLN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	281	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL
	056A08	GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
112	T0170PMP229	EVQLVESGGGLVQP	183	GSVHLLN	262	WYRQAPGKE	195	HITIAD	281	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ
	056A10	GGSLRLSCAVS		FLG		RGVVA		ATD		YLQMNSLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
113	T0170PMP237	EVQLVESGGGLVQA	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	056B11	GGSLTLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
114	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	188	GGVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	056C01	GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
115	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	204	HITIAD	295	YADFAQGRFTISRDEARNMV	222	GSRIWPYDY	321	WGQGTQ
	056C02	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		VAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
116	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	208	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	056C03	GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		TTD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
117	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	183	GSVHLLN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	281	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	323	WGHGTL
	056C04	GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
118	T0170PMP226	EVQLVESGGGLVQP	181	GDVHKIN	251	WYRQAPGKE	198	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	324	WGRGTL
	056C07	GGSLRLSCVAS		FLG		REKVA		QAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
119	T0170PMP229	EVQLVESGGGLVQP	183	GSVHLLN	263	WYRQAPGKE	195	HITIAD	281	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ
	056C10	GGSLRLSCAVS		FLG		REMVT		ATD		YLQMNSLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
120	T0170PMP238	EVQLVESGGDLVQP	181	GDVHKIN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	296	YAEFAKGRFTISRDEPKNMV	223	GSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	056D01	GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		HLQMNSLKPEDTAVYLCRA				VTVSS
121	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	322	WGRGTQ
	056D02	GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
122	T0170PMP226	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	251	WYRQAPGKE	209	RISID	293	YAESAKGRFTISRDESKNMV	218	FSRIYPYDY	320	WGQGTL
	056D11	GGSLRLSCVAS		ILG		REKVA		QTD		YLQMNSLKPEDTAVYLCRA				VTVSS
123	T0170PMP239	EVQLVESGGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	204	HITIAD	297	YADFAKGRLTISRDEAKNMV	222	GSRIWPYDY	320	WGQGTL
	056E02	EGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		VAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
124	T0170PMP240	EVQLVESGGGLVQP	184	GAVHKIN	255	WYRQTPEKE	205	RTIGD	282	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYNY	320	WGQGTL
	056F01	GGSLKLFCAAS		FLG		REMVA		EVD		YLQMTSLKPEDTAVYYCRA				VTVSS

[1680]

표 A-5 - 파트 4: 식 I 중 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 로 제공되는 바람직한 조합에 더해지는, TCR 결합 빌딩 블록의 CDR 및 프레임워크 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미한다. 제 1 컬럼은 완전한 ISV, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 의 서열번호를 의미한다. CDR1, CDR2 및 CDR3 은 [Kontermann, 2010]에 따라 결정되었다.

SEQ	나노바디	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
125	T0170PMP241	241	EVQLVESGGGLVQP	183	GSVHLLN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	285	YAHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL
	056F08		GGSLGLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
126	T0170PMP242	242	EVQLVESGGGLAQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	056G02		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
127	T0170PMP227	227	EVQLVESGGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	210	HITIAD	298	YADFAKGRFTISRDGAKNMV	222	GSRIWPYDY	321	WGQGTQ
	056G11		GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		AAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
128	T0170PMP243	243	EVQLVESGGGWVQP	189	GSVYKIN	264	WYRQAPGHE	211	TITIGD	299	YADSAKGRFTISRDEARNMV	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ
	057B02		GGSLRLSCAAS		FLS		RELVA		AAD		YLQMNSLKPEDTALYFCHA				VTVSS
129	T0170PMP227	227	EVQLVESGGGLVQP	183	GSVHLLN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	281	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ
	057D06		GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
130	T0170PMP226	226	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	251	WYRQAPGKE	212	HIAISD	293	YADSAKGRFTISRDESKNMV	218	FSRIYPYDY	320	WGQGTL
	061A02		GGSLRLSCVAS		ILG		REKVA		QTD		YLQMNSLKPEDTAVYLCRA				VTVSS
131	T0170PMP227	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	300	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	061B04		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAAYFCRA				VTVSS
132	T0170PMP227	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	265	WYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	067A01		GGSLRLSCAAS		ILG		RGMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
133	T0170PMP227	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	266	WYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	067A03		GGSLRLSCAAS		ILG		HEMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
134	T0170PMP227	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	267	WYRQAPARE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	067B06		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
135	T0170PMP227	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	301	YADSAKGRFTISRDEAENMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	067C09		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
136	T0170PMP230	230	EVQLVESGGGLVQP	184	GAVHKIN	255	WYRQTPEKE	205	FITIGD	282	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYNY	320	WGQGTL
	067D01		GGSLKLSCAAS		FLG		REMVA		EVD		YLQMTSLKPEDTAVYVCRA				VTVSS
137	T0170PMP230	230	EVQLVESGGGLVQP	184	GAVHKIN	260	WYRQAPEKE	205	FITIGD	302	YADSAKGRFTISRDEATNMV	223	GSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	067D06		GGSLKLSCAAS		FLG		REMVA		EVD		YLQMTSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
138	T0170PMP227	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	213	HITIGD	303	YAGSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	067D09		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATS		YLQLNNLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
139	T0170PMP227	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	213	HITIGD	304	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	067E03		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATS		YLQLNNLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
140	T0170PMP238	238	EVQLVESGGDLVQP	181	GDVHKIN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	305	YABFAKGRFTISRDEPKNMV	223	GSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	067E06		GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYLCRA				VTVSS

[1681]

표 A-5-파트 5: 식 I, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 로 제공되는 바람직한 조합에 더해지는, TCR 결합 빌딩 블록의 CDR 및 프레임워크 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미한다. 제 1 컬럼은 완전한 ISV, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 의 서열번호를 의미한다. CDR1, CDR2 및 CDR3 은 [Kontermann, 2010]에 따라 결정되었다.

SEQ	나노바디	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
141	T0170PMP230	EVQLVESGGGLVQP	184	GAVHKIN	255	WYRQTPEKE	205	TITIGD	306	YAHSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ
	067F02	GGSLKLSCAAS		FLG		REMVA		EVD		YLQMTSLKPEDTAVYVCRA				VTVSS
142	T0170PMP230	EVQLVESGGGLVQP	184	GAVHKIN	255	WYRQTPEKE	214	TITIGD	282	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ
	068C03	GGSLKLSCAAS		FLG		REMVA		EVA		YLQMTSLKPEDTAVYVCRA				VTVSS
143	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	210	HITIAD	291	YADFAKGRFTISRDEAKNMV	222	GSRIWPYDY	321	WGQGTQ
	068C07	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		AAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
144	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	210	HITIAD	291	YADFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ
	068C11	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		AAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
145	T0170PMP244	EVQLVESGGSVQP	182	GSVHKIN	254	WYRQAPGKE	194	TITIGD	284	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ
	068D05	GGSLRPSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLSPEDTAVYFCRA				VTVSS
146	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	204	HITIAD	307	YADFAKGRFTISREVKNMV	222	GSRIWPYDY	320	WGQGTL
	068D07	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		VAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
147	T0170PMP245	EVQLVESGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	068E01	GESLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
148	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	210	HITTAD	308	YADFAKGRFTISRDEAKNMV	222	GSRIWPYDY	321	WGQGTQ
	068E08	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		AAD		YLQMNSLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
149	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	183	GSVHLLN	254	WYRQAPGKE	215	HITTAD	309	YSYFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	321	WGQGTQ
	068F04	GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		VTD		YLQMNSLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
150	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITTGD	310	YADSAKGRFTISRDEAKNVV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	068F06	GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
151	T0170PMP233	EVQLVESGGSVQP	182	GSVHKIN	268	WYRQAPGKE	194	TITIGD	284	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYNY	321	WGQGTQ
	068F08	GGSLRLSCAAS		FLG		RGMVA		ATD		YLQMNSLSPEDTAVYFCRA				VTVSS
152	T0170PMP230	EVQLVESGGLVQP	184	GAVHKIN	255	WYRQTPEKE	205	TITIGD	311	YEDSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRIYPYNY	320	WGQGTL
	069A06	GGSLKLSCAAS		FLG		REMVA		EVD		YLQMTGLKPEDTAVYVCRA				VTVSS
153	T0170PMP246	EVQLVESGGLVRP	185	GDVHKIN	251	WYRQAPGKE	206	HISISD	293	YAESAKGRFTISRDESKNMV	218	FSRIYPYDY	321	WGQGTQ
	069B02	GGSLRLSCVAS		ILG		REKVA		QTD		YLQMNSLKPEDTAVYLCRA				VTVSS
154	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	190	GDVYKIN	259	WHRQAPGKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL
	069B08	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
155	T0170PMP231	EVQLVESGGLVQP	185	GDVHKIN	269	WYRQAPAKE	197	HITIGD	283	YAESAKGRFTISRDEAKNVV	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	069C01	GGSLRLSCRAS		ILG		REMIA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
156	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	185	GDVHKIN	270	WYRQAPAKG	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	069C04	GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS

[1682]

표 A-5-파트 6: 식 I, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 로 제공되는 바람직한 조합에 대해지는, TCR 결합 빌딩 블록의 CDR 및 프레임워크 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미한다. 제 1 컬럼은 완전한 ISV, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 의 서열번호를 의미한다. CDR1, CDR2 및 CDR3 은 [Kontermann, 2010]에 따라 결정되었다.

SEQ	나노바디	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
157	T0170PMP238	EVQLVESGGDLVQP	181	GDVHKIN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	305	YAEFAKGRFTISRDEPKNMV	224	GSRIYPYSY	321	WGQGTQ
	069C05	GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYLCRA				VTVSS
158	T0170PMP247	EVQLVESGGMVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	069D02	GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
159	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	185	GDVHKIN	271	WYRQVPAKE	197	HITIGD	300	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRLYPYNY	320	WGQGTL
	069D07	GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAAYFCRA				VTVSS
160	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	210	HITIAD	291	YADFAKGRFTISRDEAKNMV	222	GSRIWPYDY	320	WGQGTL
	069E02	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		AAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
161	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	183	GSVHLIN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	312	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL
	069E07	GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNGLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
162	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	181	GDVHKIN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	305	YAEFAKGRFTISRDEPKNMV	223	GSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	069E09	GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYLCRA				VTVSS
163	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	191	GEVHKIN	272	WYRQCPGKE	194	TITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	225	LSRLIYPNY	320	WGQGTL
	069E11	GGSLRLSCAAS		ILG		RDMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
164	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	313	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	069F05	GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYLCRA				VTVSS
165	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	187	GEVYKIN	273	WQRQAPGKE	204	HITIAD	291	YADFAKGRFTISRDEAKNMV	222	GSRIWPYDY	320	WGQGTL
	069G08	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		VAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
166	T0170PMP238	EVQLVESGGDLVQP	181	GDVHKIN	254	WYRQAPGKE	195	HITIAD	314	YAEFAKGRFTISRDEPKNMV	223	GSRIYPYNY	320	WGQGTL
	070B08	GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPVDTAVYLCRA				VTVSS
167	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	183	GSVHLLN	251	WYRQAPGKE	195	HITIAD	315	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL
	070B09	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		ATD		YLQMNNLRPEDTAVYFCRA				VTVSS
168	T0170PMP248	EVQLVESGGLVQP	181	GDVHKIN	251	WYRQAPGKE	198	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL
	070C09	GGSPRLSCVAS		FLG		REKVA		QAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
169	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	316	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	070D07	GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDAAVYFCRA				VTVSS
170	T0170PMP227	EVQLVESGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	204	HITIAD	298	YADFAKGRFTISRDGAKNMV	222	GSRIWPYDY	320	WGQGTL
	070E07	GGSLRLSCAAS		FLG		REKVA		VAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
171	T0170PMP233	EVQLVESGGSVQP	182	GSVHKIN	274	WYCQAPGKE	194	TITIGD	284	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLIYPNY	321	WGQGTQ
	070F11	GGSLRLSCAAS		FLG		REMVA		ATD		YLQMNSLSPEDTAVYFCRA				VTVSS
172	T0170PMP226	EVQLVESGGLVQP	185	GDVHKIN	251	WYRQAPGKE	206	HISISD	317	YAESAKGRFTISRDESKNMV	218	FSRIYPYDY	321	WGQGTQ
	070G02	GGSLRLSCVAS		ILG		REKVA		QTD		YLQMNSLKPEDAAVYLCRA				VTVSS

[1683]

표 A-5 – 파트 7: 식 I, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 로 제공되는 바람직한 조합에 더해지는, TCR 결합 빌딩 블록의 CDR 및 프레임워크 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미한다. 제 1 컬럼은 완전한 ISV, 즉 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 의 서열번호를 의미한다. CDR1, CDR2 및 CDR3 은 [Kontermann, 2010]에 따라 결정되었다.

SEQ	나노바디	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
173	T0170PMP	234	EVQLVESGGGLVQP	187	GEVYKIN	251	WYRQAPGKE	204	HITIAD	291	YADFAKGRFTISRDEAKNMV	222	GSRIWPYDY	321	WGQGTQ
	070G06		GGSLRPSCAAS		FTG		RFKVA		VAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
174	T0170PMP	249	EVQLVESGGGLVQP	181	GDVHKIN	251	WYRQAPGKE	216	HITIAD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPYDY	320	WGQGTL
	082B04		GGSLRPSCVAS		FTG		RFKVA		QAD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
175	T0170PMP	227	EVQLVESGGGLVQP	191	GRVHKIN	275	WYRQAPGKE	217	FTITGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	225	LSRLYPYNY	320	WGQGTL
	084B07		GGSLRLSCAAS		ILG		RDMVA		ETQ		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
176	T0170PMP	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	318	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	084C02		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMDSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
177	T0170PMP	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	319	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	084E03		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPGDTAVYFCRA				VTVSS
178	T0170PMP	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	276	WHRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	084E05		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS
179	T0170PMP	227	EVQLVESGGGLVQP	185	GDVHKIN	276	WHRQAPAKE	197	HITIGD	300	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	321	WGQGTQ
	084F04		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAAYFCRA				VTVSS
180	T0170PMP	250	EVQLVESGGGWVQA	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPYNY	320	WGQGTL
	084F10		GGSLRLSCAAS		ILG		REMVA		ATD		YLQMNSLKPEDTAVYFCRA				VTVSS

표 A-6: 대조군 나노바디의 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미하고; "ID"는 식별 명칭을 의미하고; "서열"은 아미노산 서열을 표시한다.

SEQ	ID	서열
44	RSV7B2(Q10 8L)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSPGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTLVTVSS
45	cAbLys3 D1E,Q5V,A6 E,Q108L)	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYY CAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTLVTVSS

[1684]

표 A-7 - 파트 1: 다중특이적 폴리펩티드의 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미하고; "ID"는 식별 영칭을 의미하고; "서열"은 아미노산 서열을 표시한다.

SEQ	ID	서열
46	T0170000113	EVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYY
		CVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIG
		PYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHLSTGGYGYDSWGQ
		GTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKERERKVAHIS
		IGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
47	T0170000114	EVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYY
		CVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGYTSK
		INDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGGS
		GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKERERKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTIS
		RDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
48	T0170000115	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYC
		NTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQA
		PGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTLVTVSSGG
		GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKERERKVAHISIGDQTDYADS
		AKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
49	T0170000116	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTVYYC
		NTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQA
		PGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGS
		GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKERERKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTIS
		RDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
50	T0170000120	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYY
		CAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSC
		AASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQ
		GTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKERERKVAHIS
		IGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
51	T0170000121	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTIGPYCMGWFRQAPGKEREGVAAINMGGGITYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYY
		CAADSTIYASYYECGHGLSTGGYGYDSWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC
		AASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGG
		GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKERERKVAHISIGDQTDYADS
		AKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
52	T0170000126	DVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYY
		CVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSK
		INDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGS
		GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKERERKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTIS
		RDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS

[1685]

표 A-7 - 파트 2: 다중특이적 폴리펩티드의 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미하고; "ID"는 식별 명칭을 의미하고; "서열"은 아미노산 서열을 표시한다.

SEQ	ID	서열
53	T0170000128	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYR
		QTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSS
54	T0170000129	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFR
		QAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTLVTVSS
55	T0170000130	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYC
		NTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQA
		PGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
		GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTIS
56	T0170000131	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYC
		NTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQA
		PGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
57	T0170000132	DVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY
		CAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDV
		HKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSS
58	T0170000134	VQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCN
		TFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAP
		GKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSG
		GGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTV
		YLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSS
59	T0170000135	DVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYY
		CVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVPGGSLRLSCVASGDVHK
		INFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGG
		GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFT
		ISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSS
60	T0170000138	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYR
		QTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGG
		GSGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNT
		VYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSS

[1686]

표 A-7 - 파트 3: 다중특이적 폴리펩티드의 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미하고; "ID"는 식별 명칭을 의미하고; "서열"은 아미노산 서열을 표시한다.

SEQ	ID	서열
61	T01700139	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFR
		QAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGG
		GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFT
		ISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSS
62	A0226000009	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFR
		QAPGKEREFVAAISWSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADLTSTNPGSYIYIWAYDYWGQGTLVTVSSGGGSG
		GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKG
		RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS
63	T01700142	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYR
		QTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGG
		GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT
		LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	
64	T01700143	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYR
		QTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGG
		GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNT
		VYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ
		PGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG
		TLVTVSS	
65	T01700144	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYR
		QTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGG
		GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT
		LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCA
		ASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQG
		TLVTVSS	

[1687]

표 A-7 - 파트 4: 다중특이적 폴리펩티드의 서열. "SEQ"는 숫자적 서열번호를 의미하고; "ID"는 서열 명칭을 의미하고; "서열"은 아미노산 서열을 표시한다.

SEQ	ID	서열
66	T01700145	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFR
		QAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGG
		GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFT
		ISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ
		PGNSLRLSCAASGFTSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG
		TLVTVSS
67	T01700146	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFR
		QAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGG
		GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFT
		ISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ
		AGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQG
		TLVTVSS
337	T01700099	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYR
		QAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGAADYKDHDGDYKDHD
		IDYKDDDDKGAAHHHHHH
338	T01700142	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYR
		QTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGG
		GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT
		LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSA
339	T01700143	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC
		RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYR
		QTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGG
		GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNT
		VYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ
		PGNSLRLSCAASGFTSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG
		TLVTVSSA

[1688]

표 A-7 - 파트 5: 다중특이적 폴리펩티드의 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미하고; "ID"는 식별 목록을 의미하고; "서열"은 아미노산 서열을 표시한다.

SEQ	ID	서열
340	T0170001144	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYR QTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCA ASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQG TLVTVSSA
341	T0170001145	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRR QAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFT ISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG TLVTVSSA
342	T0170001146	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFC RAFSRIYPYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFR QAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFTISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETGFRTLPIAYDYWGQGTLVTVSSGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGITSKINDMGWYRQTPGNYREWVASITATGTTNYRDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLKPEDTTVYYCNTFPPISNFWGQG TLVTVSSA

[1689]

표 A-8-파트 1: CD123 및 TCR 복합체의 성분의 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미하고; "ID"는 식별 명칭을 의미하고; "서열"은 아미노산 서열을 표시한다.

SEQ	ID	서열
68	인간 CD123 (NP_002174)	MVLLMLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYSMPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILF PENSGKPWAGAENITCWIHDVDFLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILVRGRSAAFG IPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFRYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTP QRFECDQEEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT
69	사이노 CD123 (EHH61867.1)	MTLLMLTLLLVATPCLLRTKEDPNAPIRNLRMKEKAQQLMWDLNRNVTDVECIKGTDYSMPAMNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVASPPFSTWILF PENSGTPRAGAENITCWVHDVDFLSCSWVVGPAAPADVQYDLYLNNPNSHEQYRCLHYKTDARGTQIGCRFDDIAPLSRGSQSSHILVRGRSAAVS IPCTDKFVFFSQIERLTPPNMTGECNETHSFMHWKMKSHFNRKFRYELRIQKRMQPVRTEQVRDTTSFQLPNPGTYTVQIRARETVYEFLSAWSTP QRFECDQEEGASSRAWRTSLLIALGTLLALLCVFLICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDTFQQDKLVVWEAGKAGLEECLVSEVQVVEKT
70	인간 CD3 델타 (P04234)	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSC VELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
71	인간 CD3 감마 (P09693)	MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVIDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKP LQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN
72	인간 CD3 엡실론 (P07766)	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYY VCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIR KGQRDLYSGLNQRRI
73	인간 CD3 제타 (P20963)	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
74	인간 TCR 알파 불변 도메인 (P01848)	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSC DVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
75	인간 TCR 베타 불변 도메인	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATIVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
76	2XN9 로부터 유래된 인간 TCR 알파 가변 도메인	QLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGPVLLVTVVTGGEVKKLKRLTFQFGDARKDSSLHITAAQPGDTGLYLCAGAGSQGN LIFGKGTKLSVK

[1690]

표 A-8 – 파트 2: CD123 및 TCR 복합체의 성분의 서열. "SEQ"는 주어진 서열번호를 의미하고; "ID"는 식별 명칭을 의미하고; "서열"은 아미노산 서열을 표시한다.

SEQ	ID	서열
77	2XN9 로부터 유래된 인간 TCR 베타 가변 도메인	DGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSSR SSYEQYFGPGTRLTVT
343	2IAN 으로부터 유래된 인간 TCR 알파 가변 도메인	IQVEQSPPDLILQEGANSTLRCNFSDSVNNLQWFHQNPWGQLINLFYIPSGTKQNGRLSATTVATERYSLLYISSSQTTDSGVYFCAALIQGAQKL VFGQGTRLTIN
344	2IAN 으로부터 유래된 인간 TCR 베타 가변 도메인	NAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQCTQDMNHNYMYWYRQDPGMGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLELAAPSQTSVYFCASTYH GTGYFGEGSWLTVV
345	3TOE 로부터 유래된 인간 TCR 알파 가변 도메인	GDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNNRMASLAIAEDRKSSTILHRATLRDAAVYYCTVYGGAT NKLIFGTGTLLAVQ
346	3TOE 로부터 유래된 인간 TCR 베타 가변 도메인	VVSQHPSWVIAKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARG GSYNSPLHFGNGTRLTVT
347	사이노 TCR 알파 불변 도메인	PYIQNPDPAVYQLRGSKSNDTSVCLFTDFDSVMNVSQSKDSDVHITDKTVLDMRSMDFKSNGAVAWSNKSDFACTSAFKDSVIPADTFFPSPESSC

[1691]

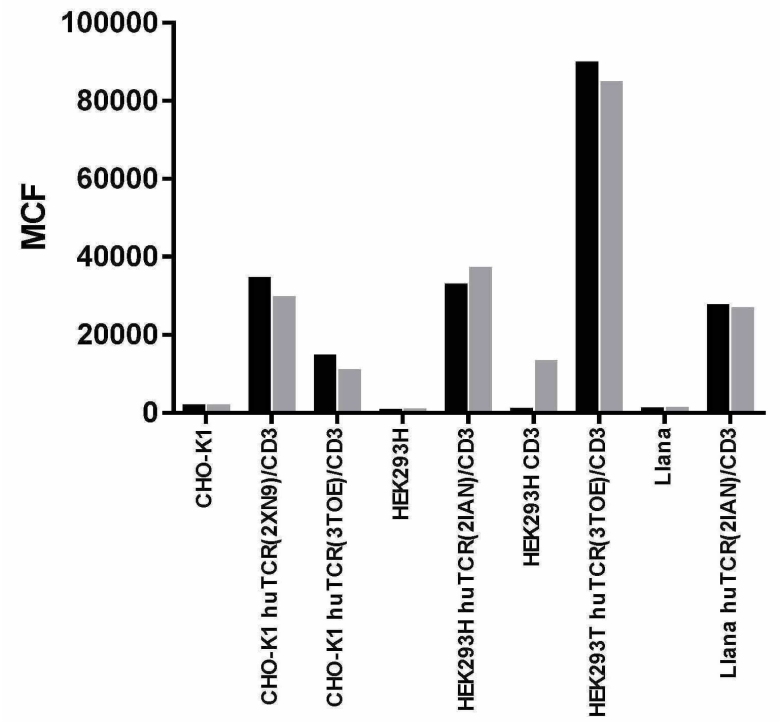
표 A-8 - 파트 3: CD123 및 TCR 복합체의 성분의 서열. "SEQ"는 주어진 서열 번호를 의미하고; "ID"는 식별 명칭을 의미하며; "서열"은 아미노산 서열을 표시한다.

SEQ	ID	서열
348	레서스 TCR 베타 불변 도메인	EDLKKVFPPKVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALEDSRYSLSSRLRVSATFWHNPRNHFRC QVQFYGLSEDDEWTEDRDKPTTQKISAEAWGRADC
349	레서스 TCR 알파 가변 도메인	QQIMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSSTTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIMLVKSGEVKKQKRLIFQFGEAKKNSSLHITATQTTDVGTYFCATTGVNNL FFGTGTRLTVL
350	레서스 TCR 베타 가변 도메인	AGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHDYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGSTEKGEVPDGYNVTRSNTEDFPLRLESAAPSQTSVYFCA SSYWTGRSYEQYFGPGTRLTVI

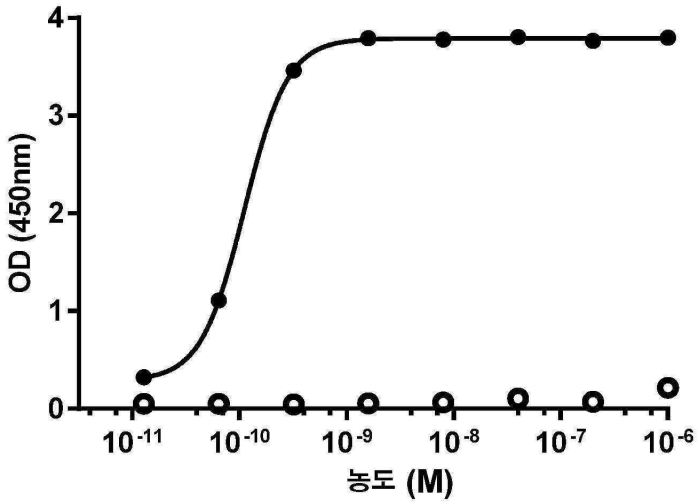
[1692]

도면

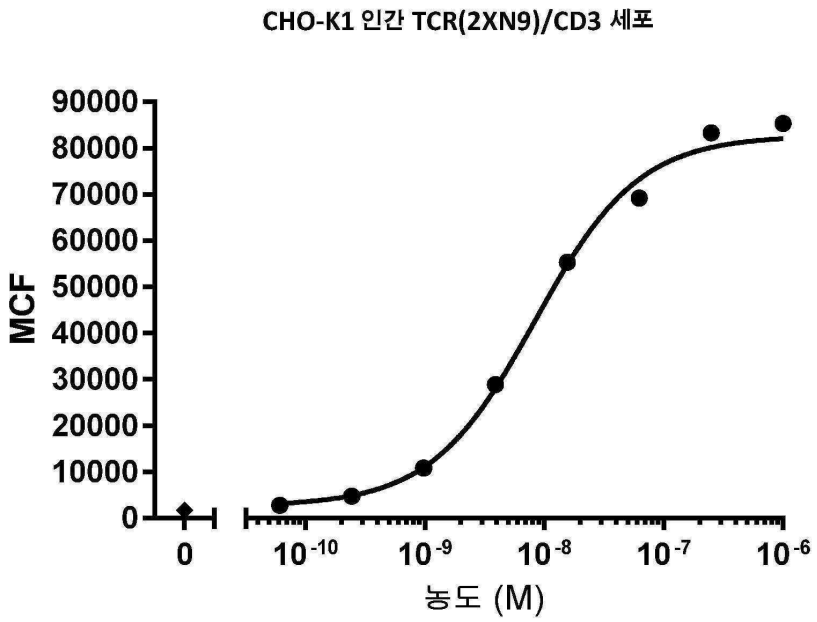
도면1


MCF
100000
80000
60000
40000
20000
0
CHO-K1
CHO-K1 huTCR(2XN9)/CD3
CHO-K1 huTCR(3TOE)/CD3
HEK293H
HEK293H huTCR(2IAN)/CD3
HEK293H CD3
HEK293T huTCR(3TOE)/CD3
Llana
Llana huTCR(2IAN)/CD3

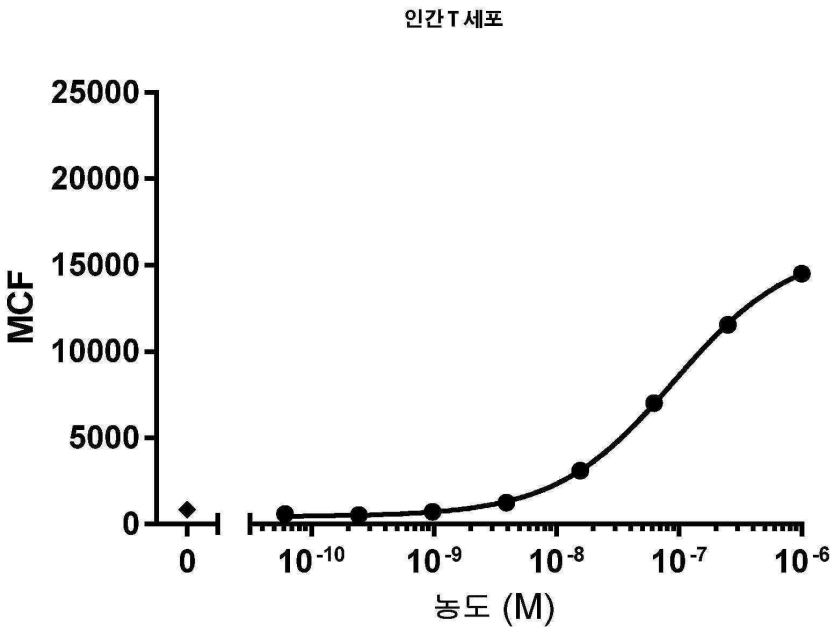
도면2


OD (450nm)
4
3
2
1
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

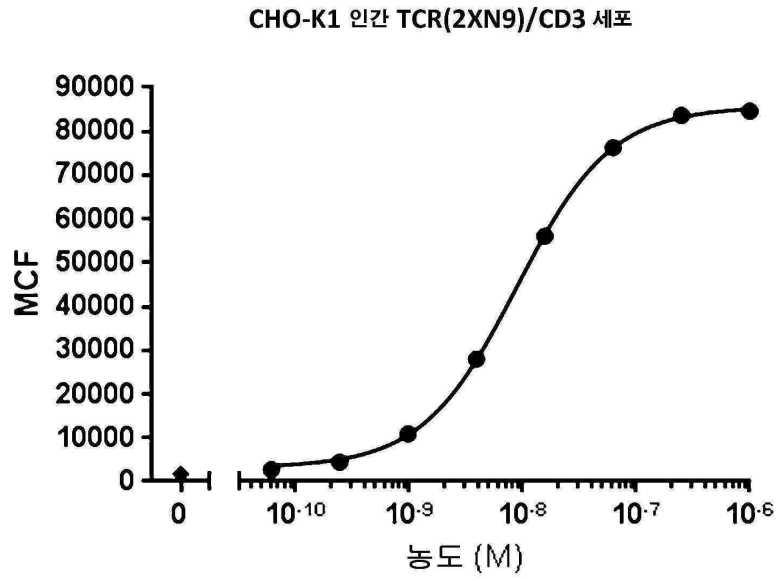
도면3a


CHO-K1 인간 TCR(2XN9)/CD3 세포
MCF
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

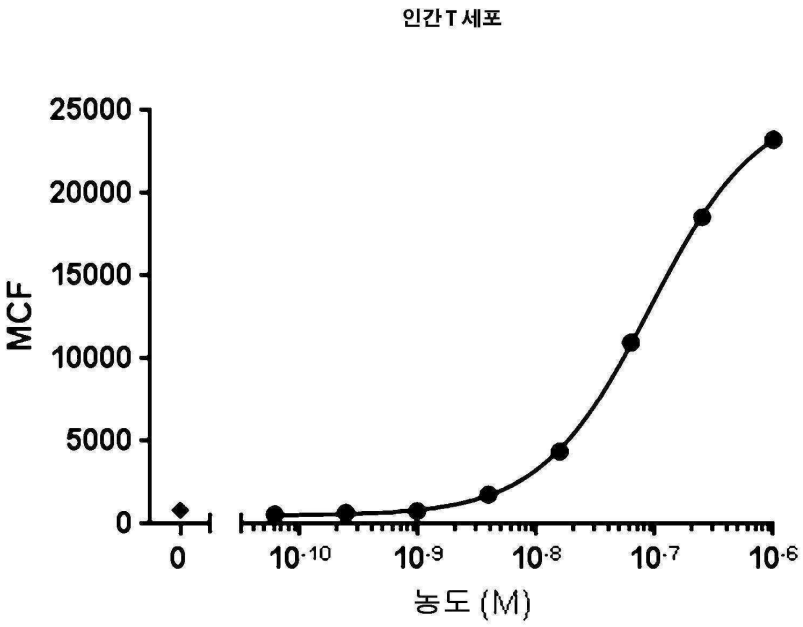
도면3b


인간 T 세포
MCF
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

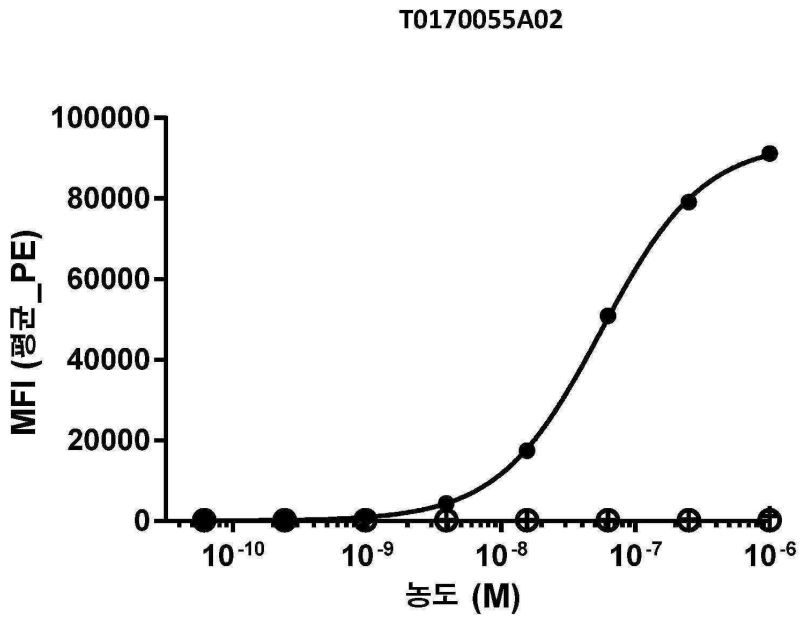
도면3c


CHO-K1 인간 TCR(2XN9)/CD3 세포
MCF
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

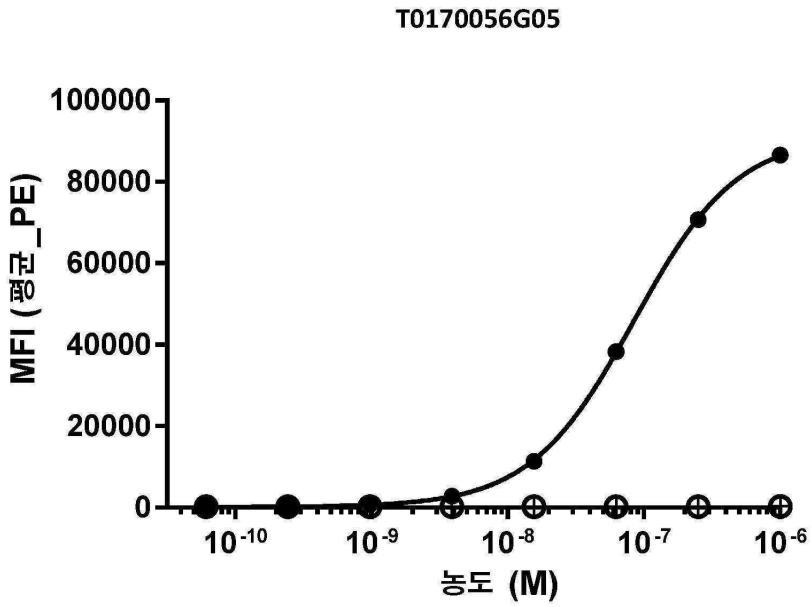
도면3d


인간 T 세포
MCF
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

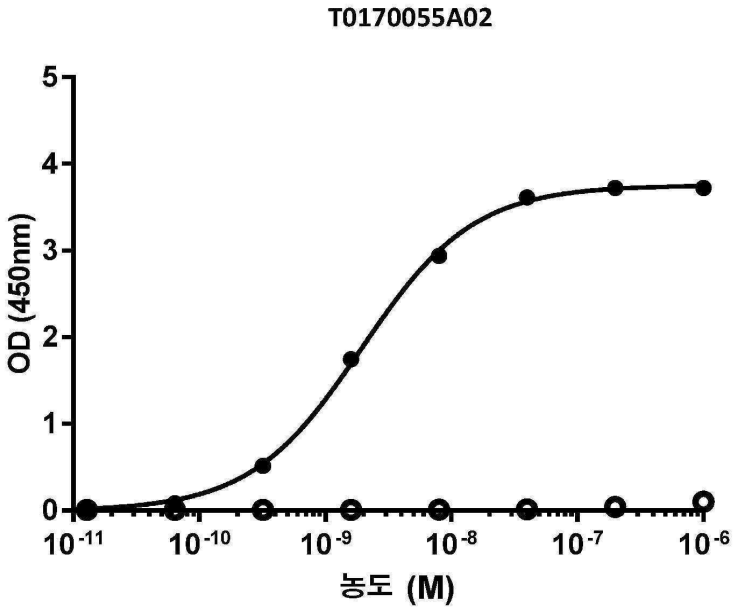
도면4a


T0170055A02
100000
80000
60000
40000
20000
0
MFI (평균_PE)
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

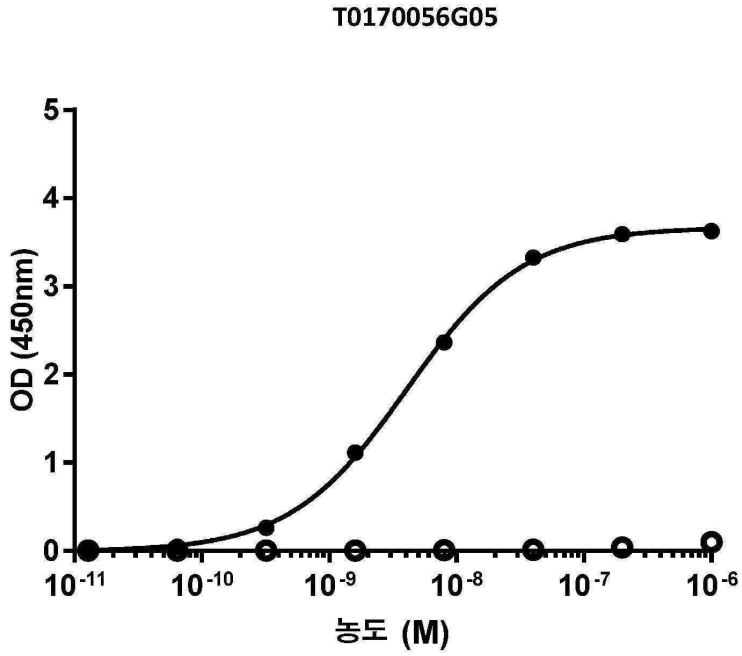
도면4b


T0170056G05
100000
80000
60000
40000
20000
0
MFI (평균_PE)
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

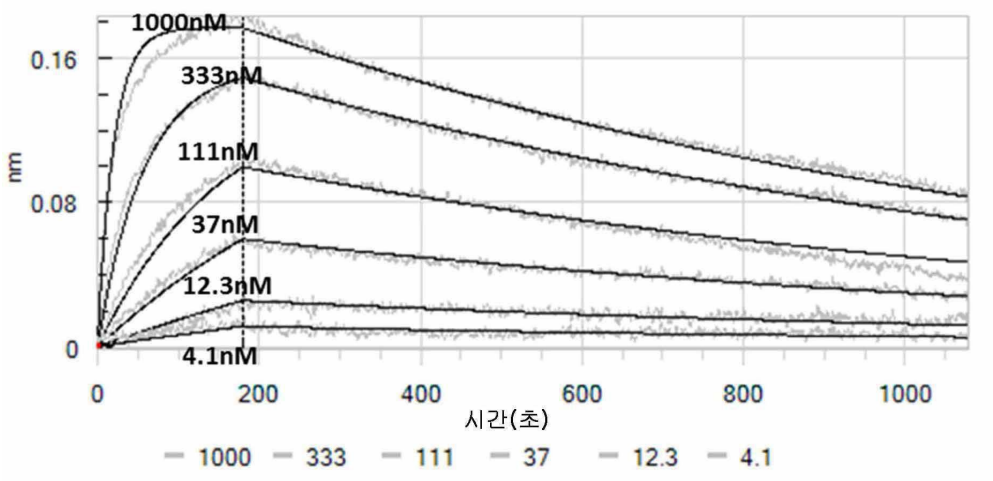
도면5a


T0170055A02
OD (450nm)
0
1
2
3
4
5
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

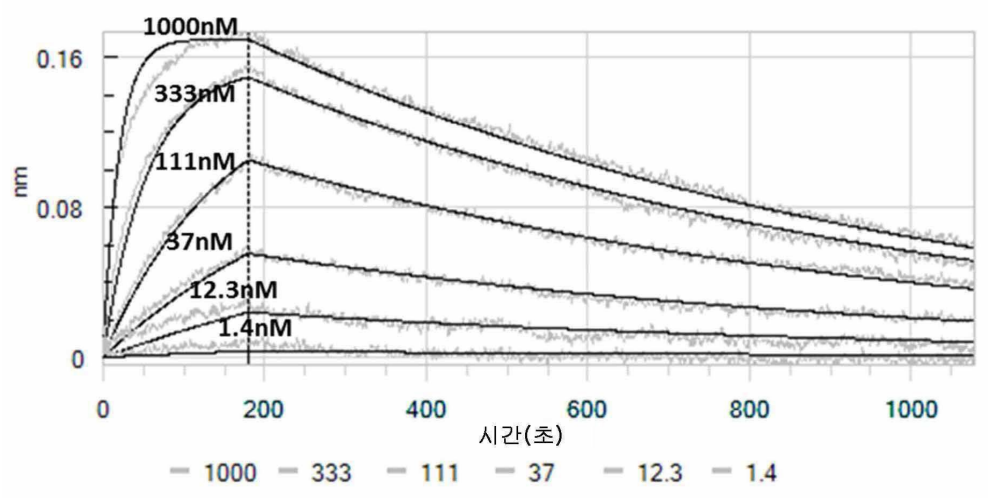
도면5b


T0170056G05
OD (450nm)
0
1
2
3
4
5
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

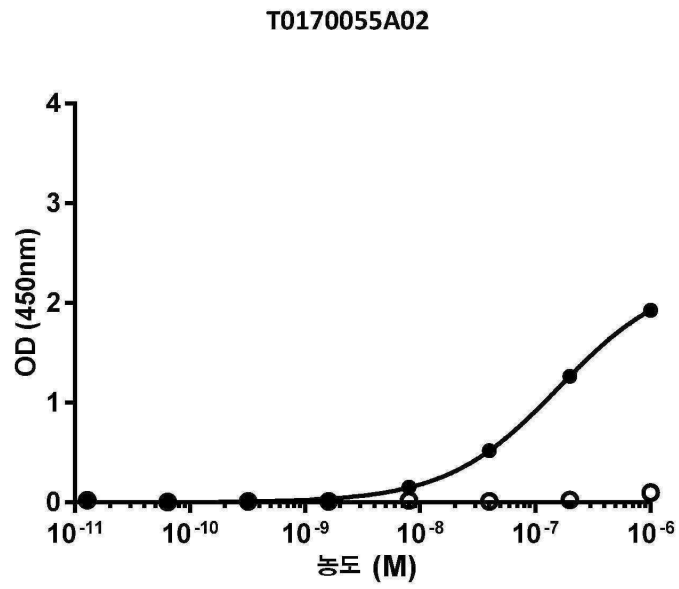
도면6a



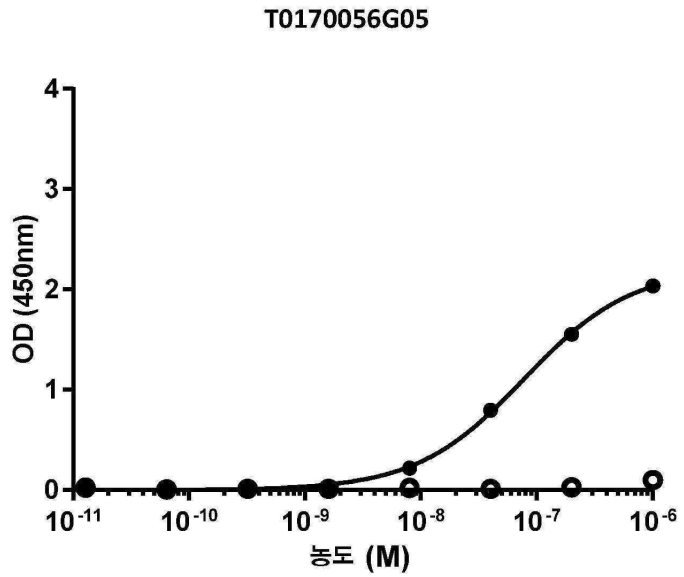
도면6b



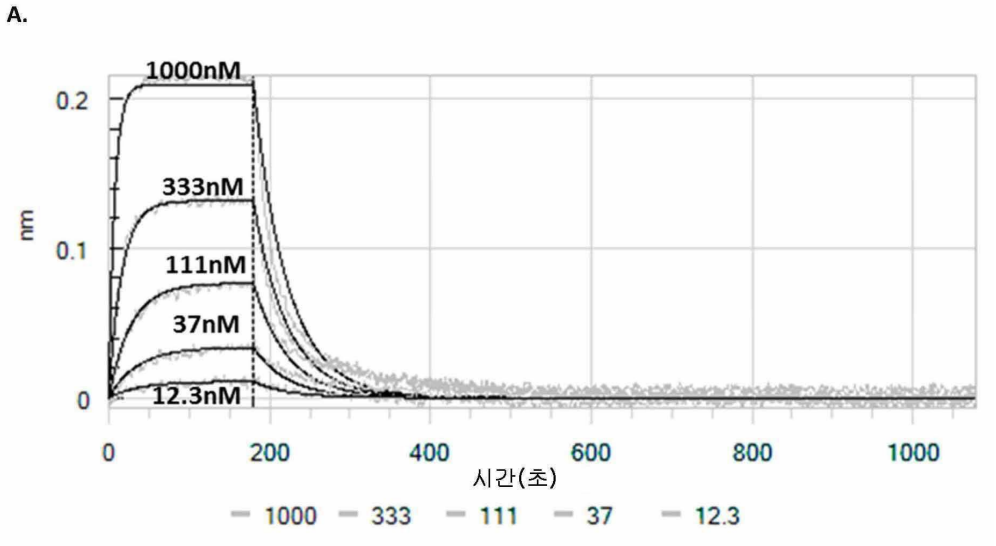
도면7a



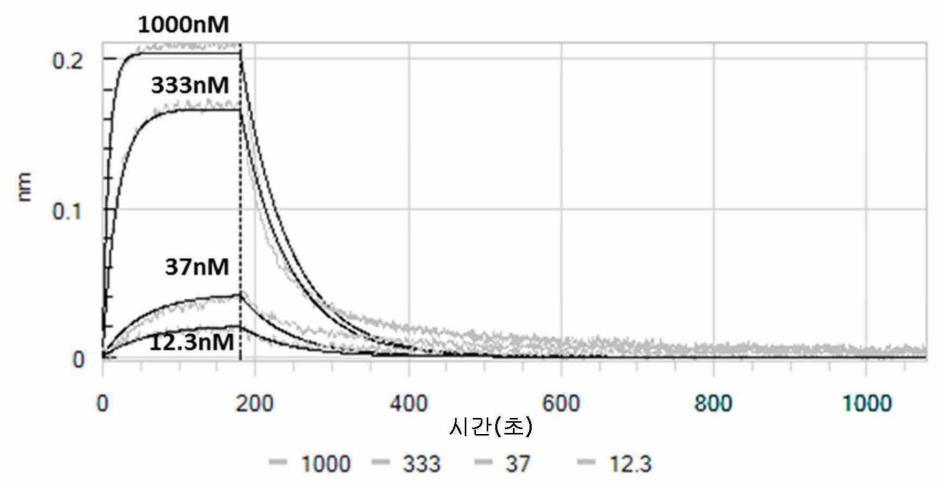
도면7b


T0170056G05
OD (450nm)
4
3
2
1
0
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

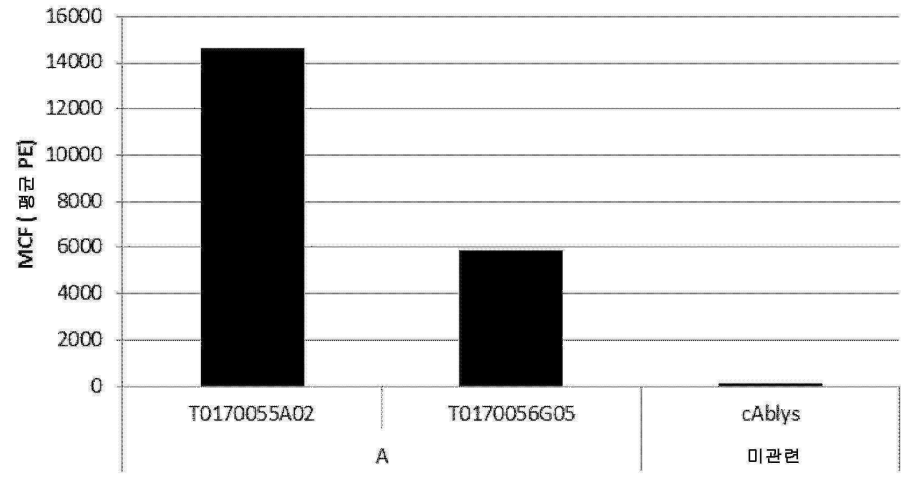
도면8a


A.
1000nM
333nM
111nM
37nM
12.3nM
nm
0.2
0.1
0
0
200
400
600
800
1000
시간(초)
1000
333
111
37
12.3

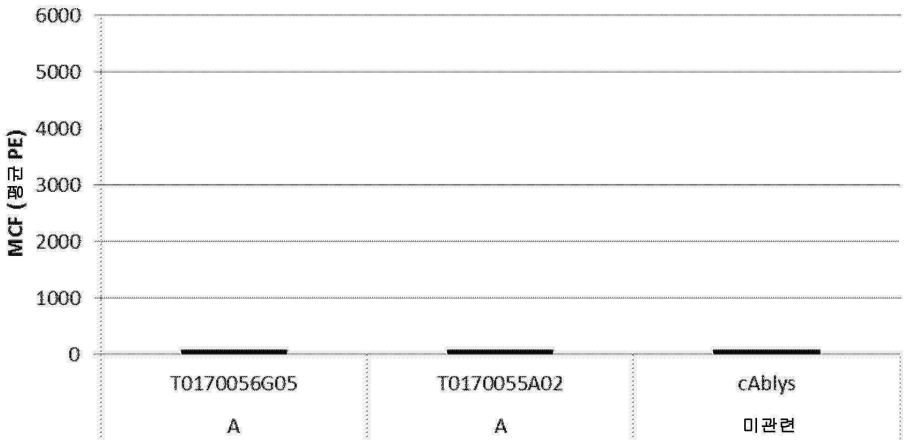
도면8b



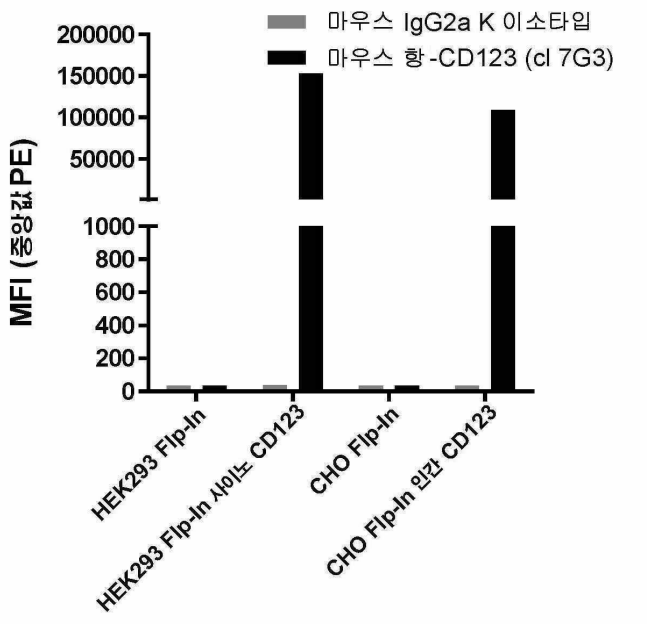
도면9a



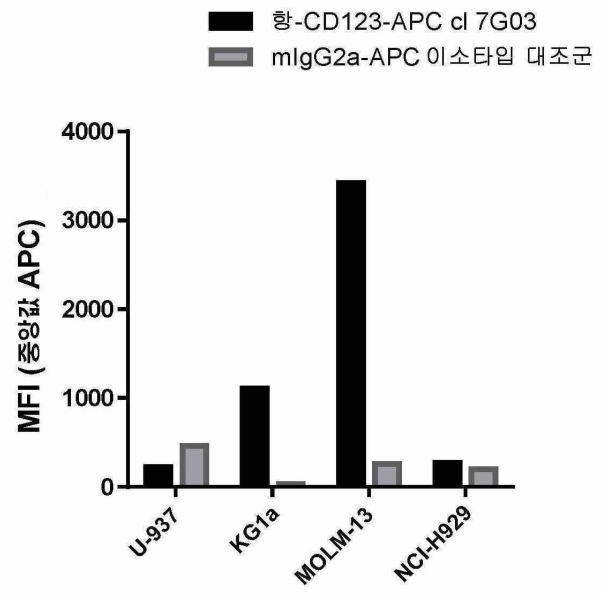
도면9b



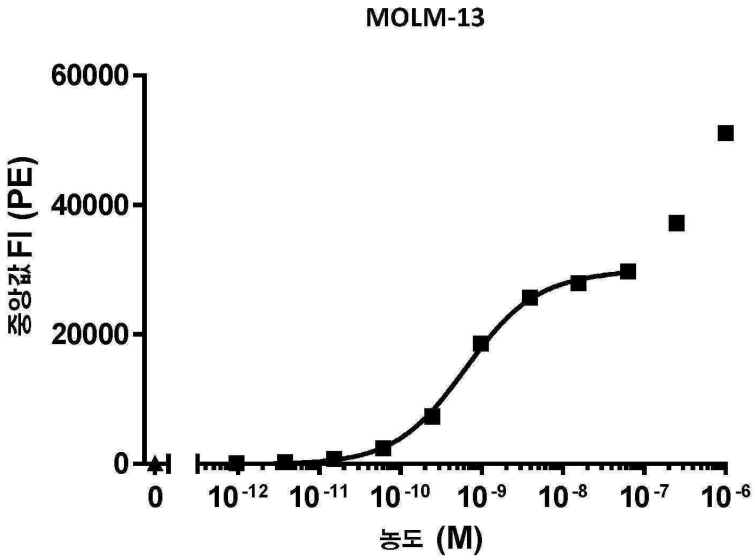
도면10


마우스 IgG2a K 이소타입
마우스 항-CD123 (cl 7G3)
MFI (중앙값 PE)
200000
150000
100000
50000
1000
800
600
400
200
0
HEK293 Flp-In
HEK293 Flp-In 사이노 CD123
CHO Flp-In
CHO Flp-In 인간 CD123

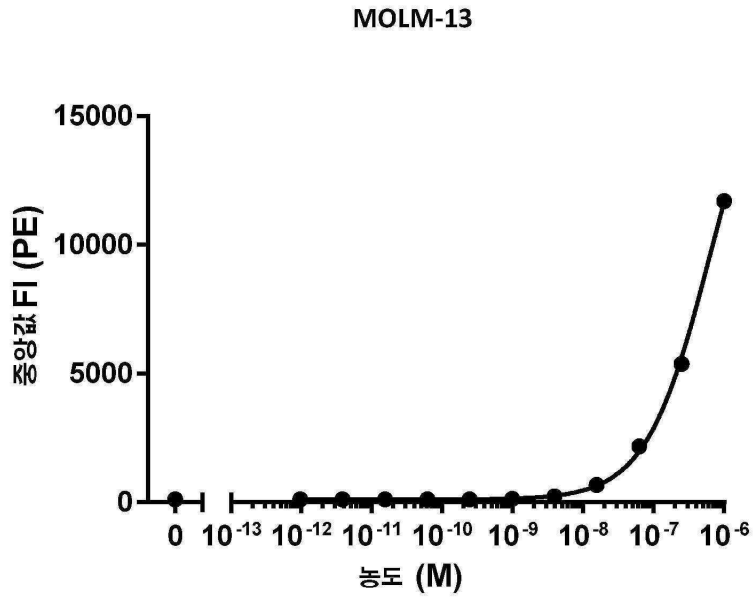
도면11


항-CD123-APC cl 7G03
mIgG2a-APC 이소타입 대조군
MFI (중앙값 APC)
4000
3000
2000
1000
0
U-937
KG1a
MOLM-13
NCI-H929

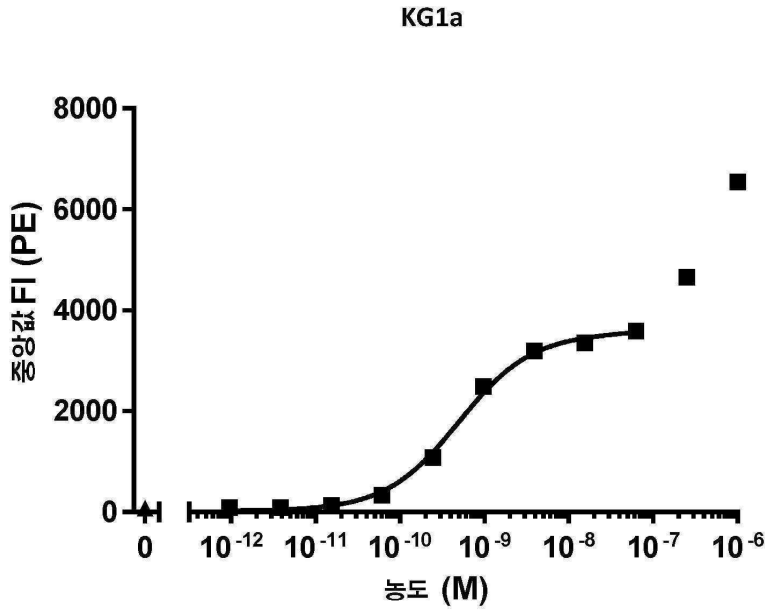
도면12a


MOLM-13
60000
40000
20000
0
중앙값 FI (PE)
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

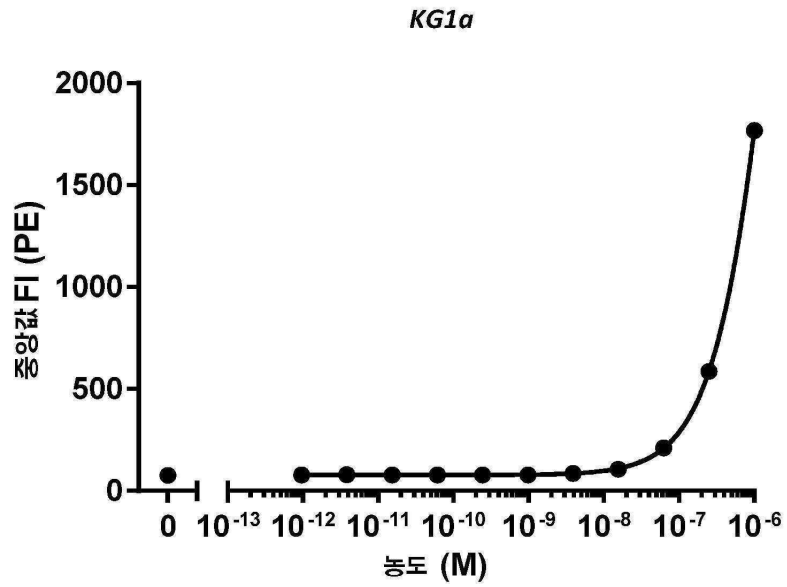
도면12b


MOLM-13
15000
10000
5000
0
중앙값 FI (PE)
0
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

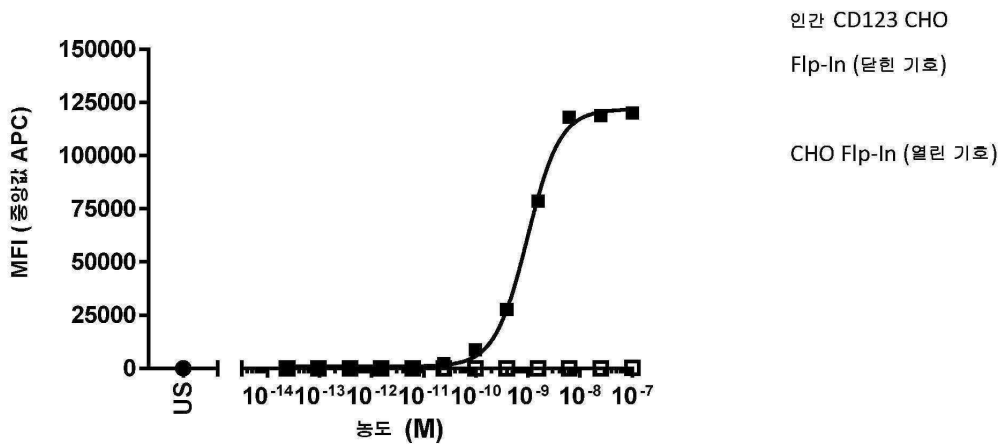
도면12c


KG1a
중앙값 FI (PE)
8000
6000
4000
2000
0
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

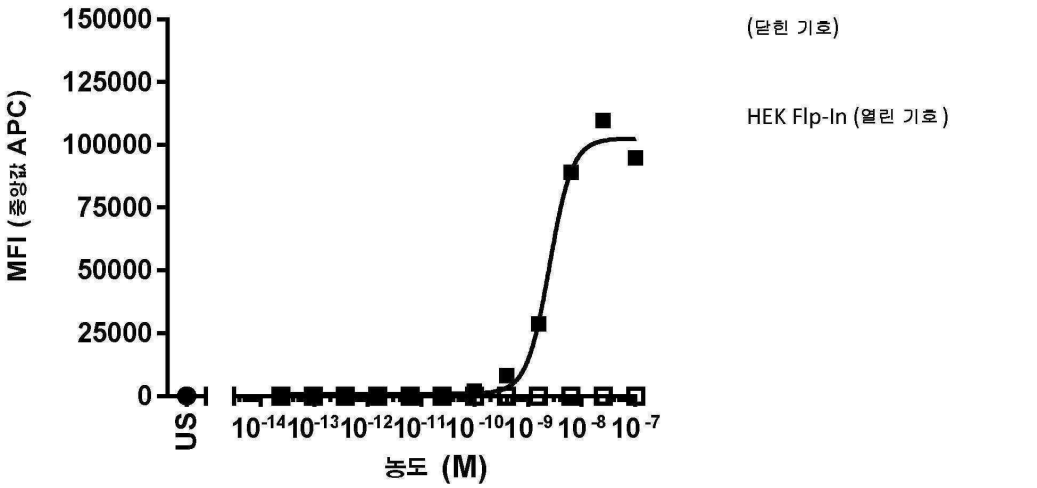
도면12d


KG1a
중앙값 FI (PE)
2000
1500
1000
500
0
0
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

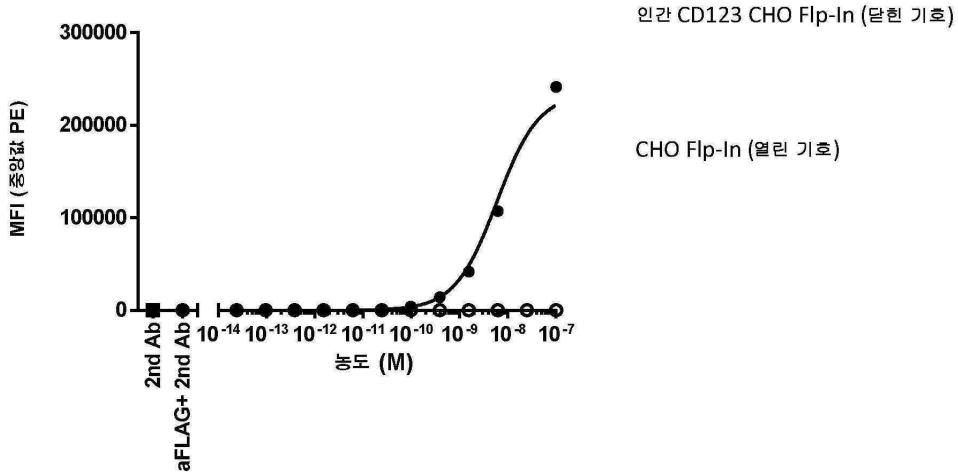
도면13a



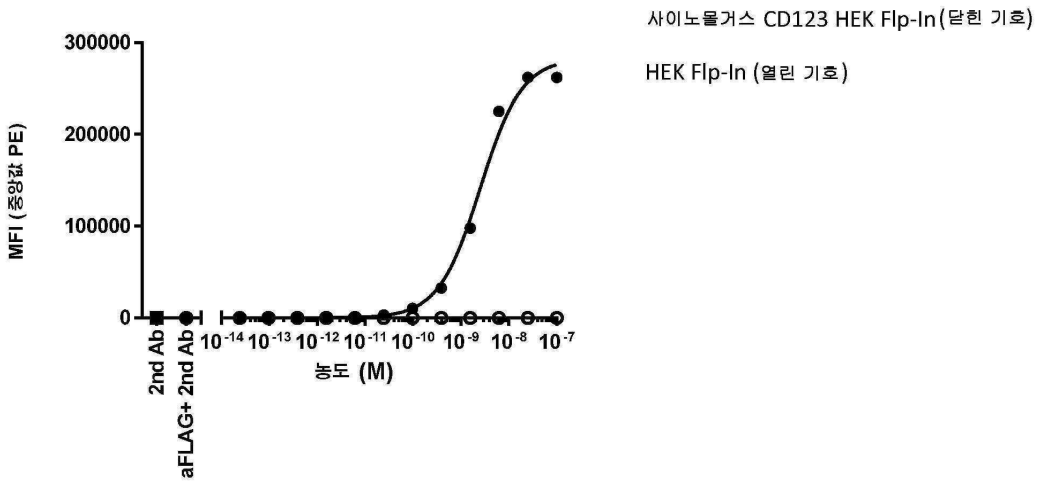
도면13b



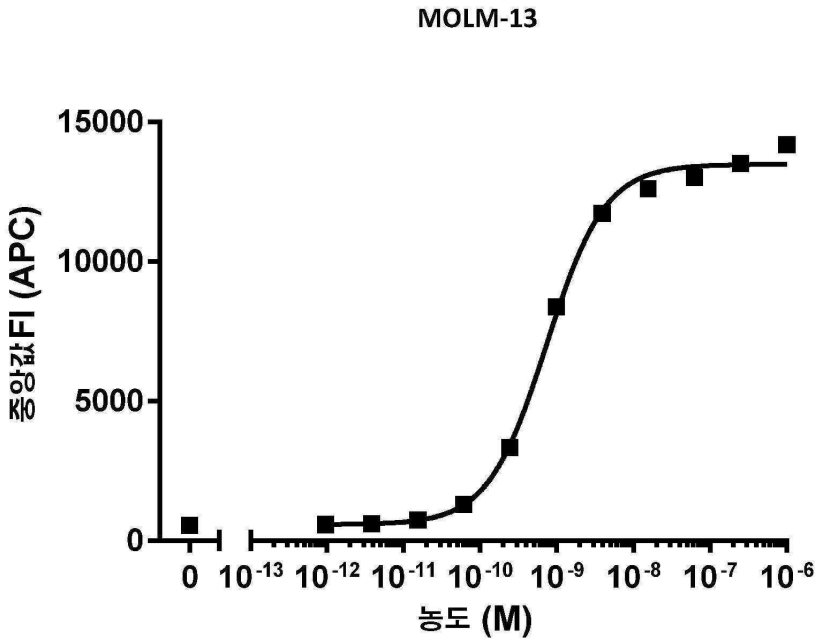
도면14a



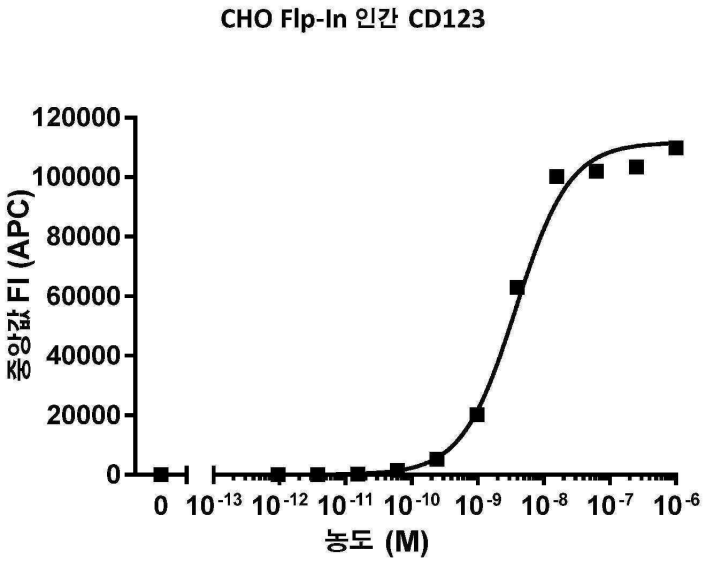
도면14b


사이노몰거스 CD123 HEK Flp-In(닫힌 기호)
HEK Flp-In (열린 기호)
MFI (중앙값 PE)
300000
200000
100000
0
2nd Ab
aFLAG+ 2nd Ab
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)

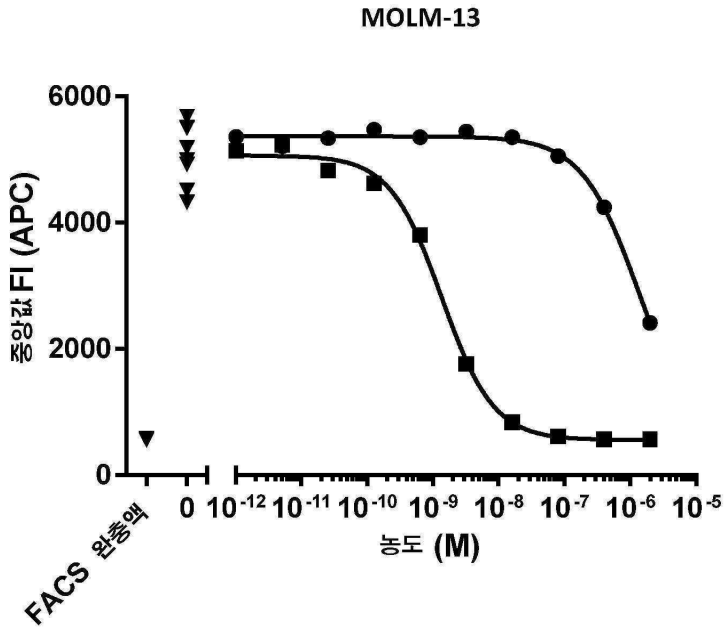
도면15a


MOLM-13
중앙값FI (APC)
15000
10000
5000
0
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)

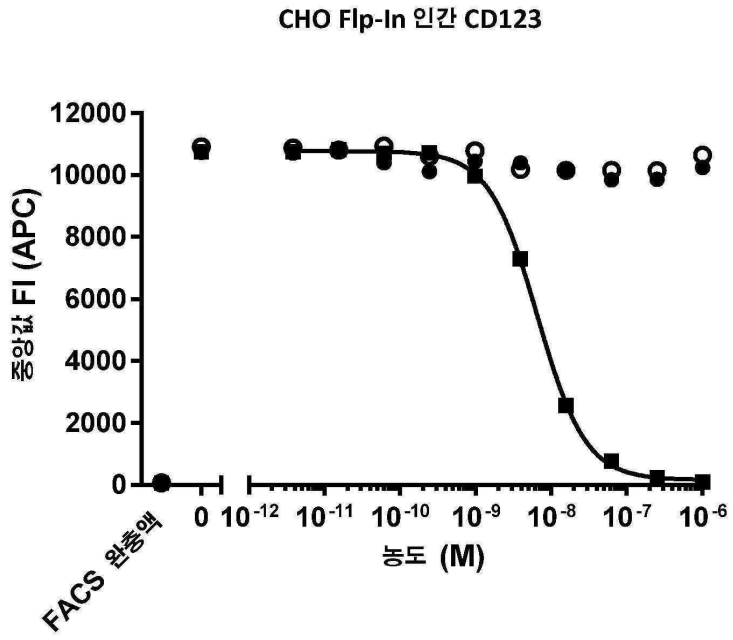
도면15b


CHO Flp-In 인간 CD123
중앙값 FI (APC)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)

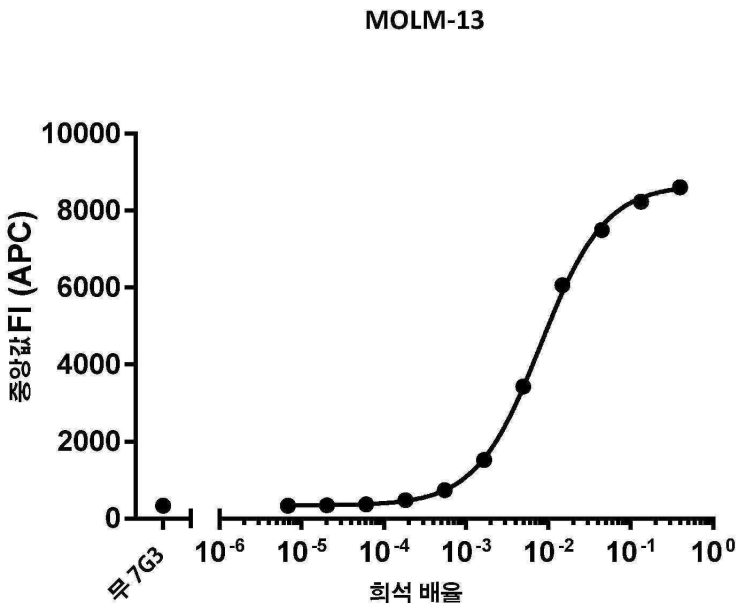
도면16a


MOLM-13
중앙값 FI (APC)
6000
4000
2000
0
FACS 완충액
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
농도 (M)

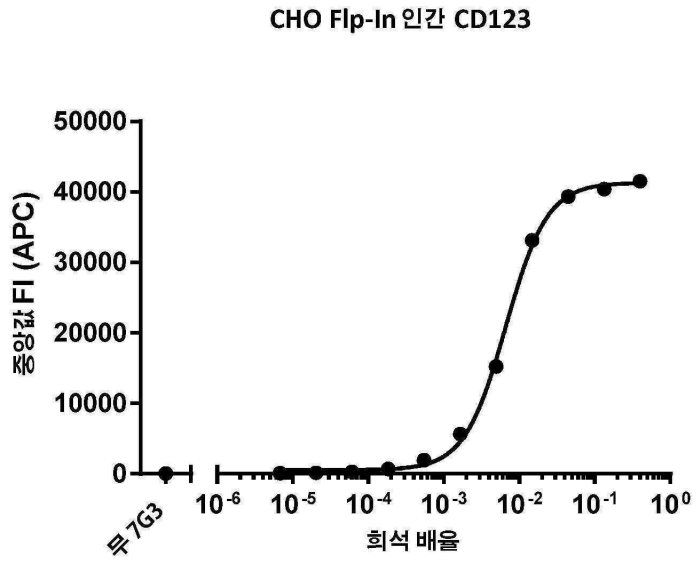
도면16b


CHO Flp-In 인간 CD123
중앙값 FI (APC)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
FACS 완충액
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

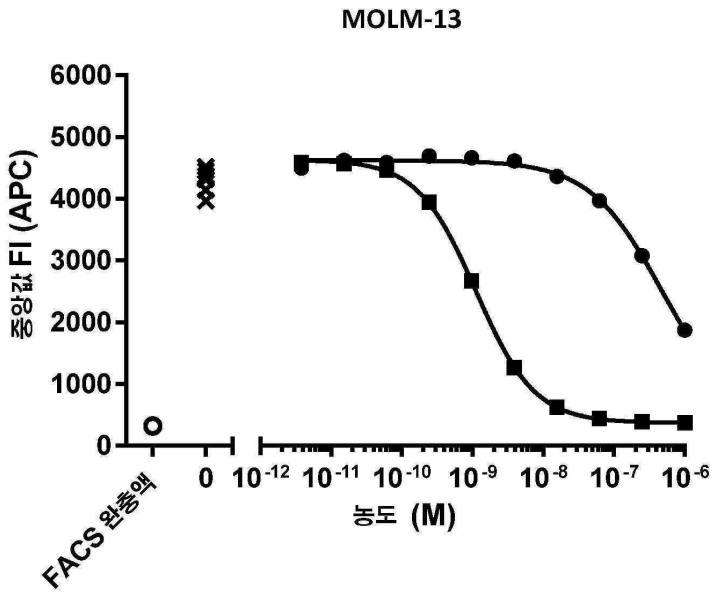
도면17a


MOLM-13
중앙값FI (APC)
10000
8000
6000
4000
2000
0
무7G3
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
희석 배율

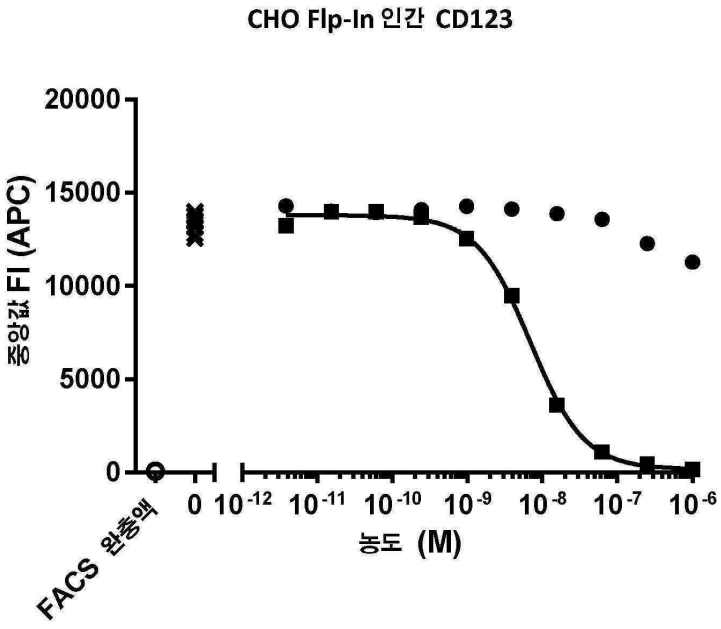
도면17b


CHO Flp-In 인간 CD123
중앙값 FI (APC)
50000
40000
30000
20000
10000
0
무7G3
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
희석 배율

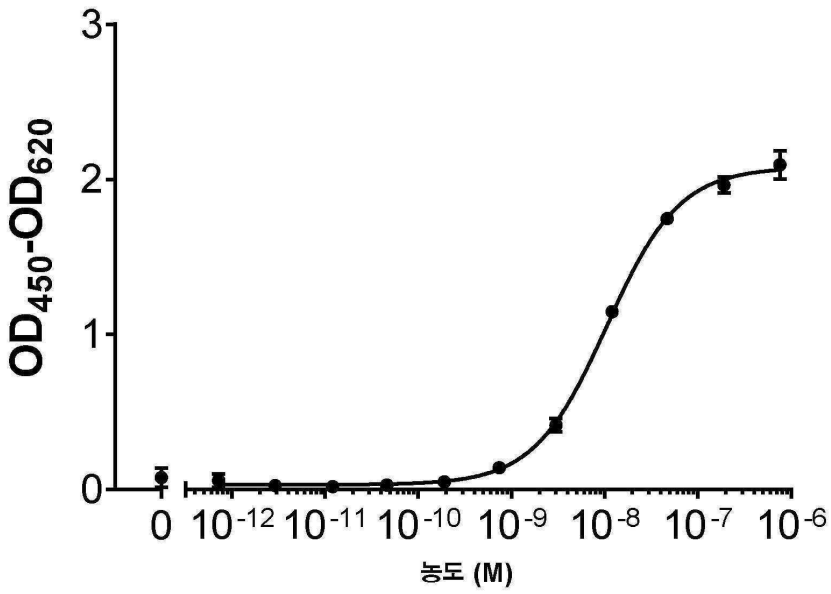
도면18a


MOLM-13
중앙값 FI (APC)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
FACS 완충액
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

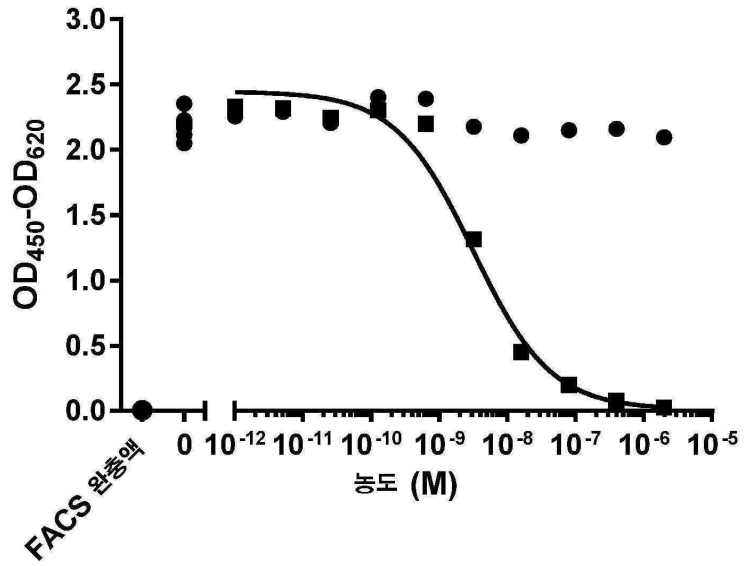
도면18b


CHO Flp-In 인간 CD123
중앙값 FI (APC)
20000
15000
10000
5000
0
FACS 완충액
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)

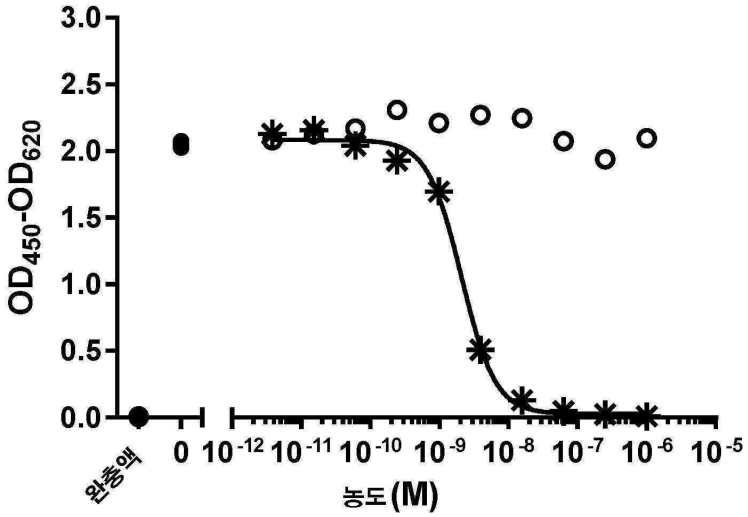
도면19


OD450-OD620
3
2
1
0
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)

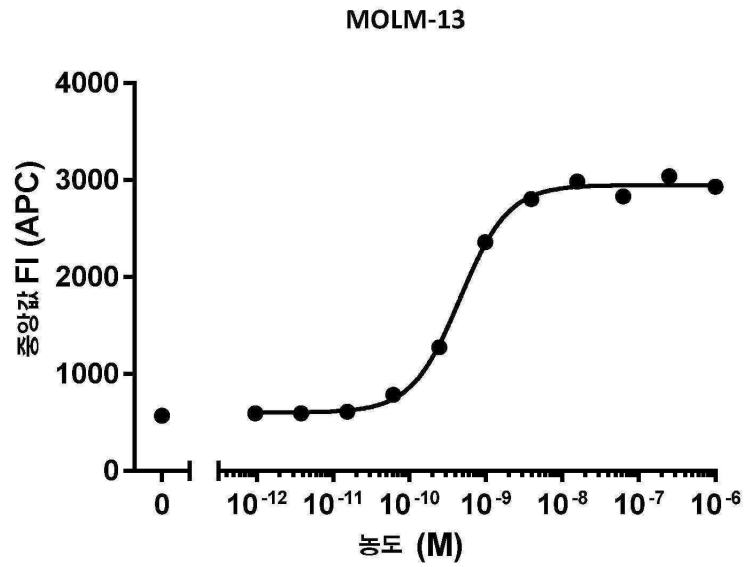
도면20a


3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD450-OD620
FACS 완충액
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
농도 (M)

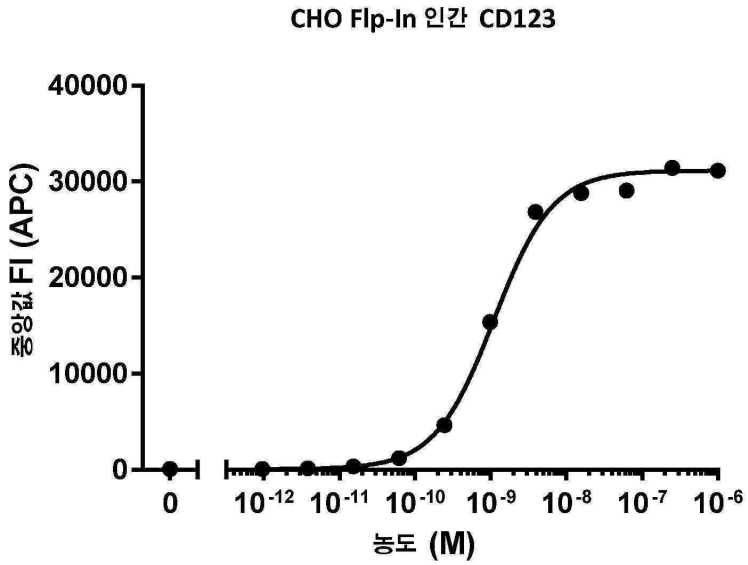
도면20b


3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD450-OD620
완충액
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6 10-5
농도 (M)

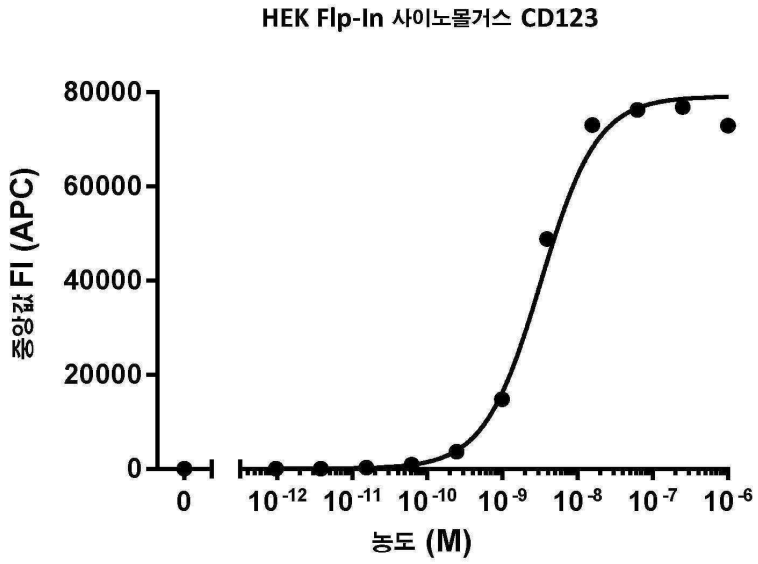
도면21a


MOLM-13
중앙값 FI (APC)
4000
3000
2000
1000
0
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

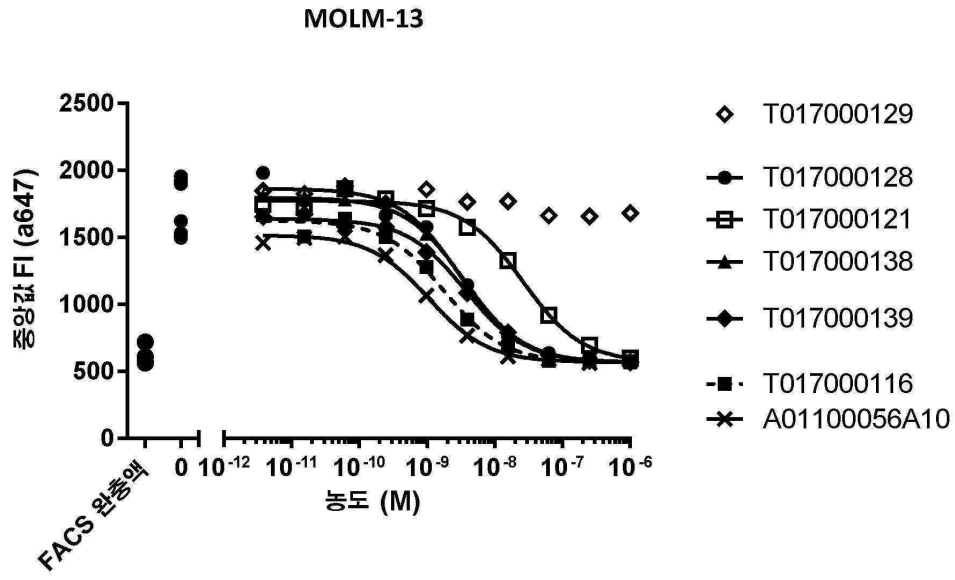
도면21b


CHO Flp-In 인간 CD123
중앙값 FI (APC)
40000
30000
20000
10000
0
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

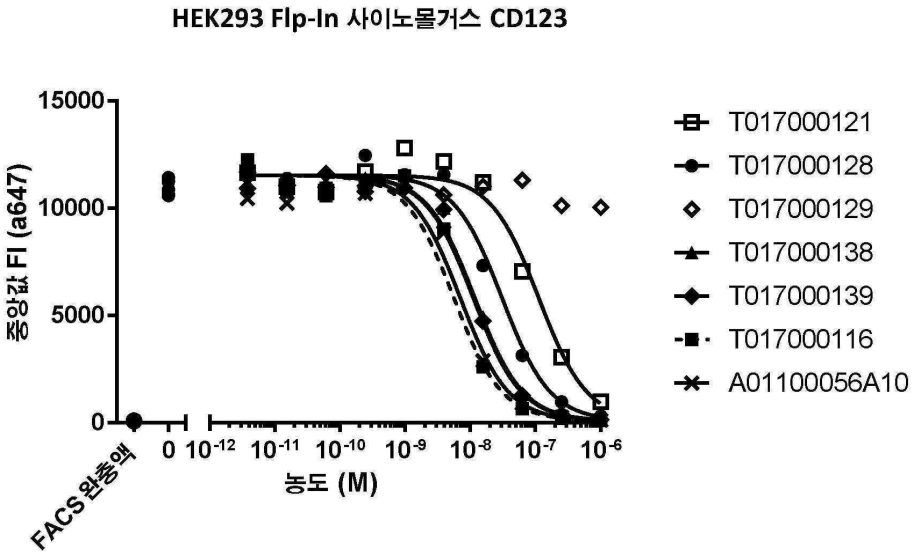
도면21c


HEK Flp-In 사이노몰거스 CD123
중앙값 FI (APC)
80000
60000
40000
20000
0
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)

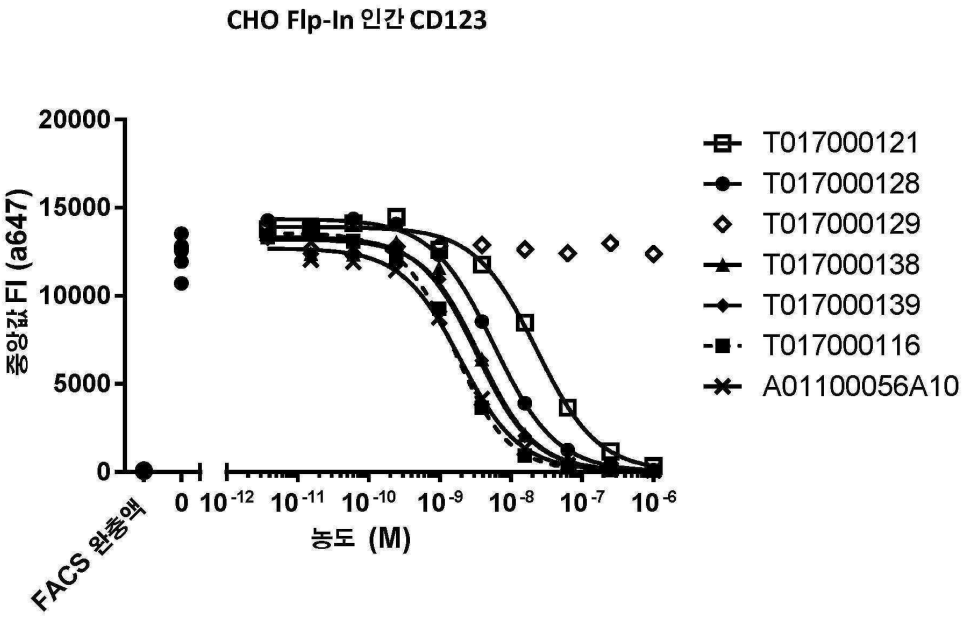
도면22a


MOLM-13
중앙값 FI (a647)
2500
2000
1500
1000
500
0
FACS 완충액
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)
T017000129
T017000128
T017000121
T017000138
T017000139
T017000116
A01100056A10

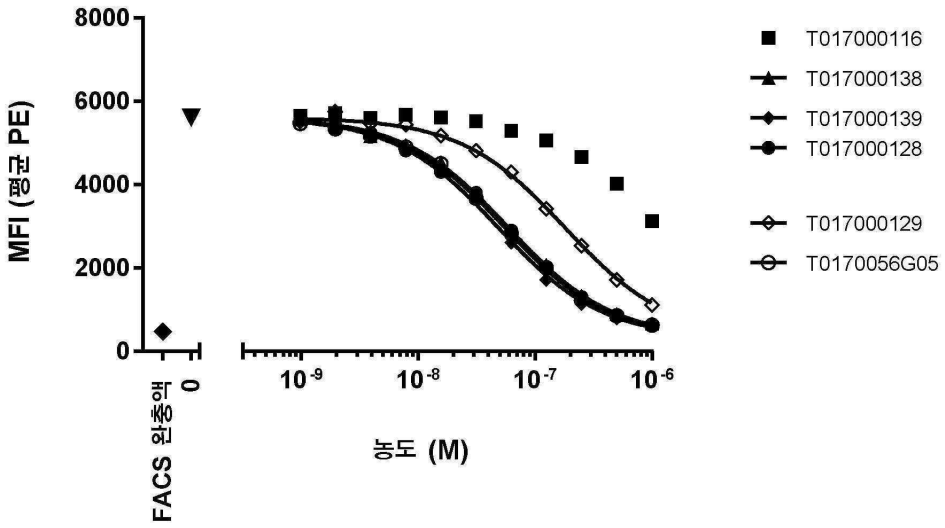
도면22b


HEK293 Flp-In 사이노몰거스 CD123
중앙값 FI (a647)
15000
10000
5000
0
FACS 완충액
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000121
T017000128
T017000129
T017000138
T017000139
T017000116
A01100056A10

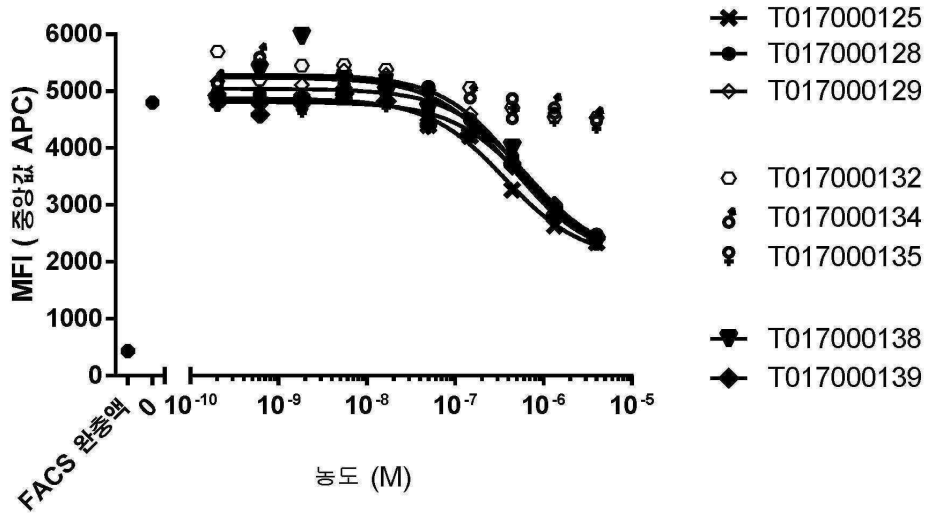
도면22c


CHO Flp-In 인간 CD123
중앙값 FI (a647)
20000
15000
10000
5000
0
FACS 완충액
0 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000121
T017000128
T017000129
T017000138
T017000139
T017000116
A01100056A10

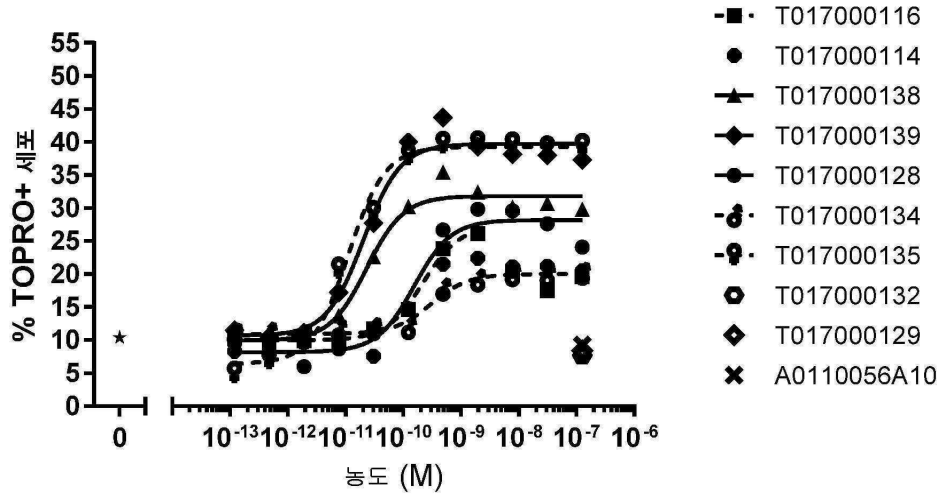
도면23



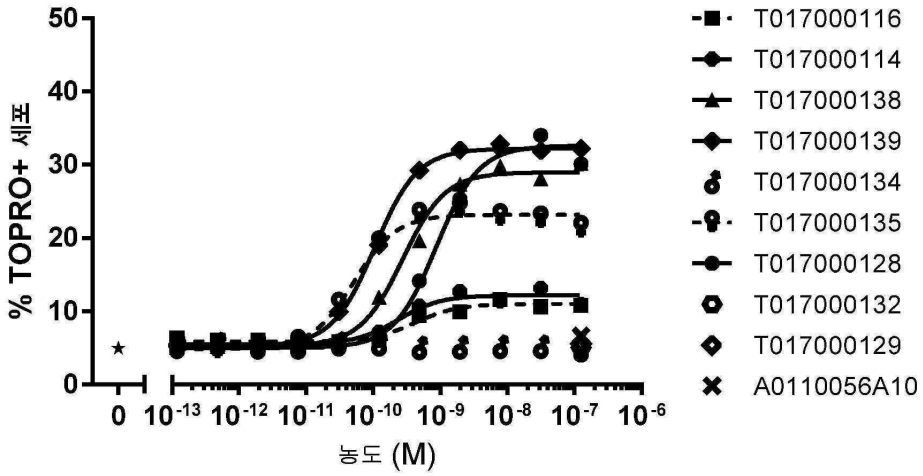
도면24



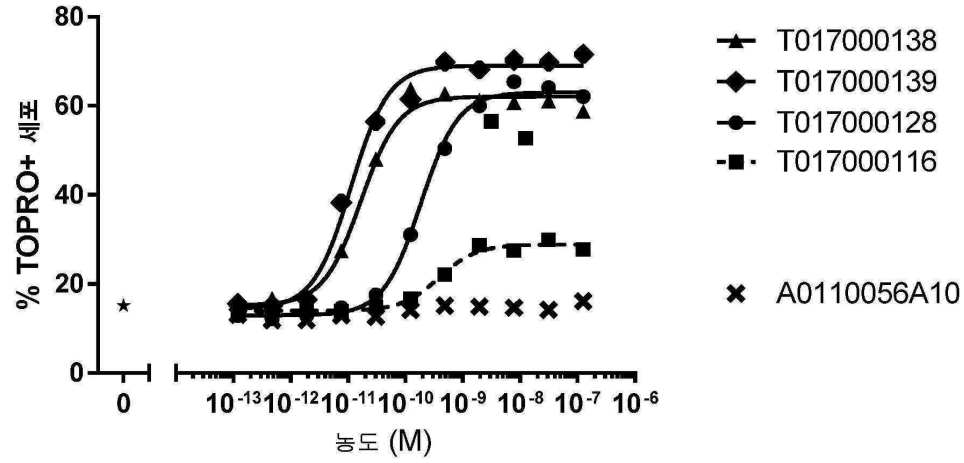
도면25



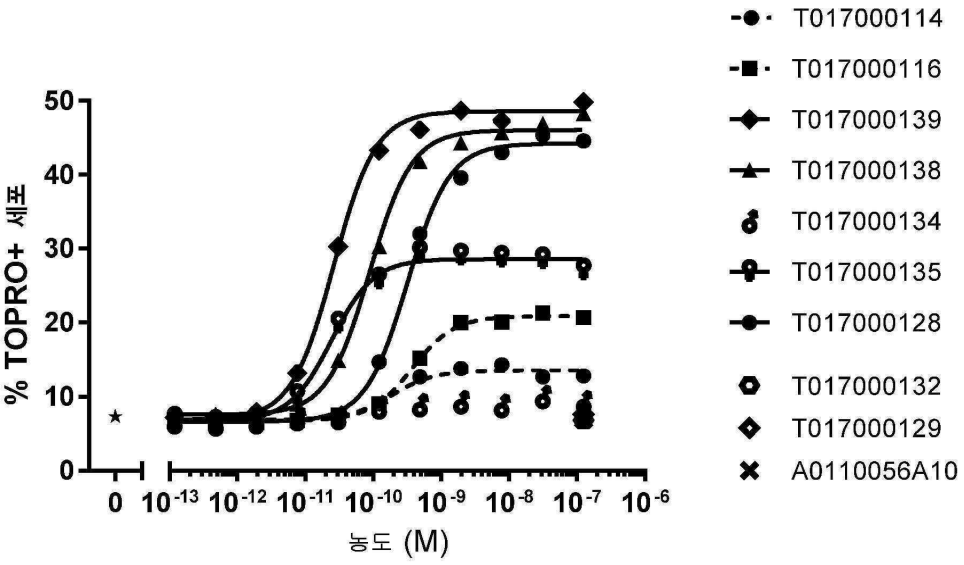
도면26



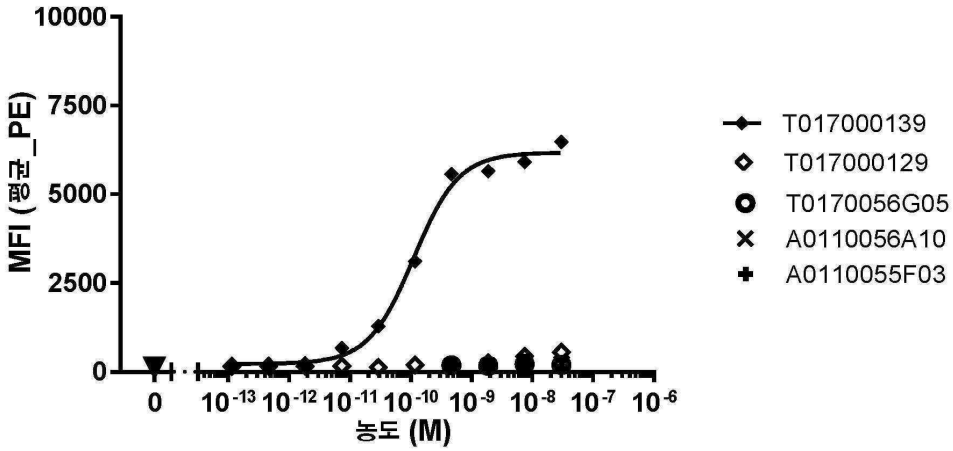
도면27



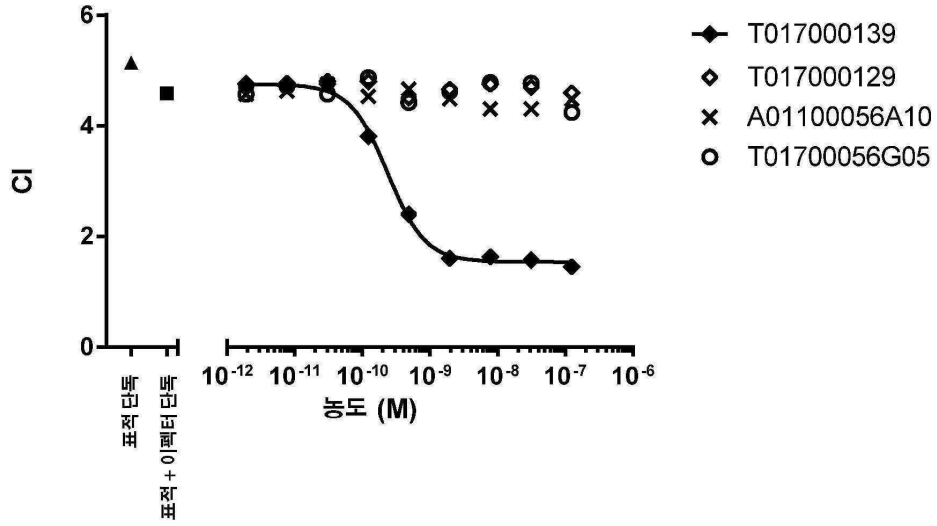
도면28



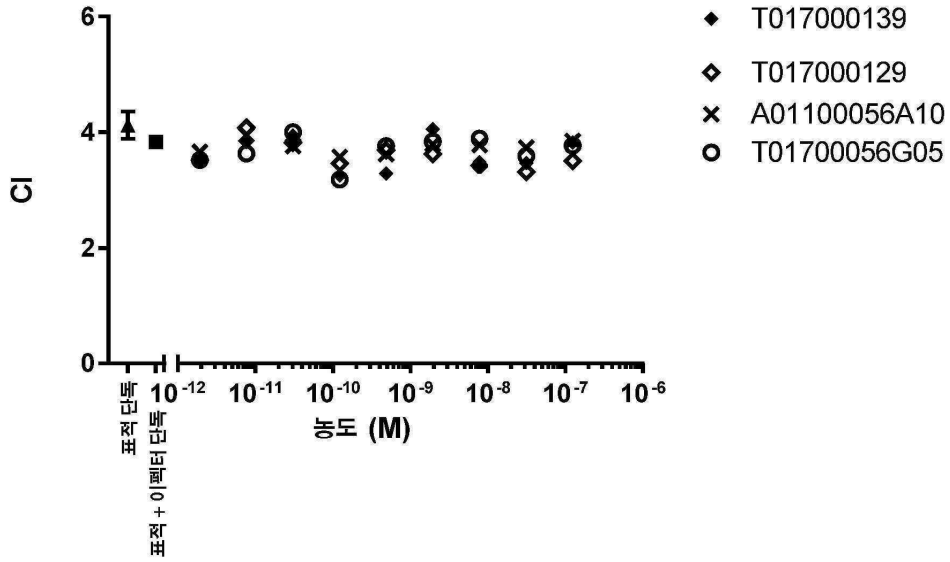
도면29


10000
7500
5000
2500
0
MFI (평균_PE)
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
T0170056G05
A0110056A10
A0110055F03

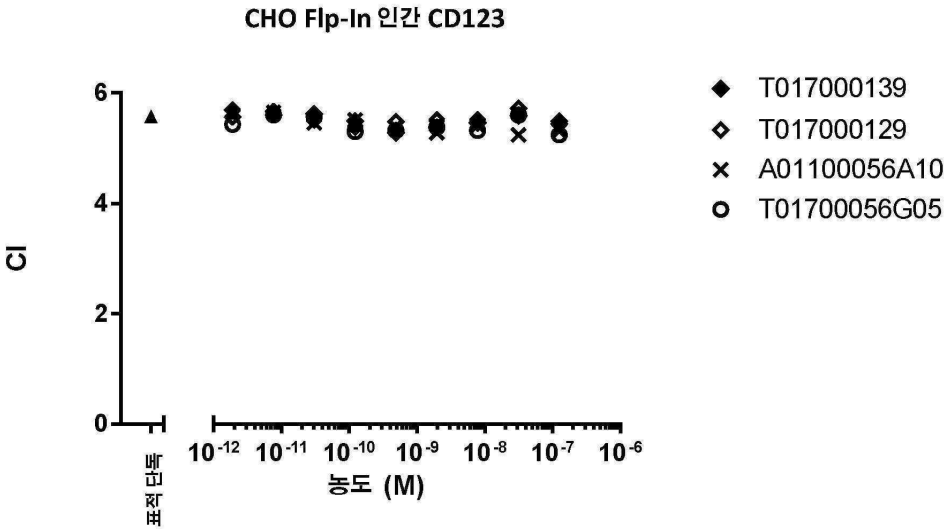
도면30


6
4
2
0
CI
표적 단독
표적 + 이펙터 단독
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
A01100056A10
T01700056G05

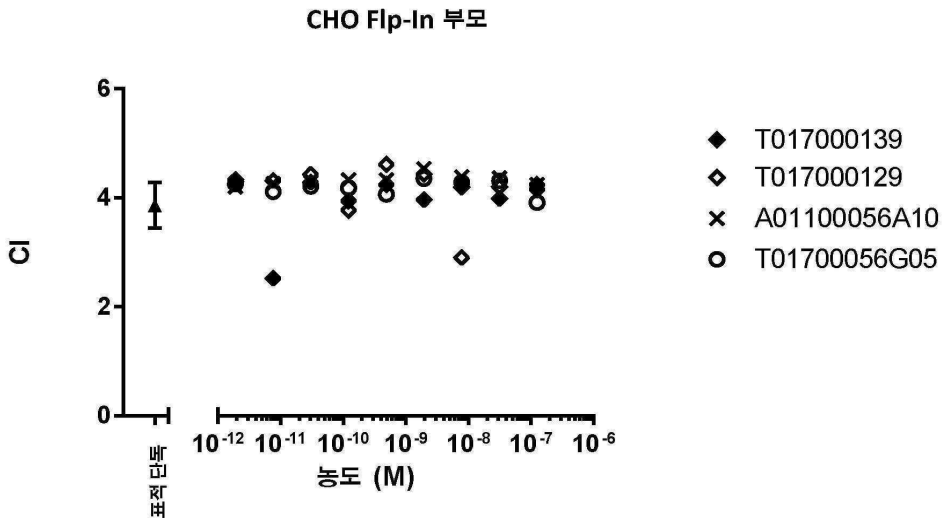
도면31


CI
6
4
2
0
표적 단독
표적 + 이펙터 단독
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
A01100056A10
T01700056G05

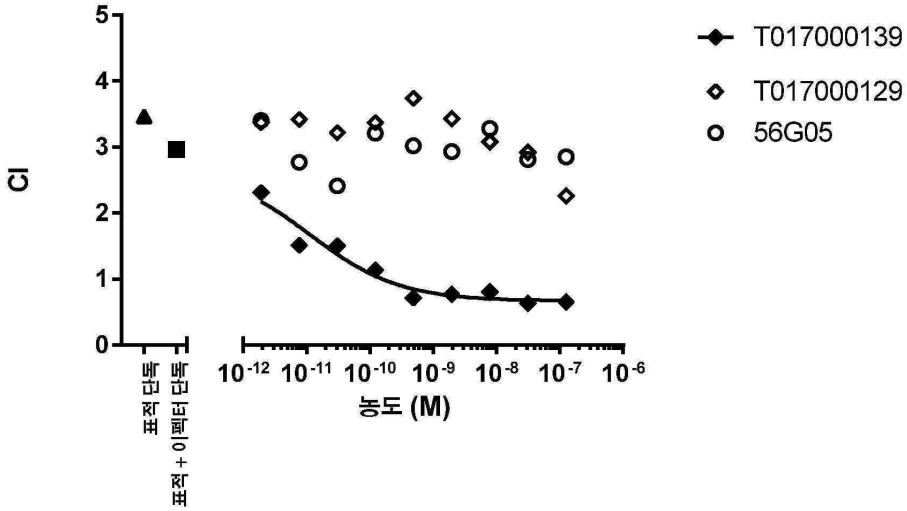
도면32a


CHO Flp-In 인간 CD123
CI
6
4
2
0
표적 단독
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
A01100056A10
T01700056G05

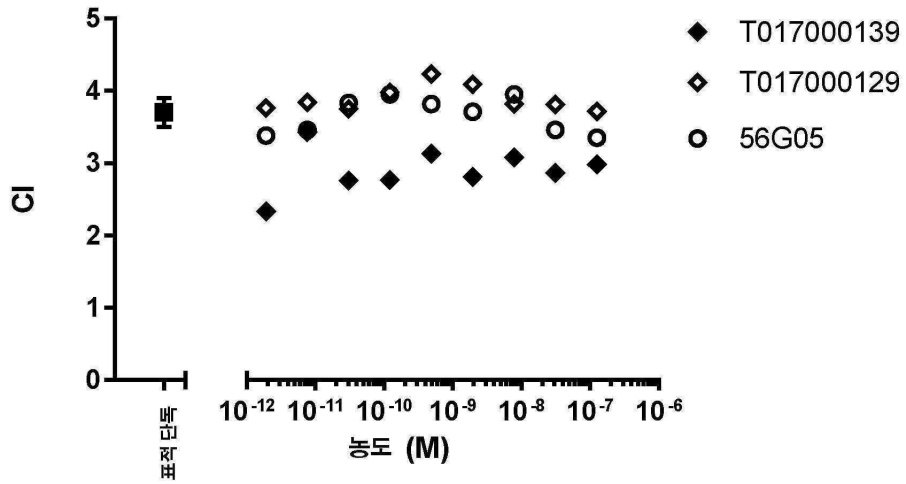
도면32b


CHO Flp-In 부모
CI
6
4
2
0
표적 단독
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
A01100056A10
T01700056G05

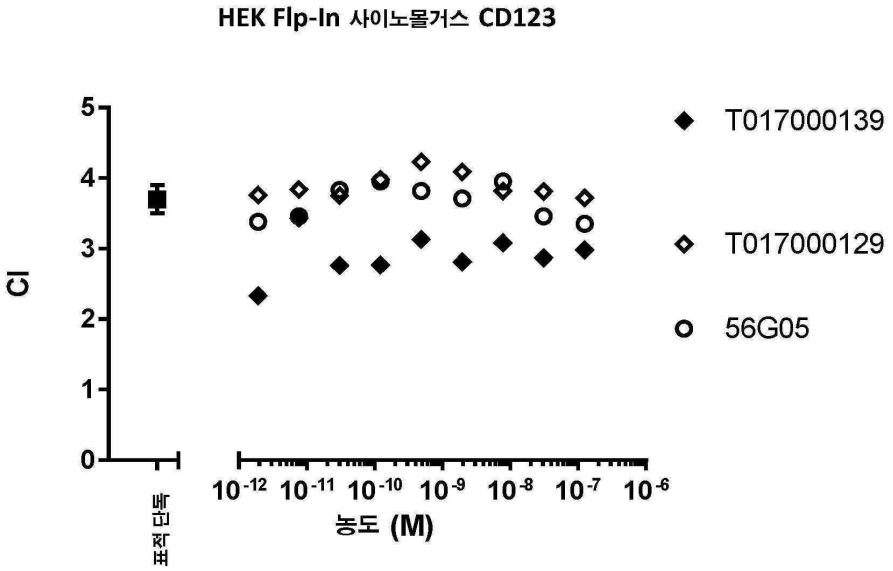
도면33


CI
5
4
3
2
1
0
표적 단독
표적 + 이펙터 단독
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
56G05

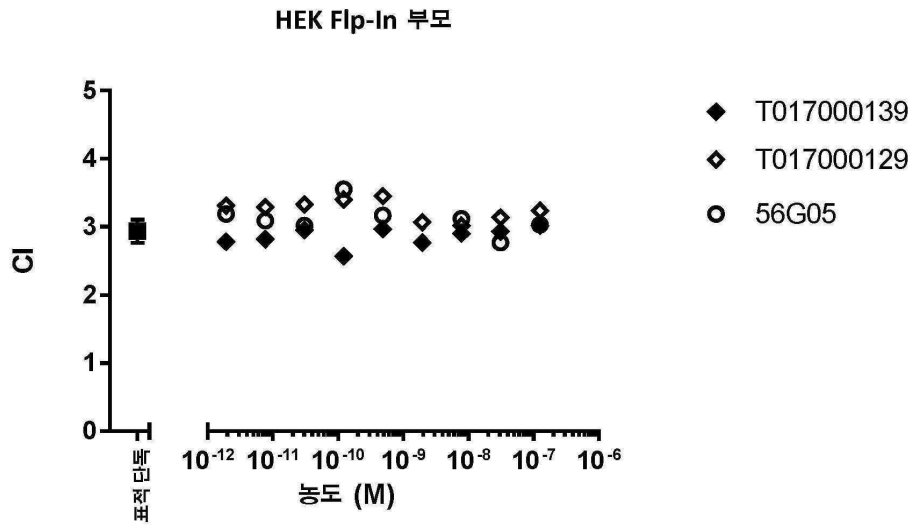
도면34


CI
5
4
3
2
1
0
표적 단독
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
56G05

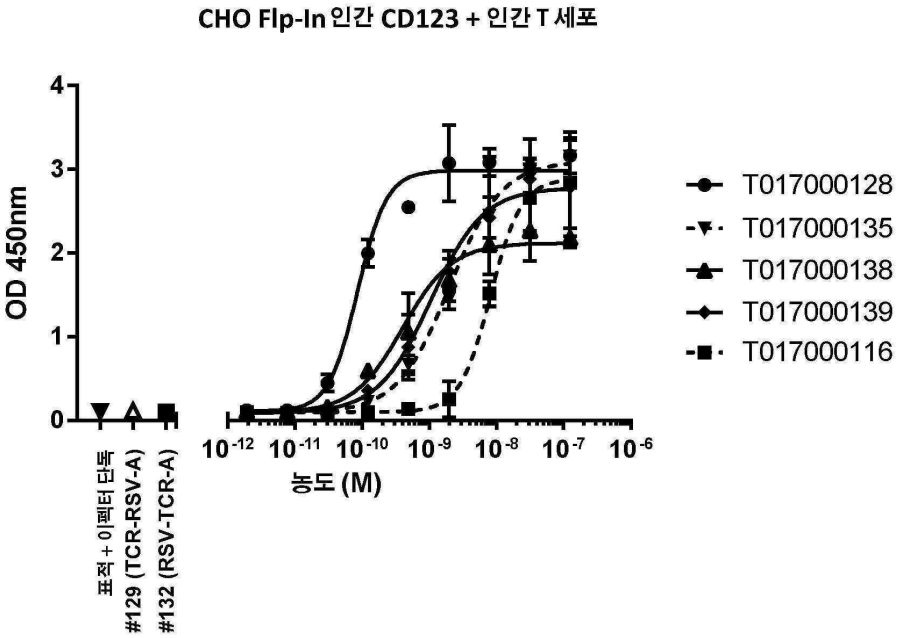
도면35a


HEK Flp-In 사이노몰거스 CD123
CI
5
4
3
2
1
0
표적 단독
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
56G05

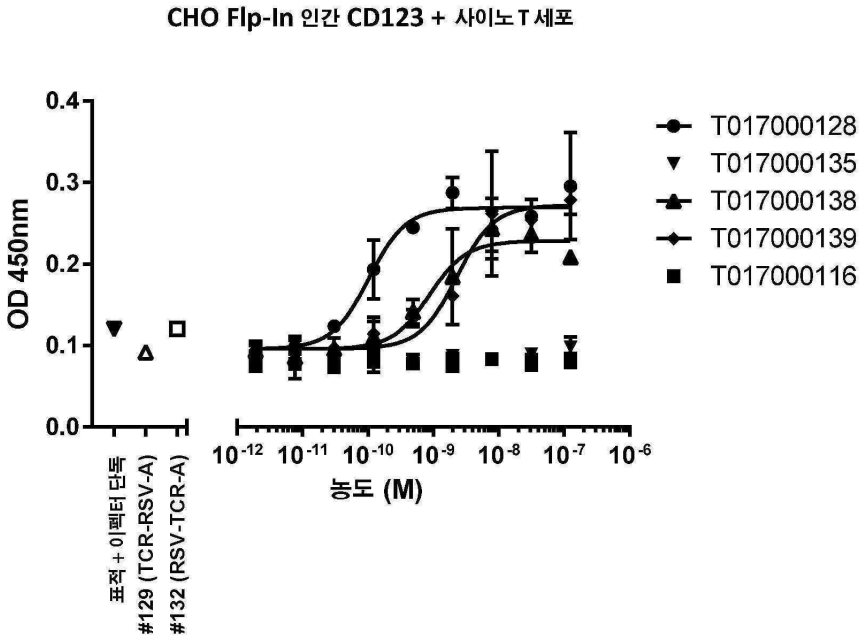
도면35b


HEK Flp-In 부모
CI
5
4
3
2
1
0
표적 단독
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
56G05

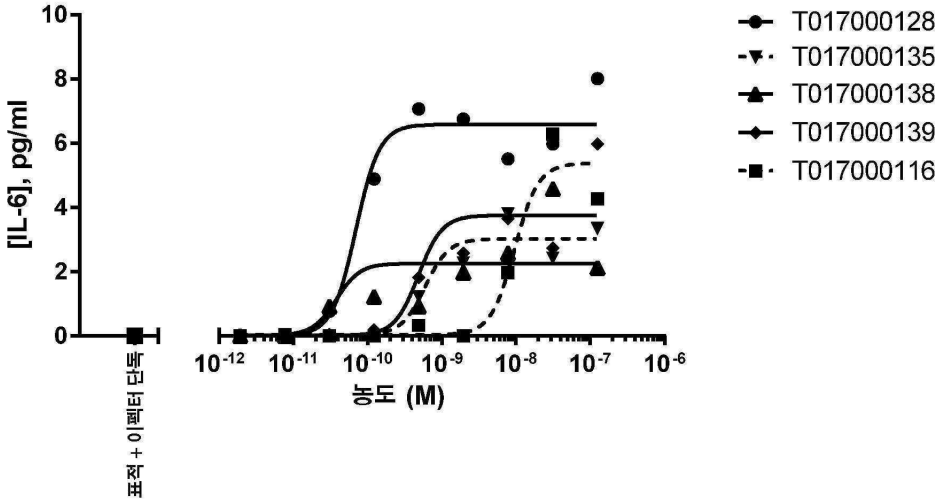
도면36a


CHO Flp-In 인간 CD123 + 인간 T 세포
OD 450nm
4
3
2
1
0
표적 + 이펙터 단독
#129 (TCR-RSV-A)
#132 (RSV-TCR-A)
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000128
T017000135
T017000138
T017000139
T017000116

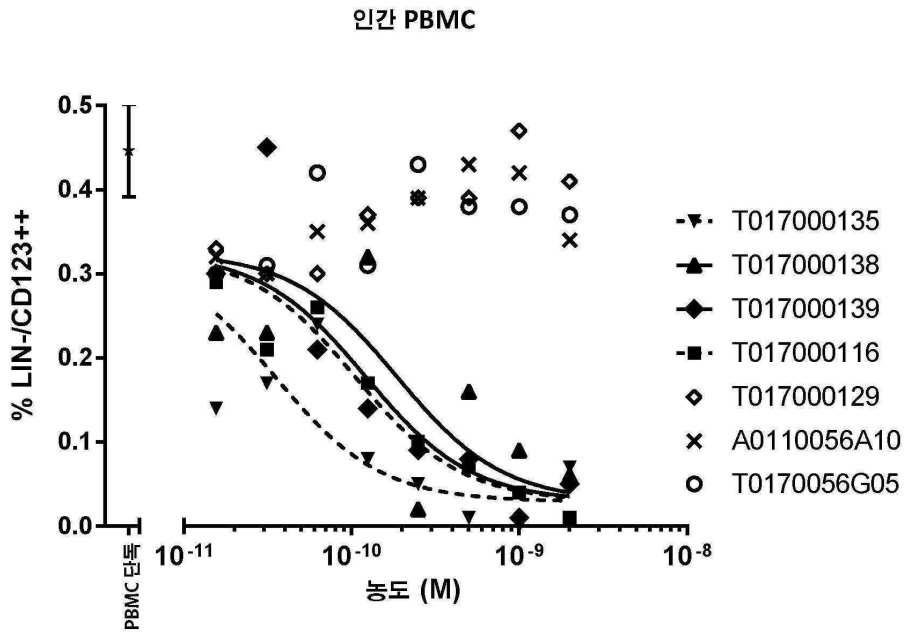
도면36b


CHO Flp-In 인간 CD123 + 사이노T세포
OD 450nm
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
표적 + 이펙터 단독
#129 (TCR-RSV-A)
#132 (RSV-TCR-A)
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000128
T017000135
T017000138
T017000139
T017000116

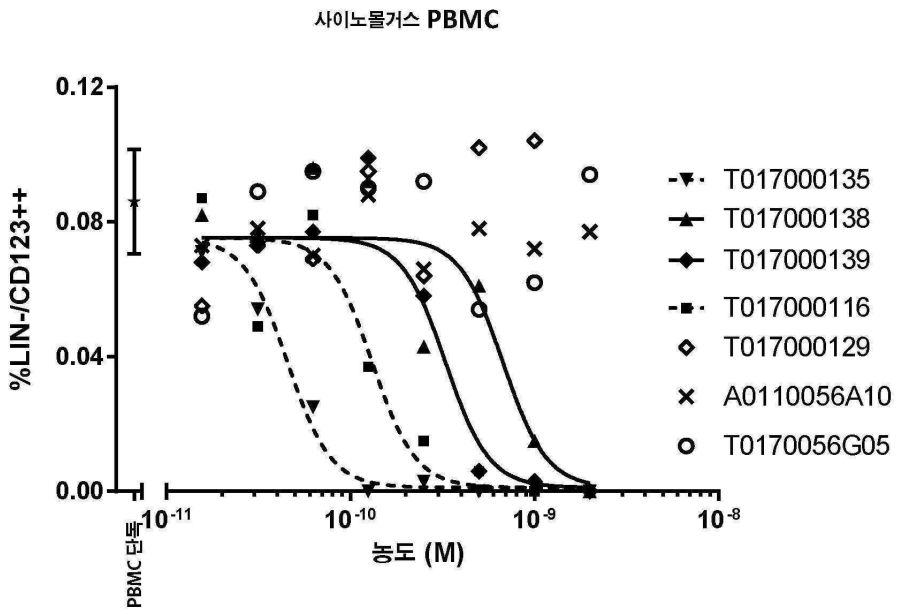
도면37


[IL-6], pg/ml
10
8
6
4
2
0
표적 + 이펙터 단독
10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000128
T017000135
T017000138
T017000139
T017000116

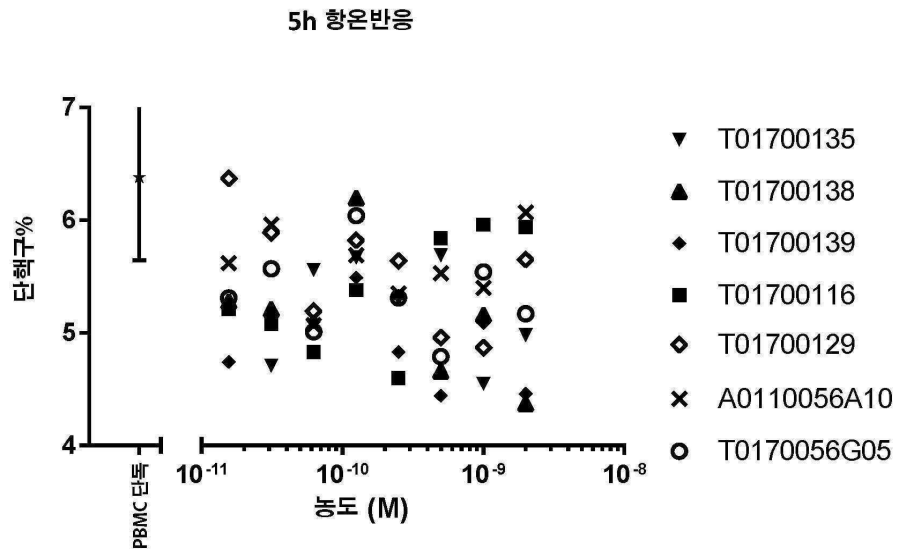
도면38a


인간 PBMC
% LIN-/CD123++
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
PBMC 단독
10-11
10-10
10-9
10-8
농도 (M)
T017000135
T017000138
T017000139
T017000116
T017000129
A0110056A10
T0170056G05

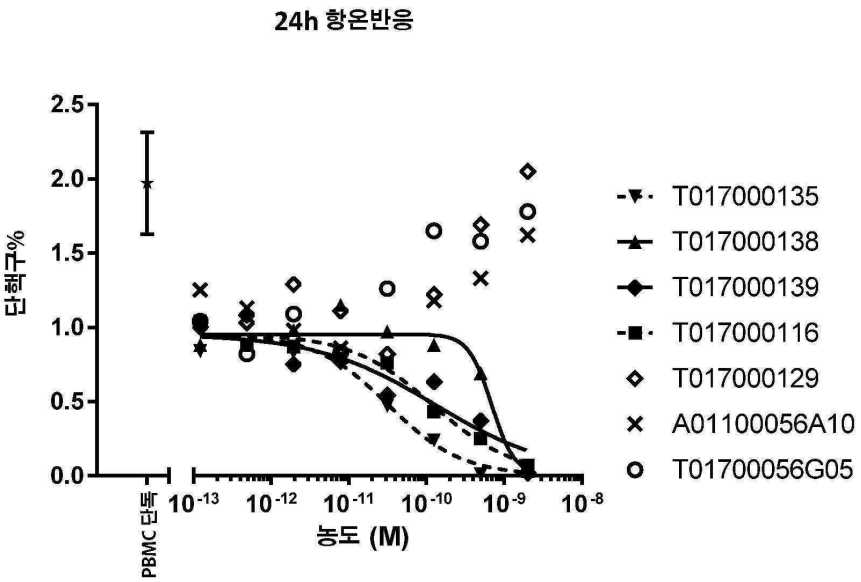
도면38b


사이노몰거스 PBMC
%LIN-/CD123++
0.12
0.08
0.04
0.00
PBMC 단독
10-11
10-10
10-9
10-8
농도 (M)
T017000135
T017000138
T017000139
T017000116
T017000129
A0110056A10
T0170056G05

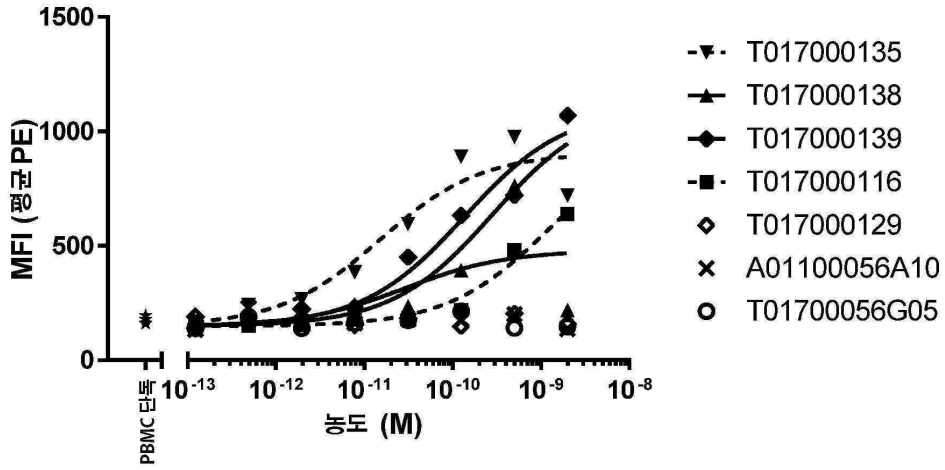
도면39a


5h 항온반응
단핵구%
7
6
5
4
PBMC 단독
10-11
10-10
10-9
10-8
농도 (M)
T01700135
T01700138
T01700139
T01700116
T01700129
A0110056A10
T0170056G05

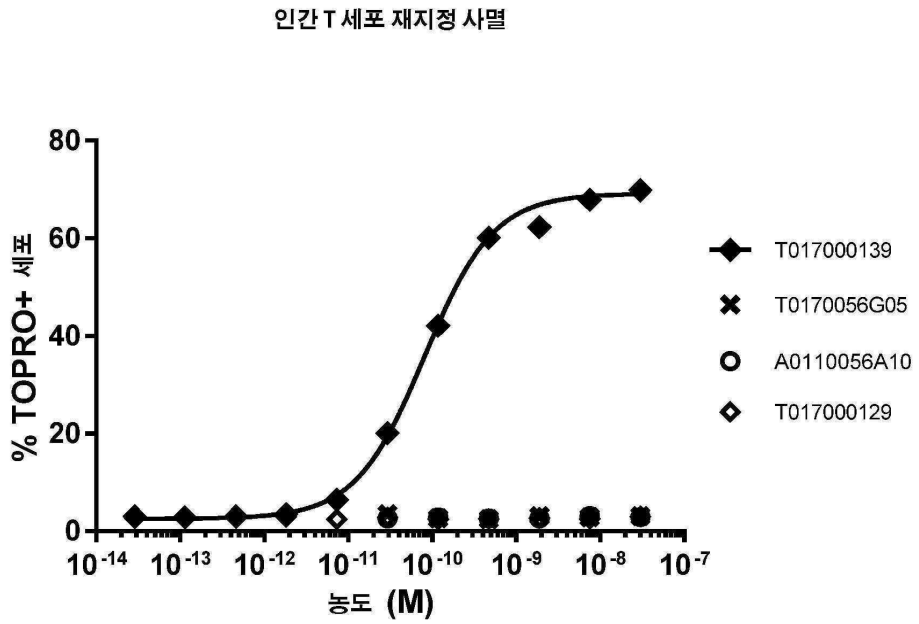
도면39b


24h 항온반응
단핵구%
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PBMC 단독
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
농도 (M)
T017000135
T017000138
T017000139
T017000116
T017000129
A01100056A10
T01700056G05

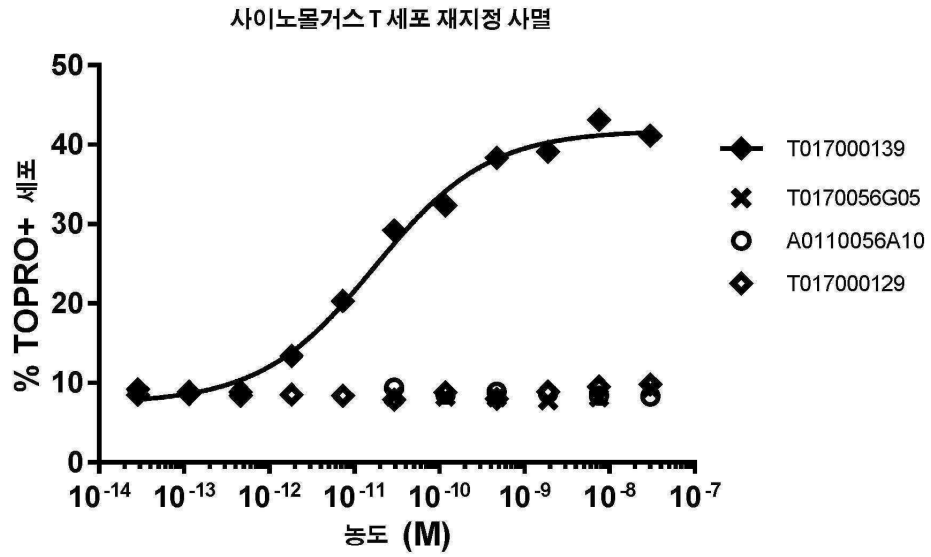
도면40


1500
1000
500
0
MFI (평균 PE)
PBMC 단독
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
농도 (M)
T017000135
T017000138
T017000139
T017000116
T017000129
A01100056A10
T01700056G05

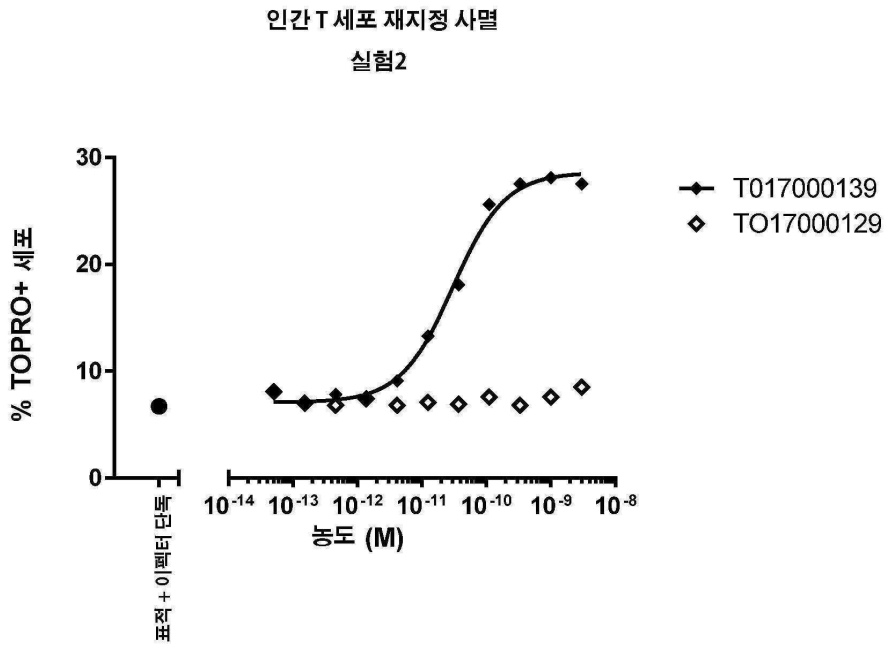
도면41a


인간 T 세포 재지정 사멸
80
60
40
20
0
% TOPRO+ 세포
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
T017000139
T0170056G05
A0110056A10
T017000129

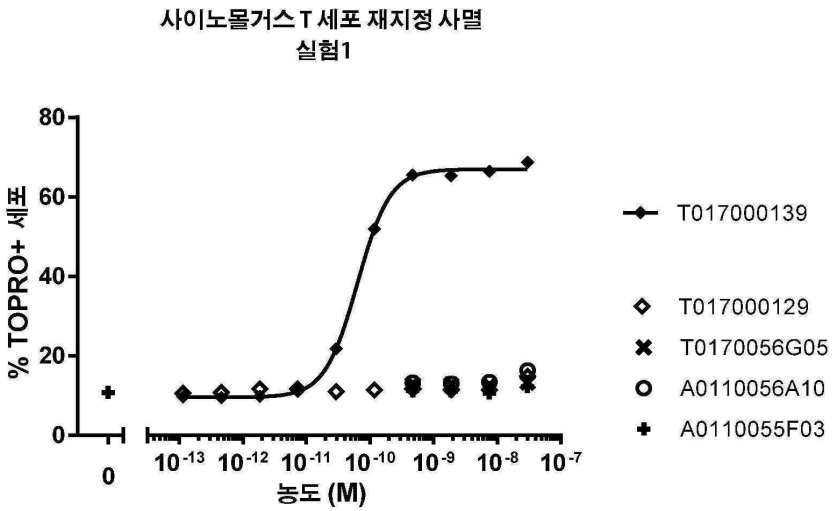
도면41b


사이노몰거스 T 세포 재지정 사멸
% TOPRO+ 세포
50
40
30
20
10
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
T017000139
T0170056G05
A0110056A10
T017000129

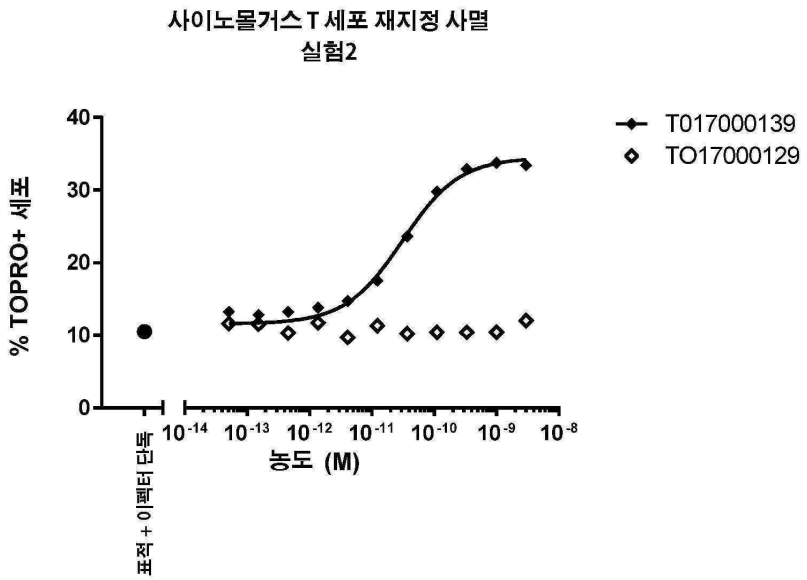
도면42a


인간 T 세포 재지정 사멸
실험2
% TOPRO+ 세포
30
20
10
0
표적 + 이펙터 단독
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
농도 (M)
T017000139
TO17000129

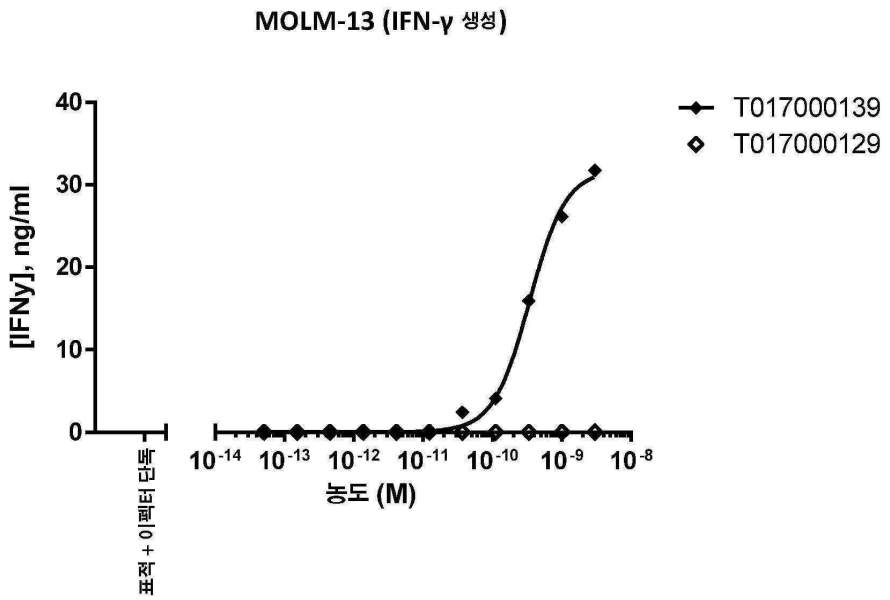
도면42b


사이노몰거스 T 세포 재지정 사멸
실험1
% TOPRO+ 세포
80
60
40
20
0
0
10^{-13} 10^{-12} 10^{-11} 10^{-10} 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7}
농도 (M)
T017000139
T017000129
T0170056G05
A0110056A10
A0110055F03

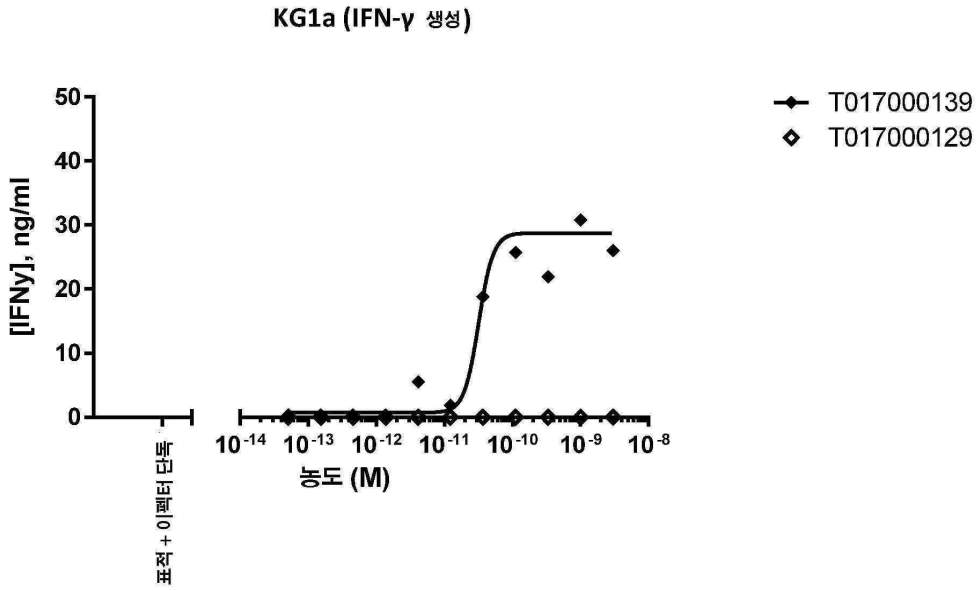
도면42c


사이노몰거스 T 세포 재지정 사멸
실험2
% TOPRO+ 세포
40
30
20
10
0
표적 + 이펙터 단독
10^{-14} 10^{-13} 10^{-12} 10^{-11} 10^{-10} 10^{-9} 10^{-8}
농도 (M)
T017000139
TO17000129

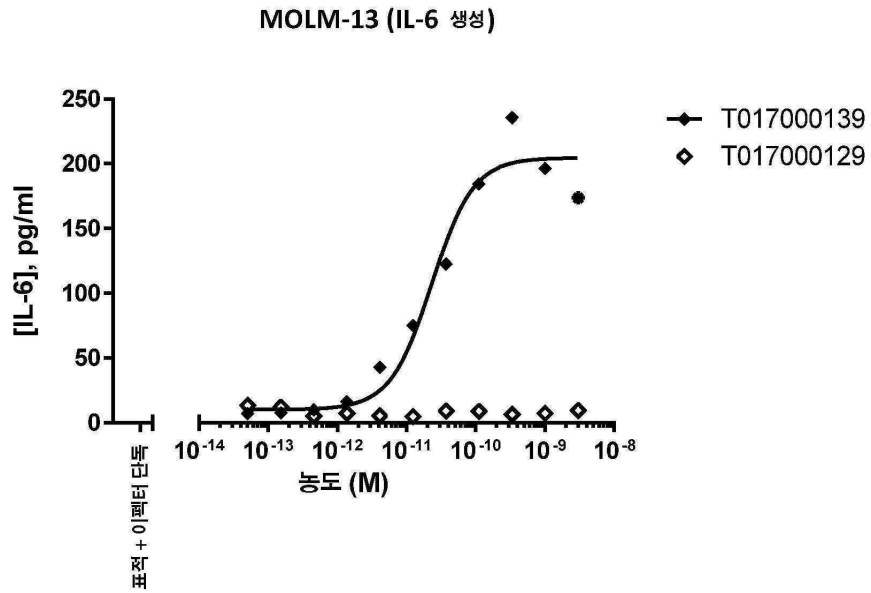
도면43a


MOLM-13 (IFN-γ 생성)
T017000139
T017000129
[IFNγ], ng/ml
40
30
20
10
0
표적 + 이펙터 단독
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
농도 (M)

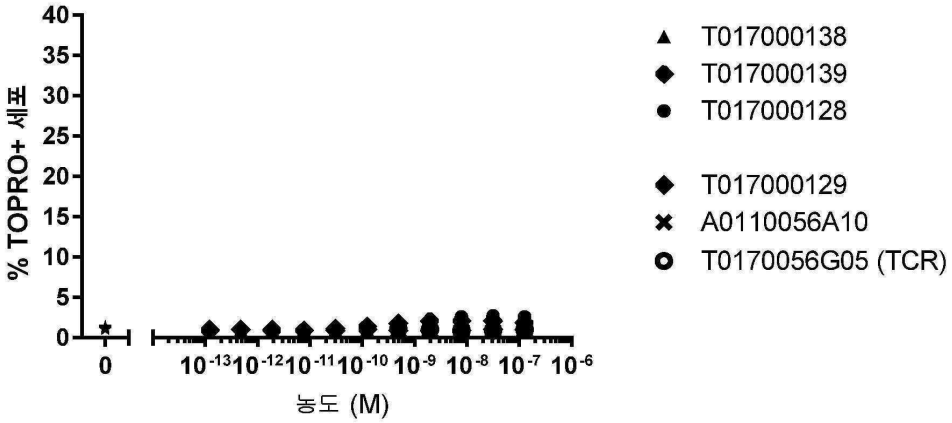
도면43b


KG1a (IFN-γ 생성)
T017000139
T017000129
[IFNγ], ng/ml
50
40
30
20
10
0
표적 + 이펙터 단독
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
농도 (M)

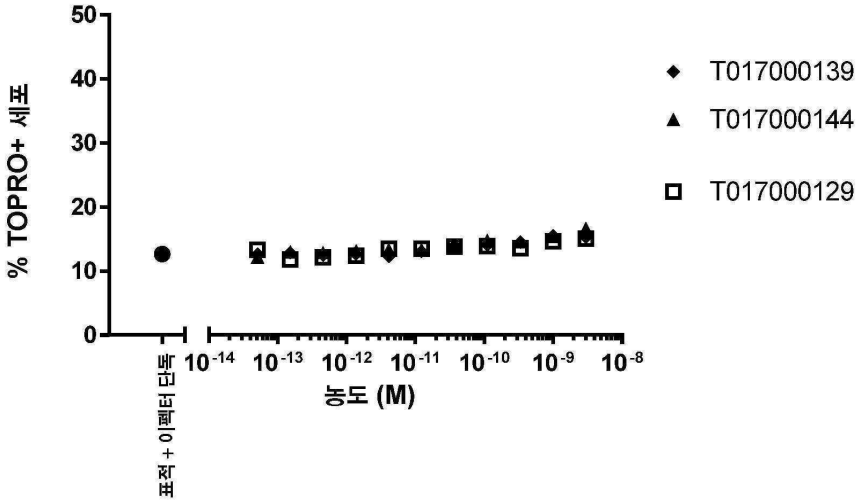
도면43c



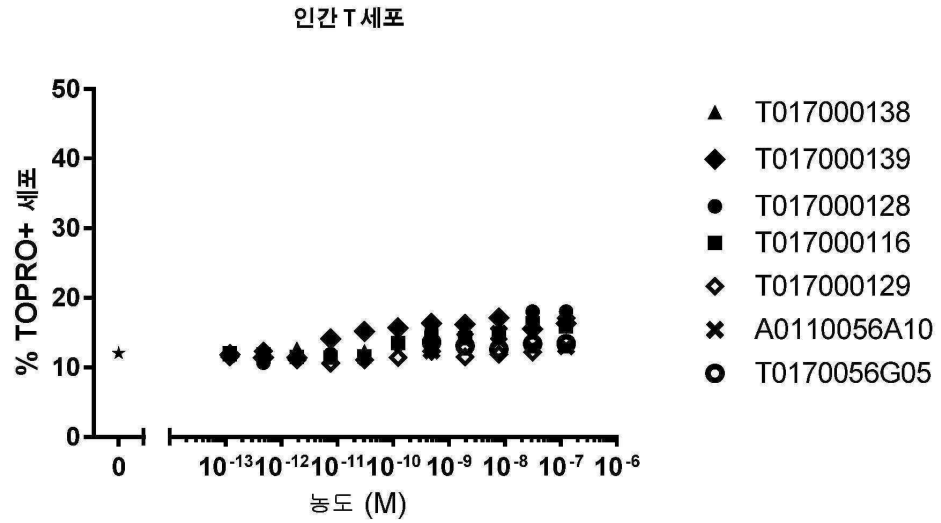
도면44a



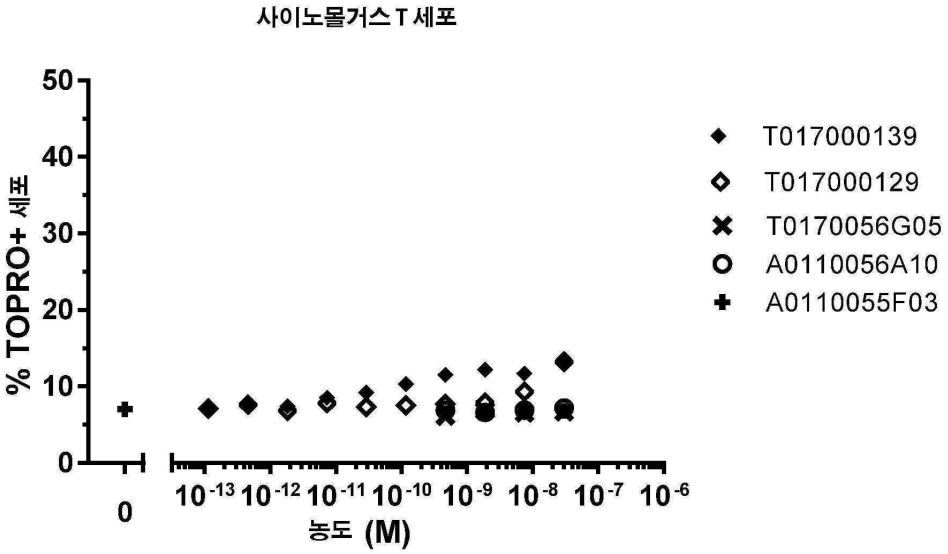
도면44b



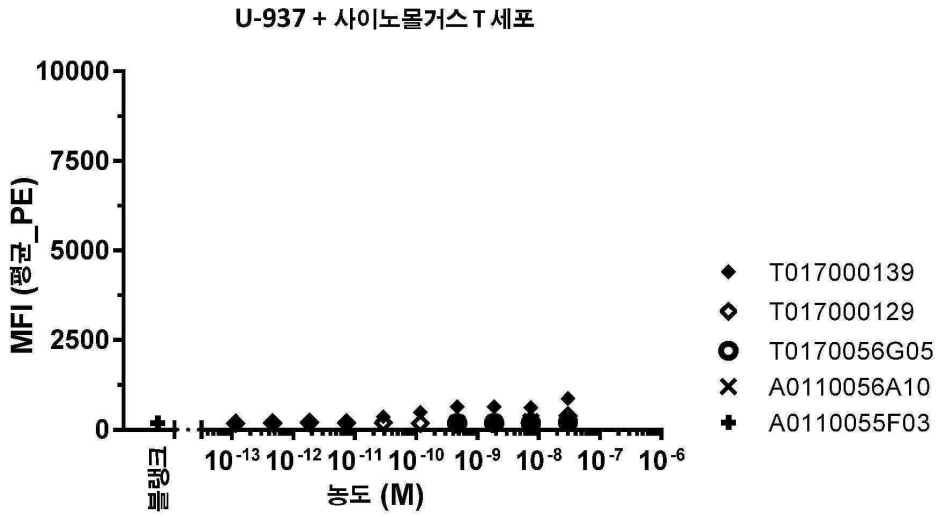
도면45a


인간 T 세포
% TOPRO+ 세포
50
40
30
20
10
0
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000138
T017000139
T017000128
T017000116
T017000129
A0110056A10
T0170056G05

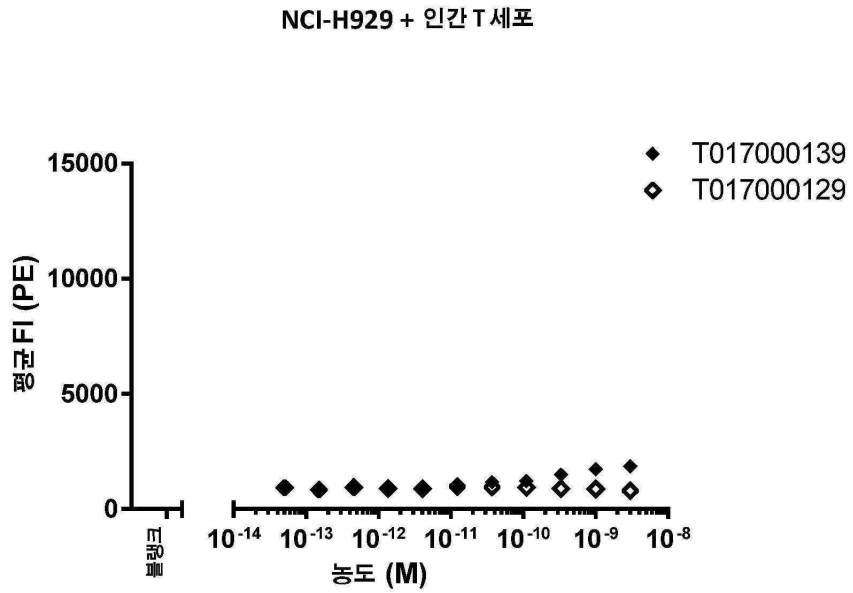
도면45b


사이노몰거스 T 세포
% TOPRO+ 세포
50
40
30
20
10
0
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
T0170056G05
A0110056A10
A0110055F03

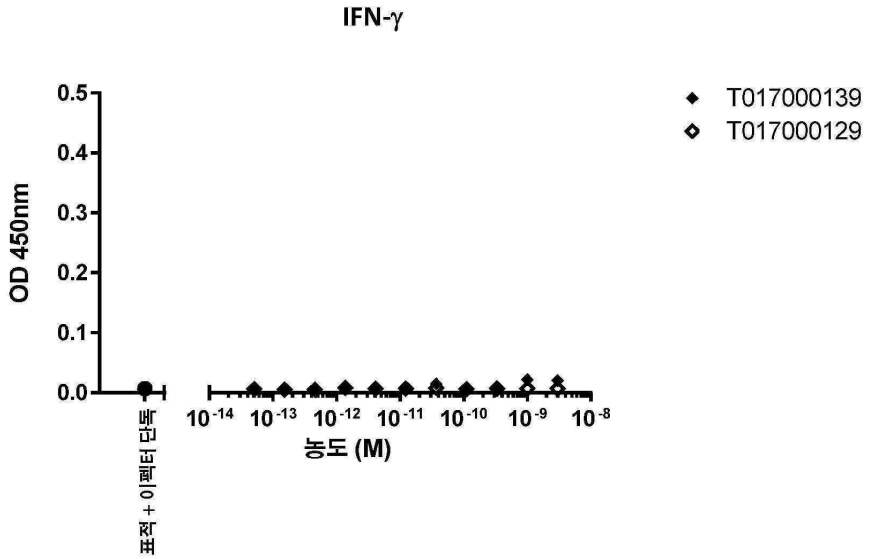
도면46a


U-937 + 사이노몰거스 T 세포
MFI (평균_PE)
10000
7500
5000
2500
0
더블릴
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000139
T017000129
T0170056G05
A0110056A10
A0110055F03

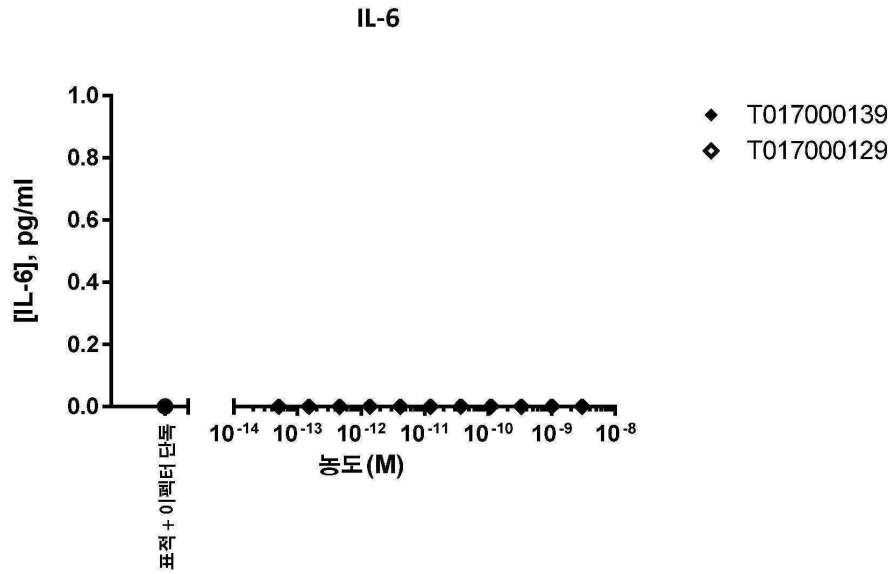
도면46b


NCI-H929 + 인간 T 세포
평균 FI (PE)
15000
10000
5000
0
더블릴
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
농도 (M)
T017000139
T017000129

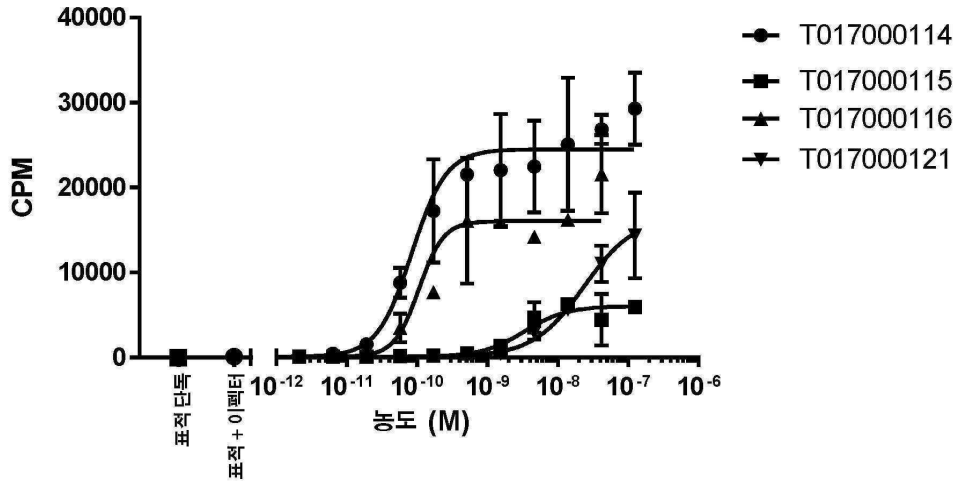
도면47a


IFN-γ
OD 450nm
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
T017000139
T017000129
표적 + 이펙터 단독
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
농도 (M)

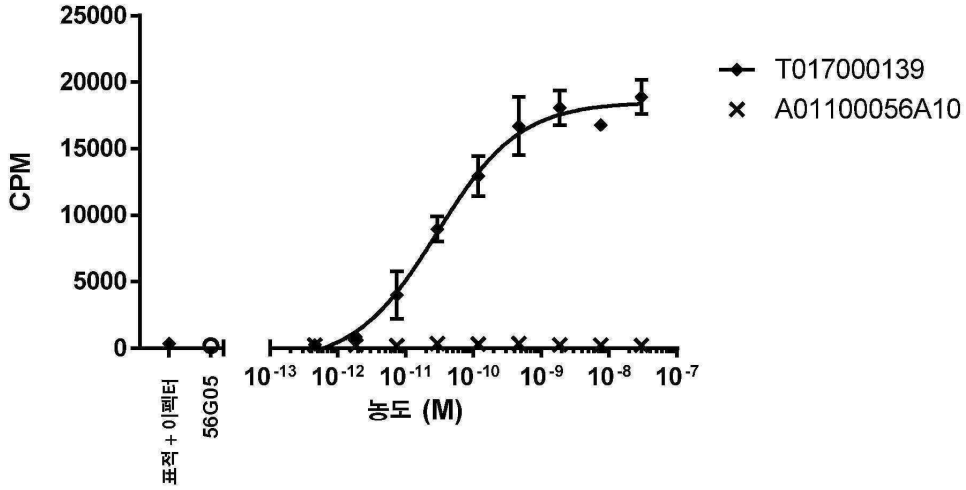
도면47b


IL-6
[IL-6], pg/ml
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
T017000139
T017000129
표적 + 이펙터 단독
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
농도 (M)

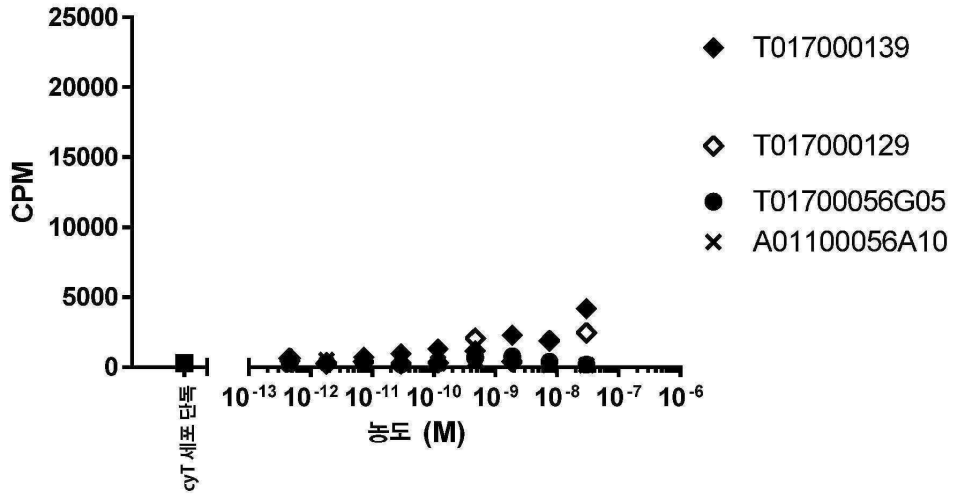
도면48a


40000
30000
20000
10000
0
CPM
표적 단독
표적 + 이펙터
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
농도 (M)
T017000114
T017000115
T017000116
T017000121

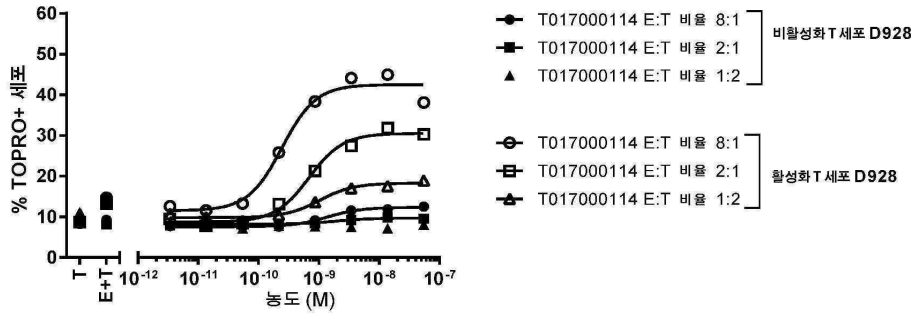
도면48b


25000
20000
15000
10000
5000
0
CPM
표적 + 이펙터
56G05
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
T017000139
A01100056A10

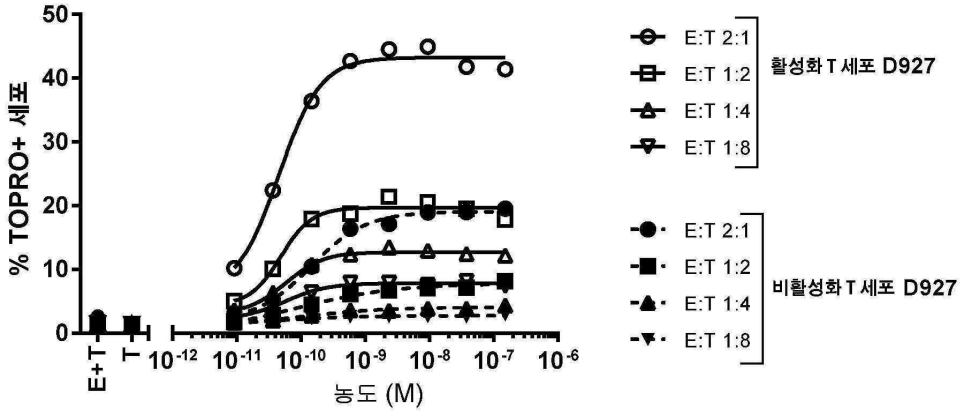
도면49



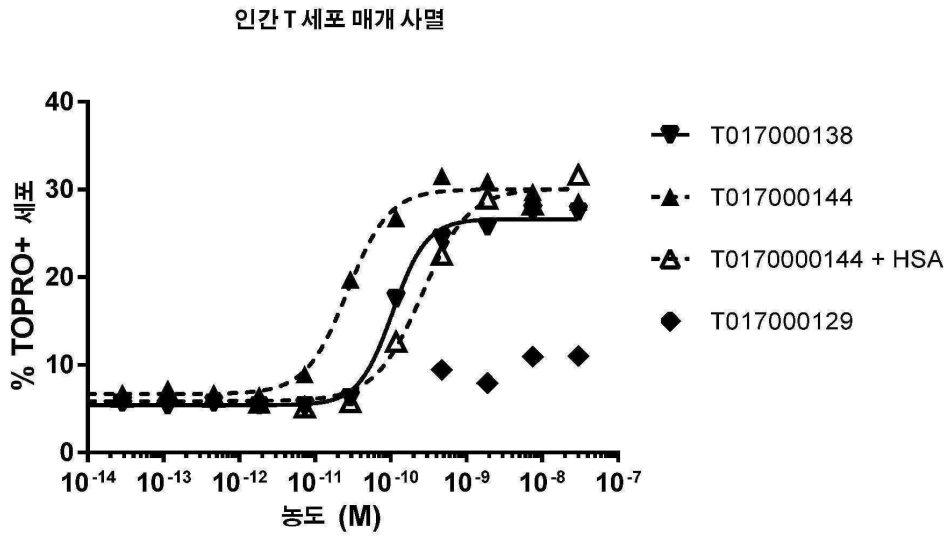
도면50



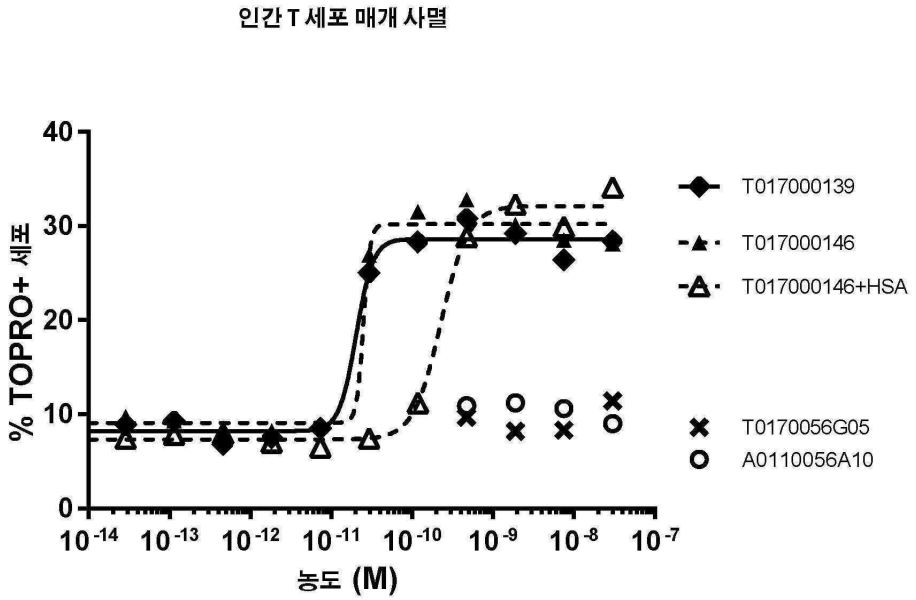
도면51



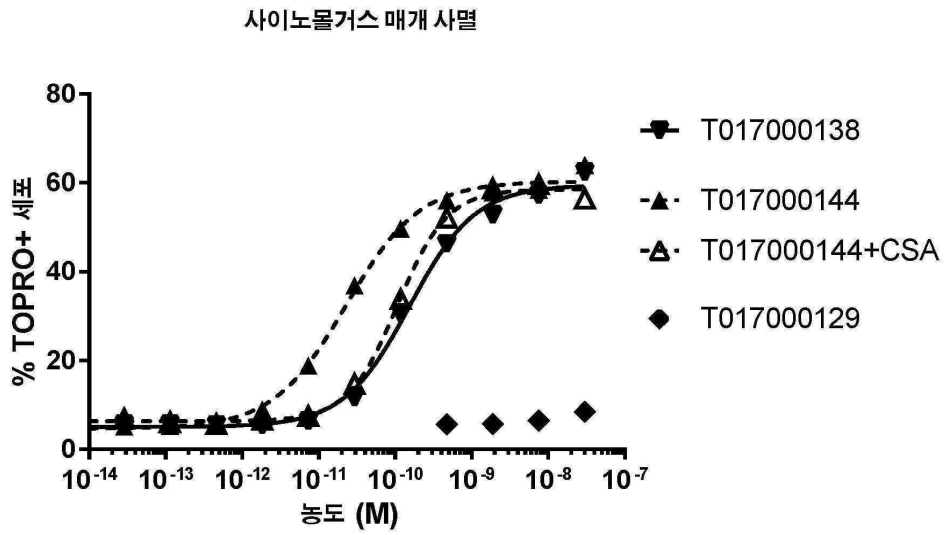
도면52a


인간 T 세포 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
40
30
20
10
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
T017000138
T017000144
T0170000144 + HSA
T017000129

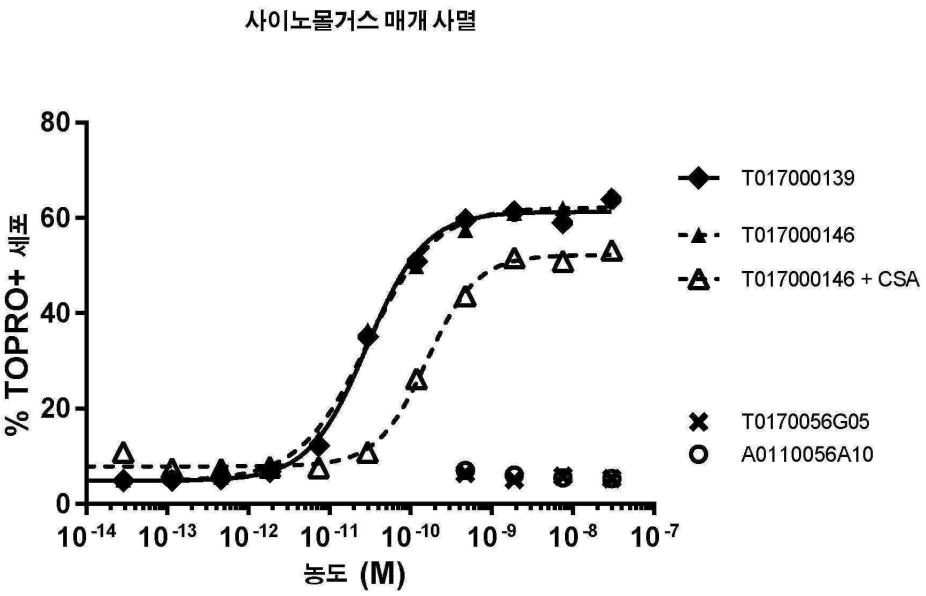
도면52b


인간 T 세포 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
40
30
20
10
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
T017000139
T017000146
T017000146+HSA
T0170056G05
A0110056A10

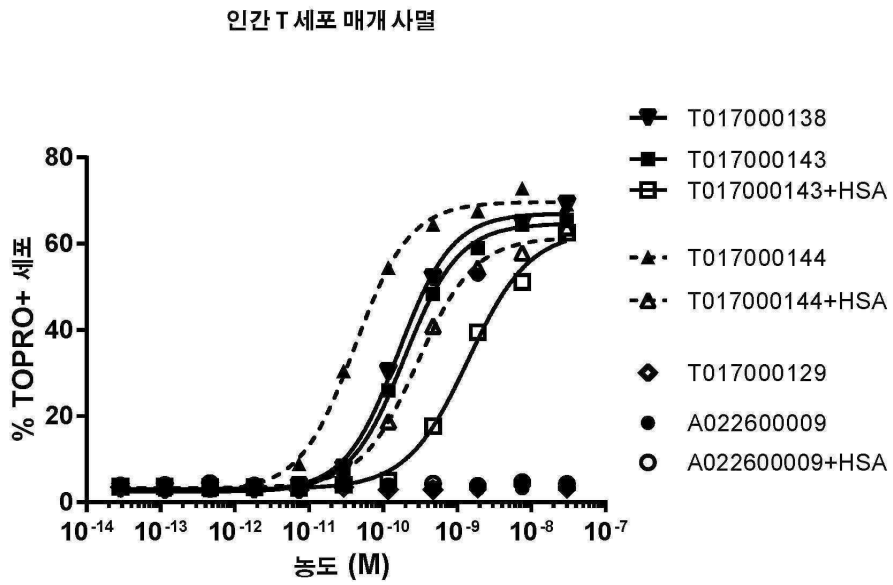
도면52c


사이노몰거스 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
농도 (M)
T017000138
T017000144
T017000144+CSA
T017000129

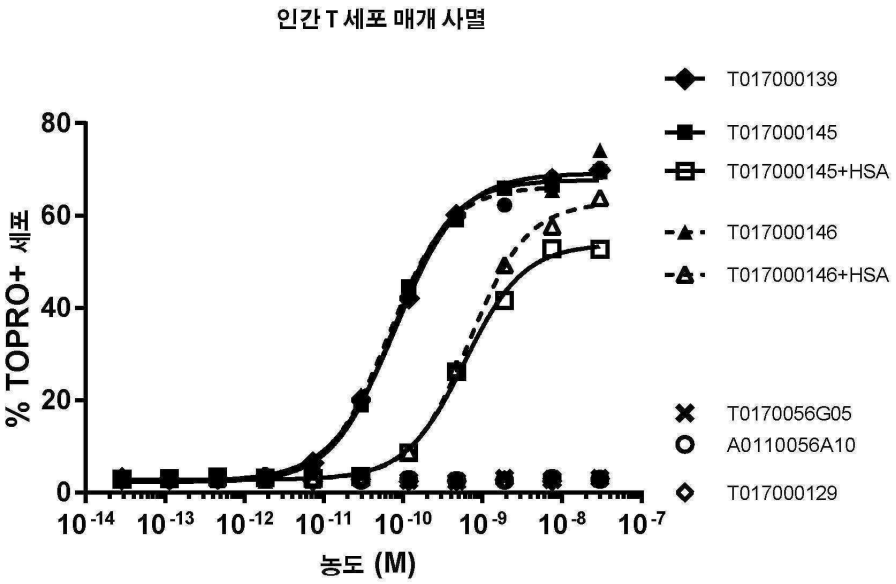
도면52d


사이노몰거스 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
농도 (M)
T017000139
T017000146
T017000146 + CSA
T0170056G05
A0110056A10

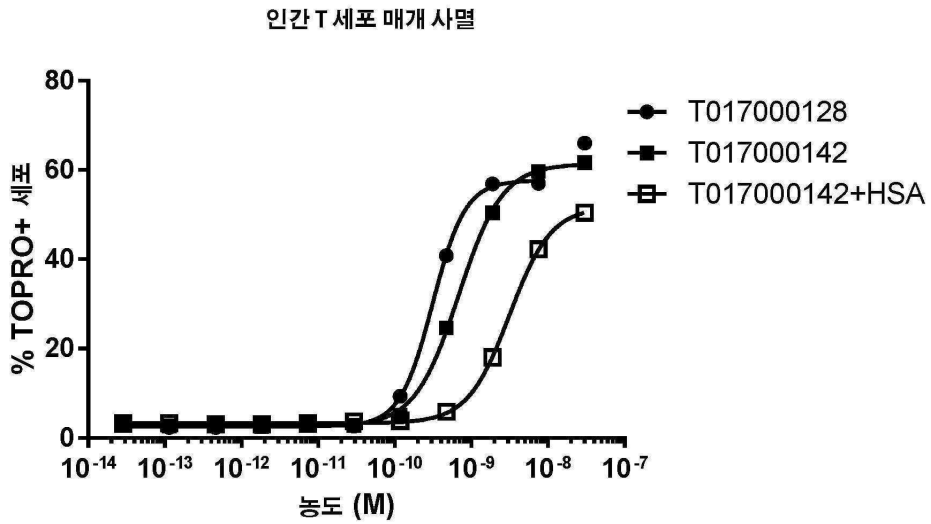
도면53a


인간 T 세포 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
80
60
40
20
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
T017000138
T017000143
T017000143+HSA
T017000144
T017000144+HSA
T017000129
A022600009
A022600009+HSA

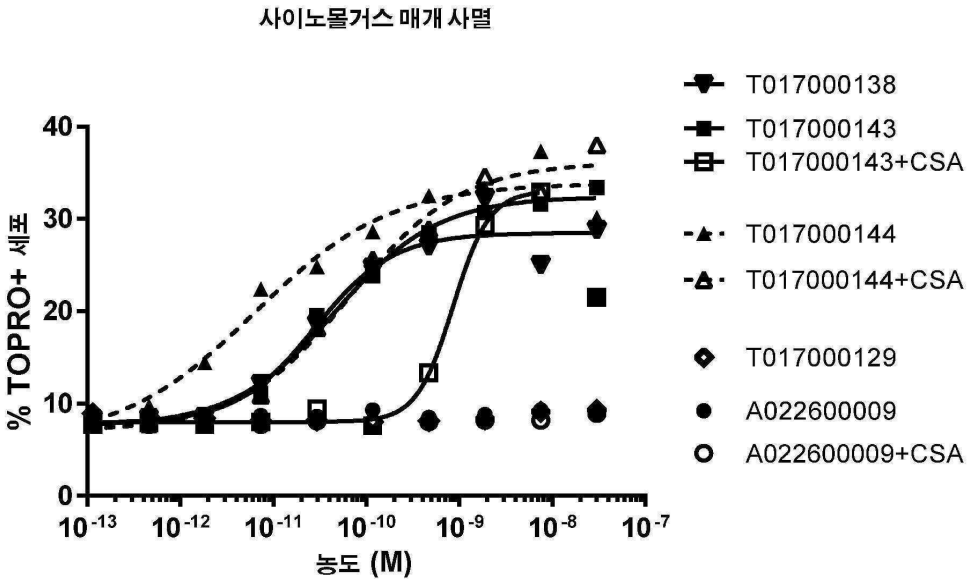
도면53b


인간 T 세포 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
80
60
40
20
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
T017000139
T017000145
T017000145+HSA
T017000146
T017000146+HSA
T0170056G05
A0110056A10
T017000129

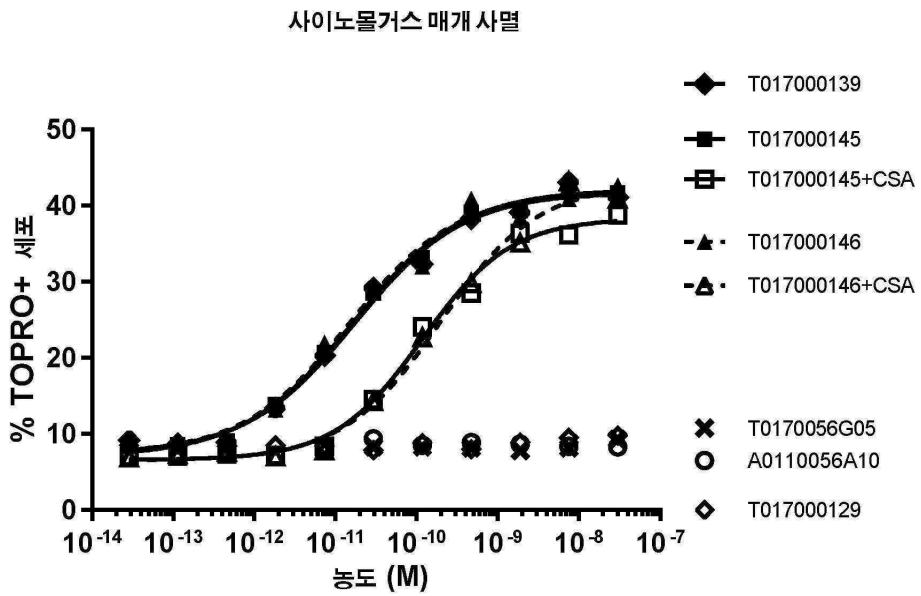
도면53c


인간 T 세포 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
80
60
40
20
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
T017000128
T017000142
T017000142+HSA

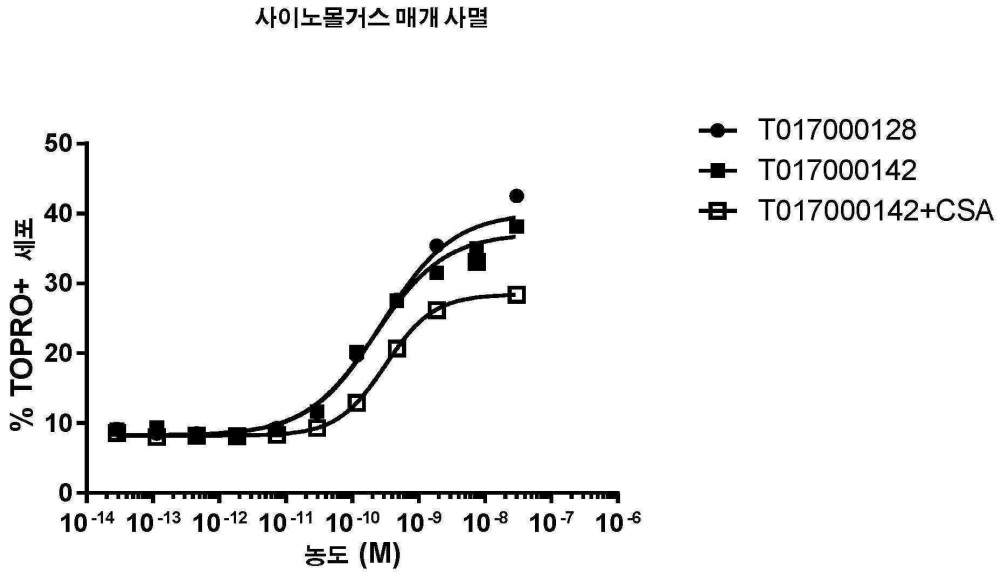
도면53d


사이노몰거스 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
40
30
20
10
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
T017000138
T017000143
T017000143+CSA
T017000144
T017000144+CSA
T017000129
A022600009
A022600009+CSA

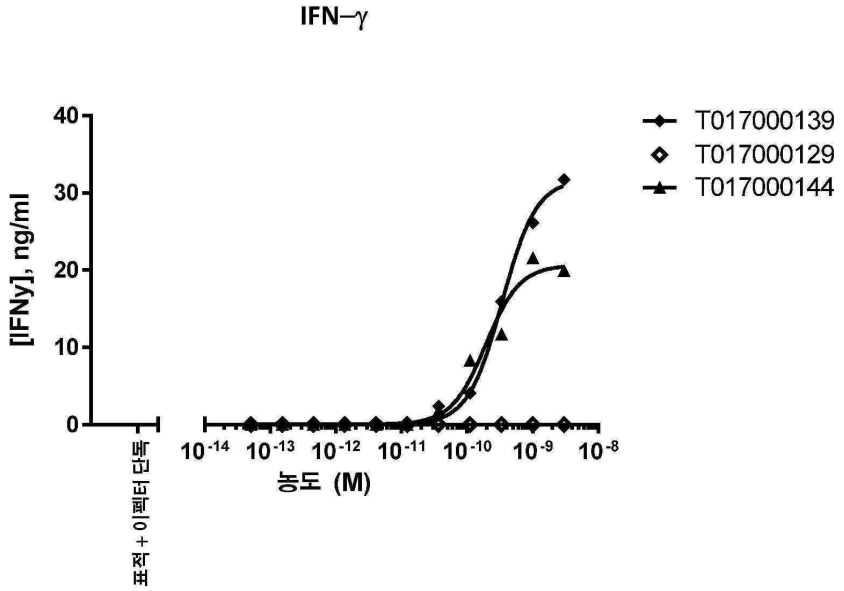
도면53e


사이노몰거스 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
50
40
30
20
10
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
T017000139
T017000145
T017000145+CSA
T017000146
T017000146+CSA
T0170056G05
A0110056A10
T017000129

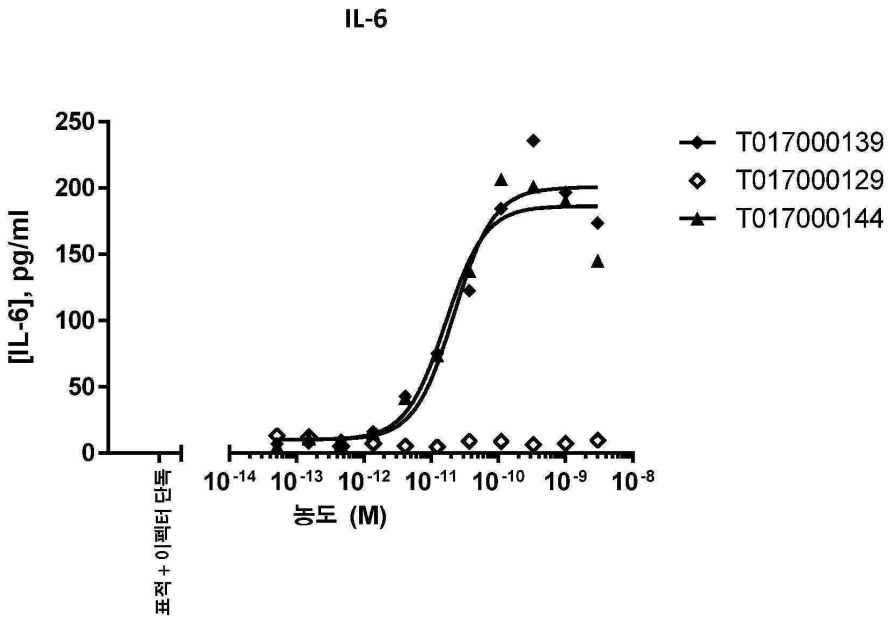
도면53f


사이노몰거스 매개 사멸
% TOPRO+ 세포
50
40
30
20
10
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
농도 (M)
T017000128
T017000142
T017000142+CSA

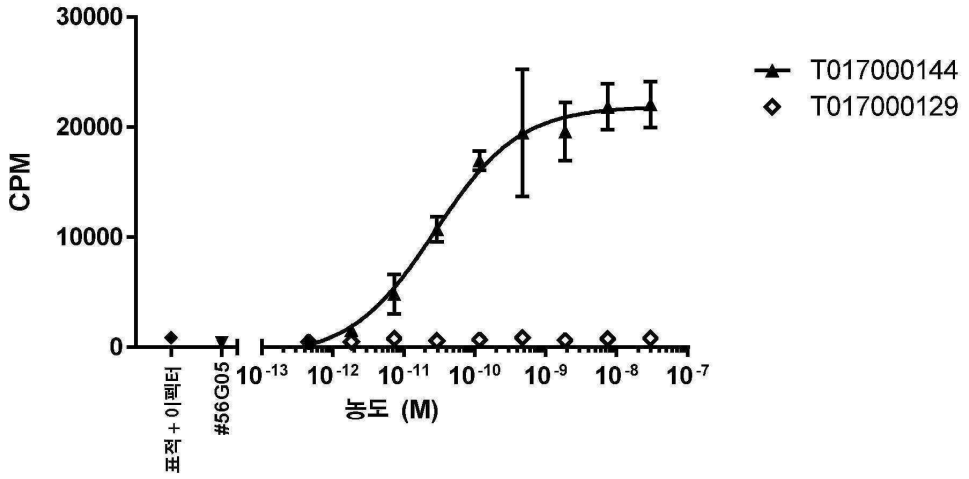
도면54a


IFN-γ
[IFNγ], ng/ml
40
30
20
10
0
표적 + 이펙터 단독
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
농도 (M)
T017000139
T017000129
T017000144

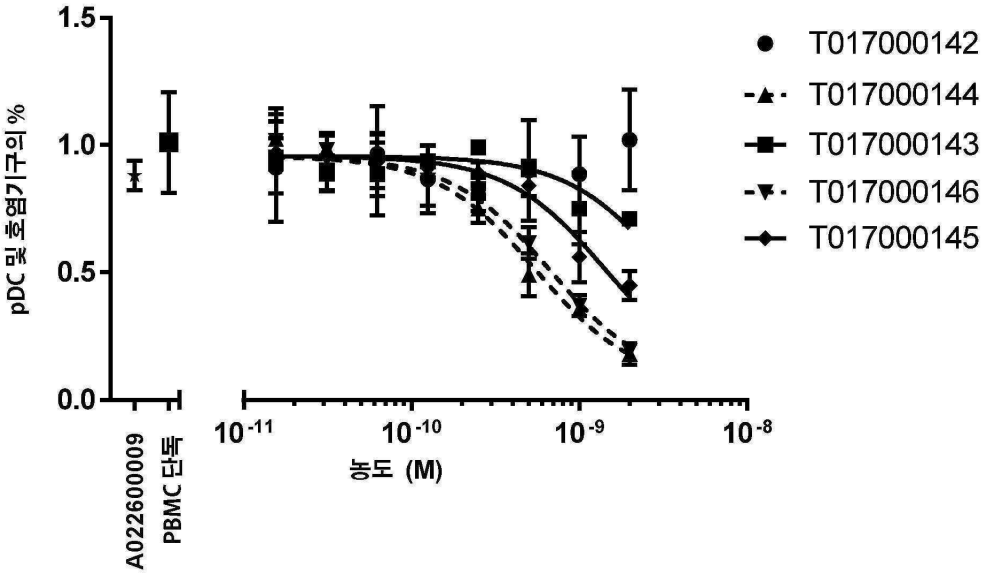
도면54b


IL-6
[IL-6], pg/ml
250
200
150
100
50
0
표적 + 이펙터 단독
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
농도 (M)
T017000139
T017000129
T017000144

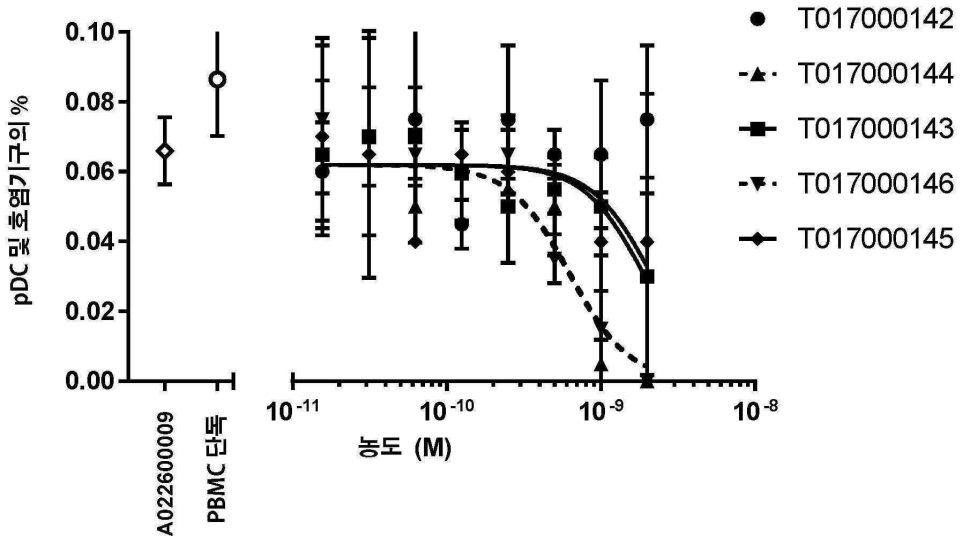
도면55


30000
20000
10000
0
CPM
표적 + 이펙터
#56G05
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
농도 (M)
T017000144
T017000129

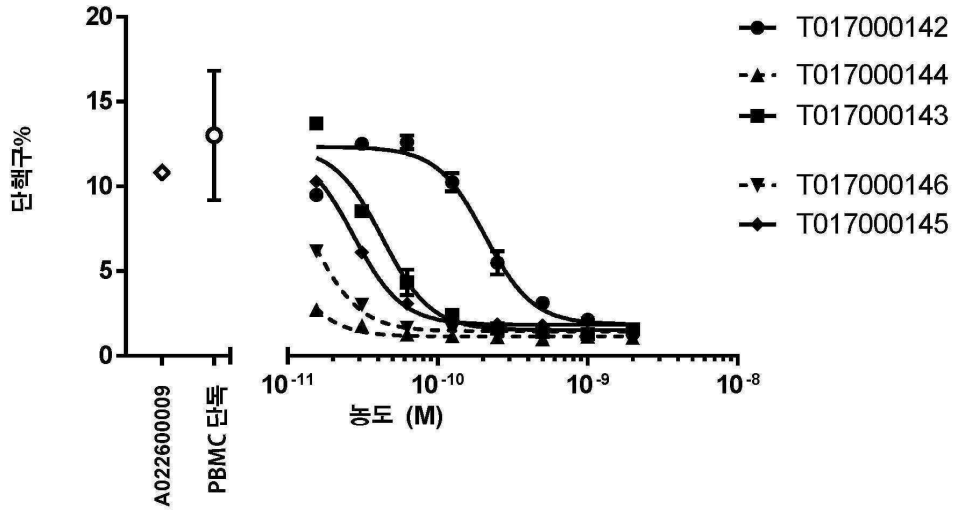
도면56


1.5
1.0
0.5
0.0
pDC 및 호염기구의 %
A022600009
PBMC 단독
10-11
10-10
10-9
10-8
농도 (M)
T017000142
T017000144
T017000143
T017000146
T017000145

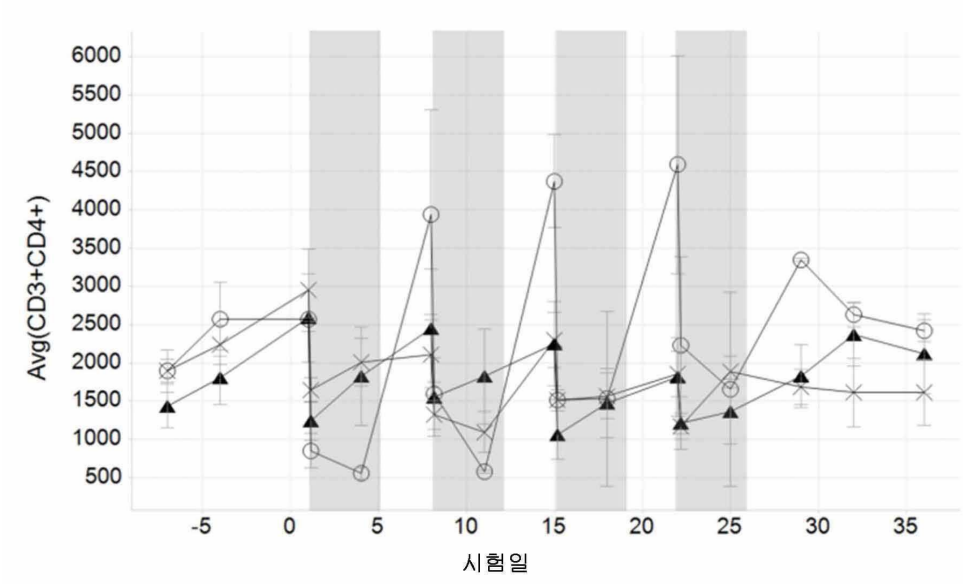
도면57


pDC 및 호염기구의 %
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
A022600009
PBMC 단독
10-11
10-10
10-9
10-8
농도 (M)
T017000142
T017000144
T017000143
T017000146
T017000145

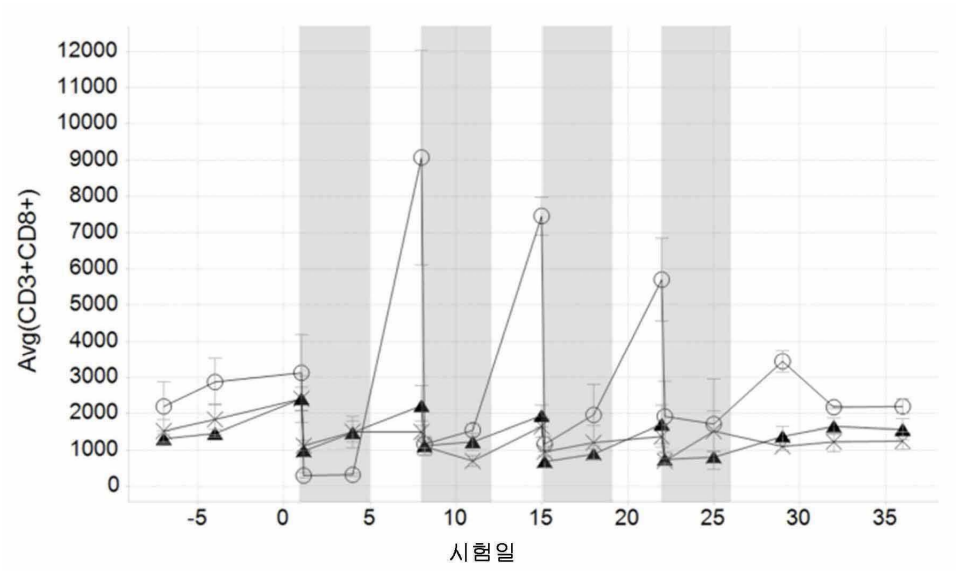
도면58


단핵구%
20
15
10
5
0
A022600009
PBMC 단독
10-11
10-10
10-9
10-8
농도 (M)
T017000142
T017000144
T017000143
T017000146
T017000145

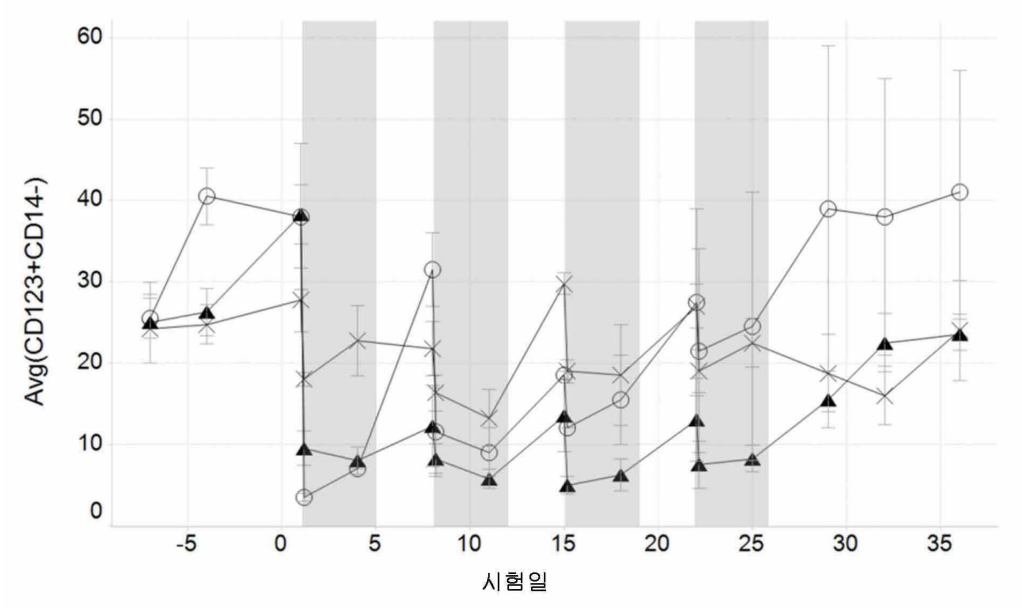
도면59a


Avg(CD3+CD4+)
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
-5
0
5
10
15
20
25
30
35
시험일

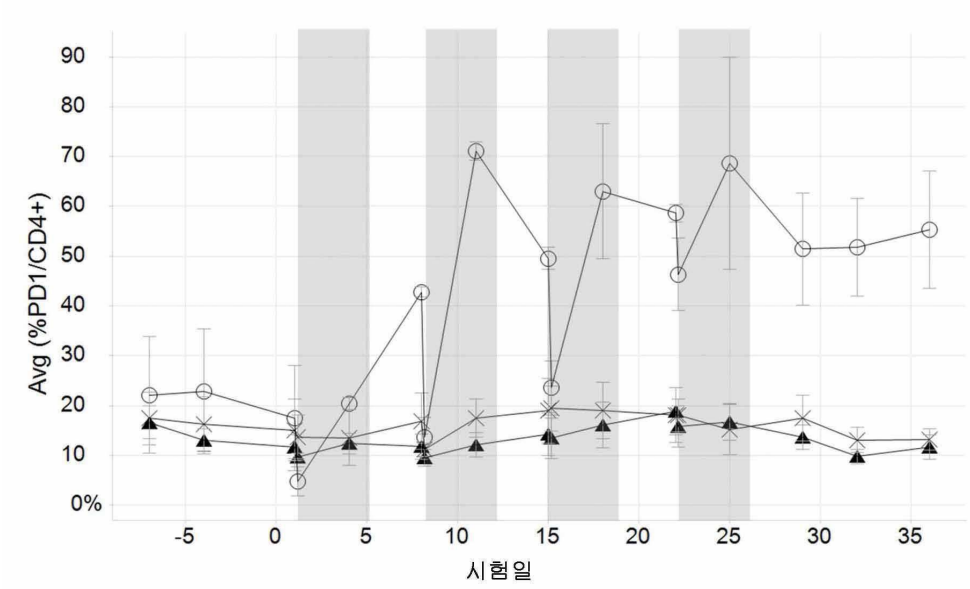
도면59b


Avg(CD3+CD8+)
12000
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-5
0
5
10
15
20
25
30
35
시험일

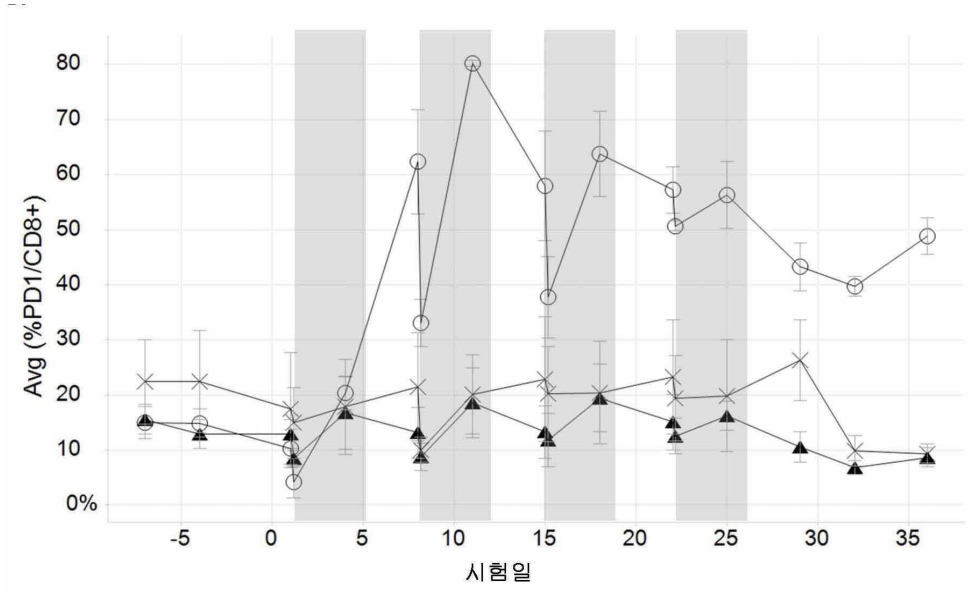
도면60


Avg(CD123+CD14-)
60
50
40
30
20
10
0
-5
0
5
10
15
20
25
30
35
시험일

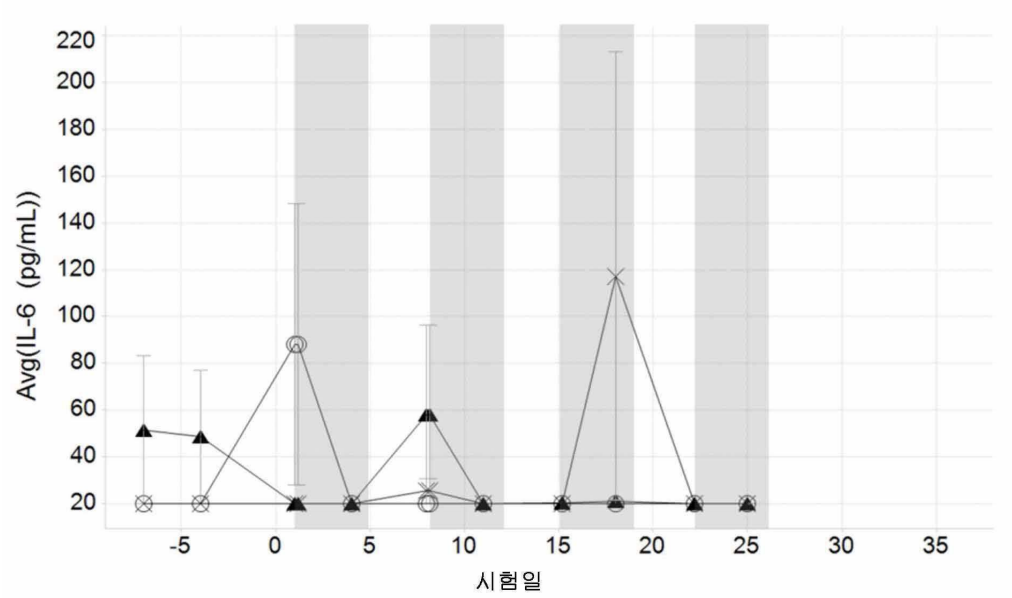
도면61a


Avg (%PD1/CD4+)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0%
-5
0
5
10
15
20
25
30
35
시험일

도면61b



도면62



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Ablynx NV

<120> T - Cell recruiting polypetides capable of binding CD123 and TCR alpha/beta

<130> P16-014-PCT-1

<150> US 62/422,770

<151> 2016-11-16

<150> US62/557,208

<151> 2017-09-12

<160> 370

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn
20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 2

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

1 5 10 15

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Thr Phe Pro Ala Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 3

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Thr Phe Pro Ala Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 4

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95
Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn
20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ser Asn
20 25 30

Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Tyr Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Thr Phe Pro Ala Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 7

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

Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Lys Thr Glu Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ala Asp Lys Asp Arg Asp Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 9

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Nanobody Sequence

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Lys Thr Glu Tyr Thr Glu Ser Val

50 55 60

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

<210> 10

<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 10

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

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

115 120 125

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 11

Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 12

Gly Ile Ser Ser Lys Ser Asp Ala Met Gly

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 13

Gly Ile Thr Ser Lys Ser Asn Ala Met Gly

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 14

Gly Ile Pro Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 15

Gly Ile Thr Ser Lys Ser Asn Val Met Gly

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 16

Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 17

Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn

1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 18

Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 19

Ala Ile Tyr Trp Ser Ser Gly Lys Thr Glu

1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 20

Ala Ile Trp Trp Ser Ser Gly Lys Thr Glu

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 21

Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 22

Phe Pro Ala Ile Ser Asn Phe

1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 23

Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 24

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

1 5 10 15

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 25

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

1 5 10 15

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Asn

20 25

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 28

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 29

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

1 5 10 15

Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 30

Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 31

Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Lys Tyr Arg Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 32

Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 33

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

1 5 10

<210> 34

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr

35

<210> 35

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr

35

<210> 36

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala

35

<210> 37

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 37

Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Gly Asp Asn Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala

35

<210> 38

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala

35

<210> 39

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 39

Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Gly Asp Asn Ala

1 5 10 15

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Asn Pro Glu Asp Thr

20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala

35

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 40

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 41

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 42

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody sequence

<400> 42

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210
> 43
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 43
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115
<210> 44
<211> 127

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Ile Ser Trp Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Asp Leu Thr Ser Thr Asn Pro Gly Ser Tyr Ile Tyr Ile Trp

100 105 110

Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 45

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 45

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr

20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Leu Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Asp Ser Thr Ile Tyr Ala Ser Tyr Tyr Glu Cys Gly His Gly
100 105 110

Leu Ser Thr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125
Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 46
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 46
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
225 230 235 240
Leu Leu Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
245 250 255
Ala Ala Asp Ser Thr Ile Tyr Ala Ser Tyr Tyr Glu Cys Gly His Gly
260 265 270
Leu Ser Thr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
275 280 285

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
290 295 300
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
305 310 315 320
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
325 330 335
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala
340 345 350

Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala
355 360 365
Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln
370 375 380
Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

385 390 395 400

Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

405 410 415

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

420 425 430

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

435 440 445

<210> 47

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn

245 250 255

Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

260 265 270

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly

325 330 335

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

340 345 350

Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp

355 360 365

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr

405 410 415

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

420 425

<210> 48

<211> 435

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn

85 90 95

Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Leu Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Ser Thr Ile Tyr Ala Ser Tyr
245 250 255
Tyr Glu Cys Gly His Gly Leu Ser Thr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Ser
260 265 270
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
275 280 285

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
290 295 300
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
305 310 315 320
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
325 330 335
Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu
340 345 350

Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His
355 360 365
Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg
370 375 380
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met
385 390 395 400
Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe

405 410 415

Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
420 425 430

Val Ser Ser
435

<210> 49

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 49

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn
20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

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

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp
225 230 235 240
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg
245 250 255
Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
260 265 270
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
275 280 285

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
290 295 300
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
305 310 315 320
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
325 330 335
Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
340 345 350

Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp
355 360 365
Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser
370 375 380
Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
385 390 395 400
Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr

405 410 415

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

420 425

<210> 50

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 50

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr

20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Asp Ser Thr Ile Tyr Ala Ser Tyr Tyr Glu Cys Gly His Gly

100 105 110

Leu Ser Thr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu

115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

225 230 235 240
Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro
245 250 255
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly
260 265 270
Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
275 280 285
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

290 295 300
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
305 310 315 320
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
325 330 335
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala
340 345 350
Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala

355 360 365
Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln
370 375 380
Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
385 390 395 400
Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
405 410 415
Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr

420 425 430

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

435 440 445

<210> 51

<211> 435

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 51

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr

20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Asp Ser Thr Ile Tyr Ala Ser Tyr Tyr Glu Cys Gly His Gly

100 105 110

Leu Ser Thr Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu

115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

180 185 190

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

195 200 205

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

210 215 220

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

225 230 235 240

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

245 250 255

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

305 310 315 320

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

325 330 335

Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

420 425 430

Val Ser Ser

435

<210> 52

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 52

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

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

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

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
165 170 175
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn
180 185 190

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
195 200 205

Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
210 215 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu
225 230 235 240

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn
245 250 255

Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
260 265 270

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
275 280 285

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
305 310 315 320

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly
325 330 335

Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly
340 345 350

Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp
355 360 365

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser
370 375 380

Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
385 390 395 400

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr
405 410 415

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420 425

<210> 53

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 53

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
165 170 175

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr
180 185 190

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr
195 200 205

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

210 215 220

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

225 230 235 240

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

260 265

<210> 54

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 54

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 55
<211> 427
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 55
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn
20 25 30
Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160
Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
165 170 175

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg
245 250 255
Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
260 265 270
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
275 280 285
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly

325 330 335

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

340 345 350

Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp

355 360 365

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr

405 410 415

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

420 425

<210> 56

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn

85 90 95

Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly

165 170 175

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

180 185 190

Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp

195 200 205

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

260 265

<210> 57

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275

<210> 58

<211> 426

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 58

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

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

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala
35 40 45

Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr
85 90 95

Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
145 150 155 160

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

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

180 185 190

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275 280 285
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
290 295 300
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg
305 310 315 320

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly
325 330 335
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile
340 345 350
Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg
355 360 365
Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
370 375 380

Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp
385 390 395 400
Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp
405 410 415
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420 425

<210> 59

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

325 330 335

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

340 345 350

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

355 360 365

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

370 375 380

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

385 390 395 400

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

405 410 415

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

420 425

<210> 60

<211> 427

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 60

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
165 170 175

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr
180 185 190

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr
195 200 205

Thr Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
225 230 235 240
Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe
245 250 255
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
275 280 285
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
290 295 300
Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu
305 310 315 320
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met
325 330 335

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala
340 345 350
Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly
355 360 365
Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
370 375 380
Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala
385 390 395 400

Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr
405 410 415
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420 425

<210> 61
<211> 427
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 61

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

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

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

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

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

245 250 255

Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

325 330 335

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

340 345 350

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

355 360 365

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

370 375 380

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

385 390 395 400

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

405 410 415

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

420 425

<210> 62

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 62

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

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

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

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
225 230 235 240
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Leu Thr Ser Thr Asn
245 250 255
Pro Gly Ser Tyr Ile Tyr Ile Trp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
275 280 285

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
290 295 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
305 310 315 320
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
325 330 335
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
340 345 350

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
355 360 365
Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
370 375 380
Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
385 390 395 400
Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
405 410 415

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
420 425

<210> 63
<211> 417
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 63
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30
Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

180 185 190

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

195 200 205

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

210 215 220

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

225 230 235 240

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

290 295 300

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu
305 310 315 320
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met
325 330 335
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
340 345 350
Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

355 360 365

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln
370 375 380
Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile
385 390 395 400
Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
405 410 415
Ser

<210> 64
<211> 577
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 64
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30
Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val
35 40 45
Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

180 185 190

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

195 200 205

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

210 215 220

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

225 230 235 240

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Ser

<210> 65

<211> 577

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 65

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

180 185 190

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

195 200 205

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

210 215 220

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

225 230 235 240

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr

465 470 475 480

Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu

485 490 495

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr

500 505 510

Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys

515 520 525

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala

530 535 540

Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu

545 550 555 560

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

565 570 575

Ser

<210> 66

<211> 577

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 66

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala

180 185 190

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

195 200 205

Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly

210 215 220

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro

225 230 235 240

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly

245 250 255

Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

325 330 335

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

340 345 350

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

355 360 365

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

370 375 380

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

385 390 395 400

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Ser

<210> 67

<211> 577

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 67

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala

180 185 190

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

195 200 205

Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly

210 215 220

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro

225 230 235 240

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly

245 250 255

Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

325 330 335

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala

340 345 350

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser

355 360 365

Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg

370 375 380

Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe

545 550 555 560

Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

565 570 575

Ser

<210> 68

<211> 378

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

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

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

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

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

245 250 255

Arg Thr Ser Phe Gln Leu Leu Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile
260 265 270
Arg Ala Arg Glu Arg Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro
275 280 285
Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Asn Thr Arg Ala Trp
290 295 300
Arg Thr Ser Leu Leu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Leu Ala Leu Val Cys
305 310 315 320

Val Phe Val Ile Cys Arg Arg Tyr Leu Val Met Gln Arg Leu Phe Pro
325 330 335
Arg Ile Pro His Met Lys Asp Pro Ile Gly Asp Ser Phe Gln Asn Asp
340 345 350
Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu
355 360 365
Val Thr Glu Val Gln Val Val Gln Lys Thr
370 375

<210> 69
<211> 378
<212
> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 69
Met Thr Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Val Ala Thr Pro Cys Leu
1 5 10 15
Leu Arg Thr Lys Glu Asp Pro Asn Ala Pro Ile Arg Asn Leu Arg Met
20 25 30
Lys Glu Lys Ala Gln Gln Leu Met Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr
35 40 45
Asp Val Glu Cys Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Ser Met Pro Ala Met Asn

50 55 60
Asn Ser Tyr Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn

65 70 75 80

Tyr Thr Val Arg Val Ala Ser Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe

85 90 95

Pro Glu Asn Ser Gly Thr Pro Arg Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys

100 105 110

Trp Val His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Val Val Gly Pro

115 120 125

Ala Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Asn Pro Asn

130 135 140

Ser His Glu Gln Tyr Arg Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Arg Gly

145 150 155 160

Thr Gln Ile Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ala Pro Leu Ser Arg Gly

165 170 175

Ser Gln Ser Ser His Ile Leu Val Arg Gly Arg Ser Ala Ala Val Ser

180 185 190

Ile Pro Cys Thr Asp Lys Phe Val Phe Phe Ser Gln Ile Glu Arg Leu

195 200 205

Thr Pro Pro Asn Met Thr Gly Glu Cys Asn Glu Thr His Ser Phe Met

210 215 220

His Trp Lys Met Lys Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu

225 230 235 240

Arg Ile Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Arg Thr Glu Gln Val Arg Asp

245 250 255

Thr Thr Ser Phe Gln Leu Pro Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile

260 265 270

Arg Ala Arg Glu Thr Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro

275 280 285

Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Ser Ser Arg Ala Trp

290 295 300

Arg Thr Ser Leu Leu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Leu Ala Leu Leu Cys

305 310 315 320

Val Phe Leu Ile Cys Arg Arg Tyr Leu Val Met Gln Arg Leu Phe Pro
325 330 335
Arg Ile Pro His Met Lys Asp Pro Ile Gly Asp Thr Phe Gln Gln Asp
340 345 350
Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu
355 360 365
Val Ser Glu Val Gln Val Val Glu Lys Thr
370 375

<210> 70
<211> 171
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 70
Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15
Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30
Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45
Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile

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

115 120 125
Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140
Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr

145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

165 170

<210> 71

<211> 182

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu

1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys

20 25 30

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

35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe

50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp

65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro

85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln

130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr

145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly

165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn

180

<210> 72

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser

1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr

20 25 30

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

35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys

50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp

65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr

85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys

145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn

165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg

180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

195 200 205

<210> 73

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 74

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser

1 5 10 15

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln

20 25 30

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys

35 40 45

Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val

50 55 60

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn

65 70 75 80

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys

85 90 95

Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn

100 105 110

Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val

115 120 125

Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

130 135 140

<210> 75

<211> 177

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro

1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu

20 25 30

Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn

35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys

50 55 60

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

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

Phe

<210> 76
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 76
Gln Leu Leu Glu Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ser Ile Gln Glu Gly Glu
1 5 10 15
Asn Leu Thr Val Tyr Cys Asn Ser Ser Ser Val Phe Ser Ser Leu Gln
20 25 30
Trp Tyr Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Val Thr Val
35 40 45
Val Thr Gly Gly Glu Val Lys Lys Leu Lys Arg Leu Thr Phe Gln Phe

50 55 60
Gly Asp Ala Arg Lys Asp Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ala Gln Pro
65 70 75 80
Gly Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Ala Gly Ala Gly Ser Gln Gly Asn

85 90 95

Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu Ser Val Lys

100 105

<210> 77

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg Lys Glu Gly

1 5 10 15

Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His Asp Ala Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr

35 40 45

Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr Val Thr Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 78

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 78

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val His Phe Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 79

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 80

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 80

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 81

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 81

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

1 5 10 15

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 82

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

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 83

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 83

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 84

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

1 5 10 15

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 85
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 85
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 86
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 86

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

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

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

<210> 87
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence

<400> 87

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 88

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 88

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

<210> 89
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 89
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 90
<211> 117
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 90

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Ser Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 91

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Ser Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala His Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 92

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 92

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Val Tyr Ala Glu Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 93

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 93

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
20 25 30

Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Cys Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 94

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 94

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

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala His Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 95

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 95

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala His Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 96

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 96

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
20 25 30

Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 97

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 97

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

Phe Leu Gly Trp His Arg Gln Pro Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 98

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 98

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val His Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 99

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 99

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 100

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 100

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

1 5 10 15

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

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

<210> 101
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 101
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 102
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 102

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

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

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

<210> 103
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence

<400> 103

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Thr Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Val Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 104

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 104

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

<210> 105
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 105
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 106
<211> 117
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 106

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Tyr Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Arg Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 107

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 107

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 108

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 108

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 109

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Ser Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 110

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 110

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

Ser Ala Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 111

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 111

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 112

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 112

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 113

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 113

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

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 114

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 114

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 115

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 115

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Gln

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 116

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 116

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

1 5 10 15

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

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

<210> 117
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 117
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 118
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 118

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

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

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

<210> 119
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence

<400> 119

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
20 25 30

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

Thr His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 120

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 120

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro Lys Asn Met Val His Leu

65 70 75 80

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

<210> 121
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 121
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 122
<211> 117
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 122

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala Arg Ile Ser Ile Ser Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Arg
85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 123

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 123

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 124

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 124

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

Ser Leu Lys Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
20 25 30

Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 125

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 125

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

Ser Leu Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala His Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 126

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 126

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 127

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 127

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 128

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 128

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Tyr Lys Ile Asn
20 25 30

Phe Leu Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly His Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Arg Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys His
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 129

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 129

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 130

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 130

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Ala Ile Ser Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 131

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 131

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 132

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 132

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

1 5 10 15

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

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

<210> 133
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 133
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 134
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 134

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

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

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

<210> 135
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence

<400> 135

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Glu Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 136

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 136

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
20 25 30

Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

<210> 137
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 137
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 138
<211> 117
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 138

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Ser Tyr Ala Gly Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 139

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 139

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 140

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 140

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 141

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 141

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
20 25 30

Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp Tyr Ala His Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 142

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 142

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
20 25 30

Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 143

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 143

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 144

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 144

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 145

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 145

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

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 146

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 146

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Val Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 147

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 147

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 148

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 148

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

1 5 10 15

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 149
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 149
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95
Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 150
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 150

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

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

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

<210> 151
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence

<400> 151

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Ser Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 152

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 152

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Val His Lys Ile Asn
20 25 30

Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp Tyr Glu Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

<210> 153
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 153

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

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

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

<210> 154
<211> 117
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 154

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val Tyr Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 155

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 155

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

Ile Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Ile
35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 156

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 156

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 157

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 157

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 158

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 158

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 159

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 159

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 160

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 160

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 161

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 161

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Gly Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 162

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 162

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 163

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 163

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Leu Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 164

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 164

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

1 5 10 15

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

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

<210> 165
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 165
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 166
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 166

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

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

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

<210> 167
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence

<400> 167

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Leu Leu Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp Tyr Ser His Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Asn Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 168

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 168

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

Ser Pro Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Gln Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

<210> 169
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 169
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 170
<211> 117
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 170

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 171

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 171

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val His Lys Ile Asn
20 25 30

Phe Leu Gly Trp Tyr Cys Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val
35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Ser Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 172

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 172

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Ser Ile Ser Asp Gln Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Leu Cys Arg
85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 173

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 173

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

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp Tyr Ala Asp Phe Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 174

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 174

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

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 175

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 175

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Glu Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Leu Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 176

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 176

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg
85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 177

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 177

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 178

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 178

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 179

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 179

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 180

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 180

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

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

<210> 181
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDR1
<400> 181
Gly Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly
1 5 10

<210> 182
<211>
10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CDR1
<400> 182
Gly Ser Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly
1 5 10

<210> 183

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 183

Gly Ser Val His Leu Leu Asn Phe Leu Gly

1 5 10

<210> 184

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 184

Gly Ala Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly

1 5 10

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 185

Gly Asp Val His Lys Ile Asn Ile Leu Gly

1 5 10

<210> 186

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 186

Gly Asp Val His Lys Ile Asn Val Leu Gly

1 5 10

<210> 187

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 187

Gly Glu Val Tyr Lys Ile Asn Phe Leu Gly

1 5 10

<210> 188

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 188

Gly Gly Val His Lys Ile Asn Ile Leu Gly

1 5 10

<210> 189

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 189

Gly Ser Val Tyr Lys Ile Asn Phe Leu Ser

1 5 10

<210> 190

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 190

Gly Asp Val Tyr Lys Ile Asn Phe Leu Gly

1 5 10

<210> 191

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 191

Gly Glu Val His Lys Ile Asn Ile Leu Gly

1 5 10

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 192

His Ile Ser Ile Gly Asp Gln Thr Asp

1 5

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 193

Thr Ile Thr Ile Gly Asp Thr Thr Asp

1 5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 194

Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp

1 5

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 195

His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Thr Asp

1 5

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 196

Thr Ile Thr Ile Gly Asp Asp Val Asp

1 5

<210> 197

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 197

His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asp

1 5

<210> 198

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 198

His Ile Thr Ile Gly Asp Gln Ala Asp

1 5

<210> 199

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 199

His Ile Ser Ile Ala Asp Ala Thr Asp

1 5

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 200

His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Val

1 5

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 201

His Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp

1 5

<210> 202

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 202

His Ile Thr Ile Gly Asp Val Thr Asp

1 5

<210> 203

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 203

His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Asn

1 5

<210> 204

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 204

His Ile Thr Ile Ala Asp Val Ala Asp

1 5

<210> 205

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 205

Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Asp

1 5

<210> 206

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 206

His Ile Ser Ile Ser Asp Gln Thr Asp

1 5

<210> 207

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 207

His Ile Thr Ile Gly Asp Gln Thr Asp

1 5

<210> 208

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 208

His Ile Thr Ile Gly Asp Thr Thr Asp

1 5

<210> 209

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 209

Arg Ile Ser Ile Ser Asp Gln Thr Asp

1 5

<210> 210

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 210

His Ile Thr Ile Ala Asp Ala Ala Asp

1 5

<210> 211

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 211

Thr Ile Thr Ile Gly Asp Ala Ala Asp

1 5

<210> 212

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 212

His Ile Ala Ile Ser Asp Gln Thr Asp

1 5

<210> 213

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 213

His Ile Thr Ile Gly Asp Ala Thr Ser

1 5

<210> 214

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 214

Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Val Ala

1 5

<210> 215

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 215

His Ile Thr Ile Ala Asp Val Thr Asp

1 5

<210> 216

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 216

His Ile Thr Ile Ala Asp Gln Ala Asp

1 5

<210> 217

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 217

Thr Ile Thr Ile Gly Asp Glu Thr Gln

1 5

<210> 218

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 218

Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 219

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 219

Gly Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr

1 5

<210> 220

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 220

Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 221

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 221

Tyr Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr

1 5

<210> 222

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 222

Gly Ser Arg Ile Trp Pro Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 223

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 223

Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Tyr

1 5

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 224

Gly Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Ser Tyr

1 5

<210> 225

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 225

Leu Ser Arg Leu Tyr Pro Tyr Asn Tyr

1 5

<210> 226

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 226

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser

20 25

<210> 227

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 227

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 228

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 228

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

Ser Leu Arg Leu Pro Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 229

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 229

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 230

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 230

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 231

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 231

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser

20 25

<210> 232

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 232

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 233

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 233

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 234

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 234

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 235

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 235

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 236

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 236

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

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser

20 25

<210> 237

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 237

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

1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 238

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 238

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 239

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 239

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 240

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 240

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Pro Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 241

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 241

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

1 5 10 15

Ser Leu Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 242

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 242

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 243

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 243

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 244

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 244

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 245

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 245

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 246

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 246

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser

20 25

<210> 247

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 247

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 248

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 248

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

Ser Pro Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser
20 25

<210> 249

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 249

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

Ser Leu Arg Pro Ser Cys Val Ala Ser
20 25

<210> 250

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR1

<400> 250

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 251

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 251

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

1 5 10

<210> 252

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 252

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

1 5 10

<210> 253

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 253

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

1 5 10

<210> 254

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 254

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

1 5 10

<210> 255

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 255

Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val Ala

1 5 10

<210> 256

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 256

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val Ala

1 5 10

<210> 257

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 257

Trp Tyr Arg Gln Cys Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val Ala

1 5 10

<210> 258

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 258

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

1 5 10

<210> 259

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 259

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

1 5 10

<210> 260

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 260

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Glu Met Val Ala

1 5 10

<210> 261

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 261

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

1 5 10

<210> 262

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 262

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

1 5 10

<210> 263

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 263

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val Thr

1 5 10

<210> 264

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 264

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

1 5 10

<210> 265

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 265

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

1 5 10

<210> 266

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 266

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu His Glu Met Val Ala

1 5 10

<210> 267

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 267

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Arg Glu Arg Glu Met Val Ala

1 5 10

<210> 268

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 268

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

1 5 10

<210> 269

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 269

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Ile Ala

1 5 10

<210> 270

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 270

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

1 5 10

<210> 271

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 271

Trp Tyr Arg Gln Val Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val Ala

1 5 10

<210> 272

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 272

Trp Tyr Arg Gln Cys Pro Gly Lys Glu Arg Asp Met Val Ala

1 5 10

<210> 273

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 273

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

1 5 10

<210> 274

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 274

Trp Tyr Cys Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Met Val Ala

1 5 10

<210> 275

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 275

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Met Val Ala

1 5 10

<210> 276

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR2

<400> 276

Trp His Arg Gln Ala Pro Ala Lys Glu Arg Glu Met Val Ala
1 5 10

<210> 277

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 277

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

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
35

<210> 278

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 278

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

<210> 279

<211> 39

<212
> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 279

Tyr Ala Asp Tyr Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 280

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 280

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 281

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 281

Tyr Ser His Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 282

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 282

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

<210> 283

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 283

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

<210> 284

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 284

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

<210> 285

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 285

Tyr Ala His Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 286

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 286

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Val Cys Arg Ala

35

<210> 287

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 287

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 288

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 288

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

Lys Asn Met Val His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 289

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 289

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

Lys Asn Met Val Phe Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 290

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 290

Tyr Ala Gly Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 291

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 291

Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 292

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 292

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Val Tyr Val Cys Arg Ala

35

<210> 293

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 293

Tyr Ala Glu Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Leu Cys Arg Ala

35

<210> 294

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 294

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 295

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 295

Tyr Ala Asp Phe Ala Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 296

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 296

Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro

1 5 10 15

Lys Asn Met Val His Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr

20 25 30

Ala Val Tyr Leu Cys Arg Ala

35

<210> 297

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 297

Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 298

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 298

Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 299

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 299

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Leu Tyr Phe Cys His Ala

35

<210> 300

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 300

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ala Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 301

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 301

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

20 25 30
Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala
35

<210> 302

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 302

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

35

<210> 303

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 303

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

<210> 304

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 304

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Leu Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 305

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 305

Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Leu Cys Arg Ala

35

<210> 306

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 306

Tyr Ala His Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Val Cys Arg Ala

35

<210> 307

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 307

Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 308

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 308

Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 309

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 309

Tyr Ser Tyr Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 310

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 310

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 311

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 311

Tyr Glu Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Thr Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr

20 25 30

Ala Val Tyr Val Cys Arg Ala

35

<210> 312

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 312

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

<210> 313

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 313

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

<210> 314

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 314

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

<210> 315

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 315

Tyr Ser His Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 316

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 316

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 317

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 317

Tyr Ala Glu Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser

1 5 10 15

Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala

20 25 30

Ala Val Tyr Leu Cys Arg Ala

35

<210> 318

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 318

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 319

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR3

<400> 319

Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ala

1 5 10 15

Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Gly Asp Thr

20 25 30

Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala

35

<210> 320

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 320

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 321

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 321

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 322

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 322

Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 323

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 323

Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 324

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FR4

<400> 324

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 325

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 325

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 326

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 326

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 327

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 327

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 328

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 328

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 329

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400

> 329

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

1 5 10 15

<210> 330

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 330

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

1 5 10 15

Gly Ser

<210> 331

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 331

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 332

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 332

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 333

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 333

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 334

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 334

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Ser

35

<210> 335

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker sequence

<400> 335

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

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 336
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Linker Sequence
<400> 336
Ala Ala Ala
1

<210> 337
<211> 303
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Nanobody Sequence
<400> 337
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn
20 25 30

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

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala
165 170 175

Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn Phe Leu Gly Trp Tyr Arg Gln Ala
180 185 190

Pro Gly Lys Glu Arg Glu Lys Val Ala His Ile Ser Ile Gly Asp Gln
195 200 205

Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
210 215 220

Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Arg Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr
245 250 255

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Ala
260 265 270

Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr
275 280 285

Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ala Ala His His His His His His
290 295 300

<210> 338

<211> 418

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 338

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

180 185 190

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

195 200 205

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

210 215 220

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

225 230 235 240

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Ala

<210> 339

<211> 578

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 339

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

180 185 190

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

195 200 205

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

210 215 220

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

225 230 235 240

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Ser Ala

<210> 340

<211> 578

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 340

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

180 185 190

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

195 200 205

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

210 215 220

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

225 230 235 240

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr

465 470 475 480

Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu

485 490 495

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Tyr Trp Ser Asn Gly Lys Thr Gln Tyr

500 505 510

Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys

515 520 525

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala

530 535 540

Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly Phe Arg Thr Leu

545 550 555 560

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

565 570 575

Ser Ala

<210> 341

<211> 578

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 341

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala

180 185 190

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

195 200 205

Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly

210 215 220

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro

225 230 235 240

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly

245 250 255

Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

325 330 335

Ser Gly Ile Thr Ser Lys Ile Asn Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Thr

340 345 350

Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Ala Thr Gly Thr

355 360 365

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

370 375 380

Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu

385 390 395 400

Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Pro Pro Ile Ser Asn Phe

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

Ser Ala

<210> 342

<211> 578

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 342

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Val His Lys Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Met Val Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Phe Ser Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

165 170 175

Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala

180 185 190

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

195 200 205

Lys Thr Gln Tyr Thr Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly

210 215 220

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Asn Pro

225 230 235 240

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Ala Asp Lys Asp Glu Thr Gly

245 250 255

Phe Arg Thr Leu Pro Ile Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

260 265 270

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

325 330 335

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala

340 345 350

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser

355 360 365

Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg

370 375 380

Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

Gly Trp Tyr Arg Gln Thr Pro Gly Asn Tyr Arg Glu Trp Val Ala Ser

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Thr Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe

545 550 555 560

Pro Pro Ile Ser Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

565 570 575

Ser Ala

<210> 343

<211> 107

<

212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 343

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

Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln
20 25 30

Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile
35 40 45

Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala
50 55 60

Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp
65 70 75 80

Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Ala Leu Ile Gln Gly Ala Gln Lys Leu
85 90 95

Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Ile Asn
100 105

<210> 344

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 344

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

Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Thr Gln Asp Met Asn His Asn Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Lys Leu Ile Tyr Tyr
35 40 45

Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Lys Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr
50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Glu Leu
65 70 75 80

Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Thr Tyr His
85 90 95

Gly Thr Gly Tyr Phe Gly Glu Gly Ser Trp Leu Thr Val Val

100 105 110

<210> 345

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 345

Gly Asp Ala Lys Thr Thr Gln Pro Asn Ser Met Glu Ser Asn Glu Glu

1 5 10 15

Glu Pro Val His Leu Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Thr Asp

20 25 30

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

35 40 45

Ile His Gly Leu Thr Ser Asn Val Asn Asn Arg Met Ala Ser Leu Ala

50 55 60

Ile Ala Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ile Leu His Arg Ala Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Lys Leu Ile Phe Gly Thr Gly Thr Leu Leu Ala Val Gln

100 105 110

<210> 346

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 346

Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Ala Lys Ser Gly Thr Ser

1 5 10 15

Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe

20 25 30

Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr Ser

35 40 45

Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp Lys

50 55 60

Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val Thr

65 70 75 80

Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Arg Gly

85 90 95

Gly Ser Tyr Asn Ser Pro Leu His Phe Gly Asn Gly Thr Arg Leu Thr

100 105 110

Val Thr

<210> 347

<211> 96

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 347

Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Gly Ser

1 5 10 15

Lys Ser Asn Asp Thr Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Val

20 25 30

Met Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val His Ile Thr Asp Lys

35 40 45

Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Gly Ala Val

50 55 60

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Thr Ser Ala Phe Lys Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

<210> 348

<211> 131

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 348

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

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

Ala Asp Cys
130

<210> 349
<211> 107
<212> PRT
<213> Macaca mulatta
<400> 349
Gln Gln Ile Met Gln Ile Pro Gln Tyr Gln His Val Gln Glu Gly Glu
1 5 10 15
Asp Phe Thr Thr Tyr Cys Asn Ser Ser Thr Thr Leu Ser Asn Ile Gln
20 25 30
Trp Tyr Lys Gln Arg Pro Gly Gly His Pro Val Phe Leu Ile Met Leu
35 40 45
Val Lys Ser Gly Glu Val Lys Lys Gln Lys Arg Leu Ile Phe Gln Phe

50 55 60
Gly Glu Ala Lys Lys Asn Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Thr Gln Thr

65 70 75 80

Thr Asp Val Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Thr Thr Gly Val Asn Asn Leu

85 90 95

Phe Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 350

<211> 118

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 350

Ala Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val

1 5 10 15

Leu Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn

20 25 30

His Asp Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg

35 40 45

Leu Ile His Tyr Ser Val Gly Glu Gly Ser Thr Glu Lys Gly Glu Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Ser Tyr Trp Thr Gly Arg Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly

100 105 110

Thr Arg Leu Thr Val Ile

115

<210> 351

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 351

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 352

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 352

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Ala

115

<210> 353

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 353

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Ala

115

<210> 354

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 354

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 355

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 355

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Lys

100 105 110

Val Ser Ser Ala

115

<210> 356

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 356

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 357

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 357

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Ala

115

<210> 358

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 358

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Ala Ala

115

<210> 359

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 359

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Ala Ala Ala

115

<210> 360

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 360

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly

115

<210> 361

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 361

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly

115

<210> 362

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanobody Sequence

<400> 362

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser Gly Gly Gly

115

<210> 363

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 363

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser

1 5 10

<210> 364

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR1

<400> 364

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Gly Met Ser

1 5 10

<210> 365

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR2

<400> 365

Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu

1 5 10

<210> 366

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR3

<400> 366

Gly Gly Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 367

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Myc-Tag

<400> 367

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala

1 5 10 15

Ala

<210> 368

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR1

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa is D, A, S, E or G

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa is H or Y

<220>

<221> VARIANT

<222>

5

<223> Xaa is K or L

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa is I or L

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa is F, I or V

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa is G or S

<400> 368

Gly Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Leu Xaa

1 5 10

<210> 369

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR2

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa is H, T or R

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa is S, T or A

<220>

<

221> VARIANT

<222> 5

<223> G, S or A

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa is Q, D, E, T, A or V

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa is T, A or V

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa is D, A, Q, N, V or S

<400> 369

Xaa Ile Xaa Ile Xaa Asp Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 370

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR3

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa is F, Y, G, L or K

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa is I or L

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa is Y or W

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa is D, N or S

<400> 370

Xaa Ser Arg Xaa Xaa Pro Tyr Xaa Tyr

1 5