(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월12일
(11) 등록번호 10-1836968
(24) 등록일자 2018년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 47/6813 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2016-7007916(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년10월27일
심사청구일자 2016년04월25일
(85) 번역문제출일자 2016년03월25일
(65) 공개번호 10-2016-0039305
(43) 공개일자 2016년04월08일
(62) 원출원 특허 10-2010-7011773
원출원일자(국제) 2008년10월27일
심사청구일자 2013년10월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/009070
(87) 국제공개번호 WO 2009/056268
국제공개일자 2009년05월07일
(30) 우선권주장
60/983,606 2007년10월30일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
Journal of Leukocyte Biology. Vol.82:657-665 (2007. 09.)
Arthritis Research and Therapy, Vol.9(1):1478-6354 (2007. 01. 29).
Trends in Biotechnology, Vol21(11):484-490 (2003. 11. 01).
WO2006119897 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
필로겐 에스.피.에이.
이탈리아 아이-53100 시에나 라 리짜 7
(72) 발명자
카스파르, 마뉴엘라
스위스 체하-8093 취리히 볼프강-파울리-스트라쎄 10 에테하-혼게르베르크 필로켐 아게 체/오
슈바거, 카트린
스위스 체하-8093 취리히 볼프강-파울리-스트라쎄 10 에테하-혼게르베르크 필로켐 아게 체/오
트라크셀, 에벨린
스위스 체하-8093 취리히 볼프강-파울리-스트라쎄 10 에테하-혼게르베르크 필로켐 아게 체/오
(74) 대리인
양영준, 김영

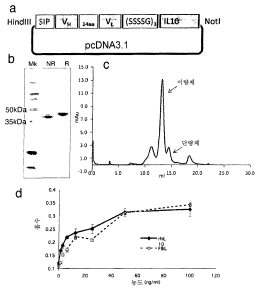
전체 청구항 수 : 총 27 항 심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **류마티스 관절염과 연관된 항원**

(57) 요 약

본 발명은 류마티스 관절염의 검출 및 치료를 위한, 피브로넥틴의 엑스트라 (Extra) 도메인-A (ED-A) 이소형에 결합하는 결합 멤버에 관한 것이다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61K 47/6843 (2017.08)
A61K 51/1018 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

소염 활성을 갖는 분자에 컨쥬게이팅된, 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 항체 컨쥬게이트이며, 상기 항체가 피브로넥틴의 엑스트라 도메인-A (ED-A)와의 결합에 대하여

(i) 상보성 결정 구역 (CDR) 1 내지 3이 서열 83, 서열 4, 및 서열 5 각각의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 및

(ii) CDR1 내지 CDR3이 서열 86, 서열 7, 및 서열 8 각각의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인

을 포함하는 참조 항체와 경쟁하지만 항체 컨쥬게이트가 상기 참조 항체는 포함하지 않는 항체 컨쥬게이트.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체 컨쥬게이트 중의 항체가 피브로넥틴의 ED-A에 대한 결합 친화도 K_D 3 x 10^{-8} M 이하를 갖는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 3

제1항에 있어서, 항체 컨쥬게이트의 상기 VH 도메인 및/또는 상기 VL 도메인이 인간 생식계열(germline) 프레임워크를 포함하는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 VH 도메인의 인간 생식계열 프레임워크가 DP47이고/이거나 상기 VL 도메인의 인간 생식계열 프레임워크가 DPK22인 항체 컨쥬게이트.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 참조 항체가

(i) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하지만 서열 81의 위치 5의 아미노산이 발린 잔기 (V)가 아니라 류신 잔기 (L)인 VH 도메인, 및

(ii) 서열 82의 아미노산 잔기 1-108을 포함하지만 서열 82의 위치 18의 아미노산이 라이신 잔기 (K)가 아니라 아르기닌 잔기 (R)인 VL 도메인

을 포함하는 것인, 항체 컨쥬게이트.

청구항 6

제1항에 있어서, 항체 컨쥬게이트의 항원 결합 단편이 단일쇄 Fv (scFv)를 포함하거나 또는 디아바디(diabody)인 항체 컨쥬게이트.

청구항 7

제1항에 있어서, 항체 컨쥬게이트의 항원 결합 단편이 작은 면역단백질 (SIP)을 포함하는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 8

제1항에 있어서, 검출가능한 표지를 포함하는 항체 컨쥬게이트.

청구항 9

제8항에 있어서, 검출가능한 표지가 방사선동위원소를 포함하는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 소염 활성을 갖는 분자가 시토킨인 항체 컨쥬게이트.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 시토킨이 인터루킨-10 (IL-10)인 항체 컨쥬게이트.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 IL-10이 하기 아미노산 서열을 포함하는 인간 IL-10인 항체 컨쥬게이트:

SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLE

DFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRC

HRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN.

청구항 13

제1항에 있어서, 항체 컨쥬게이트의 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 펩티드 링커를 통해 상기 소염 활성을 갖는 분자에 컨쥬게이팅되는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 14

소염 활성을 갖는 분자에 컨쥬게이팅된, 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 항체 컨쥬게이트이며, 상기 항체가

(i) 상보성 결정 구역 (CDR) 1 내지 3이 서열 83, 서열 4, 및 서열 5 각각의 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인, 및

(ii) CDR1 내지 CDR3이 서열 86, 서열 7, 및 서열 8 각각의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인

을 포함하는 참조 항체와 피브로넥틴의 엑스트라 도메인-A (ED-A) 내 동일한 에피토프에 결합하지만 항체 컨쥬게이트가 상기 참조 항체는 포함하지 않는 항체 컨쥬게이트.

청구항 15

제14항에 있어서, 항체 컨쥬게이트 중의 항체가 피브로넥틴의 ED-A에 대한 결합 친화도 K_D 3 x 10^{-8} M 이하를 갖는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 16

제14항에 있어서, 항체 컨쥬게이트의 상기 VH 도메인 및/또는 상기 VL 도메인이 인간 생식계열 프레임워크를 포함하는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 VH 도메인의 인간 생식계열 프레임워크가 DP47이고/이거나 상기 VL 도메인의 인간 생식계열 프레임워크가 DPK22인 항체 컨쥬게이트.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 참조 항체가

(i) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하지만 서열 81의 위치 5의 아미노산이 발린 잔기 (V)가 아니라 류신 잔기 (L)인 VH 도메인, 및

(ii) 서열 82의 아미노산 잔기 1-108을 포함하지만 서열 82의 위치 18의 아미노산이 라이신 잔기 (K)가 아니라 아르기닌 잔기 (R)인 VL 도메인

을 포함하는 것인, 항체 컨쥬게이트.

청구항 19

제14항에 있어서, 항체 컨쥬게이트의 항원 결합 단편이 단일쇄 Fv (scFv)를 포함하거나 또는 디아바디인 항체 컨쥬게이트.

청구항 20

제14항에 있어서, 항체 컨쥬게이트의 항원 결합 단편이 작은 면역단백질 (SIP)을 포함하는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 21

제14항에 있어서, 검출가능한 표지를 포함하는 항체 컨쥬게이트.

청구항 22

제21항에 있어서, 검출가능한 표지가 방사선동위원소를 포함하는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 23

제14항에 있어서, 상기 소염 활성을 갖는 분자가 시토킨인 항체 컨쥬게이트.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 시토킨이 인터루킨-10 (IL-10)인 항체 컨쥬게이트.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 IL-10이 하기 아미노산 서열을 포함하는 인간 IL-10인 항체 컨쥬게이트:

SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLE

DFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRC

HRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN.

청구항 26

제14항에 있어서, 항체 컨쥬게이트의 상기 항체 또는 항원 결합 단편이 펩티드 링커를 통해 상기 소염 활성을 갖는 분자에 컨쥬게이팅되는 것인 항체 컨쥬게이트.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체 컨쥬게이트 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 류마티스 관절염의 치료 또는 예방을 위한 제약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 류마티스 관절염 (RA)의 검출 및 치료에 관한 것이다. 본 발명은 피브로넥틴의 ED-A 이소형에 결합하는 결합 멤버, 특히 피브로넥틴의 도메인 ED-A에 결합하는 결합 멤버의 용도를 포함한다.

배 경 기 술

[0002] 류마티스 관절염 (RA)은 산업화 사회에서 인구의 0.5-1%에서 걸리는 만성 염증성 및 파괴성 관절 질병이고, 흔히 심각한 장애를 일으키고, 그 결과 삶의 질을 저하시킨다.

[0003] RA 환자의 윤활막에서의 혈관신생은 발병기전에서 및 질병의 영구화에서 중요한 초기 단계인 것으로 여겨진다 (Taylor, 2002). 신생물성 질병에서와 같이, 혈관신생은 팽창하는 윤활막에 영양을 공급한다 (Walsh et al., 1998). 혈관 성장은 아마도 염증성 윤활막 판누스 (pannus)의 증식 및 윤활막 조직 내로 염증성 백혈구의 진입에 기여한다. RA 환자의 윤활막은 증가된 양의 섬유모세포 성장 인자-2 (FGF-2) 및 혈관 내피 성장 인자

(VEGF)를 함유하였다 (Koch, 2003). 혈청 VEGF 농도는 질병 활성과 상호관련되고, 치료에 의해 윤활막염이 성공적으로 억제될 때 하락한다 (Taylor, 2002).

[0004] 피브로넥틴 (FN)은 당단백질이고, 다양한 정상 조직 및 체액에서 널리 발현된다. 이는 세포외 매트릭스 (ECM)의 성분이고, 세포 부착, 세포 이동, 지혈, 혈전증, 상처 치유, 조직 분화 및 종양 전환을 포함한 많은 생물학적 과정에서 일정 역할을 한다.

[0005] 상이한 FN 이소형들은 일차 전사체 FN pre-mRNA의 3개의 구역 (ED-A, ED-B, IIICS)의 선택적 스플라이싱 (alternative splicing) (시토킨 및 세포외 pH에 의해 조절되는 과정)에 의해 생성된다 ([Balza 1988]; [Carnemolla 1989]; [Borsi 1990]; [Borsi 1995]). 피브로넥틴은 2개의 타입-III 구형 엑스트라 (extra)-도메인을 함유하고, 이는 선택적 스플라이싱을 거칠 수 있다: ED-A 및 ED-B ([ffrench-Constant 1995], [Hynes 1990], [Kaspar et al. 2006]). 마우스 피브로넥틴 및 인간 피브로넥틴의 ED-A는 96.7% 동일하다 (2종의 90개 아미노산 서열 중 3개의 아미노산만이 상이하다, 도 2 참조).

[0006] 피브로넥틴의 ED-A의 발현은 종양 세포 및 고형 종양에서, 유방암 ([Jacobs et al. 2002], [Matsumoto et al. 1999]) 및 간암 ([Oyama et al. 1989], [Tavian et al. 1994])에서 mRNA 수준에서, 및 섬유육종, 횡문근육종 및 흑색종에서 단리된 단백질 수준에서 (Borsi et al. 1987) 보고되었다.

[0007] 면역조직화학 수준에서, ED-A의 존재는 치원성 종양 (Heikinheimo et al. 1991) 및 간세포 암종 (Koukoulis et al. 1995)의 세포외 매트릭스 (ECM) 내에서 검출되었다. 이와 반대로, ED-A는 악성 유방 신생물의 기질 (Koukoulis et al. 1993), 및 잘 분화된 신세포 암종의 혈관 및 기저막에서 (Lohi et al. 1995) 검출되었다. 그러나, 덜 분화된 신세포 암종 (Lohi et al. 1995) 및 갑상선의 유두 암종 (Scarpino et al. 1999)에서, ED-A는 혈관, 기저막 및 종양 기질에서 검출되었다. 신경아교종의 혈관계에서 ED-A의 존재가 또한 보고되었다 (Borsi et al. 1998). 따라서, 상이한 종류의 종양에 대해 보고된 ED-A 발현의 패턴은 고도로 가변적이다.

[0008] 혈관신생 부위로의 생활성 물질의 항체-기반 표적화 전달은 암 치료를 위한 매력적인 치료 전략이지만, 만성 염증성 질병에 대해 많이 조사되지 않았다. 본 발명자들은 이전에 피브로넥틴의 ED-B 도메인 (혈관신생의 마커 (marker))이 건선 환자 및 마우스 모델에서 건선성 병변에서 및 류마티스 관절염의 콜라겐-유도된 마우스 모델에서 관절염성 발에서 발현됨을 입증하였다. 방사성 및 형광 기술 모두를 사용하여, EDB에 특이적인 인간 모노클로날 항체 L19가 정맥내 투여 후에 생체 내에서 염증 부위에 선택적으로 국재화하는 것으로 밝혀졌다. 이들 결과는 염증 부위로의 생활성 화합물의 L19-기반 선택적 전달에 대한 치료 가능성을 제안한다 ([Trachsel, 2007]; PCT/EP2007/004044).

[0009] 계내 혼성화 (in-situ-hybridisation)에 의해, ED-B 외에, 피브로넥틴의 ED-A 도메인이 또한 인간 관절염 시료 내에 존재할 수 있음이 이전에 밝혀졌다 ([Berndt et al., 1998]; [Kriegsmann et al., 2004]).

발명의 내용

[0010] 본 발명자들은 본원에서 항-EDA 항체, 예를 들어 본원에 개시되는 F8 항체가 항-EDB-항체 L19 및 항-테나신-C 항체 F16 및 G11에 비해 인간 관절염 시료에 더 강한 염색 패턴을 제공할 수 있음을 보여준다.

[0011] 또한, 방사성 및 형광 기술 모두를 사용하여, ED-A에 특이적인 인간 모노클로날 항체 F8이 정맥내 투여 후에 생체 내에서 염증 부위에 선택적으로 국재화하는 것으로 밝혀졌다.

[0012] 따라서, 피브로넥틴의 ED-A는 류마티스 관절염의 혈관 마커로서 나타난다.

[0013] 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합하는 항체 분자와 같은 결합 분자는 류마티스 관절염 (RA)의 치료용 의약의 제조를 위해 사용될 수 있는 신규한 물질을 나타낸다.

[0014] 본 발명은 류마티스 관절염 치료용 의약의 제조를 위한, 피브로넥틴의 엑스트라 도메인-A (ED-A) 이소형 (A-FN)에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 류마티스 관절염 치료용 의약의 제조를 위한, 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자의 용도를 제공한다.

[0015] 본 발명은 결합 멤버에 컨쥬게이팅된 분자의 류마티스 관절염 부위로의 전달을 위한, 피브로넥틴의 ED-A 이소형에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자의 용도를 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 결합 멤버에 컨쥬게이팅된 분자의 류마티스 관절염 부위로의 전달을 위한, 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자의 용도를 제공한다. 결합 멤버는 그러한 분자의 전달을 위한 의약의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명은 류마티스 관절염을 진단하는데 사용하기 위한 진단 제품의 제조를 위한, 피브로넥틴의 ED-A 이소형에

결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 류마티스 관절염을 진단하는데 사용하기 위한 진단 제품의 제조를 위한, 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자의 용도를 제공한다.

[0017] 본 발명은 (a) 인간 또는 동물에게 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자를 투여하고,

[0018] (b) 인간 또는 동물 신체의 류마티스 관절염 부위에서 결합 멤버의 존재 또는 부재를 결정하는 것

[0019] 을 포함하는,

[0020] 인간 또는 동물에서 류마티스 관절염을 검출 또는 진단하는 방법을 추가로 제공하고;

[0021] 여기서 류마티스 관절염 부위에 대한 결합 멤버의 국재화는 류마티스 관절염의 존재를 나타낸다.

[0022] 본 발명은 개체에게 피브로넥틴의 ED-A 이소형에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자를 포함하는 의약의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 류마티스 관절염의 치료 방법을 제공한다. 본 발명은 개체에게 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자를 포함하는 의약의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 류마티스 관절염의 치료 방법을 또한 제공한다.

[0023] 본 발명은 개체에게 피브로넥틴의 ED-A 이소형에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자를 포함하는 의약의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 류마티스 관절염의 치료 방법에서 사용하기 위한, 피브로넥틴의 ED-A 이소형에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 개체에게 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자를 포함하는 의약의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 류마티스 관절염의 치료 방법에서 사용하기 위한, 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명은 인간 또는 동물에게 피브로넥틴의 ED-A 이소형에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자를 투여하는 것을 포함하는, 인간 또는 동물에서 류마티스 관절염 부위의 신생혈관으로 분자를 전달하는 방법을 제공하고, 여기서 결합 멤버는 분자에 컨쥬게이팅된다. 본 발명은 또한 인간 또는 동물에게 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자를 투여하는 것을 포함하는, 인간 또는 동물에서 류마티스 관절염 부위의 신생혈관으로 분자를 전달하는 방법을 제공하고, 여기서 결합 멤버는 분자에 컨쥬게이팅된다.

[0025] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 또는 G9, 또는 그의 변이체의 하나 이상의 상보성 결정 구역 (CDR)을 포함하는, 피브로넥틴의 ED-A 이소형 및/또는 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 항체일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 항체 B2, C5, D5, C8, F8, B7 또는 G9, 또는 그의 변이체의 하나 이상의 상보성 결정 구역 (CDR)을 포함하는, 피브로넥틴의 ED-A 이소형 및/또는 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 항체이다. 가장 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 항체 F8 또는 그의 변이체의 하나 이상의 상보성 결정 구역 (CDR)을 포함하는, 피브로넥틴의 ED-A 이소형 및/또는 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는 항체이다.

[0026] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 또는 G9의 H 및/또는 L CDR의 세트, 또는 H 및/또는 L CDR의 개시된 세트 내에 10개 이하, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 또는 G9의 H 및/또는 L CDR의 세트를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 H 및/또는 L CDR의 개시된 세트 내에 10개 이하, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 항체 B2, C5, D5, C8, F8, B7 또는 G9의 H 및/또는 L CDR의 세트를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 H 및/또는 L CDR의 개시된 세트 내에 10개 이하, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 치환을 갖는 항체 F8의 H 및/또는 L CDR의 세트를 포함한다.

[0027] 치환은 잠재적으로 CDR의 세트 내의 임의의 잔기에서 이루어질 수 있고, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 내에서 이루어질 수 있다.

[0028] 예를 들어, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 CDR의 세트를 형성하기 위해 본원에서 설명되는 바와 같은 하나 이상의 CDR, 예를 들어 CDR3, 및 임의로 또한 CDR1 및 CDR2를 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 또한 항체 분자, 예를 들어 인간 항체 분자를 포함할 수 있다. 결합 멤버는 보통은 항체 VH 및/또는 VL 도메인을 포함한다. 결합 멤버의 VH 도메인이 또한 본 발명에서 사용하기 위해 제공된다. 각각의 VH 및 VL 도메인 내에 상보성 결정 구역 ("CDR") 및 프레임워크 구역 ("FR")이 있다.

VH 도메인은 HCDR의 세트를 포함하고, VL 도메인은 LCDR의 세트를 포함한다. 항체 분자는 VH CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 항체 VH 도메인, 및 프레임워크를 포함할 수 있다. 이는 별법으로 또는 추가로 VL CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 항체 VL 도메인, 및 프레임워크를 포함할 수 있다. 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 및 G9의 VH 및 VL 도메인 및 CDR은 본원에 설명되어 있다. 본원에 개시된 모든 VH 및 VL 서열, CDR 서열, CDR의 세트 및 HCDR의 세트 및 LCDR의 세트는 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버의 실시태양을 나타낸다. 본원에서 설명될 때, "CDR의 세트"는 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 따라서, HCDR의 세트는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 나타내고, LCDR의 세트는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 나타낸다. 달리 언급하지 않으면, "CDR의 세트"는 HCDR 및 LCDR을 포함한다.

[0030] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 상보성 결정 구역 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 프레임워크를 포함하는 항체 VH 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 HCDR1은 서열 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 또는 113이고, 임의로 HCDR2는 서열 4이고/이거나 HCDR3은 서열 5이다. 바람직하게는, HCDR1은 서열 23, 33, 43, 53, 73, 83 또는 103이다. 가장 바람직하게는, HCDR1은 서열 83이다.

[0031] 전형적으로, VH 도메인은 VL 도메인과 짝을 이루어 항체 항원-결합 부위를 제공하지만, 아래에서 추가로 논의되는 바와 같이 VH 또는 VL 도메인은 단독으로 항원에 결합하도록 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 상보성 결정 구역 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 및 프레임워크를 포함하는 항체 VL 도메인을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 LCDR1은 서열 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 또는 116이고, 임의로 LCDR2는 서열 7이고/이거나 LCDR3은 서열 8이다. 바람직하게는, LCDR1은 서열 26, 36, 46, 56, 76, 86 또는 106이다. 가장 바람직하게는, LCDR1은 서열 86이다.

[0032] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는, 피브로넥틴의 ED-A에 대한 단리된 항체 분자일 수 있고, 여기서 VH 도메인은 프레임워크 및 상보성 결정 구역 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3의 세트를 포함하고, VL 도메인은 상보성 결정 구역 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 및 프레임워크를 포함하고,

[0033] 여기서, HCDR1은 서열 3, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103 또는 113의 아미노산 서열을 갖고;

[0034] HCDR2는 서열 4의 아미노산 서열을 갖고;

[0035] HCDR3은 서열 5의 아미노산 서열을 갖고;

[0036] LCDR1은 서열 6, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106 또는 116의 아미노산 서열을 갖고;

[0037] LCDR2는 서열 7의 아미노산 서열을 갖고;

[0038] LCDR3은 서열 8의 아미노산 서열을 갖는다.

[0039] 항체의 하나 이상의 CDR 또는 CDR의 세트는 본 발명에서 사용하기 위한 항체 분자를 제공하기 위해 프레임워크(예를 들어 인간 프레임워크) 내로 그라프팅 (grafting)될 수 있다. 프레임워크 구역은 인간 생식계열 유전자 세그먼트 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 프레임워크는 생식계열화될 수 있고, 그에 의해 프레임워크 내의 하나 이상의 잔기는 가장 유사한 인간 생식계열 프레임워크 내의 동등한 위치의 잔기에 일치하도록 변화된다. 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 인간 생식계열 프레임워크, 예를 들어 DP47 내에 HCDR의 세트를 포함하는 VH 도메인을 갖는 단리된 항체 분자일 수 있다. 보통은, 결합 멤버는 또한 예를 들어 인간 생식계열 프레임워크 내에 LCDR의 세트를 포함하는 VL 도메인을 갖는다. VL 도메인의 인간 생식계열 프레임워크는 DPK22일 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용하기 위한 VH 도메인은 서열 1, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101 또는 111의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 VH 도메인은 서열 21, 31, 41, 51, 71, 81 또는 101의 아미노산 서열을 갖는다. 가장 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 VH 도메인은 서열 81의 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명에서 사용하기 위한 VL 도메인은 서열 2, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102 또는 112의 아미노산 서열을 갖는다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 VL 도메인은 서열 22, 32, 42, 52, 72, 82 또는 102의 아미노산 서열을 갖는다. 가장 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 VL 도메인은 서열 82의 아미노산 서열을 갖는다.

[0041] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 펩티드 링커 (linker)를 통해 연결된 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 단일쇄 Fv (scFv)이거나 이를 포함할 수 있다. 숙련인은 예를 들어 길이가 적어도 5 또는 10개 아미노산, 길이가 약 15, 20 또는 25개 이하의 아미노산인 적절한 길이 및 서열의 링커를 선택할 수 있다. 링커는 아미노

산 서열 GSSGG (서열 28)를 가질 수 있다. scFv는 서열 9의 아미노산 서열로 이루어지거나 포함할 수 있다.

[0042] 단일쇄 Fv (scFv)는 예를 들어, 문헌 [Li et al., 1997]에 기재된 바와 같은 미니 (mini)-면역글로불린 또는 작은 면역단백질 (SIP) 내에 포함될 수 있다. SIP는 동종-이량체성 미니-면역글로불린 항체 분자를 형성하는, 인간 IgE 분비 이소형 IgE-S2 (ε_{S2}-CH4; Batista et al., 1996)의 CH4 도메인에 융합된 scFv 분자를 포함할 수 있다.

[0043] 별법으로, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 보통은 비-항체 단백질 스캐폴드 (scaffold) 내에 하나 이상의 CDR, 예를 들어 CDR의 세트에 의해 제공되는, 비-항체 분자 내에 항원-결합 부위를 포함할 수 있다. 비-항체 및 항체 분자를 비롯한 결합 멤버는 본원에서 보다 상세히 설명되어 있다.

[0044] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 살균 (biocidal), 세포독성, 면역억제 또는 소염 활성을 갖는 분자에 컨쥬게이팅될 수 있다. 인터루킨-10은 본 발명에 따라 결합 멤버와 컨쥬게이션을 위한 유익한 분자이고, 류마티스 관절염의 치료에 유용하다. 또한, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 방사성 동위원소, 검출가능한 표지 또는 광감작제 (photosensitizer)에 컨쥬게이팅될 수 있다.

[0045] 본 발명의 이들 및 다른 측면은 아래에서 보다 상세히 설명한다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 혈관신생의 마커에 대해 생성된 항체를 사용하는, 인간 관절염 시료에 대한 면역조직화학의 결과를 도시한 것이다. 보다 어두운 염색은 백색 화살표로 가시화되는, 항원의 강한 발현을 나타낸다. F8은 본원에 개시된 ED-A에 결합하는 항체 분자이고, L19는 ED-B에 결합하는 항체 분자이고 (예를 들어 [Pini et al. 1998]), F16 및 G11은 각각 테나신-C 도메인 A1 및 C에 결합하는 항체 분자이다 (WO2006/050834).

도 2는 피브로넥틴의 ED-A 도메인에 대해 생성된 F8 항체 분자를 사용하는, 인간 관절염 시료에 대한 면역형광 분석의 결과를 도시한 것이다. 백색 염색은 항원의 강한 발현을 나타낸다.

도 3은 A: 인간 ED-A (상부 서열) 및 B: 마우스 ED-A (하부 서열) 사이의 정렬을 보여준다. 별표는 인간 ED-A 및 마우스 ED-A의 아미노산이 동일한 아미노산 위치를 나타낸다.

도 4A는 항-ED-A 항체 H1 중쇄 (VH)의 뉴클레오티드 서열 (서열 12)를 보여준다. 항-ED-A 항체 H1의 중쇄 CDR1의 뉴클레오티드 서열은 밑줄친다. 항-ED-A 항체 H1의 중쇄 CDR2의 뉴클레오티드 서열은 *이탤릭체로 밑줄처서* 제시한다. 항-ED-A 항체 H1의 중쇄 CDR3의 뉴클레오티드 서열은 **굵은체로 밑줄처서** 제시한다.

도 4B는 항-ED-A 항체 H1 링커 서열의 뉴클레오티드 서열 (서열 14)을 보여준다.

도 4C는 항-ED-A 항체 H1 경쇄 (VL)의 뉴클레오티드 서열 (서열 13)을 보여준다. 항-ED-A 항체 H1의 경쇄 CDR1의 뉴클레오티드 서열은 밑줄친다. 항-ED-A 항체 H1의 경쇄 CDR2의 뉴클레오티드 서열은 *이탤릭체로 밑줄처서* 제시한다. 항-ED-A 항체 H1의 경쇄 CDR3의 뉴클레오티드 서열은 **굵은체로 밑줄처서** 제시한다.

도 5A는 항-ED-A 항체 H1 중쇄 (VH)의 아미노산 서열 (서열 1)을 보여준다. 항-ED-A 항체 H1의 중쇄 CDR1의 아미노산 서열 (서열 3)은 밑줄친다. 항-ED-A 항체 H1의 중쇄 CDR2의 아미노산 서열 (서열 4)은 *이탤릭체로 밑줄처서* 제시한다. 항-ED-A 항체 H1의 중쇄 CDR3의 아미노산 서열 (서열 5)은 **굵은체로 밑줄처서** 제시한다. 도 5B는 항-ED-A 항체 H1 링커 서열의 아미노산 서열 (서열 11)을 보여준다.

도 5C는 항-ED-A 항체 H1 경쇄 (VL)의 아미노산 서열 (서열 2)을 보여준다. 항-ED-A 항체 H1의 경쇄 CDR1의 아미노산 서열 (서열 6)은 밑줄친다. 항-ED-A 항체 H1의 경쇄 CDR2의 아미노산 서열 (서열 7)은 *이탤릭체로 밑줄처서* 제시한다. 항-ED-A 항체 H1의 경쇄 CDR3의 아미노산 서열 (서열 8)은 **굵은체로 밑줄***처서* 제시한다.

도 6은 F8-IL10에 대한 코딩 서열을 포함하는 핵산 구성체의 서열을 보여준다. 구조는 다음과 같이 HINDIII 분비 서열 F8 (14aa 링커) 링커 $(SSSSG)_3$-IL10-Stop-NotI이다: HINDIII 제한 부위는 밑줄치고, 분비 신호를 코딩하는 서열은 *이탤릭체*로 제시하고, F8 VH-코딩 서열은 분비 신호 서열 다음에 **굵은체**로 제시하고, 14개 아미노산 링커를 코딩하는 서열은 소문자로 제시하고, F8 VL-코딩 서열은 14개 아미노산 링커 서열 다음에 **굵은체**로 제시하고, 링커 $(SSSSG)_3$ 서열은 F8 코딩 서열 다음에 *밑줄치고 이탤릭체*로 제시하고, IL-10 코딩 서열은 이중-밑줄치고; 이어서, stop은 소문자로 제시한 후, NOTI 제한 부위는 밑줄친다.

도 7은 VH-링커-VL-링커-IL-10의 구조의 링커를 포함하는, 항체 scFv (F8) IL-10 컨쥬게이트의 아미노산 서열을

보여준다. VH 및 VL 도메인은 **굵은체**로 제시하고, scFv 링커는 소문자로 제시하고, scFv와 IL10 사이의 링커는 소문자로 *이탤릭체*로 제시하고, IL-10 서열은 밑줄친다.

도 8은 F8-IL10 및 HyHel10-IL10의 클로닝, 발현 및 정제를 예시한다:

도 8a는 F8-IL10 융합 단백질의 요소를 함유하는 pcDNA3.1 벡터의 개략도를 보여준다. 인간 IL10 모이어티(moiety)는 15개 아미노산 링커 $(SSSSG)_3$에 의해 scFv 항체 단편의 C-말단에 융합된다. N-말단에서 분비 서열은 재조합 단백질의 분비를 위해 요구된다.

도 8b는 정제된 융합 단백질의 SDS-PAGE 분석의 결과를 보여준다: 레인 1, 분자량 마커; 레인 2 & 3, 비-환원 및 환원 조건 하의 F8-IL10. 단량체성 융합 단백질은 분자량이 46 kDa인 것으로 예상된다.

도 8c는 정제된 F8-IL10의 크기 배제 크로마토그래피 프로필을 보여준다 (수퍼덱스 (Superdex) 200). 13 ml 체류 부피에서 용출하는 피크는 비-공유 동종이량체 형태의 F8-IL10에 대응하고, 14 ml 체류 부피에서 용출하는 보다 작은 피크는 단량체 분획에 대응한다.

도 8d는 F8-IL10의 활성 분석의 결과를 도시한 것이다. F8-IL10의 활성을 MC/9 세포에 대해 재조합 인간 IL10의 활성에 비교하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 용어

[0048] *피브로넥틴*

[0049] 피브로넥틴은 선택적 스플라이싱을 받는 항원이고, 많은 피브로넥틴의 대체적인 이소형이 본원에서 설명되는 바와 같이 알려져 있다. 엑스트라 도메인-A (EDA 또는 ED-A)는 또한 ED, 엑스트라 타입 III 리피트 (repeat) A (EIIIA) 또는 EDI로도 알려져 있다. 인간 ED-A의 서열은 문헌 [Kornblihtt et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868] 및 [Paolella et al. (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3545-3557]에 공개되었다. 인간 ED-A의 서열은 또한 SwissProt 데이타베이스에서 기탁 번호 P02751 하에 기탁된 아미노산 서열의 아미노산 1631-1720 (피브로넥틴 타입-III 12; 엑스트라 도메인 2)으로서 이용가능하다. 마우스 ED-A의 서열은 SwissProt 데이타베이스에서 기탁 번호 P11276 하에 기탁된 아미노산 서열의 아미노산 1721-1810 (피브로넥틴 타입-III 13; 엑스트라 도메인 2)으로서 이용가능하다.

[0050] 피브로넥틴의 ED-A 이소형 (A-FN)은 엑스트라 도메인-A (ED-A)를 함유한다. 인간 A-FN의 서열은 SwissProt 데이타베이스에서 기탁 번호 P02751 하에 이용가능한 상응하는 인간 피브로넥틴 전구체 서열로부터 추론할 수 있다. 마우스 A-FN의 서열은 SwissProt 데이타베이스에서 기탁 번호 P11276 하에 이용가능한 상응하는 마우스 피브로넥틴 전구체 서열로부터 추론할 수 있다. A-FN은 피브로넥틴의 인간 ED-A 이소형일 수 있다. ED-A는 인간 피브로넥틴의 엑스트라 도메인-A일 수 있다.

[0051] ED-A는 선택적 스플라이싱에 의해 피브로넥틴 (FN) 내로 삽입되고 FN의 도메인 11 및 12 사이에 위치하는 90개 아미노산 서열이다 (Borsi et al., 1987, J. Cell Biol., 104, 595-600). ED-A는 주로 혈장형의 FN 내에는 부재하지만, 배발생, 조직 재형성, 섬유증, 심장 이식 및 고형 종양 성장 동안에는 풍부하다.

[0052] *선택적 스플라이싱*

[0053] 선택적 스플라이싱은 상이한 mRNA를 생산하도록 DNA의 일차 RNA 전사체의 상이한 패턴의 스플라이싱의 발생을 나타낸다. 인트론의 절제 후에, 선택은 어떠한 엑손이 mRNA를 형성하도록 함께 스플라이싱될지 결정할 수 있다. 선택적 스플라이싱을 통해 상이한 엑손 및/또는 상이한 수의 엑손을 함유하는 상이한 이소형을 생산할 수 있다. 예를 들어, 하나의 이소형은 하나 이상의 엑손에 상응하는 추가의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이는 하나 이상의 도메인을 포함할 수 있다.

[0054] *결합 멤버*

[0055] 이는 서로에 대해 결합하는 한 쌍의 분자 중 하나의 멤버를 설명한다. 결합쌍의 멤버들은 자연에서 유래하거나, 전적으로 또는 부분적으로 합성 방식으로 생산할 수 있다. 분자들의 쌍의 하나의 멤버는 분자들의 쌍의 다른 멤버에 결합하고 따라서 그의 특정 공간적 및 극성 유기화에 상보적인 그의 표면 상의 일정 영역 또는 일정 공극 (cavity)을 갖는다. 결합쌍의 유형의 예에는 항원-항체, 비오틴-아비딘, 호르몬-호르몬 수용체, 수용체-리간드, 효소-기질이 있다. 본 발명은 항원-항체 유형 반응에 관한 것이다.

[0056] 결합 멤버는 보통은 항원-결합 부위를 갖는 분자를 포함한다. 예를 들어, 결합 멤버는 항체 분자, 또는 항원-결합 부위를 포함하는 비-항체 단백질일 수 있다.

[0057] 항원 결합 부위는 비-항체 단백질 스캐폴드, 예를 들어 피브로넥틴 또는 시토크롬 B 등의 상에 상보성 결정 구역 (CDR)의 정렬에 의해 ([Haan & Maggos, 2004]; [Koide 1998]; [Nygren 1997]), 또는 목적하는 표적에 대한 결합 특이성을 부여하도록 단백질 스캐폴드 내의 루프의 아미노산 잔기를 무작위화 또는 돌연변이시킴으로써 제공될 수 있다. 단백질에서 신규한 결합 부위를 공학처리하기 위한 스캐폴드는 문헌 [Nygren et al. (1997)]에서 상세히 검토되었다. 항체 모방체에 대한 단백질 스캐폴드는 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO/0034784에 개시되어 있고, 여기서 본 발명자들은 적어도 하나의 무작위화된 루프를 갖는 피브로넥틴 타입 III 도메인을 포함하는 단백질 (항체 모방체)을 설명한 바 있다. 하나 이상의 CDR, 예를 들어 HCDR의 세트를 그라프팅시키기 위해 적합한 스캐폴드는 면역글로불린 유전자 수퍼패밀리의 임의의 도메인 멤버에 의해 제공될 수 있다. 스캐폴드는 인간 또는 비-인간 단백질일 수 있다. 비-항체 단백질 스캐폴드의 한 가지 잇점은 적어도 일부의 항체 분자보다 더 작고/작거나 제조하기 더 쉬운 스캐폴드 분자 내에서 항원-결합 부위를 제공할 수 있다는 점이다. 작은 크기의 결합 멤버는 세포로 유입하거나, 조직 내로 깊게 관통하거나, 다른 구조 내의 표적에 도달하는 능력 또는 표적 항원의 단백질 공극 내에 결합하는 능력과 같은 유용한 생리학적 특성을 부여할 수 있다. 비-항체 단백질 스캐폴드에서 항원 결합 부위의 사용은 문헌 [Wess, 2004]에서 검토되었다. 안정한 백본과 하나 이상의 가변 루프를 갖는 단백질이 대표적이고, 여기서 루프(들)의 아미노산 서열은 표적 항원에 결합하는 항원-결합 부위를 생성하도록 특이적으로 또는 무작위로 돌연변이된다. 그러한 단백질은 에스. 아우레우스 (*S. aureus*)로부터의 단백질 A의 IgG-결합 도메인, 트랜스페린, 테트라넥틴, 피브로넥틴 (예를 들어 제10 피브로넥틴 타입 III 도메인) 및 리포칼린을 포함한다. 다른 방법은 분자내 디술피드 결합을 갖는 작은 단백질인 사이클로티드 (cyclotide)에 기반하는 합성 "마이크로바디 (Microbody)" (셀레코어 게엠베하 (Selecore GmbH))를 포함한다.

[0058] 항체 서열 및/또는 항원-결합 부위에 추가로, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 예를 들어 폴딩된 (folded) 도메인과 같은 펩티드 또는 폴리펩티드를 형성하거나, 항원에 결합하는 능력에 추가로 다른 기능적 특징을 분자에 부여하기 위해 다른 아미노산을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 검출가능한 표지를 보유할 수 있거나, 독소 또는 표적화 모이어티 또는 효소에 컨쥬게이팅될 수 있다 (예를 들어 펩티드 결합 또는 링커를 통해). 예를 들어, 결합 멤버는 촉매 부위 (예를 들어, 효소 도메인 내의)뿐만 아니라 항원 결합 부위를 포함할 수 있고, 여기서 항원 결합 부위는 항원에 결합하여 촉매 부위를 항원에 표적화시킨다. 촉매 부위는 예를 들어 절단에 의해 항원의 생물학적 기능을 억제할 수 있다.

[0059] 언급된 바와 같이, CDR은 비-항체 스캐폴드에 보유될 수 있지만, CDR 또는 CDR의 세트를 보유하기 위한 구조는 일반적으로, CDR 또는 CDR의 세트가 재배열된 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 천연 발생 VH 및 VL 항체 가변 도메인의 CDR 또는 CDR의 세트에 상응하는 위치에 위치하는 항체 중쇄 또는 경쇄 서열 또는 그의 실질적인 부분일 것이다. 면역글로불린 가변 도메인의 구조 및 위치는 현재 인터넷 상에서 이용가능한 문헌 [Kabat 1987] 및 그의 개정판 (immuno.bme.nwu.edu에서 또는 임의의 검색 엔진을 사용하여 "Kabat"를 검색)을 참고하여 결정할 수 있다.

[0060] CDR 구역 또는 CDR은 문헌 [Kabat et al. (1987)]에 규정된 바와 같은 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 초가변 구역을 나타내고자 의도된다 ([Kabat 1991a] 및 후속 개정판). 항체는 대개 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR을 함유한다. 용어 CDR 또는 CDR들은 경우에 따라, 항체가 인식하는 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 친화도에 의한 결합을 담당하는 대부분의 아미노산 잔기를 함유하는 이들 구역의 하나 또는 몇몇 또는 심지어 전체를 나타내기 위해 본원에서 사용된다.

[0061] 6개의 짧은 CDR 서열 중에서, 중쇄의 제3 CDR (HCDR3)의 크기 가변성이 더 크다 (본질적으로 그를 생성시키는 유전자의 정렬 메카니즘으로 인한 보다 큰 다양성). 이는 2개의 아미노산만큼 짧을 수 있지만, 알려진 가장 큰 크기는 26이지다. 기능적으로, HCDR3은 부분적으로 항체의 특이성의 결정에서 일정 역할을 한다 ([Segal 1974]; [Amit 1986]; [Chothia 1987]; [Chothia 1989]; [Caton 1990]; [Sharon 1990a]; [Sharon 1990b]; [Kabat et al., 1991b]).

[0062] *항체 분자*

[0063] 이는 천연의 것이든 부분적으로 또는 완전히 합성 방식으로 생산된 것이든 면역글로불린을 설명한다. 상기 용어는 또한 항체 항원-결합 부위를 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다. 본 발명은 천연 형태의 항체에 관련된 것이 아니고, 즉, 항체는 그의 천연 환경 내에 존재하는 것이 아니라, 천연 공급원으로부터

정제에 의해 단리 또는 정제되거나, 유전자 재조합에 의해 또는 화학적 합성에 의해 얻어질 수 있고, 따라서, 나중에 설명될 바와 같이 비천연 아미노산을 함유할 수 있음을 이해해야 한다. 항체 항원-결합 부위를 포함하는 항체 단편은 항체 분자, 예를 들어 Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd 및 디아바디 (diabody)를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0064] 모노클로날 및 다른 항체를 취하고, 표적 항원에 결합하는 다른 항체 또는 키메라 (chimera) 분자를 생산하기 위해 재조합 DNA 기술의 기술을 사용하는 것이 가능하다. 그러한 기술은 항체의 면역글로불린 가변 구역 또는 CDR을 코딩하는 DNA를 상이한 면역글로불린의 불변 구역, 또는 불변 구역 + 프레임워크 구역에 도입하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, EP-A-184187, GB 2188638A 또는 EP-A-239400 및 매우 많은 후속 문헌을 참조한다. 항체를 생산하는 하이브리도마 또는 다른 세포는 생산된 항체의 결합 특이성을 변경시킬 수 있거나 변경시킬 수 없는 유전자 돌연변이 또는 다른 변화를 거칠 수 있다.

[0065] 항체는 많은 방식으로 변형될 수 있기 때문에, 용어 "항체 분자"는 항원에 대한 요구되는 특이성 및/또는 결합을 갖는 항체 항원-결합 부위를 갖는 임의의 결합 멤버 또는 물질을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 상기 용어는 천연의 것이든 전적으로 또는 부분적으로 합성된 것이든 항체 항원-결합 부위를 포함하는 임의의 폴리펩티드를 포함하는 항체 단편 및 유도체를 포함한다. 따라서, 다른 폴리펩티드 (예를 들어 다른 종으로부터 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는)에 융합된 항체 항원-결합 부위, 또는 동등물을 포함하는 키메라 분자가 포함된다. 키메라 항체의 클로닝 및 발현은 EP-A-0120694 및 EP-A-0125023과 매우 많은 후속 문헌에 설명되어 있다.

[0066] 항체 공학 분야에서 이용가능한 추가의 기술로 인해 인간 및 인간화 항체를 단리하는 것이 가능해졌다. 예를 들어, 인간 하이브리도마는 문헌 [Kontermann & Dubel (2001)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 결합 멤버의 생성을 위한 다른 확립된 기술인 파지 디스플레이 (phage display)는 많은 간행물, 예를 들어 WO92/01047 (아래 추가로 논의됨) 및 미국 특허 US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 및 문헌 [Kontermann & Dubel (2001)]에 상세히 설명되어 있다. 마우스 항체 유전자가 불활성화되고 마우스 면역계의 다른 성분들을 무손상으로 유지하면서 인간 항체 유전자로 기능적으로 교체된 트랜스제닉 (transgenic) 마우스가 인간 항체를 단리하기 위해 사용될 수 있다 (Mendez 1997).

[0067] 합성 항체 분자는 예를 들어, 문헌 [Knappik et al. (2000)] 또는 [Krebs et al. (2001)]에 기재된 바와 같이 적합한 발현 벡터 내에서 합성되고 조립된 올리고뉴클레오티드에 의해 생성된 유전자의 발현에 의해 생성될 수 있다.

[0068] 전체 항체의 단편은 항원에 결합하는 기능을 수행할 수 있는 것으로 나타났다. 결합 단편의 예에는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어지는 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어지는 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어지는 Fv 단편; (iv) VH 또는 VL 도메인으로 이루어지는 dAb 단편 ([Ward 1989]; [McCafferty 1990]; [Holt 2003]); (v) 단리된 CDR 구역; (vi) $F(ab')_2$ 단편 (2개의 연결된 Fab 단편을 포함하는 2가 단편), (vii) 단일쇄 Fv 분자 (scFv) (여기서, VH 도메인 및 VL 도메인은 2개의 도메인이 회합하여 항원 결합 부위를 형성하도록 허용하는 펩티드 링커에 의해 연결된다 ([Bird 1988]; [Huston 1988]); (viii) 이중특이적 단일쇄 Fv 이량체 (PCT/US92/09965), 및 (ix) "디아바디" (유전자 융합에 의해 구성된 다가 또는 다중특이적 단편) (WO94/13804; [Holliger 1993a])가 있다. Fv, scFv 또는 디아바디 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 디술피드 다리의 포함에 의해 안정화될 수 있다 (Reiter 1996). CH3 도메인에 연결된 scFv를 포함하는 미니바디 (minibody)가 또한 제조될 수 있다 (Hu 1996). 결합 단편의 다른 예는 Fab'이고, 이는 항체 힌지 구역으로부터 하나 이상의 시스테인 및 Fab'-SH (불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 보유하는 Fab' 단편임)을 비롯하여, 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에서 수개의 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 상이하다.

[0069] 본 발명에서 사용하기 위한 항체 단편은 본원에서 설명되는 임의의 항체 분자, 예를 들어 본원에서 설명되는 임의의 항체의 VH 및/또는 VL 도메인 또는 CDR을 포함하는 항체 분자로부터 출발하여 펩신 또는 파파인과 같은 효소에 의한 소화 및/또는 화학적 환원에 의한 디술피드 다리의 절단과 같은 방법에 의해 얻을 수 있다. 다른 방식에서, 본 발명의 항체 단편은 마찬가지로 당업계의 숙련인에게 잘 공지된 유전자 재조합의 기술에 의해 또는 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems)사에서 제공되는 것 등과 같은 자동 펩티드 합성기에 의한 펩티드 합성에 의해, 또는 핵산 합성 및 발현에 의해 얻을 수 있다.

[0070] 본 발명에 따른 기능성 항체 단편은 화학적 변형, 특히 PEG화에 의해 또는 리포좀 내로의 포함에 의해 그의 반

감기가 증가된 임의의 기능적 단편을 포함한다.

[0071] dAb (도메인 항체)는 항체의 작은 단량체성 항원-결합 단편, 즉 항체 중쇄 또는 경쇄의 가변 구역이다 (Holt 2003). VH dAb는 카멜리드 (예를 들어 낙타, 라마)에서 자연적으로 발생하고, 카멜리드를 표적 항원으로 면역화시키고, 항원-특이적 B 세포를 단리하고, 개별 B 세포로부터 dAb 유전자를 직접 클로닝함으로써 생산할 수 있다. dAb는 또한 세포 배양액에서 생산가능하다. 그들의 작은 크기, 우수한 용해도 및 온도 안정성으로 인해 이들은 특히 생리학상 유용하고 선택 및 친화도 증진 (maturation)을 위해 적합하다. 본 발명의 결합 멤버는 실질적으로 본원에 제시된 바와 같은 VH 또는 VL 도메인, 또는 실질적으로 본원에 제시된 바와 같은 CDR의 세트를 포함하는 VH 또는 VL 도메인을 포함하는 dAb일 수 있다.

[0072] 본원에서 사용될 때, 어구 "실질적으로 제시된 바와 같은"은 본원에서 설명되는 결합 멤버의 VH 또는 VL 도메인의 관련 CDR의 특징이, 그의 서열이 본원에 제시된 특정 구역과 동일하거나 고도로 유사할 것임을 나타낸다. 하나 이상의 가변 도메인의 특정 구역(들)에 관하여 어구 "고도로 유사한"이 본원에서 설명될 때, 1 내지 약 5개, 예를 들어 1 내지 4개, 예를 들어 1 내지 3개, 또는 1 또는 2개, 또는 3 또는 4개의 아미노산 치환이 CDR 및/또는 VH 또는 VL 도메인에서 이루어질 수 있는 것으로 고려된다.

[0073] 이중특이적 또는 이중기능성 항체는 제2 세대 모노클로날 항체를 형성하고, 여기서 2개의 상이한 가변 구역이 동일한 분자 내에서 조합된다 (Holliger 1999). 그들의 용도는 새로운 효과기 기능을 동원하거나 종양 세포의 표면 상의 몇몇 분자를 표적화하는 그들의 능력에 의해 진단 영역 및 치료 영역 모두에서 입증되었다. 이중특이적 항체가 사용되어야 하는 경우에, 이들은 통상적인 이중특이적 항체일 수 있고, 이는 다양한 방식으로 (Holliger 1993b), 예를 들어 화학적으로 또는 하이브리드 하이브리도마로부터 제조될 수 있거나, 상기 언급된 임의의 이중특이적 항체 단편일 수 있다. 이들 항체는 화학적 방법 ([Glennie 1987]; [Repp 1995]) 또는 체세포 방법 ([Staerz 1986]; [Suresh 1986])에 의해 얻을 수 있지만, 마찬가지로 이종이량체화가 일어나도록 허용하여, 목적하는 항체의 정제 과정을 용이하게 하는 (Merchand 1998) 유전 공학 기술에 의해 얻을 수 있다. 이중특이적 항체의 예는 BiTE™ 기술의 것을 포함하고, 여기서 상이한 특이성을 갖는 2개의 항체의 결합 도메인이 사용되고 짧은 가요성 펩티드를 통해 직접 연결될 수 있다. 이는 짧은 단일 폴리펩티드 사슬 상에 2개의 항체를 조합시킨다. 디아바디 및 scFv는 가변 도메인만을 사용하여, Fc 구역 없이 구성될 수 있고, 이는 잠재적으로 항-개별특이형 반응의 효과를 감소시킨다.

[0074] 이중특이적 항체는 전체 IgG로서, 이중특이적 Fab'2로서, Fab' PEG로서, 디아바디로서 또는 이중특이적 scFv로서 구성될 수 있다. 또한, 2개의 이중특이적 항체는 당업계에 공지된 일상적 방법을 사용하여 연결되어 4가 항체를 형성할 수 있다.

[0075] 이중특이적 전체 항체와 달리, 이중특이적 디아바디는 이. 콜라이 (*E. coli*) 내에서 쉽게 구성되고 발현될 수 있기 때문에 또한 특히 유용할 수 있다. 적절한 결합 특이성의 디아바디 (및 많은 다른 폴리펩티드, 예를 들어 항체 단편)는 라이브러리 (library)로부터 파지 디스플레이 (WO94/13804)를 이용하여 쉽게 선택될 수 있다. 디아바디의 하나의 아암 (arm)이 예를 들어, 표적 항원에 대해 지정된 특이성을 갖고 일정하게 유지되어야 할 경우, 다른 아암이 변경된 라이브러리가 제조될 수 있고, 적절한 특이성의 항체가 선택될 수 있다. 이중특이적 전체 항체는 문헌 [Ridgeway 1996]에 기재된 바와 같은 대체적인 공학처리 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0076] 표적 항원에 대한 항체를 얻기 위해 다양한 방법이 당업계에서 이용가능하다. 항체는 모노클로날 항체, 특히 인간, 쥐, 키메라 또는 인간화 기원의 모노클로날 항체일 수 있고, 이는 당업계의 숙련인에게 잘 공지된 표준 방법에 따라 얻을 수 있다.

[0077] 일반적으로, 특히 쥐 기원의 모노클로날 항체 또는 그의 기능성 단편의 제조를 위해, 특히 매뉴얼 ["Antibodies" (Harlow and Lane 1988)]에 기재된 기술 또는 문헌 [Kohler and Milstein, 1975]에 기재된 하이브리도마로부터의 제조 기술을 참조하는 것이 가능하다.

[0078] 모노클로날 항체는 예를 들어, A-FN, 또는 상기 모노클로날 항체에 의해 인식되는 에피토프를 함유하는 하나의 그의 단편, 예를 들어 ED-A, 또는 ED-A의 펩티드 단편을 포함하거나 그로 이루어지는 단편에 대해 면역화시킨 동물 세포로부터 얻을 수 있다. A-FN, 또는 하나의 그의 단편은 특히 통상적인 처리 방법에 따라, A-FN 또는 그의 단편을 코딩하는 cDNA 서열에 함유된 핵산 서열을 사용하여 출발하는 유전자 재조합에 의해, A-FN 및/또는 그의 단편의 펩티드 서열에 포함되는 아미노산의 서열로부터 출발하는 펩티드 합성에 의해 생산할 수 있다.

[0079] 모노클로날 항체는 예를 들어, A-FN 또는 상기 모노클로날 항체에 의해 인식되는 에피토프를 함유하는 하나의 그의 단편, 예를 들어 ED-A 또는 ED-A의 펩티드 단편을 포함하거나 그로 이루어지는 단편을 미리 그 위에 고정

시킨 친화도 컬럼 상에서 정제할 수 있다. 모노클로날 항체는 단백질 A 및/또는 G 상의 크로마토그래피, 이어서 잔류 단백질 오염물뿐만 아니라 그 내부의 DNA 및 LPS를 제거하기 위한 이온 교환 크로마토그래피를 수행하거나 수행하지 않거나, 이어서 이량체 또는 다른 다량체의 존재로 인한 잠재적인 응집물을 제거하기 위해 세파로스 (Sepharose) 겔 상의 배제 크로마토그래피를 수행하거나 수행하지 않음으로써 정제할 수 있다. 이들 기술 전부는 동시에 또는 연속적으로 사용될 수 있다.

[0080] *항원-결합 부위*

[0081] 이는 표적 항원의 전부 또는 일부에 결합하고 그에 상보성인 분자의 일부를 설명한다. 항체 분자에서, 이는 항체 항원-결합 부위로서 언급되고, 표적 항원의 전부 또는 일부에 결합하고 그에 상보성인 항체의 부분을 포함한다. 항원이 크면, 항체는 항원의 특정 부분에만 결합할 수 있고, 상기 부분은 에피토프로 불린다. 항체 항원-결합 부위는 하나 이상의 항체 가변 도메인에 의해 제공될 수 있다. 항체 항원-결합 부위는 항체 경쇄 가변 구역 (VL) 및 항체 중쇄 가변 구역 (VH)을 포함할 수 있다.

[0082] *단리된*

[0083] 이는 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버 또는 그러한 결합 멤버를 코딩하는 핵산이 일반적으로 본 발명에 따라 존재할 상태를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 결합 멤버, VH 및/또는 VL 도메인은 예를 들어 그들의 천연 환경으로부터 단리된 및/또는 정제된 상태로, 실질적으로 순수한 또는 균질한 형태로, 또는 핵산의 경우에, 요구되는 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열 이외의 다른 기원의 핵산 또는 유전자가 없거나 실질적으로 없는 상태로 제공될 수 있다. 단리된 멤버 및 단리된 핵산은 그들이 자연에서 회합하는 물질, 예를 들어 그들의 천연 환경에서 또는 제조가 시험관 내에서 또는 생체 내에서 실시되는 재조합 DNA 기술에 의할 때 그들이 제조되는 환경 (예를 들어 세포 배양액)에서 그들과 함께 발견되는 다른 폴리펩티드 또는 핵산이 없거나 실질적으로 없을 것이다. 멤버 및 핵산은 희석제 또는 보조제 (adjuvant)를 사용하여 제형화되고 여전히 실시 목적을 위해 단리될 수 있고 - 예를 들어 멤버는 보통 면역분석에 사용하기 위한 미세적정판을 코팅하기 위해 사용되는 경우에 젤라틴 또는 다른 담체와 혼합될 것이거나, 진단 또는 치료법에서 사용될 때 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 혼합될 것이다. 결합 멤버는 자연적으로 또는 이종 진핵 세포 (예를 들어 CHO 또는 NSO (ECACC 85110503) 세포)의 시스템에 의해 글리코실화될 수 있거나, (예를 들어 원핵 세포 내에서 발현에 의해 생산되는 경우에) 비글리코실화될 수 있다.

[0084] 항체 분자를 포함하는 비균질 제제가 또한 본 발명에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 그러한 제제는 다양한 정도의 글리코실화를 갖고/갖거나 피로글루탐산 잔기를 형성하는 N-말단 글루탐산의 고리화와 같은 유도체화된 아미노산을 갖는, 전장 중쇄를 갖는 항체와 C-말단 라이신이 결핍된 중쇄를 갖는 항체의 혼합물일 수 있다.

[0085] 항원, 예를 들어 피브로넥틴의 A-FN 또는 ED-A에 대한 하나 이상의 결합 멤버는 본 발명에 따른 결합 멤버의 라이브러리 및 항원 또는 그의 단편, 예를 들어 ED-A 또는 ED-A의 펩티드 단편을 포함하거나 그로 이루어지는 단편을 접촉시키고, 항원에 결합할 수 있는 라이브러리의 하나 이상의 결합 멤버를 선택함으로써 얻을 수 있다.

[0086] 항체 라이브러리는 반복적 콜로니 필터 스크리닝 (Iterative Colony Filter Screening; ICFS)를 사용하여 스크리닝하였다. ICFS에서, 몇몇 결합 특이성을 코딩하는 DNA를 함유하는 세균을 액체 배지 내에서 성장시키고, 일단 지수 성장기에 도달하면, 이들 중 수십억 개를 적합하게 예비-처리된 막 필터로 이루어지는 성장 지지체 상에 분포시키고, 이를 완전히 융합된 (confluent) 세균 콜로니가 나타날 때까지 인큐베이팅하였다. 제2 트랩 (trap) 기질은 예비-가습되고 목적하는 항원으로 덮인 다른 막 필터로 이루어진다.

[0087] 이어서, 트랩 막 필터를 적합한 배양 배지를 함유하는 플레이트 상에 놓고, 세균 콜로니로 덮인 표면이 위를 향하도록 성장 필터로 덮는다. 이렇게 얻은 샌드위치를 실온에서 약 16 h 동안 인큐베이팅한다. 따라서, 트랩 막에 존재하는 항원과 특이적으로 결합하는 단편이 트래핑되도록, 펼침 작용 (spreading action)을 갖는 항체 단편 scFv를 코딩하는 유전자를 발현시킬 수 있다. 이어서, 그 목적으로 일반적으로 사용되는 비색 기술을 이용하여, 결합된 항체 단편 scFv를 제시하도록 트랩 막을 처리한다.

[0088] 트랩 필터 상의 발색된 지점의 위치는 상응하는 세균 콜로니로 돌아가도록 하고, 이는 성장 막 상에 존재하고 트래핑된 항체 단편을 생산한다. 그러한 콜로니를 모으고 성장시키고, 세균들 중 수백만 개를 새로운 배양 막 상에 분포시키고, 상기 설명된 절차를 반복한다. 이어서, 트랩 막 상의 양성 신호가, 그 각각이 선택에 사용된 항원에 대해 생성된 모노클로날 항체 단편의 가능한 공급원을 나타내는 단일 양성 콜로니에 대응할 때까지 유사한 사이클을 수행한다. ICFS는 예를 들어 본원에 참조로 포함된 WO0246455에 설명되어 있다. 라이브러리는 또한 입자 또는 분자 복합체, 예를 들어 복제가능한 유전자 패키지 (package), 예를 들어 박테리오파지 (예를 들

어 T7) 입자, 또는 다른 시험관내 디스플레이 시스템 상에 디스플레이될 수 있고, 여기서 각각의 입자 또는 분자 복합체는 그 위에 디스플레이되는 항체 VH 가변 도메인, 및 임의로 또한 존재하는 경우에 디스플레이된 VL 도메인을 코딩하는 핵산을 함유한다. 파지 디스플레이는 WO92/01047 및 예를 들어 미국 특허 US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 및 US6521404 (그 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에 기재되어 있다.

[0089] 항원에 결합할 수 있고 박테리오파지 또는 다른 라이브러리 입자 또는 분자 복합체 상에 디스플레이된 결합 멤버의 선택 후에, 핵산을 상기 선택된 결합 멤버를 디스플레이하는 박테리오파지 또는 다른 입자 또는 분자 복합체로부터 취할 수 있다. 그러한 핵산은 상기 선택된 결합 멤버를 디스플레이하는 박테리오파지 또는 다른 입자 또는 분자 복합체로부터 취한 핵산의 서열을 사용하여 핵산으로부터의 발현에 의한 후속적인 결합 멤버 또는 항체 VH 또는 VL 가변 도메인의 생산에서 사용될 수 있다.

[0090] 상기 선택된 결합 멤버의 항체 VH 가변 도메인의 아미노산 서열을 갖는 항체 VH 가변 도메인은 단리된 형태로 제공될 수 있고, 그러한 VH 도메인을 포함하는 결합 멤버도 또한 그러할 수 있다.

[0091] 피브로넥틴의 A-FN 또는 ED-A 또는 다른 표적 항원 또는 이소형에 결합하는 능력, 예를 들어 A-FN 또는 A-FN의 단편, 예를 들어 피브로넥틴의 ED-A에 결합하기 위해 임의의 하나의 항-ED-A 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 또는 G9와 경쟁하는 능력을 추가로 시험할 수 있다.

[0092] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 특이적으로 결합할 수 있다. 본 발명의 결합 멤버는 예를 들어 scFv 형식에서 항-ED-A 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 또는 G9와 동일한 친화도로, 또는 더 우수한 친화도로 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합할 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 3×10^{-8} M의 K_D 또는 더 우수한 친화도로 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 2×10^{-8} M의 K_D 또는 더 우수한 친화도로 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합한다. 보다 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 1.7×10^{-8} M의 K_D 또는 더 우수한 친화도로 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합한다. 더욱더 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 1.4×10^{-8} M의 K_D 또는 더 우수한 친화도로 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합한다. 가장 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 3×10^{-9} M의 K_D 또는 더 우수한 친화도로 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합한다. 본 발명의 결합 멤버는 항-ED-A 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 또는 G9와 동일한, 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A 상의 에피토프에 결합할 수 있다.

[0093] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A 이외의 다른 분자에 대해 임의의 유의한 결합을 보이지 않을 수 있다. 특히, 결합 멤버는 피브로넥틴의 다른 이소형, 예를 들어 피브로넥틴의 ED-B 이소형 및/또는 IIICS 이소형에 결합하지 않을 수 있다.

[0094] 본원에 개시되는 항체 분자의 변이체는 본 발명에서 생산되고 사용될 수 있다. CDR, 항체 VH 또는 VL 도메인 및 결합 멤버의 아미노산 서열 내에서 치환을 도입하기 위해 요구되는 기술은 일반적으로 당업계에서 이용가능하다. 변이체 서열은 활성에 대한 최소의 또는 유익한 효과를 갖는 것으로 예측될 수 있거나 예측될 수 없는 치환을 이용하여 제조되고, 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합하는 능력 및/또는 임의의 다른 목적하는 특성에 대해 시험될 수 있다.

[0095] 그의 서열이 본원에 구체적으로 개시된 임의의 VH 및 VL 도메인의 가변 도메인 아미노산 서열 변이체는 논의된 바와 같이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 특정 변이체는 하나 이상의 아미노산 서열 변경 (아미노산 잔기의 부가, 결실, 치환 및/또는 삽입)을 포함할 수 있고, 약 20개 미만의 변경, 약 15개 미만의 변경, 약 10개 미만의 변경 또는 약 5개 미만의 변경일 수 있고, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 변경일 수 있다. 변경은 하나 이상의 프레임워크 구역 및/또는 하나 이상의 CDR 내에서 이루어질 수 있다. 변경은 보통 기능 손실을 일으키지 않고, 따라서 이렇게 변경된 아미노산 서열을 포함하는 결합 멤버는 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합하는 능력을 보유할 수 있다. 예를 들어, 상기 결합 멤버는 예를 들어 본원에서 설명되는 분석으로 측정될 때 변경이 이루어지지 않은 결합 멤버와 동일한 정량적 결합을 보유할 수 있다. 이렇게 변경된 아미노산 서열을 포함하는 결합 멤버는 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합하는 능력이 개선될 수 있다.

[0096] 본 발명에서 사용하기 위한 CDR-유래 서열을 보유하는 신규한 VH 또는 VL 구역은 전체 가변 도메인 내에 돌연변이를 생성하기 위해 하나 이상의 선택된 VH 및/또는 VL 유전자의 무작위 돌연변이 유발을 이용하여 생성될 수 있다. 일부 실시태양에서, 1 또는 2개의 아미노산 치환이 전체 가변 도메인 또는 CDR의 세트 내에서 이루어진다. 사용할 수 있는 다른 방법은 VH 또는 VL 유전자의 CDR 구역에 돌연변이 유발을 지시하는 것이다.

[0097] 상기한 바와 같이, 실질적으로 본원에 기재된 바와 같은 CDR 아미노산 서열은 인간 항체 가변 도메인 또는 그의 실질적인 부분에서 CDR로서 보유될 수 있다. 실질적으로 본원에 기재된 바와 같은 HCDR3 서열은 본 발명의 실시태양을 나타내고, 예를 들어 이들은 각각 인간 중쇄 가변 도메인 또는 그의 실질적인 부분에서 HCDR3으로서 보유될 수 있다.

[0098] 본 발명에서 사용되는 가변 도메인은 임의의 생식계열 또는 재배열된 인간 가변 도메인으로부터 얻어지거나 유도될 수 있거나, 공지의 인간 가변 도메인의 컨센서스 또는 실제의 서열에 기반하는 합성 가변 도메인일 수 있다. 가변 도메인은 비-인간 항체로부터 유래할 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 CDR 서열 (예를 들어 CDR3)은 재조합 DNA 기술을 이용하여 CDR (예를 들어 CDR3)이 결핍되는 가변 도메인의 레퍼토리 (repertoire)로 도입될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Marks et al. (1992)]에서는 항체 가변 도메인의 레퍼토리를 생산하는 방법을 설명하고 있고, 여기서 가변 도메인 영역의 5' 단부에 유도되거나 그에 인접하는 컨센서스 프라이머는 컨센서스 프라이머와 함께 인간 VH 유전자의 제3 프레임워크 구역에 사용되어 CDR3이 결핍되는 VH 가변 도메인의 레퍼토리를 제공한다. 상기 문헌 [Marks et al.]에서는 상기 레퍼토리가 특정 항체의 CDR3과 조합될 수 있는 방법을 추가로 설명하고 있다. 유사한 기술을 사용하여, 본 발명의 CDR3-유래된 서열은 CDR3이 결핍되는 VH 또는 VL 도메인의 레퍼토리와 셔플링 (shuffling)될 수 있고, 셔플링된 완전 VH 또는 VL 도메인은 동족 (cognate) VL 또는 VH 도메인과 조합되어 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버를 제공할 수 있다. 이어서, 레퍼토리는 적합한 숙주 시스템, 예를 들어 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO92/01047 또는 임의의 매우 많은 후속 문헌 (예를 들어, Kay, Winter & McCafferty (1996))의 파지 디스플레이 시스템 내에서 디스플레이될 수 있어서, 적합한 결합 멤버가 선택될 수 있다. 레퍼토리는 10^4개 이상의 개별 멤버, 예를 들어 적어도 10^5, 적어도 10^6, 적어도 10^7, 적어도 10^8, 적어도 10^9 또는 적어도 10^{10}개의 멤버 중 임의의 것으로 이루어질 수 있다.

[0099] 이와 유사하게, 하나 이상 또는 3개 모두의 CDR은 VH 또는 VL 도메인의 레퍼토리 내로 그라프팅될 수 있고, 이어서 이를 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 대한 결합 멤버(들)에 대해 스크리닝한다.

[0100] 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 또는 G9의 하나 이상의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 또는 HCDR의 세트를 사용할 수 있고/있거나, 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 또는 G9의 하나 이상의 X LCDR1, LCDR2 및 LCDR3, 또는 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 또는 G9의 LCDR의 세트를 사용할 수 있다.

[0101] 이와 유사하게, 본원에 개시되는 다른 VH 및 VL 도메인, CDR의 세트 및 HCDR의 세트 및/또는 LCDR의 세트를 사용할 수 있다.

[0102] 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A는 류마티스 관절염의 치료용 의약의 제조에 사용하기 위한 결합 멤버, 예를 들어 항체 분자에 대한 스크리닝에서 사용될 수 있다. 스크리닝은 본원에서 개시되는 바와 같은 레퍼토리의 스크리닝일 수 있다.

[0103] 면역글로불린 가변 도메인의 실질적인 부분은 적어도 3개의 CDR 구역을 그들의 개재하는 프레임워크 구역과 함께 포함할 수 있다. 상기 부분은 또한 제1 및 제4 프레임워크 구역 중 하나 또는 둘 모두의 적어도 약 50%를 포함할 수 있고, 여기서, 50%는 제1 프레임워크 구역의 C-말단 50% 및 제4 프레임워크 구역의 N-말단 50%이다. 가변 도메인의 실질적인 부분의 N-말단 또는 C-말단 단부에서 추가의 잔기는 천연 발생 가변 도메인 구역과 정상적으로 회합되어 있는 것일 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 기술에 의해 제조된 본 발명의 결합 멤버의 구성은 클로닝 또는 다른 조작 단계를 용이하게 하기 위해 도입된 링커에 의해 코딩되는 N- 또는 C-말단 잔기를 도입시킬 수 있다. 다른 조작 단계는 본원에서 보다 상세히 논의된 바와 같이 본원에서 개시되는 가변 도메인을 항체 불변 구역, 다른 가변 도메인 (예를 들어 디아바디의 생산에서) 또는 검출가능한/기능적 표지를 포함하는 추가의 단백질 서열에 연결하기 위한 링커의 도입을 포함한다.

[0104] 결합 멤버는 VH 및 VL 도메인의 쌍을 포함할 수 있지만, VH 또는 VL 도메인 서열에 기반한 단일 결합 도메인이 또한 본 발명에서 사용될 수 있다. 단일 면역글로불린 도메인, 특히 VH 도메인은 특이적 방식으로 표적 항원에 결합할 수 있는 것으로 알려져 있다 (예를 들어, 상기 dAb의 논의 참조).

[0105] 단일 결합 도메인의 경우에, 이들 도메인은 피브로넥틴의 A-FN 및/또는 ED-A에 결합할 수 있는 2-도메인 결합 멤버를 형성할 수 있는 상보성 도메인에 대해 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된 WO92/01047에 개시된 바와 같은 소위 계층적 이중 조합 방안을 이용하는 파지 디스플레이 스크리닝 방법에 의해 달성할 수 있고, 여기서 H 또는 L 사슬 클론을 함유하는 개별 콜로니는 다른 사슬 (L 또는 H)을 코딩하는 클론의 완전 라이브러리를 감염시키기 위해 사용되고, 생성되는 2-사슬 결합 멤버는 본원에 설명되는 것과 같은 파지 디스플레이 기술에 따라 선택된다. 상기 기술은 문헌 [Marks 1992]에 또한 개시되어 있다.

[0106] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 항체 불변 구역 또는 그의 일부, 예를 들어 인간 항체 불변 구역 또는 그의 일부를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, VL 도메인은 그의 C-말단 단부에서, 인간 Cκ 또는 Cλ 사슬, 예를 들어 Cλ를 포함하는 항체 경쇄 불변 도메인에 부착될 수 있다. 이와 유사하게, VH 도메인에 기반한 결합 멤버는 그의 C-말단 단부에서, 임의의 항체 이소형, 예를 들어 IgG, IgA, IgE 및 IgM 및 임의의 이소형 하위-클래스, 특히 IgG1 및 IgG4로부터 유래하는 면역글로불린 중쇄의 전부 또는 일부 (예를 들어 CH1 도메인)에 부착될 수 있다. 이들 특성을 갖고 가변 구역을 안정화시키는 임의의 합성 또는 다른 불변 구역 변이체가 또한 본 발명의 실시태양에서 유용하다.

[0107] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 검출가능한 또는 기능적 표지로 표지될 수 있다. 표지는 형광물질, 방사성 표지, 효소, 화학발광물질 또는 광감작제를 포함하고 이로 제한되지 않는, 신호를 생산하거나 신호를 생산하도록 유도될 수 있는 임의의 분자일 수 있다. 따라서, 결합은 형광 또는 발광, 방사성, 효소 활성 또는 광흡수를 검출함으로써 검출 및/또는 측정될 수 있다. 검출가능한 표지는 당업계에 공지된 통상적인 화학을 이용하여 본 발명에서 사용하기 위한 항체에 부착될 수 있다.

[0108] 외부 수단에 의해, 예를 들어, 시각 검사, 전자기 방사선, 열, 및 화학 시약에 의해 표지가 검출가능한 수단을 생성할 수 있도록 하는 수많은 방법이 존재한다. 표지는 또한 본 발명에서 사용하기 위한 항체에 결합하는 다른 결합 멤버, 또는 지지체에 결합될 수 있다.

[0109] 표지된 결합 멤버, 예를 들어 검출가능한 표지로 표지된 scFv는 진단용으로 생체 내에서, 생체 외에서 또는 시험관 내에서, 및/또는 치료용으로 사용될 수 있다.

[0110] 예를 들어, 방사성 표지된 결합 멤버 (예를 들어, 방사성 동위원소에 컨쥬게이팅된 결합 멤버)는 방사선 진단 및 방사선 요법에서 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버에 컨쥬게이팅될 수 있는 방사성 동위원소는 ^{94m}Tc, ^{99m}Tc, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{203}Pb, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{47}Sc, ^{111}In, ^{97}Ru, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{86}Y, ^{88}Y, ^{90}Y, ^{121}Sn, ^{161}Tb, ^{153}Sm, ^{166}Ho, ^{105}Rh, ^{177}Lu, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I 및 ^{131}I와 같은 동위원소를 포함한다.

[0111] 예를 들어, 검출가능한 표지로 표지된 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 인간 또는 동물에서 류마티스 관절염을 검출, 진단 또는 모니터링하기 위해 사용될 수 있다.

[0112] 본 발명의 결합 멤버는 류마티스 관절염을 진단하는데 사용하기 위한 진단 제품의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0113] 본 발명은 (a) 인간 또는 동물에게, 피브로넥틴의 ED-A 이소형 및/또는 피브로넥틴의 ED-A에 결합하는, 예를 들어 검출가능한 표지로 표지된 본 발명의 결합 멤버를 투여하고,

[0114] (b) 인간 또는 동물 신체의 신생혈관에서 결합 멤버의 존재 또는 부재를 결정하는 것

[0115] 을 포함하는, 인간 또는 동물에서 류마티스 관절염을 검출 또는 진단하는 방법을 제공하고;

[0116] 여기서 인간 또는 동물에서 신생혈관에 대한 결합 멤버의 국재화는 류마티스 관절염의 존재를 표시한다.

[0117] 결합 멤버가 검출가능한 표지로 표지되는 경우에, 검출가능한 표지의 존재 또는 부재는 표지를 검출함으로써 결정할 수 있다.

[0118] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버 및 병변 내의 표적 세포에 대해 살균, 세포독성, 면역억제 또는 소염 효과를 발휘하는 분자 및 그러한 병변 내에 존재하는 세포외 매트릭스 성분에 대해 생성된 항체 사이의 컨쥬게이트 또는 융합체가 본 발명에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 컨쥬게이팅된 분자는 특히 인터루킨-10, 소염 또는 다른 약물, 광감작제 또는 방사성 핵종일 수 있다. 그러한 컨쥬게이트는 본원에서 언급한 바와 같이 예를 들어 류마티스 관절염의 치료를 위해 치료용으로 사용될 수 있다.

[0119] 결합 멤버와 살균 또는 세포독성 분자의 융합체 또는 컨쥬게이트의 생산 및 사용은 예를 들어 본원에 참조로 포함된 WO01/62298에 설명되어 있다.

[0120] 본 발명은 개체에게 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버를 포함하는 의약의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 류마티스 관절염의 치료 방법을 제공한다.

[0121] 결합 멤버는 (i) 세포성 상호작용에 의해 표적 세포에 대해 소염 효과를 발휘하는 분자, 소염 분자, IL-10, TGF 베타, 또는 다른 약물, 및 (ii) 피브로넥틴의 ED-A 이소형 및/또는 피브로넥틴의 ED-A에 대한 결합 멤버의 컨쥬게이트일 수 있다.

[0122] 결합 멤버는 (i) 면역억제 또는 소염 효과를 발휘하는 분자, 및 (ii) 피브로넥틴의 ED-A 이소형 및/또는 피브로넥틴의 ED-A에 대한 결합 멤버의 컨쥬게이트일 수 있다.

[0123] 결합 멤버는 (i) 인터루킨-10 (IL10) 또는 TGF 베타, 및 (ii) 피브로넥틴의 ED-A 이소형 및/또는 피브로넥틴의 ED-A에 대한 결합 멤버의 컨쥬게이트일 수 있다. 그러한 결합 멤버는 류마티스 관절염의 치료에 관해 본원에 개시된 본 발명의 측면에서 유용하다.

[0124] 본 발명은 류마티스 관절염의 치료용 의약의 제조를 위한, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버의 용도를 제공한다.

[0125] 결합 멤버는 본원에서 설명되는 바와 같이 살균, 세포독성, 면역억제 또는 소염 효과를 발휘하는 분자에 컨쥬게이팅되거나 융합될 수 있다. 결합 멤버는 (i) 세포성 상호작용에 의해 표적 세포에 대해 살균 또는 세포독성 효과를 발휘하거나 면역억제 또는 소염 효과를 갖는 분자, 및 (ii) 본 발명에 따른 인간 피브로넥틴에 대한 결합 멤버의 컨쥬게이트일 수 있다.

[0126] (i) 세포성 상호작용에 의해 표적 세포에 대해 살균 또는 세포독성 효과를 발휘하거나 면역억제 또는 소염 효과를 갖는 분자, 및 (ii) 본 발명에서 사용하기 위한 인간 피브로넥틴에 대한 결합 멤버의 컨쥬게이트가 또한 본원에서 설명된다. 그러한 컨쥬게이트는 바람직하게는 살균, 세포독성, 면역억제 또는 소염 분자 및 상기 결합 멤버를 포함하는 융합 단백질, 또는 결합 멤버가 2-사슬 또는 다수-사슬인 경우에, 살균, 세포독성, 면역억제 또는 소염 분자 및 상기 결합 멤버의 폴리펩티드 사슬 성분을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 바람직하게는, 결합 멤버는 단일쇄 폴리펩티드, 예를 들어 단일쇄 항체 분자, 예를 들어 scFv이다.

[0127] 면역억제 또는 소염 분자 및 단일쇄 Fv 항체 분자를 포함하는 융합 단백질이 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0128] 세포성 상호작용에 의해 표적 세포에 대한 그의 효과를 발휘하는 면역억제 또는 소염 분자는 표적 세포와 직접적으로 상호작용할 수 있거나, 표적 세포 상의 막-결합형 수용체와 상호작용하거나 세포막의 전기화학적 전위를 동요시킬 수 있다. 예시적인 바람직한 실시태양에서, 분자는 IL-10이다.

[0129] 아래에서 추가로 논의되는 바와 같이, 특이적 결합 멤버는 바람직하게는 항체이거나 항체 항원-결합 부위를 포함한다. 편리하게는, 특이적 결합 멤버는 단일쇄 폴리펩티드, 예를 들어 단일쇄 항체일 수 있다. 이는 단일쇄 항체 및 면역억제 또는 소염 분자 (예를 들어 인터루킨-10 또는 TGF 베타)를 포함하는 융합 단백질의 편리한 생산을 허용한다. 항체 항원-결합 부위는 별개의 폴리펩티드에서, 예를 들어 완전 항체 또는 항체-단편, 예를 들어 Fab 또는 디아바디에서 항체 VH 도메인 및 항체 VL 도메인의 회합에 의해 제공될 수 있다. 특이적 결합 멤버가 2-사슬 또는 다수-사슬 분자 (예를 들어 각각 Fab 또는 전체 항체)인 경우에, 면역억제 또는 소염 분자는 특이적 결합 멤버 내의 하나 이상의 폴리펩티드 사슬과 융합 폴리펩티드로서 컨쥬게이팅될 수 있다.

[0130] 결합 멤버는 면역억제 또는 소염 분자와 펩티드 결합에 의해, 즉, 상기 분자 및 특이적 결합 멤버 또는 그의 폴리펩티드 사슬 성분을 포함하는 융합 폴리펩티드 내에서 컨쥬게이팅될 수 있다 (예를 들어, [Trachsel et al.] 참조). 컨쥬게이션을 위한 다른 수단은 화학적 컨쥬게이션, 특히 이중기능적 시약을 사용하는 (예를 들어 DOUBLE-REAGENTS™ Cross-linking Reagents Selection Guide (피어스)를 사용하는) 가교결합을 포함한다.

[0131] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버를 코딩하는 단리된 핵산을 또한 본원에서 설명한다. 핵산은 DNA 및/또는 RNA를 포함할 수 있다. 핵산은 상기 정의한 바와 같이 CDR 또는 CDR의 세트 또는 VH 도메인 또는 VL 도메인 또는 항체 항원-결합 부위 또는 항체 분자, 예를 들어 scFv 또는 IgG, 예를 들어 IgG1을 코딩할 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 본원에 개시된 VH 및/또는 VL 도메인을 코딩할 수 있다.

[0132] 상기 설명된 바와 같은 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 플라스미드, 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태의 구성체를 추가로 본원에서 설명한다.

[0133] 상기한 하나 이상의 구성체를 포함하는 재조합 숙주 세포를 또한 설명한다. 제공된 바와 같은 임의의 CDR 또는 CDR의 세트 또는 VH 도메인 또는 VL 도메인 또는 항체 항원-결합 부위 또는 항체 분자, 예를 들어 scFv 또는

IgG1 또는 IgG4를 코딩하는 핵산을 설명하고, 코딩 핵산으로부터의 발현을 포함하는 코딩된 생성물의 생산 방법을 또한 설명한다. 발현은 적절한 조건 하에 핵산을 함유하는 재조합 숙주 세포를 배양함으로써 편리하게 달성할 수 있다. 발현에 의한 생산 후에, VH 또는 VL 도메인, 또는 결합 멤버는 임의의 적합한 기술을 이용하여 단리 및/또는 정제되고, 이어서 적절하게 사용될 수 있다.

[0134] 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있고, 전적으로 또는 부분적으로 합성될 수 있다. 본원에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 언급할 때 명시된 서열을 갖는 DNA 분자를 포함하고, 문맥에서 달리 요구되지 않으면 U가 T를 치환하는 명시된 서열을 갖는 RNA 분자를 포함한다.

[0135] 코딩 핵산으로부터 발현을 유도하는 것을 포함하는 항체 VH 가변 도메인의 생산 방법을 또한 설명한다. 그러한 방법은 숙주 세포를 상기 항체 VH 가변 도메인의 생산을 위한 조건 하에 배양하는 것을 포함할 수 있다.

[0136] 생산 방법은 생산물의 단리 및/또는 정제 단계를 포함할 수 있다. 생산 방법은 생산물을 적어도 하나의 추가의 성분, 예를 들어 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물로 제형화하는 것을 포함할 수 있다.

[0137] 다양한 상이한 숙주 세포 내에서 폴리펩티드의 클로닝 및 발현을 위한 시스템은 잘 알려져 있다. 적합한 숙주 세포는 세균, 포유동물 세포, 식물 세포, 사상 진균, 효모 및 바큘로바이러스 시스템 및 트랜스제닉 식물 및 동물을 포함한다. 원핵 세포 내에서 항체 및 항체 단편의 발현은 당업계에서 잘 확립되어 있다. 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Pluecthun 1991]을 참조한다. 일반적인 세균 숙주는 이. 콜라이이다.

[0138] 배양액 내에서 진핵 세포 내에서의 발현이 또한 결합 멤버의 생산을 위한 선택사항으로서 당업계의 숙련인에게 이용가능하다 (예를 들어 문헌 [Chadd & Chamow (2001)], [Andersen & Krummen (2002)], [Larrick & Thomas (2001)]). 이종 폴리펩티드의 발현을 위해 당업계에서 이용가능한 포유동물 세포주는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장 세포, NS0 마우스 흑색종 세포, YB2/0 래트 골수종 세포, 인간 배아 신장 세포, 인간 배아 망막 세포 등을 포함한다.

[0139] 적절하게 프로모터 서열, 종결자 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 다른 서열을 비롯한 적절한 조절 서열을 포함하는 적합한 벡터를 선택하거나 구성할 수 있다. 벡터는 적절하게 플라스미드, 예를 들어 파지미드, 또는 바이러스 플라스미드, 예를 들어 파지일 수 있다. 추가의 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Sambrook & Russell (2001)]을 참조한다. 예를 들어 핵산 구성체의 제조, 돌연변이 유발, 서열 결정, 세포 내로 DNA의 도입 및 유전자 발현, 및 단백질의 분석에서 핵산의 조작을 위한 많은 공지의 기술 및 프로토콜은 문헌 [Ausubel 1999]에 상세히 설명되어 있다.

[0140] 숙주 세포는 본원에서 설명되는 핵산을 함유할 수 있다. 그러한 숙주 세포는 시험관 내에 존재할 수 있고, 배양액 내에 존재할 수 있다. 그러한 숙주 세포는 생체 내에 존재할 수 있다. 숙주 세포의 생체내 존재는 "인트라바디 (intrabody)" 또는 세포내 항체로서 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버의 세포내 발현을 허용한다. 인트라바디는 유전자 요법을 위해 사용될 수 있다.

[0141] 본원에 개시된 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 방법을 또한 설명한다. 도입은 임의의 이용가능한 기술을 사용할 수 있다. 진핵 세포에 대해, 적합한 기술은 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란, 전기천공, 리포좀-매개된 형질감염, 및 레트로바이러스 또는 다른 바이러스, 예를 들어 우두바이러스, 또는 곤충 세포에 대해 바큘로바이러스를 사용하는 형질도입을 포함할 수 있다. 핵산을 숙주 세포, 특히 진핵 세포 내에 도입하기 위해 바이러스 또는 플라스미드 기반 시스템을 사용할 수 있다. 플라스미드 시스템은 에피좀 상태로 유지될 수 있거나 숙주 세포 또는 인공 염색체 내로 포함될 수 있다. 포함은 단일 로커스 (locus) 또는 다수 로커스에서 하나 이상의 카피의 무작위 또는 표적화 통합에 의할 수 있다. 세균 세포에 대해, 적합한 기술은 염화칼슘 형질전환, 전기천공 및 박테리오파지를 사용하는 형질감염을 포함할 수 있다.

[0142] 도입 후에, 예를 들어 숙주 세포를 유전자의 발현을 위한 조건 하에 배양함으로써 핵산으로부터 발현을 유도하거나 허용할 수 있다. 발현된 생성물의 정제는 당업계의 숙련인에게 공지된 방법에 의해 달성할 수 있다.

[0143] 핵산은 숙주 세포의 게놈 (예를 들어 염색체) 내로 통합될 수 있다. 통합은 표준 기술에 따라 게놈과의 재조합을 촉진하는 서열의 포함에 의해 촉진될 수 있다.

[0144] 상기와 같이 결합 멤버 또는 폴리펩티드를 발현시키기 위해 발현 시스템에서 상기한 바와 같은 구성체를 사용하는 것을 포함하는 방법을 또한 설명한다.

[0145] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 인간 또는 동물 대상, 예를 들어 인간의 진단 또는 치료 방법에서 사용되도록 설계된다. 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 류마티스 관절염의 진단 또는 치료에서 사용될 수

있다.

[0146] 따라서, 본 발명은 제공된 바와 같은 결합 멤버의 투여를 포함하는 치료 방법, 그러한 결합 멤버를 포함하는 제약 조성물, 및 투여용 의약의 제조에서, 예를 들어, 결합 멤버를 제약상 허용되는 부형제와 함께 제형화하는 것을 포함하는 의약 또는 제약 조성물의 제조 방법에서 그러한 결합 멤버의 용도를 제공한다. 제약상 허용되는 비히클은 잘 알려져 있고, 선택된 활성 화합물(들)의 성질 및 투여 방식의 함수로서 당업계의 숙련인에 의해 조정될 것이다.

[0147] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 대체로 제약 조성물 형태로 투여될 것이고, 이는 결합 멤버에 추가로 적어도 하나의 성분을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 제약 조성물은 본 발명에 따라 사용하기 위해 활성 성분에 추가로, 제약상 허용되는 부형제, 담체, 버퍼, 안정화제 또는 당업계의 숙련인에게 잘 알려져 있는 다른 물질을 포함할 수 있다. 그러한 물질은 무독성이고, 활성 성분의 효능을 저해하지 않아야 한다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은 경구, 흡입 또는 주사, 예를 들어 정맥내 주사에 의할 수 있는 투여 경로에 따라 좌우될 것이다.

[0148] 예를 들어 나노바디 (nanobody)와 같은 경구 투여용 제약 조성물이 또한 본 발명에서 고안된다. 그러한 경구 제형은 정제, 캡슐, 분말, 액체 또는 반-고체 형태로 존재할 수 있다. 정제는 고체 담체, 예를 들어 젤라틴 또는 보조제를 포함할 수 있다. 액체 제약 조성물은 일반적으로 액체 담체, 예를 들어 물, 석유, 동물유 또는 식물유, 광물 오일 또는 합성 오일을 포함한다. 생리 염수 용액, 덱스트로스 또는 다른 당류 용액 또는 글리콜, 예를 들어 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이 포함될 수 있다.

[0149] 정맥내 주사를 위해 또는 병소 부위에 주사를 위해, 활성 성분은 발열원이 없고 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구로 허용되는 수용액 형태일 것이다. 당업계에서 관련 숙련인은 적합한 용액을 예를 들어, 등장성 비히클, 예를 들어 염화나트륨 주사액, 링거 (Ringer) 주사액, 유산화 (Lactated) 링거 주사액을 사용하여 제조할 수 있다. 방부제, 안정화제, 버퍼, 항산화제 및/또는 다른 첨가제를 요구되는 대로 사용할 수 있다. 제약 제형의 제조를 위한 많은 방법은 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다 (예를 들어 Robinson, 1978 참조).

[0150] 조성물은 치료할 병태에 따라 단독으로 또는 다른 치료제와 조합으로, 다른 치료제(들)과 동시에 또는 순차적으로 또는 조합된 제제로서 투여될 수 있다.

[0151] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 추가의 의약 성분과 함께 조합 요법의 일부로서 사용될 수 있다. 조합 치료, 특히 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버와 하나 이상의 다른 약물의 조합은 유의한 상승 효과를 제공하도록 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 본원에 나열된 병태 중 하나 이상의 치료를 위해 다른 치료제(들)과 동시에 또는 순차적으로 또는 조합된 제제로서 투여될 수 있다.

[0152] 예를 들어, 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버는 류마티스 관절염의 치료를 위한 기존의 치료제와 조합으로 사용될 수 있다.

[0153] 류마티스 관절염의 치료를 위한 기존의 치료제는 IL-10, TGF베타, 광감작제 및 세포독성 약물을 포함한다.

[0154] 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버 및 하나 이상의 상기 추가의 의약 성분이 의약의 제조에서 사용될 수 있다. 의약은 개체에게 별개 또는 조합 투여를 위한 것일 수 있고, 따라서 결합 멤버 및 추가의 성분을 조합 제제로서 또는 별개의 제제로서 포함할 수 있다. 별개의 제제는 별개의 순차적인 또는 동시 투여를 용이하게 하도록 사용될 수 있고, 상이한 경로, 예를 들어 경구 및 비경구 투여에 의한 성분들의 투여를 허용한다.

[0155] 본 발명에 따라, 제공된 조성물은 포유동물에게 투여될 수 있다. 투여는 "치료 유효량"으로 이루어질 수 있고, 이는 환자에게 잇점을 보여주기에 충분한 양이다. 그러한 잇점은 적어도 하나의 증상의 적어도 개선일 수 있다. 따라서, "류마티스 관절염의 치료"는 적어도 하나의 증상의 개선을 나타낸다. 실제 투여량, 및 투여 속도 및 시간 경과는 치료할 질병의 성질과 심도, 치료할 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 질환의 원인, 조성물의 전달 부위, 결합 멤버의 종류, 투여 방법, 투여 스케줄 및 의료 담당자에게 공지된 다른 인자에 따라 결정될 것이다. 치료의 처방, 예를 들어 투여량 등에 대한 결정은 일반의 및 다른 의사의 책임 범위 내에 있고, 증상의 심도 및/또는 치료되는 질병의 진행에 따라 결정될 수 있다. 항체의 적절한 용량은 당업계에 잘 공지되어 있다 ([Ledermann 1991] 및 [Bagshawe 1991]. 투여되는 의약의 종류에 대해 적절한 것으로서 본원에 또는 문헌 [Physician's Desk Reference (2003)]에 나타낸 구체적인 투여량을 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 결합 멤버의 치료 유효량 또는 적합한 용량은 그의 시험관내 활성 및 동물 모델에서 생체내 활성을 비교함으로써 결정할 수 있다. 마우스 및 다른 시험 동물의 유효 투여량을 인간에 대해 외삽하기 위한 방법은 공지되어 있다. 정확한 용량은 항체가 진단, 예방 또는 치료용인지, 치료할 영역의 크기 및 위치, 항체 (예

를 들어 전체 항체, 단편 또는 디아바디)의 정확한 성질, 항체에 부착된 임의의 검출가능한 표지 또는 다른 분자의 성질을 비롯한 많은 인자에 따라 결정될 것이다. 전형적인 항체 용량은 전신 적용을 위해 100 ㎍ 내지 1 g, 및 국소 적용을 위해 1 ㎍ 내지 1 mg일 것이다. 초기의 보다 높은 로딩 용량 후에 하나 이상의 보다 적은 용량이 투여될 수 있다. 항체는 전체 항체, 예를 들어 IgG1 또는 IgG4 이소형일 수 있다. 이는 성인 환자의 단일 치료를 위한 용량이고, 이는 어린이 및 유아를 위해 비례적으로 조정될 수 있고, 또한 분자량에 비례하여 다른 항체 형식에 대해 조정될 수 있다. 치료는 의사의 재량에 따라 매일, 매주 2회, 매주 또는 매월 간격으로 반복될 수 있다. 치료는 피하 투여를 위해 2 내지 4주마다, 정맥내 투여를 위해 4 내지 8주마다 시행될 수 있다. 본 발명의 일부 실시태양에서, 치료는 주기적이고, 투여 사이의 주기는 약 2주 이상, 예를 들어 약 3주 이상, 약 4주 이상, 또는 약 매달 1회이다. 본 발명의 다른 실시태양에서, 치료는 수술 전에 및/또는 후에 제공될 수 있고, 수술적 치료의 해부학적 부위에 직접 투여되거나 적용될 수 있다.

[0156] 본 발명의 추가의 측면 및 실시태양은 다음 실험예를 포함하는 본원의 개시내용을 통해 당업계의 숙련인에게 명백할 것이다.

[0157] *실험 결과*

[0158] *인간 관절염 시료의 조직화학적 분석*

[0159] 피브로넥틴 도메인 EDA 및 EDB 및 테나신-C 도메인 A1 및 C의 발현을 각각 F8, L19, F16 및 G11을 사용하여 인간 관절염 시료에 대한 면역조직화학에 의해 조사하였다.

[0160] 도 1에서, 보다 어두운 염색은 각각의 항원 (백색 화살표로 표시됨)의 발현을 나타낸다. 항-EDA 항체 F8이 가장 강한 염색을 유도하였고, 따라서 추가의 모든 실험은 이 항체를 사용하여 수행하였다.

[0161] 양호한 혈관 주위 염색 (도 2에 백색 구조로 가시화됨)을 보인 F8 항체를 사용한 면역형광 실험을 수행하였다.

[0162] *인간 모노클로날 항체 F8은 마우스의 관절염 부위에 선택적으로 축적된다.*

[0163] 본 발명자들은 항체 검출을 위해 형광 및 방사성을 모두 사용하는 CIA 마우스 모델 (Courtney et al. 1980)에서 미니-항체 방식 (SIP) (Borsi et al. 2002)에서의 F8의 생체내 표적화 성능을 연구하였다. SIP 방식은 크기가 80 kDa인 동종이량체 단백질을 생성시키는, 인간 IgE의 CH4 도메인에 연결된 scFv 항체 단편으로 이루어진다.

[0164] 관절염 마우스에게 근적외선 염료 Alexa 750으로 표지된 SIP(F8)를 주사하였다. 정맥내 주사 24시간 후에, 근적외선 형광 영상 장치 (Birchler et al., 1999)를 사용하여 동물의 영상을 찍었고, 백색으로 빛나는 발로서 가시적인 관절염성 사지에 존재하는 병변에 강한 선택적인 항체 축적이 나타났고, 마우스의 앞발에 일부의 등급 2 부종이 존재하였다.

[0165] ^{125}I로 방사성 표지된 SIP(F8)의 정맥내 주사 24시간 후에, 마우스를 희생시키고, 자가방사선촬영술 (포스포르이미징 (phosphorimaging))에 의해 발 영상을 촬영하였다. 방사능의 우선적인 축적은 SIP(F8)을 주사한 마우스의 염증이 발생한 사지에서 관찰되었고, 자가방사선촬영술에서 검정 염색으로 가시화되었다. 하나의 발은 2의 관절염 스코어 (전체 발의 부종)을 보였다. 다른 발은 등급 1 관절염 (발가락 하나의 부종)으로서 분류되었다.

[0166] *항-ED-A 항체-인터루킨-10 융합체의 활성*

[0167] scFv 방식의 항체 분자 F8을 인터루킨-10 (IL-10)과 융합 단백질 내에 컨쥬게이팅시켰다. 융합 단백질의 생물학적 활성을 MC/9 세포의 IL-4 의존 증식을 유도하는 능력을 결정하는 분석 (Thompson et al., 1991)에서 인간 IL-10과 비교하였다. 결과를 도 8(d)에 제시한다.

[0168] *재료 및 방법*

[0169] *인간 관절염 시료에 대한 면역조직화학 분석*

[0170] 인간 관절염 시료의 동결 절편을 빙냉 아세톤 내에서 10' 동안 고정시키고, 소 태아 혈청으로 30' 동안 차단하고, 신생혈관의 마커 (피브로넥틴 ED-A 및 ED-B, 테나신-C 도메인 A1 및 C)에 대해 염색하였다. F8, L19, F16 및 G11 항체를 10 ㎍/ml의 농도로 myc-태깅된 (tagged) scFv로서 사용하고, 1h 동안 인큐베이팅하였다. 일차 항체를 항-myc 항체 9E10과 7 ㎍/ml의 농도로 동시 인큐베이팅하였다. 3차 검출 항체로서, 토끼 항-마우스 IgG 항체 (다코 (Dako, 덴마크)) 및 APAAP 마우스 모노클로날 항체 (다코)를 각각 1h 동안 각각 5 및 50 ㎍/ml의 농도로 사용하였다. 15' 동안 인큐베이팅한 염색을 발색시키기 위해 패스트 레드 태블릿 (Fast Red Tablet) (시그마 (Sigma), 스위스)을 사용하였다. 슬라이드를 헤마톡실린으로 2' 동안 역염색하고, 물로 세척하고, 글리세

르겔 (Glycergel) 봉입제 (다코)로 봉입하고, Axiovert S100 TV 현미경 (자이스 (Zeiss, 스위스))으로 분석하였다.

[0171] *인간 관절염 시료에 대한 면역형광 분석*

[0172] 인간 관절염 시료의 동결 절편을 빙냉 아세톤 내에서 10' 동안 고정시키고, 소 태아 혈청으로 30' 동안 차단하고, 피브로넥틴의 EDA 도메인에 대해 염색하였다. F8 항체를 10 μg/ml의 농도로 myc-태깅된 scFv로서 사용하고, 1h 동안 인큐베이팅하였다. 일차 항체를 항-myc 항체 9E10과 7 μg/ml의 농도로 동시 인큐베이팅하였다. 3차 검출 항체로서, 형광 항-마우스-Alexa 596 항체 (몰레큘라 프로브스 (Molecular Probes, 덴마크))를 1h 동안 10 μg/ml의 농도로 사용하였다. 슬라이드를 획스트 (Hoechst) 33342로 역염색하고, 글리세르겔 봉입제 (다코)로 봉입하고, AxioScop 2MOT+ 현미경 (자이스)으로 분석하였다.

[0173] *동물 모델*

[0174] 수컷 DBA/1 마우스 (8-12주령)를, 등부피의 프로인트 (Freund) 완전 어쥬번트 (adjuvant) (엠디 바이오사이언시스)로 유화된 200 μg의 소 타입 II 콜라겐 (엠디 바이오사이언시스 (MD Biosciences))을 꼬리의 기저부에 피내 주사함으로써 면역화시켰다. 제1 면역화 2주 후에, 절차를 반복하되, 불완전 프로인트 어쥬번트 (엠디 바이오사이언시스)를 사용하여 콜라겐을 유화시켰다. 마우스를 매일 검사하고, 1개 이상의 사지에서 홍반 및/또는 발 부종을 보인 각각의 마우스를 영상화 또는 치료 연구를 위해 배정하였다.

[0175] 관절염은 2개의 질병 지수 (임상 스코어 및 발 부종)를 사용하여 모니터링하였다. 임상 스코어를 위해, 각각의 사지를 매일 비맹검 방식 (not blinded fashion)으로 등급을 매겼고 (0 = 정상, 1 = 동일한 사지의 1개 이상의 발가락의 부종, 2 = 전체 발의 부종), 동물당 가능한 최대 스코어는 8이었다. 발 부종은 이소플루란 마취 하에서 각각의 사지의 두께를 측정하기 위해 측경기를 사용하여 2일마다 평가하였다. 4개의 모든 발의 평균값을 각각의 동물의 발 두께로 결정하였다.

[0176] *관절염성 발의 근적외선-영상화*

[0177] 관절염 마우스에서 SIP(F8)의 선택적인 축적은 문헌 [Birchler et al. (1999)]에 기재된 바와 같은 근적외선-영상화 분석으로 시험하였다. 간단히 설명하면, 정제된 SIP(F8)을 제조자의 권고 사항에 따라 Alexa750 (몰레큘라 프로브스, 네덜란드 레이덴)로 표지하고, 100 μg의 표지된 단백질을 관절염 마우스의 꼬리 정맥 내로 주사하였다. 마우스를 케타민 80 mg/kg 및 메데토미딘 0.2 mg/kg으로 마취하고, 주사 24 hr 후에 근적외선-마우스 영상화 장치(mouseimager)로 영상화하였다 ([Trachsel et al. 2007]; [Birchler et al. 1999]).

[0178] *생체분포 실험*

[0179] 관절염 마우스에서 SIP(F8)의 생체내 표적화 성능을 문헌 ([Borsi et al. 2002]; [Tarli et al., 1999])에 기재된 바와 같은 생체분포 분석에 의해 평가하였다. 간단히 설명하면, 정제된 SIP(F8)을 방사선 요오드화하고, 11 uCi ^{125}I에 상응하는 10 μg의 단백질을 관절염 마우스의 꼬리 정맥 내로 주사하였다. 마우스를 주사 24 hr 후에 희생시키고, 발을 1시간 동안 노출시키고, 문헌 (Trachsel et al. 2007)에 기재된 바와 같이 포스포르이미저 (phosphorimager) (후지필름 (Fujifilm) BAS-5000)로 판독하였다.

[0180] *항체*

[0181] 항-ED-B 항체 단편 scFv(L19)의 단리는 문헌 (Pini et al. 1998)에 기재된 바 있다. 모 항-ED-A 항체를 문헌에 발표된 절차 (Giovannoni, Nucleic. Acid Research, 2001, 29(5):E27)를 사용하여 ETH-2 라이브러리로부터 단리하였다. 고 친화도 항-ED-A 항체를 생성시키는 모 항-ED-A 항체의 친화도 증진은 다음 섹션에서 설명된다.

[0182] *모 항-ED-A 항체의 친화도 증진*

[0183] 모 항-ED-A 항체 (ETH-2-유래 항체)는 친화도 증진 라이브러리의 제조를 위한 주형으로서 사용되었다. 라이브러리의 VH CDR1 (DP47 생식계열) 및 VL CDR1 (DPK22 생식계열) 내의 서열 가변성은 VH CDR1의 위치 31, 32 및 33에서 및 VL CDR1의 위치 31, 31a 및 32에서 무작위 돌연변이를 생성시키는 과정으로, VH에 대해 부분 퇴화성 (degenerate) 프라이머 5'-CTGGAGCCTGGCGGACCCAGCTCATMNNMNNMNNGCTAAAGGTGAATCCAGA-3' (서열 17) 및 VL에 대해 5'-CCAGGTTTCTGCTGGTACCAGGCTAAMNNMNNMNNGCTAACACTCTGACTGGCCCTGC-3' (서열 18)을 사용하여 PCR에 의해 도입하였다 (모든 올리고뉴클레오티드는 오페론 바이오테크놀로지스 (Operon Biotechnologies, 독일 쾰른)로부터 구입하였다). VHVL 조합은 겔-정제된 VH 및 VL 세그먼트를 주형으로 사용하여 프라이머 LMB31ong (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') (서열 19) 및 fdseqlong (5'-GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3') (서열 2

0)을 사용하는 PCR 조립에 의해 scFv 방식으로 조립하였다. 조립된 VH-VL 단편은 NcoI/NotI으로 이중으로 소화시키고, NcoI/NotI-소화시킨 pHEN1 파지미드 벡터 (Hoogenboom et al., 1991) 내로 클로닝하였다. 생성되는 라이게이션 생성물을 문헌 (Viti et al., 2000)에 따라 전기수용성 (electrocompetent) 이. 콜라이 TG-1 세포 내로 전기천공하여 1.5 x 10^7개의 개별적인 항체 클론을 함유하는 라이브러리를 생성시키고, 친화도가 개선된, ED-A에 결합하는 항체에 대해 스크리닝하였다.

[0184] *항-ED-A 항체의 선택*

[0185] 상기 설명된 항체 라이브러리를 비아코어 (BIAcore) 분석을 사용하여 모 항-ED-A 항체보다 더 큰 친화도로 ED-A에 결합한 항체에 대해 스크리닝하였다. 비아코어 분석에 사용된 항원 (11A12)은 인간 피브로넥틴의 ED-A 도메인을 함유하였고, 다음 아미노산 서열 (서열 120)을 보유하였다:

[0186] MRSYRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQ
TEMTIEGLQPTVEYVVSVYAQNPSGESQPLVQTAVTNIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWES
PQGQVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPL
IGTQSTAIPAPTDLKFTQVTPTSLSAQWTPPNVQLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDS
SSVVVSGLMVATKYEVSVYALKDTLTSRPAQGVVTTLENVRSHHHHHH

[0187] 항원 (11A12)의 뉴클레오티드 서열 (서열 121)은 다음과 같다:

[0188] atgagatcctaccgaacagaaattgacaaaccatcccagatgcaagtgaccgatgttcaggacaa
cagcattagtgtcaagtggctgccttcaagttcccctgttactggttacagagtaaccaccactc
ccaaaaatggaccaggaccaacaaaaactaaaactgcaggtccagatcaaacagaaatgactatt
gaaggcttgcagcccacagtggagtatgtggttagtgtctatgctcagaatccaagcggagagag
tcagcctctggttcagactgcagtaaccaacattgatcgccctaaaggactggcattcactgatg
tggatgtcgattccatcaaaattgcttgggaaagcccacaggggcaagtttccaggtacagggtg
acctactcgagccctgaggatggaatccatgagctattccctgcacctgatggtgaagaagacac
tgcagagctgcaaggcctcagaccgggttctgagtacacagtcagtgtggttgccttgcacgatg
atatggagagccagcccctgattggaacccagtccacagctattcctgcaccaactgacctgaag
ttcactcaggtcacacccacaagcctgagcgcccagtggacaccacccaatgttcagctcactgg
atatcgagtgcgggtgacccccaaggagaagaccggaccaatgaaagaaatcaaccttgctcctg
acagctcatccgtggttgtatcaggacttatggtggccaccaaatatgaagtgagtgtctatgct
cttaaggacactttgacaagcagaccagctcagggagttgtcaccactctggagaatgtcagatc
tcatcaccatcaccatcactaa

[0189] 각각 5' 및 3'에 BamHI 및 BglII 제한 부위를 함유하는 프라이머 사용하는 PCR에 의해 항원의 뉴클레오티드 서열을 증폭하였다. 생성되는 PCR 산물 및 벡터 pQE12 (퀴아겐 (QIAGEN))를 BamHI 및 BglII 제한 엔도뉴클레아제로 소화시킨 후, 3:1의 삽입물 대 벡터의 비를 함유하는 반응물에서 라이게이션시켰다. 서열이 정확한지를 조사하기 위해 생성되는 벡터의 서열을 결정하였다.

[0190] *항원 제제*

[0191] 10 ml 2TY, Amp, 1% 글루코스 내의 TG1 전기수용성 예비배양액을 1 ㎕의 11A12의 DNA 미니프렙 (miniprep)의 존재 하에 전기천공하였다. 이어서, 예비배양액을 1:100으로 희석하고 (800 ml의 2TY, Amp, 0.1% 글루코스 중의 8 ml), 0.4-0.6의 OD600으로 성장시킨 후, IPTG로 철야 유도하였다. 다음 날, 세포를 원심분리하고, 상등액을 여과하였다 (밀리포어 (Millipore) 0.22 ㎛). 원심분리 및 배양액의 청정화 후에, FPLC의 하이트랩(Hitrap) 컬럼을 사용하여 11A12를 정제하였다. Ni/컬럼을 다음과 같이 재생하였다: 컬럼을 5 컬럼 부피 (CV)의 H_2O로 세척한 후, 3CV 0.5 M EDTA/0.2 M Tris (pH 8)를 적용하여 컬럼으로부터 오래된 니켈을 세척하였다. 이어서, 컬럼을 5CV H_2O로 세척하였다. 이어서, 컬럼에 2CV 100 mM $NiSO_4$를 재로딩한 후, 컬럼을 수 CV의 H_2O로 세척하였다. 이어서, 컬럼을 5CV 용해 버퍼 (20 mM 이미다졸/250 mM NaCl/PBS pH 7.4)로 평형화시켰다. 세포 용해물을 여과하고 (밀리포어 0.45 ㎛), 컬럼에 로딩하였다 (수동으로). 이어서, 컬럼을 다시 FPLC에 적용하고, UV 신호가 안정할 (일정할) 때까지 용해 버퍼를 유동시켰다 (약 3 CV). 이어서, 용출 프로그램을 시작하였다: 0%로부터 100%의 용출 버퍼 (400 mM 이미다졸/250 mM NaCl/PBS pH 7.4)의 구배 (5CV). 용출된 항원을 함유하는 분획을 모으고, PBS에서 철야 투석하였다.

[0192] *항-ED-A 항체의 발현 및 정제*

[0193] 항-ED-A 항체를 다음과 같이 발현시키고 정제하였다: 10 ml 2TY, Amp, 1% 글루코스 내의 TG1 전기수용성 예비배

양액을 1 ㎕의 항-ED-A 항체 중의 하나의 DNA 미니프렙의 존재 하에 전기천공하였다. 이어서, 예비배양액을 1:100으로 희석하고 (800 ml의 2TY, Amp, 0.1% 글루코스 중의 8 ml), 0.4-0.6의 OD600으로 성장시킨 후, IPTG로 철야 유도하였다. 다음 날, 세포를 원심분리하고, 상등액을 여과하였다 (밀리포어 (Millipore) 0.22 ㎛). scFv는 단백질 A-세파로스 컬럼 상에서 정제하고, 트리에틸아민을 사용하여 컬럼으로부터 scFv를 용출시켰다. 용출된 scFv를 함유하는 분획을 PBS에서 4℃에서 철야 투석하였다. 이어서, scFv 분획을 수퍼덱스 75 컬럼에 넣고, PBS를 0.5 ml/min으로 유동시키고, 0.25 ml 분획을 수거하였다. 단량체 분획을 비아코어 분석에 사용하였다.

[0194] *비아코어™ 분석 1*

[0195] 비아코어™ 칩을 HBS-EP 버퍼 비아코어™, 0.01 M Hepes pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P20 (분석을 위해 사용된 것과 동일한 버퍼)로 5 ㎕/min의 유속으로 철야 세정하였다. 항원 (11A12)을 아세테이트 버퍼 (pH 4.0) 내에 50 ㎍/ml의 농도로 희석하고, 50 ㎕의 N-히드록시 숙신이미드 (NHS)와 에틸-N-(디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 (EDC)의 혼합물을 주사하여 칩 상의 COOH기를 활성화시켰다. 40 ㎕의 11A12 항원을 칩 상에 주사하고, 잔류 유리 COOH기를 30 ㎕의 에탄올아민으로 차단하였다. 0.22 ㎛ 여과 후에, 20 ㎕의 각각의 개별적인 세균 상등액을 칩 상에 주사하고, 항원과의 상호작용을 실시간으로 모니터링하였다.

[0196] *비아코어™ 분석 2*

[0197] 모 항-ED-A 항체 및 항-ED-A 항체 B2, C5, D5, C8, F8, B7 및 G9의 k_{on}, k_{off} 및 K_D를 표면 플라스몬 공명 (Surface Plasmon Resonance)을 사용하여 평가하였다. 칩을 분석 동안 사용된 것과 동일한 버퍼로 5 ㎕/min의 버퍼 유속으로 철야 평형화시켰다. 전체 코팅 절차는 상기 유속으로 수행하였다. 항원 11A12를 아세테이트 버퍼 (pH 4.00) (비아코어™에 의해 제공됨)를 사용하여 20 ㎍/ml의 최종 농도로 1:25로 희석하였다. 이어서, NHS 및 EDC를 혼합하고, 50 ㎕를 주사하여 CM5 칩 상의 COOH기를 활성화시켰다. 이어서, 40 ㎕의 항원을 주사하였다 (약 40초 동안 지속됨). 이어서, 30 ㎕의 에탄올아민을 주사하여 최종적인 유리 COOH의 반응성을 차단하였다.

[0198] 각각의 샘플을 20 ㎕/min의 유속에서 분석하였다. 20 ㎕의 비희석된 단량체 단백질 (겔 여과로부터 배출될 때)을 주사하였다. 해리 시간은 약 200초 동안 전개되도록 하는 시간이었다. 이어서, 10 ㎕의 HCl (10 mM)을 주사하여 칩을 재생하였다. 단량체 단백질의 주사를 상이한 희석률, 즉 1:2 희석률 (PBS 중의)에서 반복한 후, HCl로 재생하였다. 이어서, 단백질을 1:4의 희석률에서 3차 주사한 후, HCl로 다시 재생하였다. 각각의 항-ED-A 항체의 k_{on}, k_{off} 및 K_D 값을 비아이벨류에이션(BIAevaluation) 소프트웨어를 사용하여 평가하였다.

[0199] *항-ED-A 항체의 선택*

[0200] *비아코어™ 분석 1*

[0201] 비아코어™ 분석을 통해, 항원에 대한 항체의 친화도를 추론하기 위해 분석된 각각의 항-ED-A 항체에 대한 다음과 같은 그래프를 얻었다: 각각의 그래프의 x축은 시간에 대응하고, y축은 공명 단위 (Resonance Unit) (비아코어™ 칩 상에 코팅된 항원에 대한 시험된 항체의 결합 친화도를 나타내는 척도)에 대응한다. 각각의 그래프는 3개의 피크 및 1개의 골을 보이고, 이는 버퍼의 변화에 대응하고, 따라서 결과 해석과 무관한 것이다.

[0202] 각각의 그래프의 상승 부분은 회합기를 나타낸다. 그래프의 상기 부분에서 곡선이 보다 가파를수록 항체의 항원과의 회합이 더 빠르다. 각각의 그래프의 하강부는 항원으로부터 항체의 해리기를 나타낸다. 그래프의 상기 부분에서 곡선이 보다 평탄할수록 항원으로부터 항체의 해리가 더 느리다.

[0203] 항-ED-A 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 및 G9는 모두 이들이 그로부터 유도되는 모 항-ED-A 항체보다 더 평탄한 해리 곡선을 보였고, 이는 이들이 ED-A에, 따라서 A-FN에도 모 항-ED-A 항체보다 더 큰 친화도로 결합함을 나타낸다. 항체 E5, F1, F8 및 H1에 대한 그래프는 시험된 모든 항-ED-A 항체의 가장 평탄한 해리 곡선을 보였다. 항체 H1, C5, D5, E5, C8, F8 및 F1의 회합 곡선은 모 항-ED-A 항체에 대해 관찰된 것보다 더 평탄한 반면에, 항체 B2, B7, E8 및 G9에 대해 관찰된 회합 곡선은 모 항-ED-A 항체에 대해 관찰된 회합 곡선만큼 가팔랐다. 그러나, IPTG-유도 이. 콜라이 TG-1 세포의 세균 상등액을 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 및 G9의 비아코어™ 분석을 위해 사용하였기 때문에, 시험된 항체 샘플의 농도는 알 수 없는 상태이지만, 비교를 위해 사용된 모 항-ED-A 항체 샘플의 농도보다 낮을 가능성이 가장 크다. 결과적으로, 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 및 G9의 회합 곡선은 비아코어™ 분석을 위해 사용된 샘플 내의 항체의 낮은 농도 때문에 인공적으로 낮을 수 있다. 그러나, 농도는 비아코어™ 분석에서 그의 표적 항원으로부터

항체의 해리에 유의한 영향을 주지 않기 때문에, 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 및 G9에 대해 관찰된 평탄한 해리 곡선은 이들 항체가 모 항-ED-A 항체에 비해 적어도 동일한, 아마도 더 높은 친화도로 ED-A에 결합함을 보여준다.

[0204] *비아코어 분석 2*

[0205] 각각의 항-ED-A 항체에 대한 k_{on}, k_{off} 및 K_D 값을 비아이벨류에이션 소프트웨어를 사용하여 평가하였다. 항원 11A12에 대한 모 항-ED-A 항체 및 항-ED-A 항체 B2, C5, D5, C8, F8, B7 및 G9의 k_{on}, k_{off} 및 K_D 값을 표 2에 상세히 제시한다. 항-ED-A 항체 B2, C5, D5, C8, F8, B7 및 G9는 모두 이들이 그로부터 유도되는 모 항-ED-A 항체보다 더 우수한, 항원 11A12에 대한 K_D 값을 갖고, 이는 이들이 ED-A에, 따라서 A-FN에도 모 항-ED-A 항체보다 더 큰 친화도로 결합함을 나타낸다.

[0206] *서열*

[0207] 항-ED-A 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 및 G9는 모두 scFv 항체이고, 통상적인 방법을 사용하여 서열을 결정하였다. 항-ED-A 항체 H1의 뉴클레오티드 서열을 도 4에 제시한다. 항-ED-A 항체 H1의 아미노산 서열을 도 5에 제시한다.

[0208] 항-ED-A 항체 B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 및 G9의 VH 및/또는 VL을 코딩하는 바람직한 뉴클레오티드 서열은 항-ED-A 항체 H1의 VH 및/또는 VL을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 동일하되, 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)의 H1 CDR1을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 각각의 항체에 대해 표 1에 제시된 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH) CDR1을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 치환된다.

[0209] 항-ED-A scFv F8 디아바디의 VH 및/또는 VL을 코딩하는 바람직한 뉴클레오티드 서열은 항-ED-A 항체 H1의 VH 및/또는 VL을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 동일하되, 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)의 H1 CDR1을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 항-ED-A 항체 F8에 대해 표 1에 제시된 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH) CDR1을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 치환된다. 항-ED-A scFv F8 디아바디의 VH 및 VL을 연결하는 링커를 코딩하는 바람직한 뉴클레오티드 서열은 gggtccagtggcggt (서열 29)이다.

[0210] 항-ED-A 항체 B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8 및 G9는 항-ED-A 항체 H1과 동일한 아미노산 서열을 갖되, 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)의 H1 CDR1의 아미노산 서열은 각각의 항체에 대해 표 1에 제시된 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH) CDR1의 아미노산 서열로 치환된다. 항-ED-A scFv F8 디아바디의 아미노산 서열은 항-ED-A 항체 H1의 아미노산 서열과 동일하되, 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)의 H1 CDR1의 아미노산 서열은 항-ED-A 항체 F8에 대해 표 1에 제시된 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH) CDR1의 아미노산 서열로 치환되고, H1의 링커의 아미노산 서열은 링커 아미노산 서열 GSSGG (서열 28)로 치환된다.

[0211] 항-ED-A 항체 B2 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 21)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 23이 H1의 VH CDR1을 치환한다.

[0212] 항-ED-A 항체 C5 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 41)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 43이 H1의 VH CDR1을 치환한다.

[0213] 항-ED-A 항체 D5 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 51)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 53이 H1의 VH CDR1을 치환한다.

[0214] 항-ED-A 항체 E5 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 61)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 63이 H1의 VH CDR1을 치환한다.

[0215] 항-ED-A 항체 C8 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 71)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 73이 H1의 VH CDR1을 치환한다.

[0216] 항-ED-A 항체 F8 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 81)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 83이 H1의 VH CDR1을 치환한다. 항-ED-A F8 디아바디의 VH 도메인은 항-ED-A 항체 F8의 VH 도메인 (즉, 서열 81)과 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0217] 항-ED-A 항체 F1 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 91)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 93이 H1의 VH CDR1을 치환한다.

[0218] 항-ED-A 항체 B7 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 101)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동

일하되, 서열 103이 H1의 VH CDR1을 치환한다.

[0219] 항-ED-A 항체 E8 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 111)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 113이 H1의 VH CDR1을 치환한다.

[0220] 항-ED-A 항체 G9 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열 31)은 항-ED-A 항체 H1의 VH 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 33이 H1의 VH CDR1을 치환한다.

[0221] 항-ED-A 항체 B2 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 22)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 26이 H1의 VL CDR1을 치환한다.

[0222] 항-ED-A 항체 C5 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 42)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 46이 H1의 VL CDR1을 치환한다.

[0223] 항-ED-A 항체 D5 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 52)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 56이 H1의 VL CDR1을 치환한다.

[0224] 항-ED-A 항체 E5 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 62)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 66이 H1의 VL CDR1을 치환한다.

[0225] 항-ED-A 항체 C8 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 72)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 76이 H1의 VL CDR1을 치환한다.

[0226] 항-ED-A 항체 F8 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 82)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 86이 H1의 VL CDR1을 치환한다. 항-ED-A F8 디아바디의 VL 도메인은 항-ED-A 항체 F8의 VL 도메인 (즉, 서열 82)과 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0227] 항-ED-A 항체 F1 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 92)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 96이 H1의 VL CDR1을 치환한다.

[0228] 항-ED-A 항체 B7 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 102)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 106이 H1의 VL CDR1을 치환한다.

[0229] 항-ED-A 항체 E8 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 112)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 116이 H1의 VL CDR1을 치환한다.

[0230] 항-ED-A 항체 G9 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열 32)은 항-ED-A 항체 H1의 VL 도메인의 아미노산 서열과 동일하되, 서열 36이 H1의 VL CDR1을 치환한다.

[0231] 임의로, 항-ED-A 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 및 scFv F8 디아바디의 VH 도메인의 위치 5의 아미노산은 도 4A에 도시된 바와 같이 발린 잔기 (V)가 아니라 류신 잔기 (L)일 수 있다. 추가로 또는 별법으로, 항-ED-A 항체 H1, B2, C5, D5, E5, C8, F8, F1, B7, E8, G9 및 scFv F8 디아바디의 VL 도메인의 위치 18의 아미노산은 도 4C에 도시된 바와 같이 라이신 잔기 (K)가 아니라 아르기닌 잔기 (R)일 수 있다.

[0232] *F8-IL10의 클로닝, 생산 및 특성 결정*

[0233] 인간 IL-10 유전자를 다음 프라이머 서열을 사용하여 PCR에 의해 증폭하여 그의 N-말단에 15개 아미노산 링커 (SSSSG)3의 일부 및 그의 C-말단에 정지 코돈 및 NotI 제한 부위를 부가하였다:

[0234] 역방향 안티센스 프라이머

[0235] 5'-TCGGGTAGTAGCTCTTCCGGCTCATCGTCCAGCGGCAGCCCAGGCCAGGGCACC-3'; 및

[0236] 전방향 센스 프라이머

[0237] 5'-TTTTCCTTTTGCGGCCGCtcattaGTTTCGTATCTTCATTGTCATGTA-3'

[0238] 단일쇄 가변 단편 (F8)을 코딩하는 DNA는 다음 프라미어 쌍을 사용하여 신호 펩티드와 함께 증폭하였다:

[0239] 역방향 안티센스 프라이머

[0240] 5'-CCCAAGCTTGTCGACCATGGGCTGGAGCC-3' ; 및

[0241] 전방향 센스 프라이머

5'-
GAGCCGGAAGAGCTACTACCCGATGAGGAAGAGAATTCTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTG-
[0242] 3'.

[0243] 상기 전략을 사용하여, HindIII 제한 부위가 N-말단에 삽입되고, 링커 서열의 상보성 부분이 C-말단에 삽입되었다.

[0244] 이어서, 단일쇄 Fv 및 IL-10 단편을 PCR을 사용하여 조립하고, 포유동물 세포-발현 벡터 pcDNA3.1(+)의 HindIII 및 NotI 제한 부위 내로 클로닝하였다.

[0245] CHO-S 세포를 상기 플라스미드로 안정적으로 형질감염시키고, G418 (0.5 g/l)의 존재 하에 선택을 수행하였다.

[0246] 검출을 위해 항원으로서의 인간 피브로넥틴의 재조합 EDA 및 단백질 A를 사용하여 ELISA에 의해 G418-내성 세포의 클론을 융합 단백질의 발현에 대해 스크리닝하였다.

[0247] 융합 단백질을 단백질 A 컬럼 상에서 친화도 크로마토그래피에 의해 세포 배양 배지로부터 정제하였다.

[0248] 융합 단백질의 크기는 SDS-PAGE에 의해 환원 및 비-환원 조건에서 및 수퍼덱스 S-200 배제 컬럼 (아머샴 파마시아 바이오테크 (Amersham Pharmacia Biotech, 스위스 뒤벤도르프)) 상의 FPLC 겔 여과에 의해 천연 조건에서 분석하였다.

[0249] *활성 분석*

[0250] hIL10의 생물학적 활성은 비색 MTT 염료-환원 분석을 사용하여 MC/9 세포의 IL-4 의존 증식을 유도하는 그의 능력에 의해 결정하였다 (Thompson et al., 1991). 96-웰 미량역가 플레이트 내의 5 pg (0.05 단위)의 쥐 IL4/ml (이바이오사이언시스 (eBiosciences))를 함유하는 200 ㎕의 배지 내의 10.000 MC/9 (ATCC, 미국 매나사스) 세포/웰을 48 hr 동안 상이한 농도의 인간 IL10으로 처리하였다. hIL10 표준품 및 F8-IL10 융합 단백질을 최대 100 ng/ml의 IL10 동등물로 사용하고, 연속 희석하였다. 10 ㎕의 5 mg/ml MTT (시그마)를 첨가하고, 3-5 hr 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 원심분리하고, DMSO로 용해시키고, 570 nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0251] *참고 문헌*

[0252] 상기 인용된 것을 포함하여 본 명세서에 인용되는 모든 참고 문헌은 그 전체가 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

Amit et al. (1986), Science, 233:747-753.
Andersen et al. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117
Ausubel et al. (1999) 4th eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons.
Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922
Balza et al. (1988), *FEBS Lett.*, *228*: 42-44.
Batista et al. J. Exp. Med., *184:* 2197-205, 1996.
Berndt et al. *Histochem Cell Biol* 1998, 109(3):249-255.
Birchler et al. (1999), J. Immunol. Methods, *231*, 239-248.
Bird et al. (1988) Science, 242, 423-426
Borsi et al. (1987), J. Cell. Biol., *104*, 595-600.
Borsi et al. (1990), *FEBS Lett.*, *261:* 175-178.
Borsi et al. (1995), J. Biol.Chem., *270:* 6243-6245.
Borsi et al. (1998), Exp. Cell Res., *240*, 244-251.
Borsi et al. (2000) *Int J Cancer*, 102(1):75-85.
Brack et al. (2006), Clin. Cancer Res., *12*, 3200-3208.
Carnemolla et al. (1989), J. Cell. Biol., *108*: 1139-1148.
Caton et al. (1990), J. Immunol., 144:1965-1968.
Chadd et al. (2001), Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194
Chothia et al. (1987), J. Mol. Biol., 196:901-917.

[0253]

Chothia et al. (1989), Nature, 342:877- 883.
Courtney et al. (1980) Nature, 14;283(5748):666-8.
Devos et al. (1983), Nucl. Acids Res. 11: 4307-4323.
ffrench-Constant (1995), Exp. Cell Res., *221*, 261-271.
Giovannoni, Nucleic. Acid Research, 2001, 29(5):E27.
Glennie M J et al., 1987 J. Immunol. 139, 2367-2375
Haan et al. (2004), BioCentury, 12(5): A1-A6.
Hanahan et al. (2000), Cell *100*, 57-70.
Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988
Heikinheimo et al. (1991), Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol., *61*, 101-109.
Holliger and Bohlen 1999 Cancer and metastasis rev. 18: 411-419.
Holliger et al. (1993a), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448.
Holliger et al. (1993b), Current Opinion Biotechnol 4, 446-449.
Holt et al. (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490.
Hoogenboom et al. (1991), Nucleic Acids Res., 19 (15) 4133-7.
Hu et al. (1996), Cancer Res., 56, 3055-3061.
Huston et al. (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883.
Hynes, R.O. (1990). Fibronectins (New York: Springer-Verlag).
Jacobs et al. (2002), Hum. Pathol., *33*, 29-38.
Kabat et al. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services.
Kabat et al. (1991a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington. (a)
Kabat et al. (1991b), J. Immunol., 147:1709-1719.
Kaspar et al. (2006), Int. J. Cancer, *118*, 1331-1339.
Knappik et al., (2000) J. Mol. Biol. 296, 57-86.
Koch et al. *Ann Rheum Dis* 2003, 62 Suppl 2:ii60-67.
Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975
Koide et al. (1998), Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151.
Kontermann et al. (2001), S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; ISBN: 3540413545.
[0254] Kornblihtt et al. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868.

Koukoulis et al. (1993), J. Submicrosc. Cytol. Pathol., *25*, 285-295.
Koukoulis et al. (1995), Ultrastruct. Pathol., *19*, 37-43.
Krebs et al. (2001), Journal of Immunological Methods, 254 67-84.
Kriegsmann et al.(2004) *Rheumatol Int*, 24(1):25-33.
Larrick JW and Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418.
Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664
Li et al. Protein Engineering, *10*: 731-736, 1997
Lohi et al. (1995), Int. J. Cancer, *63*, 442-449.
Maeda et al. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 115: 1040-1047;
Matsumoto et al. (1999), Jpn. J. Cancer Res., *90*, 320-325.
McCafferty et al., (1990) Nature, 348, 552-554.
Mendez, M. et al., (1997) Nature Genet, 15(2): 146-156.
Merchand et al., 1998 Nature Biotech. 16:677-681
Neri, D., and Bicknell, R. (2005), Nat Rev Cancer *5*, 436-446.
Nygren et al. (1997), Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469.
Oyama et al. (1989), J. Biol. Chem., *264*, 10331-10334.
Paolella et al. (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3545-3557.
Pini et al. (1998), J. Biol. Chem., *273*, 21769-21776.
Plückthun (1991), Bio/Technology 9: 545-551.
Reiter et al. (1996), Nature Biotech, 14, 1239-1245.
Repp et al., 1995 J. Hemat. 377-382.
Ridgeway et al. (1996), Protein Eng., 9, 616-621.
Robinson ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
Roesli et al. (2006), Nature Protocols, *1*, 192-199.
Ruf et al. (1991) J. Biol. Chem. 226: 15719-15725.
Rybak et al. (2005), Nat. Methods, *2*, 291-298.
Rybak et al. (2006), ChemMedChem., *2*,22-40.
Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
Scarpati et al. (1987) Biochemistry 26: 5234-5238.
Scarpino et al. (1999) J. Pathol. *188*, 163-167.
Scheurer et al. (2005), Proteomics *5*, 3035-3039.

[0255]

Segal et al. (1974), PNAS, 71:4298-4302.
Sharon et al. (1990a), PNAS, 87:4814-4817.
Sharon et al. (1990b), J. Immunol., 144:4863-4869.
Silacci et al. (2003), Proteomics, 5, 2340-2350.
Staerz U. D. and Bevan M. J. 1986 PNAS 83
Suresh et al. (1986) Method Enzymol. 121: 210-228
Taniguchi et al. (1983) Nature 302, 305-310;
Tarli et al. *Blood* 1999, 94(1):192-198.
Tavian et al. (1994), Int. J. Cancer, *56*, 820-825.
Taylor, *Arthritis Res* 2002, 4 Suppl 3:S99-107.
Terrana et al. (1987), Cancer Res. *47*, 3791-3797.
Thompson et al. (1991), J Exp Med, **173**:507-510.
Thorpe (2004), Clin. Cancer Res., *10*, 415-427.
Trachsel et al. (2006), Adv. Drug Deliv. Rev., *58*, 735-754.
Trachsel et al. *Arthritis Res Ther* 2007, 9(1):R9.
Viti et al. (2000), Methods Enzymol., *326*, 480-505.
Walsh et al. (1998) *Am J Pathol*, 152(3):691-702.
Ward et al. (1989), Nature 341, 544-546.
Wess In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004.

[0256]

표 1

항-ED-A 친화도 증진된 항체의 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL) CDR1의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열

[0257]

항체	CDR1 (VH)	CDR1 (VL)
H1	CCG CGG AGG P R R (서열 : 3)	TCT GCG TGG S A W (서열 : 6)
B2	GCG GCT AAG A A K (서열 : 23)	GTG GCT TTT V A F (서열 : 26)
C5	CCG ATT ACT P I T (서열 : 43)	TTG CAT TTT L H F (서열 : 46)
D5	GTG ATG AAG V M K (서열 : 53)	AAT GCT TTT N A F (서열 : 56)
E5	ACT GGT TCT T G S (서열 : 63)	CTT GCG CAT L A H (서열 : 66)
C8	CTT CAG ACT L Q T (서열 : 73)	CTT CCT TTT L P F (서열 : 76)
F8	CTG TTT ACG L F T (서열 : 83)	ATG CCG TTT M P F (서열 : 86)
F1	TAG GCG CGT Q(Amber) A R (서열 : 93)	GCG CCT TTT A P F (서열 : 96)
B7	CAT TTT GAT H F D (서열 : 103)	CTG GCT TTT L A F (서열 : 106)
E8	GAT ATG CAT D M H (서열 : 113)	TCG TCT TTT S S F (서열 : 116)
G9	CAT ATG CAG H M Q (서열 : 33)	ACT GCT TTT T A F (서열 : 36)

표 2

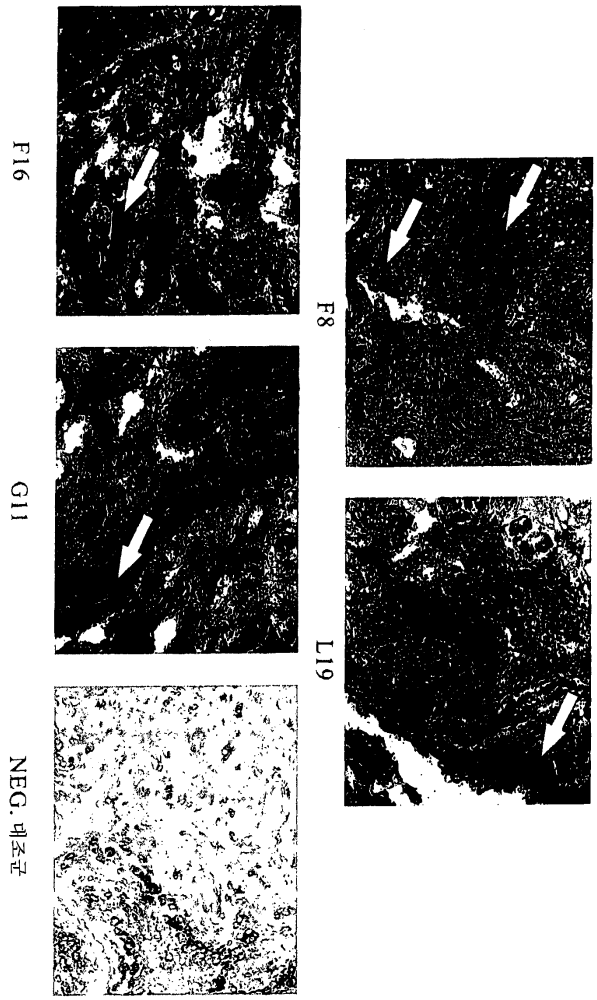
BIAcore 평가 데이타

[0258]

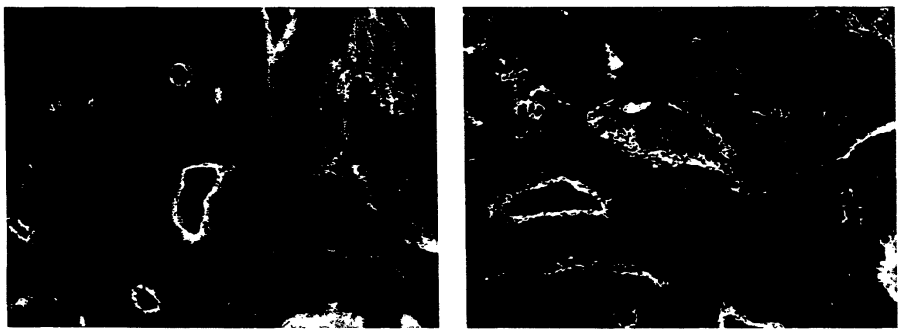
항체	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
모 항-ED-A 항체	2.5×10^5	0.02	$\sim 1 \times 10^{-7}$
B2	3.8×10^5	7.54×10^{-3}	$\sim 2 \times 10^{-8}$
C5	3.04×10^5	9.23×10^{-3}	$\sim 3 \times 10^{-8}$
D5	4.53×10^5	7.6×10^{-3}	$\sim 1.7 \times 10^{-8}$
C8	3.8×10^5	5.3×10^{-3}	$\sim 1.4 \times 10^{-8}$
F8	4.65×10^5	1.4×10^{-3}	$\sim 3.1 \times 10^{-9}$
B7	2.67×10^5	4.5×10^{-3}	$\sim 1.68 \times 10^{-8}$
G9	3.6×10^5	7.54×10^{-3}	$\sim 2.09 \times 10^{-8}$

도면

도면1



도면2



도면3

```
A       1 NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQ
          ****************************************** ********* ******
B       1 NIDRPKGLAFTDVDVDSIKIAWESPQGQVSRYRVTYSSPEDGIRELFPAPDGEDDTAELQ

A      61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQST
          ************************** ***
B      61 GLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGIQST
```

도면4

도 4A

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTT
TAGCCCGCGGAGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA
CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTC
ATTTGTATCTTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCGAGT

도 4B

GGCGGTGGAGGTTCTGGCGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGAGGTT
CCGGGGGTGGAGGATCT

도 4C

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC
CAGGGGAAAAAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT
TAGCTCTGCGTGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG
GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
GCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG
TATTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCGGCC
AAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGCGGCCGCAGAACAAAAACT
CATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGGGCCGCATAGACTGTGAAA

도면5

도 5A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPRRMSWVRQ
APGKGLEWVSAI*SGSGGS*TYYADSVKGRFTISRDNSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAK**STHLYL**FDYWGQGTLVTVS
S

도 5B

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

도 5C

EIVLTQSPGTLSLSPGEKATLSCRASQSVSSAWLAWYQQ
KPGQAPRLLIY*GASSRAT*GIPDRFSGSGSGTDFTLTISR
LEPEDFAVYYCQQ**MRGRPP**TFGQGTKVEIKAAAEQKLIS
EEDLNGAA

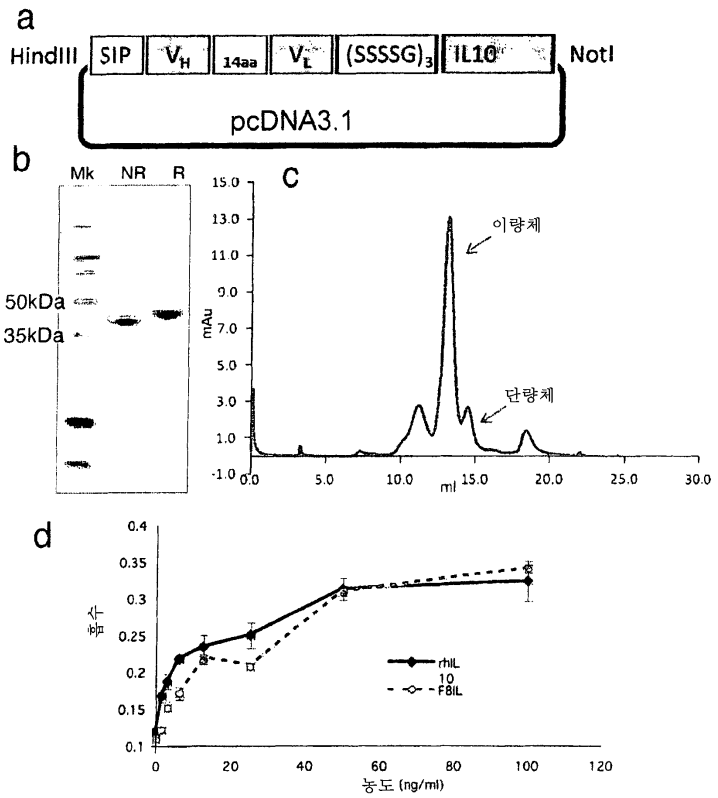
도면6

AAGCTTGTCGACCATGGGCTGGAGCCTGATCCTCCTGTTCCTCGTCGCTGTGG
CTACAGGTAAGGGGCTCACAGTAGCAGGCTTGAGGTCTGGACATATATATGGG
TGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTGCACTCGGAGGTGCA
GCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCCTGTTTACGATGAGCTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGT
GGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG
ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA
CACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGTACTCATTTGTATCTTTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTggtggaggcggttcaggcggaggtggc
tctggcggtggcggaGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT
CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCATGC
CGTTTTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT
CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGT
GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATT
TTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGATGCGTGGTCGGCCGCCGACGTTCGGCCA
AGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGAATTCTCTTCCTCATCGGGTAGTAGCTCTT
CCGGCTCATCGTCCAGCGGCAGCCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAG
CTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCCGAGATG
CCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGCTGGACAACTTGT
TGTTAAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCT
TGTCTGAGATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCCAAGCTGAGAAC
CAAGACCCAGACATCAAGGCGCATGTGAACTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGAC
CCTCAGGCTGAGGCTACGGCGCTGTCATCGATTTCTTCCCTGTGAAAACAAGA
GCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGC
ATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAGCCTACA
TGACAATGAAGATACGAAACtaatgaGCGGCCGC

도면7

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS LFTMSWVRQA PGKGLEWVSA
ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKST
HLYLFDYWGQ GTLVTVssgg ggsggggsgg ggEIVLTQSP GTLSLSPGER
ATLSCRASQS VSMPFLAWYQ QKPGQAPRLL IYGASSRATG IPDRFSGSGS
GTDFTLTISR LEPEDFAVYY CQQMRGRPPT FGQGTKVEIK Efssssgsss
sgssssgSPG QGTQSENSCT HFPGNLPNML RDLRDAFSRV KTFFQMKDQL
DNLLLKESLL EDFKGYLGCQ ALSEMIQFYL EEVMPQAENQ DPDIKAHVNS
LGENLKTLRL RLRRCHRFLP CENKSKAVEQ VKNAFNKLQE KGIYKAMSEF
DIFINYIEAY MTMKIRN

도면8



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Philogen S.p.A.

KASPAR, Manuela

SCHWAGER, Kathrin

TRACHSEL, Eveline

<120> An Antigen Associated With Rheumatoid Arthritis

<130> SMWFP6580872

<150> US 60/983,606

<151> 2007-10-30

<160> 147

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody

H1 heavy chain (VH)

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Arg

20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody

H1 light chain (VL)

<400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala

20 25 30

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

<210> 3

<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1 of anti-ED-A antibody H1
<400> 3
Pro Arg Arg
1

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR2 of anti-ED-A antibody H1
<400> 4
Ser Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220

><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR3

of anti-ED-A antibody H1

<400> 5

Ser Thr His Leu Tyr Leu

1 5

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1

of anti-ED-A antibody H1

<400> 6

Ser Ala Trp

1

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR2

of anti-ED-A antibody H1

<400> 7

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR3

of anti-ED-A antibody H1

<400> 8

Met Arg Gly Arg Pro Pro

1 5

<210> 9

<400> 9

000

<210> 10

<400> 10

000

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody

H1 linker sequence

<400> 11

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> 12

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Nucleotide sequence of the anti-ED-A antibody

H1 heavy chain (VH)

<400> 12

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc ccgcggagga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtact 300

catttgtatc tttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354

<210> 13

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Nucleotide sequence of the anti-ED-A antibody

H1 light chain (VL)

<400> 13

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aaaagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc tctgcgtggt tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagatgcgtg gtcggccgcc gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaagcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 360

ctgaatgggg ccgcatagac tgtgaaa 387

<210> 14

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Nucleotide sequence of the anti-ED-A antibody

H1 linker sequence

<400> 14

ggcggtggag gttctggcgg cggtggcagt ggcggtggag gttccggggg tggaggatct 60

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Phe Leu Thr Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Ala Pro

1 5 10 15

Arg

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Partially degenerate primer

<220><221> misc_feature

<222> 27, 28, 30, 31, 33, 34

<223> n is a or g or c or t

<400> 17

ctggagcctg gcggacccag ctcatmnnmn nmnngctaaa ggtgaatcca ga 52

<210> 18

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Partially degenerate primer

<220><221> misc_feature

<222

> 28, 29, 31, 32, 34, 35

<223> n is a or g or c or t

<400> 18

ccaggtttct gctggtacca ggctaamnnm nnmnngctaa cactctgact ggccctgc 58

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Primer LMB3long

<400> 19

caggaaacag ctatgaccat gattac 26

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Primer fdseqlong

<400> 20

gacgttagta aatgaatttt ctgtatgagg 30

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody B2 VH domain

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala
20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody B2 VL domain

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Val Ala

20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu

100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala

115 120 125

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1 of anti-ED-A antibody B2

<400> 23

Ala Ala Lys

1

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

<400> 25

000

<210> 26

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1 of anti-ED-A antibody B2

<400> 26

Val Ala Phe

1

<210> 27

<400> 27

000

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Linker sequence of F8 diabody

<400> 28

Gly Ser Ser Gly Gly

1 5

<210> 29

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223

> Synthetic sequence: Linker sequence of F8 diabody

<400> 29

gggtccagtg gcggt 15

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody G9 VH domain

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Met

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

85 90 95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody G9 VL domain

<400> 32

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu

100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala

115 120 125

<210> 33

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1

of anti-ED-A antibody G9

<400> 33

His Met Gln

1

<210> 34

<400> 34

000

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1

of anti-ED-A antibody G9

<400> 36

Thr Ala Phe

1

<210> 37

<400> 37

000

<210> 38

<400> 38

000

<210> 39

<400> 39

000

<210> 40

<400> 40

000

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213

> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody
C5 VH domain

<400> 41

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Ile
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody C5 VL domain

<400> 42

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu His

20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu

100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala

115 120 125

<210> 43

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1 of anti-ED-A antibody C5

<400> 43

Pro Ile Thr

1

<210> 44

<400> 44

000

<210> 45

<400> 45

000

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1 of anti-ED-A antibody C5

<400> 46

Leu His Phe

1

<210> 47

<400> 47

000

<210> 48

<400> 48

000

<210> 49

<400> 49

000

<210> 50

<400> 50

000

<210> 51

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody D5 VH domain

<400> 51

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Met

20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 52

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody

D5 VL domain

<400> 52

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ala

20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

<210> 53

<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1 of anti-ED-A antibody D5
<400> 53
Val Met Lys
1

<210> 54
<400> 54
000

<210> 55
<400> 55
000

<210> 56
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1 of anti-ED-A antibody D5
<400> 56
Asn Ala Phe
1

<210> 57

<400> 57

000

<210> 58

<400> 58

000

<210> 59

<400> 59

000

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody E5 VH domain

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Gly
20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 62

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody E5 VL domain

<400> 62

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala

20 25 30

His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu

100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala

115 120 125

<210> 63

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1 of anti-ED-A antibody E5

<400> 63

Thr Gly Ser

1

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<400> 65

000

<210> 66

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1 of anti-ED-A antibody E5

<400> 66

Leu Ala His

1

<210> 67

<400> 67

000

<210> 68

<400> 68

000

<210> 69

<400> 69

000

<210> 70

<400> 70

000

<210> 71

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody

C8 VH domain

<400> 71

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Gln
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody

C8 VL domain

<400> 72

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 73
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1 of anti-ED-A antibody C8
<400> 73
Leu Gln Thr
1
<210> 74
<400> 74
000
<210> 75
<400> 75
000
<210> 76
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1 of anti-ED-A antibody C8

<400> 76

Leu Pro Phe

1

<210> 77

<400> 77

000

<210> 78

<400> 78

000

<210> 79

<400> 79

000

<210> 80

<400> 80

000

<210> 81

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody F8 VH domain

<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 Phe Thr Phe Ser Leu Phe
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 82

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody F8 VL domain

<400> 82

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro

20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu

100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala

115 120 125

<210> 83

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1

of anti-ED-A antibody F8

<400> 83

Leu Phe Thr

1

<210> 84

<400> 84

000

<210> 85

<400> 85

000

<210> 86

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1

of anti-ED-A antibody F8

<400> 86

Met Pro Phe

1

<210> 87

<400> 87

000

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<400> 89

000

<210> 90

<400> 90

000

<210> 91

<211> 118

<212> PRT

<213

> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody F1 VH domain

<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 Phe Thr Phe Ser Gln Ala
20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 92

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody F1 VL domain

<400> 92

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ala Pro
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu

100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala

115 120 125

<210> 93

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1 of anti-ED-A antibody F1

<400> 93

Gln Ala Arg

1

<210> 94

<400> 94

000

<210> 95

<400> 95

000

<210> 96

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1

of anti-ED-A antibody F1

<400> 96

Ala Pro Phe

1

<210> 97

<400> 97

000

<210> 98

<400> 98

000

<210> 99

<400> 99

000

<210> 100

<400> 100

000

<210> 101

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody B7 VH domain

<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 Phe Thr Phe Ser His Phe

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 102

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody

B7 VL domain

<400> 102

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

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

<210> 103

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1 of anti-ED-A antibody B7

<400> 103

His Phe Asp

1

<210> 104

<400> 104

000

<210> 105

<400> 105

000

<210> 106

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1 of anti-ED-A antibody B7

<400> 106

Leu Ala Phe

1

<210> 107

<400> 107

000

<210> 108

<400> 108

000

<210> 109

<400> 109

000

<210> 110

<400> 110

000

<210> 111

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody E8 VH domain

<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 Phe Thr Phe Ser Asp Met
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 112

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the anti-ED-A antibody E8 VL domain

<400> 112

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

Glu Lys Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu

100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala

115 120 125

<210> 113

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the heavy chain CDR1 of anti-ED-A antibody E8

<400> 113

Asp Met His

1

<210> 114

<400> 114

000

<210> 115

<400> 115

000

<210> 116

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Amino acid sequence of the light chain CDR1

of anti-ED-A antibody E8

<400> 116

Ser Ser Phe

1

<210> 117

<400> 117

000

<210> 118

<211> 90

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro

35 40 45

Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr

85 90

<210> 119

<211> 90

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 119

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro
35 40 45

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

<210> 120

<211> 288

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Antigen (11A12) containing the ED-A domain of human fibronectin

<400> 120

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

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

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

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

Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly
260 265 270
Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Arg Ser His His His His His His
275 280 285

<210> 121
<211> 867
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: Nucleotide sequence of antigen (11A12)
<400> 121
atgagatcct accgaacaga aattgacaaa ccatcccaga tgcaagtgac cgatgttcag 60
gacaacagca ttagtgtcaa gtggctgcct tcaagttccc ctgttactgg ttacagagta 120

accaccactc ccaaaaatgg accaggacca acaaaaacta aaactgcagg tccagatcaa 180
acagaaatga ctattgaagg cttgcagccc acagtggagt atgtggttag tgtctatgct 240
cagaatccaa gcggagagag tcagcctctg gttcagactg cagtaaccaa cattgatcgc 300
cctaaaggac tggcattcac tgatgtggat gtcgattcca tcaaaattgc ttgggaaagc 360

ccacaggggc aagtttccag gtacagggtg acctactcga gccctgagga tggaatccat 420

gagctattcc ctgcacctga tggtgaagaa gacactgcag agctgcaagg cctcagaccg 480

ggttctgagt acacagtcag tgtggttgcc ttgcacgatg atatggagag ccagcccctg 540

attggaaccc agtccacagc tattcctgca ccaactgacc tgaagttcac tcaggtcaca 600

cccacaagcc tgagcgccca gtggacacca cccaatgttc agctcactgg atatcgagtg 660

cgggtgaccc ccaaggagaa gaccggacca atgaaagaaa tcaaccttgc tcctgacagc 720

tcatccgtgg ttgtatcagg acttatggtg gccaccaaat atgaagtgag tgtctatgct 780

cttaaggaca ctttgacaag cagaccagct cagggagttg tcaccactct ggagaatgtc 840

agatctcatc accatcacca tcactaa 867

<210> 122

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody H1

<400> 122

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 Ser Pro Arg

20 25 30

Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 123

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody B2

<400> 123

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 Ser Ala Ala
20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 124

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody C5

<400> 124

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 Ser Pro Ile
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 125

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody D5

<400> 125

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 Ser Val Met

20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 126

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody E5

<400> 126

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 Ser Thr Gly

20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 127

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody C8

<400> 127

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 Ser Leu Gln
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 128
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody F8
<400> 128
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 Ser Leu Phe
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 129
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody F1

<400> 129
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 Ser Gln Ala
20 25 30
Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody B7

<400> 130

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 Ser His Phe
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 131

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody E8

<400> 131

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 Ser Asp Met
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 132
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VH domain of anti-ED-A antibody G9
<400> 132
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 Ser His Met
20 25 30
Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Thr His Leu Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 133
<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody H1

<400> 133

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 134

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody B2

<400> 134

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Val Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 135
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody C5
<400
> 135

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

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

<210> 136

<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody D5
<400> 136

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

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 137
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody E5
<400> 137

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

20 25 30

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

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 138
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody C8
<400> 138

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125
<210> 139
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody F8
<400
> 139
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Met Pro
20 25 30
Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125
<210> 140

<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody F1
<400> 140

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

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125
<210> 141
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody B7
<400> 141
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Leu Ala
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 142
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody E8
<400> 142
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro
85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu
100 105 110
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
115 120 125

<210> 143
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: VL domain of anti-ED-A antibody G9

<400

> 143

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ala

20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Arg Gly Arg Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Ala Ala Glu

100 105 110

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala

115 120 125

<210> 144

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Primer

<400> 144

tcgggtagtagctcttccggctcatcgtccagcggcagcccaggccagggcacc 54

<210> 145

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Primer

<400> 145

ttttccttttgcggccgctcattagtttcgtatcttcattgtcatgta 48

<210> 146

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Primer

<400> 146

cccaagcttgtcgaccatgggctggagcc 29

<210> 147

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic sequence: Primer

<400> 147

gagccggaagagctactacccgatgaggaagagaattctttgatttccaccttggtcccttg 62

2

51

1

1